

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
Természettudományi és Informatikai Kar
Genetikai Tanszék

Tudományos Diákköri Dolgozat
XXXII. OTDK Biológia szekció

Az Rybp polikomb fehérje szerepének vizsgálata a szívizom kialakulásában

Készítette: **Vajda Flóra**
Biomérnöki BSc szakos hallgató; IV. évfolyam

Témavezető: **Dr. Purity Melinda**
MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Konzulens: **Dr. Sinka Rita**
SZTE TTIK Genetikai Tanszék

Szeged
2015

1. TARTALMI ÖSSZEFOGLALÓ

Szívinfarktus során az oxigén nélkül maradt szívizomszövetek elpusztulnak és helyükön egy hegszövet alakul ki. Több kutatócsoport, köztük laboratóriumunk is azt vizsgálja, hogy pluripotens őssejtekből, - melyek a test bármely típusú szövetévé képesek differenciálódni - hogyan hozhatók létre differenciált és működőképes szívizomsejtek. Dolgozatom egy polikomb fehérje, az Rybp (Ring1- and YY1-Binding Protein; szintén ismert, mint DEDAF (Death Effector Domain Associated Factor), UniGene Mm.321633; MGI:1929059) fenti folyamatban betöltött specifikus szerepét vizsgálja egér őssejtes modellrendszerben. Kísérleteimet a laboratóriumunkban korábban előállított *rybp* vad típusú (*rybp*^{+/+}) és Rybp termelésére képtelen (*rybp*^{-/-}) egér embrionális őssejtvonalakon végeztem. A sejtekből embrionális testecskéket (Embryoid Body; EB) formáltam függőcseppes módszerrel, majd a sejtaggregátumokat zselatinos táptalajra helyeztem, hogy azok dobogó szívizomtelepeket (kardiomiocita) formáljanak 2 héten keresztül. A szívizomtelepeket morfológiailag és molekuláris biológiai módszerekkel (kvantitatív Real-Time polimeráz láncreakció [qRT-PCR]; Immunhisztokémia [IHC]) hasonlítottam össze. Eredményeim azt mutatják, hogy *rybp*^{-/-} őssejtek nem képesek dobogó szívizomtelepeket létrehozni. A szívizomtelepekből nyert RNS minták analízise rávilágított számos, a szívizom kialakulásában fontos gén expressziós szintjének a megváltozására. Munkámmal kimutattam azt is, hogy a szív kialakulásában esszenciális jelentőséggel bíró transzkripció faktorok közül több (Isl1, Nkx2.5) az *in vitro* kardiális differenciáció során csökkent mértékben indukálódik az Rybp termelésére képtelen sejtekben. Mindezen eredmények valószínűsítik, hogy az Rybp a szívirányú differenciáció egy kritikus regulátora. Így a projekt során keletkezett adatok fontos információt nyújtanak az egér embrionális szív kialakulásáról és működéséről, valamint segíthetnek megérteni, hogy mely mutációk befolyásolják az embrió megfelelő fejlődését és a veleszületett szívbetegségek kialakulását. A szívfejlődési rendellenességek a szívfejlődés korai stádiumában létrejövő defektusok miatt alakulnak ki, ezért fontos, hogy megértsük, mely molekuláris útvonalak állnak a sejtdifferenciáció hátterében és a folyamatokat, amelyek ezt a szervet kialakítják. Dolgozatomban leírt vizsgálatok eredményei ennek a gyorsabb és pontosabb megismerését segítik elő és hozzájárulhatnak a szívinfarktus következtében elhalt szövetek őssejtekből történő pótlásához, így a szívizomszövet regenerálásához is.

Kulcsszavak: őssejt, Rybp, *in vitro* kardiális differenciáció

2. TARTALOMJEGYZÉK

1. TARTALMI ÖSSZEFOGLALÓ	1
2. TARTALOMJEGYZÉK	2
3. CÉLKITŰZÉSEK	3
4. BEVEZETÉS	4
4.1. Össejtek	4
4.2. Az <i>rybp</i> gén és az Rybp fehérje	4
4.3. A szívizom kialakulása az embrionális fejlődés során	5
4.4. Aszkorbinsav (ASC) hatása a szívizom irányú differenciációra	5
4.5. <i>In vitro</i> szívizom irányú differenciáció	6
5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	7
5.1. Össejtvonalak	7
5.2. Össejtek tenyésztése	8
5.3. Embryoid body képzés függőcseppes módszerrel és <i>in vitro</i> szívizom irányú differenciáció	9
5.4. ASC indukció	10
5.5. Kvantitatív RT-PCR (qRT-PCR)	10
5.6. Immunhisztokémia (IHC)	11
6. KÍSÉRLETEK ÉS EREDMÉNYEK	12
6.1. Az <i>rybp</i> ^{+/+} , <i>rybp</i> ^{-/-} genotípusú sejtekből spontán differenciációval és indukció hatására létrejövő szívizomtelepek morfológiai összehasonlítása	12
6.2. Az <i>rybp</i> ^{+/+} , <i>rybp</i> ^{-/-} genotípusú szívizomtelepek génexpressziójának vizsgálata (qRT-PCR)	14
6.3. Az <i>rybp</i> ^{+/+} , <i>rybp</i> ^{-/-} és <i>Tg^{rybp}</i> genotípusú szívizomtelepek fehérje szintű (IHC) analízise	23
7. ÖSSZEFOGLALÁS	27
8. MELLÉKLETEK	28
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	29
10. NYILATKOZAT	30
11. TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS	30
12. TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	31
13. REFERENCIÁK	33

3. CÉLKITŰZÉSEK

A dolgozatomban megírásához a Szegedi Biológiai Kutatóközpont (SZBK), Genetikai Intézet, Embrionális és Indukált Össejt Csoportja biztosított helyet. A laboratórium a polikomb családba tartozó Rybp polikomb (PcG) fehérje emlősök embrionális fejlődésében betöltött szerepét vizsgálja a laboratóriumban korábban előállított vad típusú (R1; *rybp*^{+/+}), *rybp* homozigóta null mutáns (D11; *rybp*^{-/-}) és *rybp* transzgenikus (C8; *Tg^{rybp}*) egér embrionális őssejtvonalak segítségével. Korábbi eredmények azt bizonyítják, hogy az *rybp* gén alapvető fontosságú a szem és az idegrendszer kifejlődésében. Dolgozatomban a fenti három őssejtvonalat felhasználva modelleztem a szívizomtelepek kialakulását és vizsgáltam az *rybp* gén szívizom irányú differenciációban betöltött szerepét. Kísérleteim alapjául az az előzetes megfigyelés szolgált, hogy a megváltozott Rybp termelés hatással van a szívizom irányú differenciációra.

A dolgozatban bemutatott eredmények a három sejtvonal közötti morfológiai, transzkripció és fehérje szintű összehasonlításokat mutatják be: kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakcióval a kardiális gének expressziójának vizsgálatát, immunhisztokémia módszerekkel pedig a specifikusan kimutatott fehérjék sejtszintű elemzését végeztem.

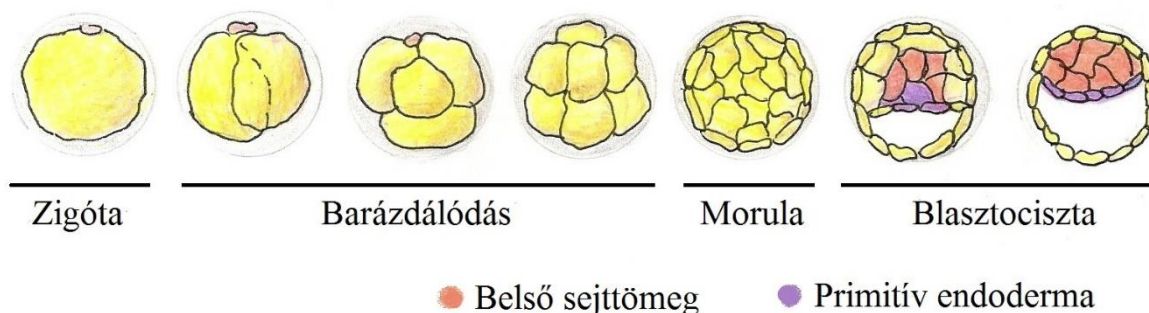
TDK dolgozatomban célja tehát az Rybp kardiális differenciációban betöltött szerepének vizsgálata és a folyamatot szabályozó mechanizmusok tanulmányozása.

4. BEVEZETÉS

4.1. ÖSSEJTEK

Az őssejtek fő jellemzői a következők: (i) pluripotencia, (ii) önmegújító képesség (iii) és hogy képesek a szervezet bármely sejttypusát létrehozni.

Az őssejteket eredetük szerint 3 fő csoportba soroljuk: az **embrionális őssejtek** (Embryonic Stem Cells, ESC) a szeder vagy hólyagcsíra (morula/blasztociszta) állapotú embrióból (*1.ábra*), **feelnőtt őssejtek** pedig felnőtt szövetekből pl. csontvelőből, vérből vagy köldökzsinórból nyerhetők ki; ezzel szemben az úgynevezett **indukált pluripotens őssejtek** (Induced Pluripotent Stem Cells, iPSC) testi sejtek újraprogramozásával állíthatók elő. Az első egér embrionális őssejtvonalat 1981-ben [1], a humánt 1988-ban izolálták [2]. Az első egér iPSC sejt vonalat 2006-ban, a humánt pedig 2007-ben hozták létre [3].



1.ábra. A korai embrionális fejlődés stádiumai

Az őssejtek laboratóriumi körülmények közt fenntarthatóak, önmegújuló képességüket ez idő alatt is megőrzik. Másik fontos tulajdonságuk az, hogy amennyiben a tenyésztési feltételeket valamilyen irányban megváltoztatjuk, a sejtek a legkülönbözőbb specializálódott sejttypusokká (pl.: neuron, szívmusculus, májsejt) differenciálódnak. Munkámban az *rybp* vad típusú és *rybp* mutáns őssejtek spontán és aszkorbinsavval indukált kardiális differenciációját vizsgáltam.

4.2. AZ RYBP GÉN ÉS AZ RYBP FEHÉRJE

Az *rybp* gén elnevezése a vele kölcsönhatásba lépő két interakciós fehérje partner rövidítéséből származik (Rybp: Ring1 and YY1 binding protein vagy DEDAF: Death Effector Domain Associated Factor). Az YY1 (Ying Yang 1) polikomb fehérje esszenciális a szív kialakulásához (Circulation Research 2013), míg a Ring1 (Ring finger protein 1) polikomb fehérje szerepe a szív kialakulásában ez idáig még nem tisztázott [4,5]. Az *rybp* gén egérben (*Mus musculus*) a 6. kromoszómán lokalizálódó, 58794 bp méretű génszakasz. Fehérjeterméke (Rybp) 228 aminosavból áll.

Az Rybp fehérjét, mint az emlős polikomb család feltételezett tagját elsőként Miguel Vidal munkacsoportja írta le 1999-ben [4]. Később bebizonyosodott, hogy valóban egy polikomb fehérjecsaládba tartozó protein. Emlősökben a PcG fehérjék számos fontos fejlődésbiológiai szereppel bírnak. Így például működésük felfüggesztése embrionális letalitást, illetve homeotikus transzformációkat mutató peri-natális (születés körüli) fenotípust okoz [6]. Az *rybp* gén hiánya egérben az embrionális fejlődés korai szakaszában homozigóta letális fenotípust eredményez. Az Rybp ugyanis szükséges a korai beágyazódást követő fejlődéshez és hiányában a beágyazódás nem megy végbe. A heterozigóta mutáns embriók egy része pedig részlegesen átadódó embrionális letalitást mutatott, melynek oka a velőcső fejlődésének rendellenessége volt, ami igazolta a gén idegrendszer kialakításában betöltött szerepét [7]. Az Rybp szív kialakulásában betöltött szerepe ezidáig nem tisztázott.

4.3. A SZÍVIZOM KIALAKULÁSA AZ EMBRIONÁLIS FEJLŐDÉS SORÁN

Az emlősök szívének kialakulása az embrionális fejlődés során rendkívül komplex folyamatok eredménye, melyek magukba foglalják a szívizom irányú specifikáció lépéseinek összehangolását, differenciációt, proliferációt és migrációt. Az egér szív az embrionális élet hetedik napja után fűződik le a mezodermából. Multipotens progenitor sejtekből alakul ki, melyek az embrionális fejlődés előrehaladtával szívizomsejteké (kardiomiociták), az erek falát képző simaizommá, az endokardiumot alkotó endoteliális sejtekké és a kötőszöveti állományt képző fibroblaszt szövevé differenciálódnak. Az egér őssejtes rendszerek kiváló eszközök a szív és egyéb szervrendszerek fejlődésének tanulmányozására, mert az egér genetikailag alaposan jellemzett és számos mutáns egérvonal áll rendelkezésre. Ezek közül számos kongenitális szívbetegség modelljeként is szolgál. Az Rybp szívkiakulásban betöltött szerepét a homozigóta mutáció korai embrionális letalitása megakadályozza, így az őssejteken végzett *in vitro* szívirányú differenciáció hasznos modellként szolgálhat ennek a folyamatnak a megértéséhez. [8]

4.4. ASZKORBINSAV (ASC) HATÁSA A SZÍVIZOM IRÁNYÚ DIFFERENCIÁCIÓRA

A szívizom irányú *in vitro* differenciációt ASC-val lehet indukálni. Az ASC pontos hatásmechanizmusa még nem ismert. [9,10]

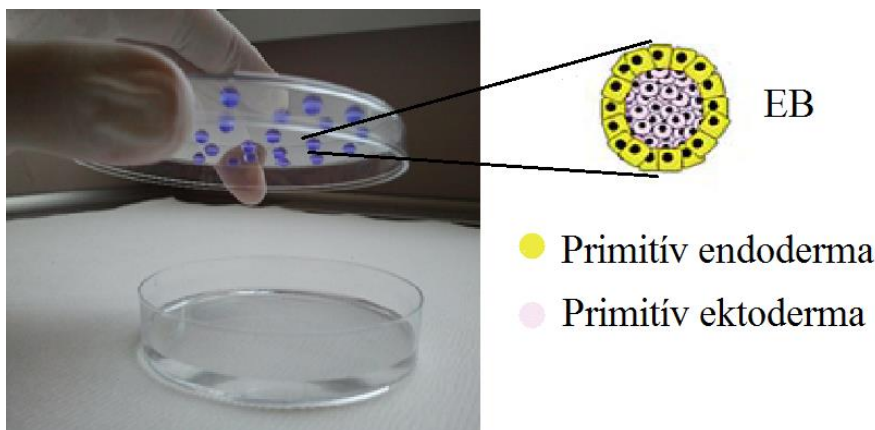
4.5. *IN VITRO* SZÍVIZOM IRÁNYÚ DIFFERENCIÁCIÓ

Munkám során az őssejtek szívizom irányú differenciációját vizsgáltam. A kardiális differenciációhoz a sejtekből ún. embrionális testecskéket vagy embrionális csomókat (Embryoid Body; EB) formálunk. Az EB-k a tér mindhárom irányában növekvő sejtaggregátumok. Velük modellezzük az embrió képződésének korai stádiumát, a három fő csíralemez (ektoderma, mezoderma, endoderma) fejlődését és a korai differenciációs folyamatokat.

EB képzéshez a következő módszereket alkalmazzuk leggyakrabban:

4.4.1.Szuszpenziós technika: A sejteket folyamatosan, zselatin kezeletlen bakteriális Petri csészében tápoldatban, szuszpenzióban lebegtetjük, melynek során letapadásuk gátolt, így belőlük aggregátumok képződnek. Ezek szabad szemmel is megfigyelhetők. A módszer hátránya, hogy szabálytalan alakú és méretű EB-k keletkeznek, ami bizonyos esetekben nem kívánatos. A szuszpenziós technika előnye, hogy kevésbé költséges és egyszerű módszer.

4.4.2.Hanging drop (HD) technika vagy “függőcseppes” módszer. A sejteket a sejtszám meghatározását követően (általában 3×10^4 sejt/ml) 20 μ l-es függőcseppekben helyezzük bakteriális Petri-csésze fedelére (2.ábra). Az így kialakított cseppeket két napig aggregáltatjuk. Technikailag bonyolultabb, mint a szuszpenziós módszer, de előnye, hogy morfológiailag egységesebb (gömbszerű struktúra) sejtaggregátumok képződnek.



2.ábra. Függőcseppekben aggregálódó EB-k

4.4.3.Slow turning lateral vessel (STLV) technika: Egy rotációs sejtenyésztő készülék tartja a sejteket szuszpenzióban. A rendszer optimális tenyésztési körülményeket és minimális nyíróerőt biztosít. Szintén előnye, hogy automatizálható, ami pl. gyógyszergyári alkalmazásoknál előnyös. Hátránya, hogy költséges.

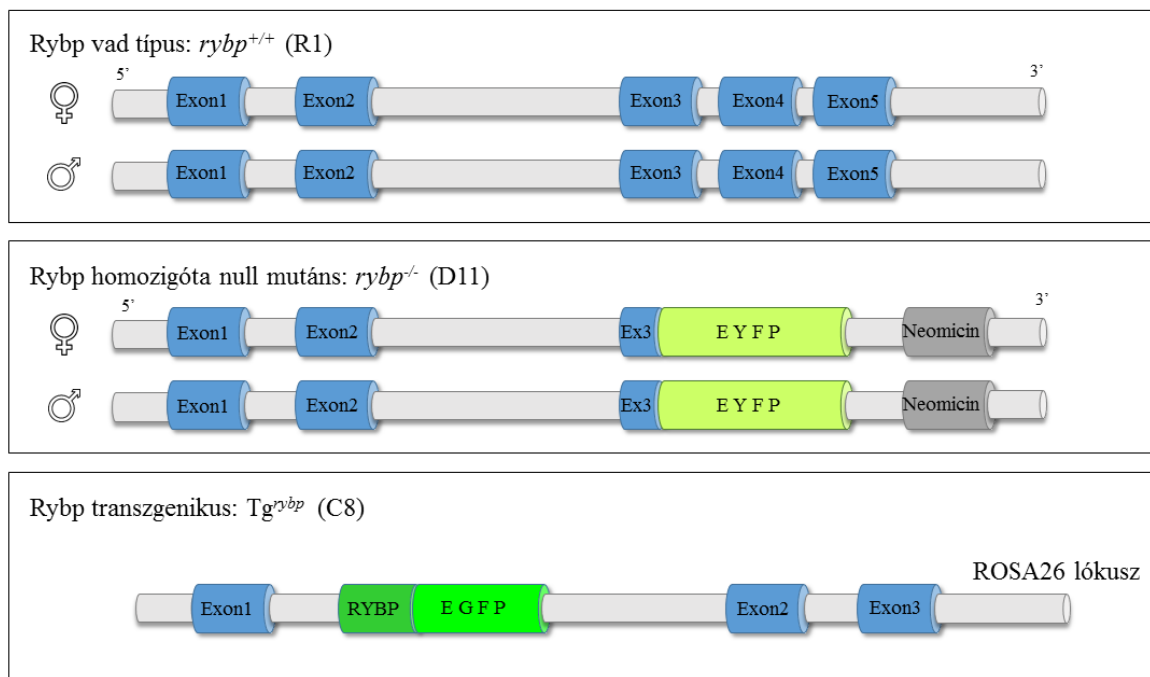
5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

5.1. Össejtvonalak:

R1: (*rybp*^{+/+}) vad típusú hím egérből izolált össejtvonal, melyet kísérleteinkben referencia/kontrol sejtvonalként használtunk. 1991-ben Nagy András laboratóriuma izolálta 3,5 napos egér blasztocisztából [11].

D11: (*rybp*^{-/-}) *rybp* homozigóta null mutáns sejtvonal, mely az R1 sejtvonal leszármazottja: Rybp termelésére képtelen, ún. „knock out” sejtvonal, az Rybp helyett egy fúziós fehérje termelődik ezekben a sejtekben, mely az Rybp első 58 aminosavjából és a hozzá fuzionáltatott fluoreszcens EYFP-ből (Enhanced Yellow Fluoreszcens Protein; EYFP) áll [12].

C8: (*Tg^{rybp}*) *rybp* transzgenikus össejtvonal. Az Rybp fehérjét kódoló cDNS-t zölden fluoreszkáló fehérjével (Enhanced Green Fluoreszcens Protein; EGFP) fuzionáltatva egy extra kópiában tartalmazza [13]. A fúziós konstrukt a *Rosa 26* genomi lókuszbba van bejuttatva, ami egy konstitutívan expresszálandó, nem esszenciális gén, így a lókuszbba targetált konstruktok fenotípusa célzottan vizsgálható (3.ábra).



3.ábra. *rybp*^{+/+}, *rybp*^{-/-} és *Tg^{rybp}* sejtvonal

5.2. ÖSSEJTEK TENYÉSZTÉSE

Az őssejtek tápláló sejtrétegre („feeder layer”) kerültek olvasztásra. Erre a célra laboratóriumunk mitomicin C kezelt egér embrionális fibroblaszt (Mouse Embryonic Fibroblast; MEF) sejteket használ. A mitomicin C kezelt MEF-ek nem képesek osztódni, így idővel „kihígulnak” a sejtenyészetből. Az őssejtek olvasztás után a MEF-ekhez tapadnak. Az *rybp*^{+/+} őssejtvonal sajátja, hogy olvasztást követően zselatinozott felületen MEF nélkül is fenntartható.

A sejtek tenyésztését Nagy András és munkatársai módszerét követve végeztük [12]. Az őssejtek tenyésztéséhez speciális őssejtes tápoldatot (ES DMEM +LIF) használunk:

ES DMEM (+LIF) tápoldat összetétele:

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM Gibco, Cat.No.:41965-039)
- 15% fetal bovine serum (Gemini Stasis Stem Cell FBS, West Sacramento, CA, USA; Cat.No.:100-125)
- 0,1mM nem esszenciális aminosav (PAA; Cat.No.:M11033)
- 0,1mM β -mercaptoethanol (Gibco; Cat.No.:M-6250)
- 50 U/ml penicillin/streptomycin antibiotikum (PAA; Cat.No.:P11010)
- 1000 U/ml egér Leukémia Inhibitor Faktort (LIF) – differenciálódást gátló anyag (ESGRO-LIF; Chemicon).

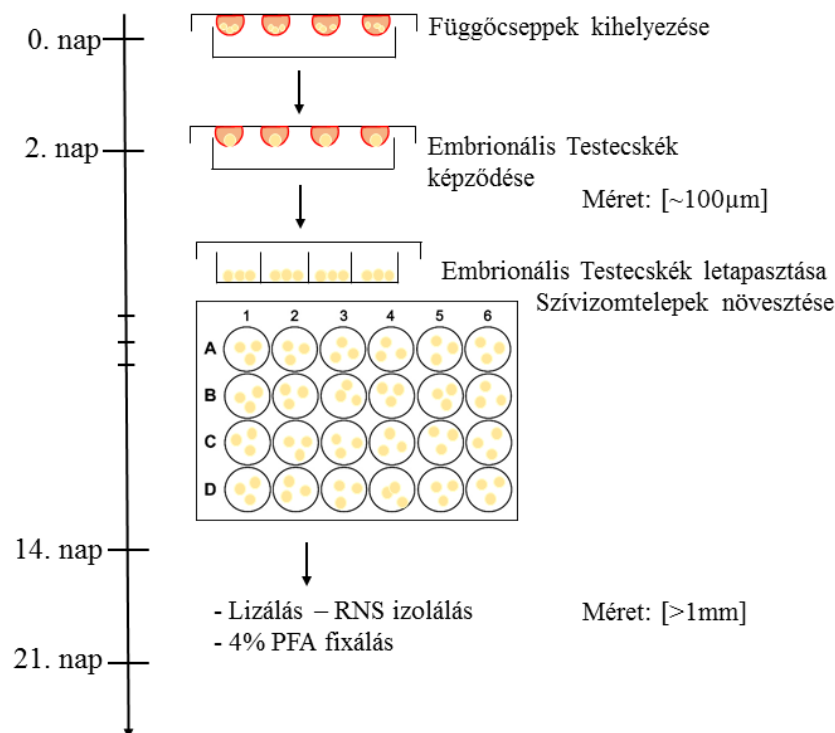
ES DMEM (-LIF) tápoldat összetétele:

- ES DMEM (+LIF) tápoldattal megegyező, de LIF hozzáadása nélkül.

70% konfluencia (sejtsűrűség) esetén, a sejteken passzálást végeztünk: 5ml PBS-sel (Dulbeccos's PBS (1x); PAA; Cat.No.:H15-001) mostuk a sejtenyészet felszínét, majd 2ml Tripszin:EDTA-val (0,05% tripszin 0,02% EDTA PBS-ben; PAA; Cat.No.:L15-004) inkubáltuk 5perc/37°C (2ml), majd 3ml tápoldattal leállítottuk a tripszin működését. A sejteket új, zselatinnal felületkezelt csészékbe vittük át és 37°C-on, 5% CO₂ páratartalmú inkubátorban növesztettük. A sejteket kétnaponta passzáltuk Tripszin-EDTA (0,05% Tripszin; PAA) emésztést végezve zselatinozott felületre áttéve, az optimális sejtszám beállítását követően. A tápoldatot naponta cseréltük az őssejteken.

5.3. EMBRYOID BODY KÉPZÉS FÜGGŐCSEPPES MÓDSZERREL ÉS *IN VITRO* SZÍVIZOM IRÁNYÚ DIFFERENCIÁCIÓ

A sejtek kezelése a passzálás első három műveletével kezdődik. A sejteket centrifugálással üleptették (1000rpm/4perc) és a tripszines felülúszót 10ml friss LIF-mentes tápoldatra (DMEM -LIF) cseréltük. A sejteket felfuszpendáltuk és a sejtszuszpenzió denzitását Burker-kamra segítségével állapítottuk meg. DMEM-LIF tápoldattal a sejtkoncentrációt 1000sejt/20 μ l-re állítottuk be. 10cm-es bakteriális csésze felfordított tetejére 50 db 20 μ l-es cseppet helyeztünk, majd a csészét óvatosan ráborítottuk a 10ml PBS-t tartalmazó csészealjra, biztosítva a nedvesség ellátását (5.ábra). Az így előállított függőcseppeket 2 napon keresztül, 37°C-os inkubátorban növesztettük. A sejtaggregátumokat a 2. napon 24 lyukú, zselatinnal felületkezelt, szövettenyésztőbe transzferáltuk („letapasztás”) (3 EB/lyuk sűrűségben). Kétnaponta tápoldatcserét végeztünk 14-18 napon keresztül (4.ábra).



4.ábra. A kardiális differenciáció idővonala

5.4. ASC INDUKCIÓ

Az ASC (Ascorbic Acid; C-vitamin) indukáló hatással van a szívizomtelepek képződésére. ASC indukció esetén ugyanúgy jártunk el, mint az előzőekben leírtaknál (5.3. *EB képzés függőcseppes módszerrel*) kivéve, hogy a HD módszerrel előállított EB-ket 20µg/µl koncentrációjú ASC-s (ASC törzsoldat (TO): 10mg/ml; 200µl TO 100ml DMEM–LIF) tápoldatban növesztettük. A médiumot ebben az esetben is kétnaponta friss oldatra cseréltük.

5.5. KVANTITATÍV RT-PCR (qRT-PCR)

A sejtekből RNS-t izoláltunk (Qiagen; RNeasy Plus Mini Kit; Cat.No.:74134) a gyártó által mellékelt leírás alapján. Az izolált RNS koncentrációját és tisztaságát spektrofotométerrel ellenőriztük. Az RNS-t reverz transzkripcióval (Applied Biosystems; High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit; Part No.: 4368814) cDNS-sé írtuk át a gyártó által mellékelt leírás alapján. Az átírás eredményességét PCR reakcióval (*Taq* DNA Polymerase: Thermo Scientific; #EP0404; 10mM dNTP Mix Thermo Scientific; #R0192; 10x Taq buffer with (NH₄)₂SO₄: Fermentas; cc MgCl₂: Thermo Scientific) ellenőriztük. A futtatás adatait az *1.táblázat* tartalmazza. A cDNS-t templátként használtuk qRT-PCR reakcióban, melynek során kardiális markerek relatív expresszióját vizsgáltuk (5,4µl cDNS (18x hígítás) + 0,6µl primer mix + Applied Biosystems Sybr Select Master Mix for CFX; Ref.: 4472942 /reakció.) A PCR reakciót MJ Research; a Real Time PCR reakciót Bioer készülékkel végeztük. A futtatás adatait a *2.táblázat* tartalmazza.

PCR Program:	Hőmérséklet [°C]	Inkubációs idő
1.	94	2 perc
2. 30 ciklus	94	30 s
	63	30 s
	72	45 s
3.	72	5 perc
4.	4	-

1. táblázat

RT-PCR Program:	Hőmérséklet [°C]	Inkubációs idő
1.	95	15 perc
2. 40 ciklus	95	15 s
	58	30 s
	72	30 s
3.	95	20 s
4.	10	-

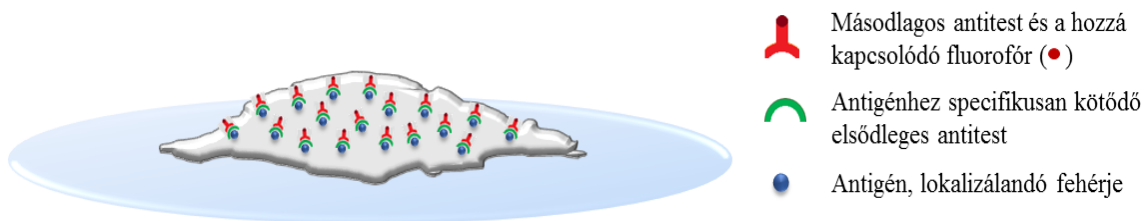
2. táblázat

5.6. IMMUNHISZTOKÉMIA (IHC)

Az IHC-ket 24 lyukú szövettenyésztőben, fedőlemezen növesztett sejteken végeztük. A sejteket 200µl PBS-sel mostuk (Dulbecco's PBS (1x); PAA; Cat.No.: H15-001). A sejtek permeabilizálása céljából 0,3ml 0,2% Triton X-et használtunk PBS-ben feloldva és szobahőmérsékleten inkubáltuk 20 percen keresztül. Blokkolást végeztünk 0,4ml; PBS-ben feloldott, 5% BSA blokkoló oldattal (Albumin from Bovine Serum; Sigma; Cat.No.:A7906): szobahőmérsékleten, 1 órán keresztül, illetve 0,4ml elsődleges antitesttel 4°C-on inkubáltuk a telepeket egy éjszakán át, fénytől védett helyen. Az inkubálás során, a sejteken a folyadék folyamatos keverése lassú himbálással volt biztosított. A felhasznált ellenanyagok a következők voltak: DEDAF rabbit: (1:1000 hígítás); Oct-3-4 Mouse (1:100 hígítás); cTroponin T Mouse (1:2000 hígítás). A sejteket 0,4ml PBS-sel mostuk 5x10 percen keresztül 4°C-on, majd blokkoló oldatban 1 órán keresztül szobahőmérsékleten tartottuk a sejteket. Másodlagos antitesttel (0,4ml) 1 órán keresztül, 4°C-on inkubáltuk sötétben a sejteket (fényérzékeny kromofór). A felesleges elsődleges ellenanyag eltávolítása után a mintákat anti-egér vagy anti-nyúl 400x-os hígítású fluoreszcens konjugált másodlagos ellenanyaggal (ALEXA 488 GAM/DAR (1:2000 hígítás); ALEXA 546 (1:600 hígítás); ALEXA 647 GAR/DAM (1:2000 hígítás)) inkubáltuk szobahőmérsékleten 60 percig. 0,4ml PBS-sel mosást végeztünk 3x10 percen keresztül. 0,4ml DAPI (sejtmag-festő) oldattal 20 percig szobahőmérsékleten inkubáltunk sejteket, majd 0,4ml PBS-sel mosást végeztünk 2x10 percen keresztül (5.ábra). A fedőlemezeket 50%-os glicerolban fixáltuk tárgylemezen.

Kísérlethez használt mikroszkópok:

- Olympus; CK2, ULWCD 0,30; 10x és 4x lencsék
- Olympus; Cell R imaging, IX 81 mikroszkóp; DSU
- Olympus; konfokális IX 81 mikroszkóp; FV100
- Leica; TCS SP 5II konfokális mikroszkóp

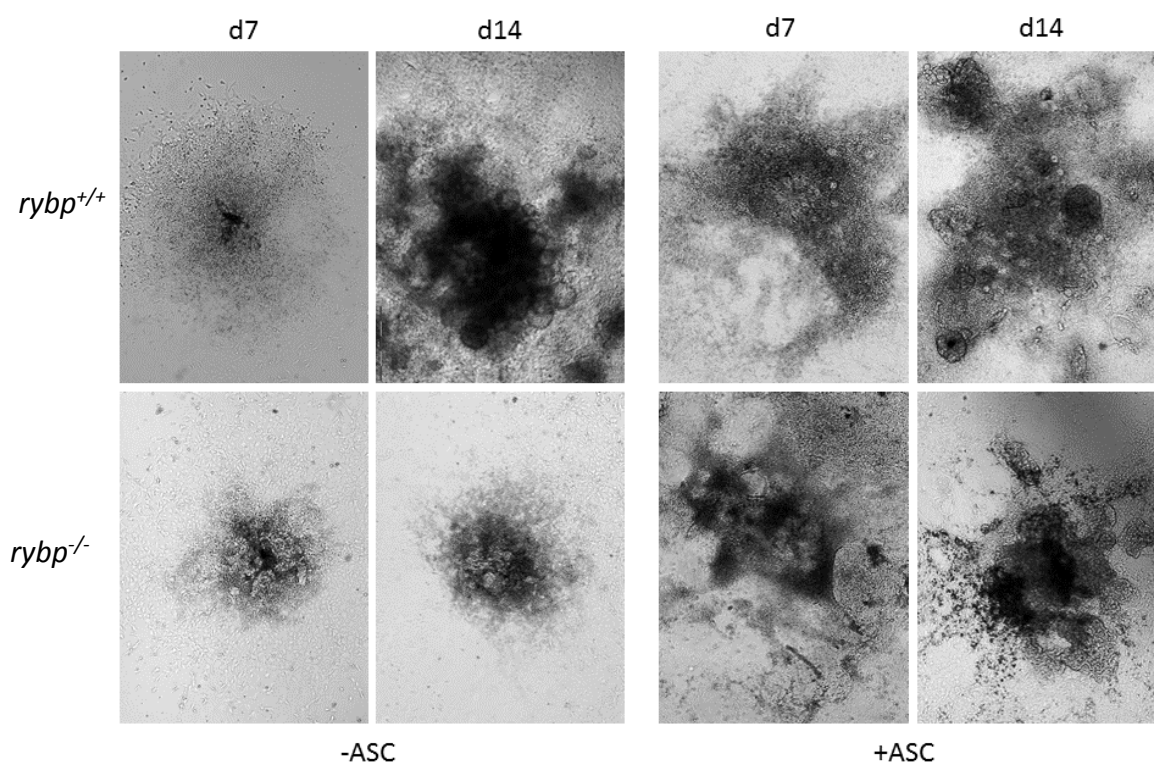


5.ábra. Fedőlemezen növesztett szívizomtelepek immunhisztokémiája

6. KÍSÉRLETEK ÉS EREDMÉNYEK

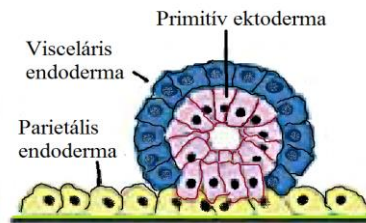
6.1. AZ $RYBP^{+/+}$, $RYBP^{-/-}$ GENOTÍPUSÚ SEJTEKBŐL SPONTÁN DIFFERENCIÁCIÓVAL ÉS INDUKCIÓ HATÁSÁRA LÉTREJÖVŐ SZÍVIZOMTELEPEK MORFOLÓGIAI ÖSSZEHASONLÍTÁSA

Az $rybp^{+/+}$ és $rybp^{-/-}$ genotípusú őssejtekből EB-ket formáltunk kardiomiociták létrehozása céljából HD módszerrel (5.3.). Minden egyes differenciáció alkalmával mindkét genotípusból 72 EB-et vizsgáltunk szívizom képzésre a következő módon: 24 lyukú zselatinózott szövettenyésztő edénybe mozgattuk az EB-ket és lyukanként 3 EB-t helyeztünk el. A zselatinos felületre helyezett EB-k nagy része 2-3 nap alatt letapadt és a tér mindhárom irányába növekedésnek indult (7.ábra). A kontrol sejtvonalak ($rybp^{+/+}$) nagyobb átmérőjű, burjánzóbb telepeket képeztek, mint az $rybp^{-/-}$ sejtvonalak (6.ábra). A kardiális differenciáció legszembetűnőbb jele a mikroszkóp alatt ritmikusan összehúzódó (dobogó) területek megjelenése. Megfigyeltem, hogy az $rybp^{-/-}$ telepek nem képeztek dobogó szívizomtelepeket. A $rybp^{+/+}$ ASC kezeletlen minták közül a 11. napon detektáltuk az első kontrakciókat. A percenkénti összehúzódások átlagos száma 52 volt. ASC kezelés (+ASC) hatására nagyobb és testesebb telepek nőttek, mint kezelés nélkül (-ASC) (6.ábra).



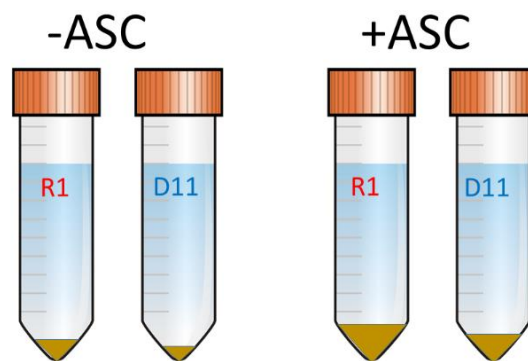
6.ábra. $rybp^{+/+}$ és $rybp^{-/-}$ sejtvonalból alkotott szívizomtelep morfológiája
- 10x nagyítás

A *rybp*^{-/-} sejtvonallal szemben 14 nap alatt közel fele akkora mértékű növekedést produkált. Apoptotikus sejtek mindkét sejtvonalnál láthatók (a telepek közepe fekete.) (6.ábra). Megfigyeléseink eredményeképpen elmondhatjuk, hogy az *rybp*^{-/-} sejtvonallal nem képez dobogó szívizom telepeket sem spontán, sem ASC-al történő indukció hatására, ami ezekben a sejtekben a szívizom irányú differenciáció defektusára és az Rybp szívizom kialakulásában betöltött szerepére utal.



7.ábra. Zselatinkezelt felületre tapasztott EB

A 14. napon a telepeket alkotó sejteket összegyűjtöttem és lizáltam RNS kinyerés céljából. A lizálás során összegyűlt sejtpellet eltérő mennyiségű volt. ASC hatására mindkét sejtvonallal nagyobb sejttömeget hozott létre. (8.ábra).



8.ábra. ASC hatása a sejtmennyiségre

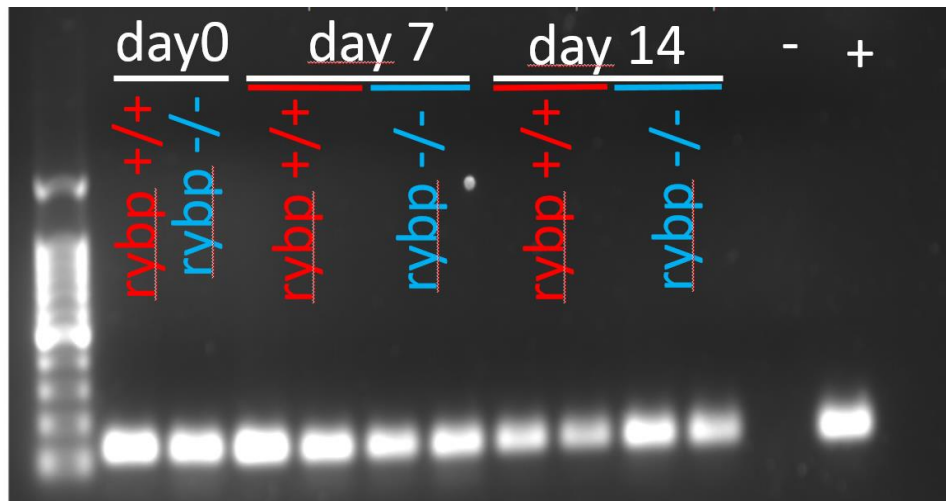
Ezt követően a kísérletet háromszor megismételtam a következő módon: a fentiekhez hasonlóan jártam el kivéve, hogy mindkét sejtípusból 2-2 db 24 lyukú edénybe helyeztem EB-ket (3 EB/lyuk). Két hét után a plateket előkészítettem a további vizsgálatokhoz: a sejtvonalak közötti génexpresszió (6.2.) és fehérje mintázat összehasonlítására (6.3.).

6.2. AZ RYBP^{+/+}, RYBP^{-/-} GENOTÍPUSÚ SZÍVIZOMTELEPEK GÉNEXPRESSZIÓJÁNAK VIZSGÁLATA (qRT-PCR)

A szívizomtelepek differenciációjának és a szívizom irányultságát meghatározó gének kifejeződésének molekuláris szintű vizsgálatára az *rybp*^{+/+}, *rybp*^{-/-} genotípusú sejtvonalak mRNS szintű expressziós analízisét kvantitatív qRT-PCR segítségével végeztem el (5.5. *Kvantitatív RT-PCR (qRT-PCR)*). A génexpresszió vizsgálatához a kiindulási sejt kultúrákból (d0) és a differenciált szívizomtelepekből RNS-t izoláltunk a differenciáció hetedik (d7) és tizennegyedik (d14) napján. 24 lyukú szövettenyésztő lyukaiba 3-3 EB-t helyeztünk ki, sejtvonalanként 12 lyukat használva. Az így kapott 36 EB-t tripszines kezeléssel begyűjtöttük az adott időpontokban (d0, d7, d14) és lecentrifugáltuk (1000rpm/4perc). Ettől a lépéstől kezdve az Qiagen RNeasy Plus Mini Kit (5.5. *Kvantitatív RT-PCR (qRT-PCR)*) gyártó által leírt instrukcióit követtük, majd az RNS koncentrációját spektrofotométerrel határoztuk meg (3.táblázat). Az RNS mintákból történő cDNS átíráshoz reverz transzkripciót végeztünk (2µg RNS/reakció). A reverz-transzkripció sikerességét PCR reakcióval HPRT, ill. GAPDH génekre tervezett primerek felhasználásával ellenőriztük. A termékeket 1,5% agaróz gélen detektáltuk (9.ábra).

RNS minták	OD ₂₆₀	OD ₂₈₀	Koncentráció [ng/µl]	Total RNS cc [ng]
<i>rybp</i> ^{+/+} 0.nap	0,649	0,390	2600	182000
<i>rybp</i> ^{+/+} 7.nap -ASC	0,026	0,033	252	17640
<i>rybp</i> ^{+/+} 7.nap +ASC	0,063	0,013	104	7280
<i>rybp</i> ^{+/+} 14.nap -ASC	0,092	0,055	368	25760
<i>rybp</i> ^{+/+} 14.nap +ASC	0,289	0,172	1160	81200
<i>rybp</i> ^{-/-} 0.nap	0,281	0,165	1120	78400
<i>rybp</i> ^{-/-} 7.nap -ASC	0,030	0,019	120	8400
<i>rybp</i> ^{-/-} 7.nap +ASC	0,045	0,017	180	12600
<i>rybp</i> ^{-/-} 14.nap -ASC	0,064	0,036	256	17920
<i>rybp</i> ^{-/-} 14.nap +ASC	0,086	0,053	344	24080

3.táblázat. RNS minták koncentrációja

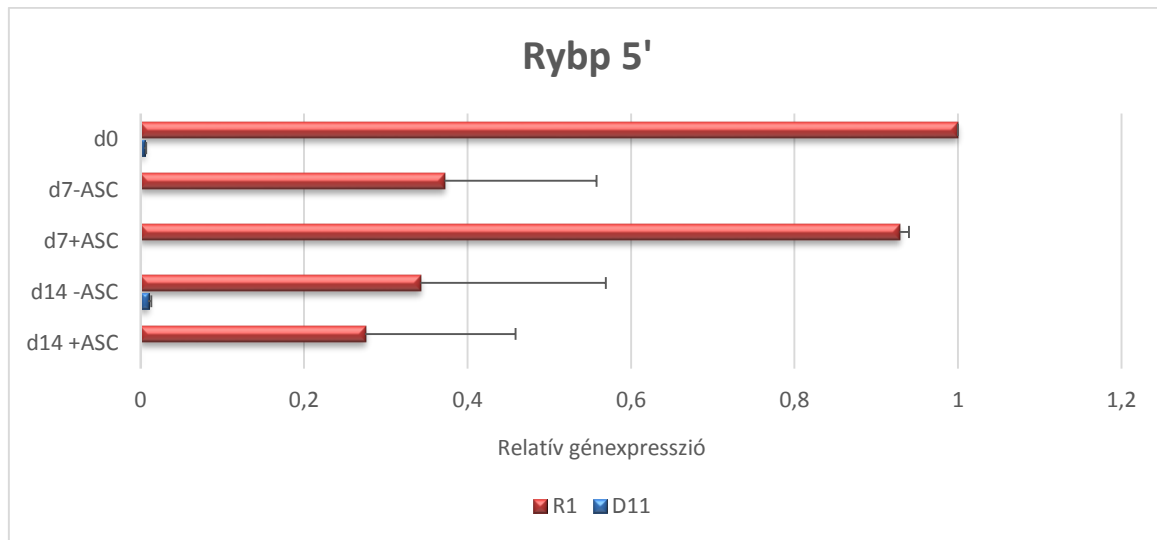


9.ábra. cDNS termék ellenőrzése

A cDNS mintákból HPRT és GAPDH gének Ct értékeihez viszonyítottuk a többi minta Ct értékét ($\Delta\Delta C_t$ módszer). A módszer segítségével szívizom irányú differenciáció során egy adott gén expresszióját vizsgáltam három különböző időpontban (d0, d7, d14), két sejtvonalban ($rybp^{+/+}$ és $rybp^{-/-}$), ASC-val kezelt és kezeletlen esetekre (-ASC, +ASC). Az ábrákon a standard deviáció értékét tüntettük fel szórásként és csak a szignifikáns értékekkel számoltunk.

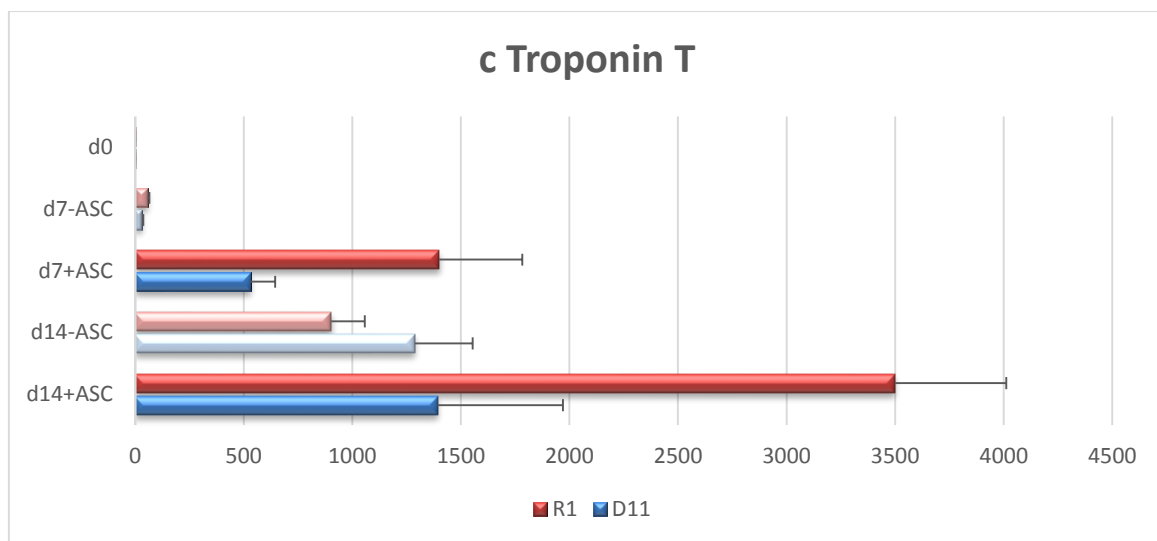
Elsőként az *rybp* gén expresszióját vizsgáltuk meg a kontrol és Rybp termelésére képtelen sejtekben, illetve szívizomtelepekben az *in vitro* kardiális differenciáció előrehaladtával. Az *rybp* expresszió szintje közel ötödére csökken a differenciáció során mind spontán mind pedig az ASC-val indukált szívizom telepekben a kiindulási d0 időpontokhoz képest. Ez két dologra is utalhat: (1) az *rybp* szükséges, hogy jelen legyen a kiindulási őssejtenyészetekben az eredményes szívizom irányú differenciációhoz hiszen hiányában az nem indukálható; valamint (2) feltehetően az *rybp* szintjének downregulációja is szükséges a kardiális diffrenciáció indukációjához, ugyanis mennyisége a szívizom irányú elkötelezettség előrehaladtával csökken. Ez a PcG proteinek jellemzője: represszált állapotban tartanak géneket (pl. a differenciációban esszenciális géneket represszálják aktívan proliferáló sejtekben (őssejt)).

Várákozásunknak megfelelően az $rybp^{-/-}$ sejtvonalban az *rybp* expressziója nem detektálható. (10.ábra)



10.ábra. Rybp RT-PCR

c Troponin T (Cardiac Troponin T; cTnT): a szívizomban található, specifikusan kardiális marker, mely a kalcium közvetített kapcsolatot regulálja az aktin és miozin szálak között. Kontrakcióért felelős. Koordinálja az összehúzódások számát és a szüneteket. A harántcsíkolt izomrost funkcionális egységének, a szarkomernek alkotórésze. A szívizom irányú elkötelezettség egy kései markere, szívizomsejteket jelöl.



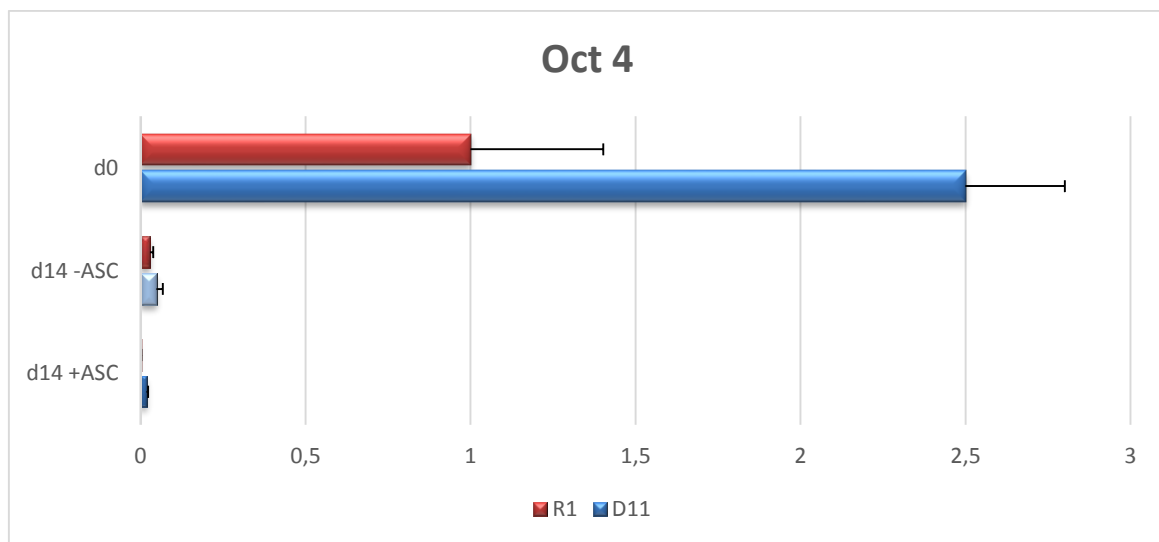
11.ábra. cTnT RT-PCR

Eredmények: cTnT expressziójával vizsgáltuk a kardiális differenciáció sikerességét. A cTnT gén kifejeződött mind a *rybp*^{+/+}, mind a *rybp*^{-/-} sejtvonalakban. Expressziója mindkét sejtvonaltól esetén növekedett. ASC hatására 3500-szoros indukció mutatható ki *rybp*^{+/+} sejtvonaltól. Az ASC mindkét sejtvonaltól eredményesen indukálta a szívizom irányú differenciációt, noha az

rybp^{-/-} sejtek cTnT szintje csak 50%-ra a *rybp*^{+/+} sejtvonálnak. Tehát az *rybp*^{-/-} sejtvonalt is expresszálja ezt az esszenciális kardiális markert, de csökkent mértékben. Következtetésünk továbbá, hogy a termelődő cTnT funkcióját valószínűleg nem képes teljes mértékben betölteni, hiszen az *rybp*^{-/-} sejtvonalt ritmikus összehúzódásra nem képes. Ezen feltevésünknek az ellenőrzésére fehérje szintű vizsgálatokat is végeztünk (6.3.) További terveink között szerepel, hogy qRT-PCR-rel, Western-blottolással és IHC-vel tárjuk fel a *rybp*^{-/-} sejtvonalt kardiális defektusát. (11.ábra)

Az RT-PCR reakciók értékelése során azt vettük észre, hogy a HPRT génre normalizált *rybp*^{+/+} és *rybp*^{-/-} pontjainkban a készülék eltérő Ct (Threshold Cycle: az a ciklusszám ahol a görbe eléri a fluoreszcencia értékét) mért. Ebből arra következtettünk, hogy a HPRT gén expresszióját befolyásolja, represszálja az ASC. Így további vizsgálatainkhoz a GAPDH gént alkalmaztuk referenciának, melynek szintje a kardiális differenciáció során nem változik.

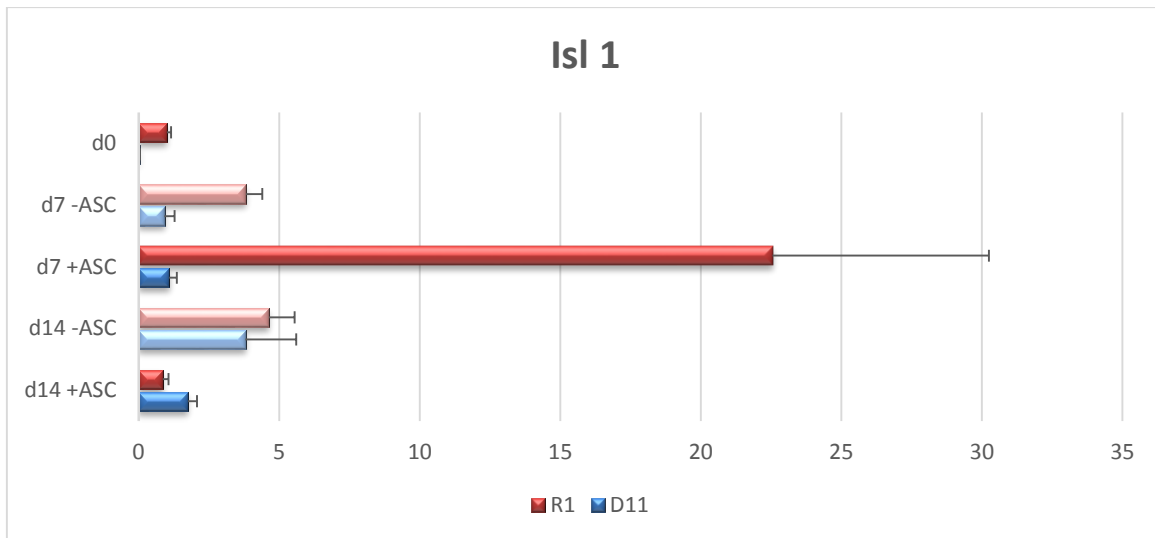
Oct 4 (Octamer-binding transcription factor 4): pluripotencia marker, mely a sejtek önmegújuló képességében játszik szerepet. Differenciálatlan embrionális őssejtekben expresszálódik.



12.ábra. Oct4 RT-PCR

Eredmények: a vártak megfelelően a vad típusú és mutáns őssejtekben is (d0) jelen van és mennyisége a differenciáció előrehaladtával a 14. napra lecsökken (12.ábra).

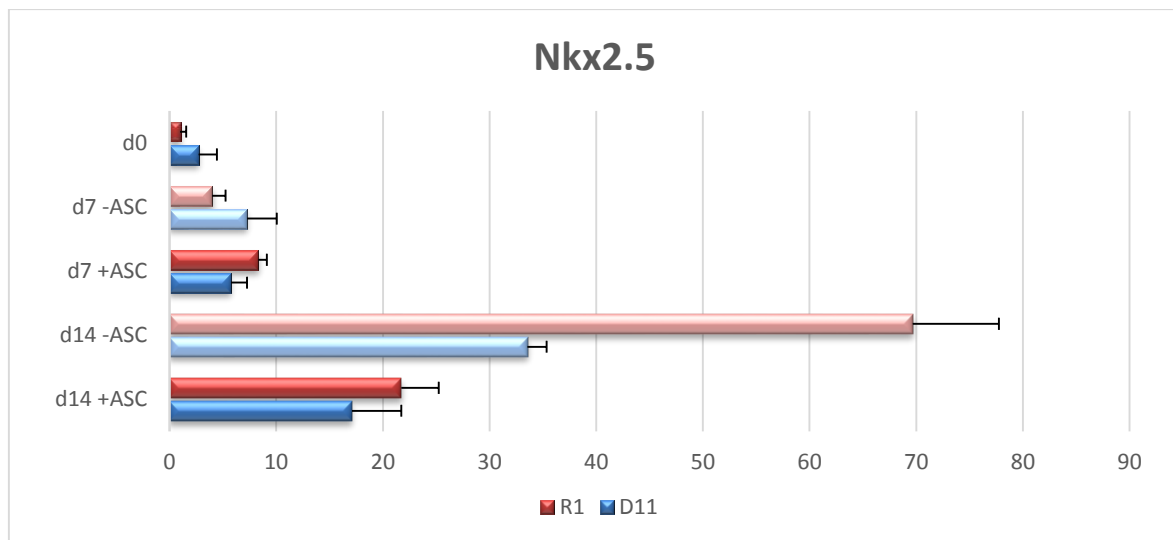
Isl1 (Insulin gene enhancer protein ISL-1): fontos szerepet játszik az embriógenézis során a szív fejlődésében. Elsőként szív progenitor sejtekben expresszálódik, így korai szív fejlődési marker. Később a jobb kamrai kardiális progenitorokban megjelenő markerként ismert.



13.ábra. *Isl1* RT-PCR

Eredmények: a vártak megfelelően az *Isl1* expressziója *rybp*^{+/+} szívizomtelepekben a kardiális differenciáció előrehaladtával emelkedik. ASC hatására az *Isl1* expresszió tovább emelkedik és a hetedik napon éri el a csúcst (d7 +ASC; R1, D11). Az *rybp*^{-/-} szívizomtelepekben azonos az *Isl1* expresszió, huszad része a kontrol szívizom telepekben tapasztaltak (d7 +ASC; D11). Tehát az *Isl1* expresszió az *rybp*^{-/-} telepekben defektust mutat. Sőt az *rybp*^{-/-} sejtekből kialakuló szívizomtelepekben az ASC sem indukálta ritmikusan összehúzódó szívizomtelepek képződését. (13.ábra)

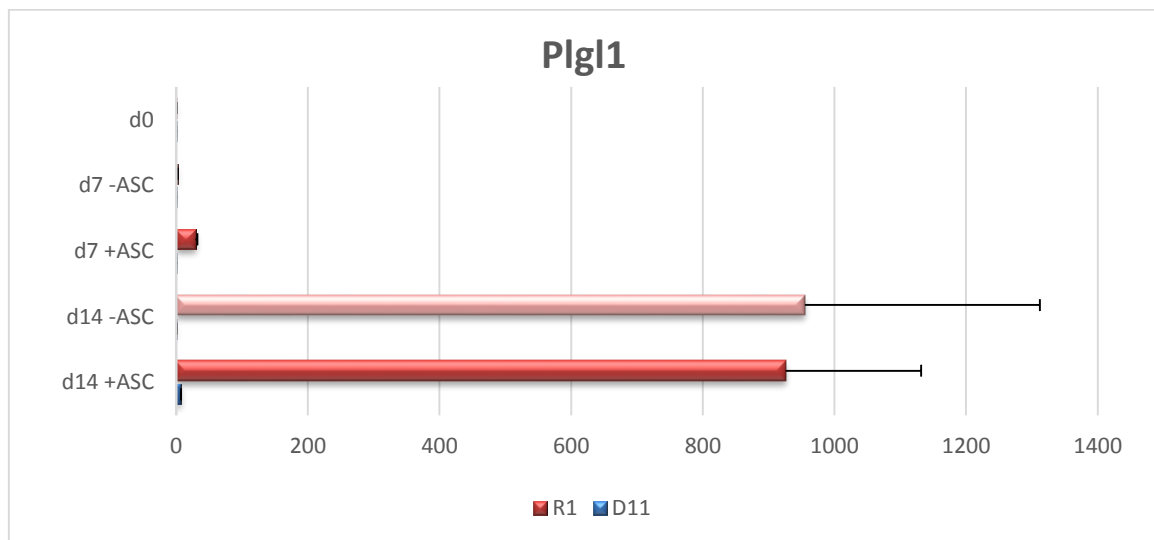
Nkx2.5: kardiális transzkripciós faktor, korai-prekardiális marker, mely a szívizom irányú specializációban lát el alapvető funkciót. Az embrió szívének kialakulásában és további fejlődésében játszik szerepet. Mutációja pitvari septum defektust okoz.



14.ábra. Nkx2.5 RT-PCR

Eredmények: az Nkx2.5 egyre növekvő mennyiségben expresszáldott mindkét sejtvonalban. Az expressziós szint a 14. napra érte el a csúcsát: ASC kezelt minták esetén szintje megkétszereződött. Szintje egyik időpontban sem éri el a kontrol sejtek szintjét az *rybp*^{-/-} szívizomtelepekben. ASC számottevő indukciót nem fejtett ki a gén expressziójára - kezeletlen minták esetén a kifejeződés nagyobb mértékű. Mindezek alapján elmondható, hogy az *rybp*^{-/-} őssejtekből képződő szívizom telepek defektust mutatnak az Nkx2.5 expressziójában. (14.ábra)

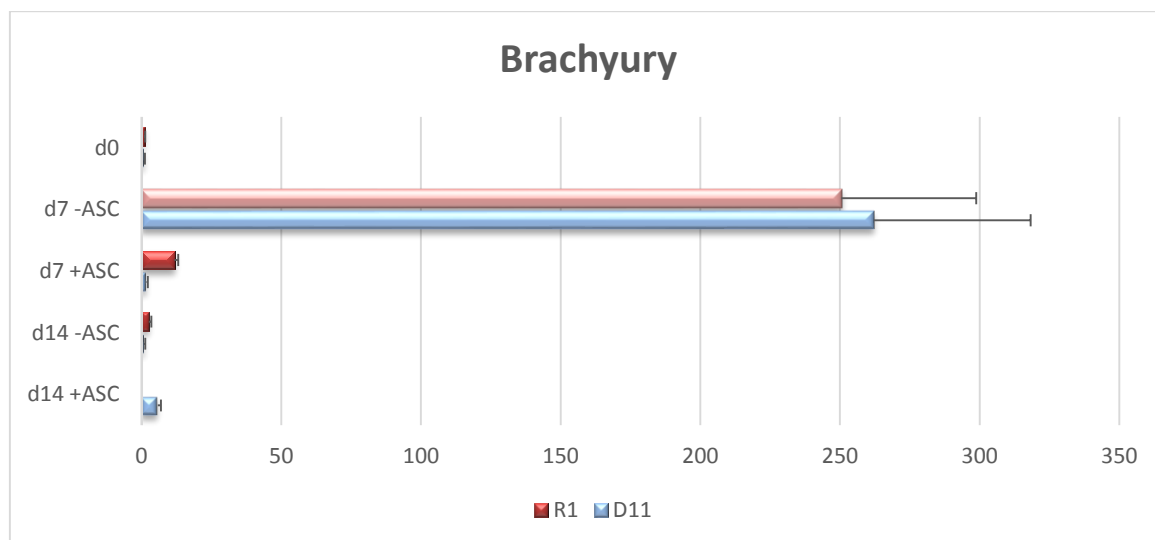
Plgl1 (Zac1/Lot1) (Pleiomorphic Adenoma Gene-Like 1): zinc finger-típusú transzkripciósfaktor, mely erősen expresszálódik a fejlődő szívmuskokban.



15.ábra *Plgl1* RT-PCR

Eredmények: kontrol sejtvonalonban erősen expresszálódik 14. napra, míg az *rybp*^{-/-} sejtvonala defektust mutat kardiális differenciációban. ASC nincs hatással a *Plgl1* jelenlétének mértékére. Szintjét valószínűleg az *rybp* jelenléte szabályozza. (15.ábra)

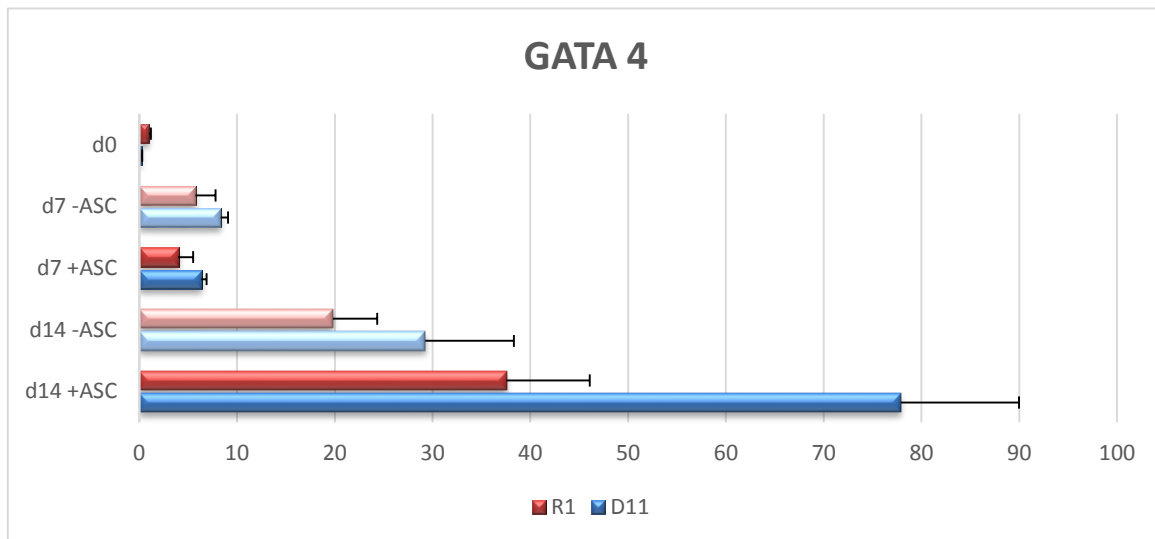
Brachyury: *T* gén által kódolt protein. Hólyagsíra állapotban is már erősen expresszálódik, a legkorábbi mezoderma markergének egyike. Óssejt állapotban nem fejeződik ki. Jelenléte a mezodermális irányultságra utal, így a szívírányú differenciáció egyik legkorábbi indikációja.



16.ábra. *Brachyury* RT-PCR

Eredmények: a vártak megfelelően korai (d7) stádiumban mindkét sejtvonalon erősen expresszálódik – közel 250-szeres az indukciója. Kifejeződését az ASC nem erősíti tovább. A *rybp*^{-/-} sejtvonalon is nagymértékű az expressziója. Tehát a mezoderma képződést az Rybp hiánya nem befolyásolja. Ebből arra következtetünk, hogy az *rybp* hiánya nincs hatással a Brachyury gén expressziójára, így a mezoderma kialakulására. (16.ábra)

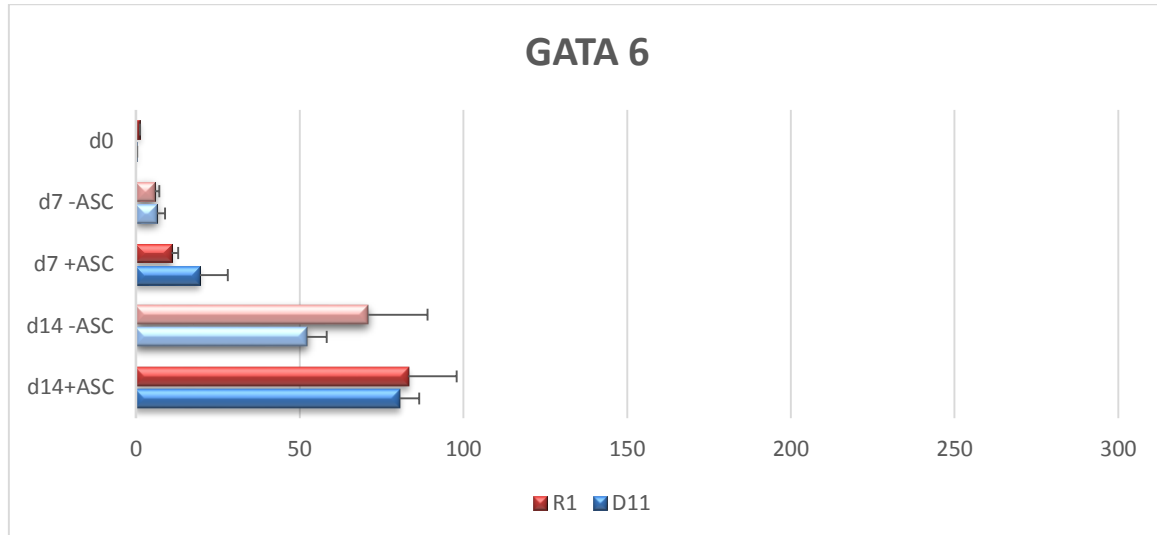
GATA 4: a GATA családba tartozó transzkripciós faktorok más transzkripciós faktorokkal (Tbx5, MEF2C) együttműködve a szívizom irányultság fontos meghatározói. A GATA faktorok mindegyike képes szérum-mentes körülmények között kardiogenezist indukálni, de különbségekkel.



17.ábra GATA4 RT-PCR

Erdemények: *rybp*^{+/+} és *rybp*^{-/-} sejtvonalon erősen expresszálódó gén. *Rybp*^{+/+} sejtvonalon –ASC mintákban 20x-osára emelkedett az expresszió a 14. napra, *rybp*^{-/-} sejtvonalon ez az erősség 30x-os. ASC mindkét sejtvonalonra kifejtette hatását: *rybp*^{+/+} d14-ASC-hoz képest d14+ASC kétszeres indukciót fejtett ki, *rybp*^{-/-} sejtvonalon ez a hatás közel 3x-os. (17. ábra)

GATA6 (GATA-binding factor 6): őssejtekben a GATA6 túltermeltetés a kardiális differenciációt promotálja. Funkciója a “testvér GATA4” généhez hasonló.



18.ábra GATA6 RT-PCR

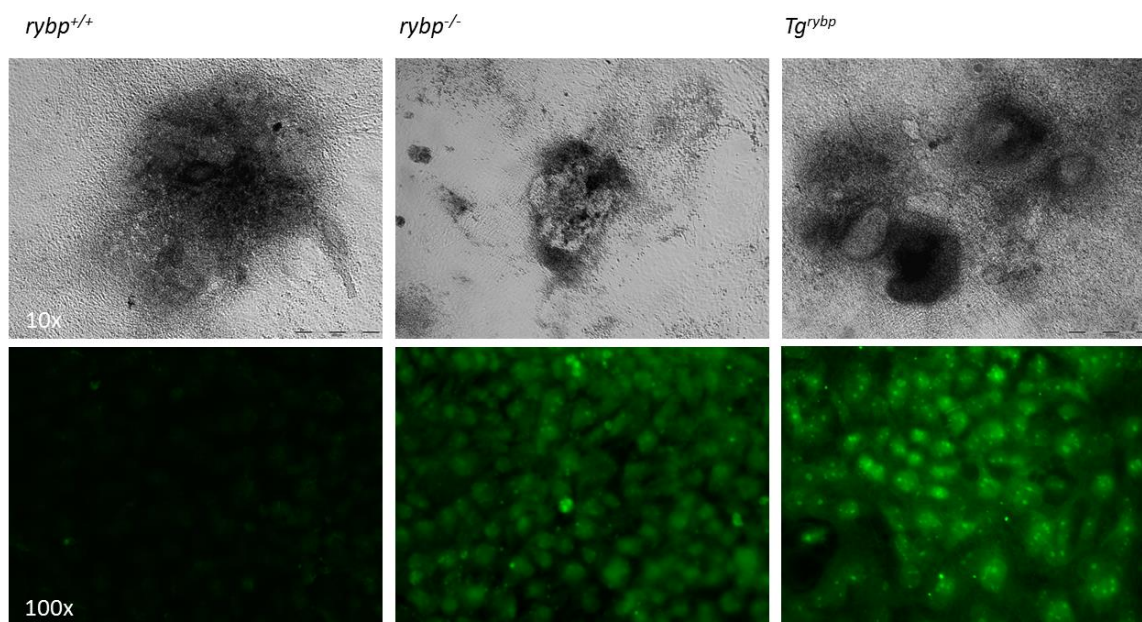
Eredmények: mindkét sejtvonalban erősen expresszálódó gén, a kontrol sejtvonalban 14. napon volt erősebb a jelenléte ($70\times/rybp^{+/+}$; $50\times/rybp^{-/-}$). 14. napra nyolcszorozódott a 7. naphoz képest $rybp^{+/+}$; $/rybp^{-/-}$ sejtvonalakban. ASC indukáló hatást fejt ki a GATA6 gén tekintetében is az $rybp^{+/+}$ és $rybp^{-/-}$ sejtvonalak expressziós szintjére nézve. Mivel számottevő különbség nem mutatkozik az expressziók között, arra következtetünk, hogy az $rybp$ nem a GATA faktorokon keresztül fejt ki hatását (18.ábra).

6.3. AZ $RYBP^{+/+}$, $RYBP^{-/-}$ ÉS TG^{rybp} GENOTÍPUSÚ SZÍVIZOMTELEPEK FEHÉRJE SZINTŰ (IHC) ANALÍZISE

Immunhisztokémiának nevezzük az olyan biológiai festési eljárást, mely során specifikusan kimutathatóvá tehetünk egy fehérjét. A módszer alkalmas fehérjék sejten belüli (intracelluláris) lokalizációjának meghatározására is. Kísérleteinkben specifikus fehérjék jelenlétét és sejten belüli lokalizációját vizsgáltuk kardiális irányba differenciált $rybp^{+/+}$, $rybp^{-/-}$ és Tg^{rybp} szívizomtelepeken. Ennek céljából immunfestést végeztünk.

A 6.1. pontban leírtak szerint jártunk el és $rybp^{+/+}$, $rybp^{-/-}$ és Tg^{rybp} sejtvonalból HD-módszerrel EB-ket képeztünk majd a telepeket zselatinnal felületkezelt lemezekre növesztettük 18 napon keresztül. 1 db 24 lyukú szövettényesztő lyukacskaiba 3-3 EB-t helyeztünk ki, mindhárom sejtvonalból 2x24-t (így sejtvonalként 144 EB-t vizsgáltunk). Kétnaponta tápoldatcserét végeztünk (DMEM –LIF –ASC)

Az $rybp^{-/-}$ mutáns szívizomtelepek az előzőekhez hasonlóan kisebb méretű és dobogásra képtelen kardiomiocitákat hoztak létre. Az előző kísérletekhez képest még új információt hordozott az $rybp$ -t túltermelő Tg^{rybp} sejtvonali telepeinek vizsgálata is: morfológiájuk alapján a transzgenikus sejtvonali nagyobb átmérőjű telepeket képzett (1.5x nagyobb terület) a $rybp^{+/+}$ sejtvonallalhoz képest és szintén pulzáló telepeket alkotott (19.ábra. 10x nagyítás).



19.ábra. $rybp^{+/+}$, $rybp^{-/-}$ és Tg^{rybp} szívizomtelep morfológiája és GFP expressziójuk

Immunfestést Rybp-DEDAF, Oct4, c Troponin T és Rhodamin-Phalloidin antitestekre végeztünk. (4. táblázat)

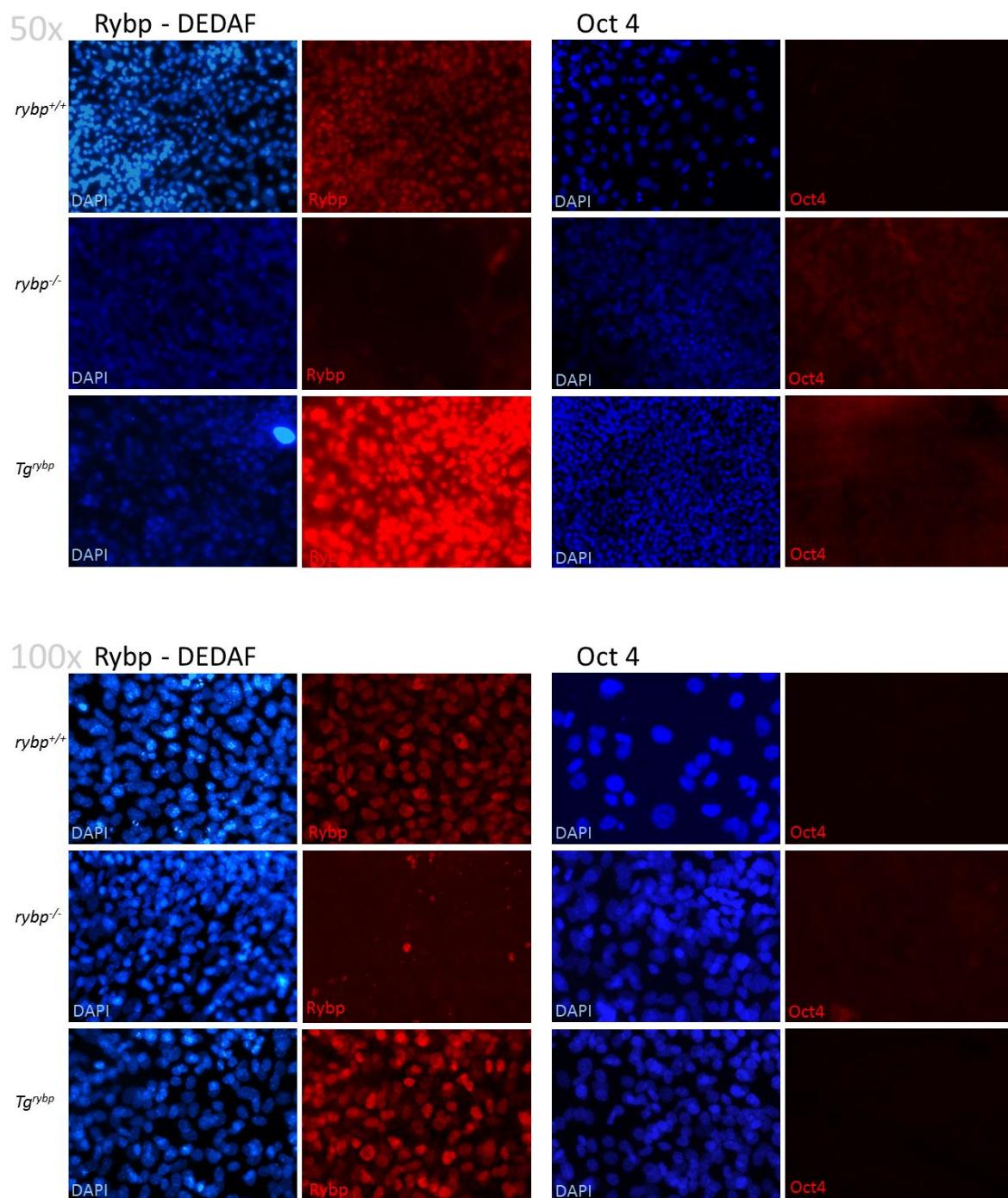
	Sejtvonal	Elsődleges antitest	Másodlagos antitest	Sejtmag festés
1.	<i>rybp</i> ^{+/+}	Rybp – DEDAF Rabbit	Alexa Fluor 647 G-A-R	DAPI
2.	<i>rybp</i> ^{-/-}			
3.	<i>Tg</i> ^{<i>rybp</i>}			
4.	<i>rybp</i> ^{+/+}	Oct 4 Mouse	Alexa Fluor 647 D-A-M	
5.	<i>rybp</i> ^{-/-}			
6.	<i>Tg</i> ^{<i>rybp</i>}			
7.	<i>rybp</i> ^{+/+}	c Troponin T Mouse	Alexa Fluor 488 G-A-M	
8.	<i>rybp</i> ^{-/-}		Alexa Fluor 546	
9.	<i>Tg</i> ^{<i>rybp</i>}		Alexa Fluor 546	
10.	<i>rybp</i> ^{+/+}	Rhodamin-Phalloidin		
11.	<i>rybp</i> ^{-/-}			
12.	<i>Tg</i> ^{<i>rybp</i>}			

4.táblázat. IHC-hez használt antitestek

Eredmények: Az Rybp túltermelésre képes transzgenikus sejtvonalban az Rybp túltermelve jelent meg a kontrol (*rybp*^{+/+}) sejtvonalhoz képest. A KO mutáns nem mutatott Rybp-DEDAF-ra pozitív jelet.

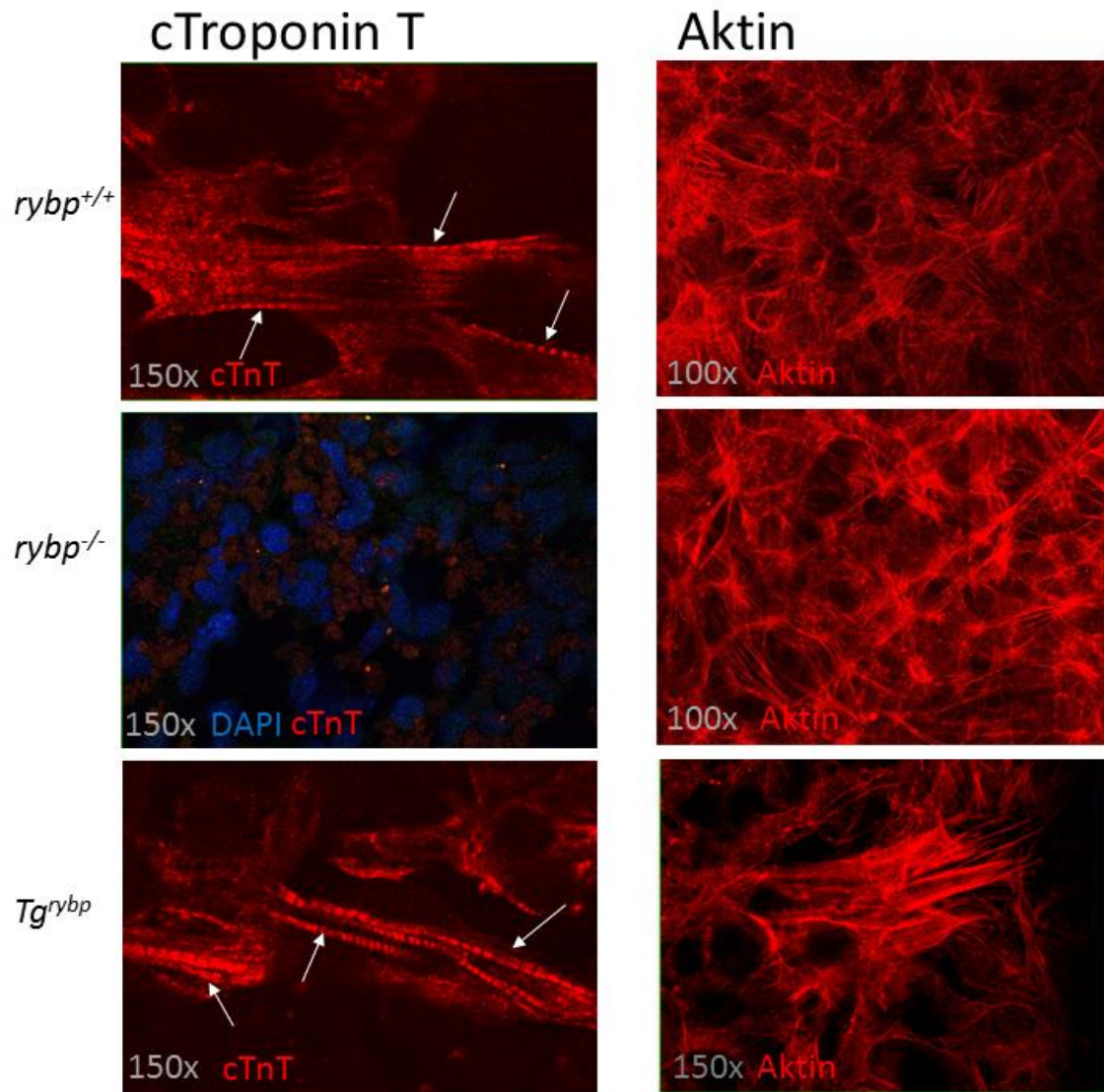
A szívizom irányú differenciációban bekövetkezett defektusok magyarázhatóak azzal, hogy a homozigóta mutánsokban bizonyos pluripotencia gének expressziója nem cseng le és emiatt nem képesek a sejtek a differenciáció beindítására. Ezért megvizsgáltuk a pluripotencia gének expresszióját mindhárom sejtvonalban. Az Oct4 pluripotencia génexpressziós szint változásának qRT-PCR módszerrel történő változásainak bemutatása a 20. ábrán látható: Az *oct4* gén expressziós szintje mindhárom sejtvonalban a differenciációval lecsökken. Tehát elmondható, hogy a defektus oka nem a pluripotencia gének kikapcsolásának hiányával magyarázható az *rybp*^{-/-}-szívizom telepekben.

Az eredményeket 50x és 100x nagyításban rögzítettük.



20.ábra. Rybp-DEDAF és Oct 4 expressziója (50x és 100x nagyítás)

Szívizomra specifikus cTnT antitesttel a harántcsíkolt izom jellegét vizsgáltuk. *Rybp*^{+/+} és *Tg^{rybp}* sejtvonalba a vártak megfelelően az izomrostok harántcsíkolt mintázata jól kivehető (fehér nyilak – 21.ábra). Az *rybp*^{-/-} szívizomtelepekben ez a struktúra nem figyelhető meg, ami megerősíti azt a feltevésünket, hogy noha ezekben a sejtekben is termelődik cTnT, az nem funkcionális (filamentek hiánya, harántcsíkoltat defektusa).



21.ábra. cTroponin T és aktin festés

A phalloidin *Amanita phalloides* gomba által termelt toxin, mely az aktin mikrofilamentumhoz kötődik. Az aktin az izomban a kontraktilis apparátus tagja. Mindhárom sejtvonala mutat aktinfilament-hálózatot ami azt jelzi, hogy az *rybp*^{-/-} szívizomtelepekben is kialakul az aktin váz, így feltehetőleg az *Rybp* hiánya az aktin váz kialakulását nem befolyásolja (21.ábra). Tehát az *Rybp* hiánya (direkt vagy indirekt módon) a szívizom specifikus, működőképes cTnT kialakulására van hatással.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

TDK dolgozati munkám kiindulópontjában az a hipotézis állt, hogy az *rybp* gén szerepet játszik a szív kialakulásában, így kísérletsorozatomban azt vizsgáltam, hogy az Rybp hiánya vagy túltermeltetése befolyásolja-e szívizomtelepek kialakulását. Eredményeim a következőkben foglalhatók össze:

- *rybp*^{-/-} mutáns összejtvonalt nem képez ritmikusan összehúzódó szívizomtelepeket; az *in vitro* szívizom irányú differenciációban defektust mutat.
- Morfológiájuk alapján az *rybp*^{-/-} összejtvonalból kialakuló szívizomtelepek kisebbek és csökevényesebbek a kontrol sejtvonalhoz képest.
- A morfológiai eltérésekkel párhuzamosan az *rybp*^{-/-} szívizomtelepek számos molekuláris szintű elváltozást is mutatnak.
- Több, a szívirányú differenciációban fontos gén expressziója megváltozott az *rybp*^{-/-} mutánsban (Isl1; Nkx2.5; GATA6; cTnT)
- *rybp*^{-/-} szívizomtelepekben a cTnT nem képez harántcsíkolatú szerkezetet, a szarkomerek nem alakulnak ki.
- Bizonyos gének expressziója nem változik az *rybp*^{-/-} mutánsban (Oct4 expresszió lecseng, phalloidin festésre mutat aktin hálózatot).

Jövőbeni terveink közé tartozik, hogy a szívizomtelepeket további immunhisztokémiai vizsgálatnak vetjük alá.

Összességében elmondhatjuk, hogy az Rybp hiányában a sejtek nem képesek dobogó kardiomiocitákat létrehozni, melynek oka, hogy az *rybp* gén szerepet játszhat a kardiális differenciációban.

8. MELLÉKLETEK

qRT-PCR-hoz használt primer szekvenciák:

HPRT forward: TCC TCC TCA GAC CGC TTT T

HPRT reverse: CCT GGT TCA TCA TCG CTA ATC

GAPDH forward: CAT GTT CCA GTA TGA CTC CAC TCA CG

GAPDH reverse: CCA GTA GAC TCC ACG ACA TAC TCA GCA

Troponin T forward: TTC TCG AAG TGA GCC TCG AT

Troponin T reverse: ATC CCC GAT GGA GAG AGA GT

Oct4 forward: AGC CGA CAA CAA TGA GAA CC

Oct4 reverse: TCT CCA GAC TCC ACC TCA CA

Nkx 2.5 forward: ACA CCC ACG CCT TTC TCA GT

Nkx 2.5 reverse: AGG TCC CCA GAC GCC A

Plgl1 forward: ATG GCT CCA TTC CGC TGT C

Plgl1 reverse: CTC AGC CTT CGA GCA CTT GA

Rybp forward: TTA GGA ACA GCG CCG AAG

Rybp reverse: GCC ACC AGC TGA GAA TTG AT

Brachyury forward: TAC ACC TCT AAT GTC CTC CCT TG

Brachyury reverse: CCA TAC AGT TGA CTT CCC AAC AC

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton köszönöm dolgozatom elkészítéséhez kapott támogatást a következő személyeknek:

Dr. Purity Melinda tudományos főmunkatársnak, témavezetőmnek, aki az elmúlt két évben bevezetett az őssejtkutatás világába, felkeltette érdeklődésem a tudományos laboratóriumi munka iránt. Támogatása, segítőkészsége, értékes és hasznos információi, észrevételei nagymértékben segített fejlődésemben és dolgozatom elkészítésében.

Köszönöm továbbá az Embrionális és Indukált Óssejtcsoport munkatársainak: **Radóné Dudás Mária**nak („Gyugyi”), **Szabó Viktória**nak, **Militár Beá**nak. **Kovács Gergő** és **Szécsényi Anita** Ph.D hallgatóknak, **Berecz Tünde**, **Nagy Diána**, **Varga Árpád** szakdolgozó társaimnak a kísérletek elvégzésében nyújtott segítségét és az ez idő alatti jókedv biztosítását.

Végül köszönöm a Szegedi Biológiai Kutatóközpont dolgozóinak, **Dr. Endre Gabriella**, **Ayaydin Ferhan** és **Dr. Mihály József** csoportvezetőknek segítségüket; és az SZBK Genetika Intézet igazgatójának, **Dr. Erdélyi Miklós**nak, hogy a kutatási projekt megvalósulhatott.

10. NYILATKOZAT

Alulírott, Vajda Flóra biomérnöki BSc szakos hallgató kijelentem, hogy a TDK dolgozatban foglaltak saját munkám eredményei, és csak a hivatkozott forrásokat (szakirodalom, eszközök, stb.) használtam fel.

.....
Vajda Flóra

2014

11. TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS

Alulírott Vajda Flóra, kijelentem, hogy a TDK dolgozatban foglaltak saját munkám eredményei. Így a dolgozatban leírt munkafolyamatok közül a következő módszereket sajátítottam el:

- Sejtek olvasztása és fagyasztása
- Sejtek fenntartása *in vitro*
- Függőcseppes embryoid body képzés
- *In vitro* kardiális differenciáció
- RNS izolálás
- Reverz transzkripció PCR
- PCR
- Agaróz gélelektroforézis
- Kvantitatív Real Time-PCR
- Immunhisztokémia
- Mikroszkópos sejtanalízis

12. TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

TDK:

2014. évi tavaszi Tudományos Diákköri Konferencia: IV. hely;

Az Rybp polikomb fehérje szerepének vizsgálata a szívizom kialakulásában

Szeged, Magyarország; 2014. április 29.

POSZTEREK:

F. Vajda, V. Szabo, D. Nagy, A. Kaity-Szecsényi and M. Purity;

Orthologs of the rabbit Oct4, Sox2, Klf4 pluripotency genes

Straub-napok, Szeged, Magyarország; 2013. május 29-30.

V. Szabo, **F. Vajda** and M. Purity;

Why stem cell derived rybp deficient cardiomyocytes are not contractible?

Straub-napok, Szeged, Magyarország; 2014. május 28-29.

13. REFERENCIÁK

- [1] Evans MJ, Kaufman MH: „Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos” *Nature* 1981, 292(5819):154-6.
- [2] Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM: „Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts” *Science* 1998, 282(5391):1145-7.
- [3] Takahashi K, Yamanaka S: „Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors” *Cell* 2006, 126(4):663-76.
- [4] García E, Marcos-Gutiérrez C, del Mar Lorente M, Moreno JC, Vidal M: „RYBP, a new repressor protein that interacts with components of the mammalian Polycomb complex, and with the transcription factor YY1” *The EMBO journal* 1999, 18(12): 3404–3418.
- [5] Tavares L, Dimitrova E, Oxley D, Webster J, Poot R, Demmers J, Bezstarosti K, Taylor S, Ura H, Koide H, Wutz A, Vidal M, Elderkin S, Brockdorff N: „RYBP-PRC1 complexes mediate H2A ubiquitylation at polycomb target sites independently of PRC2 and H3K27me3” *Cell* 2012, 148(4):664-78
- [6] Varghese S¹, Hwang NS, Ferran A, Hillel A, Theprungsirikul P, Canver AC, Zhang Z, Gearhart J, Elisseeff J:” Engineering musculoskeletal tissues with human embryonic germ cell derivatives.” *Stem Cells* 2010, 28(4):765-74.
- [7] Melinda K. Pirity, Joseph Locker, Nicole Schreiber-Agus: „Rybp/DEDAF Is Required for Early Postimplantation and for Central Nervous System Development” *Molecular and Cell Biology* 2005, 25(16): 7193–7202.
- [8] Fekete Éva: A gerinces állatok egyedfejlődésének anatómiai alapjai, JATEPress, 2006

[9] Yan Yan^{1,3*}, Wenfeng Zeng^{2*}, Shujun Song⁴, Fayun Zhang², Wenxi He¹, Wei Liang², Zhongying Niu: „Vitamin C induces periodontal ligament progenitor cell differentiation via activation of ERK pathway mediated by PELP1” *Protein & Cell* 2013, 4(8): 620–627

[10] Nan Cao¹, Zumei Liu¹, Zhongyan Chen¹, Jia Wang¹, Taotao Chen², Xiaoyang Zhao³, Yu Ma¹, Lianju Qin¹, Jiahong Kang², Bin Wei², Liu Wang³, Ying Jin^{1, 4}, Huang-Tian Yang¹: „Ascorbic acid enhances the cardiac differentiation of induced pluripotent stem cells through promoting the proliferation of cardiac progenitor cells” *Cell Research* 2012, 22:219-236

[11] Anna-Katerina Hadjantonakis, Melinda Pirity, András Nagy: „Cre recombinase mediated alterations of the mouse genome using embryonic stem cells” *Methods in Molecular Biology* 2008, 461: 111–132.

[12]] A Nagy, J Rossant, R Nagy, W Abramow-Newerly, J C Roder: „Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells” *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, 90(18): 8424–8428.

[13] Pirity MK¹, Wang WL, Wolf LV, Tamm ER, Schreiber-Agus N, Cvekl A: „Rybp, a polycomb complex-associated protein, is required for mouse eye development.”, *BMC Dev Biol.* 2007 7:39.