

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
Természettudományi és Informatikai Kar, Genetikai Tanszék
MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Genetikai Intézet

DIPLOMAMUNKA

***Rybp null* mutáns szívizomsejtek vizsgálata egér őssejtes modellrendszerben**

(Characterisation of *rybp null* mutant cardiomyocytes in mouse embryonic
stem cells)

Szabó Viktória

Biológus (MSc) szakos hallgató



Témavezető: **Dr. Pirity Melinda Katalin**

MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Konzulens: **Dr. Sinka Rita**

SZTE TTIK Genetikai Tanszék

Szeged

2016

1. TARTALMI ÖSSZEFOGLALÓ

A szív- és érrendszeri megbetegedések háttérben gyakran genetikai mutációk állnak, melyek nagyrészt még ismeretlenek. Laboratóriumunk egyik fő kutatási célpontja egy, a polikomb csoportba (Polycomb Group; PcG) tartozó Rybp fehérje (Ring1- and Yy1-Binding Protein; magyarul: Ring1- és Yy1-kötő fehérje) szív irányú differenciációban betöltött szerepének megismerése. Csoportunk korábban kimutatta, hogy az Rybp a szívben kifejeződik, azonban szerepe ismeretlen maradt. Dolgozatomban az Rybp kontraktilis szívizom kialakításában betöltött szerepét vizsgáltam. Kísérleteimhez egér őssejt alapú *in vitro* differenciáltatási módszert alkalmaztam, melynek során a vad típusú (*rybp*^{+/+}) és *rybp null* mutáns (*rybp*^{-/-}) egér embrionális őssejteket 7, 12, 14, 21 és 28 napon keresztül szívizom irányba differenciáltattam és jellemeztem. A differenciáció során szívizomtelepeken a kontrakciós képesség elemzésére Ca²⁺-tranzienst és sejtrövidülés méréseket végeztem (12. napon fluoreszcencia és videó-követéses technikával), majd a struktúrgének relatív génexpressziós szintjét kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakcióval (qRT-PCR); a fehérje kifejeződés mértékét és térbeli mintázatát pedig immunocitokémiával (immunocytochemistry; ICC) vizsgáltam. Az eredmények arra utalnak, hogy a vad típusú őssejtek képesek ritmikusan összehúzódó (kontraktilis) szívizomtelepeket létrehozni, míg az *rybp null* mutáns sejtelepek kontrakcióra képtelenek. Megfigyeltem, hogy a mutánsban a szívizomsejtekre jellemző szarkomer struktúra nem alakult ki, a struktúrgének expressziója lecsökkent, illetve a fehérjék lokalizációja eltért. Továbbá kimutattam, hogy egy, a szív irányú elköteleződésben kiemelten fontos fehérje, a Plagl1 (Pleiomorphic adenoma gene-like 1) transzkripciósfaktor Rybp hiányában nem termelődik. Végezetül, mivel mind az Rybp, mind pedig a Plagl1 fehérjéknek fontos szerepük van a sejtek proliferációjában és apoptózisában, összehasonlítottam a két sejtvonal sejtciklusát és apoptózist fluoreszcencia aktivált sejtválogatás (Fluorescence Activated Cell Sorting; FACS) segítségével, 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) és propidium-jodid (PI) jelölést használva. Vizsgálataim rámutattak, hogy Rybp hiányában a differenciáció során kevesebb sejt tartózkodik G1/G0 és több S fázisban, továbbá megemelkedett az apoptózis szintje. Mindezek arra utalnak, hogy az Rybp és a Plagl1 egy közös útvonal tagjaiként vesznek részt a szívizom irányú differenciációban. A leírt eredmények hozzájárulhatnak a veleszületett szívbetegségek megértéséhez és segítséget nyújthatnak az őssejt-alapú terápiák alkalmazásához a szívizomszövet-regenerációban.

Kulcsszavak: őssejt, *rybp*, *plagl1*, szarkomer, *in vitro* kardiális differenciáció

2. TARTALOMJEGYZÉK

1. Tartalmi összefoglaló	1
3. Előzmények és célkitűzések	3
4. Irodalmi áttekintés	4
4.1 Az őssejtek.....	4
4.2 A polikomb csoport és az Rybp fehérje	5
4.3 Az rybp szerepe <i>in vivo</i>	6
4.4 Az <i>in vitro</i> kardiális differenciáció módszerei.....	7
4.5 A proliferáció, a sejtciklus és az apoptózis jelentősége a szívfejlődésben	7
4.6 Az emlős szív és a szarkomer kialakulása, felépítése.....	8
4.7 Az általunk vizsgált szarkomer szerkezeti elemek jellemzése	10
4.8 A Plagl1, mint a kardiális differenciáció esszenciális szabályozója.....	14
5. Anyagok és módszerek.....	15
6. Eredmények és megvitatásuk	22
6.1 Az rybp ^{+/+} és rybp ^{-/-} szívizomtelepek morfológiájának összehasonlítása a kardiális differenciáció során.....	22
6.2 Az apoptózis és a sejtciklus összehasonlítása az rybp ^{+/+} és rybp ^{-/-} sejtvonalakban a kardiális differenciáció során.....	23
6.3 Az rybp ^{+/+} és az rybp ^{-/-} szívizomtelepek kontraktilitásának vizsgálata.....	27
6.4 A szarkomer-szerkezet kialakításában fontos gének, fehérjék vizsgálata	28
6.5 A Plagl1 transzkripció faktor expressziójának vizsgálata az rybp ^{-/-} sejtekben	34
7. Összefoglalás.....	35
8. Irodalomjegyzék	36
9. Nyilatkozat	40
10. Köszönetnyilvánítás	41
11. Mellékletek	42

3. ELŐZMÉNYEK ÉS CÉLKITŰZÉSEK

Diplomamunkám elkészítéséhez az MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont (MTA-SZBK; Genetikai Intézet; Emlőssejt Kutató Témacsoport), Embrionális és Indukált Óssejt Csoportja biztosított lehetőséget. Laboratóriumunk a differenciáció folyamatát vizsgálja. Az egyik fő kutatási terület a polikomb csoportba (Polycomb Group; PcG) tartozó Ring1- és Yy1-kötő fehérje (Rybp; Ring1- and YY1-Binding Protein; DEDAF (Death Effector Domain Associated Factor), UniGene Mm.321633; MGI:1929059) kardiális differenciációban betöltött szerepének vizsgálata *in vitro* őssejtes modellrendszerben. Ehhez a laboratóriumban korábban előállított vad típusú (*rybp*^{+/+}) és *rybp* homozigóta null mutáns (*rybp*^{-/-}) egér embrionális őssejtvonalakat alkalmaztuk. Munkám alapjául az a megfigyelés szolgált, hogy *rybp* hiányában a szívizom-irányú differenciáció folyamata sérült, nem képződnek összehúzódásra képes szívizomtelepek [1]. Diplomamunkám a fenotípus hátterében álló molekuláris mechanizmusok megismerésére irányult. Úgyszintén, korábban kimutattuk, hogy az *rybp* null mutánsban a szívizom-irányú differenciációban, apoptózisban és sejtciklusban fontos transzkripciós faktor, a Plagl1 (Pleiomorphic adenoma gene-like 1; Zac1 (Zinc finger protein regulating apoptosis and cell-cycle arrest) és Lot1 (Lost on transformation 1), Unigene Mm.287857; MGI:1100874) mRNS szintje teljesen lecsökkent [1]. Hipotézisünk értelmében az *rybp* null mutáns fenotípust okozhatja a vad típustól eltérően, hogy az *rybp* hiányában (i) megváltozott a sejtekben az egyes sejtciklus-fázisok aránya; (ii) megváltozott a sejtek apoptotikus képessége, (iii) nem alakult ki a szarkomer megfelelő organizációja.

Diplomamunkám célja az Rybp szerepének vizsgálata a funkcionális, kontraktilis szívizom kialakításában, különös tekintettel a szarkomer-szerkezetre, sejtciklusra és apoptózisra.

Munkám során célkitűzéseim a következők voltak:

- az *rybp*^{+/+} és az *rybp*^{-/-} szívizomtelepek közötti morfológiai különbségek elemzése
- az *rybp*^{+/+} és az *rybp*^{-/-} szívizomsejtek kontrakciós képességének vizsgálata
- az *rybp*^{+/+} és az *rybp*^{-/-} szívizomtelepekben a szarkomer felépítésében kulcsfontosságú, úgynevezett struktúrgének analízise
- a kardiális differenciációban, apoptózisban és sejtciklusban fontos Plagl1 transzkripciós faktor vizsgálata az *rybp*^{+/+} és az *rybp*^{-/-} sejtekben
- az *rybp*^{+/+} és az *rybp*^{-/-} szívizomtelepek apoptotikus képességének és sejtciklusának összehasonlítása

4. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

4.1 Az őssejtek

Az őssejtek olyan sejtek, melyek korlátlan számú sejtosztódásra, önmegújításra, mindhárom csíravonal (ekto-, mezo- és endoderma) és az ezekből származtatott sejtek létrehozására képesek. Az őssejteknek ezen tulajdonsága a pluripotencia. Így őssejtekből alakul ki például az összes testi sejtünk. Eredetük szerint három csoportba sorolhatjuk az őssejteket: az **embrionális őssejtek** (Embryonic Stem Cell; ESC) vagy másnéven pluripotens őssejtek morula stádiumból és hólyagcsíra állapotú embriók belső sejtsomójából (Inner Cell Mass; ICM) származnak, a **felnőtt, multipotens őssejtek** pedig felnőtt szövetekből, mint pl. vérből és csontvelőből nyerhetők ki. Pluripotens őssejtek létrehozhatók még újraprogramozással testi sejtekből, ezek az úgynevezett **indukált pluripotens őssejtek** (Induced Pluripotent Stem Cell; iPSC) [2, 3]. Ismereteink többsége – beleértve az embrionális és születés utáni, ún. posztembrionális szakaszt is – egermodellekből származik. 1981-ben izoláltak először eger embrióból embrionális őssejteket, ezzel együtt létrehozták az első *in vitro* őssejtvonalat [4].

Az őssejteket csoportosíthatjuk potenciáljuk alapján: a **totipotens őssejtek** mind embrionális, mind extraembrionális irányba képesek differenciálódni és képesek ivarsejteket is létrehozni (zigóta). A **pluripotens őssejtek** képesek a test minden szövetét létrehozni, de az extraembrionális szöveteket nem (amnion, chorion, yolk sac, allantois) (pl. blasztocisza belső sejtömege (ICM; Inner Cell Mass)). A **multipotens őssejtek** olyan szöveti őssejtek, amik korlátozott fejlődési képességgel bírnak, tehát csak bizonyos sejtípusok irányába képesek differenciálódni (pl. vérképző-őssejtek). **Unipotens/oligopotens őssejtek** csak egyféle sejtípust hozhatnak (pl. neuron) létre, de képesek a megújulásra, ami megkülönbözteti őket a differenciálódott testi sejtektől [2].

Az őssejtek és az őssejtvonalak kultúrában fenntarthatók, manipulálhatók, önmegújító és differenciációs képességük fennmarad. A sejtenyésztési körülmények célzott megváltoztatásával az őssejteket különböző fejlődési irányba differenciáltathatjuk. Így *in vitro* növeszthetők többek között szívizomsejtek vagy neurális hálózatok. Az őssejtek alkalmas modellrendszert nyújtanak *in vitro* olyan gének vizsgálatához is, melyeknek mutációja *in vivo* az élőlény letalításához vezet.

4.2 A polikomb csoport és az Rybp fehérje

4.2.1 A polikomb csoport (Polycomb Group; PcG)

Az epigenetika a gének olyan öröklődési formájának vizsgálata, ami nem jár együtt az elsődleges DNS szekvencia megváltozásával. Ilyen epigenetikai módosítások a DNS metilációk, a kromatin újrendeződések és a hiszton modifikációk. A hisztonok kovalens módosításai a kromatin átrendeződésén keresztül a gének aktiválásához (Trithorax (Trithorax; TrxG) transzkripciós faktor komplex végzi) vagy gátlásához (PcG transzkripciós faktor komplexek végzik) vezet. A PcG fehérjék a transzkripciós represszorok egy konzervált csoportja, amik a pluripotens (csíravonal-specifikus géneket gátolnak) és differenciált állapot közötti átkapcsolóként működnek [5, 6]. A PcG fehérjekomplexek a célgén szabályozó szekvenciáin a hisztonmódosításra kijelölt helyeken (lizin-csoport) metilációt vagy ubiquitinációt iniciálnak. A PcG fehérjék kétféle fő multiprotein komplexbe rendeződhetnek, mint a kanonikális (általános) Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1) és Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2). A PRC2 (központi tagok: Ezh2, Eed, Suz12) által közvetített trimetilálási lépés után képes bekötni a PRC1 (központi tagok: Cbx, Pcgf, Ring, Phc) a célgénhez és monoubiquitinációt iniciálni. Többféle PRC1 komplexet is megkülönböztethetünk attól függően, hogy a tagok (pl. Pcgf) mely izoformái (pl. Pcgf1 vagy Pcgf2) alkotnak kombinációt. Ez a rendezettség függ a specifikus célgéntől, az összeszerelődési mechanizmustól és a fejlődési állapot-függő enzimatis aktivitástól. A PRC1 egy központi tagja, a Cbx7 a sejtek pluripotens állapotában van jelen, majd a kardiális differenciáció során Cbx2-re (mezodermális őssejtekben) és Cbx4-re cserélődik (differenciálódott szívizomsejtekben) [7, 8]. Nemrég a kanonikális PRC komplexeken kívül alternatív, non-kanonikális PRC1 komplexek létezését is leírták, amelyek nem igénylik a PRC2 aktivitását a monoubiquitinációhoz és Cbx helyett Rybp-t tartalmaznak. Feltételezik, hogy a PRC komplexek összetétele, és hogy a PRC1-ben a Cbx vagy az Rybp van jelen, szövetspecifitást határoz meg, azonban ennek molekuláris mechanizmusa nem ismert [9].

4.2.2 Az Rybp fehérje

A vizsgálataink középpontjában álló Rybp fehérje a non-kanonikális PRC1 tagja [10, 11]. Nevét kölcsönható partnereiről kapta, melyek a Ring1 (*Ring finger protein 1*) és a Yy1 (*Yin and Yang 1 protein*) PcG fehérjék [12]. A Ring1 polikomb fehérje a PRC1 tagja, E3 ubiquitin-protein ligáz, mely DNS-kötő képességgel is rendelkezik. Korábban a *ring1*

funkcióvesztéses (knock out; KO) egerekben a tengelyváz anterior transzformációját és egyéb rendellenességeit figyelték meg [13], de a szív kialakulásában szerepe nem vizsgált [12, 14]. A Yy1 cink-ujj transzkripciós aktivátor és represszor fehérje, homozigóta mutációja egérben embrionális letalitást mutat a beágyazódásnál. Szerepe van a korai kardiális mezoderma fejlődésében. Yy1 hipomorf egér modellben megfigyelték, hogy az embrionális fejlődés során a Yy1 elengedhetetlen a szív embrionális fejlődéséhez, a sejtek apoptózisához és proliferációjához. [15]. Az *rybp* gén egérben (*Mus musculus*) 58794 bázispárból áll és a 6. kromoszómán lokalizálódik (6E1), fehérjeterméke pedig (Rybp) 228 aminosavból áll. Emberben (*Homo sapiens*) homológja a hármas kromoszómán található (3p13). Az Rybp fehérje N-terminális régiójában egy evolúciósan konzervált cink-ujj domén található. Az Rybp úgynevezett „moonlighting”, rendezetlen fehérje, ami annyit jelent, hogy igen sokféle kölcsönhatásra képes különböző komplexek tagjaként, más-más funkciót ellátva. Így képes transzkripciós regulátorként funkcionálni [16] vagy hídképző faktorként működve kapcsolatot létesíteni a promóterekben lévő Yy1 és E2f kötőhelyek között [17]. Hídképző funkciója révén képes multimerikus fehérje komplexeket szabályozni és azokat a megfelelő promóterekhez célba juttatni. Az Rybp *in vitro* képes kölcsönhatásba lépni kromatin-módosító (Brg1) [18], proapoptotikus (Pro-caspase-8) [19, 20], DNS-kötő (Yy1) és más polikomb fehérjékkel (M33, mPc2, Ring1A, Ring1B) [12], továbbá az MDM2-vel kölcsönhatva részt vesz a p53 szabályozásában [21]. Az *rybp* a tumorbiológiában is egyre növekvő szereppel bír: új potenciális biomarker hepatocelluláris karcinómában (Hepatocellular Carcinome; HCC), ugyanis az *rybp* szintje csökkent a HCC-s betegeknel, megemelkedett szintje pedig érzékenyít a kemoterápiás kezelésre [22].

4.3 Az *rybp* szerepe *in vivo*

Csoportunk korábban kimutatta, hogy az *rybp* homozigóta null mutáns (*rybp*^{-/-}) egerek nem életképesek, a fenotípus korai embrionális letális. *Rybp* heterozigóta mutáns (*rybp*^{+/-}) egerek esetében pedig részlegesen átadódó letalitást figyeltünk meg: az embriók egy része a velőcső-záródási rendellenességek következtében elpusztult. Az *rybp*^{+/-} egereknél továbbá megfigyelhető a nyitott koponyatető (exenkefália), a retina záródási rendellenessége (kolobóma) [23], az elő- és középagy hiperproliferációja és a holoprozenkefália (amikor az embrionális fejlődés során az előagy nem osztódik ketté). Kiméra állatokban (*rybp*^{+/+} és *rybp*^{-/-} sejtek keverékéből álló állatok) az Rybp deficiens sejtek jelenléte a heterozigóta állatokhoz hasonló fenotípusos jellegeket eredményezett

[24]. Részint az *rybp*^{-/-} egerek beágyazódás körüli embrionális letalitása miatt vált szükségessé az általunk használt *in vitro* összejtes modellrendszer alkalmazása, hiszen a korai letalitás megakadályozta az *rybp*-nek a beágyazódást követő folyamatokban, így pl. a szív kialakulásában betöltött szerepének vizsgálatát.

4.4 Az *in vitro* kardiális differenciáció módszerei

Munkám során az *rybp*^{+/+} és *rybp*^{-/-} összejtvonalak szívizom irányú differenciációját végeztem el. A módszer alapja, hogy az összejtekből úgynevezett embrionális testeket (Embryoid Body; EB) formálunk. Az EB-k összejtaggregátumok, amik mimikálják az embrionális fejlődés korai stádiumát és bennük mindhárom csíravonal kialakul (ektoderma, endoderma, mezoderma).

Az EB képzéshez leggyakrabban alkalmazott módszerek:

1. *Szuszpenziós technika*: a kísérlet során az összejteket meghatározott sejtszámban differenciációs tápoldatba helyezik olyan sejttenyésztő edénybe, ahol letapadásuk gátolt. A sejtek aggregálódnak és szabad szemmel is látható, de változatos formájú és változatos méretű EB-ket képeznek. A módszer előnye hogy nem igényel bonyolult technikai felkészültséget.
2. *Függőcseppes technika (Hanging Drop; HD)*: az összejteket a sejtszám meghatározás után (50 sejt/ μ l) cseppenként kell elhelyezni sejttenyésztő edény fedelébe. A sejtek két napig függőcseppekként aggregálódnak és morfológiailag egységesebb (gömbszerű) EB-ket képeznek. Magasabb szintű technikai tudást és tréninget igényel kivitelezése a szuszpenziós módszerhez képest.
3. *Slow Turning Lateral Vessel (STLV) technika*: az összejteket tartalmazó szuszpenzió egy rotációs készülékben kering, ami minimális nyíróerőt és optimális tenyésztési körülményeket biztosít az EB képzés számára. A rendszer automatizálható (gyógyszeripari alkalmazásoknál előnyös), gyakorlatilag egyforma EB-ket eredményez, azonban költséges.

4.5 A proliferáció, a sejtciklus és az apoptózis jelentősége a szívfejlődésben

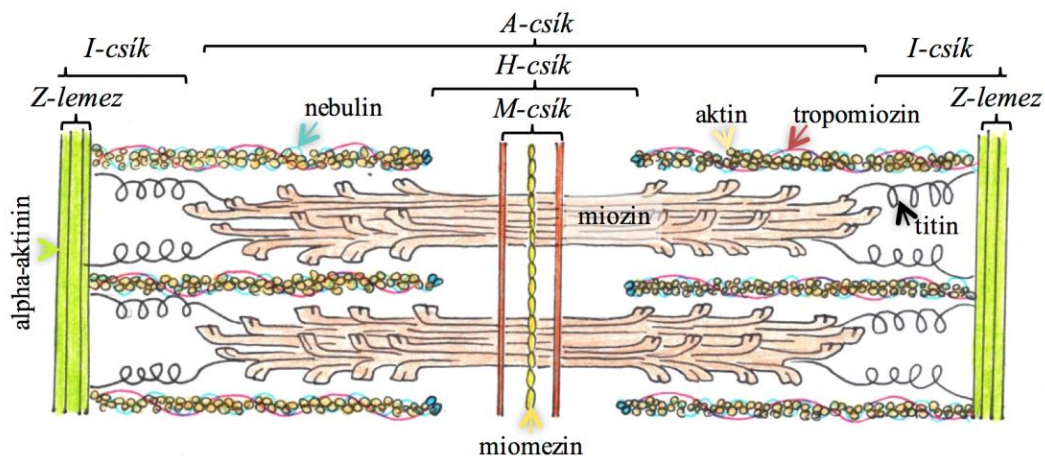
A **proliferáció** a sejtnövekedés és osztódás következtében létrejövő sejtszámbeli növekedés, amely a differenciációval összehangoltan, a sejtcikluson keresztül szabályozva megy végbe. A szívizomsejtek proliferációja meghatározza a szív fejlődését és regenerációs képességét. A szívizomsejtek növekedési mintázata kapcsolatban áll a szív

formálódásával, méretével és funkciójával. A **sejtciklus** az eukarióta sejtek szigorúan szabályozott folyamata. A sejtciklusnak két fő fázisa van, ami az interfázis (I) és a mitózis (M). Az interfázison belül megkülönböztetünk nyugalmi állapotot (G0; gap0), növekedési szakaszokat (G1 és G2; gap1 és 2) és a DNS duplikálódás fázisát (S; synthesis). A sejtciklus fő szabályozói a ciklinek, ciklin-dependens kinázok és ezek regulátorai (pl. p53) [25]. Az őssejtek rövid G1 fázissal rendelkeznek és leginkább a sejtciklus S fázisában tartózkodnak, majd a differenciálódás során a sejtek a G1 fázisba vagy G0 fázisba kerülnek. Születés után a szívizomsejtek irreverzibilisen kilépnek a sejtciklusból. Emlősejtekben a szívizomsejtek ezen tulajdonsága miatt a kardiális regeneráció limitált [26]. Az **apoptózis** a többsejtű élőlényekre jellemző programozott sejthalál egyik formája. Az apoptózis természetes válaszreakció a „suicide” (öngyilkos) szignálokra vagy a „survival” (túlélő) szignálok hiányára, továbbá elengedhetetlen az egyedfejlődés mechanizmusában (szervek, testrészek kialakítása) és az immunrendszer működésében [27]. Ha az apoptózis és/vagy a proliferáció folyamata sérül, az korlátlan sejtosztódáshoz, azaz tumorok képződéséhez vezethet [28, 29]. Az apoptózis a szív koordinált fejlődéséhez is szükséges. Fokális (helyhez kötött) apoptózis zajlik le az embrionális kiáramlási traktus, a szívbillentyűk, a vezetési rendszer és a fejlődő koszorúér rendszer esetében [30]. A születés utáni koordinálatlan apoptózis azonban a szív rendellenes működéséhez vezet. A szívelégtelenség adódhat a szívizomsejt mechanikai tulajdonságainak defektusából (szerzett vagy öröklött), a szívizomsejteket körülvevő extracelluláris mátrix (ECM) rendellenességeiből vagy olyan defektusokból, amik a sejt túlélését érintik [31]. A DNS fragmentációja és kaszpáz-3 (Caspase-3; apoptózis marker) aktivitása magasabb volt azon beteg emberektől származó szívizomsejtekben, akik szívelégtelenségben szenvedtek, mint azokban, akik hirtelen szívhalálban hunytak el [32].

4.6 Az emlős szív és a szarkomer kialakulása, felépítése

Az egyedfejlődés során a szív a mezodermből alakul ki. A kezdeti multipotens progenitor sejtekből kamrai és pitvari szívizomsejtek, fibroblaszt-, endokardiális- és epikardiális-sejtek, a vezető rendszer sejtjei (sinoatrial csomó, atrioventricular csomó, Purkinje rostok), az aorta és az artéria simaizomsejtjei és az autonóm idegrendszer sejtjei jönnek létre. A szív normál fejlődéséhez, a differenciációhoz és éréshez szívspecifikus génexpressziók szükségesek, ezek mutációja szívfejlődési rendellenességekhez vezet (pl. Brachyury (T) mezoderma marker; Islet1 multipotens kardiális progenitor marker; Nkx2-5 korai

differentiációs marker) [33]. Korábban kimutattuk, hogy Rybp hiányában az Islet1 expressziója lecsökkent és emellett több, a szívizom-irányú differenciáció későbbi pontjaiban jelentős marker (pl. Tnnt2, Tnni3 stb.) szintje is eltéréseket mutatott [1]. Az összejték kiváló modellrendszert nyújtanak a szívizom és a szarkomer vizsgálatához *in vitro*, többek között jól meghatározható bennük egy fehérje fejlődésbiológiai szerepe is. Már a szív kialakulásának elején megkezdődik a szarkomer szerkezeti komponenseinek expressziója. A szarkomer a szív- és a vázizom legkisebb funkcionális egysége, ami esszenciális a mechanikus erő generálásában és továbbadásában. A szarkomerek egymás utáni rendeződése hozza létre a myofibrillumokat, amik egy hosszanti tengely mentén képzik az orsó alakú szívizomsejtet. A szívizomsejtek végkapcsoló struktúrákkal kapcsolódnak össze (*discus intercalaris*) és funkcionális szincíciumot alkotnak. Egy szívizomsejtnek egy, maximum kettő sejtmagja van. A myofibrillumokat myofilamentumok építik fel (vékonyabb (6-9 nm vastag) főként aktinból, vastagabb (12-15 nm vastag) főként miozinból), amik periodikus ismétlése adja a harántcsíkolatot. A szarkomer felépítését tekintve „csíkokra” bontható, melyekben a szerkezeti fehérjék szisztematikusan rendeződnek, szerkezeti állandóságáért a struktúrgének felelősek (1. ábra). Egy szarkomerikus egység (2,2-2,5 μm hosszú) határát a Z-lemez alkotja, egyben ez kapcsolja össze a szomszédos egységeket. A Z-lemezt az I-csík veszi körül, ami csak aktin-filamentumokból áll. Az A-csíkot aktin és miozin filamentumok építik fel, a H-csíkot pedig csak miozin filamentumok. Az M-csík a szarkomer középvonala. A szívizom-sejtek kontrakciója az aktin filamentumok és a miozin filamentumok koordinált egymáson történő elcsúszásán alapszik, ATP-függő módon [34]. Ha a fehérjék szintézise, működése, degradációja vagy lokalizációja eltér, az a szívizom elégtelen működéséhez vezethet (kardiomiopátiák és veleszületett szívbetegségek (Congenital Heart Defect; CHD)) [35].



1. ábra: A szarkomer felépítése, a főbb régiók és alkotók megnevezésével (saját illusztráció)

4.7 Az általunk vizsgált szarkomer szerkezeti elemek jellemzése

A kísérleteink során olyan géneket és róluk képződő fehérjéket vizsgáltunk, amik a szarkomer egyes funkcionális egységében nagy jelentőséggel bírnak (1. ábra, 2. ábra).

A **miozin** motor fehérje, fő funkciói az energia továbbítása és az erő generálása. 270-350 miozinmolekula alkotja a vastag filamentumot, ami a szarkomer A-csíkjának felel meg, közepén az M-csíkkal, ami a miozinok harántkapcsolatai miatt sötétebb színezetű (1. ábra, 2. ábra). A vastag filamentumok bipolárisak, csúcsi részükkel a Z-vonal felé tekintenek. A miozinok két fő osztályba sorolhatóak, amik a hagyományos kétfejű miozinok és a nem hagyományos egyfejű miozinok. Az általunk vizsgált szarkomerikus miozin a kétfejű miozinok csoportjába sorolható. Felépítésüket tekintve hexamer fehérjék (520 kDa): két miozin-nehézláncból (Myosin Heavy Chain; MHC, pl. *myh6*, *myh7*) és négy miozin-könnyűláncból (Myosin Light Chain; MLC, pl. *myl7*) épülnek fel. Az MHC-k a miozin C-terminálisán dimerizálódva alkotják a farki régiót, ami felel a miozin szarkomeren belüli rendezettségéért (pl. titinnel kölcsönhatva) és az aktinnal való kapcsolatért. A miozin N-terminálisán az MHC-k kettő globuláris fejet alakítanak ki, ami tartalmazza az MLC-k, az ATP, az aktin és a kétértékű kationok kötőhelyeit, amik szükségesek a motorikus funkció betöltéséhez. A *MYH6* (*myosin, heavy polypeptide 6, cardiac muscle, alpha*, α MHC) a szívfejlődés során a pitvarokban nagy mértékben, kisebb mértékben pedig a kamrákban expresszálódik, majd a felnőtt szívpitvarban domináns marad. A rágcsálókban embrionálisan a pitvarban magasabb a *Myh6* expresszió, felnőtt szívben viszont mind a kamrában, mind a pitvarban ez a domináns nehézlánc izoforma. Az α MHC volt az első szerkezeti fehérje, amelynek mutációját összefüggésbe hozták CHD-val, pitvari septum defektusokkal (Atrial Septal Defect; ASD), kamrai septum defektusokkal (Ventricular Septal Defect; VSD) és persistens truncus arteriosus-szal (PTA). Homozigóta mutációja egérben embrionális letális, heterozigóta mutációja abnormális szívfunkcióhoz és szarkomer szerkezethez vezet. A *MYH7* (*myosin, heavy polypeptide 7, cardiac muscle, beta*, β MHC) a kamrai miozin nehézlánc izoforma, mutációját kimutatták számos kardiomiopátiában, ASD-ben, VSD-ben és Epstein anomáliában (tricuspidalis billentyű hibája). Deléciós fenotípusát egérben még nem írták le [36].

A vékony filamentet két egymás köré csavarodó aktin lánc alkotja, az ezek közötti barázdába fekszik a **tropomiozin** (*tpm*, Tm) (1. ábra, 2. ábra), amihez a három alegységből álló troponin komplex kapcsolódik. Ezáltal a Tm a Ca^{2+} -szabályozta kontrakció egyik közvetítője. A Tm-nek egérben négy izoformája ismert, ezek az α -Tm

(*tpm1*), β -Tm (*tpm2*), γ -Tm (*tpm3*), δ -Tm (*tpm4*) [37]. A szívspecifikus Tm egy $\alpha\alpha$ -Tm homodimer [38], de nemrég a *tpm4* szerepét is kimutatták a szarkomer kialakításában [37]. Embrionális korban az α -Tm és a β -Tm expresszálódik a szívben, majd a születés után a β -Tm expressziója lecsökken. A *TPM1* mutációját kimutatták örökletes hipertrófiás kardiomiopátiában (familial hypertrophic cardiomyopathy (FHC)) és dilatatív kardiomiopátiában (dilated cardiomyopathy (DCM)) [38].

A szívizomsejtek összehúzódását a Tm szálon elhelyezkedő **kardiális troponin (cTn) komplex** (2. ábra) szabályozza, ami a vékony és vastag filamentumok közötti kötés kialakulását teszi lehetővé Ca^{2+} megkötése után. A cTn komplex három alegységből áll. A kardiális troponin C (*tnnc1*, cTnC) (2. ábra) a Ca^{2+} -kötő alegység, a kardiális troponin I (*tnni3*, cTnI) (2. ábra) egy gátló alegység, ami az aktin és a cTnC közötti Ca^{2+} koncentráció függő válaszban vesz részt, továbbá a kardiális troponin T (*tnnt2*, cTnT) (2. ábra), ami az egész cTn komplexet a Tm-hez köti. Az aktin-miozin kapcsolódása gátolt a cTnI által, ha a cTnC-hez nem köt Ca^{2+} [39, 40]. cTnT-deficiens (*tnnc1*^{-/-}) egerekben a vékony és vastag filamentumok nem szerelődtek össze szarkomerré, az egerek korai embrionális letalitást mutattak, a cTnI pedig disszociált a Tn komplexről. A Ca^{2+} -tranziensek nem sérültek, ami azt bizonyítja, hogy ez a cTnT-nek egy szerkezettől független funkciója. A heterozigóta mutáns (*tnnc1*^{+/-}) egerek nem mutattak abnormalitást a szív fejlődésében [41]. A *TNNC1* mutációja emberben hipertrófiás kardiomiopátiához (HCM) vezetett [42]. A cTnI foszfoprotein hiányában az egerek normál testsúllyal és egészséges szívvel jönnek világra egy magzati TnI izoformának (slow skeletal troponin I) köszönhetően, ami kompenzálja a cTnI hiányát. Ennek az izoformának azonban az expressziója lecsökken a születés utáni 15. naptól ami az egerekben akut szívelégtelenséghez vezetett és így azok a 18. napon elpusztultak. Ez a cTnI normál szívfunkcióban és túlélésben játszott szerepét bizonyítja. Ezen egerek kamrai szívizomsejtjeiben a szarkomerek rövidebbek voltak és csökkent a Ca^{2+} érzékenység. A módosult cTnI emberben számos szívbetegségben kimutatható volt: kábult („stunned”) myocardiumban, iszkémiás, infarktusos szívben és akut koronáriás szindrómákban [43], továbbá restriktív kardiomiopátiákban (RCM) [44].

A vastag filamentumok szabályos elrendeződésében és kihorgonyzásában résztvevő M-csík legjelentősebb komponense a **miomezin** (*myom1*, Myom, szkelemin) (1. ábra, 2. ábra). A Myom és egy M-protein nevű fehérje a miozin filamentek középpontjába és a titin C-terminusába köt. Kontrakció alatt segít a vastag filamentek szerkezeti integritásának megőrzésében és segít a titinnek „túlélni” a működő izomban létrejövő erő

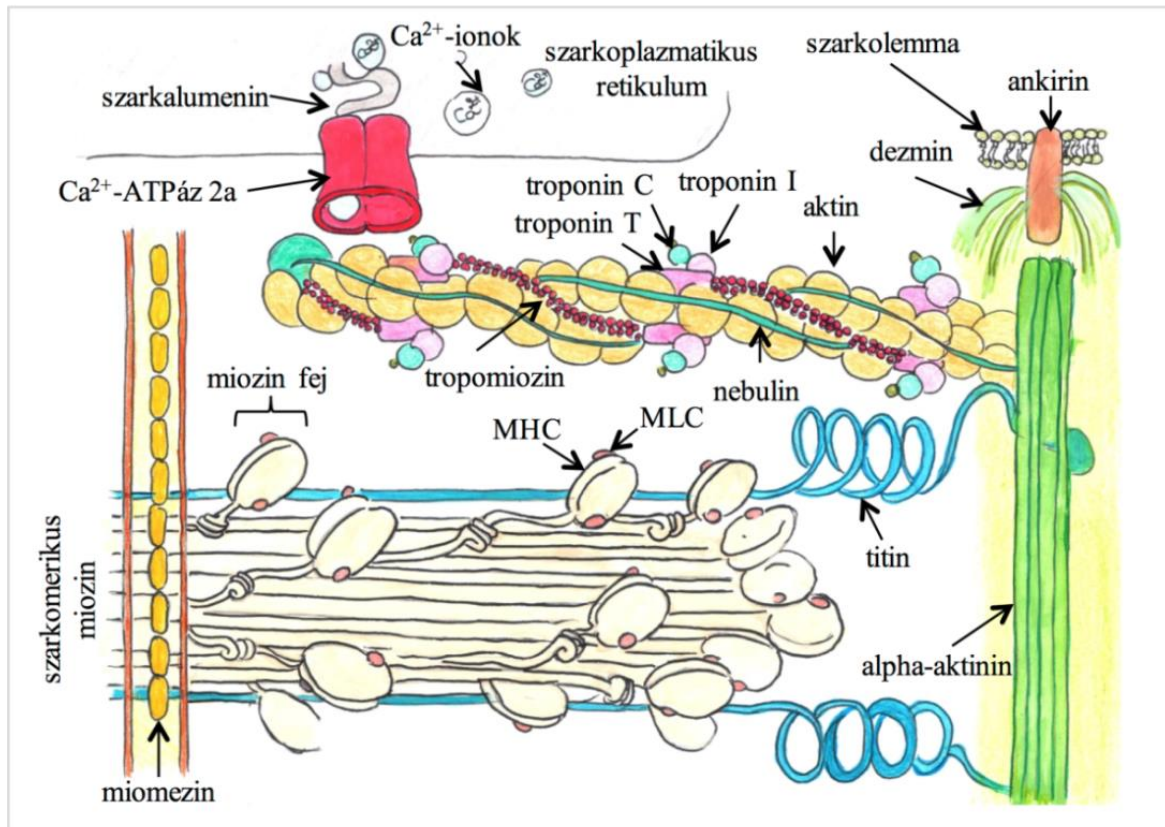
egyenetlenségeket úgy, hogy a miomezin antiparallel dimerei a kontrakció alatt megnyúlnak. A Myom és a titin izoformái összehangoltan alakulnak a szív fejlődése alatt [45]. Egérben indirekt *myom1* knock-outot végeztek a miomezin génjét aktiváló Mef2c transzkripciós faktor deletálásával, ami a szarkomer dezorganizációjához vezetett [46]. Emberben a *MYOM1* mutációját HCM-ben mutatták ki [47].

A **titin** (*ttn*, Ttn, konnektin) a szarkomer óriás fehérjéje (~3000 kDa) (1. ábra, 2. ábra), molekuláris rugóként szolgál az izom plasztikus elaszticitásában. A Z-lemezt az M-csíkhöz kapcsolja, szerepet játszik az erőátvitelben és fenntart egy nyugalmi feszültséget az I régióban. Hozzájárul az izom passzív merevségéhez a szarkomerhossz megváltozásának korlátozásával. Szívben specifikus izoformái (felnőtt N2B, felnőtt N2B-A, magzati FCT) alternatív splicing-gal alakulnak ki [48]. A *TTN* mutációja olyan betegségekhez köthető emberben, mint az örökletes DCM és a HCM [49]. A DCM-ben a Ttn Z-lemezben alpha-aktininhez és T-cap-hez (telethonin) való kötődési affinitása lecsökkent [50]. Egér modellben a *ttn* M-csíkbeli exonjainak (MEx1, MEx2) deletálásával az A-csík rendezettsége nem sérült, de az M-csíké igen [51]. Feltételezik, hogy a nem-mutálódott *ttn* képes kompenzálni a mutációt szenvedett részek feladatát, azonban az öregedés és a stressz hatására gyakran manifesztálódik a DCM [52, 53].

Az **alpha-aktinin 2** (*actn2*, Actn2) egy alpha-aktinin izoforma, amely váz- és szívizomban termelődik. Feladata az aktin vékony filamentek és a Ttn kihorgonyozása a Z-lemezhez. Az alpha-aktininek a spektrin gén családba tartoznak, amelyek aktin-kötő citoskeletális fehérjéket kódolnak [54]. Az Actn2 keresztköti az aktin és Ttn molekulákat, ezzel összeköti a Z-lemezen keresztül a szomszédos szarkomereket [55, 56]. Emellett az Actn 2 a Z-lemezeken jelátvivő molekulákat dokkol és szerepet játszik kardiális ioncsatornák kötésében (pl. K_v1.5) [57]. Az *ACTN2* mutációja kapcsolatban áll HCM-mel [58], DCM-mel és endokardiális fibroelasztózissal [59]. Az Actn-kötő és szarkomer-összeszerelődésben esszenciális izom LIM fehérje (Muscle LIM Protein; MLP) mutációja az egerekben DCM-hez és szívelégtelenséghez vezetett [59].

A **dezmin** (*des*, Des) intermediér filamentum a harántcsíkolt izmokban, mely a Z-lemezek körül komplexet alkot, ezzel az extra-szarkomerikus citoskeleton fontos alkotóeleme (2. ábra). A monomer Des központját négy α -helikális domén alkotja, melyek pontmutációja polimerizációs defektushoz vezet [60]. A Des hiánya a Z-lemezek körül összefüggésben áll a Ttn elhelyezkedésének megváltozásával [61]. Rágcsálókban HCM és kamrai dilatáció alakul ki szisztolés diszfunkcióval Des hiányában [62]. Emberben túlermelődése is szívelégtelenséghez vezet [63]. A *DES* mutációit kapcsolatba hozták restriktív és idiopátiás

A szarkoplazmatikus retikulum (SR) az izom endoplazmatikus retikuluma, Ca^{2+} -t raktároz és esszenciális a normál izomműködéshez. A **szarkalumenin** (*srl*, *Sar*) egy Ca^{2+} -kötő fehérje az SR-ben (2. ábra), szerepet játszik a Ca^{2+} tárolásában és segíti a Ca^{2+} -pumpa fehérjét. A *Sar* kapcsolatban áll a Ca^{2+} -ATPáz 2a-val (*Serca2a*) [72, 73]. A *Sar*-Knock Out (*SarKO*) fiatal egerekben enyhe Ca^{2+} tranziens rendellenesség és szív működési elégtelenség lépett fel [72]. A *SarKO*-egerek túlterheléses tréningeltetése progresszív szívelégtelenséghez vezetett [74].



13

4.8 A *Plagl1*, mint a kardiális differenciáció esszenciális szabályozója

A szív fejlődése konzervált transzkripciós faktorok által szabályozott, de a pontos mechanizmus még feltáratlan. Számos faktor, mint a *Gata4*, *Mef2c* (Myocyte Enhancer Factor), *Srf* (Serum Response Factor), *Tbx5* és *Nkx2-5* expresszálódnak a szívben és kooperatíván részt vesznek annak kialakításában. Egér embrionális őssejtekből differenciáltatott szívizomsejtekben a *Plagl1* magas szintű kardiális expresszióját figyelték meg [75]. A *plagl1* egy paternálisan expresszálódó imprinted gén, aminek kiemelten fontos szerepe van az egér embrionális fejlődésében [75-80]. Az imprinting egy epigenetikai jelenség, amikor az egyik szülőtől származó allél imprinted, azaz expressziója gátolt (hipermetilált), a másik szülőtől származó allél pedig expressziósan aktív. Az imprinting folyamata fontos az emlősök fejlődésben, de a szívfejlődésben betöltött szerepe jelenleg még ismeretlen [75]. A *Plagl1* fehérje cink-ujj doménnel rendelkezik, elsőként az apoptózisban [81] és a sejtciklus-szabályozásban [78] betöltött szerepét írták le, anti-proliferációs és tumorszupresszor aktivitása révén [82]. Egér szívben a 8.5 embrionális naptól egészen felnőttkorig magas expressziót mutat. A *Plagl1* az Atrial Natriuretic Factor (ANF; *nppa* (natriuretic peptide A) szívizomsejtek által szekretált fehérje hormon, a kamra myocardium fejlődés markere [83]) promóteréhez közvetlenül köt. A *Plagl1* és az *Nkx2-5* kölcsönható partnerek, az ANF promóteren egymással szomszédos helyen kötnek és aktiválják a génexpressziót. Az *nkx2-5 null* mutáns (*nkx2.5^{-/-}*) egerekben a *Plagl1* csökkent szintjét mutatták ki. Megfigyelték, hogy a *Plagl1* az egér szívben a 8.5 embrionális naptól az *Actn*-nel a szív hasonló területein kolokalizálódik *in vivo*, ugyanakkor expressziója extenzívebb a szívcsőben a dorzális mesenchymánál. A *Plagl1* kamrai myocardiumban való erős expressziója mellett szintje az atrioventricularis myocardiumban lecsökkent. A *plagl1* inaktivációja (paternálisan mutáns heterozigóta utód egérben) sérült embrionális szívfejlődéshez és a kamrai és myofilament gének csökkent expressziójához vezetett. A *plagl1 heterozigóta* mutáns (*plagl1^{+/-}*) egereknél, az *rybp^{+/-}* egerekhez hasonlóan, velőcsőzáródási rendellenességek alakultak ki és ezek az egerek részlegesen átadódó embrionális letalitást mutattak (17.5 nap előtt), emellett jellemzőek voltak a szeptális defektusok, a vékony ventrális fal és az apoptózis megemelkedett szintje a szívben [75]. Csoportunk korábban kimutatta, hogy *Rybp* hiányában a *plagl1* gén teljes deficienciát mutat mind kardiális (Ujhelly et al 2015), mind neurális kultúrában (Kovacs et al 2016). Ez a tény, és hogy az *rybp* és *plagl1* mutáns egerek hasonló fenotípusos jellegeket mutatnak vezetett minket a *Plagl1* további elemzéséhez az *rybp* dózis függvényében [24, 75, 76].

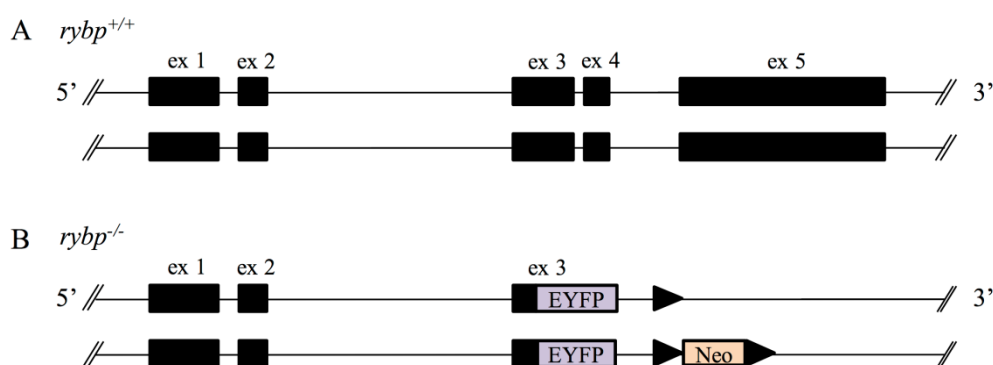
5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

5.1 Anyagok

5.1.1 Össejtvonalak

R1 (*rybp*^{+/+}) [84]: 3,5 napos blasztociszta stádiumban lévő egér embrió (129/Sv x 129/Sv-CP) belső sejttömegéből (Inner Cell Mass; ICM) izolált embrionális össejtvonal. Az *rybp* gén a vad típusú sejtekben öt exonból áll, amiből az utolsó három exon által kódolt szakasz felelős a fehérjével való legtöbb kölcsönhatásért (pl. Ring1B, Yy1). Kísérleteinkben referencia/ kontrol sejtvonalként alkalmaztuk (3. ábra: A).

D11 (*rybp*^{-/-}) [24]: Rybp termelésére képtelen, *homozigóta null* mutáns össejtvonal, melyben az *rybp* gén a harmadik exontól kezdődően (a gén első 58 aminosava változatlan) egy EYFP-t (Enhanced Yellow Fluorescent Protein) és egy neomycint hordozó kazettát tartalmaz (in frame). Géntargetálással lett előállítva az R1 össejtvonalból (3. ábra: B).



3. ábra: Alkalmazott össejtvonalak: vad típusú (*rybp*^{+/+}) (A) és *null* mutáns (*rybp*^{-/-}) (B) (ex: exon; EYFP: Enhanced Yellow Fluorescent Protein; Neo: neomycin rezisztencia gén; ►: loxP hely)

5.1.2. Felhasznált tápoldatok

Sejtenyésztő tápoldatok

Nem-össejtes tápoldat:

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM with 4.5 g/l glucose with L-glutamine, Cat. BE12-604F, Lonza)
- 10% (vol/vol) Savó (Heat Inactivated FBS, Cat: 10500, Gibco Life Technologies)
- 50 U/mL Penicillin-Streptomycin (Cat. 15140-122, Gibco by Life Technologies)
- 1% Sodium Pyruvate (100mM) (Cat. 11360-070, Gibco by Life Technologies)
- 1% L-Glutamine (200mM) (Cat. 25030-081, Gibco by Life Technologies)
- 1% MEM Nonessential Amino Acids (100X) (Cat. 25-025-CIR, Corning)

DMEM-LIF (differenciáltató) tápoldat:

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM (1X) + GlutaMAX™-I, Cat. 31966-021, Gibco by Life Technologies)
- 15% (vol/vol) Savó (Fetal Bovine Serum, Cat. 35-015-CV, Corning Mediatech)
- 50 U/mL Penicillin-Streptomycin (Cat. 15140-122, Gibco by Life Technologies)
- 1% Sodium Pyruvate (100mM) (Cat. 11360-070, Gibco by Life Technologies)
- 1% L-Glutamine (200mM) (Cat. 25030-081, Gibco by Life Technologies)
- 1% MEM Nonessential Amino Acids (100X) (Cat. 25-025-CIR, Corning)
- 0,1 mM 2-Mercaptoethanol (Cat. 31350-010, Gibco by Life Technologies)

DMEM+LIF (össejtes) tápoldat:

- DMEM-LIF ES tápoldat
- 1000 U/mL Leukemia Inhibitory Factor (ESGRO LIF, Cat. ESG1106, Chemicon)

5.2 Módszerek

5.2.1 Az össejtek *in vitro* fenntartása és szaporítása

Az össejtek úgynevezett „feeder”, tápláló sejtrétegre kerültek olvasztásra. Feeder réteggént mitomicin C (Mitomycin C from *Streptomyces caespitosus*, Cat. M4287, Sigma) kezelt egér embrionális fibroblaszt sejteket (Mouse Embryonic Fibroblast; MEF) alkalmaztunk. A MEF sejtek olvasztása nem-össejtes tápoldatba történt. Az R1 és az ebből származtatott sejtvonalak sajátja, hogy a későbbi transzferálások (passzálások) alkalmával nem igényelnek tápláló réteget, ezért olvasztást követően az R1 sejtvonalat (és származékait) 0,1%-os zselatinra (0,1% gelatin (Cat. 9391, Sigma) dH₂O-ban) passzáltuk [84]. A sejtek DMEM+LIF tápoldatban voltak fenntartva. Az össejtek kétnaponta kerültek passzálásra, amikor sejtsűrűségük (konfluencia) elérte a 70%-ot. Passzálás alkalmával a sejtenyészet felszínét DPBS-sel (DPBS (1X) Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Cat. 14190-094, Gibco by Life Technologies) mostuk, majd Tripszin-EDTA-ban (Trypsin-EDTA (1X), Cat. L15-004, PAA) 37°C-on két percreg inkubáltuk, míg egysejtes („single cell”) szuszpenziót képeztünk. 60 mm-es sejtenyésző csészében (Cat. 430166, Corning) 0,8x10⁶, 100 mm-es csészében (Cat. 430167, Corning) 2,2x10⁶ sejtszámmal indítottunk. A sejteket inkubátorban (37°C, 5% CO₂) növesztettük. Az össejteken minden nap tápoldatot cseréltünk.

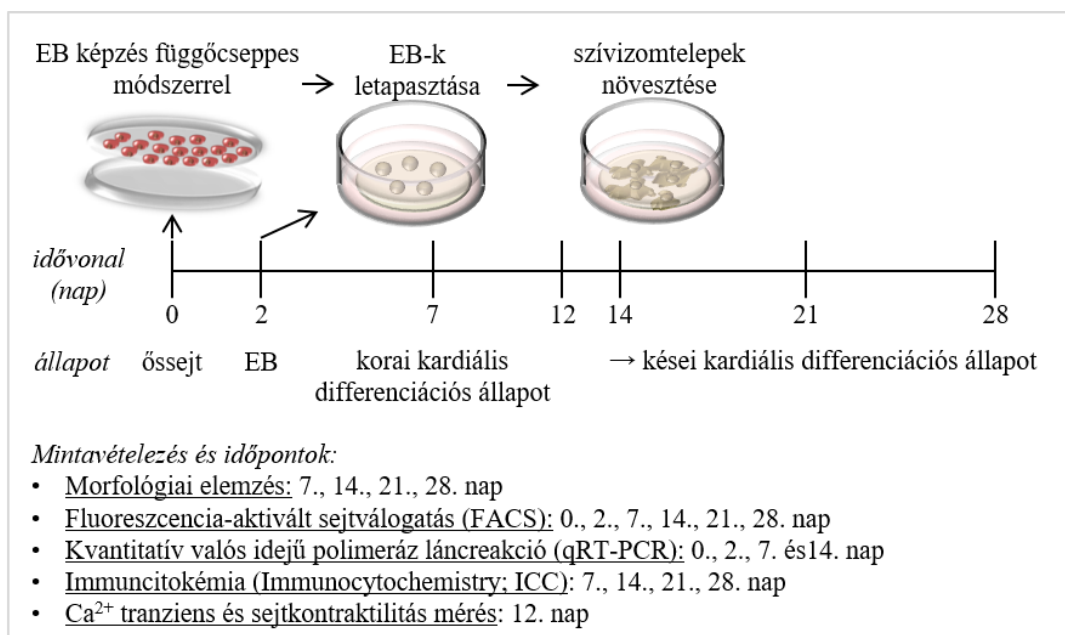
5.2.2 Össejtek *in vitro* kardiális differenciációja

Függőcsepp képzés

A kísérletet 2×10^6 sejtszámmal indítottuk. A letapadt sejteket DPBS-sel mostuk, majd tripszines emésztéssel és szuszpendálással egysejtes kultúrát hoztunk létre. A sejtsuszpenziót centrifugáltuk (1000 rpm, 3 perc), majd a felülúszót DMEM-LIF tápoldatra cseréltük. A sejtszámot Bürker-kamrában (0.0025 mm², depth 0.1 mm, Marienfeld, Germany) állapítottuk meg, majd a sejtsuszpenziót 50 sejt/ul koncentrációra hígítottuk. 50 db cseppet helyeztünk a hígított sejtsuszpenzióból (20 ul/ csepp) 100 mm átmérőjű bakteriológiai csésze (Cat. 663102, Greiner) felfordított tetejébe. A tetőt ezután DPBS-t tartalmazó csésze aljára fordítottuk. A sejteket két napon keresztül inkubátorban (37°C, 5% CO₂) aggregáltattuk.

Az embrionális testek letapasztása

Immuncitokémiához két nap után az EB-ket ötösével zselatinnal felületkezelte fedőlemezre (Cat. CS2222100, Menzel) tapasztottuk és a fedőlemezeket 35 mm-es csészékbe (Cat. 627160, Greiner) helyeztük. FACS és RNS-izolálás céljából az EB-ket fedőlemez nélküli, zselatinozott 60 mm-es sejtenyésztő csészékbe tapasztottuk le 50 EB/ csésze mennyiségben. A letapasztott EB-ken kétnaponta cseréltünk DMEM-LIF tápoldatot 28 napon keresztül. A kardiális differenciáció során a következő időpontokban vettünk mintákat a további vizsgálatokhoz: 0. nap (össejt-állapot), 2. nap (EB-k), 7. nap (korai kardiális differenciációs állapot), 14. nap (innenről kései kardiális differenciációs állapot), 21. nap, 28. nap (4. ábra). A kardiális differenciációhoz nem végeztünk indukciót.



4. ábra: A kardiális differenciáció idővonala a mintavételi időpontok felsorolásával

5.2.3 A sejt kultúrák fixálása és immuncitokémia

A sejt kultúrák fixálása

A sejteket kétszer mostuk DPBS-sel (DPBS (10X) [+CaCl₂][+MgCl₂], Cat. 14080-048, Gibco by Life Technologies dH₂O-ban 1x-esre hígítva), majd 20 percen át 4%-os paraformaldehid (4% PFA) (Paraformaldehyde, Cat. P-6148, Sigma) oldatban fixáltuk 4°C-on. A 4% PFA eltávolítása után a sejteket háromszor mostuk DPBS-sel. A sejteket ezután közvetlenül felhasználtuk vagy DPBS-ben 4°C-on tároltuk a további felhasználásig.

Immuncitokémia (Immunocytochemistry; ICC)

A fixált sejt kultúrákat [+CaCl₂][+MgCl₂]-tartalmú DPBS-sel mostuk, majd a sejtmembrán permeabilizálásának céljából 0,2% Triton[®]X-100 (Cat. T8787, Sigma) tartalmú DPBS-ben 20 percen keresztül inkubáltuk szobahőn. A permeabilizálást követően a sejteket 0,5% BSA-t tartalmazó DPBS-ben (blokkoló puffer) blokkoltuk egy órán keresztül, szobahőn. Az elsődleges antitestet (1. táblázat) a megfelelő koncentrációban alkalmazva blokkoló pufferben hígítottuk és ebben a sejteket egy éjszakán át, 4°C-on inkubáltuk. Másnap a mintákat szobahőn ötször 10 percig DPBS-sel mostuk, majd egy órán át blokkoltuk. Ezután a másodlagos ellenanyagokat (2. táblázat) a megfelelő koncentrációban blokkoló pufferben hígítottuk és ezzel a sejteket egy órán keresztül, 4°C-on inkubáltuk fénytől védett helyen. Ezt követően a mintákat háromszor 10 percig mostuk szobahőn, majd 20 percig inkubáltuk DAPI-val (4',6-diamidino-2-phenylindole (sejtmag-festő), Cat. H-1200, Vector Laboratories). Ezután a mintákat kétszer mostuk. A fedőlemezeket 50% glicerol (50% glycerol, Cat. G-9012, Sigma dH₂O-ban) oldatban fedtük le. Az ICC segítségével az apoptózis fázisában lévő sejteket és a Plagl1-t vizsgáltuk, továbbá a szarkomer-
struktúrgének fehérje szintű kifejeződését, illetve annak mintázatát tanulmányoztuk. A festődött sejteket konfokális mikroszkóp segítségével elemeztük (Olympus Confocal; IX 81 mikroszkóp; FV100). A jeleket Image J szoftverrel kvantitáltuk (intenzitás analízis).

Fehérje neve	Ellenanyag	Gyártó	Kat. szám	Hígítás
Aktív kaszpáz 3	Cleaved Caspase-3 (Asp175)	Cell Signaling	9661	1:400
BrdU	Anti-BrdU	BD Pharmingen	555627	1:100
Plagl1	Zac1 antibody (M-300)	Santa Cruz	sc-33812	1:1000
Kardiális troponin T	Anti-cardiac Troponin T [1C11]	Abcam	ab8295	1:2000
Kardiális troponin I	Anti-cardiac Troponin I	DSHB	TI-1	1:200
Tropomiozin	Anti-Tropomyosin	BABRAHAM	BT-GB-141	1:400
Miozin	Anti-Myosin-sarcomere	DSHB	MF20	1:200
Miomezin	Anti-mMac Myomesin	DSHB	B4	1:10
Titin	Anti-Titin	DSHB	9 D10	1:200

1. táblázat: A kísérleteink során alkalmazott elsődleges ellenanyagok

Másodlagos ellenanyag	Gyártó	Kat. szám	Hígítás
Alexa Fluor® 647 Donkey-anti-Mouse IgG (H+L) Antibody	Invitrogen	A-31571	1:1000
Alexa Fluor® 568 Donkey anti-Mouse IgG (H+L) Antibody	Invitrogen	A-10037	1:2000
Alexa Fluor® 647 Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Antibody	Invitrogen	A-21244	1:2000
Alexa Fluor® 546 Goat anti-Rat IgG (H+L) Antibody	Invitrogen	A-11081	1:600

2. táblázat: A kísérleteink során alkalmazott másodlagos ellenanyagok

5.2.4 Morfológiai analízis

A morfológiai analízis során összehasonlítottuk az *rybp*^{+/+} és az *rybp*^{-/-} telepek méretét, a sejtek relatív sűrűségét és strukturáltságát az egyes mintavételi időpontokban. A 4% PFA-val fixált korai érési állapotú szívizomsejtekről (7. nap) és az érett állapotú szívizomsejtekről (14., 21., 28. nap) Olympus CellR (Olympus Corporation, Japan) mikroszkóppal készítettünk fénymikroszkópos képeket. A telepek területének összehasonlításához a mintákról sztereo mikroszkóppal (Olympus SZX12, 0,5 objektív (DFPLFL), 7x zoom) felvételeket készítettünk, majd FV10-ASW 1.7 Viewer szoftverrel az egyes telepek pixel² értékeit rögzítettük és ebből μm^2 értékeket számoltunk (1 pixel = 0,019mm). Az eredmények 3 biológiai párhuzamosból kerültek kiszámításra (n=3). A párhuzamosok szórása standard deviáció $\pm\text{SD}$ Az eredmény $p < 0,05$ alatt számít szignifikánsnak (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). Statisztikai módszer: T test type 3.

5.2.5 Kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció (kvantitatív Real Time-PCR; qRT-PCR)

A qRT-PCR során a *Plagl1* és a szarkomer-szerkezeti elemek relatív génexpressziós mintázatát vizsgáltuk. Különböző mintavételi időpontokban (0. nap: összejt-állapot, 2. nap: EB-k, 7. nap: korai differenciációs állapot, 14. nap: kései differenciációs állapot) a sejteket lizáltuk, majd RNS-izolálást végeztünk a gyártó által mellékelt protokoll alapján (GeneJET RNA Purification Kit, Cat. K0731, Thermo Scientific). Az izolált RNS koncentrációját és tisztaságát spektrofotométerrel (WPA Photometer UV110) határoztuk meg. Az RNS-t reverz transzkripció PCR-ral cDNS-sé írtuk át a gyártó által mellékelt protokoll alapján (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Cat. 4368814, Applied Biosystems). Az átírás eredményességét PCR reakciót követő (*Taq* DNA Polymerase, Cat. EP0404, Thermo Scientific; 10mM dNTP Mix, Cat. R0192, Thermo Scientific; 10x *Taq* buffer with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Cat. B33, Thermo Scientific; MgCl_2 , G13927, Roche) gélelektroforézissel (1,5% SeaKem LE agarose (Cat. 50004; BMA) 1X TAE pufferben (1M Tris (T-1503, Sigma), 0.121M Na-acetát (Na-acetát-3-hidrát, 24321-1-01-38, Reanal), 0.025M EDTA

(EDTA Dinátrium-só 2-hidrát, 02980-101-190, Molar), pH 7.7-8.0) ellenőriztük. A futtatás paramétereit a 3. táblázat tartalmazza. A cDNS-t később templátként alkalmaztuk a qRT-PCR reakciókban (5,4µl cDNS (18x hígítás dH₂O-ban) + 0,6µl primer mix (50%-50% forward és reverse primer (primer lista: 1. melléklet)) + Sybr Select Master Mix for CFX, Cat. 4472942, Thermo Scientific/ reakció.) A qRT-PCR reakciót Bioer LineGeneK Real-time PCR System (Bioer, China) készülékkel végeztük. A futtatás paramétereit az 3. táblázat tartalmazza. A relatív génexpressziós szint-változásokat a $\Delta\Delta C_t$ módszer alapján kvantitáltuk. A küszöbérték (Threshold Cycle) minden gén esetében a Hprt (hipoxantin-foszforibozil-transzferáz) expressziós szintjéhez lett normalizálva, mint belső kontrolhoz. Az expressziós változás mértékének kiszámításához a kapott értékek a differenciálatlan mintához lettek viszonyítva (0. napos *rybp*^{+/+}). Az adatok egy biológiai párhuzamoson (n=1) belül három technikai párhuzamosra (t=3) vonatkoztatott átlagok. A szignifikancia értékek T-próbával (T test type 3) kerültek kiszámításra (p). A technikai párhuzamosok szórása standard deviáció $\pm SD$ Az eredmény $p < 0,05$ alatt számít szignifikánsnak (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

PCR program	Ciklus	Hőmérséklet (°C)	Inkubációs idő (h/m/s)
1.	1	94	0:02:00
2.	30	94	0:00:30
		63	0:00:30
		72	0:00:45
3.	1	72	0:05:00
4.	1	4	-

qRT-PCR program	Ciklus	Hőmérséklet (°C)	Inkubációs idő (h/m/s)
1.	1	95	0:15:00
2.	40	95	0:00:15
		58	0:00:30
		72	0:00:30
3.	1	95	0:00:20
4.	1	4	-

3. táblázat: A kísérleteink során alkalmazott PCR és qRT-PCR programok

5.2.6 Fluoreszcencia-aktivált sejtválogatás (Fluorescence Activated Cell Sorting; FACS)

A differenciáció során az egyes mintavételi időpontokban (0., 2., 7., 14., 21., 28. nap) a különböző sejtciklusokban tartózkodó, illetve az apoptózison átesett sejtek számát FACS segítségével állapítottuk meg, melyhez Becton-Dickson FACS Calibur (Palo-Alto, Temecula, CA, USA) áramlási citométert használtunk. A sejtek és EB-k egy órán át 10µM BrdU-t (5-bromo-2'-deoxyuridine, Cat. B9285-250MG, Sigma) tartalmazó DMEM

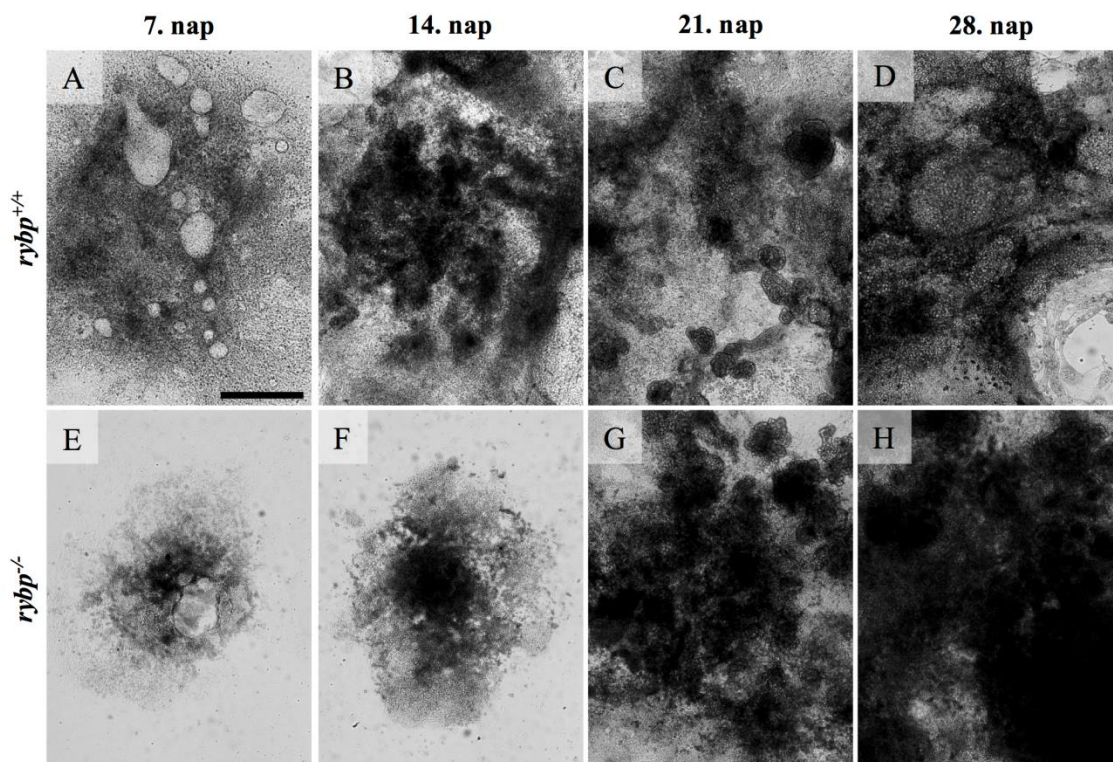
tápoldatban inkubálódtak. Ezt követően a mintákból akkutázos (Accutase, Cat. 25-058-CI, Corning) kezeléssel egysejtes szuszpenziót képeztünk és mostuk mosó pufferben (mosó puffer: 0,5% BSA (Albumin from bovine serum, Cat. A7906-100G, Sigma) DPBS-ben). A sejteket 20 percig jéghideg 70%-os etanolban (70% Etanol absz., Cat. 02910-101-340, Molar) fixáltuk, majd 20 percig 2M HCl-ben denaturáltuk (denaturáló puffer: 2M HCl (Sósav 37%, Cat. 08710-101-340, Molar) DPBS-ben). Ezt követően 0,1 M nátrium-borát oldatban ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, Cat. 07470-101-190, Molar, pH 8.5) neutralizáltuk. Mosási lépés után a sejteket elsődleges anti-BrdU ellenanyaggal (1. táblázat) (diluációs puffer: 0.5% BSA és 0.5% Tween[®]20 (Cat. P5927, Sigma) DPBS-ben) fél órán át inkubáltuk szobahőn. Mosás után a sejteket Alexa Fluor 647 Donkey-Anti-Mouse másodlagos ellenanyaggal (2. táblázat) (diluációs pufferben) inkubáltuk fél órán át szobahőn, fénytől védve. Mosás után a sejteket egy órán át propidium-jodid (PI) oldatban (Propidium-iodide, Cat. P4170, Sigma - 10 $\mu\text{g/mL}$ DPBS-ben) inkubáltuk szobahőn, fénytől védve. A mérések során minden mintából 10^4 fluoreszcens jelet detektáltunk. A kapott hisztogramon sejtméret és DNS-tartalom alapján kijelöltük az egysejtes sejtpopulációt és a kijelölt pontokat dot plot-on ábrázoltuk, ahol elkülönülnek a különböző sejtciklus-fázisban lévő sejtek. A kapott számok alapján kiszámoltuk az egyes fázisokban lévő sejtek százalékos arányát, amit grafikonon ábrázoltunk (csatornák: FL2-A: PI intenzitás; FSC-H: sejtméret; FL1-H: Alexa Fluor 647 intenzitás). Az apoptotizált sejtek mennyisége arányos a PI intenzitással (M2 cella).

5.2.7 Kalcium-ion tranziens és sejtkontraktilitás mérés

Ezt a vizsgálatot az SZTE-ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézettel kollaborációban végeztük. A szívizomtelepek tápoldatába 5 μM Fluo-4 (Cat. F14201, Molecular Probes, DMSO (Dimethyl sulfoxide, Cat. D-5870, Sigma) + 20% pluronsav F-127-ban (Cat. P2443, Sigma) oldva) festéket mértünk, majd 40 percen keresztül sötétben inkubáltuk szobahőn. Ezt követően a sejtek felszínét kétszer normál Tyrode-oldattal (Tyrode-oldat (mM): 144 NaCl, 0,4 NaH_2PO_4 , 4KCl, 0,53 MgSO_4 , 1,8 CaCl_2 , 5,5 glükóz, 5 HEPES (pH 7,4)) mostuk és fluoreszcens mikroszkóp alatt vizsgálatuk (Fluo-4 excitáció: 480 nm, fluoreszcens emisszió 535 nm; Chroma Technology filterek). Az optikai jeleket egy foton-számláló modullal monitoroztuk (Hamamatsu; H7828), a kontrakciókat videó-detekciós rendszerrel (VED-105, Crescent Electronics) követtük nyomon, melyeket a WinWCP (V4.9.1. Whole Cell Electrophysiology Analysis Program, John Dempster University of Strathclyde) szoftverrel regisztráltunk, a mintavételezés frekvenciája 1kHz volt.

6. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

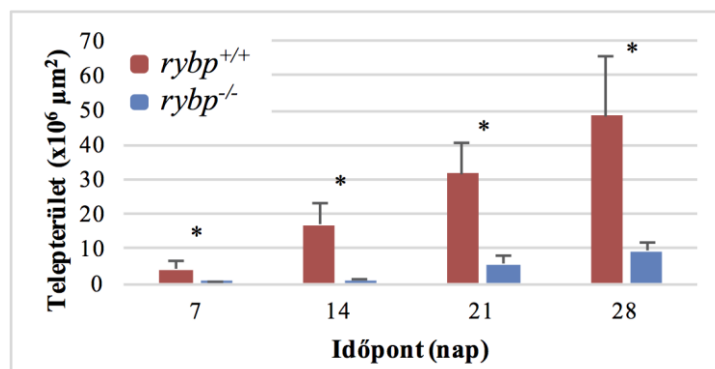
6.1 Az *rybp*^{+/+} és *rybp*^{-/-} szívmizomtelepek morfológiájának összehasonlítása a kardiális differenciáció során



5. ábra: Az *rybp*^{+/+} és *rybp*^{-/-} szívmizomtelepek morfológiai összehasonlítása a 7. naptól a 28. napig (Objektív: 4x; Scale bar: 500 μ m)

Korábban az őssejteket 14 napon keresztül differenciáltattuk szívmizom irányba. Ez idő alatt az *rybp*^{-/-} őssejtek a kardiális differenciálódás során nem képeztek dobogó telepeket [1]. Ezen megfigyelés adott indikációt arra, hogy a szívmizomtelepeket tovább (28 napig) tartsuk fenn, hogy megvizsgálhassuk, vajon az *rybp*^{-/-} sejtek képeznek-e a későbbi időpontokban dobogó telepeket. Az *rybp*^{+/+} és *rybp*^{-/-} genotípusú őssejtekből EB-ket formáltunk függőcseppes módszerrel, majd a 2. napon zselatinózott fedőlemezre transzferáltuk őket és DMEM-LIF sejtenyészítő tápoldatban 7 (7. nap, 5. ábra: A, E), 14 (14. nap, 5. ábra: B, F), 21 (21. nap, 5. ábra: C, G) és 28 (28. nap, 5. ábra: D, H) napon keresztül differenciáltattuk (5.2.4). A sejteket különböző időpontokban 4% PFA-ban fixáltuk, majd mikroszkópban megfigyeltük. A 7. nap a korai (5. ábra: A, E), a 14-28 nap (5. ábra: B-D, F-H) pedig a késői kardiális differenciálási állapotnak felel meg. Őssejtes állapotban az *rybp*^{+/+} és *rybp*^{-/-} sejtek morfológiája között nem volt különbség, továbbá mindkét sejtvonal képes volt EB képzésre, ami egybevágott korábbi megfigyeléseinkkel [85]. Az EB-k mindkét

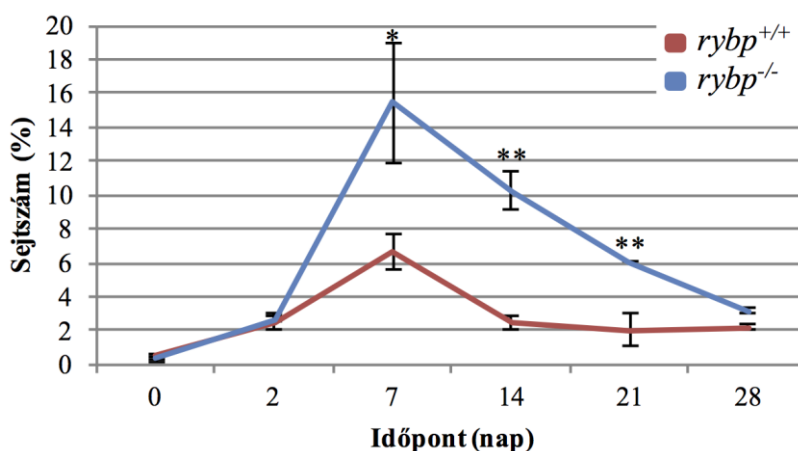
sejtvonalból letapadtak és növekedésnek indultak. Az $rybp^{+/+}$ sejtvonalból differenciáltatott szívizomtelepek a 7. napon 8x, a 14. napon 15x, a 21. és 28. napon 5x nagyobb területűek voltak, mint az $rybp^{-/-}$ sejtvonalból képzettek (6. ábra).



6. ábra: Az $rybp^{+/+}$ és $rybp^{-/-}$ szívizomtelepek területének összehasonlítása μm^2 -ben kifejezve (n=3) Szórás: standard deviáció $\pm$ SD, szignifikancia: $p < 0,05$ (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

Az $rybp^{+/+}$ szívizomtelepeknél a 10. naptól ritmikus összehúzódást figyeltünk meg, míg ezt az $rybp^{-/-}$ kardiomiocitáknál (szívizomsejteknél) egy esetben sem tapasztaltunk. Megfigyeltük, hogy az $rybp^{-/-}$ telepek a 21. naptól (5. ábra: C, G) gyors növekedésbe kezdtek és vastagabb, de kisebb területű telepeket képeztek a vad típushoz képest. Az $rybp^{+/+}$ szívizomtelepek a 28. napig a tér mindhárom irányában növekedtek, míg az $rybp^{-/-}$ telepek nem terültek el, csak helyi túlbujánzást tapasztaltunk (5. ábra: D, H). Ez a megfigyelés adott okot arra, hogy tovább vizsgáljuk, vajon ez a túlbujánzás fokozott proliferáció vagy apoptózis eredménye-e.

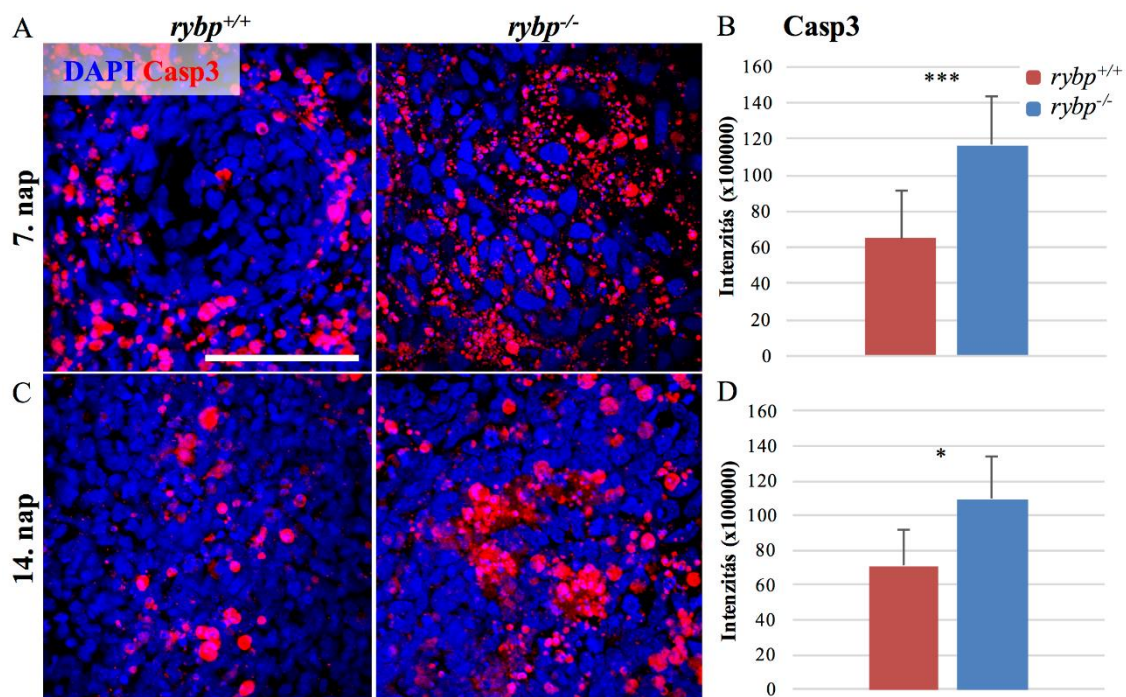
6.2 Az apoptózis és a sejtciklus összehasonlítása az $rybp^{+/+}$ és $rybp^{-/-}$ sejtvonalakban a kardiális differenciáció során



7. ábra: Az apoptózis fázisában lévő $rybp^{+/+}$ és $rybp^{-/-}$ sejtek mennyiségének összehasonlítása százalékban kifejezve ((apoptotizáló sejtek száma/ összejtszám)*100) (n=3, t=3) Szórás: standard deviáció $\pm$ SD, szignifikancia: $p < 0,05$ (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

A morfológiai vizsgálatokat követően a sejteket a 0., 2., 7., 14., 21., és 28. napon propidium-jodiddal (PI) jelöltük, majd FACS analízist végeztünk az apoptózis mértékének meghatározására (7. ábra) (5.2.6). A 0. napon az *rybp*^{+/+} és az *rybp*^{-/-} sejteknek is 0,5%-a, a 2. napon pedig 2,5%-a apoptotizált. Az első jelentős változást a 7. napon regisztráltuk, ahol az *rybp*^{+/+} sejteknek 6,6%-a, míg az *rybp*^{-/-} sejteknek 15,4%-a ment át apoptózison, a 14. napon ez a különbség négyszeres, (*rybp*^{+/+}: 2,5%, *rybp*^{-/-}: 10,3%), a 21. napra háromszoros (*rybp*^{+/+}: 2%, *rybp*^{-/-}: 6%) volt. A 28. napon a két sejtvonal között nem kaptunk szignifikáns különbséget, erre az időpontra az apoptózis szintje lecsökkent (*rybp*^{+/+}: 2,2%, *rybp*^{-/-}: 3,2%).

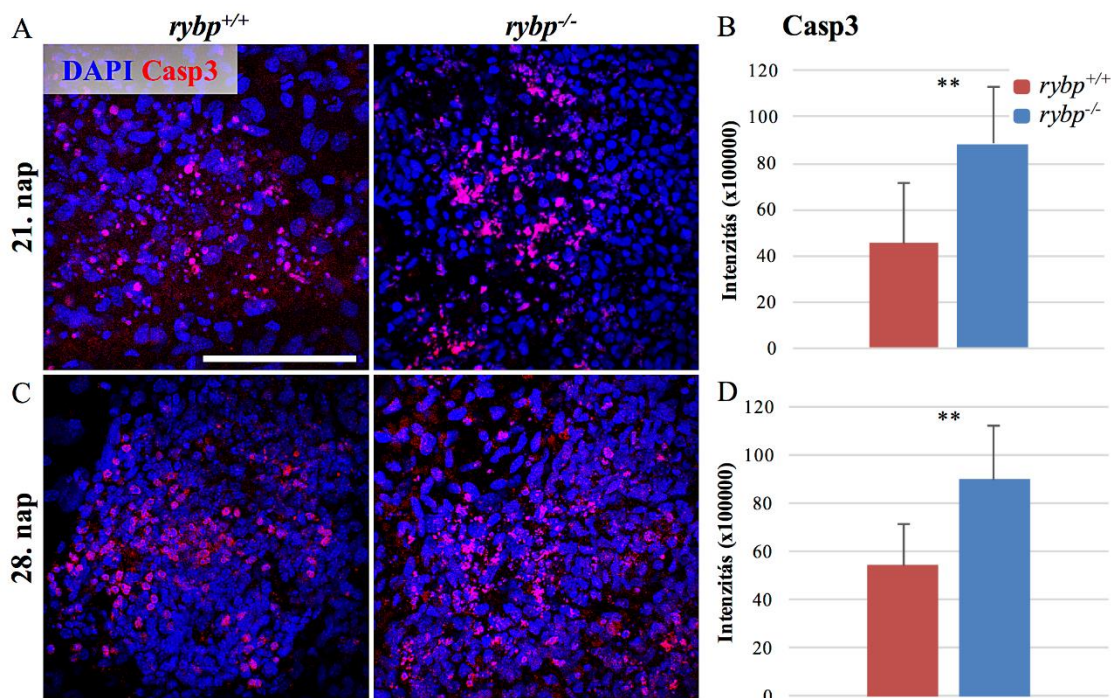
A differenciáltatott sejteket 4% PFA-ban való fixálás után aktív kaszpáz 3 ellenanyaggal (1. táblázat) festettük az apoptózis ICC analízisének céljából a 7., 14., 21. és 28. napon (5.2.3). A 7. napon és a 14. napon is szignifikáns különbséget láttunk az *rybp*^{+/+} és az *rybp*^{-/-} minták között az apoptózis mértékében, amit a piknotikus sejtmagok nagy mennyisége jelez (8. ábra: A C). Az aktív kaszpáz 3 (Casp3) intenzitása alapján, ami az apoptózis végső lépését jelöli, a 7. napon az *rybp*^{-/-} mintákban 1,8-szor, a 14. napon 1,5-szer több volt az apoptózis kései fázisában lévő sejtek mennyisége (8. ábra: B, D).



8. ábra: 7 és 14 napos *rybp*^{+/+} és *rybp*^{-/-} szívizomtelepek apoptózis vizsgálata aktív kaszpáz 3 (Casp3) festéssel (A, C), az intenzitás kvantitatív kiértékelésével (B, D)(Obj.: 60x; Scale bar: 100μm) Szórás: standard deviáció ±SD, szignifikancia: p<0,05 (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001)

A 21. és 28. napon a két sejtvonal közötti különbség továbbra is szignifikáns maradt, de az apoptózis fázisában lévő sejtek mennyisége mindkét időpontban lecsökkent (9. ábra: A,

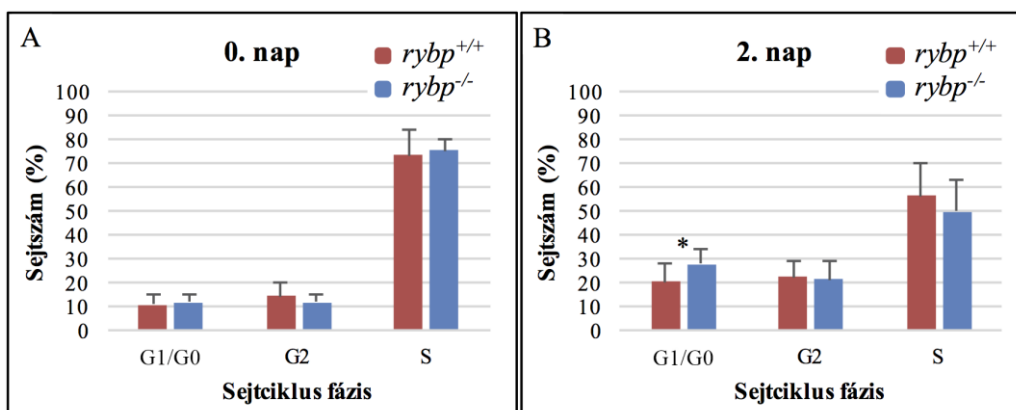
C). A Casp3 intenzitása alapján a 21. napon az *rybp*^{-/-} mintákban 1,9-szor, a 28. napon 1,5-szer több volt az apoptózis kései fázisában lévő sejtek mennyisége (9. ábra: B, D).



9. ábra: 21 és 28 napos *rybp*^{+/+} és *rybp*^{-/-} szívizomtelepek apoptózis vizsgálata aktív kaszpáz 3 (Casp3) festéssel (A,C), az intenzitás kvantitatív kiértékelésével (B, D) (Obj.: 60x; Scale bar: 100µm) Szórás: standard deviáció ±SD, szignifikancia: p<0,05 (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001)

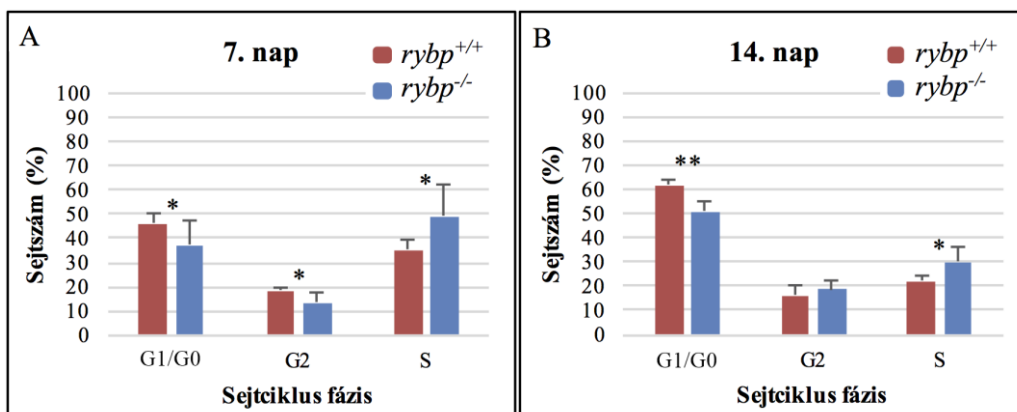
A FACS analízis és az ICC alapján is elmondható, hogy az *rybp*^{-/-} sejt kultúrákban a kardiális differenciáció korai időpontjától (7. naptól) kezdve az apoptózis szintje megemelkedett, ugyanakkor a differenciáció előrehaladtával mindkét sejtvonal esetén a 28. napra lecsökkent.

A sejtciklus vizsgálatához a sejteket a 0., 2., 7., 14., 21. és 28. napon BrdU-val jelöltük majd FACS analízist végeztünk (5.2.6).



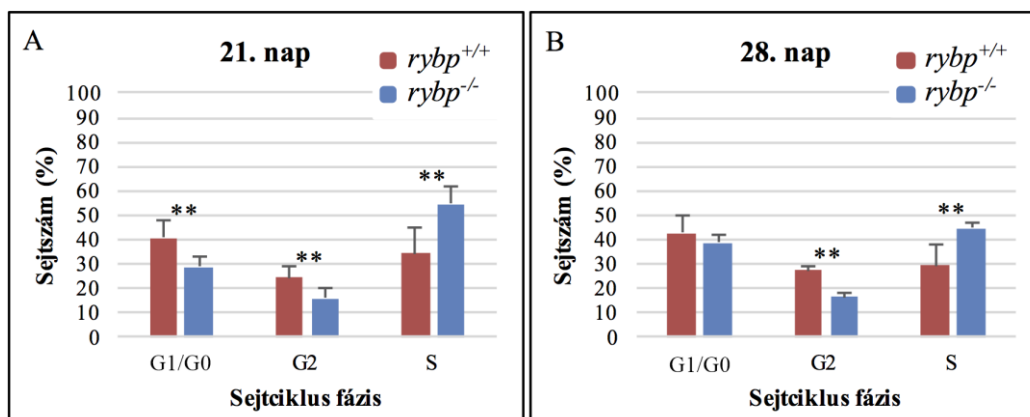
10. ábra: 0 napos (A) és 2 napos (B) *rybp*^{+/+} és *rybp*^{-/-} sejtek sejtciklus analízise (n=3, t=3) Szórás: standard deviáció ±SD, szignifikancia: p<0,05 (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001)

A 0. napon (10. ábra: A), azaz összejtes állapotban a sejtek a vártak megfelelően túlnyomórészt az S fázisban tartózkodtak (~75%) és csak alig 25%-uk volt G1/G0 és G2 fázisban. Az *rybp*^{+/+} és az *rybp*^{-/-} összejtek között a sejtciklus fázis megoszlásában nem tapasztaltunk eltérést. A 2. napon (10. ábra: B), az *rybp*^{+/+} EB-k sejtjeinek 21%-a volt G1/G0, 23%-a G2, és 56%-a S fázisban. *Rybp*^{-/-} sejteknél több sejt tartózkodott G1/G0 fázisban (28%) az *rybp*^{+/+}-hoz képest és kevesebb az S fázisban (50%), míg a G2 fázis aránya nem tért el jelentősen (21%).



11. ábra: 7 napos (A) és 14 napos (B) *rybp*^{+/+} és *rybp*^{-/-} sejtek sejtciklus analízise (n=3, t=3) Szórás: standard deviáció ±SD, szignifikancia: p<0,05 (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001)

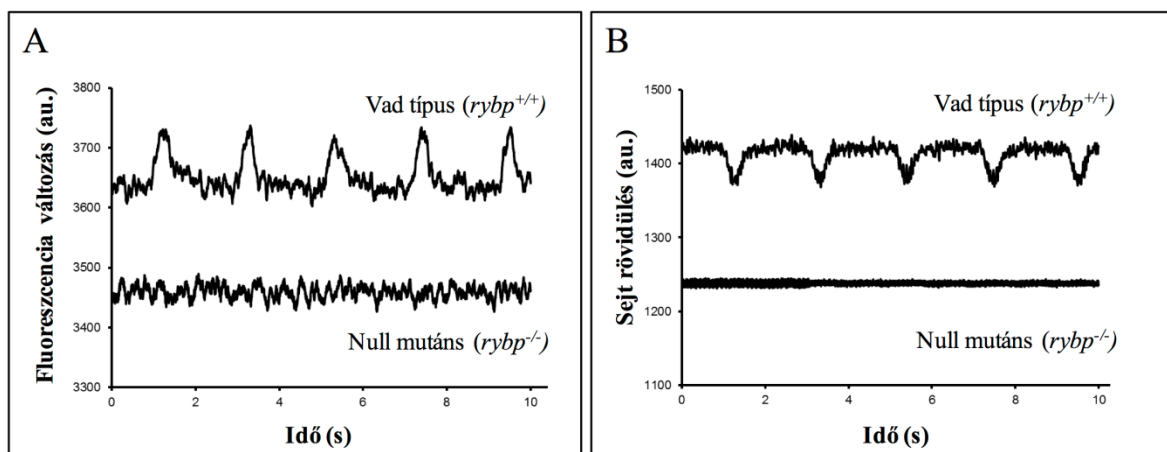
A differenciáció alatt jellemző, hogy a sejtek a nyugalmi fázisba (G0) kerülnek. A 7. napon (11. ábra: A), azaz a korai kardiális differenciációs állapotban az *rybp*^{-/-} sejtek 49%-a tartózkodott S fázisban, míg az *rybp*^{+/+} sejteknek csak 35%-a. Az *rybp*^{+/+} sejtek 46%-a tartózkodott a G1/G0 fázisban, 19%-a G2 fázisban, az *rybp*^{-/-} sejteknél 37% G1/G0 fázisban és 14% G2 fázisban. A 14. napon (11. ábra: B), amikortól kései kardiális differenciációs állapotról beszélünk, az *rybp*^{+/+} sejtek 62%-a volt G1/G0, 16% G2, 22% S fázisban, míg az *rybp*^{-/-} sejteknek 51%-a G1/G0, 19%-a G2, 30%-a S fázisban. Tehát több *rybp*^{-/-} sejt volt az S fázisban, és kevesebb a G1/G0 fázisban az *rybp*^{+/+}-hoz képest.



12. ábra: 21 napos (A) és 28 napos (B) *rybp*^{+/+} és *rybp*^{-/-} sejtek sejtciklus analízise (n=3, t=3) Szórás: standard deviáció ±SD, szignifikancia: p<0,05 (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001)

A 21 és 28 napos *rybp*^{+/+} sejtek 43%-a G1/G0, 25%-a G2, 32%-a S fázisban tartózkodott (12. ábra: A, B). A 21. napon *rybp*^{-/-} sejtek 55%-a az S, 29%-a a G1/G0, 16%-a a G2 fázisban volt. A 28. napon is több *rybp*^{-/-} sejt volt a sejtciklus S fázisában (45%) és kevesebb a növekedési fázisokban (G1/G0: 39%, G2: 17%). Ez arra utal, hogy az *rybp*^{-/-} sejtek közül kevesebben lépnek ki a sejtciklusból, fokozottan proliferálnak, ami a szívizom abnormális fejlődéséhez vezethet. Azonban ez még nem magyarázat arra, hogy miért nem tapasztaltunk szemmel érzékelhető kontrakciót. A továbbiakban megmértük a kontraháló *rybp*^{+/+} és nem kontraháló *rybp*^{-/-} szívizomsejtek intracelluláris Ca²⁺ oszcillációját és sejtrövidülését.

6.3 Az *rybp*^{+/+} és az *rybp*^{-/-} szívizomtelepek kontraktilitásának vizsgálata



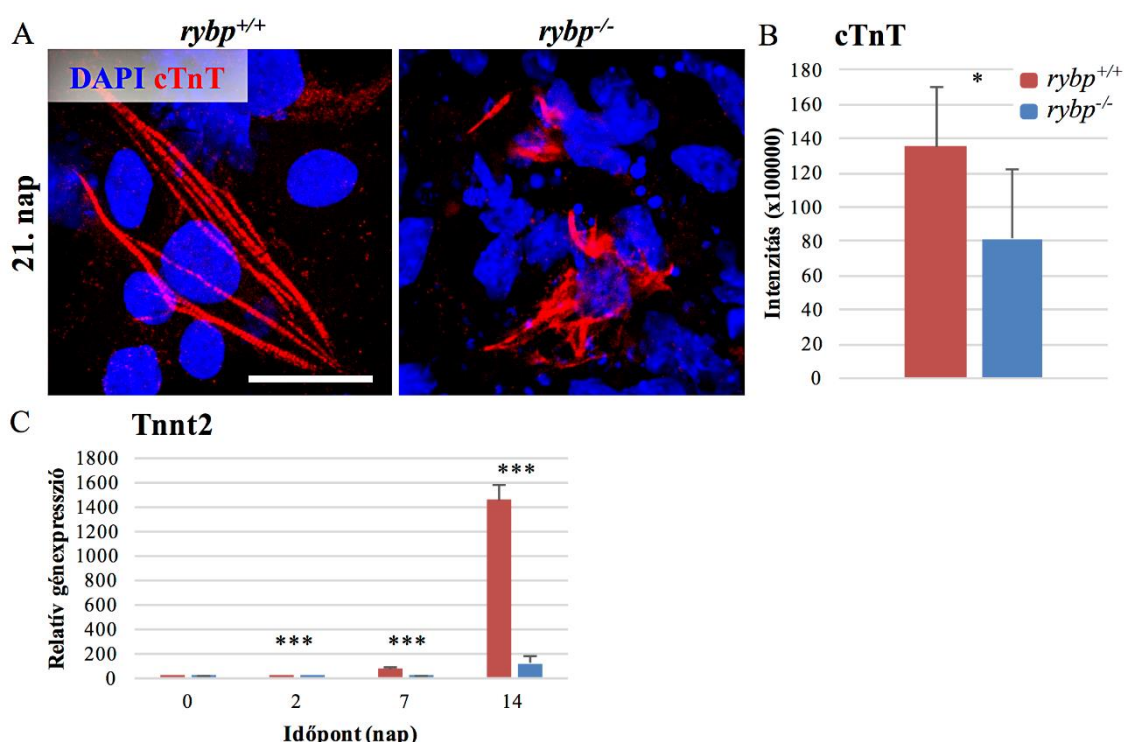
13. ábra: 12 napos kontraháló *rybp*^{+/+} és nem kontraháló *rybp*^{-/-} szívizomtelepek intracelluláris Ca²⁺-függő fluoreszcens szignál-görbéje (F535 nm) (A) és a hozzátartozó sejtrövidülés változások (B)

A 12 napos vad típusú kontraháló *rybp*^{+/+} és a mozdulatlan *null* mutáns *rybp*^{-/-} szívizomtelepeket Fluo-4 Ca²⁺-szenzitív fluoreszcens festékkel töltöttük, 480 nm hullámhosszon gerjesztettük, majd az emittált jelet 535 nm-en detektáltuk (5.2.7). Az *rybp*^{+/+} spontán kontraháló telepekben az intracelluláris Ca²⁺ ion koncentráció szabályosan ismétlődő markáns változását tapasztaltuk (13. ábra: A), ritmikusan ismétlődő sejtrövidülés (13. ábra: B) kíséretében. Az *rybp*^{-/-} telepekből sem intracelluláris Ca²⁺-szint változást, sem kontrakciót nem sikerült regisztrálni, ami arra utalt, hogy *rybp* hiányában a sejtekben nem alakult ki az elektro-mechanikai kapcsolat, azaz nem képesek kontrakcióra [1]. Hogy felfedjük ennek a rendellenességnek a molekuláris hátterét, megvizsgáltuk a kontrakcióhoz nélkülözhetetlen szarkomer alkotóinak (4.7) és a Plagl1 (4.8) transzkripció faktorának a termelődését.

6.4 A szarkomer-szerkezet kialakításában fontos gének, fehérjék vizsgálata

6.4.1 A kardiális Troponin T

Mivel a megfelelő szarkomer-szerkezet feltétele a kontrakciónak, ezért a továbbiakban megvizsgáltuk a szarkomer struktúrgének expressziós szintjét és fehérje lokalizációját. Az *rybp*^{+/+} és *rybp*^{-/-} sejtek génexpressziós változásait qRT-PCR-rel végeztük (primerek: 1. melléklet). A qRT-PCR-hez (5.2.5) a 0., 2., 7. és 14. napon vettünk mintát, mert ezen időpontok jól modellezik a kardiális fejlődés egyes állapotait (össesjtek, EB-k, korai és kései kardiális differenciációs állapot). A sejteket 21 napig differenciáltattuk, majd fixáltuk és ICC analízisre (5.2.3) használtuk fel (ellenanyagok: 1. táblázat, 2. táblázat).



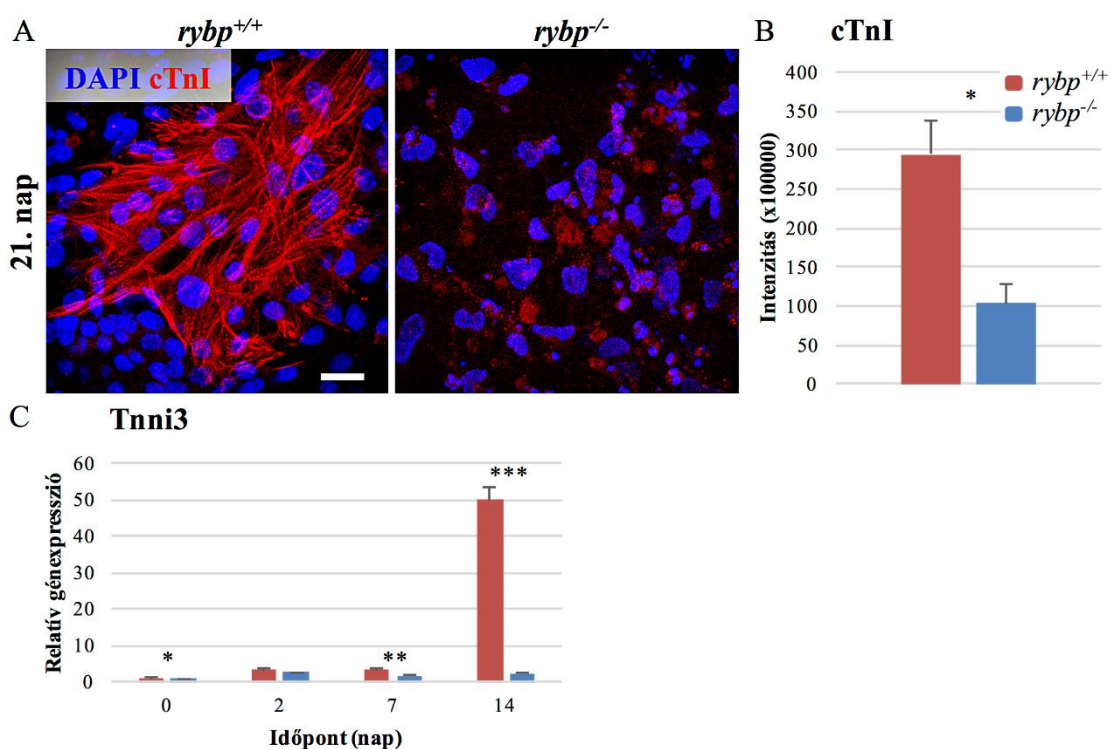
14. ábra: A kardiális troponin T (cTnT) immunfestése (A) az eredmények kvantitálása (B) és a Tnnt2 qRT-PCR analízise (n=1, t=3) (C) (Objektív: 60x, zoom: 3,8x; Scale bar: 20 μm) Szórás: standard deviáció ±SD, szignifikancia: p<0,05 (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001)

A *tnnt2* qRT-PCR analízise során (14. ábra: C) megfigyeltük, hogy az *rybp*^{+/+} sejtekben indukciója 1400-szoros a 14. napon, terminálisan expresszálódó kardiális differenciációs faktor révén. Indukciója az *rybp*^{-/-} sejtekben ugyanezen időpontban csak 200-szoros volt. Hogy információt kapjunk a cTnT sejten belüli lokalizációjáról és struktúrájáról, elvégeztük a 21 napos *rybp*^{+/+} és *rybp*^{-/-} sejtek ICC analízisét. Ennek során kimutattuk, hogy a cTnT az *rybp*^{+/+} szívmusclesejtekben szabályosan rendezett szarkomerikus mintázatot mutat, míg az *rybp*^{-/-} szívmusclesejtekben a harántcsíkok nem láthatóak és a

filamentumok rövidebbek (14. ábra: A), az eredményeket Image J szoftverrel kvantitáltuk (14. ábra: B).

6.4.2 A kardiális troponin I

A cTnI ICC analízise (15. ábra: A) során az *rybp*^{-/-} sejtekben nem találtunk sem szarkomerikus, sem filamentózus mintázatot és a fehérje mennyisége harmad része volt az *rybp*^{+/+}-ban lévőének (15. ábra: B). A qRT-PCR vizsgálat során kimutattuk, hogy az *rybp*^{+/+} sejtekben tízszer magasabb volt a *tnni3* relatív génexpressziós szintje (15. ábra: C). Mivel a cTnI az aktin és a cTnC közötti Ca²⁺ koncentráció függő válaszban vesz részt, defektusa egyik oka lehet a kontrakció hiányának.



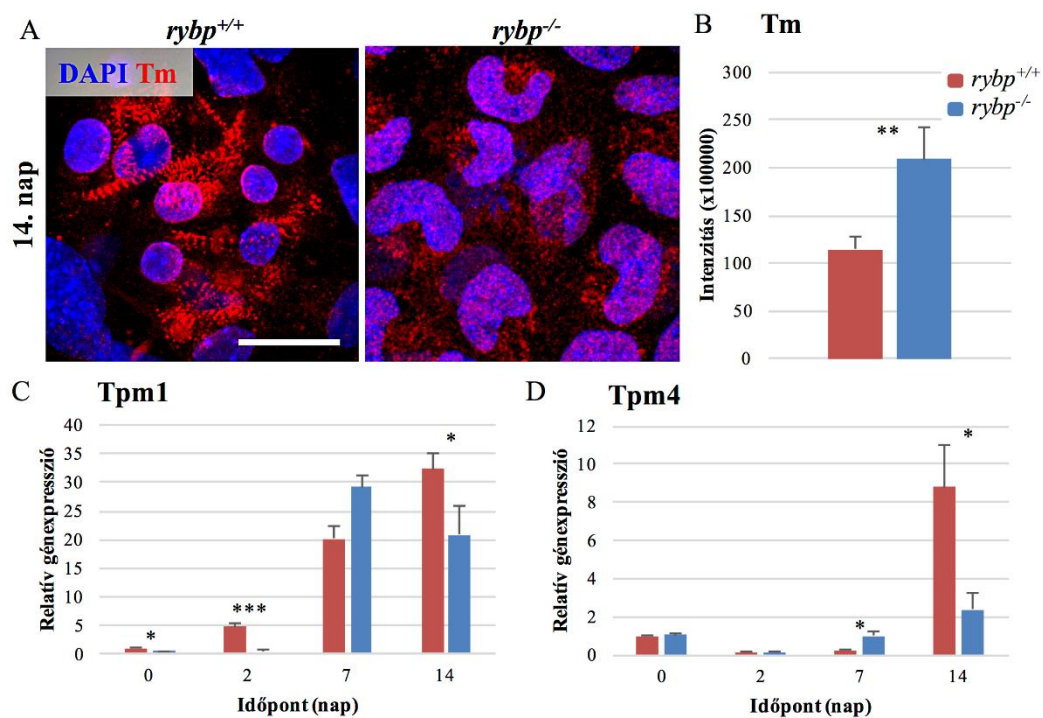
15. ábra: A kardiális troponin I (cTnI) immunfestése (A), az eredmények kvantitálása (B) és a Tnni3 qRT-PCR analízise (n=1, t=3) (C) (Objektív: 60x, zoom: 1,5x; Scale bar: 100µm) Szórás: standard deviáció ±SD, szignifikancia: p<0,05 (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001)

Mivel a kardiális troponin komplex két tagjának expressziója is sérült, megvizsgáltuk, hogy a tropomiozin (ehhez kapcsolódik a troponin komplex) mutat-e expressziós és lokalizációs különbségeket az *rybp*^{-/-} sejtekben.

6.4.3 A tropomiozin

Feltételeztük, hogyha a troponin komplexek nem rendeződnek szarkomerikus szerkezetbe, összefüggésben lehet azzal, hogy a Tm már egy korábbi időpontban sem mutat rendezettséget. Így a Tm immunfestését a 14. napon végeztük el 4% PFA fixált mintákon.

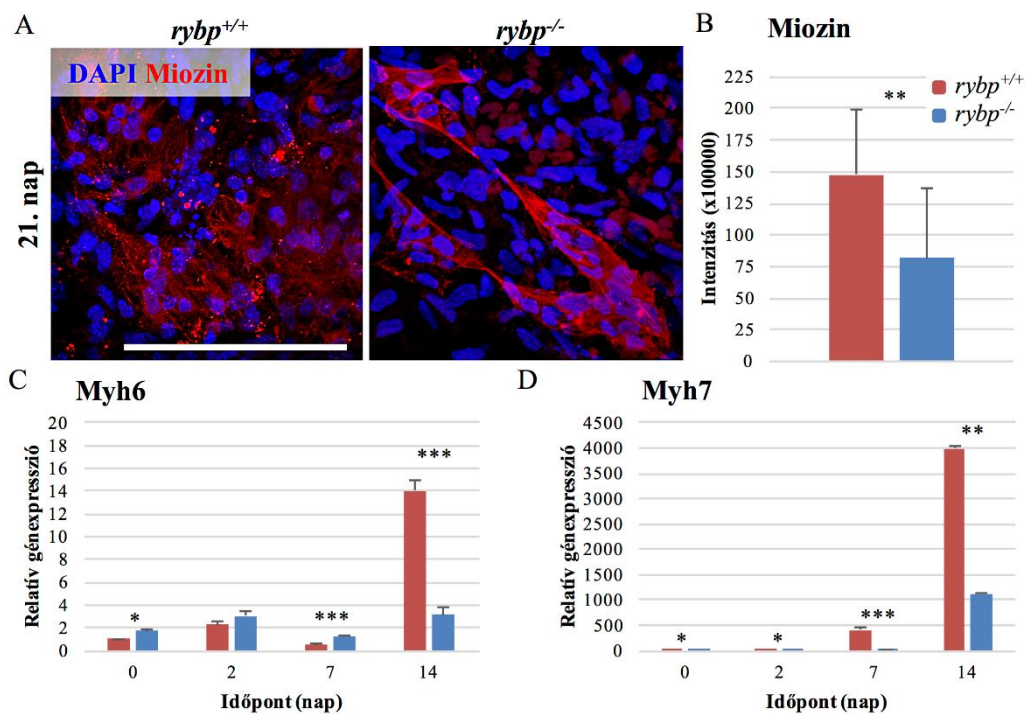
Eredményeink alapján az *rybp*^{-/-} sejtekben a Tm nem rendeződött szarkomerikus szerkezetbe, diffúzan terült el a citoplazmában (16. ábra: A). Mivel a fehérje diffúzan volt jelen a sejtekben, az intenzitás kétszer nagyobb, mint az *rybp*^{+/+}-ban, ahol a harántcsíkokat kirajzolódottak (16. ábra: B). A qRT-PCR során két kardiális Tm izoforma analízisét végeztük el (*tpm1* (16. ábra: C) és *tpm4* (16. ábra: D)). Mindkét izoforma csökkent expressziót mutatott az *rybp*^{-/-} sejtekben, amely magyarázhatja a nem megfelelő organizációt (16. ábra: C, D). A troponin tagok és a Tm vizsgálatával nyert eredményekkel a vékony filamentum rendellenességeire lehet következtetni az *rybp*^{-/-} szívműködési sejtekben.



16. ábra: A tropomiozin (Tm) immunfestése (A), az eredmények kvantitálása (B) és a Tpm1 és Tpm4 qRT-PCR analízise (n=1, t=3) (C,D) (Objektív: 60x, zoom: 3,3x; Scale bar: 20µm) Szórás: standard deviáció ±SD, szignifikancia: p<0,05 (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001)

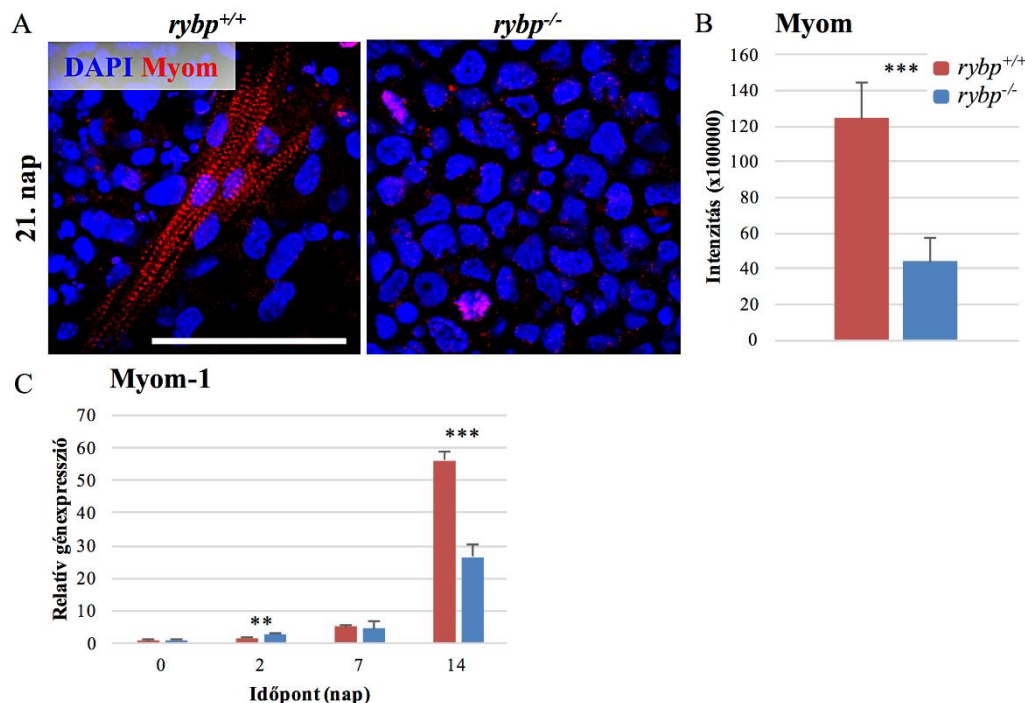
6.4.4 A miozin

A szarkomer-specifikus miozin ICC analízise során (17. ábra: A) az *rybp*^{+/+} sejtekben sűrű, filamentózus, harántcsíkolatos mintázatot láttunk. Az *rybp*^{-/-} sejtekben csökkent mértékben termelődött a szarkomerikus miozin (17. ábra: B), és nem alkotott harántcsíkolat mintázatot, a sejtek megnyúltabbak voltak. A kardiális miozin nehéz lánc 6 (*myh6*) (17. ábra: C) és 7 (*myh7*) (17. ábra: D) génexpressziója csökkent szintű az *rybp*^{-/-} sejtekben az *rybp*^{+/+} sejtekhez képest. A *myh6* expressziója közel ötöde, a *myh7* expressziója negyede az *rybp*^{+/+}-énak (17. ábra: C, D). A kardiális miozin a szívműködési sejtek motor proteinje, ezért csökkent szintje és hibás organizációja okozhatja az *rybp*^{-/-} sejtek kontrakcióképtelenségét.



17. ábra: A szarkomerikus miozin (Miozin) immunfestése (A), az eredmények kvantitálása (B) és a Myh6 és Myh7 qRT-PCR analízise (n=1, t=3) (C,D) (Objektív: 60x, zoom: 2,1x; Scale bar: 100µm) Szórás: standard deviáció ±SD, szignifikancia: p<0,05 (*p< 0.05; **p< 0.01; *** p<0.001)

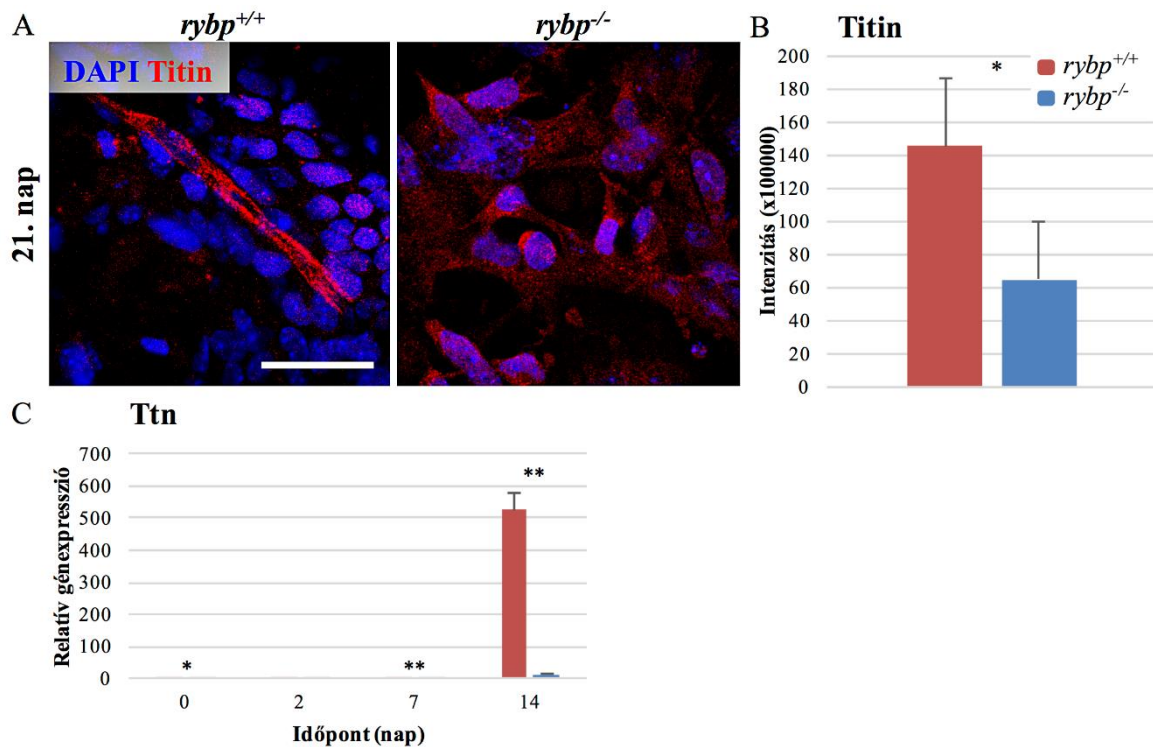
6.4.5 A miomezin



18. ábra: A miomezin (Myom) immunfestése (A), az eredmények kvantitálása (B) és a Myom1 qRT-PCR analízise (n=1, t=3) (C) (Objektív: 60x, zoom: 3x; Scale bar: 50µm) Szórás: standard deviáció ±SD, szignifikancia: p<0,05 (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001)

A Myom izoformák közül a szarkomer M-csíkában lokalizálódó és miozint horgonyzó *myom1* expressziója közel felére csökkent az *rybp*^{-/-} sejtekben az *rybp*^{+/+} sejtekhez képest (18. ábra: C). A különbség fehérjeszinten is megmutatkozott, ugyanis az *rybp*^{-/-} sejtekben nem találtunk szarkomerikus elrendeződést (18. ábra: A) és a jel harmada volt az *rybp*^{+/+} Myom szignáljának mértékéhez képest (18. ábra: B). Mivel a Myom a miozint a titinnel együtt az M-vonalban kihorgonyozza, és ezzel stabilitást biztosít, feltételezhető, hogy ennek a fehérjének a hiánya az oka a miozinnál tapasztalt dezorganizációnak.

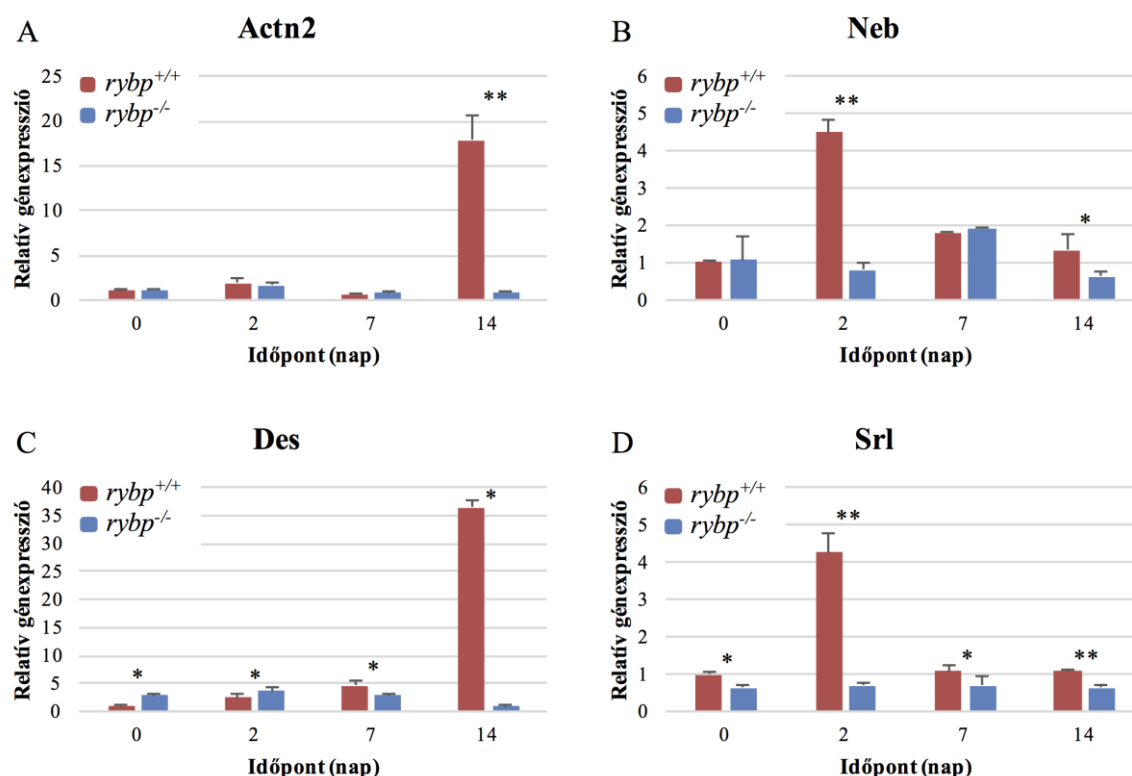
6.4.6 A titin



19. ábra: A titin (Titin) immunfestése (A), az eredmények kvantitálása (B), és a Ttn qRT-PCR analízise (n=1, t=3) (C) (Objektív: 60x, zoom: 2,3x; Scale bar: 100µm) Szórás: standard deviáció ±SD, szignifikancia: p<0,05 (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001)

A titin a szarkomer legnagyobb méretű fehérjéje (~3000 kDa), ami a miomezinnel együtt a stabilitásban esszenciális. A titin fehérje az *rybp*^{+/+} sejtekben szarkomerikus mintázatot mutat, míg ilyen rendezettséget az *rybp*^{-/-} sejtekben nem figyeltünk meg, a fehérjék a citoplazmában diffúzan oszlanak el (19. ábra: A). A detektált jelek intenzitása az *rybp*^{-/-} sejtekben fele annyi volt, mint az *rybp*^{+/+} sejtekben (19. ábra: B). A *ttn* génexpressziója ötvenszer alacsonyabb volt az *rybp*^{-/-} sejtekben az *rybp*^{+/+} sejtekhez képest (19. ábra: C). Mivel a titin a szarkomer két I-csíkja közötti vastag filamentum stabilizálója, ezzel fontos eleme a kontrakciónak, hiánya a szarkomer rendezetlenségének egyik fő oka lehet.

6.4.7 Az alpha-aktinin 2, a nebulin, a dezmin és a szarkalumenin qRT-PCR analízise

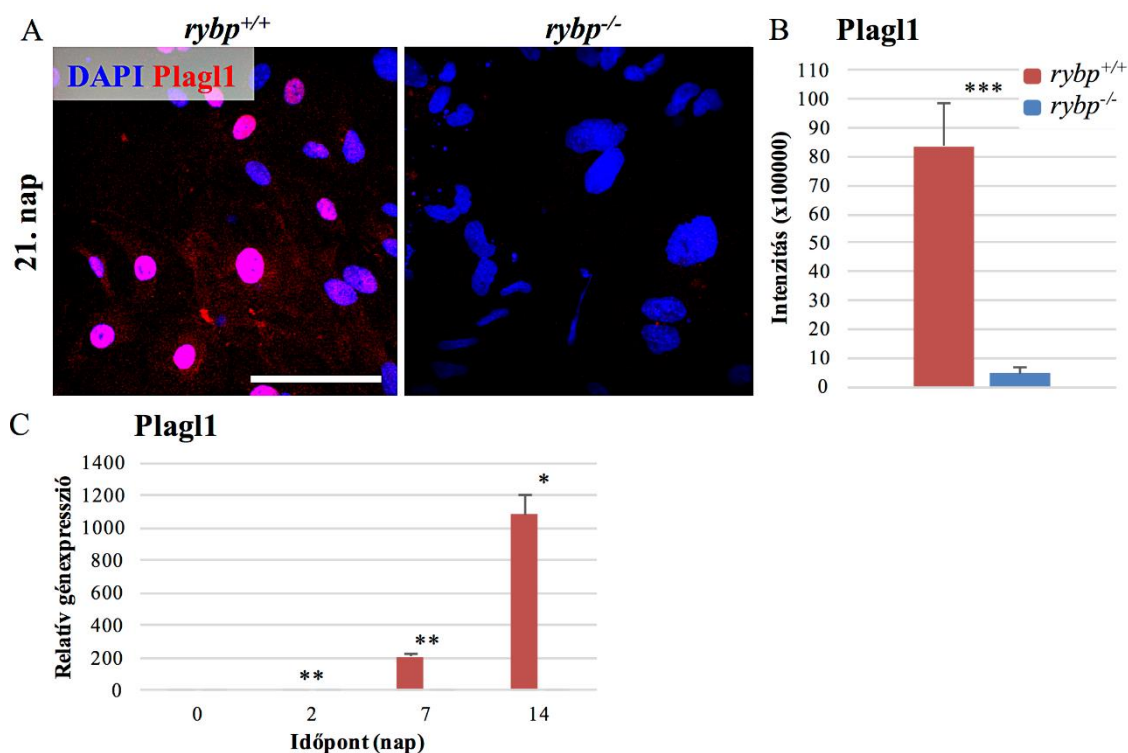


20. ábra: Az alpha-aktinin 2 (Actn2) (A), a nebulin (Neb) (B), a dezmin (Des) (C) és a szarkalumenin (Srl) (D) qRT-PCR analízise az *rybp*^{+/+} és *rybp*^{-/-} sejt vonalakban (n=1, t=3) Szórás: standard deviáció $\pm$ SD, szignifikancia: $p < 0,05$ (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

Kísérleteink során egyéb, a funkcionális szívizom kialakításában szerepet játszó gének qRT-PCR analízisét végeztük el 0., 2., 7. és 14 napos *rybp*^{+/+} és *rybp*^{-/-} szívizomtelepek esetén. Az Actn2 a fejlődő szarkomer egyik első markere, a vékony filamentumokat rögzíti a szarkomer Z-lemezében. Az Actn2 szintje az *rybp*^{-/-} sejtekben a 14. naptól mutat szignifikáns csökkenést: szintje húszszor alacsonyabb az *rybp*^{+/+} sejtekben lévőhöz képest (20. ábra: A). A Neb a vékony filamentumok hosszát szabja meg. A *neb* expressziója a 2. napon (hatszoros különbség) és a 14. napon (kétszeres különbség) mutatott csökkenést az *rybp*^{-/-} sejtekben (20. ábra: B). A Des a szarkomer Z-lemezei körül komplexet alkotó intermediér filamentum. A Des szintje az *rybp*^{-/-} sejtekben a 0. és 2. napon kétszer annyi, mint az *rybp*^{+/+} sejtekben, majd a 7. napon fele annyi, a 14. napon pedig 35-ször kevesebb (20. ábra: C). A Sar (ltd. srl) a szívben, az SR-ben található Ca^{2+} -kötő fehérje. Szintje az *rybp*^{-/-} sejtekben a 0., 7. és 14. napon fele, a 2. napon pedig hatod-része az *rybp*^{+/+} sejtekben mérthez képest (20. ábra: D). Mindezen eredmények arra mutatnak rá, hogy funkcióképes Rybp hiányában nem alakul ki az izomkontrakcióhoz szükséges szarkomer a szívizomtelepekben.

6.5 A *Plagl1* transzkripció faktor expressziójának vizsgálata az *rybp*^{-/-} sejtekben

A *Plagl1* kiemelten fontos az apoptózisban, sejtciklus-szabályzásban és a kardiális differenciáció folyamatában. Korábban transzkriptom analízis során kimutattuk, hogy a *plagl1* gén nem indukálódik Rybp hiányában (4.8) [1]. Ezen megfigyelést erősítettem meg fehérje szinten ICC-vel (ellenanyag: 1. táblázat, 2. táblázat) és mRNS szinten qRT-PCR-rel (primerek: 1. melléklet). Az ICC során az *rybp*^{+/+} sejtekben a *Plagl1* expressziója jól látszik a magban, míg az *rybp*^{-/-} sejtekben nem kaptunk pozitív jelet (21. ábra: A).



21. ábra: A *Plagl1* immunfestése (A), az eredmények kvantitálása (B), a *Plagl1* qRT-PCR analízise (C) (n=1, t=3) (Objektív: 60x, zoom: 2,2x; Scale bar: 100µm) Szórás: standard deviáció ±SD, szignifikancia: p<0,05 (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001)

Az eredményt Image J szoftver segítségével kvantitáltuk (21. ábra: B). A *plagl1* qRT-PCR analízise során a 7. napon 200-szoros, a 14. napon több, mint 1000-szeres indukciót kaptunk az *rybp*^{+/+} sejtek esetén, míg Rybp hiányában a *plagl1* szintje nulla közeli maradt (21. ábra: C). Mivel a *plagl1* és az *rybp* heterozigóta mutáns egerek hasonló fenotípust mutatnak, továbbá mindkét gén részt vesz az apoptózis, sejtciklus és a kardiális differenciáció folyamataiban (4.8), feltételezzük, hogy az Rybp polikomb független módon, mint aktivátor, a *Plagl1*-gyel közösen vesz részt ezen folyamatok szabályzásában. Ez az Rybp-nek egy új, eddig nem ismert szabályozó szerepét jelentené.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Diplomamunkám kiindulópontjában az megfigyelés állt, hogy *rybp* hiányában a szívizomsejtek kontrakcióra képtelenek. Kísérleteim során azt vizsgáltam, hogy az *rybp*^{-/-} mutáns szívizomsejtekben milyen apoptózis- és sejtciklusbeli különbségek figyelhetők meg az *rybp*^{+/+} sejtekhez képest, továbbá hogy sérült-e bizonyos szarkomer-szerkezeti komponensek expressziója és ez összefüggésbe hozható-e a kardiális differenciációban, apoptózisban és sejtciklus-szabályzásban fontos faktor, a *Plagl1* hiányával.

Eredményeim a következő pontokban foglalhatóak össze:

- az *rybp*^{-/-} szívizomtelepek területe kisebb az *rybp*^{+/+} telepekéhez képest, a 21. naptól pedig az *rybp*^{-/-} sejtek vastagabb telepeket képeztek. Ezt azon eredmény támasztja alá, hogy az *rybp*^{-/-} sejtek sejtciklusában az S fázis dominált, A G1/G0 fázis mértéke lecsökkent, tehát kevesebb *rybp*^{-/-} sejt lépett ki a sejtciklusból
- az *rybp*^{-/-} szívizomsejtekben a korai kardiális időponttól (7. naptól) megemelkedett az apoptózis mértékének szintje az *rybp*^{+/+} sejtekhez képest
- az *rybp*^{-/-} sejtekben nem volt regisztrálható sem intracelluláris Ca²⁺ oszcilláció, sem sejtrövidülés, továbbá az *rybp*^{-/-} telepek a 28. napig sem mutattak kontraktilitást
- a *plagl1* a kardiális differenciáció során nem indukálódott Rybp hiányában, jelenléte a 21. napon sem volt fehérjeszinten kimutatható
- a vizsgált szarkomer-struktúrgének expressziója lecsökkent és a fehérjék lokalizációja eltért Rybp hiányában a szívizomsejtekben (*Actn2*, *Des*, *Myh6*, *Myh7*, *Myom1*, *Neb*, *Srl*, *Tnni3*, *Tnnt2*, *Tpm1*, *Tpm4*, *Ttn*), a szarkomer szerkezet nem alakult ki

Mivel az *rybp*^{-/-} sejtek jobban proliferálnak, főként a 21. naptól, valószínűsíthető, hogy több szívizomsejt progenitor képződik a differenciáció terminális fázisában, ami a defektusokhoz vezet. Tehát az Rybp-nek a differenciáció időbeli szabályzásában fejlődésbiológiai szerepe lehet. Eredményeink azt sugallják, hogy az Rybp a *Plagl1*-gyel egy közös útvonalon szabályozza a kardiális differenciációt és ez a szabályzás az Rybp polikomb funkciójától független. Jövőbeni terveink közé tartozik a *Plagl1* és az Rybp kölcsönhatásának vizsgálata a szívizomban és a szívben előforduló egyes sejtípusok jelenlétének, arányainak meghatározása is. Továbbá tervezzük az egyes sejtípusok kialakításáért felelős útvonalak és apoptózis és sejtciklus szabályzásában résztvevő gének elemzését.

8. IRODALOMJEGYZÉK

1. Ujhelly, O., et al., *Lack of Rybp in Mouse Embryonic Stem Cells Impairs Cardiac Differentiation*. Stem Cells Dev, 2015.
2. Martello, G. and A. Smith, *The nature of embryonic stem cells*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2014. **30**: p. 647-75.
3. Takahashi, K. and S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. Cell, 2006. **126**(4): p. 663-76.
4. Evans, M.J. and M.H. Kaufman, *Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos*. Nature, 1981. **292**(5819): p. 154-6.
5. Bracken, A.P. and K. Helin, *Polycomb group proteins: navigators of lineage pathways led astray in cancer*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(11): p. 773-84.
6. Simon, J.A. and R.E. Kingston, *Mechanisms of polycomb gene silencing: knowns and unknowns*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(10): p. 697-708.
7. Morey, L., et al., *Nonoverlapping functions of the Polycomb group Cbx family of proteins in embryonic stem cells*. Cell Stem Cell, 2012. **10**(1): p. 47-62.
8. O'Loughlen, A., et al., *MicroRNA regulation of Cbx7 mediates a switch of Polycomb orthologs during ESC differentiation*. Cell Stem Cell, 2012. **10**(1): p. 33-46.
9. Turner, S.A. and A.P. Bracken, *A "complex" issue: deciphering the role of variant PRC1 in ESCs*. Cell Stem Cell, 2013. **12**(2): p. 145-6.
10. Gao, Z., et al., *PCGF homologs, CBX proteins, and RYBP define functionally distinct PRC1 family complexes*. Mol Cell, 2012. **45**(3): p. 344-56.
11. Vidal, M., *Role of polycomb proteins Ring1A and Ring1B in the epigenetic regulation of gene expression*. Int J Dev Biol, 2009. **53**(2-3): p. 355-70.
12. Garcia, E., et al., *RYBP, a new repressor protein that interacts with components of the mammalian Polycomb complex, and with the transcription factor YY1*. EMBO J, 1999. **18**(12): p. 3404-18.
13. del Mar Lorente, M., et al., *Loss- and gain-of-function mutations show a polycomb group function for Ring1A in mice*. Development, 2000. **127**(23): p. 5093-100.
14. Tavares, L., et al., *RYBP-PRC1 complexes mediate H2A ubiquitylation at polycomb target sites independently of PRC2 and H3K27me3*. Cell, 2012. **148**(4): p. 664-78.
15. Beketaev, I., et al., *Critical role of YY1 in cardiac morphogenesis*. Dev Dyn, 2015. **244**(5): p. 669-80.
16. Neira, J.L., et al., *The transcriptional repressor RYBP is a natively unfolded protein which folds upon binding to DNA*. Biochemistry, 2009. **48**(6): p. 1348-60.
17. Schlisio, S., et al., *Interaction of YY1 with E2Fs, mediated by RYBP, provides a mechanism for specificity of E2F function*. EMBO J, 2002. **21**(21): p. 5775-86.
18. He, S.Y., et al., *Chromatin remodeling enzyme Brg1 is required for mouse lens fiber cell terminal differentiation and its denucleation*. Epigenetics & Chromatin, 2010. **3**.
19. Zheng, L., et al., *The death effector domain-associated factor plays distinct regulatory roles in the nucleus and cytoplasm*. J Biol Chem, 2001. **276**(34): p. 31945-52.
20. Stanton, S.E., et al., *Rybp interacts with Hippo and enhances Hippo-mediated apoptosis*. Apoptosis, 2007. **12**(12): p. 2197-206.
21. Chen, D., et al., *RYBP stabilizes p53 by modulating MDM2*. EMBO Rep, 2009. **10**(2): p. 166-72.
22. Wang, W., et al., *RYBP expression is associated with better survival of patients with hepatocellular carcinoma (HCC) and responsiveness to chemotherapy of HCC cells in vitro and in vivo*. Oncotarget, 2014. **5**(22): p. 11604-19.

23. Pirity, M.K., et al., *Rybp, a polycomb complex-associated protein, is required for mouse eye development*. BMC Dev Biol, 2007. **7**: p. 39.
24. Pirity, M.K., J. Locker, and N. Schreiber-Agus, *Rybp/DEDAF is required for early postimplantation and for central nervous system development*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(16): p. 7193-202.
25. Harvey Lodish, A.B., Chris A. Kaiser, Monty Krieger, Anthony Bretscher, Hidde Ploegh, Angelika Amon, Matthew P. Scott *Molecular Cell Biology*. 7th ed. 2012: W. H. Freeman, Palgrave Macmillan.
26. Takeuchi, T., *Regulation of cardiomyocyte proliferation during development and regeneration*. Dev Growth Differ, 2014. **56**(5): p. 402-9.
27. Green, D.R., *Means to an End: Apoptosis and Other Cell Death Mechanisms*. 2011: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
28. Surget, S., M.P. Khoury, and J.C. Bourdon, *Uncovering the role of p53 splice variants in human malignancy: a clinical perspective*. Onco Targets Ther, 2013. **7**: p. 57-68.
29. Roulston, A., R.C. Marcellus, and P.E. Branton, *Viruses and apoptosis*. Annu Rev Microbiol, 1999. **53**: p. 577-628.
30. Fisher, S.A., B.L. Langille, and D. Srivastava, *Apoptosis during cardiovascular development*. Circ Res, 2000. **87**(10): p. 856-64.
31. Fiedler, L.R., E. Maifoshie, and M.D. Schneider, *Mouse models of heart failure: cell signaling and cell survival*. Curr Top Dev Biol, 2014. **109**: p. 171-247.
32. Kyto, V., et al., *Apoptotic cardiomyocyte death in fatal myocarditis*. Am J Cardiol, 2004. **94**(6): p. 746-50.
33. van Weerd, J.H., et al., *Epigenetic factors and cardiac development*. Cardiovasc Res, 2011. **91**(2): p. 203-11.
34. van Eldik, W. and R. Passier, *Signalling in sarcomeres in development and disease*. Neth Heart J, 2013. **21**(7-8): p. 367-71.
35. Wang, X. and J. Robbins, *Heart failure and protein quality control*. Circ Res, 2006. **99**(12): p. 1315-28.
36. England, J. and S. Loughna, *Heavy and light roles: myosin in the morphogenesis of the heart*. Cell Mol Life Sci, 2013. **70**(7): p. 1221-39.
37. Samson, S.C., et al., *3-OST-7 regulates BMP-dependent cardiac contraction*. PLoS Biol, 2013. **11**(12): p. e1001727.
38. Jagatheesan, G., S. Rajan, and D.F. Wieczorek, *Investigations into tropomyosin function using mouse models*. J Mol Cell Cardiol, 2010. **48**(5): p. 893-8.
39. Gomes, A.V., J.D. Potter, and D. Szczesna-Cordary, *The role of troponins in muscle contraction*. IUBMB Life, 2002. **54**(6): p. 323-33.
40. Parmacek, M.S. and R.J. Solaro, *Biology of the troponin complex in cardiac myocytes*. Prog Cardiovasc Dis, 2004. **47**(3): p. 159-76.
41. Nishii, K., et al., *Targeted disruption of the cardiac troponin T gene causes sarcomere disassembly and defects in heartbeat within the early mouse embryo*. Dev Biol, 2008. **322**(1): p. 65-73.
42. Morimoto, S., et al., *Ca²⁺-sensitizing effects of the mutations at Ile-79 and Arg-92 of troponin T in hypertrophic cardiomyopathy*. Am J Physiol, 1998. **275**(1 Pt 1): p. C200-7.
43. Huang, X., et al., *Cardiac troponin I gene knockout: a mouse model of myocardial troponin I deficiency*. Circ Res, 1999. **84**(1): p. 1-8.
44. Mogensen, J., T. Hey, and S. Lambrecht, *A Systematic Review of Phenotypic Features Associated With Cardiac Troponin I Mutations in Hereditary Cardiomyopathies*. Can J Cardiol, 2015. **31**(11): p. 1377-85.

45. Agarkova, I. and J.C. Perriard, *The M-band: an elastic web that crosslinks thick filaments in the center of the sarcomere*. Trends Cell Biol, 2005. **15**(9): p. 477-85.
46. Potthoff, M.J., et al., *Regulation of skeletal muscle sarcomere integrity and postnatal muscle function by Mef2c*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(23): p. 8143-51.
47. Siegert, R., et al., *A myomesin mutation associated with hypertrophic cardiomyopathy deteriorates dimerisation properties*. Biochem Biophys Res Commun, 2011. **405**(3): p. 473-9.
48. LeWinter, M.M. and H.L. Granzier, *Cardiac titin and heart disease*. J Cardiovasc Pharmacol, 2014. **63**(3): p. 207-12.
49. Freiburg, A. and M. Gautel, *A molecular map of the interactions between titin and myosin-binding protein C. Implications for sarcomeric assembly in familial hypertrophic cardiomyopathy*. Eur J Biochem, 1996. **235**(1-2): p. 317-23.
50. Itoh-Satoh, M., et al., *Titin mutations as the molecular basis for dilated cardiomyopathy*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **291**(2): p. 385-93.
51. Gotthardt, M., et al., *Conditional expression of mutant M-line titins results in cardiomyopathy with altered sarcomere structure*. J Biol Chem, 2003. **278**(8): p. 6059-65.
52. Gramlich, M., et al., *Stress-induced dilated cardiomyopathy in a knock-in mouse model mimicking human titin-based disease*. J Mol Cell Cardiol, 2009. **47**(3): p. 352-8.
53. Herman, D.S., et al., *Truncations of titin causing dilated cardiomyopathy*. N Engl J Med, 2012. **366**(7): p. 619-28.
54. Luther, P.K., *The vertebrate muscle Z-disc: sarcomere anchor for structure and signalling*. J Muscle Res Cell Motil, 2009. **30**(5-6): p. 171-85.
55. Fukami, K., et al., *Requirement of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate for alpha-actinin function*. Nature, 1992. **359**(6391): p. 150-2.
56. Young, P. and M. Gautel, *The interaction of titin and alpha-actinin is controlled by a phospholipid-regulated intramolecular pseudoligand mechanism*. EMBO J, 2000. **19**(23): p. 6331-40.
57. Eldstrom, J., et al., *SAP97 increases Kv1.5 currents through an indirect N-terminal mechanism*. FEBS Lett, 2003. **547**(1-3): p. 205-11.
58. Chiu, C., et al., *Mutations in alpha-actinin-2 cause hypertrophic cardiomyopathy: a genome-wide analysis*. J Am Coll Cardiol, 2010. **55**(11): p. 1127-35.
59. Mohapatra, B., et al., *Mutations in the muscle LIM protein and alpha-actinin-2 genes in dilated cardiomyopathy and endocardial fibroelastosis*. Mol Genet Metab, 2003. **80**(1-2): p. 207-15.
60. Bar, H., et al., *The biology of desmin filaments: how do mutations affect their structure, assembly, and organisation?* J Struct Biol, 2004. **148**(2): p. 137-52.
61. Cullen, M.J., J.J. Fulthorpe, and J.B. Harris, *The distribution of desmin and titin in normal and dystrophic human muscle*. Acta Neuropathol, 1992. **83**(2): p. 158-69.
62. Milner, D.J., et al., *The absence of desmin leads to cardiomyocyte hypertrophy and cardiac dilation with compromised systolic function*. J Mol Cell Cardiol, 1999. **31**(11): p. 2063-76.
63. Heling, A., et al., *Increased expression of cytoskeletal, linkage, and extracellular proteins in failing human myocardium*. Circ Res, 2000. **86**(8): p. 846-53.
64. Li, D., et al., *Desmin mutation responsible for idiopathic dilated cardiomyopathy*. Circulation, 1999. **100**(5): p. 461-4.
65. Goldfarb, L.G., et al., *Missense mutations in desmin associated with familial cardiac and skeletal myopathy*. Nat Genet, 1998. **19**(4): p. 402-3.

66. Klauke, B., et al., *De novo desmin-mutation N116S is associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy*. Hum Mol Genet, 2010. **19**(23): p. 4595-607.
67. Lorenzon, A., et al., *Desmin mutations and arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy*. Am J Cardiol, 2013. **111**(3): p. 400-5.
68. Brodehl, A., et al., *The novel desmin mutant p.A120D impairs filament formation, prevents intercalated disk localization, and causes sudden cardiac death*. Circ Cardiovasc Genet, 2013. **6**(6): p. 615-23.
69. McElhinny, A.S., et al., *Nebulin: the nebulous, multifunctional giant of striated muscle*. Trends Cardiovasc Med, 2003. **13**(5): p. 195-201.
70. Kazmierski, S.T., et al., *The complete mouse nebulin gene sequence and the identification of cardiac nebulin*. J Mol Biol, 2003. **328**(4): p. 835-46.
71. Selcen, D., B.R. Krueger, and A.G. Engel, *Familial cardioneuromyopathy with hyaline masses and nemaline rods: a novel phenotype*. Ann Neurol, 2002. **51**(2): p. 224-34.
72. Jiao, Q., et al., *Sarcalumenin is essential for maintaining cardiac function during endurance exercise training*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009. **297**(2): p. H576-82.
73. Yoshida, M., et al., *Impaired Ca²⁺ store functions in skeletal and cardiac muscle cells from sarcalumenin-deficient mice*. J Biol Chem, 2005. **280**(5): p. 3500-6.
74. Shimura, M., et al., *Sarcalumenin alleviates stress-induced cardiac dysfunction by improving Ca²⁺ handling of the sarcoplasmic reticulum*. Cardiovasc Res, 2008. **77**(2): p. 362-70.
75. Yuasa, S., et al., *Zac1 is an essential transcription factor for cardiac morphogenesis*. Circ Res, 2010. **106**(6): p. 1083-91.
76. Chung, S.H., et al., *Zac1 plays a key role in the development of specific neuronal subsets in the mouse cerebellum*. Neural Dev, 2011. **6**: p. 25.
77. Ma, L., et al., *Zac1 functions through TGFbetaII to negatively regulate cell number in the developing retina*. Neural Dev, 2007. **2**: p. 11.
78. Valente, T. and C. Auladell, *Expression pattern of Zac1 mouse gene, a new zinc-finger protein that regulates apoptosis and cellular cycle arrest, in both adult brain and along development*. Mech Dev, 2001. **108**(1-2): p. 207-11.
79. Valente, T., F. Junyent, and C. Auladell, *Zac1 is expressed in progenitor/stem cells of the neuroectoderm and mesoderm during embryogenesis: differential phenotype of the Zac1-expressing cells during development*. Dev Dyn, 2005. **233**(2): p. 667-79.
80. Varrault, A., et al., *Zac1 regulates an imprinted gene network critically involved in the control of embryonic growth*. Dev Cell, 2006. **11**(5): p. 711-22.
81. Spengler, D., et al., *Regulation of apoptosis and cell cycle arrest by Zac1, a novel zinc finger protein expressed in the pituitary gland and the brain*. EMBO J, 1997. **16**(10): p. 2814-25.
82. Abdollahi, A., et al., *Identification of a zinc-finger gene at 6q25: a chromosomal region implicated in development of many solid tumors*. Oncogene, 1997. **14**(16): p. 1973-9.
83. Rodeheffer, R.J., et al., *Molecular forms of atrial natriuretic factor in normal and failing human myocardium*. Circulation, 1993. **88**(2): p. 364-71.
84. Nagy, A., et al., *Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(18): p. 8424-8.
85. Kovacs, G., V. Szabo, and M.K. Pirity, *Absence of Rybp Compromises Neural Differentiation of Embryonic Stem Cells*. Stem Cells Int, 2016. **2016**: p. 4034620.

9. NYILATKOZAT

Alulírott **Szabó Viktória**, biológus MSc szakos hallgató, kijelentem, hogy a diplomadolgozatban foglaltak saját munkám eredményei, és csak a hivatkozott forrásokat (szakirodalom, eszközök, stb.) használtam fel.

Tudomásul veszem azt, hogy diplomamunkámat a Szegedi Tudományegyetem könyvtárában, a kölcsönözhető könyvek között helyezik el.

.....
aláírás

Szeged, 2016. május 13.

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni a diplomamunkám elkészítéséhez kapott támogatást a következő személyeknek:

Dr. Pirity Melinda Katalin tudományos főmunkatársnak, témavezetőmnek, aki minden szakmai és szellemi támogatást megadott az elmúlt évek alatt, akinek segítségével rengeteg tudást halmozhattam fel és egy érdekes téma kutatásában vehettem részt. Türelme, segítőkészsége, észrevételei nagyban hozzájárultak szakmai fejlődésemhez és a dolgozatom elkészítéséhez. Köszönöm **Dr. Sinka Rita** adjunktusnak, hogy belső konzulensemként támogatott diplomamunkám elkészítésében.

Szeretném megköszönni az Embrionális és Indukált Össejt Csoport tagjainak, **Kovács Gergő** és **Surya Henry PhD** hallgatóknak, továbbá **Sutus Enikő** szakdolgozónak a kísérletek elvégzésében nyújtott segítséget és a jókedvet, amivel minden nap könnyebbé tették a munkát.

Szeretném megköszönni **Dr. Acsai Károlynak** és **Dr. Prorok Jánosnak**, hogy kollaborációban velük dolgozhattam és hogy szakmai kérdéseimre mindig készséggel válaszoltak.

Köszönöm a Szegedi Biológiai Kutatóközpont dolgozóinak, **Dr. Ayaydin Ferhannak**, **Dr. Endre Gabriellának**, **Dr. Mihály Józsefnek** és **Kotogány Editnek** a kísérletekben nyújtott segítséget, továbbá a Genetikai Intézet igazgatójának, **Dr. Erdélyi Miklósnak**, hogy a kutatási projekt megvalósulhatott.

11. MELLÉKLETEK

Primer (gén_exon_irány)	Szekvencia (5'-3')
Actn2_8/9_Forward	CACTCCCAAACCCGATGAAA
Actn2_8/9_Reverse	TTCTGTTAGCTGCTGTCTCG
Des_2/3_Forward	AGAGAAGAAGCAGAGAACAACCT
Des_2/3_Reverse	GGTCAATACGAGCTAGAGTGG
Hprt_1/3_Forward	AGTCCCAGCGTCGTGATTAG
Hprt_1/3_Reverse	GCAAGTCTTTCAGTCCTGTCC
Myh6_33/34_Forward	CTCAGCCAGGCCAATAGAAT
Myh6_33/34_Reverse	GGTGTCTTCAAGTGAGCTT
Myh7_6-8_Forward	CCATCTCTGACAACGCCTAT
Myh7_6-8_Reverse	CCAATGGCGGCAATAACAG
Myom1_9/10_Forward	TAAAGCACTTTCAGCCCGAG
Myom1_9/10_Reverse	CTCGGATCGTGTAGAGACCT
Neb_3/4_Forward	TCTGGAAAAATGGCGGATGA
Neb_3/4_Reverse	GGCACCTCTTCGTAAACTGT
Srl_6/7_Forward	CGCAAGCAACAAGAAAGAGG
Srl_6/7_Reverse	AGCTTTGTGGGATCGAAGAC
Tnni3_5/6_Forward	TTCAGGACTTATGCCGACAG
Tnni3_5/6_Reverse	CACGTCATATCTCTCTTCATCCA
Tnnt2_6/9_Forward	CTGAGACAGAGGAGGCCAAC
Tnnt2_6/9_Reverse	ACCAAGTTGGGCATGAAGAG
Tpm1_4/5_Forward	TGAAAGAGGCCAAGCACATT
Tpm1_4/5_Reverse	GATGATGACCAGCTTACGGG
Tpm4_3/4_Forward	CAAAGAAGCCAAGCACATCAC
Tpm4_3/4_Reverse	CCAACCTTACGAGCAACCTCC
Ttn_4/5_Forward	GGTGGTTCAAGGTGAAGAAGTA
Ttn_4/5_Reverse	TCCGGGTTTGTCTTGTTTCTG
Plagl1_5/6_Forward	CAAAGCCTTCGTCTCCAAGTAT
Plagl1_5/6_Reverse	GTCCTTCCGGTTGAATGTCTT

1. melléklet: A qRT-PCR kísérleteink során alkalmazott primerek listája

2. melléklet: Tudományos eredmények

Poszterek

- Flóra Vajda, **Viktória Szabó**, Diána Nagy, Anita Káity-Szécsényi, Melinda K. Purity
Orthologs of the rabbit Oct4, Sox2, Klf4 pluripotency genes
Straub-napok, Szeged, Magyarország; 2013. május 29-30.
- **Viktória Szabó**, Flóra Vajda, Melinda K. Purity
Why stem cell derived rybp deficient cardiomyocytes are not contractible?
Straub-napok, Szeged, Magyarország; 2014. május 28-29.
- Gergő Kovács, Árpád Varga, **Viktória Szabó**, Melinda K. Purity
Dosage dependent effect of Rybp on the retinoic acid mediated signalling pathway
Straub-napok, Szeged, Magyarország; 2014. május 28-29.
- **Viktória Szabó**, Gergő Kovács, Melinda K. Purity
Rybp-deficient cardiogenesis reveals disruption of sarcomere remodeling
Straub-napok, Szeged, Magyarország; 2015. június 3-4.
- Gergő Kovács, **Viktória Szabó**, Melinda K. Purity
Lack of rybp impairs neural differentiation in embryonic stem cells
Straub-napok, Szeged, Magyarország; 2015. június 3-4.

Szakmai folyóiratokban megjelent tudományos közlemények

Olga Ujhelly, **Viktória Szabó**, Gergő Kovács, Flóra Vajda, Szilvia Mallok, János Prorok, Károly Acsai, Zoltán Hegedűs, Stefan Krebs, András Dinnyés, Melinda K. Purity
Lack of Rybp in Mouse Embryonic Stem Cells Impairs Cardiac Differentiation
Stem Cells and Development, (2015)

Gergő Kovács, **Viktória Szabó**, Melinda K. Purity
Absence of Rybp compromises neural differentiation of embryonic stem cells
Stem Cells International, (2016)

Tudományos Diákköri tevékenység

2016. évi tavaszi Tudományos Diákköri Konferencia (helyi forduló)
Molekuláris biológia és genetika I. szekció
I. helyezés