

dc\_39\_10

**MTA doktori értekezés tézisei**

**Az embrionális ivarsejtfejlődés genetikai vizsgálata  
*Drosophila melanogaster*ben**

**Erdélyi Miklós**

Magyar Tudományos Akadémia  
Szegedi Biológiai Központ  
Genetikai Intézet

Szeged 2010

## BEVEZETÉS

A fejlett soksejtűek két alapvető sejttypusát az ivarsejtek és a testi sejtek képezik. Az ivarsejtek a szaporodást szolgálják, a testi sejtek pedig a közösségi feladatok ellátásával az egyed egészségének túlélését biztosítják. Mivel a fejlett soksejtű szervezetek összes sejtje egyetlen sejtből, a megtermékenyített petesejtből származik, a testi és ivarsejtek azonos genotípussal rendelkeznek. Ennek következtében a testi sejtek az egyed érdekében végzett „önzetlen” működését lehetővé tevő gének nem szenvednek szelekciós hátrányt, hiszen az ivarsejteken keresztül átadódhatnak az utódokba. Az ivarsejt-testi sejt funkciók szétválasztása, mint „evolúciós találmány” a soksejtű szervezetek testfelépítésének gyors evolúcióját tették lehetővé. Ennek az „evolúciós találmánynak” fontosságát jól bizonyítja, hogy a soksejtűvé válás, és egyben az ivarsejtsors elkülönülése többször egymástól függetlenül bekövetkezett az evolúció során. A fejlődés iránya minden esetben egyértelmű, az egyedek egyre nagyobb és bonyolultabb működésű testet fejlesztettek. Létrejött a csodálatosan változatos testi felépítést mutató soksejtű élővilág. Az ivarsejtek, pedig folytatják a testen belüli, generációkon átívelő, a fennmaradást szolgáló, rejtett életüket.

Ritával, Vilmos Péterrel, Szuperák Milánnal, Henn Lászlóval, Varga Ágnessel, akik a dolgozatomban bemutatott eredmények zömét létrehozták. Szakmai életemet két kiváló asszisztens mindennapos áldozatos munkája kísérte végig, amiért a legnagyobb tisztelettel vagyok Mosonyi Andrea és Szathmári Margit iránt.

A sors igen nagy adományának tartom, hogy a szakmai és családi életem sohasem ment egymás rovására. Mindez csak úgy valósulhatott meg, hogy feleségem, három gyermekem szüleim, feleségem szülei a legmesszebbmenően segítettek céljaim elérésében, aminek megköszönésére nehéz lenne megfelelő szavakat találni.

Függő idézetek száma:	113
Összegzett impakt faktor:	136.485
Első vagy utolsó szerzős közlemények összesített impact faktora:	63,812**
Az értekezésben tárgyalt közlemények összesített impaktfaktora:	60,327
Az értekezésben tárgyalt közlemények száma:	8

\*\* A megosztott utolsó szerzős közleményt beszámítva

## KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Tisztelettel köszönöm Szabad Jánosnak, hogy megtanított a tudományos kutatás alapelveire, hogy pályámat diákkorom óta a mai napig minden lehető eszközzel segíti. Szakmai életem alakulására nagy hatással volt, hogy tagja lehettem a Genetikai Intézetben működő Drosophila Genetikai tudományos iskolának. Köszönettel tartozom Anne Ephrussinak, hogy megismerttetett a nemzetközi tudományos életben való eligazodás alapjaival. Hálás vagyok Kiss Istvánnak, Gausz Jánosnak, Gyurkovics Henriknek, Maróy Péternek, a Szegedi Drosophila iskola meghatározó egyéniségeinek, hogy segítettek, önálló laboratóriumom megalakításában. Köszönöm Raskó Istvánnak a Szegedi Biológiai Központ Igazgatójának, hogy bizalmába fogadott és egy évtizeden át helyetteseként hasznos vezetői tapasztalatokat szerezhettem. Munkám során sok szakmai és baráti segítséget kaptam Sipos Lászlótól, Mihály Józseftől, a Genetikai Intézetbeli Drosophilás csoportvezető-társaimtól. Rendkívül szerencsésnek mondhatom magam, hogy együtt dolgozhattam Závorszky Péterrel, Jankovics Ferencsel, Sinka

## CÉLKITŰZÉS

Ahogy az evolúció során többször megtörtént az ivarsejt és testi sejt sorsok szétválása minden ma élő soksejtű egyedfejlődése során bekövetkezik. Az elmúlt években az ivarsejtek egyedfejlődés során való differenciálódásával foglalkoztam. Legfontosabb célom az ivarsejt-testi sejt elválás folyamatának jobb megértése volt. Munkámat az ivarsejtkutatás egyik legfontosabb modellorganizmusán a *Drosophila melanogasteren*, ecetmuslicán végeztem. Dolgozatom az ebben a témakörben végzett tevékenységemet foglalja össze.

## A DROSOPHILA IVARSEJTKUTATÁS MÉRFÖLDKÖVEI

August Weismann az ivarplazmát, a csíravonal folytonosságát biztosító citoplazmarészletet, több mint száz évvel ezelőtt, kétszárnyú embrióban írta le, ezzel a legyeket, köztük a *Drosophila melanogaster*t az ivarsejtkutatás fontos modellszervezetévé tette. Az 1970-es években Karl Illmensee és Antony Mahowald citoplazma átültetéssel igazolták, hogy az ivarplazma az összes faktort tartalmazza, amely az ivarsejtek fejlődését a testi sejtek sorsától elkülöníti. Anne Ephrussi és Ruth Lehmann 1991-ben azonosította az ivarplazma összeszerelődés megindításához szükséges és elégséges morfogént az *oskar* gén termékét. Az *oskar* morfogén felfedezés után a *Drosophila* ivarsejtkutatás két fő részre bomlik. Az egyik fő irány a morfogén lokalizációjának tanulmányozása. A másik

fő irány az *oskar* géntermék által lokalizált végrehajtó ivarsejtfaktotok azonosítása. Az utóbbi húsz évben világossá vált, hogy *oskar* géntermékek lokalizációját összetett sejtbiológiai folyamatsor irányítja melynek része a follikuláris sejtek és a petesejt közötti kommunikáció, a petesejt polaritásának megfelelő átalakulása, az *oskar* RNS sejtmagi exportja, majd hosszú távú transzportja, a transzport folyamat alatti transzlációs gátlás, hely specifikus transzláció, és végül a petesejt hátulsó részén való kihorgonyozódás. Munkánk kezdetekor 1994-ben az *oskar* géntermék által az ivarplazmában lokalizált faktorokból is ismerünk már néhányat (*tudor*, *vasa*, *valois*, *nanos*, *germcell-less*, *small mt rRNS*, *large mt rRNS*).

## A DOLGOZATBAN BEMUTATOTT EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

Dolgozatomban az elmúlt másfél évtizedben végzett munkám azon részét foglaltam össze, melynek során a *Drosophila* embrionális ivarsejtek kialakulását és működését vizsgáltam genetikai, molekuláris és sejtbiológiai módszerekkel. Az időszak, melyet a dolgozatom átfog jelentős technikai és szemléletbeli változásokat hozott a *Drosophila* genetikában. Munkám során törekedtem arra, hogy az adott kor adta technikai lehetőségeket kihasználjam a változatlan, és azóta is fő tevékenységemnek tekintett ivarsejtkutatásaim során. A dolgozat megírásakor arra törekedtem, hogy bemutassam az olvasónak azokat a megfontolásokat, melyek

**7** LIPPAI M, TIRIAN L, BOROS I , MIHALY J , ERDELYI M , BELECZ I, MATHE E, POSFAI J , NAGY A, UDVARDY A , PARASKEVA E, GORLICH D, SZABAD J *GENETICS* **156**: 1889-1900 (2000) IF: 4.687

**8** TIRIAN L, PURO J, ERDELYI M , BORES I, PAPP B, LIPPAI M, SZABAD J The *Ketel(D)* dominant-negative mutations identify maternal function of the *Drosophila* importin-beta gene for cleavage nuclei formation *GENETICS* **156**: 1901-1912 (2000) IF: 4.687

**9** JUHASZ G, CSIKOS G, SINKA R, ERDELYI M, SASS M The *Drosophila* homolog of *Aut1* is essential for autophagy and development *FEBS LETT* **543**: 154-158 (2003) IF: 3.609

**10** CSIKOS G, LIPPAI M, LUKACSOVICH T, JUHASZ G, HENN L, ERDELYI M, MAROY P, SASS M A novel role for the *drosophila* *epsin (lqf)* involvement in autophagy *AUTOPHAGY* **5**: (5)636-648 (2009) IF: 6.829

**11** SZALONTAI T, GASPAR I, BELECZ I, KEREEKES I, ERDELYI M, BOROS I, SZABAD J *Horka(d)*, a chromosome instability-causing mutation in *drosophila*, is a dominant-negative allele of *lodestar* *GENETICS* **181**: (2)367-377 (2009) IF: 3.889

**12** ADAM C, HENN L, MISKEI M, ERDELYI M, FRIEDRICH P, DOMBRADI V Conservation of male-specific expression of novel phosphoprotein phosphatases in *drosophila* *DEV GENES EVOL* **220**: (3-4)123-128 (2010) IF: 2.

\* Megosztott utolsó szerző

Saját közlemények száma:	20
Idézetek száma:	787
Független idézetek száma:	674

**8** VILMOS P, JANKOVICS F, SZATHMARI M, LUKACSOVICH F, HENN L, ERDELYI M Live imaging reveals that the Drosophila actin-binding ERM protein, moesin, co-localizes with the mitotic spindle. EUR J CELL BIOL **88**: (10) 609-619 (2009) IF: 3.314

### Egyéb közlemények

**1** SZABAD J, ERDELYI M, SZIDONYA J Characterization of FS(2)1, a germ-line dependent dominant female sterile mutation of Drosophila. ACTA BIOL HUNG **38**: 257-266 (1987) IF: 0.215

**2** KLINGLER M, ERDELYI M, SZABAD J, NUSSLEIN-VOLHARD C Function of torso in determining the terminal anlagen on the Drosophila embryo. NATURE **335**: 275-277 (1988) IF: 15.758

**3** ERDELYI M, SZABAD J Isolation and characterization of dominant female sterile mutations of Drosophila melanogaster. I. Mutations on the third chromosome. GENETICS **122**: 111-127 (1989) IF: 3.485

**4** SZABAD J, ERDELYI M, HOFFMANN G, SZIDONYA J, WRIGHT TRF Isolation and characterization of dominant female sterile mutations of Drosophila melanogaster. II. Mutations on the second chromosome. GENETICS **122**: 823-835 (1989) IF: 3.485

**5** ERDELYI M, MATHE E, SZABAD J Genetic and developmental analysis of mutant Ketel alleles that identify the Drosophila importin-b homologue. ACTA BIOL HUNG **48**: 323-338 (1997)

**6** GUICHET A, COPELAND JWR, ERDELYI M, HLOUSEK D, ZAVORSZKY P, HO J, BROWN S, PERCIVAL-SMITH A, KRAUSE HM, EPHRUSSI A The nuclear receptor homologue Ftz-F1 and the homeodomain protein Ftz are mutually dependent cofactors. NATURE **385**: 548-552 (1997) IF: 27.368

folyamatos metodikai útkeresésre ösztönöztek. Igyekeztem a munkám egyes fázisaiban használt eljárásokkal kapott eredményekből csupán a leglényegesebbeket kiemelni.

Munkám célja az volt, hogy az embrionális ivarsejt determináció genetikai hátterét a lehető legpontosabban feltárjam. Ez valójában a folyamatot irányító gének azonosítása és fenotípusos jellemzése volt. Drosophilában az ivarsejtek az embriogenezis legkorábbi szakaszában kialakulnak, a korai ivarsejtekben működő faktorok kizárólag az anyától származnak. A folyamatot tehát anyai hatású ivarsejthiányos mutációkkal lehetett vizsgálni. Korábban ismert tény volt, hogy a Drosophila ivarsejt determináció központi eleme az *oskar* gén temékeinek petesejten belüli lokalizációja valamint lokális aktiválódása. Természetes tehát, hogy az újonnan azonosított ivarsejthiányos mutációk fenotípusát mindig az *oskar* généhez mértük. Génazonosításra forward és reverz genetikai eljárásokat is alkalmaztunk. Összefoglalva elmondható, hogy a forward irány az ivarsejt determinációban szerepet játszó génhierarchia *oskar* feletti, a reverz irány pedig *oskar* alatti elemek felkutatására volt alkalmas. Munkám során munkatársaimmal nagy áteresztő képességű reverz genetikai rendszereket dolgoztunk ki, melyek az ivarsejt determinációt irányító génhierarchia új elemeinek felfedezését tették lehetővé. Laboratóriumuk tevékenységének elkövetkezendő néhány évét az újonnan azonosított gének részletes vizsgálata fogja kitenni.

## A dolgozatban összefoglalt főbb eredmények

- A *Drosophila* ivarsejtsors meghatározásban kulcs szerepet játszó *oskar* gén RNS-ének translációtól független, a petekezdemények fejlődésében betöltött funkcióját írtuk le. Kimutattuk, hogy ezért az RNS alapú funkcióért a transzkriptum 3' nem translálódó része a felelős.

- Az általunk korábban azonosított domináns hideg érzékeny *Ketel* allélnak és annak domináns szupresszorának felhasználásával kettős szelekción alapuló, nagy áteresztő képességű automatikus mutánsizolálási rendszert fejlesztettünk ki. Ennek segítségével létrehoztuk az akkor legnagyobb P elem indukálta mutánsgyűjteményt és azt anyai hatású ivarsejthiányos mutációk szűrésére használtuk fel.

- Azonosítottunk egy az *oskar* RNS poszterior lokalizációjához szükséges új faktort a *Tmll* gén által kódolt aktin kötő tulajdonságú celluláris tropomiosin (cTm) fehérjét. Kimutattuk, hogy a cTm fehérje az *oskar* RNS lokalizáció utolsó lépéséhez, a petesejt poszterior pólusrán történő való lokalizációhoz szükséges. Újabb vizsgálatokkal kimutatták, hogy a cTm fehérje az *oskar* RNS-t szállító RNS-fehérje komplex tagja. A cTm fehérje legvalószínűbb feladata a szubkortikális aktinvázhoz megérkező *oskar*-t szállító partikulumok helyben tartása.

- Hobo transzpozon mutagenézis kísérletben anyai hatású ivarsejthiányos fenotípusával azonosítottuk az ivarsejt specifikus *Drosophila poirot* gént. Kimutattuk, hogy gén funkciója az Oskar rövid fehérje izoforma poszterior póluson való megtartása. A *poirot*

## SAJÁT KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

### A Doktori értekezésben tárgyalt közlemények listája

1 ERDELYI M, MICHON AM, GUICHET A, GLOTZER JB, EPHRUSSI A Requirement for *Drosophila* cytoplasmic tropomyosin in *oskar* mRNA localization. *NATURE* **377**: 524-527 (1995) IF: 27.074

2 JANKOVICS F, SINKA R, ERDELYI M An interaction type of genetic screen reveals a role of the Rab11 gene in *oskar* mRNA localization in the developing *Drosophila melanogaster* oocyte *GENETICS* **158**: 1177-1188 (2001) IF: 4.803

3 JANKOVICS F, SINKA R, LUKACSOVICH T, ERDELYI M MOESIN Crosslinks Actin and Cell Membrane in *Drosophila* Oocytes and Is Required for OSKAR Anchoring *CURR BIOL* **12**: 2060-2065 (2002) IF: 7.007

4 SINKA R, JANKOVICS F, SOMOGYI K, SZLANKA T, LUKACSOVICH T, ERDELYI M *Poirot*, a new regulatory gene of *Drosophila oskar* acts at the level of the short Oskar protein isoform *DEVELOPMENT* **129**: 3469-3478 (2002) IF: 7.883

5 SZUPERAK M, ZVARA A, ERDELYI M Identification of germ plasm-enriched mRNAs in *Drosophila melanogaster* by the cDNA microarray technique *GENE EXP PATT* **5**: 717-723 (2005) IF: 1.794

6 JENNY A, HACHET O, ZAVORSZKY P, CYRKLAFF A, WESTON M D J, JOHNSTON D S ERDELYI M\*, EPHRUSSI A A translation-independent role of *oskar* RNA in early *Drosophila* oogenesis *DEVELOPMENT* **133**: 2827-2833 (2006) IF: 7.764

7 VILMOS P, HENN L, SZATHMÁRI M, LUKÁCSOVICH T, SIPOS L, ERDELYI M Application of the dual-tagging gene trap method combined with a novel automatic selection system to identify genes involved in germ cell development in *Drosophila melanogaster* *ACTA BIOL HUNG* **58**: (Suppl.7.) 81-94 (2007) IF: 0.688

is megtapasztaltuk, hogy egy adott fejlődéstani folyamatban nagyon sok gén játszhat, sokszor azonban nagyon gyengén tetten érhető szerepet. A fenotípus elemzésnek egyfajta határozatlansági relációja kezd kibontakozni. Egyes mutánsokkal a gének funkciója jól meghatározható, de így csak a genom egy része vizsgálható. Többes mutáns analízissel az egész genom vizsgálható, de a fenotípusok nagyon keveset árulnak el az egyes interakciós partnerek egyéni funkciójáról. Jelenleg, jobb híján, az interakciós rendszereinket első szűrőnek használjuk, és ezután az így azonosított gének egyedi funkcióját hagyományos mutáns analízissel próbáljuk kideríteni. Így az interakciós rendszerek adta lehetőségek közül csak a nagy áteresztő képességet használjuk ki. Sokszor tapasztaltuk, hogy az interakciós rendszerekben szignifikáns fenotípust adó jelöltek a hagyományos egyes mutáns analízis során semmilyen fenotípust nem mutatnak. Tapasztalataink kijelölik a további kutatási irányt, történetesen bioinformatikusok, hálózati modellezéssel foglalkozó kutatók bevonásával új utakat kell keresni a többes mutáns analízis eredmények értékelésében.

fenotípusok vizsgálatával megmutattuk a két Oskar izoforma eltérő biológiai szerepét. A hosszú Oskar izoforma az lokalizált oskar géntermékek magas szintjének eléréséhez szükséges pozitív autoregulációért, míg a rövid izoforma az ivarsejtek kialakulásához szükséges ivarplazma összeszervezéséért felelős.

- Kialakítottunk egy ivarsejtekben működő kettős szelekciójú *Drosophila* géncsapdázó (GT) transzpozont, melynek segítségével anyai hatású ivarsejthiányos fenotípusú mutációkat azonosítottunk. A GT transzpozonos mutagenézis során anyai hatású ivarsejthiányos alléljával azonosítottuk a Moesin gént.

- Moesin mutáns petekezdemények mikroszkópos analízisével először adtuk sejtbiológiai bizonyítékát annak, hogy a szerkezeti adatok alapján korábban is aktin-sejtmembrán keresztkötő tulajdonságúnak jósolt Moesin fehérje valóban az aktin sejtváz és a sejtmembrán keresztkötő ágense.

- Moesin mutáns petekezdemények mikroszkópos vizsgálatával megmutattuk, hogy a szubkortikális aktin váz ektopikusan is képes az Oskar fehérjének és RNS-nek helyben tartására. Ezzel bizonyítottuk azt a korábbi sejtést, hogy az ivarsejt determinációban kulcsszereppel bíró oskar poszerior lokalizáció az aktin sejtvázon valósul meg.

- A korábban szigorúan citoplazmás fehérjeként számon tartott Moesin fehérje sejtmagi lokalizációját mutattuk ki *Drosophila* ivar és testi sejtekben, valamint sejttenyészeteken. Kimutattuk, hogy a Moesin fehérje a sejtmagi aktinnal kolokalizál és valószínűen az aktin alapú ún, orsómátrix alkotóeleme. RNS interferencia

módszerrel megmutattuk, hogy a Moesin fehérjének szerepe van az osztódási orsó kialakításában és működésében.

- Két, *oskar* és *TropomiosinII* allélokból álló genetikai interakción alapuló fenotípusos szűrőrendszert hoztunk létre, melyekkel akár recesszív letális fenotípusú, pleiortóp gének ivarsejkialakulásban betöltött szerepe is vizsgálható. A két szűrőrendszer egymás utáni alkalmazásával kémiai mutagenézis kísérletet hajtottunk végre, melyben az *oskar* fenotípusnak enhanszer mutációit, köztük a *Rab11* gén alléljait is azonosítottuk.

-A vezikulatranszportban szereppel bíró Rab GTPáz családba tartozó *Rab11* gén életképes alléljaival megmutattuk, hogy a *Rab11* részt vesz a fejlődő petesejtben a mikrotubulus váz polaritásának kialakításában, és az *oskar* RNS poszterior lokalizációjában.

- Ivarplazmában lokalizált RNS-eket azonosítottunk microarray technikával.

- *In situ* RNS hibridizációs adatbázisokból, publikációkban közölt és saját adatok felhasználásával összeállítottuk a lehető legteljesebb transzkriptómot, ami az ivarsejteket kialakulásuktól az embrionális gonádformálódásig jellemzi.

- Gén specifikus kettős szálú RNS injektálással, valamint automatikus videomikroszkópiával elvégeztük az embrionális ivarsejt transzkriptóm funkcionális analízisét. A fenotípusok részletes jellemzésével, valamint az adatok hierarchikus klaszterezésével a hasonló fenotípus eloszlásuk alapján funkcionális géncsoportokat hoztunk létre. Az egyes géncsoportokba tartozó gének együttes vizsgálatával, a *Drosophila* embrionális ivarsejtek osztódását,

vándorlását, a testi sejtekkel való kapcsolattartását, illetve a gonádformálódás mikéntjét tudjuk majd vizsgálni.

## A jövő feladatai

A genetikai analízis fenotípusok vizsgálatán alapszik, legyen az reverz vagy forward genetikai vizsgálat. A jelenlegi fenotípuselemzés korlátait Ashburner és munkatársai Az ADH genomi régió vizsgálatával kijelölték. A *Drosophila* genomprogram előfutáraként elkészítették a 2,9 Mb kiterjedésű ADH régió génjeinek annotálását, valamint klasszikus mutánsokkal való telítését. Adataik összevetéséből világosan kiderült, hogy a számítógéppel szerkezeti kritériumok alapján annotált géneknek kevesebb, mint fele mutat funkcióvesztéses mutáns fenotípust egyes mutáns kísérletekben. Más szavakkal, a hagyományos mutagenézis kísérleteket végző kutató számára a géneknek fele láthatatlan. A láthatatlan gének minden valószínűség szerint olyan funkciókat kódolnak, melyek redundánsak, az egyedfejlődés szabályozásának robosztusságát, vagy éppen a természetben található változatos külső ingerekre való adekvát válaszok kialakításához kellene. Ezeknek a géneknek funkcionális vizsgálatában a többes mutáns analízis, finomabb, molekuláris szintű fenotípusok detektálása, illetve a fenotípusoknak változatos körülmények között való megfigyelése segíthet. A három gén alléljával érzékenyített genetikai rendszerünkkel (SOT) magunk