MTA Doktori értekezés

Az embrionális ivarsejtfejlődés genetikai vizsgálata Drosophila melanogasterben

Erdélyi Miklós

Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Központ Genetikai Intézet

Szeged 2010

TARTALOMJEGYZÉK

BEVEZETÉS	3
Az ivarsejtek jelentősége a soksejtű életforma kialakulásában	3
-Az ivarsejt testi sejt munkamegosztás megjelenése	
felgyorsítja a soksejtű életforma evolúcióját	4
-Élő kövületek mutatják meg a valódi soksejtű életforma	
kialakulásának módját	5
Az ivarsejtek életciklusa fejlett soksejtűekben	6
-Az ivarsejtciklus eseményei Drosophilában	7
-A peteképződés folyamata Drosophilában	11
-Az ivarsejt-testi sejt elkülönülés az egyedfejlődés során	11
,	13
CÉLKITŰZÉS	17
EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK	17
Az ivarsejtdifferenciáció klasszikus genetikai vizsgálata	17
-Anyai hatású ivarsejthiányos mutációk azonosítása P elem	
mutagenezissel	17
-Anyai hatású ivarsejthiányos mutációk azonosítása Hobo	
transzpozonos mutagenezissel	26
-Anyai hatású ivarsejthiányos mutációk azonosítása	
géncsapdázó transzpozon mutagenezissel	31
-A hagyományos genetikai megközelítés tanulságai	41
-lvarsejthiányos mutációk izolálása mozaik technikával; egy	
sikertelen kísérlet összefoglalása	43
Az ivarsejtdifferenciáció vizsgálata genetikai interakción	
alapulómutánsizolálási rendszerekkel	45
-A genetikai interakciós rendszerek elve	45
-Anyai hatású ivarsejthiányos mutációk azonosítása két gén	
alléljaival érzékenyített genetikai interakción alapuló	
mutánsizolálási rendszerrel	48
-Anyai hatású ivarsejthiányos mutációk azonosítása három g	gén
alléljaíval érzékenyített genetikai interakción alapuló	
mutánsizolálási rendszerrel	53
Az ivarsejtdífferenciáció reverz genetikai vizsgálata	58
-Reverz genetikai vízsgálataink előzményei	58
-Ivarplazmában lokalizált RNS-ek keresése microarray	
technikával	60
-Embrionális ivarsejttranszkriptóm összeállítása	63
-Az RNS interferencia a nagyléptékű reverz genetikai	
kisérletek alkalmas eszköze	64
-Az ivarsejttranszkriptóm funkcionális analízise RNS	
	65
ANYAGOK ES MODSZEREK	72
OSSZEFOGLALAS	88
A dolgozatban összefoglalt föbb eredmények	88
	92
	94
	101
KUSZUNETNYILVANITAS	104

BEVEZETÉS

Az ivarsejtek jelentősége soksejtű életforma kialakulásában

A földi élet egyik legjelentősebb eseménye minden bizonnyal a soksejtű létforma megjelenése volt. Erről a jelentős evolúciós történésről valódi fosszíliák hiányában csupán a mai élőlények vizsgálatából következtethetünk. A terület szakértői egyes ma élő egysejtűek és a különféle soksejtű élőlénycsoportok genomjai között meggyőző hasonlóságot mutattak ki. Az ilyen fajta összehasonlításokból bizonyosra vehető, hogy az evolúció során a soksejtűvé válás többször is lejátszódott, ami az állati, növényi, alga és soksejtű gomba életformák független kialakulását eredményezte (Kaiser 2001). A soksejtűvé válás a minden tekintetben egyenrangú sejtekből álló egyszerű társulások kialakulásával kezdődhetett melyeket a csoport létből adódó szelekciós előnyök terjesztettek el. Könnyen belátható, hogy a kolónia megnövekedett mérete már önmagában is szelekciós előnyöket biztosíthat a ragadozók elleni védekezés, a tápanyag hasznosítás, vagy éppen a kiszáradás elleni védelem tekintetében. Csoportos létformára a mai baktériumok is képesek, ún. biofilmeket képezhetnek (1 ábra).

1. ábra Az Escherichia coli biofilm életciklusa. 1. А baktériumok szabadon élő hordozó felületre tapadnak. 2, tapadást elősegítő majd sejten kívüli állományt fejlesztenek. 3,4, Létrejön a biofilm amely érése során sajátságos alakot vesz fel, és belső testfelépítést alakít ki. 5, A biofilmet alkotó baktériumok osztódása során újra szabadon élő baktériumok jönnek létre, melyek alkalmas környezetben újabb biofilmet fejleszthetnek ki(Kaiser 2001).



A ma élő biofilmek jóval többek, mint egyszerű sejthalmazok. Megjelenik például bennük a sejten kívüli szerkezeti anyag (extacelluláris mátrix) ami a valódi soksejtűekre kivétel nélkül jellemző. A biofilmben élő baktériumok jelátadó rendszerekkel tartják egymás között a kapcsolatot, csakúgy, mint a soksejtűek sejtjei. A biofilmek belső folyadékcsatornákat fejleszthetnek, melyek tápanyagfelvevő pórusokban végződnek. Ezek a képletek egy kis képzelőerővel rokoníthatók a soksejtűek szállító rendszereihez. És végül, a biofilmeket saját elkülönült sorssal rendelkező egyedi létezőnek tekinthetjük, melyeknek élete térben és időben véges, hasonlatosan a soksejtű egyedekéhez. A biofilmeket azonban egy lényeges evolúciós találmány hiánya élesen elválasztja a soksejtűek világától. Ez a találmány pedig az ivarsejt-testi sejt munkamegosztás.

Az ivarsejt-testi sejt munkamegosztás megjelenése felgyorsítja a soksejtű életforma evolúcióját

Az élőlények életrevalóságát (fitneszét), legyenek azok baktériumok, biofilmek vagy valódi soksejtes élőlények, két tényezőnek, a túlélésnek és a szaporodás képességének egyensúlya határozza meg. A biofilm egyed több, eltérő genetikai állományú baktériumból alakul ki, melyek mindannyian megőrzik szaporodási képességüket, tehát a biofilm egészének életrevalósága az őt alkotó baktériumok életrevalóságának összességétől függ. Könnyen belátható, azonban, hogy az egyed egészére értelmezhető életrevalóság ellentétben is állhat az őt kialakító egyes baktériumokéval. Az egyed túlélését ugyanis növelné, ha testét alkotó baktériumok egyike-másika közösségi szerepek ellátására szakosodna. akár saját szaporodóképessége rovására. Ez azonban csak nagyon korlátozottan valósulhat meg, mivel az ilyen önfeláldozó baktérium szaporodási esélye csökkenne, ezáltal az

önfeláldozást lehetővé tevő genotípus szelekciós hátrányba kerülne. A biofilm egyed túlélése és a baktériumok szaporodási képessége, mint két érdek között meglévő ellentét miatt a baktériumtársulások, vagy a hozzájuk hasonló egyszerű soksejtű szervezetek evolúciója nagyon lassú.

Élő kövületek mutatják meg a valódi soksejtű életforma kialakulásának módját

A valódi soksejtes élőlények sejtjei között, a biofilmekkel ellentétben, a túlélés és a szaporodás dolgában sajátságos munkamegosztás alakult ki. Az ivarsejtek a szaporodást szolgálják, a testi sejtek pedig a közösségi feladatok ellátásával az egyed egészének túlélését biztosítják (Wolpert és Szathmáry 2002). Hogyan alakultak ki a ma élő magasabb rendű soksejtűek, nem tudjuk, azonban az ivarsejttesti sejt elkülönülés evolúciójának valószínű lépéseire a ma élő Volvocidae fajok összehasonlításából következtethetünk (Herron és mtsai. 2009). Az összehasonlítás a valódi többsejtű élőlények kialakulásának két elkülönült lépését valószínűsíti. Először egyszerű, sejt közötti állománnyal összetartott, egyenértékű sejtekből álló társulások jönnek létre, majd megtörténik az ivarsejtek és a testi sejtek elkülönülése (2 ábra).

2. ábra A Volvocidae ostoros fotoszintetizáló algacsalád tagjai

Átmenetet figyelhető meg az A, egysejtű, B,C sejtdifferenciációt nem mutató többsejtű, valamint D,E,F a nagy belső szaporodó és a kicsi külső, steril testi sejtekből álló soksejtes életformák között. A, Chlamydomonas reinhardtii; B, Gonium pectorale; C, Eudorina



elegans; D, Pleodorina californica; E, Volvox carteri; F, Volvox aureus (Michod és mtsai. 2006).

Mivel a fejlett soksejtű szervezetek összes sejtje egyetlen sejtből, ivaros szaporodás esetén a megtermékenyített petesejtből származik, a testi és ivarsejtek azonos genotípussal rendelkeznek. Ennek következtében a testi sejtek önzetlen működését lehetővé tevő gének nem szenvednek szelekciós hátrányt, hiszen az ivarsejteken keresztül átadódhatnak az utódokba. Az ivarsejtek kialakulása a soksejtű szervezetek testfelépítésének gyors evolúcióját indította el. A fejlődés iránya egyértelmű, az egyedek egyre nagyobb és bonyolultabb működésű testet fejlesztettek. Létrejött a csodálatosan változatos testi felépítést mutató soksejtű élővilág. Az ivarsejtek, pedig folytatták a testen belüli generációkon átívelő, a fennmaradást szolgáló, rejtett életüket.

Az ivarsejtek életciklusa fejlett soksejtűekben

A soksejtű szervezetek egyedi, elkülönült élete múlandó, az embrió kialakulásától az egyed haláláig tart. A faj fennmaradását az ivarsejtek megszakítás nélküli leszármazási sora biztosítja. A Volvox fajokban, és feltehetően a százmillió évvel ezelőtt élő őseinkben is, az ivarsejtek a még szabadon élő egysejtű ősökre emlékeztetnek, tömegük és számuk pedig összemérhető a testi sejtekével. Az ilyen alacsony fejlettségi fokon álló szervezetek ivarsejtjei az egyedfejlődés során egyszerű életciklust írnak le, melynek során a testi sejtek bizonyos védelmi szerepükön kívül csak kevéssé hatnak az ivarsejtekre. A fejlett soksejtűekben azonban az ivarsejt-testi sejt arány az utóbbi javára végletesen eltolódik. Az ivarsejtek maguk is több fejlődési állapoton átívelő, ún. ivarsejtciklust járnak be melynek lépései a testi sejtekkel szoros együttélésben zajlanak le, ahol a testi sejtek változó környezetet niche-t biztosítanak (3.ábra).



3. ábra A Drosophila melanogaster ivarsejtciklusa Hartenstein nyomán

Az ivarsejtek elhelyezkedését piros körök jelzik. (A) Drosophila pete a jellegzetes háti függelékekkel. B, A korai embrió poszterior pólusán a testi sejteknél nagyobb, 15-40 gömb alakú embrionális ivarsejt jelenik meg. C, Az embrionális ivarsejtek passzív mozgással a középbél hátulsó részének betüremkedésében a bél lumenébe jutnak. D Az embrionális ivarsejtek áttörnek a bélfalon, majd E, jobb és bal oldali csoportra oszolva kapcsolatba lépnek az embrionális ivarsejtek gömb alakú embrionális gonádokat hoznak létre. Az embrionális élet során az ivarsejtek átlagosan kétszer osztódnak. G,H, A lárva és báb fejlődési szakaszokban az ivarsejtek egyenlőtlen sejtosztódásba kezdenek, differenciálatlan ivarsejtek, valamint hímekben elsődleges spermatociták és a cisztoblasztok spermiumokká és petékké érnek, a differenciálatlan ivarsejtek sztemsejtekként működnek,egyenlőtlen osztódás révén spermatociták és cisztoblasztok tömegét állítják elő, melyekből nagyszámú spermium és pete keletkezik.

Az ivarsejtciklus eseményei Drosophilában

A testi sejtek, valamint az ivarsejtek különbözősége már e két sejttípus cellularizációjának mikéntjében is megnyilvánul. Az ivarsejtek a pete kérgi részében

lévő sejtmagok osztódásakor keletkező, "pole bud"-oknak nevezett citoplazma kitüremkedések lefűződésével, egyenként alakulnak ki. A tucatnyi gömb alakú sejt egymással csupán laza kapcsolatot alakít ki, melynek eredménye az embrió poszterior végén lévő félhold alakú sejtcsomó. A testi sejtek ezzel ellentétben a pete sejthártyájának magok közé való betüremkedésével különülnek el egymástól. A cellularizációnak ez utóbbi formája szorosan kapcsolódó oszlopos sejtekből álló folytonos, egy sejtrétegű blasztodermát alakít ki úgy, hogy az ivarsejtek a balsztodermából kizárva, annak külső felszínén helyezkednek el. A kétféle cellularizáció típus mögött meghúzódó mechanikai különbségekről, illetve a folyamatokat irányító molekuláris különbségekről szinte semmit nem tudunk.

Az ivarsejtek laza csomója a gasztruláció során, a középbéli betüremkedésen keresztül az embrió belsejébe jut. A legutóbbi megfigyeléseink e folyamat során az ivarsejtcsomó aktív mozgását valószínűsítik. Megoldatlan rejtély, hogyan valósul meg az ivarsejtek összetapadása és koordinált mozgása, ugyanis mindezidáig egyetlen, az ivarsejtek közötti jelátadást, illetve a sejtek mechanikai kapcsolatát lehetővé tevő molekulát nem találtak.

A középbél lumenében az ivarsejtcsomó felbomlik. Az ivarsejtek egyenként a bélfal sejt közötti állományát áttörve a bél lumenéből a testüregbe jutnak, ahol a negyediktől a hetedik potrohszelvény jobb és baloldali viszcerális mezodermájához vándorolnak (Kunwar és mtsai. 2008). A vándorlást irányító csalogató és taszító jelek molekuláris természete részben ismert (Renault és Lehmann 2006). Az ivarsejtek, valamint az ivarsejtekkel kapcsolatba lépő viszcerális mezoderma sejtek az ötödik potrohszelvény területére vándorolnak, létrehozva a jobb és bal oldali gömb alakú embrionális gonádot. Az ivarsejtvándorlás során célt tévesztett, a

gonádformálódás területét el nem érő ivarsejtek programozott sejthalállal eliminálódnak (Yamada és mtsai. 2008).

Az ivarsejtek az embrionális gonád megformálása után, a lárvális fejlődés folyamán mutatják az első szex specifikus jellegeket. A két nem közötti különbség egyik legszembetűnőbb vonása, hogy a nőstény gonádokban az ivarsejtek a bábállapotig csupán cisztoblasztokat képeznek, míg a hím gonádokban a fejlődés tovább megy a ciszták képzése a második lárva stádiumban már beindul.

Az ivarsejtek szex determinációjáról igen keveset tudunk. Annyi azonban bizonyos, hogy az ivarsejtek nem meghatározása lényegileg különbözik a testi sejtekétől (Salz és Erickson 2010). A sex lethal-nek, a szomatikus szex meghatározás mestergénjének hiánya vagy túltermelése a testi sejtekben azok nemének teljes megváltozásához vezet. Ezzel ellentétben a sex lethal gén hiánya vagy túltermelése az ivarsejtekben nem változtatja meg az ivarsejtek nemét. Nemek közötti ivarsejt transzplantációs kísérletek eredményei pedig arra utalnak, hogy az ivarsejt szex determináció, a szómától eltérően, nem sejt autonóm módon, hanem a testi környezet indukciója révén megy végbe. A testi sejtek induktív hatásának bizonyítéka, hogy XX genotípusú ivarsejtek hím testi környezetben hím ivarsejtként, XY genotípusú ivarsejtek nőstény testi környezetben maguk is nőstény ivarsejtként kezdenek viselkedni (Staab és mtsai. 1996). Míg a hím testi sejtek indukciója ismert módon a JAK/STAT jelátviteli úton valósul meg, addig a nőstény testi sejtek és ivarsejtek közötti indukció mikéntje még nem ismert, csak annyi tudott, hogy az embrionális nőstény ivarsejtek a máig ismeretlen testi jel hatására kifejezik az Otu nőstény specifikus fehérjét (Casper és Van Doren 2009).

A megfelelően összehangolt szex determinációjú testi és ivarsejtek gonádot alkotnak ahol kölcsönösen szabályozák egymás osztódási képességét és

differenciálódási állapotát (Gilboa és Lehmann 2004; Gilboa és Ruth Lehmann 2006).

A gonádok testi eredetű sejtjei nemre jellemző differenciálódáson mennek át. A végeredmény egy specializált szomatikus térrészlet, a nish, amely a sztemsejt jellegű ősivarsejtek fenntartásáért felelős, valamint a peték és spermiumok kialakításában is részt vesz (4 ábra). Megjegyzendő, hogy az felnőtt ivarsejt nish-ek a nőstények esetében a bábozódás során, a hímekben a második lárvastádiumban már kialakulnak. A Drosophila ősivarsejt nish-ek az élővilág talán legjobban jellemzett nish-ei, mindazonáltal kialakulásuk mikéntje, az őket alkotó sejtek differenciálódása, valamint az ivarsejtek és testi sejtek kölcsönös szabályozási lépéseinek sok részlete feltárásra vár (Kirilly és Xie 2007).



4. ábra Ivarsejt sztemsejteket fenntartó nish-ek szerkezete a Drosophila felnőtt nőstény és hím gonádban A, a nőstény ivarsejt sztemsejt (GSC) nish-t fenntartó testi eredetű sejtek a terminális filament

sejtek (TF), a cap sejtek (CpC), az inner germarium sheath (IGS) sejtek. Az ivarsejt sztemsejtek egyenlőtlenül osztódnak, a cap sejtekkel kapcsolatban maradt leánysejtek szetm sejtek maradnak, míg az inner germarium sheath sejtekkel kapcsolatba levő leánysejtek cisztoblaszttá, differenciálódnak, melyek további osztódás után a pete ivarsejt eredetű részét, a pirossal jelzett elágazó struktúrát az ún, fusome-okat tartalmazó cisztát alakítják ki. B, a hím ivarsejt sztemsejt (GSC) nish-t fenntartó testi eredetű sejtek a hub sjtek (HUB), a cyst progenitor sejtek (CP), és ciszta sejtek (Cyst cells). A hím ivarsejt sztemsejt egyenlőtlenül osztódnak, a hub sejtekkel kapcsolatban maradt sejtek megőrzik sztemsejt jellegüket, míg a ciszta sejtekkel kapcsolatba lépő sejtek gonioblasztokká alakulnak és a ciszta irányú differenciálódás útjára lépnek (Decotto és Spradling 2005).

A peteképződés folyamata Drosophilában

A nőstény ivarsejt sztemsejtek osztódása során létrejött leánysejtek közül azok, melyek elvesztik fizikai kapcsolatukat a sztemsejt fenntartó nish-sel cisztoblasztokká alakulnak, és megkezdik a pete kialakítását. A cisztoblaszok négy osztódás után tizenhat sejtes cisztát hoznak létre, melyből egy sejt petesejtté, 15 pedig dajkasejtté differenciálódik. Az így képződő petekezdeményt testi eredetű follikuláris sejtek burkolják (5. ábra). A petekezdemény fejlődése során a dajkasejtek minden anyagukat a petesejtsejt táplálására fordítják és a peteburkot kialakító follikuláris sejtekhez hasonlóan a folyamat végére elpusztulnak (King 1970). A petében tárolt anyai öröklődésű faktorok, a későbben ismertetett funkciójú *oskar* RNS is, a dajkasejtek terméke. Az érett petét egyetlen élő sejt, a petesejt alkotja, mely a megtermékenyítés után egy új egyed összes sejtjét létrehozza; egy új soksejtű élet kezdődik el.

5. ábra A peteképződés folyamata Drosohilában

1-11 stdiumú petekezde-mények vázlatos rajza. D, dajka sejt; P, petesejt; F follikuláris sejt



Az ivarsejt-testi sejt elkülönülés az egyedfejlődés során

Az ivarsejt-testi sejt elkülönülés ideje egyes élőlénycsoportok esetében lényeges különbségeket mutat. Növényeknél, gombáknál, az elválás az egész élet folyamán

bekövetkezhet. A növényekben például a meriszéma az egyedfejlődés bármelyik szakában szaporító szerveket, benne ivarsejteket képezhet. A vegetatív szaporodással pl. bújtatással létrejött növények magot hozhatnak. Az állatoknál is megvannak a merisztémának megfelelő sejttípusok az ún. sztemsejtek. A növényi sztemsejtekhez hasonlóan egyenlőtlen osztódással önmagukhoz hasonló, differenciálatlan, illetve különféle fejlődési irányokat követő sejteket hoznak létre. Az embrionális sztemsejtekből alakul ki az egyedet alkotó összes sejttípus beleértve az ivarsejteket is, ez azonban az állatvilágban, a növényekkel ellentétben, rendszerint az egyedfejlődésnek fajra jellemző, meghatározott időpontjában történik meg.

Az ivarsejt testi sejt fejlődési irányok szétválásának ideje, az egyes állatcsoportokban is igen különböző lehet. Kisebbségben ugyan, de léteznek olyan állattörzsek is pl. szivacsok, melyekben ivarsejtképzés a növényekhez hasonlóan felnőtt sztem sejtekből is történhet (Denis és Lacroix 1993). Az állattörzsek zömében azonban az ivarsejtek differenciálódása az embriogenezis ideje alatt megkezdődik. Az ivarsejt kialakulásnak két típusát szokás megkülönböztetni. Az induktív ivarsejtfejlődés a testi sejtekből jövő indukáló faktorok hatására, rendszerint az egyedfejlődés kései időszakában indul meg (Extavour 2007). Ilyen fejlődési utat járnak be a madarak és az emlősök. Ezzel szemben a preformáció elve alapján differenciálódó ivarsejtek esetében, amikor is az új generáció ivarsejtjei a petében már meglévő anyai hatású faktorok hatására alakulnak ki, a ivarsejt-testi sejt elkülönülés az embriogenezis legkorábbi szakaszában lezajlik.

Drosophila melanogasterben az ivarsejt determináció preformáció útján valósul meg. Az ivarsejtek determinációjáért a Drosophila pete leghátsó citoplazma részlete az ún. ivarplazma a felelős (Strome és Lehmann 2007). Az ivarplazma ivarsejt determinációban betöltött kizárólagos szerepét egyszerű embriológiai

kísérlettel igazolták. Az érett Drosophila pete citoplazmjának leghátsó részéből, az ivarsejtek kialakulásának helyéről, mintát vettek, majd azt egy másik embrió elülső részébe injektálták (Illmensee és Mahowald 1974). A citoplazma beültetetés helyén funkcionális ivarsejtek alakultak ki. Mindez azt bizonyította, hogy az ivarsejt kialakulás helyén lévő citoplazma, az ivarplazma minden elemet tartalmaz, ami az ivarsejt irányú differenciálódás megindításához szükséges. Ezzel a felismeréssel az Drosophila ivarplazma a ivarsejt-testi sejt elválás kutatásának nagyszerű kísérleti objektuma lett. A pete többi részétől elkülönült ivarplazma szerkezetének és működésmódjának megismerése elvezethet bennünket az ivarsejt irányú differenciálódás megirtéséhez.

A Drosophila ivarplazma biológiája

Az ivarplazma anyagai, peteseit összes anyagával mint a együtt а petekezdeményben, a dajkasejtekben szintetizálódnak, majd a ciszta sejtjeit összekötő csatornákon át szállítódnak peteseitbe. а Az ivarplazma összeszerelődése a petesejt hátsó részén történik meg. Az összeszerelést az elsőként lokalizálódó molekulák az oskar gén termékei irányítják (Ephrussi és mtsai. 1991). Az oskar fehérje kulcsszerepét az bizonyítja, hogy ha azt ektopikusan lokalizáljuk, ektopikus ivarsejteket kapunk (Ephrussi és Lehmann 1992). Az oskar gén funkciója tehát az ivarplazma összeszervezése, amit koncentrációfüggő módon végez. Alacsony Oskar fehérje koncentráció kevés ivarplazmát, és ennek következtében kisszámú ivarsejtet eredményez. A vadtípusnál magasabb Oskar fehérje koncentráció ezzel szemben nagyobb számú ivarsejthez vezet. Az oskar génmutációival tehát az ivarplazma mennyiségét egyaránt csökkenthetjük és

növelhetjük. Az Oskar fehérje lokalizációja az *oskar* RNS citoplazmán belüli lokalizációjával és a fehérjének lokális transzlációjával jön létre (Ephrussi és mtsai. 1991). A fehérje lokalizációnak e módja nem kivételes, oocitában, polarizált hámsejtekben, idegsejtekben számos lokalizált RNS forrásról helyben transzlálódó fehérjét írtak le (Lécuyer és mtsai. 2009). Az *oskar* RNS 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 taranszlációs gátlás és végül a petesejt hátulsó részén való helyben tartás (6. ábra).



6. ábra Az oskar RNS lokalizációját, helyspecifikus transzlációjáért felelős összetett sejtbiológiai folyamatsor összefoglalása

Magyarázat a szövegben. Pirossal jelöltem azokat a géneket, melyeket ebben a dolgozatban tárgyalt kísérletek során helyeztünk el az *oskar* lokalizációt irányító génhierarchiában.

Az oskar RNS lokalizációját irányító gének közül jó néhányat már ismerünk (Mahowald 2001). Ezekről a génekről egytől egyig kiderült, hogy nem ivarplazma specifikusak, általános sejtbiológiai funkciót látnak el, más szóval pleiotrópok. Az oskar géntermék által az ivarplazmában lokalizált faktorokból is ismerünk néhányat (tudor, vasa, valois, nanos, germcell-less, small mt rRNS, large mt rRNS). Ezek közül az nanosról és a vasaról kiderült, hogy kifejeződésük ivarsejt specifikus. Mind a két gén meghatározó szerepű az embrionális ivarsejtek kialakulásában. A nanos CCHC-cink kötő domént tartalmazó RNS-kötő fehérje, transzlációs regulátor és szerepe van mind a nőstény ősivarsejt, mind az embrionális ivarsejtsors kialaulásában és fenntartásában (Kobayashi és mtsai. 1996). A Vasa fehérje egy helikáz, amely az nuage-nak nevezett magkörüli ivarsejtspecifikus RNS sejtorganellumban található meg. Figyelemre méltó, hogy ez a két gén más fajokban is ivarsejtspecifikusan expresszálódik (Raz 2000). Úgy látszik, hogy újabb ivarsejtspecifikus transzkriptumok azonosításával további kulcsfontosságú, esetleg evolúciósan konzervált ivarsejtfaktorokat lehet még azonosítani.

Az ivarplazmában tárolt anyai faktorok száma az eddig megismertnél jóval nagyobb kell legyen. Ugyanis, az embrionális ivarsejtek kezdeti transzkripciós aktivitása nagyon alacsony és az embrionális gonád formálódásig az is marad (Leatherman és Jongens 2003). A korai ivarsejtfejlődés fontos mozzanatait, mint a középbél sejtjeivel való vándorlást vagy két sejtosztódási ciklus végrehajtását, majd a kialakult bélfalon való áttörést jórészt az ivarplazmában tárolt anyai géntermékek irányítják. A géntermékek magas számát a Drosophila Genom Program egyik kapcsolódó kísérletsorozata, a szisztematikus RNS *in situ* hibridizációs program is megerősíti. A kísérletsorozatban nagyszámú gén expressziós mintázatát határozták meg embriókban (Tomancak és mtsai. 2002; Lécuyer és mtsai. 2007). Adataik

szerint a frissen lerakott peték az ivarplazma területén nagyszámú RNS féleséget tartalmaznak. Ez azt jelenti, hogy az ivarplazma az ivarsejtek életében fontos, mindezidáig ismeretlen szerepű géntermékek valóságos tárháza.

dc_39_10

CÉLKITŰZÉS

Ahogyan az evolúció során többször megtörtént, a sejtkolóniákban élő egyszerű soksejtű organizmusokban elválik az ivar és a testi sejt szerep, a szétválás minden ma élő soksejtű egyedfejlődése során bekövetkezik. Az elmúlt években az ivarsejtek egyedfejlődés során való differenciálódásával foglalkoztam, különös tekintettel az ivarsejt-testi sejt elválás folyamatára. Munkámat az ivarsejtkutatás egyik legfontosabb modellorganizmusában a *Drosophila melanogaste*ren, ecetmuslicán végeztem. Dolgozatom az ebben a témakörben végzett tevékenységemet foglalja össze.

EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

Az ivarsejtdifferenciáció klasszikus genetikai vizsgálata

Anyai hatású ivarsejthiányos mutációk azonosítása P elem mutagenezissel

August Weismann az ivarplazmát, több mint száz évvel ezelőtt, kétszárnyú embrióban írta le, ezzel a legyeket, köztük a *Drosophila melanogastert* az ivarsejtkutatás legfőbb modellszervezetévé tette. A felfedezés óta eltelt évszázad során a Drosophila az egyik legalkalmasabb genetikai modellszervezetté vált. Kézenfekvőnek tűnt tehát, hogy az ivarplazma biológiáját genetikai eszközökkel vizsgáljuk. A klasszikus genetikai analízis logikáját követve az ivarplazma biológiájában szerepet játszó géneket ivarplazma hiányra utaló fenotípussal rendelkező mutációikkal azonosítottunk. Mivel az ivarplazma összetevői anyai

eredetűek, anyai hatású ivarsejt hiányos fenotípusra kellett szűrnünk, azaz homozigóta mutáns nőstények utódai között kellett ivarsejthiányos fenotípusúakat keresni. Később, a fenotípussal azonosított géneket kódoló DNS szakaszokat megkerestük, majd a DNS bázissorrendjéből, ha lehetett a gén molekuláris szerepére következtettünk, végül mindezek alapján igyekeztünk az adott fenotípust a molekulák szintjén vizsgálni.

Az anyai hatású ivarsejthiányos mutációk izolálását 1994-ben kezdtem el. Abban az időben a Drosophila Genom Program előkészítő szakaszát éltük, amikor is az egyik fő cél a genomnak P transzpozon indukált mutációkkal történő lehető legtökéletesebb telítése volt. A mintegy ötven családba sorolható Drosophila transzpozonok között akkoriban a P elem egyeduralkodó mutagenezis eszköz volt. A P transzpozonon alapuló mutánsizolálási rendszer egyedülálló tulajdonsága volt ugyanis, hogy az önállóan ugrani képtelen mutátor transzpozonokat a genom más részén elhelyezkedő P elem specifikus transzpozázforrással lehetett mozgatni (7. ábra).



7. ábra A P elem alapú bináris transzpozonrendszer szerkezeti vázlata

A, a PlacW mutátor elem ampicillin (AmpR) rezisztencia gént, bakteriális replikációs origót (ori) és két Drosophilában működő markergént, a *white* és a *LacZ* gént hordozza a P transzpozon fordított ismétlődő szekvenciái közözött (zöld háromszög). (Bier és mtsai. 1989) A, a PlacW elem transzpozáz forrást nem tartalmaz, így önmagában transzpozícióra képtelen. B, a ∆2-3 99B nevű transzhatású mobilizáló elem a P transzpozázt kódoló gént valamint a *rosy* Drosophilában szelektálható markergént hordozza deléciót szenvedett P elem fordított ismétlődő szekvenciák között. (Robertson és mtsai. 1988) A mobilizáló elem maga transzpozícióra képtelen, de transz hatású aktív transzpozázt termel és nagy hatékonysággal mobilizálja a PlacW mutátor elemet.

A transzpozázforrás szegregációval történő eltávolításával stabil mutáns vonalakat lehetett létrehozni. A mutátor elem mozgásának követését alkalmas markergén tette lehetővé, és végül a mutációt szenvedett gén molekuláris klónozását bakteriláis replikációs origó és baktérium rezisztencia gén segítette.

Akkoriban 3500 P elem inszerciós mutáns vonal létezett, amiből 700, jórészt homozigóta letális vonalat lehetett a törzsgyűjteményekből megszerezni (Spradling és mtsai. 1995). Mivel az anyai hatású ivarsejt hiányos mutációk azonosítása homozigóta életképes vonalak vizsgálatát igényelte elhatároztam, hogy nagyszámú életképes P elemes inszerciót állítok elő, és vizsgálom meg őket ivarsejthiányos fenotípusra. Sipos Lászlóval létrehoztunk egyerre a feladatra alkalmas automatikus szelekciós rendszert (Vilmos és mtsai. 2007; 8. ábra).



8. ábra Automatikus szelekciós rendszer nagyszámú életképes autoszómális mutáció homozígótává tételére

А mutagenizált autoszómákat (*) hordozó egyedi hímeket egy Domináns marker mutációval (Ubx) ellátott 2-3-as transzlokációs kromoszómához keresztezzük, ezzel a két nagy autoszómát a későbbiekben egy szegregációs egységként kezelhetjük. A transzlokációt és a mutagenizált kromoszómákat hordozó utódokat az

automatikus szelekciós rendszer kulcselemével, a domináns meleg- (*DTS513*) és hideg érzékeny (*Ketel^{DCS}*) mutációkat egyaránt tartalmazó segédtörzzsel keresztezzük. A segédtörzs életképességét alacsony hőmérsékleten a domináns hideg érzékeny allél transzhelyzetű szupresszora (*Su of DTS*) biztosítja. A következő generációt alacsony hőmérsékleten nevelve a homozigóta *Ubx*, valamint a *Ketel^{DCS}* kromoszómát hordozó egyedek életképtelensége miatt csak a mutagenizált kromoszómákat, valamint a meleg érzékeny *DTS513* allélt hordozó transzlokációs balanszerkromoszómára heterozigóta hímek és nőstények kelnek ki. Az ilyen utódok magas hőmérsékleten való *inter se* keresztezése kizárólag a mutagenizált második és harmadik kromoszómára homozigóta egyedeket eredményez. Az automatikus szelekciót lehetővé tevő *Ketel^{DCS}* allélt, annak szupresszorát, illetve a DTS szupresszort tartlamazó transzlokációs balanszerkormoszómát korábbi munkám során magam állítottam elő (Szabad és mtsai. 1989)

Ezt a rendszert felhasználva Anne Ephrussi laboratóriumában 44000 életképes, 6000 letális, 500 steril *PlacW* inszerciót hoztunk létre. 44000 életképes vonalat alapítottunk meg, amiből az automatikus szelekciós eljárás segítségével 35000-t ivarsejthiányos fenotípusra szűrtük.

A P elemes mutánsizolálási kísérletben új típusú *osk* allélt sikerült azonosítanunk (Jenny és mtsai. 2006). Az újonnan izolált *oskar¹⁸⁷* allél RNS hipomorf allélnak bizonyult. Kimutattuk, hogy a korábban ismert *oskar* allélokkal ellentétben, melyek a mutációk az RNS szintet nem befolyásolták, az *oskar¹⁸⁷* allélról csökkent mértékben kifejeződik ki RNS (9.ábra).

9. ábra Az oskar¹⁸⁷ homozigóta petekezdemé-nyek csökkent mértékben fejezik ki az oskar RNS-t

Az oskar RNS-t fluoreszcens in situ hibridizációs techniká-val tettük láthatóvá. A, vad típusban a fehér fluoreszcens jel magas oskar RNS koncentrációt jelez a petekezdemény



poszterior részét alkotó petesejtben, míg a dajkasejtekben a politén óriás sejtmagok körül mutatkozik alacsony szintű *oskar* RNS-re utaló jel. B, az *oskar*¹⁸⁷ homozigóta mutáns petekezdeményben a vadtípushoz képest a hibridizáció alacsonyabb szintű *oskar* RNS mutat a fejlődő petesejtben.

Az *oskar*¹⁸⁷ allél segítségével új *oskar* fenotípust tudtunk kimutatni. A részletes fenotípus jellemzés megmutatta, hogy az *oskar* RNS hiányában a petefejlődés idő előtt megáll, a homozigóta nőstények nem raknak petéket. (10. ábra).



10. ábra Az oskar RNS-t csökkent mértékben kifejező osk¹⁸⁷ mutáns allél homozígóta fenotípusa

A, B, vad típusú petekezdemények fejlődési sora interferenciakontraszt mikroszkóp alatt. C,D, azonos korú *oskar*¹⁸⁷ homozigóta petekezdemények. A petefejlődés nyolcadik stádiumában az *oskar*¹⁸⁷

homozigóta petekezdemények (D) fejlődése megáll, az oskar¹⁸⁷ nőstények sterilek, nem raknak petéket.

Mivel az Oskar fehérje hiánya tudottan nem jár Mivel az oskar fehérje null allélek nem okoznak petefejlődési zavarokat (Ephrussi és mtsai. 1991) feltételeztük, és alkalmas transzgenikus kísérletekkel bizonyítottuk, hogy *oskar* génről íródó RNS molekulának transzlációtól független szerepe van az ivarsejtfejlődésben (11.ábra).



11. ábra Oskar kiméra transzgénekről íródó érett mRNS-ek szerkezete, melyek segítségével bizonyítottuk, hogy az *oskar* RNS transzlációtól független funkcióját az ivarsejtfejődésben

Az oskar mRNS két transzlációs starthelyét megtört nyilak, a függőleges osztások az exonok határvonalát jelzik. Fehér vastag vonal az oskar kódoló, a fekete vonalak pedig a nem kódoló 3' régiót (3'NTR) jelzik. A vonalkázott és szürke vonalak idegen génekből származó szakaszokat jelölnek. A fekete pöttyök kis lábbal a lánckezdő metionin miszensz mutációit, a fekete pöttyök nonszensz mutációkat, a csillagok frame-shift mutációkat, az Omega jel inszerciót jelez. A transzgének közül azok és csak azok komplementálták az osk¹⁸⁷ hipomorf allél petehiányos fenotípusát, melyek az oskar mRNS-nek az ábrán feketével jelzett 3' nem transzlálódó régióját tartalmazták. Igaz ez az M1M2lacZwt transzgénre is, ahol az oskar mRNS kódoló szakaszának nagyrészét bakteriális génnel lacZ-vel helyettesítettük. A kódoló szakaszban elhelyezett miszensz, nonszensz, frameshit és inszerciós mutációk az Ooskar fehérje termelését teljesen meggátolták, de az oskar mRNS transzlációtól független funkcióját nem befolyásolták. A kódoló részben mutációkat hordozó transzgének (M1L,M1,39L,54,84,366, mM1mM2stop mM1SMI2) menekítették az oskar⁴⁸⁷ RNS hipomorf allél fenotípusát. Mindez azt jelenti, hogy az oskar mRNS transzlációtól független funkciója van, melyért a transzkriptum 3' nem kódoló szakasza a felelős.

A fennebb összefoglalt kísérletek két új ismeretet eredményeztek: egyfelől bebizonyosodott, hogy az mRNS-ek nem transzlálódó szakaszainak a transzkriptumok stabilizálásán, illetve a lokalizációján kívül egyéb, feltehetően szerkezeti funkciója is lehet. Az oskar mRNS ugyanis a dajkasejtekből a petesejtbe illetve a petesejten belül nagy ribonukleo-protein partikulumokban (RNP) szállítódik. Feltételeztük, hogy ezen RNP-k összeszerelődésében, vagy összetartásában az oskar mRNS 3' nem transzlálódó régiójának mechanikai kötőszerepe lehet. Az oskar mRNS 3' nem transzlálódó régiójának hiánya az oskar RNP-k destabilizációjához, az RNP-ben szállítódó egyéb faktorok delokalizációjához, végeredményben a pete pusztulásához vezet. Ezt a feltételezésünket egy 2009-ben megjelent publikáció alátámasztja, melyben kimutatták, hogy az oskar RNS oligomerizálódásra képes (Mhlanga és mtsai. 2009). Mostani elképzelésünk szerint az oligomerizáció képezné azt a mechanikai kapcsolóerőt, ami az oskar RNP-t kialakítja és összetartja. Ezek a kísérleteink azt is bizonyították, hogy az ivarplazma összeszerelődés kulcs eleme az oskar gén maga is egy pleiotróp funkciójú gén. A korábban ismert anyai hatású ivarsejthiányos fenotípusán kívül a peteképződést leállító steril fenotípusa is van. Az új oskar fenotípus vizsgálata Anne Ephrussi laboratóriumával kooperációban történt. A munka oroszánrészét Závorszky Péter végezte.

A P elemes mutagenezis kísérletben 11 életképes *Tropomyosin II (TmII)* allélt is azonosítottunk (Erdélyi és mtsai. 1995). A *TmII* gén a Drosophila egyetlen citoplazmás tropomiozint (cTm) kódoló génje, melynek terméke a nem izom sejtekben rendszerint a szubkortikális aktin hálózathoz kapcsolódva lelhető fel. A *TmII* allélek 18-98%-os penetranciájú anyai hatású ivarsejthiányos fenotípust mutattak, melyek közül a további részletes vizsgálatokhoz a *TmII^{gs1}* elnevezésű legerősebb fenotípussal jellemezhető allélt választottuk ki. A *TmII^{gs1}* inszerciós

allélből kiindulva P elem remobilizáció technikát alkalmazva vad típusú revertánst, illetve génen belüli részleges deléciós allélt állítottunk elő. A vadtípusú revertáns léte igazolta, hogy az ivarsejthiányos fenotípusért valóban a *Tmll* gén mutációja a felelős. Northern analízissel kimutattuk, hogy mind az eredeti, mind a deléciós allélunk erős hipomorf jelleggel bír (12. ábra).

12 .ábra A Tmll mutánsok Northern analízise

A *Tmll* gén alternatív splicing-gal és alternatív poliadenilációval legalább három transzkriptumot kódol. Felső panel: w^{1118} -as jelű vadtípusú laboratóriumi törzshöz képest az *eredeti P elem* inszerciós *Tmll^{gs1}*, valamint a *Tmll^{eg9}*-es jelű deléciós törzsben a két nagyobb RNS termék erős csökkenést mutat. A *Tmll^{ew1}*, vad típusú revertáns törzsben a cTm transzkriptumok szintje a vad típuséval megegyező. Középső panel: A Drosophila izom típusú *Tropmiozin (mTm)* szintje a mintákban nem mutat változást. Alsó panel: a mintafelvétel pontosságát az rp49-es kontrol RNS szint kimutatásával mutattuk be.



A részletes fenotípus analízis megmutatta, hogy a *Tmll* ivarsejthiányos fenotípusát az *oskar* gén helyspecifikus transzlációjának elmaradása okozza. Megfigyeltük, hogy a *Tmll* homozigóta mutáns nőstények petekezdeményeiben az *oskar* mRNS termelődik ugyan, de nem lokalizálódik a poszterior póluson (13. ábra).



13. ábra *Oskar* RNS *in situ* hibridizáció fejlődő petekezdeményeken

A, vad típusú petekezdemények fejlődési sorában az oskar RNS a dajkasejtekben termelődik, majd aktív transzportfolyamatok révén a petesejt poszterior részén lokalizálódik. B, A *Tmll^{gs1}* petekezdeményekben az oskar RNS termelődik ugyan, a vad típusú petekezdeményekhez hasonlóan a

petesejtbe is bejut, de a vad típusra jellemző poszterior lokalizáció elmarad.

Ennek megfelelően azt vártuk, hogy az Oskar fehérje helyspecifikus transzlációja elmarad. Valóban, a *Tmll* mutáns nőstényektől származó embriók hisztokémiai analízise az Oskar fehérje szintjét a kimutathatóság alattinak mutatta (14. ábra).



14. ábra Az Oskar fehérje kimutatása Tmll mutáns anyától származó embriókban

Az oskar RNS poszterior lokalizációjának elmaradása Oskar fehérje hiányos állapothoz vezet, amit az *Tmll^{gs1}* homozigóta anyáktól származó embriókon mutattunk meg. A, az Oskar fehérje a vadtípusú embriók poszerior részén lefűződő embrionális ivarsejtekben nagy mennyiségben kimutatható. B, A *Tmll^{gs1}* mutáns nőstények utódaiban Oskar fehérje nem mutatható ki. Az Oskar fehérje hiánya ivarsejthiányos fenotípust eredményez. C, Az oskar RNS lokalizációs szignáljának manipulálásával anterior oskar RNS-lokalizációt és transzlációt idéztünk elő. Az ektopikus Oskar fehérje hatására az anterior oldalon, is embrionális ivarsejtek alakultak ki. D, anterior Oskar fehérjét termeltettünk *Tmll^{gs1}* anyától származó embrióban. A Tropomiozin hiány következtében a poszterior oldalon az Oskar fehérje transzlációja elmarad. Az ektopikusan elhelyezkedő oskar RNS transzlációjára Tropomiozin hiánynak nincs hatása, ami azt bizonyítja, hogy a Tropomiozin fehérjére az Oskar fehérje poszterior termelődéséért felelős.

Ezek a vizsgálataink szolgáltatták az elő kísérleti bizonyítékot az aktin sejtváz lehetséges szerepéről az ivarplazmát megalapító *oskar* géntermékek lokalizációban. Az elfogadott modell szerint a vad típusban az *oskar* RNS a petesejt poszterior végébe szállítódik, ahol felszabadulva a transzlációs gátlás alól hely specifikusan transzlálódik (Johnstone és Lasko 2001). A lokálisan termelődött Oskar fehérje kihorgonyzódik a pete szubkortikális aktin vázához, ahol elsőként saját mRNS-ét, köti meg, ami újabb lokalizált fehérje felhalmozódásához vezet. A mutáns fenotípus alapján úgy gondoltuk, hogy a *Tmll* gén terméke, az ismert aktin kötő celluláris

tropomiozin az Oskar fehérjének és RNS-nek petesejt szubkortikális aktin vázához való rögzítésében vesz részt. A *Tmll* génen végzett munkánkkal az aktin váznak az *oskar* RNS lokalizációban betöltött szerepét valószínűsítettük. Újabb eredmények megerősítik akkori feltételezésünket. Anne Ephrussi laboratóriumában kimutatták, hogy a cTm az *oskar* RNS-sel együtt fordul elő az *oskar* RNS-t szállító ribonukleoprotein partikulumokban (Trucco és mtsai. 2009). Elgondolásunk szerint a szállító partikulumokban jelenlevő aktinkötő cTm fehérjék horgonyozhatják ki a poszterior pólusra érkező *oskar* RNS tartalmú partikulumokat. Az aktin váznak az *oskar* termékek, és ennek következtében az ivarplazma lokalizációjában betöltött szerepét később, *Moezin* mutációk segítségével, a Szegedi Biológiai Központban működő laboratóriumomban sikerült végleg bizonyítani.

A P elemes mutagenezis kísérletünk az ivarsejtvizsgálatok terén kettős eredménnyel járt, egyrészt feltárta, hogy a poláris plazma összeszerelődésének kulcs eleme az oskar gén maga is pleiotróp, az ivarplazma összeszerelődésén kívül a petesejt fejlődésének irányításában is van feladata. Másrészt, a P elemes kísérletünk vezetett az aktin váznak az oskar RNS lokalizációban betöltött szerepének felismeréséhez. Mindazonáltal a P elemes mutagenezis eredménye elmaradt várakozásainktól. Dacára annak, hogy mintegy 35000 életképes inszerciót tartalmazó vonalat vizsgáltunk meg, mindössze 30 ivarsejthiányos mutáns vonalat azonosítottunk, amiből mindössze a tizenegy Tmll allél mutatott a későbbi penetranciát. vizsgálatokhoz elegendően magas Α kísérletünk alacsony hatékonyságát részben a P elemek időközben megismert sajátságos ugrási preferenciájával magyarázhatjuk. A Drosophila genomprogram akkorra már ugyanis kiderítette, hogy a genomban P elem inszerciós forró pontok vannak valamint, hogy a P elemek a géneknek csupán mintegy 50 százalékát képesek eltalálni. Kiderült

tehát, hogy a P elemmel, ezzel a kiváló génazonosító eszközzel nem lehet az összes gén funkcióját tisztázni. A Drosophilakutatók érdeklődése új transzpozonok felé fordult. Úgy gondoltuk, hogy új transzpozonok kipróbálásával újabb anyai hatású ivarsejthiányos géneket tudunk azonosítani. Megismételtük tehát a klasszikus genetikai, anyai hatású ivarsejthiányos fenotípusra alapuló kísérletünket egy akkoriban újonnan kifejlesztett hobo transzpozonnal.

Anyai hatású ivarsejthiányos mutációk azonosítása Hobo transzpozonos mutagenezissel

A P elemek hátrányos inszerciós preferenciája új transzpozonok kifejlesztését igényelte. Smith és munkatársai (Smith és mtsai. 1993) vadtípusú hobo transzpozonból a P elemekhez hasonlóan, könnyen kezelhető mutagenezis rendszert fejlesztettek ki (15 ábra).



15. ábra A hobo elem alapú bináris transzpozonrendszer szerkezeti vázlata

A, a HLw2 mutátor elemet úgy hozták létre, hogy a vad típusú hobo elem transzpozáza helyére a Drosophila *white* és *LacZ* szelekciós markergént, illetve egy baktériumban működő rezisztencia gént (kanamicin R) és replikációs origót (ori) helyezték el (Smith és mtsai. 1993). A hobo transzpozon transzpoziciós képességéért felelős fordított ismétlődő szekvenciákat sárga háromszög jelzi. B, a mobilizáló elem (P[ry+, HBLI])szerepét egy a P elem fordított ismétlődő szekvenciák (zöld háromszög) közé épített hobo transzpozázból (H transzpozáz) és a *rosy* markergénből álló transzpozon játssza (Calvi és mtsai. 1991). Ha a két elemet keresztezéssel egy genomba juttatjuk, a transzpozáz forrást kódoló elem hatására a mutátor elem új helyekre inszertálódik. A mobilizáló elemet egy újabb keresztezési lépéssel eltávolítva stabil inszerciókat állíthatunk elő.

Vizsgálataik szerint az új rendszer a P elemekétől eltérő inszerciós preferenciával rendelkezik, így azzal a P elemek által nem azonosítható gének is vizsgálhatóvá válnak. Kiss István munkacsoportja a Drosophila Genomprogram megbízásából rendszeres, nagyléptékű hobo alapú inszerciós mutagenezist hajtott végre az új HLw2 nevű mutátor elemmel. Kiss István az életképes hobo inszerciós vonalakat kutatócsoportom rendelkezésére bocsátotta. A vonalakat Sinka Ritával és Jankovics Ferenccel ivarsejthiányos fenotípusra szűrtük. Összesen hétszáz hobo inszerciót hordozó vonalból homozigóta nőstényeket válogattunk, majd azok utódai között boncolással ivarsejthiányos fenotípusúakat kerestünk. Ebben a kísérletben egyetlen ivarsejthiányos mutációt találtunk, amely az emberi Sab gén (Matsushita és mtsai. 1998) Drosophila homológját, az általunk *Poirot*-nak (*prt*) elnevezett Drosophila gént azonosította (Sinka és mtsai. 2002). A hobo transzpozon a *poirot* gén első intronjába inszertálódott (16.ábra), és a Poirot fehérje ellen készített ellenanyaggal elvégzett western blot analízis tanúsága szerint a *prt^{gs}* mutációmutnull mutációt okozott (;17 ábra).





16. ábra A poirot gén szerkezete

Az ivarsejthiányos mutációt a *poirot* gén első exonjába integrálódott HLw2 hobo mutátor elem okozta. A *poirot* genomikus szekvenciát a DS04940 es jelű P1 fágból különítettük el.



Mivel a *prt^{gs}* homozígóta null mutánsok életképesek, de anyai hatású ivarsejthiányos fenotípust mutatnak, a *poirot* gén funkcióját ivarsejt specifikusnak mondhatjuk. A *prt^{gs}* mutáns petekezdemények részletes fenotípus leírása megmutatta, hogy a homozigóta mutáns anyák petéiben az *oskar* mRNS lokalizációja vadtípusú (18 ábra), azonban az Oskar protein a pete fejődése során egyre nagyobb mértékben leválik a poszterior pólusról (19. ábra).

18 .ábra *oskar* RNS *in situ* hibridi-záció vadtípusú és *prt^{gs1}* homozi-góta mutáns petekezdeményeken

A, a vad típusú petekezdeményben az oskar RNS a fejlődő petesejt poszterior csúcsán akkumulálódik. B, az ivarsejthiányos fenotípust okozó *prt^{gs1}* mutációra homozigóta mutáns petekezdeményekben az oskar RNS lokalizációja a vad típusnak megfelelő.





19. ábra Oskar fehérje ellenanyagos kimutatása *prt^{gs1}* homozigóta mutáns petesejtekben és embriókban

A,B,C,D, a vad típusú A,B, fejlődő petesejtben és C, érett petesejtben, illetve D, embrionális ivarsejtekben az Oskar fehérje kifejezett poszterior lokalizációt mutat, illetve az utód embrió lefűződő ivarsejtjeiben akkumulálódik. E,F,G,H a *prt^{gs1}* homozigóta mutáns E,F fejlődő petesejtekben G, érett petében illetve H, korai embrióban az Oskar fehérje a poszterior pólusról leszakadó delokalizált fenotípust mutat, a poszterior lokalizáció hiányában H, embrionális ivarsejtek nem alakulnak ki.

Ezek a megfigyelések ellentétesnek látszottak az elfogadott modellel, miszerint az Oskar fehérje szükséges saját RNS-ének lokalizációjához is (Rongo és mtsai. 1995). Az ellentmondást az alább ismertetett kísérlettel sikerült feloldanunk, melynek eredménye az *oskar* RNS által kódolt két fehérje izoforma eltérő lokalizációs mechanizmusára utal. Az *oskar* génről egyetlen transzkriptum íródik, melyről azonban két alternatív transzlációs start helyről egy 55 kDa-os rövid, és egy 71 kDa relatív molekulatömegű hosszú izoforma keletkezik. A rövid izoforma foszorilálódhat, ami egy 57 kDa relatív molekulatömegű formához vezet (Markussen és mtsai. 1995) Megvizsgáltuk, hogy a *prt^{gs1}* mutációknak milyen hatása van a különböző Oskar fehérje izoformák szintjére. Oskar Western blot analizissel kimutattuk, hogy a *prt^{gs1}* mutáns petekezdeményekben az 55 kDa relatív molekulatömegű nem foszforilált és az 57 kDa relatív molekulatömegű foszforilált rövid izoformák mennyisége erősen csökken, addig a 71 kDa-os hosszú izoforma a vad típusra jellemző mennyiségben fordul elő (20. ábra).

20. ábra *prt^{gs1}* mutáns petekezdemények Oskar western blot analízise

vadtípusú Α, а (vt) petefészkekből készített fehérjepreparátumban a rövid Oskar izoforma egy 55-57 kDa-os relatív molekulatömegű kettős csík formájában mutatható ki. A prt^{gs1} mutáns petekezdeményekben a izoforma mennyisége rövid jelentős mértékben csökken, míg a 71 kDa relatív molekulatömegű izoforma hosszú szintie а vadtípuséval egyező. Negatív kontrolként az osk54/Df Oskar fehérje null genetikai hátteret használtuk. B, az oskar mRNS vázlatos szerkezete két а alternatív lánckezdő metioninnal.



A Western blot eredmény alapján az embriókban megfigyelt delokalizációt úgy értelmeztük, hogy a petékben végzett ellenanyagos festéssel a rövid izoforma delokalizációját láttuk, míg poszeterior póluson maradt Oskar fehérje többsége a hosszú fehérjeváltozat volt. Ezt az értelmezést alátámasztja Markussen 1995-ös megfigyelése (Markussen és mtsai. 1995) miszerint a hosszú Oskar izoforma önmagában elegendő az oskar RNS poszterior póluson való tartásához, de az embrionális ivarsejtdeterminációhoz a rövid izoforma is kell. A jelenleg legpontosabb modell szerint tehát a poszterior pólusra szállítódó oskar RNS helyspecifikusan transzlálódik. A helyben keletkezett hosszú Oskar fehérje az oskar RNS-t a szubkortikális aktin vázhoz köti. A kihorgonyzott RNS molekulákról egyre több lokalizált fehérje termék keletkezik. Az így keletkezett nagy mennyiségű rövid izoforma feladata újabb ivarsejt faktorokat lokalizálni, így az embrionális ivarsejtek keletkezésének helyét meghatározni. A prt^{gs1} mutáns petekezdeményekben a hosszú izoforma szintje a vadtípuséra hasonlít. Ennek megfelelően az oskar RNS-t poszterior lokalizációja megtörténik, melyről egyre nagyobb mennyiségű Oskar fehérje izoformák képződnek, de a prt mutáns petekezdeményekben a rövid izoformák helyben tartása nem valósul meg. A prt gén funkciója tehát a poláris plazma összeszerelődését irányító rövid Oskar fehérje izoforma helyben tartása.

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a hobo mutagenezis kísérlet során valóban sikerült a P elemes mutagenezis kísérletben nem azonosított gént ivarsejthiányos fenotípussal azonosítani. Azt is elmondhatjuk azonban, hogy mind a P elemes mind a hobo kísérlet alacsony hatásfokú volt. Ennek legfőbb okát abban láttuk, hogy egyik transzpozon használatakor sem tudtuk elkülöníteni a számunkra értékes életképes mutációt okozó, valamint az értéktelen gének közötti régiókba történő transzpozon inszerciókat, ami azt jelentette, hogy feleslegesen nagyszámú, géneket nem is érintő

vonalat kellett törzsbe állítanunk és tesztelnünk. Az ezredfordulón Lukacsovich Tamás és kollégái egy géneken kívüli inszerciók kizárására alkalmasnak látszó megoldással jelentkeztek azzal, hogy az emlős kísérleti rendszerekre kifejlesztett géncsapdázó elgondolást Drosophilára alkalmazták (Lukacsovich és mtsai. 2001)

Anyai hatású ivarsejthiányos mutációk azonosítása géncsapdázó transzpozon mutagenezissel

Asztalos Zoltán és Lukácsovich Tamás Daisuke Yamamoto kutatócsoportjában viselkedésgenetikai vizsgálataik során a mi laborunkéhoz hasonló technikai kihívással küzdöttek, amikor nagyszámú homozigóta életképes mutáns vonalat kellett hosszadalmas tesztelésnek alávetniük. Annak érdekében, hogy gének közötti régiókba inszertálódott, tehát számukra értéktelen transzpozon inszerciókat ne kelljen a munkaigényes fenotípusos tesztjeiken átereszteni, géncsapdázó transzpozonokat hoztak létre (Lukacsovich és mtsai. 2001). Az elgondolás lényege a két speciálisan módosított markergénben rejlett. Ezek a markergének csak akkor léptek működésbe, ha a transzpozon egy gén belsejébe ugrott be, jelezve melyik inszerciót válasszák ki a fenotípusos tesztelésekre (21. ábra). Lukácsovichék előkísérletei szerint a GT rendszer használata mintegy 70%-ra dúsítja fel a génben történő inszerciókat. Úgy véltük, hogy ennek a rendszernek alkalmazásával ivarsejthiányos mutánsizolálási kísérletben igen sok energiát takaríthatunk meg. A GT transzpozon rendszert az ivarsejtekben történő munkára alkalmassá tettük, és azzal ivarsejthiányos mutációs kísérletet végeztünk. Az eredeti GT transzpozon markergénjei a leggyakrabban használt w, valamint a Gal4 transzkripciós faktort kódoló gének voltak. A Gal4 aktivitás kimutatása közvetetten történt egy Gal4 fehérjére érzékeny ún. UAS szekvenciával ellátott másodlagos markergén pl UAS-

LacZ vagy UAS-GFP segítségével. Ez a gyakorlatban újabb keresztezést igényelt, amikor is a kimutatást lehetővé tevő UAS-LacZ vagy UAS-GFP-t tartalmazó transzpozpnokat a GT inszercióval egy genomba vitték. Mivel a Drosophila ivarsejtekben a Gal4-UAS indukció csak speciális körülmények között működik (Rørth 1998) az eredeti transzpozont módosítanunk kellett. Úgy gondoltuk, hogy az egyébként tagadhatatlan előnyökkel járó Gal4 rendszert elhagyjuk és egy közvetlenül szelektálható markergénekből álló GT transzpozont állítunk elő (21 ábra).



21. ábra A Drosophila géncsapdázó (gene trap GT) transzpozon vázlatos szerkezete és működése

a, GtGFPw tanszpozon két csonka markergént tartalmaz P elem fordított ismétlődő szekveciák (zöld háromszög) között. Az egyik markergén, a Green fluorescent protein (GFP) poliadenilációs jellel (A) rendelkezik, de nincs promótere. A másik markergén a white promóterrel (P) bír, de nem hordoz poliadenilációs szignált. b, egy átlagos szerkezetű *Drosophila* gén, amelyet négy exon (sötét téglalap) és három intron (fekete vonal) alkot. c, a GT elemet a PlacW elemhez hasonlóan, P mobilizáló transzpozonnal lehet aktiválni. A GT elem markergénjei csak abban az esetben fejeződnek ki, ha a transzpozon egy gén belsejébe ugrik, ahol a csonka markergének promóterhez, illetve poliadenilációs jelekhez jutnak. d, a génbe ékelődő GT transzpozonok lényegében két prómótertől poliadenilációs jelig tartó új gént hoz létre, melyről az elrontott gén exonjaiból és a markergének exonjaiból álló kiméra RNS-ek keletkeznek. e, Mivel a markergének transzlációs start-stop szekvenciákkal határoltak a kiméra RNS-ekről a működőképes GFP és W fehérje termelődik. A markergének termelődése azt jelzi, hogy az inszerció génen belül történt.

Így jött létre az 21. ábrán bemutatott másodlagos markergént nem igénylő GFP és White markergéneket hordozó GtGFPw transzpozon mellyel Jankovics Ferenc száznyolcvan géncsapda inszerciót állított elő, amelyből kettő ivarsejthiányos fenotípusúnak mutatkozott (22.ábra). Jankovics Ferenc kimutatta, hogy az egyik GT ivarsejthiányos inszerció, a 193-as jelű, a Drosophila Moesin génjét érinti (23. ábra;

Jankovics és mtsai. 2002).

22. ábra Moesin mutáns nőstény által lerakott petékben ivarsejthiányos fenotípusú embriók fejlődtek.

A, A vad típusú korai embrió poszterior pólusán lefűződő embrionális ivarsejteket nyílhegy mutatja. **B**, A GT193 mutáns embrió poszterior pólusán nincsenek embrionális ivarsejtek.





23. ábra A Drosophila Moesin gén szerkezete és az ivarsejthiányos mutációt okozó GT193 inszerció helye

A Drosophila Moesin egy összetett szerkezetű gén alternatív splicing-gal, alternatív promóter használattal legalább hétféle transzkriptum jön létre. A GT193 transzpozon inszerció a 67 kDa fehérje izoformát kódoló splice variánsok első kódoló szekvenciájában következett be.

A Moezin az ERM családba sorolható fehérje melynek szerkezete alapján aktinsejtmembrán keresztkötő funkciót tulajdonítottak (24 ábra; Tsukita és Yonemura 1999). Az emlős genomok három nagyon hasonló ERM fehérjét a Moesint az Ezrint és a Radixint, kódolják, melyek funkciói jelentősen átfednek egymással (Doi és mtsai. 1999). Ez a funkcionális redundancia nagymértékben nehezíti az ERM fehérjék genetikai vizsgálatát emlős modellorganizmusokon, sejttenyészeteken. Ezzel szemben Drosophilában egyetlen ERM fehérjét kódoló gén a Moesin található meg. Ez a tény a Drosophilát az ERM fehérjék vizsgálatára különösen alkalmassá teszi.



24. ábra az ERM fehérjecsaládba sorolható fehérjék szerkezeti összehasonlítása

Az ERM fehérjék N terminálisán lévő fehérjefehérje kölcsönha-tásért felelős domén egy sereg membránfehérjével képes kap-csolatot teremteni. Az ERM fehérjék C terminális részén pedig aktin kötő domént találunk. (Tsukita és Yonemura 1999)

A Moesin, a *cTm* fehérjéhez hasonlóan aktin kötő fehérje, de szerencsénkre annál jóval könnyebben értelmezhető fenotípussal rendelkezik. A Moesin mutációk látványos fenotípusával elsőként sikerült megmutatni, hogy a vad típusú Moezin fehérjének sejtbiológiai szerepe valóban a sejthártya- aktin-háló keresztkötése, amit korábban csak szerkezeti adatokból feltételeztek. Azt tapasztaltuk, hogy a Moezin

mutáns petekezdeményekben a petesejt szubkortikális aktin váza sokszor hibásan kötődik a sejthártya belső felszínéhez, rendellenes betűrődéseket mutat (25. ábra).



25. ábra Moesin mutáns és vadtípusú petekezdemények szubkortikális aktin vázának összehasonlítása

A vadtípusú (vt) és Moesin (Moe) mutáns petekezdemények aktin vázát A, rodamin konjugált falloidinnel tettük láthatóvá. B, a sejtek membránját E-cadherin ellenanyaggal jelöltük meg. C, a falloidin, E-cadherin kettős festés a vadtípusú petekezdeményekben a petesejt kérgi részében teljes mértékben kolokalizál, míg a Moesin mutáns petekezdeményben a szubkortikális aktinnak a kortexről való helyenkénti leválását detektáltuk.

A *Tropomiozin II* génnel végzett munkánkból sejtettük, hogy az aktin váznak szerepe van az *oskar* RNS és fehérje lokalizációban. Azonban a leggondosabb mikroszkópi vizsgálattal sem tudtunk *TmlI* mutánsokban aktin szerkezet változást kimutatni, így az aktin hálózatnak az *oskar* géntermékek lokalizációjában betöltött szerepe bizonyításra várt. Mivel a Moesin mutáns petekezdemények a szubkortikális aktin jól látható szerkezeti elváltozását mutatták, megvizsgáltuk, hogy ezek a szerkezeti változások milyen hatással vannak az *oskar* géntermékek lokalizációjára.

Kimutattuk, hogy Moesin mutáns háttéren az Oskar fehérje a vadtípustól eltérő lokalizációt mutat (26.ábra).



26. ábra Oskar fehérje és az aktin váz együttes festése Moesin mutáns petekezdeményekben

Az Oskar fehérjét Oskar ellen termeltetett ellenanyaggal (piros) az aktin vázat OregonGreen-falloidinnel (zöld) tettük láthatóvá. A, vad típusú petekezdemény. B,C,D,E Moesin mutáns petekezdemények, melyekben B, az Oskar fehérje a kortextől eltávolodva rendezetlen eloszlást mutat. C,D azokban az esetekben amikor a Moezin mutáns petekezdeményekre jellemző aktin leválások a kortex poszterior részében következnek be, az Oskar a kortexről levált aktinnal mutat kolokalizációt. A Moezin mutáns petekezdeményekben gyakran megfigyeltünk a poszterior csúcstól oldalirányba való Oskar fehérje elcsúszást is.

Abban az esetben, ha a betűrődés a petekezdemény poszerior csúcsán történik, az Oskar fehérje lokalizációs hibáját okozza, úgy, hogy az Oskar fehérje a kortextől elvált aktin hálózathoz kötődik. Az elfogadott pozitív visszacsatolás elvén működő Oskar lokalizációs modell szerint a lokálisan termelődő Oskar fehérje újabb *oskar* RNS molekulákat lokalizál. Amennyiben az aktin hálózathoz való kapcsolódás elegendő a pozitív visszacsatolási szabályozás beindításához, annak ektopikus aktin vázon is ki kell alakulnia. A kérdés tisztázása érdekében Moesin mutáns háttéren
megvizsgáltuk az *oskar* RNS eloszlást is. Azt tapasztaltuk, hogy a Moesin mutáns petekezdeményekben az *oskar* RNS az Oskar fehérjéhez hasonló lokalizációs hibát okozott (27. ábra).



27. ábra oskar RNS sin situ hibridizáció Moesin mutáns petekezdeményeken

A, vad típusú petekezdeményben az *oskar* RNS a fejlődő petesejt poszterior végében koncentrálódik. B, az *oskar* RNS a kortextől eltávolodva rendezetlen eloszlást mutat. C,D az *oskar* RNS pontszerűen, illetve jól körülhatárolható térrészben, de ektopikusan festődik. E, az *oskar* RNS a poszterior csúcstól oldalirányba elcsúszva, de a szubkortikális aktinnal koloaklizálódik.

Az a felismerésünk, hogy a sejthártyától eltávolodott aktin hálózat is képes az Oskar fehérjét megkötni, véglegesen bizonyította, hogy a morfogenetikus hatású *oskar* géntermékek helyben tartásáért az aktin váz a felelős. Az a további megfigyelésünk pedig, hogy a Moesin mutáns petekezdeményekben az ektopikus *oskar* fehérjét és RNS-t nagyon hasonló mintázatban figyeltük meg azt valószínűsíti, hogy az *oskar* szabályozásra jellemző pozitív visszacsatolási rendszer fenntartáshoz a szubkortikális aktin önmagában elegendő, a petesejt kortexének egyéb elemeire nincs szükség.

A Moesin mutáns petekezdemények aprólékos vizsgálata során feltűnt, hogy az aktin váznak, illetve az *oskar* géntermékeknek lokalizációs hibája kisebb gyakoriságú esemény mintsem hogy azzal a moezin mutánsokban megfigyelt ivarsejthiányos fenotípus teljes mértékben megmagyarázható lenne. Feltételeztük, hogy a Moesin fehérjének egyéb szerepe is lehet az ivarsejtek életében. A feltételezett új funkció feltárása érdekében megvizsgáltuk a Moesin fehérje eloszlását az embrionális ivarsejtekben. Ennek érdekében Green Fluorescent Protein (GFP) jelzett, teljes funkciójú Moesin fehérjét fejeztük ki vadtípusú embriókban és figyeltük a GFP jel sejten belüli lokalizációját (Polesello és mtsai. 2002). Meglepetésünkre a korábban tisztán citoplazmás fehérjeként számon tartott Moesin fehérje a frissen lefűződött ivarsejtek magjaiban feldúsulni látszott (28. ábra).



28. ábra A Moesin fehérje eloszlása frissen lefűződött Dorsophila embrionális ivarsejtekben

A, frissen lefűződő ivarsejtek
interferencia kontraszt mikroszkópi
felvétele. B a Moesin-GFP

transzgén (zöld) a pete szubkortikális régiója mellett az embrionális ivarsejtek magjában is feldúsul. C, moesinGFP DAPI kettősfestés.

További vizsgálataink során kiderítettük, hogy Drosophila S2 sejtekben illetve a gasztrulálódó embriók testi sejtjeiben is ki tudjuk mutatni a Moesin fehérjét a sejtmagokban (29, ábra). A gasztrulálódó embriók mitotikus szigeteiben a Mosin-GFP sejtmagon belül is speciális lokalizációt mutatott, a fluoreszcens jel osztódási orsó szerű képződményeket világított ki (30. ábra).

29. Moesin fehérje kimutatása Drosophila S2 sejtek mag-jábanA Lamin (piros) fehérjével jelölt sejtmaghártyán belül, a Dapi (kék) festődéssel jelölt



magban jelentős Moesin fehérje mennyiség mutatható ki.



30 .ábra Moesin fehérje kimutatása gasztrulálódó embriók magjaiban

A Gasztrulálódó Drosophila embriók mitotikus szigeteiben a sejtmagi Moesin-GFP magorsó szerű alakzatban található.

A Moesin fehérjének a sejtmagon belüli lokalizációját időfelbontásos mikroszkópiával is megvizsgáltuk, és a sejtmagi felhalmozódást sejtciklus

függőnek találtuk, valamint a magorsóval való Moesin fehérje asszociációt megerősítettük. A szinciciális blasztoderma korú embriókban Moesin-GFP fehérjét fejeztettünk ki és tettünk láthatóvá konfokális mikroszkóp segítségével. Az interfázisos sejtmagban kevés Moesin mutatható ki, melynek mennyisége a profázisban hirtelen megnő, a metafázisban pedig egyértelmű magorsóval való kolokalizáció mutatható ki. Az anafázisban és a telofázisban a Moesin fehérje a húzófonalak alkotta ún. midbody-hoz lokalizálódik. A citokinézis folyamán a Moesin fehérje magi felhalmozódása megszűnik (31. ábra).



31 ábra Moesin fehérje dinamikus lokalizációja szinciciális blasztoderma sejtmagokban

I, interfázis; P, profázis; PM, prometafázis; M,metfázis; A anafázis; T,telofázis; CK, citokinézis. Magyarázat a szövegben.

A Moesin fehérje jellegzetes aktin kötőfehérje, amely a citolpazmában szorosan kolokalizál az aktin sejtvázzal. Megvizsgáltuk, hogy a fehérje frissen felfedezett magi lokaizációja alapulhat-e hasonlóan aktin kötésen. Drosophila blasztoderma stádiumú embriókban Moesin-GFP és actin-RFP transzgéneket fejeztettünk ki, és figyeltük a két fehérje esetleges kolokalizációját. Az embriók magjában jól detektálható aktin-RFP-re utaló vörös fluoreszcenciát, továbbá egyértelmű Moesin-actin kolokalizációt kaptunk. Ez alapján a megfigyelésünk alapján valószínű, hogy a Moesin fehérje a sejtmagi aktinhoz kötődik (32.ábra).



32. ábra Moesin-aktin fehérje kolokaizáció kimutatása blasztoderma stádiumú Drosophila sejtmagokban

A I, inter-, P, pro-, M meta-,A,ana- és T, telofázisban. A, MoesinGFP, B, aktinRFP fluoreszcencia, C egyesített kép. Az egyesített képen minden mitotikus fázisban szoros Moesin-aktin kolokalizáció (sárga) figyelhető meg.

Az aktinnak és néhány aktin kötő fehérjének (LaminB, East, Megator, Chromator és Skeletor) az osztódási orsó kialakításában újabban fontos szerepet tulajdonítanak. Johansen K. and Johansen J. bevezették az orsómátrix fogalmát (Johansen és Johansen 2009). Az egyre több adattal alátámasztott elmélet szerint a mitotikus orsó az orsómátrix alkotta "kaptafán" jönne létre. Az orsómátrix hibás

működése orsó összeszerelődési és működési hibákkal jár. Felmerült a kérdés, hogy a Moesin fehérje magi lokaizációjának és osztódási orsó asszociációjának van-e funkciója a sejtmagok életében és ezek alapján lehetet-e a Moesin az orsómátrix legújabban felismert tagja. A kérdés eldöntésére RNSi kísérleteket végeztünk Drosophila sejttenyészeten. Moesin specifikus kettős szálú RNSt transzfektáltunk S2 sejtekbe és figyeltük, van-e a kezelésnek hatása a mitotikus orsók szerkezetére. Moesin RNSi hatására kromoszóma szegregációs hibák és tripoláris orsók jöttek létre, jelezve, hogy a Moesin fehérjének szerepe van az osztódási orsó szerkezetének kialításában (33. ábra).

33. ábra. A Moesin RNSi hatása S2 sejtek osztódási orsóira

Felső sor: A piros γ tubulin, a zöld β tubulin és a kék DAPI festés normális orsó szerkezetet és kromoszómaszegregációt mutat a kontrol S2 mitótikus sejtekben. Moesin specifikus dsRNS transzfekciója után abnormális kromoszómaszegregációt (második sor) valamint tripoláris orsókat tudtunk kimutatni.



Annak eldöntésre, hogy a Moesin klasszifikálható-e orsómártix fehérjeként kolokalizációs vizsgálatokat kell még végeznünk a LaminB, East, Megator, Chromator és Skeletor fehérjékkel. Ugyancsak további vizsgálatok szükségesek annak eldöntésére, hogy a Moesin gén magi funkciója szükséges-e a korai embrionális ivarsejtek életében.

A hagyományos genetikai megközelítés tanulságai

A fentebb ismertetett kísérleteinkben a genetika hagyományos megismerési módját követtük. Egy-egy gént mutációkkal elrontottunk, a mutáns allélt homozigóta

formába hoztuk és az így kapott fenotípusból következtettünk az ép gén vadtípusú szerepére. Annak érdekében, hogy a gén molekuláris azonosítását könnyen végezhessük el a mutációkat transzpozonokkal állítottuk elő. A munka során megtapasztaltuk azonban a transzpozon mutagenezis néhány hátrányát is. Ilyen volt például a P elemek sajátos ugrási preferenciája, a másodlagos mutációk megléte vagy például a hobo elemek instabilitása. Az inszerciós preferencia kérdését több transzpozon használatával, a másodlagos mutációk problémáját pedig több allél vizsgálatával, valamint néhány egyszerű ellenőrző kísérlettel, mint pl. menekítő konstrukciók használatával sikeresen meg lehetett oldani. A transzpozon mutagenezis legnagyobb hátránya a pleiotróp gének vizsgálatakor mutatkozik meg. Mindez a gyakorlati munkában azt jelenti, hogy ivarsejthiányos fenotípust legtöbbször csak akkor kapunk, ha speciális fehérjemódosulást kiváltó, vagy gyenge expresszivitású mutációkat indukálunk, olyanokat, melyek az életbemaradáshoz elégséges minőségű vagy mennyiségű transzkriptumot állítanak elő, de az ivarsejtek kialakulását már nem teszik lehetővé. A rengeteg előnnyel járó transzpozonos mutagenezis ebből a szempontból hátrányos oldalát mutatja. Ugyanis a transzpozon inszerciók legtöbbször erős funkcióvesztéses fenotípust eredményeznek módosult fehérje szerkezetű mutánsokat pedig szinte lehetetlen általuk előállítani. A pleiotrópia jelenségéből adódó technikai nehézségekre is van megoldás. Mozaik analízissel, valamint genetikai interakciós rendszerek alkalmazásával lehetővé válik a pleiotróp gének transzpozon indukálta erős funkcióvesztéses, letális alléljainak vizsgálata. Elhatároztuk hát, hogy az ivarsejtek kialakulásának genetikai boncolását ennek a két technikának alkalmazásával folytatjuk.

lvarsejthiányos mutációk izolálása mozaik technikával; egy sikertelen kísérlet összefoglalása

A genetikai mozaikok eltérő genotípusú sejtekből álló élőlények. Számos fejlődéstani jelenség és nem egy betegség hátterében is genetikai mozaikosság áll. A kísérletesen indukált mozaikosság pedig a genetikai analízis hatékony eszközévé vált. Az ún. mozaik analízis lényege abban áll, hogy heterozióta egyedekben kisebb homozigóta sejtcsoportokat hozunk létre, abban a szövetben, melyben az adott mutációt kívánjuk vizsgálni. Ennek a kísérleti elrendezésnek előnye, hogy általa olyan mutáns allélok fenotípus elemzése is elvégezhető, melyekre, ha az egész test homozigóta volna az egyed halálát okoznák. Szabad János és Eric Wieschaus (Wieschaus és Szabad 1979) megmutatta, hogy a mozaik technika a Drosophila ivarsejtekben nagyszerűen használható módszer, melyet később domináns szelekciót biztosító markermutációk alkalmazásával Madlen Gans laboratóriumában (Perrimon és Gans 1983) általánosan használható eszközzé tettek. Az ivarsejt mozaik technika mai teljes fejlettségében, amit OvoD-FRT rendszerként ismerünk Norbert Perrimon laboratóriumában alakult ki (Dang és N Perrimon 1992). Ők tették lehetővé, hogy az ivarsejtmozaikokat röntgensugárzás helyett a kevesebb mellékhatással járó és hatékonyabb élesztő Flip rekombinázzal lehessen létrehozni. Az OvoD-FRT rendszer az életfontos gének anyai hatásának vizsgálatára a legalkalmasabb eszköz lett (34 ábra). Úgy gondoltuk, hogy a rendszer az ivarsejttestisejt sors elválását irányító pleiotróp gének azonosítására is alkalmas lehet. Elhatároztuk, hogy az OvoD-FRT rendszerrel mozaikos nőstényektől származó felnőtt utódokat nevelünk és köztük boncolással ivarsejthiányosakat keresünk. Ezt a kísérletet mintegy felkészülésnek szántuk. Ugyanis akkoriban vált ismertté, hogy a Flip által létrehozott mozaikosság erejét felismerve Barry Dickson egy egész

meglévő P elem inszerció gyűjteményt rekombinációval megfelelő FRT helyekkel kíván ellátni. Úgy véltük, ha az előkísérlet sikerrel zárul az egész Dickson féle gyűjteményt megvizsgáljuk.

34 ábra: Az OvoD-FRTrendszer működési elve

Az OvoD/m nőstények életképesek, hiszen a vizgálni kívánt (m) letális mutációra heterozigóták Ezek a nőstények azonban sterilek. hiszen az OvoD domináns nősténysteril mutáció megakadályozza, hogy ivarsejtjeik (piros) érett petékké az A hősokkal vezérelt hs-FLP feilődjenek. transz hatású transzpozáz hatására a G2ben, a négyfonalas stádiumban az FRT helyek között mitotikus rekombináció következhet és а rekombináns be kromoszómák szegregációja két egyenlőtlen leánysejteket eredményezhet. Az egyik leányseit homozigóta lesz a vizsgálni kívánt



mutációra, és egyben megszabadul a peteképzést akadályozó OvoD mutációtól (zöld), belőle pete fejlődhet. A domináns szelektív marker mutáció jóvoltából tehát a mitotikus rekombinációval nem érintett, valamint az OvoD homozigóta sejtekből nem, csak és kizárólag az m mutációra homozigóta ivarsejtekből fejlődnek peték, melyek fenotípusa a peték válogatása nélkül könnyen végrehajtható.

Az előkísérleteket Sinka Rita végezte. A harmadik kromoszóma jobb karján indukált EMS (etil metán szulfonát) mutációkat tett homozigótvá az OvoD-FRT rendszerrel nőstény ivarsejtekben, és keresett közöttük ivarsejt hiányosakat. Az eredmény elmaradt a várakozásainktól. Az elindított vonalaknak csak mintegy felében sikerült mitotikus rekombinációt észlelnünk. A mitotikus rekombináció eredményeképpen egy-egy mutáns vonal vizsgálatakor csupán néhány tucat petét kaptunk. Ezzel az alacsony hatékonysággal 1800 egyedi EMS kezelt FRT kromoszómakart tettünk homozigótává. Ezek közül öt anyai hatású embrió letalitással járó mutációt azonosítottunk, melyek fenotípusa oskar az funkcióvesztéses fenotípusra hasonlított. Egyikükről komplementációs analízissel

beláttuk, hogy az ivarsejtekben ismert funkciójú *nanos* gén allélja. Az előkísérletben felnőtt ivarsejthiányos mutációt azonban nem találtunk. A megtapasztalt rossz fertilitás, valamint a nagyon kevés homozigóta klónból származó felnőtt utód alapján úgy döntöttünk, hogy az OvoD-FRT kísérleteinket a várható technikai nehézségek miatt nem folytatjuk. 2003-ban Ruth Lehmann laboratóriumából az általunk tervezetthez nagyon hasonló, sikeres kísérlet eredményét közölték (Morris és mtsai. 2003). Az OvoD-FRT rendszerrel, szintén a harmadik kromoszóma bal karján EMS indukálta ivarsejthiányos mutációkat kerestek. 10 000 vonal átvizsgálásával 14 ivarsejt hiányos mutációt izoláltak, amit a későbbi komplementációs tesztekkel négy komplementációs csoportba soroltak. Kísérletük sikere az eljárásaink közötti egyetlen lényeges különbségen múlhatott. Lehmann-ék ugyanis a homozigóta klónokból származó utódokat nem nevelték fel felnőtt korig, hanem egy alkalmas embrionális marker segítségével már embrió korban elvégezték az ivarsejthiányos fenotípus tesztet, aminek hatására kísérletük egyszerűbbé és minden bizonnyal hatékonyabbá vált.

Az ivarsejtdifferenciáció vizsgálata genetikai interakción alapuló mutánsizolálási rendszerekkel

A genetikai interakciós rendszerek elve

A mendeli öröklődés elmélet egymástól függetlenül öröklődő gének meglétét mondja ki. Az elmélet mutáns fenotípusoknak az utódokban való szabályszerű megjelenési arányain az ún. mendeli arányokon alapul. Már Mendel közvetlen követői egyremásra eltérést tapasztaltak a fenotípusok megjelenésének aranyszabályától. Az

eltérések egyik oka az egyes gének által okozott fenotípusok egymásra hatása volt. A fenotípusok, illetve gének közötti kölcsönhatás tehát a genetika kezdete óta ismert jelenség, ami kezdetben inkább a tisztánlátást zavaró tényező volt. Mára a genom összetettségének valamint a génkölcsönhatások változatos biokémiai hátterének ismeretében a kezdeti zavaró tényező, a fenotípusok szintjén megnyilvánuló kölcsönhatás, a genetikai vizsgálatok tárgyává lett. A fenotípusos megfigyelések a genetikai interakciók sokaságát tárták fel, és mára oda vezettek, hogy a genom működését egy kölcsönhatások tömegével szervezett génműködési hálózatként látjuk.

Az egyre szaporodó ismeretek alapján a genetikai interakciók több csoportját különíthetjük el. Allélok között fenotípus erősítő, enhaszer vagy éppen gyengítő, szupresszor hatásokat figyelhetünk meg (Guarente 1993). Előfordul az is, hogy egyes allélok önmagukban nem, csak együttesen mutatnak fenotípust. Ennek egyik szélsőséges esete az élesztő genetikában széles körben használt szintetikus letalitás (Ye és mtsai. 2005). Máskor egy gén alléljainak fenotípusát egy másik gén alléljai nem komplementálják. A genetikai interakciók lehetnek dominánsak illetve recesszívek, aszerint, hogy a kölcsönhatás hetero- vagy homozigóta formában valósul meg. A genetikai interakciók értékelésekor figyelembe kell vennünk, hogy az interakció, legyen az bármelyik is a felsoroltak közül, utalhat a géntermékek közvetlen fizikai kölcsönhatására (Hays és mtsai. 1989) vagy fizikailag nem érintkező géntermékek funkcionális kapcsolatára egyaránt. A kölcsönhatás, mint genetikai eszköz egy adott életfolyamatban szerepet játszó géncsoport elemeinek felismerését teszi lehetővé. Alkalmas továbbá a géncsoporton belüli szabályozási viszonyok felderítésére, de a kölcsönhatás fizikai hátterének megmutatása molekuláris munkát igényel. A genetikai interakció az ivarplazma funkciójának

vizsgálatára különösen alkalmasnak tűnt, ugyanis ismert tény, hogy az ivarplazma összeszerelődését elindító kulcs elemnek az Oskar fehérjének koncentrációfüggő fenotípusa van (Smith és mtsai. 1992). Az Oskar aktivitásának csökkentésével először enyhe, majd egyre erősebb ivarsejthiányos fenotípus alakul ki. További Oskar fehérje csökkentéssel abdomenhiányos fenotípus érhető el. Ennek oka az, hogy az oskar által összeszerelt ivarplazma abdomen kiakulásához szükséges faktorokat is tartalmaz így az ivarplazma hiánya egy járulékos fenotípussal, abdomenhiányos fenotípussal jár. Az Oskar túltermelés ezzel szemben ektopikus ivarsejteket eredményez. Elhatároztuk, hogy kihasználva az Oskar fehérje koncentrációfüggő hatását domináns genetikai interakción alapuló mutáns izolálási rendszereket dolgozunk ki annak érdekében, hogy újabb, ivarsejtfejlődést irányító géneket azonosítsunk.

Kezdetben az interakción alapuló mutánsizolálási eljárásoktól csupán a pleiotrópia által okozott technikai jellegű nehézségeinkre vártunk megoldást. Ugyanis, a domináns interakciókra alapozott kísérletekben akár letális mutánsok vizsgálata is lehetséges, mert elégséges azokat heterozigóta formában vizsgálni. Elhatároztuk, hogy ismert ivarsejthiányos mutációkból alacsony penetranciájú ivarsejthiányos, ún. érzékenyített genetikai háttereket hozunk létre, melyen a vizsgálni kívánt mutáns alléloknak akár gyenge domináns interakcióját érzékelni tudjuk.

Anyai hatású ivarsejthiányos mutációk azonosítása két gén alléljaival érzékenyített genetikai interakción alapuló mutánsizolálási rendszerrel

Rendszeres vizsgálatot végeztünk, melynek során ismert ivarsejthiányt okozó mutációkat, illetve azok kombinációit hoztuk létre, majd átmeneti ivarplazma hiányra utaló ivarsejthiányos és abdomenhiányos fenotípusokat kerestünk. Két alkalmas érzékenyített genetikai hátteret sikerült kialakítani. Az *oskar⁵⁴TmII^{el4} / TmII^{eg9}* allél kombinációval gyenge, az *oskar* mutánsokra jellemző járulékos abdomenhiányos fenotípust kaptunk. A *TmII^{eg9}/TmII^{eg20}* allélkombináció pedig alacsony penetranciájú ivarsejthiányos fenotípust okozott. Kísérleteinket erre a két érzékenyített genetikai háttére.

35. ábra Az Oskar fehérje koncentrációfüggő fenotípusát kihasználó genetikai interakciós rendszerek elvi vázlata

Amennyiben az Oskar fehérje koncentrációja egy bizonyos küszöbérték alá csökken. ivarseithiánvos fenotípust figvelhetünk meg. А további elérhetjük csökkenéssel а járulékos abdomenhiányos fenotípus kialkulásához szükséges küszöbértéket. Az oskar⁵⁴TmII^{el4} / Tmll^{eg9} alllélkombináció olyan genetikailag érzékenyített hátteret eredményez, mely alacsony



penetranciájú abdomenhiányos fenotípussal jellemezhető. Amennyiben az érzékenyített háttéren egy új mutáció további Oskar koncentráció csökkenést eredményez, nagyobb penetranciájú abdomenhiányos fenotípust kapunk. Az ilyen mutációkat Enhancer of Tropomiosin and oskar, röviden E(To) mutációknak neveztük. A $Tmll^{eg9}/Tmll^{eg20}$ allélkombináció kismértékű Oksar fehérje koncentráció csökkenést okoz, ennek megfelelően ezt az érzékenyített genetikai hátteret ivarsejthiányos fenotípus jellemez. Az oskar⁵⁴ $Tmll^{eg9}$ érzékenyített rendszerben azonosított E(To) alléloktól elvárjuk, hogy a $Tmll^{eg9}/Tmll^{eg20}$ érzékenyített háttéren is enhanszerként viselkedjenek. Az E(To) mutációkról feltételeztük, hogy olyan géneket reprezentálnak, melyeknek maguknak is szerepük van az ivarplazma kialakításában, vagy funkciójában.

Jankovics Ferenc ötezer EMS kezelt kromoszómát vizsgált meg az oskar⁵⁴TmII^{el4} TmII^{eg9} allélok alkotta érzékenyített háttéren. 1 Tizennéav kromoszómán talált az oskar fenotípust erősítő, enhanszer mutációt. Az enhanszer mutációkat hordozó kromoszómákat azután megvizsgálta az TmII^{eg9}/TmII^{eg20} heterozigóta hátéren is. A végeredmény 14 ivarsejthiányos fenotípust okozó Enhancer of Tropomiosin and oskar, E(To) mutáció lett. A 14 E(To) mutáció komplementációs analízise megmutatta, hogy egyetlen két alléllal reprezentált komplementációs csoportunk van. Ezt a komplementációs csoportot deléciós törzsgyűjteményekből térképezéssel, valamint származó allélokkal való komplementációval a Rab11 génnel azonosítottuk (Jankovics és mtsai. 2001) (36.ába).



36 .ábra Az *E(To)* mutációkkal azonosított *Rab11* allélok térképezése

A, a kéttagú komplementációs csoportba tartozó homozigóta letális E(To) allélokat harmadik kromoszómás deléciókkal a 93-as citológiai régió B-C szekciójára térképeztük. A régióban korábban leírt mutációkat törzsgyűjteményekből begyűjtöttük, majd komplementációs analízist végeztünk. Az *E(To)* mutációkat az EP3017 és j2D1 és 93Bi jelű *Rab11* allélok nem komplementálták. A komplementációs analízis megmutatta, hogy a *Rab11*^{93Bi} allélkombinációk életképesek. A további kísérleteinket ezekkel az életképes allélkombi-nációkkal végeztük. B, a *Rab11* gén szerkezete.

A *Rab11^{93Bi}* allél életképes allélkombinációkat eredményezett, melyek anyai hatású ivarsejthiányos fenotípust mutattak, megerősítve a *Rab11* génnek az interakciós rendszerben azonosított ivarsejt funkcióját. Annak érdekében, hogy a Rab11 gént elhelyezzük az ivarsejtdeterminációt irányító gének hierarchiájban megvizsgáltuk mutáns alléljainak hatását az *oskar* géntermékek lokalizációjára. Kísérleteink a

Rab11 gént egyértelműen az oskar gén felett ható, oskar szabályozó elemeként azonosították. A *Rab11* mutáns petekezdeményekben az oskar RNS poszterior pólus helyett a petesejt közepén sokszor egy éles határvonalakkal rendelkező, jól körülhatárolt foltban helyezkedett el (37. ábra).

37. ábra oskar RNS *in situ* hibridizáció *Rab11* petekezdeményeken

vadtípusú petekezde-Α, mény, melyben az oskar RNS feilődő peteseit а poszterior csúcsán lokalizálódik. B,C,D Rab11 mutáns petekezdemények, melyekben az oskar RNS a vadtípusú poszterior lokaizáció mellett, vagy helvett a fejlődő petesejt középpont-



jában ektopikusan lokalizálódik, vagy alaktalan rögök formájában találgató meg.

A *Rab11* mutánsok középen lokalizált *oskar* RNS fenotípusa azoknak a géneknek mutáns fenotípusára emlékeztetett, melyek a petesejt mikrotubulus rendszerének polaritását befolyásolják *Notch*, *PKA*, *laminA* (Ruohola és mtsai. 1991; Lane és Kalderon 1994; González-Reyes és mtsai. 1995; Deng és Ruohola-Baker 2000). Ezeknek a gének a follikuláris sejtektől származó polarizációs jelek kialakításában és a fejlődő petesejtnek való átadásában játszanak szerepet (6. ábra a bevezetésben) Mutánsaikban a fejlődő petesejt polaritása zavart szenved. Mikrotubulusok direkt és indirekt vizualizációjával kimutattuk, hogy a *Rab11* mutáns ivarsejtek mikrotubulus rendszerének polaritása szintén eltér a vadtípusétól (38. ábra).

38. ábra *Rab11* mutáns petekezdemények mikrotubulus szerkezetének összehasonlítása direkt és indirekt módszerrel

Felső panel: vadtípusú (vt) Rab11 mutáns petekezdeményben kinezin-LacZ fúziós fehérjét fejeztettünk ki, és annak seiten belüli elhelyezkedését ßgalaktozidáz festéssel tettük felvételeket láthatóvá. А interferencia kontraszt mikrosz-



kóppal készítettük. A vad típusú petekezdeményben a kinezin-LacZ fúziós fehérje a mikrotubulusok növekvő végét a petesejt poszterior póluson mutatja ki. A *Rab11* mutáns petekezdeményekben fejlődő petesejt közepén tapasztaltunk LacZ aktivitást, ami a petekezdemény mikrotubulus rendszerének megváltozott polaritására utal. Alsó panel: vad típusú és *Rab11* mutáns petesejtek mikrotubulus rendszerének direkt vizualizációja GFP jelölt *tau* mikrotubuluskötő fehérje segítségével. A felvételek pásztázó lézermikroszkóppal készültek. A vadtípusú (vt) petesejtben a mikrotubulusok koncentrációja jól kivehető anterior-poszterior irányú csökkenést mutat, jelezve, hogy a mikrotubulusok az anterior oldalon nukleálódnak és növekvő végükkel a poszterior irányba mutatnak. A *Rab11* mutáns petesejtben a mikrotubulus koncentráció azt jelzi, hogy a mikrotubulus nukleáció a kortex laterális részén is megtörténik. A legkisebb mikrotubulus koncentráció a petesejt belseje felé mutat.

Az oskar RNS-nek a mukrotubulusok mentén való szállításában résztvevő Kinesin1 motormolekula (Brendza és mtsai. 2000) a *Rab11* mutáns petesejtek középpontja körüli térrészben lokalizálódik. Ebből arra következtettünk, hogy a *Rab11* gén a petesejt polaritását biztosító mikrotubulus váz szerkezeti hibáját okozhatja, ami a mikrotubulusok mentén való szelektív *oskar* RNS szállítást lehetetlenné teszi, így okozva az ivarsejthiányos fenotípust. Ezt a feltételezést vadtípusú és a *Rab11* mutáns petesejtek mikrotubulus vázának direkt vizualizációjával erősítettük meg. A vad típusú petékben a mikrotubulusok jellegzetes anterior-poszterior irányultságot mutattak. A *Rab11* mutáns petékben, ezzel szemben, a mikrotubulusok növekvő végei a pete közepére mutattak (38. ábra), ami jól magyarázza mind a *Kinsin1* mind az *oskar* RNS középponti lokalizálódását. Kimutattuk, tehát, hogy a membrán transzport folyamatokat irányító *Rab* fehérjecsalád egyik tagja részt vesz a polarizált

.mikrotubulus rendszer fenntartásában. A fent összefoglalt kísérleti eredményeinket 2002-ben Dollar és mtsai. (2002) megerősítették. Mindkét publikáció végkicsengése az volt, hogy az *oskar* RNS hibás lokalizációját indirekt módon, a mikrotubulus rendszer polaritásának hibája okozza. Újabban a Rab fehérjéknek az RNS lokalizációban közvetlenebb szerepet is tulajdonítanak (Cohen 2005). A Robert Cohen által javasolt általánosított modell szerint a lokalizálódó RNS-ek transzport partikulumai membrán határolt vezikulumok külső részéhez tapadva mozognának a mikrotubulusok mentén. A vezikulumokat és egyben az RNS lokalizációs partikulumokat Rab fehérjék kötnék a mikrotubulus motor fehérjékhez (39. ábra). A *Rab11* fehérjének az *oskar* RNS lokalizációjában betöltött, a modellnek megfelelő közvetlen szerep még bizonyításra vár.



39 .ábra R. Cohen által javasolt általános RNS lokalizációs modell (Cohen 2005)

A fenti kísérlettel bizonyítottuk, hogy megfelelően megválasztott genetikai interakciókra pleiotróp gének azonosítására is alkalmas mutánsizolálási kísérletek építhetők. Az oskar⁵⁴, Tmll^{eg9} és Tmll^{eg20} allélok alkotta rendszereinknek azonban volt egy jelentős hiányossága. Nevezetesen mindkét érzékenyített háttér az érzékenyítő elemeket transz-heterozigóta formában hordozta. Ez az elrendezés a már meglévő mutációknak az érzékenyített háttérbe való bevitelét nagyban megnehezíti, így a gyakorlatban a meglévő mutánsgyűjtemények rendszeres szűrését nem teszi lehetővé. Ez igen jelentős hátránynak mondható, hiszen

időközben nagyszámú transzpozon indukált, pontosan térképezett mutáció került a mindenki számára elérhető mutánsgyűjteményekbe, melyek használatával a génazonosítás sokszor igen hosszadalmas munkája megtakarítható. Célul tűztük ki tehát, hogy olyan ivarsejthiányos érzékenyített hátteret találunk, melynek révén a meglévő mutánsgyűjtemények szűrését is végre tudjuk hajtani.

Anyai hatású ivarsejthiányos mutációk azonosítása három gén alléljaival érzékenyített genetikai interakción alapuló mutánsizolálási rendszerrel

Olyan érzékenyített genetikai hátteret kívántunk létrehozni, melyben az érzékenyítő allélok heterozigóta formában vannak jelen, ami az érzékenyített rendszert alkalmassá teszi már meglévő mutációk vizsgálatára is. A rendszer kialakítása érdekében Szuperák Milán szisztematikus keresésbe kezdett. Ismert ivarsejthiányos fenotípussal rendelkező mutációkból heterozigóta allélkombinációkat állított elő. Mivel egyetlen kettős heterozigóta mutáns sem bizonyult alkalmas érzékenyített rendszernek, azaz nem mutatott ivarsejthiányos fenotípust, hármas heterozigóta kombinációkkal próbálkozott, így állította elő az 40. ábrán bemutatott kísérleti elrendezést, amit az érzékenyítő allélok nevének kezdő betűiből alkotott betűszóval SOT rendszernek neveztünk el. A SOT rendszert egy harmadik kromoszómás, P elem indukált, letális törzsgyűjtemény szűrésével próbáltuk ki. Mintegy hatszáz független mutáns vonalat vizsgáltunk meg. A vizsgálat eredményét a 41. ábrán mutatom be.



Ivarsejthiányos fenotípus megállapítása boncolással

40. ábra A staufen, oskar és tropomiosinll gének mutáns alléljai alkotta SOT interakciós mutánsizolálási rendszer működési vázlata

A *staufen* (*stau*⁴³) *osk*⁵⁴ és *TmII*^{el4} allélokat az SM6b és a TM3 balanszerkromoszómákkal kiegyensúlyozott letális törzsként tartjuk fenn. Az ebből a törzsből származó nőstények utódai 13 %-os penetranciájú anyai hatású ivarsejthiányos fenotípust mutatnak. Ha az ilyen genotípusú nőstényeket bármilyen, már meglévő mutációt (itt egy PlacW inszerciót) hordozó hímmel párosítjuk, a következő generációban a három érzékenyítető, valamint a vizsgálni kívánt allélra nézve immáron négyes heterozigóta nőstények kiválogathatók a SM6b és a TM3 Sb Ser balanszerkromoszómák domináns markermutációinak hiánya alapján. A négyes heterozigóta tesztnőstények utódaiban boncolással állapíthatjuk meg az ivarsejthiányos egyedek arányát.

A SOT rendszerrel végzett kísérlet eredménye lényegesen különbözött a korábban bemutatott két gén alléljaival működő interakciós rendszerrel kapott eredményektől.

A SOT rendszerben ugyanis a megvizsgált mutációknak mintegy harmada enhanszerként vislekedett, vagyis megemelte az érzékenyített rendszer alap fenotípusát. Az enhanszer fenotípusok penetranciája folyamatos eloszlást mutatott (41. ábra). Az enhanszerek nagy száma és az inetrakciós fenotípus penetranciájának folyamatos eloszlása felveti azt a kérdést, melvik az a penetrancia küszöbérték, mely felett az interakciós fenotípus a megvizsgált mutációval azonosított gén szerepét nyilvánvalóan jelzi az ivarsejtek életében. A mért adatoknak a normál eloszlástól való eltérésének figyelembe vételével meg tudtuk határozni azt a penetrancia küszöb értéket, mely felett a fenotípus az adott gén nyilvánvaló szerepét jelzi az ivarsejtek kialakulásának szabályozásában (42. ábra).

dc_39_10



41. ábra A SOT rendszerben megvizsgált P elem indukált letális mutációk interakciós fenotípusának penetrancia eloszlása

A függőleges tengelyen a penetrancia értékek láthatók százalékban megadva a vízszintes tengelyen néhány reprezentatív törzset neveztem meg.

42. ábra A vizsgált mutánsok ivarsejthiányos fenotípusának a normál eloszlás szerint várt, és a kísérletben mért eloszlása

A vízszintes tengelyen az egyes vonalak ivarsejthiányos fenotípusának penetranciáját ábrázoltuk 10 százalékos bontásban. Az oszlopok magassága az adott penetranciaértékbe eső mutánsok számával arányos. A narancssárga oszlopok a normál eloszlási értékeket, a zöldek a mért adatokat mutatják. Látható, hogy a mért adatok a normál



eloszlástól a 60%-os penetrancia érték feletti tartományban térnek el. Ezek alapján a 60%os penetranciánál nagyobb interakciós fenotípust tekintettük enhanszer hatásnak. Megjegyzendő, hogy ez az érzékenyített rendszer alap penetrancia értékének (13%-nak) négy és félszerese.

A kísérleti rendszer gyors, egyszerű, kiválóan alkalmas bármilyen eredetű mutáns allél interakciójának gyors fenotípusos elemzésére, azóta is használjuk (Vilmos és mtsai. 2007).

Norbert Perrimon a "Genetic screening for signal transduction in the era of network biology" című összefoglalő közleményében hasonlóan viselkedő kísérleti rendszert ír le (Friedman és Perrimon 2007). Sejttenyészeteken végzett kísérletekben egy jól ismert szignál útra, a Drosophila embriók terminális struktúráit meghatározó torso/tailless útvonalra ható géneket kerestek. RNS interferencia kísérletükben, a megfigyelt fenotípus a szignálút végén levő (tailless) transzkripciós faktor aktivitása volt, melyet alkalmas módszerrel közvetlenül mérni tudtak. Kiderült, hogy a transzkripciós faktor aktiválódására igen sok gén volt hatással, jóval több, mint amit a szignálút által szabályozott fejlődési folyamat élő állatban történő fenotípusos vizsgálatával korábban azonosítottak. Kimutatták, hogy az egész állaton megfigyelhető fenotípust azok a gének mutatnak, melyek a transzkripciós faktor aktivitását jelző molekuláris fenotípus tekintetében kiemelkedően erős hatással voltak. A sejtekben mért molekuláris és az egyedszinten megfigyelt fejlődési jellegekben megnyilvánuló fenotípusok közötti érzékenységbeli különbség a fejlődési utak robosztus jellegére utal. A szerzők szerint a szignál utak inkább hálózatokként mintsem lineáris hierarchiába szervezhető információs láncként értelmezhetők. A hálózatok sok elemből állnak, melyek redundáns működésükkel robosztus működést tesznek lehetővé, mindazonáltal a klasszikus, egész állaton végzett fenotípus analízissel a hálózat legtöbb eleme nem mutatható ki. Alkalmasan érzékeny fenotípussal pl. egy transzkripciós faktor aktivitásának mértékével a korábbinál jóval több gén szerepe mutatható ki egy egy folyamat irányításában (43. ábra).



43. ábra A torso/tailles szignálút vizsgálati eredménye klasszikus mutáns fenotí-pussal, illetve a sokkal érzékenyebb molekuláris fenotípussal

A, a klasszikus fenotípusok alapján a szignálút kevés elemből álló lineáris hierarchiának tűnik fel kevés oldal irányú kapcsolattal. B, ugyanaz a szignálút sokelemű, hálózatos hierarchiának mutatkozik, ha a fenotípust molekuláris szinten mérjük. C, RNS interferenciával sejttenyészetekben géneket inaktiváltak és figyelték a *tailless* transzkripciós faktor aktivitási szintjét. A csendesítés okozta

tailles aktivitásváltozások mértékét az átlagtól való eltérés szerint (z-érték) rendezték. Az értékek folyamatos eloszlást mutattak, legalább nyolcezer csendesítés okozott jelentős eltérést az átlagtól. Az ábrán feltüntették a klasszikus fenotípust okozó mutációk helyét (kék, szürke területek). A fehér térrész jelöli a fenotípusos vizsgálatban nem, csak a molekuláris kísérletben fenotípust mutató géneket. D, a sejtenyészetben kivitelezett RNS interferenciás kísérlet eredményeinek hálózatos megjelenítése. A nagy z-értékkel bíró csendesítések olyan géneket határoznak meg melyek a hálózat központi részét képezik.

Úgy gondoljuk, hogy a SOT kísérleteinkben alkalmazott három érzékenyítő allél olyan finoman reagáló kísérleti rendszert alkot, ami érzékenység tekintetében a transzkripciós faktor aktivitási szintjének közvetlen mérésével összemérhető. Ennek tudjuk be, hogy a SOT rendszerrel kapott eredményink jellegzetességei, a folyamatos eloszlás és a nagyszámú interakciót adó mutáció jobban hasonlítanak a sejttenyészetekben végrehajtott kísérletre, mint a hagyományos fenotípust követő mutáns screenekre. Kísérleti rendszerünk tehát alkalmas lehet az ivarsejtképződés szabályozását irányító génhálózat távolabbi elemeinek feltérképezésére.

Arra nézve is van elképzelésünk, hogyan képes három gén részleges funkcióvesztése egy rendkívül érzékenyen reagáló genetikai hátteret alkotni. Pongor Sándor és munkatársai baktérium anyagcsere hálózatok számítógépes szimulációjával kimutatták, hogy az anyagcsere hálózat működése három-négy enzim részleges inaktiválásával legalább olyan erősen blokkolható, mint amilyet egy kulcsenzim teljes eltávolítása eredményez (Agoston és mtsai. 2005). Ők,

eredményeik nyomán a több hatáspontú gyógyszerek kifejlesztése mellett érvelnek. Pongor Sándorék eredménye a mi számunkra más fontossággal bír, azt üzeni ugyanis, hogy az ivarsejt kialakulás genetikai szabályozásának hátterében a baktérium anyagcsere hálózat összetettségével jellemezhető génhálózat van, más szavakkal az ivarsejt kialakulás folyamatának felderítése nagyszámú gén vizsgálatát igényli, melyre a reverz genetikai megközelítés látszik alkalmasnak.

Az ivarsejtdifferenciáció reverz genetikai vizsgálata

Reverz genetikai vizsgálataink előzményei

Az ivarplazmában lokalizált fehérjéket és RNS-eket először klasszikus genetikai módszerekkel azonosítottak. A "forward" genetikai megközelítés logikáját követve az ivarplazma hiányára utaló fenotípusú mutációkat izoláltak, meghatározták, hogy a mutációk milyen géneket érintenek, és végül kimutaták a géntermékek ivarplazma szerű lokalizációját (Golumbeski és mtsai. 1991; A Ephrussi és mtsai. 1991; Hay és mtsai. 1990; C. Wang és R Lehmann 1991; S Kobayashi és mtsai. 1993). A Drosophila ivarplazmán alapuló ivarsejtfejlődése, amikor is a petében a testi és az ivarsejteknek szánt anyai örökség fizikailag elkülönül, nagyszerű lehetőséget ad a reverz genetikai megközelítés sikeres alkalmazására. Az ilyen irányú reverz genetikai vizsgálatok az ivarplazmában lokalizált géntermékek fizikai azonosításával kezdődnének, majd jutnának el a kódoló génig, végül azok funkciójának vizsgálatához. A fizikai elkülönülést kihasználva próbálkoztak már ivarsejt specifikus transzkriptumokat azonosítani úgy, hogy a frissen lerakott petéket elülső és hátulsó

összehasonlították (Anne Ephrussi szóbeli közlés). Feltehetően a kis mennyiségű minta, valamint az alkalmazott összehasonlító módszer kis érzékenysége miatt ez a megközelítés sikertelen maradt. Ivarsejthiányos és vadtípusú embriók differential display módszerrel történő összehasonlításával azonban már eredményt értek el. Így sikerült, igaz egyetlen ivarsejt specifikus RNS-t, a *polar granule component* (Pgc) RNS-t azonosítani (Nakamura és mtsai. 1996). Az ivarseithiányos és vadtípusú egyedek RNS tartalmát DNS microarray kísérletben is összehasonlították (Arbeitman és mtsai. 2002). Mintegy száz ivarsejtekben expresszálódó gént azonosítottak úgy, hogy többek között ivarsejthiányos és vad, hím és nőstény egyedek RNS tartalmát hasonlították össze különféle életszakaszokban. Az ivarplazmában lokalizált RNS-ek azonosítására ez az átfogó összehasonlító módszer kevéssé alkalmas, ugyanis ebben a kísérletben az ivarsejthiányos felnőtt nőstényeket hasonlítottak össze vadtípusúakkal. így természetesen az ivarplazmában lokalizálódó RNS-eket a sokkal nagyobb számú, az ovárium egészében kifejeződő RNS-ek-től elkülöníteni nem lehet. Ezzel az általános microarray kísérlettel azonban bizonyították, hogy ez a technológia alkalmas ivarsejt specifikus gének azonosítására is. Érdemes megjegyezni, hogy Caenorhabditis elegans általános microarray kísérletekben, hasonlóan a Drosophilához, szintén azonosítottak specifikus taranszkriptumokat ivarseit ivarseithiánvos hermafroditáknak illetve hímeknek vadtípusokkal való összehasonlításával (Reinke és mtsai. 2000). Továbbá embrionális őssejtek és ivarsejttumorok vizsgálatával megindult microrray technika alkalmazása ivarsejtek а ez emberi (Sperger és mtsai. 2003). tanulmányozásában is Ezek a vizsgálatok természetszerűen embrionális ivarsejttenyészeteken, illetve ivarsejt eredetű tumor sejteken folynak, és így a normális fejlődésre csak korlátozottan érvényes adatokat

szolgáltatnak. Az eddigi reverz genetikai próbálkozásokról összefoglalóan annyit mondhatunk el, hogy az ivarsejt specifikus, vagy ivarplazmában lokalizált transzkriptumok megtalálásából, az őket kódoló gének azonosításából és a funkciójuk megértéséből álló háromlépéses megismerési folyamat mindezidáig csak az egyetlen gén, a Drosophila Pgc esetében történt meg (Nakamura és mtsai. 1996).

Ivarplazmában lokalizált RNS-ek keresése microarray technikával

Az ivarplazmában lokalizálódó RNS-ek azonosítására microarray alapú módszert dolgoztunk ki. Módszerünk azon az elgondoláson alapult, hogy az ivarplazma az ott lokalizálódó RNS-ek stabilitásáért is felelős. Feltételeztük, hogy az ivarplazma mennyiségének csökkentésével kevesebb RNS marad stabil, vagyis megfelelő eszközökkel koncentráció csökkenést mérhetünk. Az ivarplazma túltermelő petéktől éppen ellenkezőleg azt vártuk, hogy több RNS molekulát képesek stabilizálni, ami az ivarplazmában lokalizált RNS-ek koncentráció-növekedéséhez vezet. Az RNS molekulák mennyiségét microarray technológiával követtük. Esetünkben tehát a microarray technológiát nem a szokásos expressziós különbségek detektálására, hanem mRNS-ek stabilitásának mérésére kívántuk felhasználni. Irodalmi ismereteink szerint ivarsejtfaktorokat mRNS-eik stabilitása alapján még nem azonosítottak. Vizsgálataink kezdetén teljes genom Drosophila microarray eszközök még nem álltak rendelkezésre. Ezért egy 6400 gén transzkriptumát tartalmazó rendezett cDNS könyvtárat vásároltunk, és a Szegedi Biológiai Központ Funkcionális Genomikai Laboratóriumában egy sajátkészítésű 3200 mérőponttal rendelkező cDNS micoarray lemezt készíttettünk. A mérésekhez szükséges megváltozott ivarplazma tartalmú petéket az oskar RNS lokalizációjára ható mutációk segítségével állítottuk elő.

Ismert tény ugyanis, hogy az oskar mRNS mennyiségének csökkentése az ivarplazma mennyiségének csökkenésével, növelése annak növekedésével jár (Smith és mtsai. 1992; A Ephrussi és R Lehmann 1992). Mások és részben saját eredményeink nyomán az oskar RNS mennyiségét szabályozó mutációknak egész sora állt rendelkezésünkre. Különböző *TMII* és oskar mutációk segítségével (*eg*²⁰, *gs*¹, *eg*⁹, *osk*^{A87}, *osk*⁵⁴), eltérő mértékben csökkent, illetve megnövekedett (*oskbcd3'UTR*) mennyiségű ivarplazmával rendelkező mutáns kombinációt állítottunk elő. Az így létrehozott kondíciókra jellemző RNS-ek mennyisége ivarplazma hiány esetén csökkent, ivarplazma felesleg esetében pedig nőtt. A 3200 transzkriptum vizsgálatára alkalmas microarray lemezünk segítségével hatvan RNS-fajtát találtuk ilyennek (44. ábra).



44. ábra A hatvan ellenőrzésre kiválasztott transzkriptum microarray adatának megjelenítése. Tree view program segítségével.

Az ábra jobb oldalán található függőleges oszlop az ivarplazma RNS-ektől elvárt mintázatot mutatja. A transzkriptumoknak a vadtípusú kontrolhoz hasonlított csökkenését vagy növekedését a zöld és piros színekkel jelöltük. A színárnyalatok 5X-ös csökkenési és növekedési tartományt fognak át. A fekete jelölés a kontrollal azonos szintet a szürke pedig adathiányt jelez. Az eg²⁰, gs¹, eg⁹, osk^{A87}/osk⁵⁴ a *TmII* és *oskar* gén mutációiból álló genetikai hátterek ivarplazma csökkenést vagy hiányt okoznak. Az *oskbcd3'UTR* egy ivarplazma túltermelő transzgén, melynek hatására ivarplazma alakul ki a pete anterior oldalán is. R (Replica) betűvel a kísérletek technikai ismétlését jelöltük. Az X kromoszómán található *white* gén alléljait w jelöli. A microarray adatok megjelenítését a *Tree view* program segítségével végeztük (Eisen és mtsai. 1998).

In situ RNS hibridizációval ellenőriztük a microarray kísérletben azonosított hatvan reménybeli ivarplazmában lokalizálódó RNS valódi lokalizációját. Tizenhét esetben vagy a poláris plazma lokalizációt (45. ábra), vagy poszterior póluson való erős feldúsulást tapasztaltunk (46. ábra; Szuperák és mtsai. 2005). A microarray analízissel és az azt követő *in situ* hibridizációs ellenőrzéssel a vizsgált gének 0,5 %-áról állapítottuk meg, hogy transzkriptumaik az ivarplazmában feldúsulnak.



45. ábra A microarray kísérletben azonosított, az ivarplazmában oskar-szerűen lokalizált RNS-ek *in situ* hibridizációja

A-D, kontrol kísérlet. A, *oskar* RNS poszterior lokalizációja vad típusú preblasztoderma és B, blasztoderma embriókon. C, az *oskar* RNS az *oskbcd3'UTR* transzgént hordozó anyától származó preblasztoderma embriókon mind a vadtípusú poszterior oldalon, mind az ektopikus anterior oldalon akkumulálódik. D, Az *oskar* RNS az *oskbcd3'UTR* transzgént hordozó anyától származó blasztoderma embriókon mind a vadtípusú poszterior oldalon, mind az ektopikus anterior oldalon lefűződő ivarsejtekben megtalálható. (E–H), CG11371; (I–L), shu; (M–P) Pros45 (Q–T) *tgo* RNS-ek lokalizációs mintázata az *oskar* RNS-éhez hasonló.



46. ábra A microarray kísérletben azonosított, az ivarplazmában nem oskar-szerűen lokalizált RNS-ek *in situ* hibridizációja

A-B, *CG4424*; C-D, *mRpL54* és E-F, *CG2976* RNS-ek *in situ* hibridizációja vad típusú anyáktól származó embriókon. A,C,E az oskar RNS-nek preblasztoderma embrióban megfigyelt szoros poszterior lokalizációja helyett poszterior-anterior grádiens szerű lokalizáció. B,D,F a blasztoderma embriókban az oskar RNS-szerű mintázatot detektáltunk. G,H a *CG5455* és I,J a *CG2493* gének transzkriptumai ellentétesen viselkednek. G,I, a preblasztoderma embriókban szoros oskar-szerű lokalizációt mutatnak, azonban H,J a blasztoderma stádiumban a lefűződő embrionális ivarsejtekben már nem találhatók meg. A G,H,I,J *in situ* hibridizációk oskbcd3'UTR transzgént hordozó anyáktól származó embriókon készültek

Azóta ezt a kísérletet megismételtük Affymetrix gene chip 2 teljes genom Drosophila microarray platformon is. Ez a kísérlet mintegy száz új potenciális ivarplazmában feldúsuló mRNS fajtát eredményezett, azonban ezek *in situ* hibridizációval történő ellenőrzését már nem hajtottuk végre. Időközben ugyanis a genomprogramhoz kapcsolódó rendszeres *in situ* hibridizációs kísérletek eredményeképpen genomszintű adatbázisok jöttek létre, melyekben a gének mintegy feléről találhatunk expressziós adatokat (Lécuyer és mtsai. 2007; Tomancak és mtsai. 2002).

Embrionális ivarsejt transzkriptóm összeállítása

A microarray kísérletekben és az azt követő *in situ* hibridizációs kísérletekben az általunk azonosított ivarplazmában feldúsuló transzkriptumok jegyzékét három forrásból származó adattal egészítettük ki. A csendesítésre szánt RNS-ek listájába

felvettük a BDGP és Fly-FISH adatbázisokból illetve (Shigenobu és mtsai. 2006) közleményéből az ivarplazmára és a korai embrionális ivarsejtekre és az embrionális gonádokra specifikus transzkriptumokat (Lécuyer és mtsai. 2007; Tomancak és mtsai. 2002). A végeredmény egy 502 RNS-ből álló gyűjtemény lett, ami a ma legteljesebben összeállítható transzkriptóm, mellyel a Drosophila embrionális ivarsejtek kialakulásuktól az embrionális gonádformálódásig jellemezhetők. Meg kell jegyezni azonban, hogy az általunk összeállított transzkriptom nem teljes, ugyanis a BDGP és Fly-FISH összesen 4644 gént vizsgál, ami a *Drosophila melanogaster* genomprogram 5.23 frissítése (2009. október) szerint a genomban elhelyezkedő gének mindössze 31,2%-át jelenti. Shigenobu-ék és a saját transzkrip analizisünk is részleges, hiszen Shigenobu-ék csak az embrionális gonádokban kifejeződő géneket vizsgálták, a saját *in situ* hibridizációval ellenőrzött microarray kísérletekünkben pedig csupán 3200 gén termékét vizsgáltuk meg. Célul tűztük ki ennek az ivarsejt transzkriptomnak funkcionlis analízisét.

Az RNS interferencia a nagyléptékű reverz genetikai kísérletek alkalmas eszköze

A C. elegansban megismert RNS interferencia (RNAi) más organizmusokban is, így a Drosophilában is működik (Hunter 1999). Az első Drosophila alkalmazás ugyan még sejtvonalon történt, de az élő Drosophilán végzett kísérletek sem várattak sokat magukra (Clemens és mtsai. 2000). Első egész állaton való Drosophila alkalmazás az ezredfordulón történt meg (Kennerdell és Carthew 2000). Azóta az RNS interferencia a Drosophila genetika egyik legfontosabb eszközévé vált. Drosophilában kettős szálú RNS alapú RNAi terjedt el. Ennek lényege, hogy az RNS

interferencia ható molekuláját, a 21-23 bp hosszú small interfering RNS-t (siRNS-t) több száz bázispáros kettős szálú prekurzor RNS-ből magával a kísérleti állattal állíttatjuk elő. Drosophilában a hosszú kettős szálú RNS prekurzor molekulák sejtekbe juttatásának két módja ismeretes. Legtöbbször a genomba stabilan integrált transzgénekről a prekurzor molekulát is a Drosophila sejtek termelik. A Drosophila közösség számára két publikus törzsgyűjtemény áll rendelkezésre, melyből génspecifikus kettős szálú RNS-t termelő transzgenikus törzsek megrendelhetők VDRC (Dietzl és mtsai. 2007;, NIG-Fly (http://flybase.org). A törzsgyűjteményekből származó RNS interferenciás törzsekkel gyakorlatilag az összes fehérjekódoló gén csendesítése megvalósítható. Sajnos a törzsgyűjteményekben rendelkezésre álló RNS interferenciás törzsek ivarsejtekben történő géncsendesítésre nem alkalmasak, ugyanis bennük a kettős szálú RNS molekulákat egy testi sejt specifikus indukálható (UASt) promóteren keresztül lehet aktiválni. ĺgy az ivarsejt specifikus transzkriptumok vizsgálatára a kettősszálú RNS-ek bejuttatásának ritkábban használt módját, az injektálást lehet alkalmazni.

Az ivarsejt transzkriptóm funkcionális analízise RNS interferencia segítségével

Egy injektáláson alapuló RNS interferenciás kísérletsorozat során az általunk összeállított embrionális ivarsejt transzkriptómnak mind az 502 elemét megvizsgáltunk. A gén specifikus dsRNS-eket Michael Boutros teljes genomra kialakított dsRNS gyűjteményéből válogattuk ki (Boutros és mtsai. 2004). A dsRNSeket 1µg/µl koncentrációjú töménységben injektáltuk. Irodalmi adatok (Koizumi és mtsai. 2007) és kontrolkísérleteink alapján e koncentráció mellet mérhető ki a legerősebb specifikus RNS interfernecia a lehető legalacsonyabb aspecifikus letalitás mellett. Egy-egy dsRNS oldattal 60 db, nos>moe:GFP:nos3'UTR

anyáktól származó preblasztoderma embriót injektáltunk. Az ilyen injektált embriók később kialakuló ivarsejtjei a GFP fluoreszcens fehérjét fejezik ki, lehetővé téve ez által az ivarsejtek sorsának fluoreszcens mikroszkóppal való követését. Az RNSi fenotípust automatikus videomikroszkópiával detektáltuk úgy, hogy minden egyes embrióról az embrionális gonád kifejlődéséig 10 percenként felvételeket készítettünk. A 80-90 felvételből álló képsorozatokat az ImageJ szoftver segítségével mozgó képpé illesztettük össze. A mozgóképeket szabad szemmel értékeltük. A géncsendesítő kísérletsorozat negatív kontroljaként injektáló pufferrel injektáltunk, ezzel meghatároztuk az injektálás műveletéből fakadó aspecifikus fenokópiák előfordulási gyakoriságát. Azt, hogy a dsRNS, mint molekulaféleség, nem okozza az ivarsejt fejlődés zavarát, úgy teszteltük, hogy véletlenszerűen hét olyan gént csendesítő dsRNS-t injektáltunk, melyek sem fejeződnek ki Drosophila embrióban (Pilot és mtsai. 2006). Ezeknél a géncsendesítéseknél nem tapasztaltunk a pufferrel injektált kontrolhoz képest emelkedett penetranciájú ivarsejteket érintő mutáns fenotípust. A kísérletsorozat pozitív kontroljaként az ismerten ivarsejthiányos allélokkal bíró nanos gént csendesítettük. Ebben az esetekben reprodukálni tudtuk a korábban leírt ivarsejtfejlődési fenotípusokat (Kobayashi és mtsai. 1996).

A kísérletsorozatban összesen 32500 embriót injektáltunk, melynek 73 %-a élte túl az injektálást. A kísérleti procedúrát túlélt állatokról készült mozgóképek vizsgálatával megállapítottuk az abnormális ivarsejtfejlődést mutató embriók arányát. Mivel a fluoreszcens videomikroszkópia nem invazív eljárás, az embrionális fenotípusok felvétele után az injektált állatokat felnőtt korig nevelhettük, és boncolással megvizsgálhattuk a felnőtt ivarsejthiányos fenotípus arányát is. Azt az RNSi kísérletet tekintettük pozitív eredményűnek mind az embrionális mind a felnőtt

fenotípusok esetén, ahol a negatív kontrol kísérletben tapasztalt ivarsejt fejlődési rendellenesség penetranciájának kétszeresét figyeltük meg (47. ábra).



47. ábra A korai embrionális ivarsejt transzkriptóm RNS interferencia alapú funkcionális analízisének eredménye

A kék háromszögek az 508 RNSi kísérletekben kapott ivarsejt fenotípus penetrancia értékét jelöli %-ban kifejezve. A sárga háromszög a negatív kontrolok eredményét, a piros háromszögek, azok átlagát jelölik. A, az elsődleges screenben tapasztalt embrionális ivarsejt fenotípusok penetranciájának eloszlása. B, felnőtt ivarsejthiányos fenotípusok penetranciájának eloszlása.

Ennek a kritériumnak összesen 128 géncsendesítés felelt meg. Ezt a 128 géncsendesítést megismételtük. A technikai ismétlés során 62 gén esetében tapasztaltunk reprodukálható ivarsejt fenotípust. A 62 gén közül 57-re új, a korábbitól eltérő génszakaszra specifikus géncsendesítő dsRNS-eket terveztünk és készítettünk. Az új dsRNS-ekkel csendesítéseket végeztünk, majd ezek technikai ismétlését is elvégeztük. Végeredményben tehát az 502 elemből álló Drosophila embrionális ivarsejt transzkriptóm tizede mutatott interferencia kísérletünk során ivarsejtspecifikus fenotípust.

Az ötvenhét reprodukálható ivarsejt fenotípust okozó RNSi midegyikét kétféle dsRNSsel is kiváltottuk, és mindkétszer technikai ismétlést is végeztünk. Ennek

megfelelően minden RNSi esetében összesen négy kísérlet eredményét rögzítő mozgókép felvételünk volt. Ezeket a felvételeket részletesen kiértékeltük, úgy hogy a megfigyelhető fenotípusokat finomabb kategóriákba soroltuk. Az egyes fenotípus kategóriáknál csak azokat az eredményeket tekintettük reprodukálhatónak, ha a négy mérésből legalább három esetben kontrol értékre jellemző penetrancia érték kétszeresét figyeltük meg. A következő fenotípusos kategóriákat állapítottuk meg: az ivarsejtek hiánya, a vadtípusnál kevesebb ivarsejt, a bélkezdeményekbe be nem jutó ivarsejtek, a bélkezdeményben maradt sejtek, az összes ivarsejt a bélben marad, az ivarsejtvándorlás folyamán eltévedt ivarsejtek, rossz gonád kompaktálódás, aszimmetrikus gonád, egyetlen gonád valamint a gonádok teljes hiánya. A géncsendesítések által előidézett fenotípus kategóriák kontrolhoz mért változásait hőtérkép segítségével jelenítettük meg. A hőtérképen a fenotípus adatokat gének és a fenotípusok szerint hierarchikus klaszterezéssel rendeztük és a Multi Experiment Wiever program segítségével ábrázoltuk (48. ábra).

Az RNS interferenciás kísérletben megfigyelt fenotípus kategóriák közötti összefüggések

Az általunk felállított fenotípus kategóriák közül több nyilvánvalóan nem független egymástól, pl. "egy gonád", "aszimmetrikus gonád". Azonban a fenotípus kategóriák klaszterezése előre nem sejtett összefüggéseket is megvilágított az egyes kategóriák között. Az "eltévedt ivarsejt" és "bélben maradó ivarsejt" fenotípus kategóriák például szoros összefüggést mutattak. Ezt a jelenséget azzal magyarázzuk, hogy az ivarsejteknek a bélfalon való hibás átlépése az egyes fejlődési mozzanatok időbeni



48. ábra A Drosophila embrionális ivarsejt transzkriptóm RNS interferenciával megvalósított funkcionális analízisének eredménye

Az egyes gének csendesítése során tapasztalt fenotípusokat tíz kategóriába soroltuk. Kategóriánként a kontrolhoz mért különbséget (2-25 –szörös változás) a szürke árnyalataival jelöltük. A kétszeres penetrancia növekedést meg nem haladó értékek fehér jelölést kaptak. A hierarchikus klaszterezéssel kialakított dendrogramm ághosszak a Pearson korrelációs együtthatóval arányosak. A tapasztalt négy génklasztert zöld, kék, piros és sárga színekkel különböztettük meg.

szétkapcsolódásához vezetnek. Stein és mtsai. hasonló fenotípust figyeltek meg a

slam mutánsban, pontosan leírva azt, hogy azok az ivarsejtek, melyek nem jutnak ki

időben a középbél-kezdeményből, lemaradnak az embriogenezis egyik jelentős morfogenetikai mozgásáról a germband retraction folyamatról, így a későbbi embrionális gonádformálódásról (Stein és mtsai. 2002). Az ilyen ivarsejtek az embrionális gonádhoz nem kapcsolódnak, eltévednek. A "kevés embrionális ivarsejt" és a "rossz gonádkompaktálódás" fenokópiák szintén kapcsoltságot mutattak. Megfigyelésünk hátterében valószínűleg az áll, hogy a gonád-kialakuláshoz egy minimális ivarsejtszám szükséges. A minimális ivarsejtszám alatt a kevés ivarsejt helyzete hiába megfelelő, de a gonád nem alakul ki.

A gének szerinti kalaszterezés fő célja, hogy az egyes ivarsejtfejlődési részfolyamatokban közösen működő géncsaládokat tudjunk kimutatni. A kalszterezés négy világosan elkülönülő géncsoportot jelöl ki.

Az első klasztert a bélben maradó és a testüregben eltévedő fenotípusok kombinációja jellemzi. Ez a géncsoport tíz tagból áll, jellegzetes képviselője a CG8116 gén. Elgondolásunk szerint az ebbe a klaszterbe tartozó gének csendesítésénél az ivarsejtek a bélből való kijutása, vagy a testüregi vándorlása szenvedett hibát. Ebbe a klaszterbe tartozó gének valószínűleg az ivarsejtek aktív vándorlásához szükséges faktorokat kódolnak.

A második klaszter tizenöt tagot számlál, jellemzője, hogy a csendesített gének mindig okoztak olyan fenotípust, ahol az összes ivarsejt a középbélkezdeményben maradt, emellett gyakran megfigyelhető volt az ivarsejtek kimaradása a bélkezdeményből. A csoport egyik jellegzetes képviselője a *Tre-1* gén, melyről már korábban ismert volt, hogy mutánsában az embrionális ivarsejtek a középbélben maradnak (Kunwar és mtsai. 2008). Ezek a gének legvalószínűbben a bélsejtekkel való kapcsolattartásban illetve a bél falának áttörésében játszanak szerepet.

A harmadik klaszterbe tizenkét gén tartozik. Közös jellemzőjük, hogy csendesítéseik által a középbél-kezdemény betűrődéséből kimaradó ivarsejteket figyeltünk meg. A középbél kezdemény betűrődésekor a bél lumenébe történő bejutást az ivarsejtek szempontjából passzív folyamatnak tartják. Elképzelhető, hogy ennek a klaszternek egyes elemei, eddig ismeretlen módon, az ivarsejtekben expresszálódva hozzájárulnak az ivarsejtek bélbe való bejutásához.

Az utolsó és egyben legnépesebb klaszter tizennyolc gént tartalmaz, melyek csendesítésekor a rossz gonádformálódás volt a jellegzetes fenotípus, de emellett gyakran tapasztaltunk, hogy az embrióknak kevesebb ivarsejtje van, vagy azt, hogy azok kimaradnak a középbél kezdeményből. Ezek a gének a korai ivarsejtek osztódásáért, az ivarsejtek szexdeterminációjáéért, illetve a mezoderma sejtekkel való kapcsolattartásért lehetnek felelősek.

Két gént Mcm6, Lis-1) nem tudtunk egyik klaszterbe sem beilleszteni, ezek azonban egymáshoz hasonló fenotípus-eloszlást mutattak.

Az egy klaszterbe tartozó gének között feltételezésünk szerint nagyobb valószínűséggel találunk a genetikai szabályozási szerveződésben közel álló, egymással genetikai interakcióba lépő, vagy akár fizikai kapcsolatban lévő faktorokat kódoló géneket. A későbbiekben az egyes klaszterekbe tartozó géneket együttesen kettősmutáns analízissel, fehérjekolokalizációs kísérletekkel is kívánjuk vizsgálni.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A P elem inszerciók széli szekvenciáinak meghatározása

A P elem széli szekvenciáinak meghatározására a Berkeley Drosophila Genom Project (BDGP) által kidolgozott módszert használtuk (http://www.fruitfly.org/about/methods/inverse.pcr.html). 10 µl tisztított genomi DNS-t négy bázis felismerésű restrikciós enzimekkel (Mbol, Hpall) 3 óráig 20 µl végtérfogatban emésztettük. (10 µl gDNS, 2 µl 10x puffer, 1 µl RNáz 10 mg/ml, 6 µl dH₂O, 1 µl enzim.) Az emésztés során létrejött fragmenteket éjszakán át taró T4 DNS ligáz kezelésel 4 °C-on körré zártuk. (10 µl gDNS, 40 µl 10x ligáz puffer, 350 µl desztillált víz és 2 µl T4 DNS ligáz.) A széli szekvenciák amplifikálását inverz PCR segítségével, P-elem specifikus primerekkel (Plac1, Plac4) végeztük el. A reakcióelegy összetétele: 3 µl ligált, megközelítőleg 1/15 felnőtt légynek megfelelő genomi DNS, 1 µl 10mM-os dNTP keverék, 1 µl 10µM-os forward primer (Plac4), 1 µl 10µM-os reverse primer (Plac1), 5 µl 10x Tag puffer, 3 µl MgCl₂, 35.5 µl dH₂O és 0.5 µl rekombináns Tag polimeráz (Fermentas). Az amplifikációt a következő PCR program segítségével hajtottuk végre: 1x: 95 °C 5 perc, 35x: 95 °C 30 sec./ annealing hőmérséklet: 60 °C, 1 perc/ extenziós hőmérséklet: 68 °C, 2 perc, 1x: 72 °C 10 perc, majd 4 °C. A PCR reakció 1/10-ét 1%-os agaróz gélen vizsgáltuk meg. Ha a termék nem volt kellő tisztaságú, akkor az első PCR reakcióelegyet az 1000-szeresére hígítottuk, majd azt templátként használva egy második, nested PCR-t indítottunk, két belső, P elem specifikus primerrel (Sp1 és Plac2). A második PCR reakció paraméterei megegyeztek az elsővel, kivéve az annealing hőmérsékletet, ami ebben az esetben 55 °C volt. A PCR reakciókból a termékeket 1%-os, preparatív agaróz gélen választottuk el. A PCR termékeket gélroncsolásos fragmentizolálási
technikával izoláltuk, majd Miniprep Express DNS tisztító mátrix segítségével tisztítottuk. A tiszta DNS mintákat az Sp1 primer segítségével megszekvenáltattuk.

Digoxigenin (DIG) jelölt DNS, illetve RNS próba szintézis

DNS jelöléshez a kívánt célszekvenciát hordozó plazmidot megfelelő enzimekkel linearizáltuk, majd gélből visszaizoláltuk. 1 µg DNS-t tíz percig denaturáltuk 100 °Con, majd hozzáadtunk random hexanukleotid keveréket, a jelölt nukleotidokat is tartalmazó dNTP keveréket és Klenow enzimet, majd 16 órán át inkubáltuk az elegyet 37 °C-on (a Roche protokollja szerint). A reakciót 2 µl 0,2M pH 8-as EDTAval állítottuk le, majd 2,5 µl 4M LiCl-ot és 75 µl -20 °C-os 96%-os etilalkoholt adtunk hozzá és -80 °C-on a termékeket kicsaptuk. Centrifugálás és 75%-os alkohollal való mosás után a csapadékot beszárítottuk, majd 50 µl TE pufferben oldottuk fel. A próba ellenőrzéséhez 1µl mintához 5 µl 5xSSC-t adtunk, az elegyet 5 percig forraltuk, majd gyors lehűtés után tíz-, száz- és ezerszeres hígítást készítettünk, és 2 µl-t pozítívan töltött poliamid membránra cseppentettünk. Száradás után a DNS-t UV fénnyel keresztkötöttük a membránra. A filtert eppendorf csőbe helyeztük, majd kétszer öt percig mostuk PBT-ben. Ezután a mintát harminc percig állni hagytuk blokkoló oldatban (0,5% Roche blokkoló reagens PBT-ben). A membránt híaítású alkalikus foszfatázzal koniugált anti-Digoxigenin kétezerszeres ellenanyaggal inkubáltuk egy órán keresztül, majd festő pufferrel (100mM 9,5 pH Tris, 100mM NaCl, 50mM MgCl₂) mostuk háromszor öt percig. A színreakció előhívó pufferben (3,5 µl X-foszfátot és 4,5 µl NBT-t tartalmazó festő puffer, 1 ml) játszódott le, amit kétszeres PBT-s mosással állítottunk le. A jelölés sikerességét a Roche jelölt kontroljaihoz hasonlítottuk.

Az RNS-jelöléshez a kívánt célszekvenciát hordozó plazmidot megfelelő enzimekkel linearizáltuk, majd 2,5 µl 4M LiCl-ot és 75 µl -20 °C-os 96%-os etilalkoholt adtunk hozzá és a termékeket -80 °C-on kicsaptuk. Centrifugálás és 75%-os alkohollal való mosás után a csapadékot beszárítottuk, majd 50 µl DEPC kezelt vízben feloldottuk. A jelölő reakcióelegybe 1,5 µg DNS-t, 4 µl 5x transcripciós puffert, 1 µl ribonukleáz inhibítort, 2 µl RNS polimerázt és 1,5 µl Digoxigenin jelölt NTP-t is tartalmazó NTP keveréket tettünk, majd a reakcióelegyet vízzel kiegészítettük 20 µl-re. A reakcióelegyet egy éjszakán át 37 °C-on inkubáltuk. A reakciót 2 µl 0,2M EDTA hozzáadásával állítottuk le, majd a termékeket LiCl-os kicsapással tisztítottuk. A jelölt RNS-eket 50 µl hibridizációs oldatban oldottuk fel.

RNS in-situ hibridizáció embriókon

A *Drosophila* Gene Collection Release1 cDNS gyűjteményből származó plazmidokat Promega miniprep express plazmidizoláló kittel tisztítottuk, majd megfelelő enzimekkel linearizáltuk. Antiszensz digoxigenin-jelölt RNS próbákat szintetizáltunk DIG RNS jelölő kit segítségével (Roche). 0-3 órás petéket gyűjtöttünk, 50%-os hypóban enyhe rázogatással 2-3 perc alatt dekorionizáltunk, végül műanyaghálón összegyűjtve folyó vízzel alaposan leöblítettük. Az embriókat n-heptán:fixáló oldat 1:1 arányú elegyében rázatva 20 percig fixáltuk (a fixáló összetétele: 0,05M EGTA, 10% formaldehid PBS oldatban). A fixálót tartalmazó alsó fázist -20 °C-os metanolra cseréltük le, és erős rázással az embriók vitellin burkát eltávolítottuk. Ezután eltávolítottuk a felső, szerves fázist, majd az embriókat néhányszor metanollal mostuk. A fixált embriókat vagy rögtön felhasználtuk, vagy a további kísérletekig -20 °C-on tároltuk. Az embriókat metanol:PBT (0.1% Tween20-at tartalmazó PBS) 1:1 arányú elegyében 5 percig forgatva rehidráltuk, majd a mintákat 4% formaldehidet

tartalmazó PBT-ben 25 percig újra fixáltuk. A fixáló oldatot ötszöri PBT-ben való mosással távolítottuk el. Az embriókat 5µg/ml Proteináz-K-t tartalmazó PBT oldattal kezeltük. A mintát újra ötször mostuk PBT-vel, majd 4%-os formaldehid tartalmú PBT-ben utófixáltuk. Négy újabb mosás után az embriókat PBT:hibridizációs oldat (50% formamid, 0.1% Tween20, 0.05 mg/ml heparin és 0.1 mg/ml tRNS 5XSSC oldatban) 1:1 arányú elegyében inkubáltuk 10 percig szobahőn, majd hibridizációs oldatban 55 °C-on egy órán át. 100 ng DIG jelölt RNS-t öt percig 80 °C-on kezeltük, majd 50 µl hibridizációs oldatban feloldottuk, majd a mintákra helyeztük, és 55 °C-on egy éjszakán át hibridizáltattuk. Másnap az embriókat hibridizációs oldatban mostuk hatszor húsz percig 55 °C-on, majd egy órán keresztül 2000-szeres hígítású, embriókon kimerített, alkalikus foszfatázzal konjugált anti-Digoxigenin ellenanyaggal inkubáltuk. Az ellenanyagot kétszer tíz perces PBT-s mosással távolítottuk el, majd a jelet 0,45% NBT-t és 0,35% X-foszfátot tartalmazó festő oldat segítségével hívtuk elő. Az embriókat mosás után tárgylemezre helyeztük, és glicerin:10xPBS 9:1 arányú elegyében fedtük le, majd Zeiss Axioscope II interferencia-kontraszt mikroszkóppan vizsgáltuk, és a készülék Axiocam CCD kamerájával és Axiovision szoftverével képeket készítettünk.

RNS in situ hibridizáció ováriumokon

A kétnapos, jól táplált nőstények petefészkeit jégen, PBT oldatban boncoltuk ki, majd 4% paraformaldehidet, 0,2% CLOROX hypo-t és 10% DMSO-t tartalmazó PBT-ben fixáltuk 20 percen keresztül. Kétszeri ötperces PBT-s mosás után 5 percig 50 µg/ml töménységű Proteináz-K oldattal kezeltük. A Proteináz-K enzimet-t 2 mg/ml-es glicinnel blokkoltuk, a petefészkeket 5 percig PBT-vel mostuk, majd 20 percig -20 °C- on metanol:DMSO 9:1 arányú elegyében inkubáltuk. Ezután a mintákat kétszer öt

percig PBT-ben, majd öt percig PBT:hibridizáló puffer 1:1 arányú elegyével mostuk. A prehibridizációt 55 °C-on, hibridizáló pufferben végeztük. A hibridizáció hibridizáló pufferben százszorosára hígított DIG-jelölt próbákkal 55 °C-on 16 órán keresztül történt. A petefészkeket ezután 15 percig 55 °C-os hibridizáló pufferben, majd újabb 15 percig szobahőmérsékletű PBT:hibridizáló puffer 1:1 arányú elegyében mostuk. A mintákat kétszer tíz percig PBT-vel öblítettük, majd egy órán át 2000-szeres hígítású, ováriumokon kimerített anti-DIG ellenanyaggal inkubáltuk szobahőmérsékleten. Az ellenanyagot kétszer tíz perces PBT-s mosással távolítottuk el, majd a jelet 0,45% NBT-t és 0,35% X-foszfátot tartalmazó festő oldat segítségével hívtuk elő. Az embriókat mosás után SuperFrost tárgylemezre helyeztük, és glicerin:10xPBS 9:1 arányú elegyében fedtük le, majd Zeiss Axioscope II interferencia-kontraszt mikroszkóppan vizsgáltuk, és a készülék Axiocam CCD kamerájával és Axiovision szoftverével képeket készítetünk.

Embriók immun-hisztokémiai festése

Az 1-2 órás petéket gyűjtöttünk, Ringer oldatban mostuk, majd kétszeresre hígított Chlorox hypóban áztattuk a chorion burok eltávolítása érdekében. A dekorionizált petéket PBS-ben történő (130mM NaCl, 7mM Na₂HPO₄, 3mM NaH₂PO₄, pH=7.5) mosást követően fixáltuk. A fixáló pufferhez (0,1M PIPES, 2mM MgSO₄, 1mM EGTA, 0,03% NaN₃, pH=6.9 NaOH vagy HCl oldattal beállítva) tized térfogatú formaldehidet, majd azonos térfogatú n-heptánt adtunk (üvegcsőben, a tapadás megakadályozása celjából). Alapos összerázást követően forgókeréken 14 percig fixáltuk az embriókat. Ezután az alsó, vizes fázist eltávolítottuk és azonos térfogatú –20°C-os metanollal erőteljesen ráztuk, kb 1 percig. Ezzel a belső, vitellin membránt távolítottuk el. A devitellinizált embriók az elegy aljára süllyedtek. Ezeket az embriókat új csőben

először 4 °C-os metanollal, majd 1xPBT-vel (1xPBS + 0,1% Triton X-100 +0,1%BSA) mostuk, mindkét esetben 2-szer 5 percig. A fixált embriókat kétszer 30 perces PBT-s mosást követően egy éjszakán át inkubáltuk folyamatos rázogatással 4°C-on az elsődleges ellenanyagban, amit PBT-N-ben (PBT+2% BSA+5% FCS+0.02% NaN₃) hígítottunk. Másnap az elsődleges ellenanyag eltávolítása után 3x5 perces majd 4x30 perces PBT-s mosás következett. Ezután a másodlagos ellenanyaggal inkubáltuk szobahőmérsékleten 2 órán keresztül, amelyet PBT-N-ben hígítottunk. Ezt követően 2 órától egy éjszakán át mostuk PBT-ben. A a mosásokat követően az embriókat tárgylemezre helyeztük és 4% n-propil-gallát, 80% glicerin pH=9.5 összetételű médiummal lefedtük, majd fénymikroszkóppal vizsgáltuk a megfelelő szűrők alkalmazásával, Zeiss Axioscope II, mikroszkópot használva.

Petekezdemények immun-hisztokémiai festése

Ováriumokat EBR (10mM HEPES pH=6.9, 130mM NaCl, 5mM KCl, 2mM CaCl₂) oldatban boncoltuk, Eppendorf csőbe gyűjtöttük és jégen tároltuk a fixálásig. A mintákat 10 percig folyamatosan forgatva fixáltuk 1 térfogat fixáló puffer (100mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ pH=6.8, 450mM KCl, 150mM NaCl, 20mM MgCl₂), 4 térfogat dH₂O és 1 térfogat 37% formaldehid keverékében, amit frissen készítettünk. A fixált ováriumokat 3-szor öblítettük, majd 30 percig mostuk PBT-ben. Végül a mitát 30 percig PBT-N-ben inkubáltuk. Az így előkészített ováriumokat PBT-N-ben hígított elsődleges ellenanyaggal inkubáltuk egy éjszakán keresztül 4 °C-on folyamatos rázogatással. A hígított elsődleges ellenanyagot 2-3-szor újra felhasználtuk. Másnap a mintát 2 órán át mostuk PBT-ben az oldat gyakori lecserélésével, majd 30 percig PBT-N-ben inkubáltuk. Ezután az ováriumokat 4-6 órán át PBT-N-ben másodlagos ellenanyaggal kezeltük, amit 2 órától egy éjszakáig terjedő PBT-ben történő mosás

követett. Az ováriumokat tárgylemezen 4% n-propil-gallát, 80% glicerin pH=9.5 összetételű médiumban fedtük le, majd a preparátumokat Zeiss Axioscope II típusú fénymikroszkóppal a megfelelő szűrők alkalmazásával vizsgáltuk.

Northern blot analízis

Totál RNS tisztítás

50 felnőtt legyet 1.5ml-es Eppendorf csőben cseppfolyós N₂-ben lefagyasztottunk. Rámértünk 100µl Trizol reagenst (GIBCO BRL), majd csiszolt üvegbot segítségével a legyeket gyorsan homogenizáltuk. A homogenizátumhoz újabb 700µl Trizolt adtunk, majd 5 percig jégen inkubáltuk. Ezután 200µl kloroformot adtunk a preparátumhoz, amit 15 másodperces vortexelés és 3 perces jégen történő inkubálás követett. A mintát 4°C-on 12000g-n 20 percig centrifugáltuk. A felső vizes fázist új csőbe tettük és az RNS-t 500µl izopropanol hozzáadásával kicsaptuk. A mintát vortexeltük, majd 10 percre jégre tettük és 10 percig 12000g-n centrifugáltuk. A felülúszót eltávolítottuk és a csapadékot DEPC kezelt RNáz mentes vízzel hígított 75%-os etanollal mostuk, amelyet 5 perces 4°C-os centrifugálás követett. A felülúszó eltávolítása után a mintákat 10 percig szobahőmérsékleten szárítottuk. A beszárított csapadékot DEPC kezelt vízben oldottuk fel.

Formaldehid gél készítése és a minták futtatása

200ml 1.5%-os gélhez 3 g agarózt, 146ml dH₂O-t és 20ml 10xMOPS-t (0.4 M 3-[N-Morpholino] propánszulfonilsav pH=7.0, 0.1 M Na-acetát, 10 mM EDTA pH=8.0, DEPC kezelt vízben készítjük az oldatot, majd autoklávozzuk) felforraltunk, majd 50°C-ra hűtöttük és 34ml 37% (12,3M) formaldehidet adtunk hozzá. Az oldatot

öszekevertük és fülke alatt futtató tálcába öntöttük. A futtatópuffer összetétele 1000ml-re számolva 100ml 10xMOPS, 18ml 37% formaldehid és 882ml dH₂O volt. A minta előkészítése során ~ 10µg totál RNS-t oldottunk 5µl DEPC kezelt dH₂O-ben és hozzáadtunk 10µl formamidot, 2µl 10xMOPS-t, 3µl 37% formaldehidet, majd az elegyet 65°C-on denaturáltuk 10 percig, majd jégre tettük és 3µl festéket (1xMOPS, 15% ficoll, Brómfenolkék) adtunk hozzá. A minták felvitele előtt a gélt elő futtattuk 5 percig 5V/cm-el, majd a mintákat rögtön felvittük a gélre és egy éjszakán keresztül ~40V-tal futtattuk, 4°C-on. A pontos molekulatömeg megállapítás érdekében DNS molekulatömeg marker helyett RNS markert használtunk.

A blottoláshoz a membránt (Nytran plus membrán, Schleicher és Schuell) vízben való benedvesítéssel, majd 15 perces 2xSSC-ben történő áztatással készítettük elő. A gélt 20xSSC-ben 5 percig mostuk. A blottolást egy éjszakán át 20xSSC-vel, kapilláris módszerrel végeztük. Másnap a membránt 5xSSC-ben mostuk a géldarabkák eltávolítására, majd megszárítottuk és az RNS-t 2 perces 1200x100µJ/cm² teljesítményű UV kezeléssel a membránnal keresztkötöttük. A membránt ezután hibridizáló csőbe helyeztük és módosított Church és Gilbert féle hibridizáló oldatban (0.5M NaPO₄ puffer pH=7, 1mM EDTA, 7% SDS) 55°C-on 1 órán át előhibridizáltuk.

A próba elkészítése izotópos random primer jelöléssel történt, DNS templátról a Boehringer Random Primed DNA Labeling Kit felhasználásával és az abban ajánlottak szerint. Belső kontrollként *rp49*-t (riboszómális proteint kódoló RNS-t) használtunk, amelyet párhuzamosan jelöltünk a próbával. A próba előállításánál a templát linearizálásával kezdődött, majd a komplementer RNS átírása a vektorban található T7 promóterről Fermentas T7 RNS polimeráz alkalmazásával és radioaktív [α^{32} P] dCTP (3000Ci/mmol) felhasználásával történt. A be nem épült nukleotidokat

Sephadex G50 oszlop segítségével távolítottuk el. Szcintillációs detektorral választottuk ki a legaktívabb frakciókat.

A jelölt DNS-t 7 perces forralással denaturáltuk, majd jégen hűtöttük és 5ml hibridizációs oldathoz adtuk, amit a membránra mértünk. A hibridizálást 55°C-on egy éjszakán keresztül végeztük. Másnap a filtert 2x15 percig nagy térfogat 50mM NaPO₄ pH=7.0 pufferben szobahőmérsékleten mostuk. Ezt egy 30 perces 55°C-os mosás követett, mely után ellenőriztük a filter radioaktivitását. Amennyiben GM számlálóval 50-100 beütés/mp-nél nagyobb értéket kaptunk a filtert 65°C-on újabb 30 perces mosásnak vetettük alá. A filterek radioaktivitását IS 450 Phospholmmager-rel tettük láthatóvá.

Fehérje preparálás, Western blot analízis

A Ringer oldatban preparált ováriumokat megközelítőleg 10-szeres térfogatú minta pufferben gyűjtöttük (6mM Tris-Cl pH=6.8, 6.4% glicerin, 2% SDS, 100mM DTT és brómfenolkék). Az ováriumokat 5 perces forralással, szonikálással majd újabb 5 perces forralással tártuk fel. A mintákat ezután 1 percig centrifugáltuk 12000g-vel, majd a folyadék fázist új csőbe tettük. A fel nem használt fehérje preparátumot -80°C-on tároltuk. A fehérjeminták futtatására valamint a blottolásra a Bio-Rad minigél rendszert használtunk. 10%-os poliakrilamid gélt készítettünk, mely a Laemmli-féle gélelektroforézis elvének megfelelően egy pH=6.8, 5%-os felső és egy pH=8.8, 10%-os alsó gélből állt. A gél összetétele a Sambrook J. és Maniatis T. laboratóriumi receptgyűjtenyében javasolt volt. Körülbelül 3 pár ovárium ekvivalens fehérjét vittünk fel egy zsebbe. A relatív molekulatömegek megbecslésére a Bio-Rad Kaleidoscope Prestained Standards molekulatömeg markert használtunk. A futtatást 25mA állandó áramerősséggel végeztük futtató pufferben (10xpuffer: 1000ml-be

30.2g TRIS, 144.19g glicin, 10g SDS). A gélen szeparált fehérjéket 200mA áramerrősséggel, 2 órán keresztül, jéghideg transzferpuffer felhasználásával (20% Met-OH, 25mM Tris-Cl, 192mM Glycine) PVDF membránra (Amersham), blottoltuk át. A blottolás hatékonyságát a gél Coomassie Blue-val való festésével ellenőriztük. A membrant TTBS-ben (25mM TRIS-CI, 15mM NaCl, 0,1% Tween20) mostuk, majd blokkoló pufferben (TTBS, 5% sovány tejpor) egy éjszakán keresztül blokkoltuk. Az így előkészített membránt blokkoló pufferben hígított elsődleges ellenanyaggal szobahőmérsékleten 2 órán keresztül inkubáltuk. Az ellenanyagos kezelés után a membránt 2-szer 5 percig desztillált vízben, majd 2-szer 10 percig TTBS-ben mostuk. A másodlagos ellenanyagokat blokkoló pufferben hígítottuk és 2 órán át inkubáltuk a membránokat szobahőmérsékleten. A membránokat desztillált vízzel öblítettük, majd 5-ször 5 percig mostuk TTBS-ben. A peroxidáz konjugált másodlagos ellenanyag enzimatikus aktivitását felerősített kemolumineszcencia (ECL) rendszerrel detektáltuk. (25µl 90mM Coumaric, 50µl 230mM Luminol, 3µl H₂O₂ 10ml 100mM TRIS pH=8.5 15 perc inkubálás).

Kinesin β-Galaktozidáz festés

A petefészkeket PBT oldatban boncoltuk, majd 2,5% glutáraldehidet tartalmazó PBS oldatban fixáltuk. A petefészkeket kétszer mostuk PBT oldatban, majd festő pufferbe helyeztük [0,05 M K₃(Fe(CN)₆), 0,05 M K₄(Fe(CN)₆) PBS-ben]. Az X-gal oldat végső koncentrációja 0,2% volt. A festést 12 óráig, szobahőmérsékleten végeztük. A festett petefészkeket háromszor tíz percig mostuk PBT oldatban, majd Aqua Poly/Mount médiumba ágyaztuk (Polysciences, Inc).

Microarray lemezek előállítása

A Drosophila Gene Collection Release1 (Rubin 2000) cDNS könyvtárból 3200 annotált gén cDNS-ét plazmid specifikus primerek segítségével sokszorosítottuk. A cDNS-ek mennyiségét és minőségét agaróz gél elektroforézis segítségével ellenőriztük, majd a cDNS-eket MultiScreen PCR plate kittel (Millipore) tisztítottuk. A tisztított terméket 50 %-os DMSO-ban oldottuk fel, majd FMB cDNS tárgylemezre (Full Moon BioSystems) vittük fel két példányban (Hackler és mtsai. 2003). Az utófeldolgozás és blokkolás egy már korábban leírt módon folyt (Palotás és mtsai. 2004).

A cDNS alapú microarray analízis

3-5 gs1/gs1, eg9/eg9, gs1ex1/gs1ex1, napos eg20/eg20, osk-bcd/+, wwoskA87/osk54, w+oskA⁸⁷/osk⁵⁴, és w¹¹¹⁸ genotípusú, jól táplált nőstények ováriumából totál RNS-t tisztítottunk. Az RNS tisztítás a Macherey-Nagel (Macherey-Nagel, Düren, Germany) cég által forgalmazott RNS tisztító kit-tel történt a mellékelt útmutató szerint. A tisztított RNS-t a szilika membránról eluáltuk és a továbbiakban 30U Prime RN-áz inhibítor (Eppendorf) jelenlétében -80C0-on tároltuk. A tisztított RNS minőségét agaróz gélelektoforézissel, mennyiségét spektrofotometriával (NanoDrop, Rockland, DE, USA) ellenőriztük. A cDNS átírás és a jelölés a Genisphere cég által forgalmazott kit-tel történt a gyártó utasításai szerint (Genisphere Expression Array 350 Detection Kit system). A tisztított RNS-ből 2 mikrogrammot SuperScript II RN-áz H- Reverz transcriptáz (Invtirogen, Carlsbad, CA, USA) enzimmel cDNS-sé alakítottunk. A reakció 0.2 µg/µl random primer, 0.1 µg/µl oligo-dT primer, 1x First-Strand Buffer (250mM Tris-HCl (pH.:8.3), 375mM KCl, 15mM MgCl2), 500nM dNTP mix (500nM) 0.01M DTT, 40U Prime RNáz inhibítor

(Eppendorf) és 200 units SuperScript II RNáz H- Reverz transcriptáz (Invtirogen Carlsbad, CA, USA) jelenlétében, 20µl végtérfogatban, 42C0-on 2 órán keresztül zajlott. A reverz transzkripciót (RT) megelőzően az RNS és a primerek elegyét 80C0on 10 percig denaturáltuk. Az analizálandó és a kontroll mintát minden esetben a különböző fluoreszcens festékeket (Cy3 és Cy5) hordozó dendrimerekre specifikus oligonukleotidokkal jelöltük. Az első hibridizálási lépésben а specifikus oligonukleotidokat tartalmazó cDNS került a 3200 annotált gén cDNS-ét hordozó tárgylemezekre. A hibridizációt 42 °C-on hat órán át végeztük FGL2 hibridizációs pufferben (10x Denhart oldat, 0,25M pH 7.0 nátrium-foszfát, 1mM EDTA, 1x SSC, 0,5% SDS;cDNS hiridizáció). A második hibridizálási lépésben pedig a fluoreszcens festékeket hordozó dendrimereket hibridizáltuk a chip felületére. Ez a lépés 200 µl 2,5-2,5 µl Cy3 és Cy5 Dendrimert tartalmazó "Chiphyb" hibridizáló oldatban (Ventana) történt két órán át 42°C-on (jelölés). A hibridizációk után a lemezeket 0,2x SSC-ben mostuk kétszer tíz percig, szobahőn, majd megszárítottuk. A mosást követően a lemezeket lézer szkennerrel (ScanArray Lite, GSI Lumonics) leolvastuk, detektáltuk a Cy3 és Cy5 fluoreszcencia értékeket. A szkennelés és az adatok nyers kiértékelése a korábban leírt módon történt (Puskás és mtsai. 2003). A pontok kiértékelése ScanAlyze és GenePix analizáló programmal történt. A számszerűsített adatokat Excell program segítségével, minőségi paraméterek figyelembe vételével értékeltük és normalizáltuk. Az egyes microarray pontokon mért Cy3 és Cy5 emissziók medián érékét egymáshoz arányítottuk. Az egyes mérőpontokra számolt arányokat az összes mérőponton mért arányok mediánjára normalizáltuk, majd a cluster nevű program segítségével az eredményeket K-means módszerrel hasonlóságuk alapján 100 csoportba rendeztük. Ezután az eredményt a tree wiev program segítségével színkódokkal vizualizáltuk (Eisen és 1998). mtsai.

Meghatároztuk azokat a csoportokat, melyeknek tagjai a leginkább hasonlítottak az általunk elvárt mintázathoz, és ezek közül a részletes analízishez végül hatvanat választottunk ki.

Affymetrix Drosophila Genome Array alapú microarray analízis

A w¹¹¹⁸, *Tm1^{eg9}*, *osk^{A87}/osk⁵⁴* és *osk^{bcd.UTR}* genotípusú ováriumokból preparált RNS mintákból a genotípusonként 4 legjobb integritású mintát használtuk fel a microarray kísérlethez. A mintákat 45⁰C-on vákuumcentrifuga segítségével 2µg/µl végkoncentrációjúra töményítettük. A microarray kísérlethez szükséges biotinilált RNS-t az Affymetrix GeneChip® IVT Express Kittel állítottuk elő a következő lépésekkel:

1, Az RNS-preparátumokról egyszálú cDNS szintézise reverz transzkripcióval. 2, Második cDNS szál szintézise E.coli DNS-polimerázzal, RNS-elbontása RNázH-val (Affymetrix GeneChip® 3'IVT Express Kit Manual). 3, ds-cDNS tisztítása (Affymetrix GeneChip[®]Expression Analysis Technical Manual). 4, Biotinilált cRNS-szintézis in vitro transzkripcióval. 5, Biotinilált cRNS tisztítása. A cRNS-minták tisztítása után a cRNS mennyiségét spektrofotometriával határoztuk meg. 6, Biotinilált cRNS fragmentációja.

A biotinilált fragmentált RNS-ek teszt-arrayre, majd a Drosophila Genome 2.0 arrayre hibridizáltuk. Az arrayek mosását, festését az Affymetrix Fluidic Station 400 automatán végeztük (Affymetrix GeneChip® 3'IVT Express Kit Manual). Az automata a teszt-arrayek esetében a EukGE-WS2v4, míg a Drosophila arrayek esetében Midi_euk2v3 nevű scriptek alapján végezte a mosási és festési lépéseket. Az arrayeket a GCOS (Affymetrix GeneChip Operating Software) által vezérelt GeneChip Scanner 3000 készülékben scanneltük. A microarray-ek minőségi

ellenőrzését (box-plot diagram, Pearson-korrelációs színintenzítás-térkép) az Affymetrix Expression Console szoftverrel végeztük. A GCOS szoftver által generált adatokat (CEL fájlok) a GEPAS 4.0 (Herrero és mtsai. 2003) online szoftverrel értékeltem ki a következő lépésekkel és beállításokkal: 1, Normalizálás: mas háttérkorrekció (Affymetrix Statistical Algorithms Description Document 2002), kvantilis normalizálás (Bolstad és mtsai. 2003), mas PM-korrekció (Affymetrix Statistical Algorithms Description Document 2002), median polish összegzés (Tukey 1977). 2, Normalizált adatok előfeldolgozása: Azon adatsorok törlése, ahol az adatoknak legalább 70%-a hiányzik. 3, A kondíciók közötti génexpressziós különbségek megállapítása klasszikus ANOVA-modellt használtunk.

Géncsendesítés Drosophila embriókban

A 1-2 stádiumú nos>GFP:moe genotípusú Drosophila embriókat injektálás elött 50%os Na-hypoclorittal (50%-os hypó) dekorionáltuk, ventrális felszínükkel ragasztóval bevont tárgylemezre rögzítettük. Az injektáló pufferben (5mM KCl, 0,1mM Na₃PO₄, pH: 6,8) oldott kettős szálú RNS-oldatot 1µg/µl végkoncentrációban üveg mikrokapillárissal injektáltuk az embriókat laterálisan a hossztengely mentén középen. Egy-egy dsRNS oldattal 60 embriót injektáltunk 18 °C-on, Voltalef PVTFE 10S olajjal fedtük le. 2-14. stádiumú embriók GFP-t kifejező ivarsejtjeit in vivo videomikroszkópiával követtük nyomon az Olympus CellR Live Imaging Work Station rendszerén 25 °C-on (5x objektív, 1375x1038 pixel felbontás, 3-9 embrió/felvétel, 1 felvétel/10 perc, 180 ms expozíciós idő). A videomikroszkópiából származó nagy mennyiségű adatot 4db egyenként 1Gb kapacítású HDSA Seagate ES merevlemezből álló szerveren tároltuk. injektált embriókról Az készült felvételsorozatokat ImageJ szoftver segítségével jelenítettük meg és értékeltük ki. Az

injektált embriókat a videomikroszkópiás vizsgálat után standard Drosophila táptalajra helyeztük, az ezekből kifejlődő felnőtt állatokat felboncoltuk, az ivarsejthiányos fenokópiák penetranciáját megállapítottuk. Azon gének esetében, ahol embrionális vagy adult mutáns ivarsejt-fenokópiát tapasztaltunk, a géncsendesítéseket megismételtük.

Géncsendesítő dsRNS-ek szintézise

Az RNSi kísérletben reprodukálható fenotípust adó génekre olyan géncsendesítő dsRNS-eket terveztünk, melyek szekvenciája nem fed át az előzőleg használtéval (Boutros és mtsai. 2004) és a lehető legkisebb off-target hatást adják valamint lehetőleg az adott gén minden fehérje izoformájában jelenlévő kódoló szakaszt érintsenek. A kiválasztott gének és az előzőleg használt géncsendesítő dsRNS-ek szekvenciáit a FlyBase adatbázisból (http://flybase.org) töltöttük le. Az off-target hatást a dsCheck (Naito és mtsai. 2005) online szoftverrel ellenőriztük. A kiválasztott szekvenciákra primer3 program segítségével (Rozen és Skaletsky 2000) olyan primereket terveztünk, melyek 5'-végükön egy GGATC extra szekvencia mellett T7 polimeráz promótert tartalmaztak. A primereket az Eurofins MWG Synthesis GmbHvel szintetizáltattuk HPSF (High purity salt free purification) módszerrel tisztíttattuk. A polimeráz láncreakciót 100µl végtérfogatban végeztük (+(NH₄)₂SO₄ puffer, 2,5mM MgCl2, 1mM dNTP mix, 28ng/µl DNS, 0,01U/µl Tag DNS polimeráz) a következő programmal: $96^{\circ}C$ 2 perc, $2x(94^{\circ}C$ 45 mp, $58^{\circ}C$ 1 perc, $72^{\circ}C$ 45 mp), $40x(94^{\circ}C$ 45 mp, 66⁰C 1 perc, 72⁰C 45 mp), 72⁰C 2 perc. A PCR terméket QIAGEN QIAquick PCR purification Kit-tjével (Cat.No.: 28106) tisztítottuk, a fragmentek méretét 1%-os agaróz gélen ellenőriztük, koncentrációjukat Nanodrop műszerrel mértük. A PCR termékeket templátként használva in-vitro transzkripcióval készítettünk kettős szálú

RNS-t. A reakciót a Promega T7 RiboMAX[™] Express Large Scale RNA Production System-jével végeztük 1 órán át, 37⁰C-on, 25µl végtérfogatban, templátként 1µg PCR terméket használva. A mintákat ezután RQ1 RNáz mentes DNázzal kezeltük (1U/minta, 37⁰C, 30 perc). Az in vitro transzkripció termékhez 0,1 tf 3M Na-acetátot és 1 tf izopropanolt adtunk, majd 10 percig inkubáltuk jégen, centrifugáltuk (13000 rpm, 10 perc, 4⁰C), 70%-os etanollal mostuk, ismét centrifugáltuk (13000 rpm, 10 perc, 4⁰C), majd a kicsapott RNS-t vákuumelszívóval szárítottuk, végül 30µl RNáz mentes vízben vettük fel. Az RNS-ek méretét 1,5%-os agarózgélen ellenőriztük, koncentrációjukat Nanodrop műszerrel mértük. Az 1µg/µl koncentrációjúra hígított dsRNS oldatokat -20⁰C-on tároltuk felhasználásig.

ÖSSZEFOGLALÁS

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 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 RNSének transzlációtól független, a petekezdemények fejlődésében betöltött funkcióját írtuk le. Kimutattuk, hogy ezért az RNS alapú funkcióért a transzkriptum 3' nem transzlálódó 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 mutagenezis 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 fenotípusok vizsgálatával megmutattuk a két Oskar izoforma eltérő biológiai szerepét. A hosszú Oskar izoforma az lokalizált oskar géntermékek magas szintjének eléréséhez szükséges pozitiv 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 mutagenezis 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 aktinsejtmembrán 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 mutagenezis 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 microarry 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 fenotípuseloszlásuk 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 (Ashburner 1999). 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 mutagenezis 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 kialításához kellenek. 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 is megtapasztaltuk, hogy egy adott fejlődéstani folyamatban nagyon sok gén játszhat, sokszor azonban nagyon gyengén tetten érhető szerepet. A fenotípus elemzésnek egyfajta határozatlansági kibontakozni. Egyes mutánsokkal a gének funkciója jól relációja kezd 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.

IRODALOMJEGYZÉK

Agoston, V., Csermely, P. és Pongor, S., 2005. Multiple weak hits confuse complex systems: a transcriptional regulatory network as an example. *Physical Review. E, Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*, 71(5 Pt 1), 051909.

Arbeitman, M.N. és mtsai., 2002. Gene expression during the life cycle of Drosophila melanogaster. *Science (New York, N.Y.)*, 297(5590), 2270-2275.

Ashburner, M. és mtsai 1999. An exploration of the sequence of a 2.9-Mb region of the genome of Drosophila melanogaster: the Adh region. *Genetics*. 1999 153(1):179-219.

Bier, E. és mtsai., 1989. Searching for pattern and mutation in the Drosophila genome with a P-lacZ vector. *Genes és Development*, 3(9), 1273-1287.

Boutros, M. és mtsai., 2004. Genome-wide RNAi analysis of growth and viability in Drosophila cells. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5659), 832-835.

Brendza, R.P. és mtsai., 2000. A function for kinesin I in the posterior transport of oskar mRNA and Staufen protein. *Science (New York, N.Y.)*, 289(5487), 2120-2122.

Calvi, B.R. és mtsai., 1991. Evidence for a common evolutionary origin of inverted repeat transposons in Drosophila and plants: hobo, Activator, and Tam3. *Cell*, 66(3), 465-471.

Casper, A.L. és Van Doren, M., 2009. The establishment of sexual identity in the Drosophila germline. *Development (Cambridge, England)*, 136(22), 3821-3830.

Clemens, J.C. és mtsai., 2000. Use of double-stranded RNA interference in Drosophila cell lines to dissect signal transduction pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(12), 6499-6503.

Cohen, R.S., 2005. The role of membranes and membrane trafficking in RNA localization. *Biology of the Cell / Under the Auspices of the European Cell Biology Organization*, 97(1), 5-18.

Dang, D.T. és Perrimon, N., 1992. Use of a yeast site-specific recombinase to generate embryonic mosaics in Drosophila. *Developmental Genetics*, 13(5), 367-375.

Decotto, E. és Spradling, A.C., 2005. The Drosophila ovarian and testis stem cell niches: similar somatic stem cells and signals. *Developmental Cell*, 9(4), 501-510.

Deng, W.M. és Ruohola-Baker, H., 2000. Laminin A is required for follicle cell-oocyte signaling that leads to establishment of the anterior-posterior axis in Drosophila. *Current Biology: CB*, 10(11), 683-686.

Denis, H. és Lacroix, J.C., 1993. The dichotomy between germ line and somatic line, and the origin of cell mortality. *Trends in Genetics: TIG*, 9(1), 7-11.

Dietzl, G. és mtsai., 2007. A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in Drosophila. *Nature*, 448(7150), 151-156.

Doi, Y. és mtsai., 1999. Normal development of mice and unimpaired cell adhesion/cell motility/actin-based cytoskeleton without compensatory up-regulation of ezrin or radixin in moesin gene knockout. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(4), 2315-2321.

Dollar, G. és mtsai., 2002. Rab11 polarization of the Drosophila oocyte: a novel link between membrane trafficking, microtubule organization, and oskar mRNA localization and translation. *Development (Cambridge, England)*, 129(2), 517-526.

Eisen, M.B. és mtsai., 1998. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(25), 14863-14868.

Extavour G. M. Evolution of the bilaterian germ line: lineage origin and modulation of specification mechanisms Cassandra. Integr. Comp. Biol. (2007) 47 (5): 770-785.)

Ephrussi, A., Dickinson, L.K. és Lehmann, R., 1991. Oskar organizes the germ plasm and directs localization of the posterior determinant nanos. *Cell*, 66(1), 37-50.

Ephrussi, A. és Lehmann, R., 1992. Induction of germ cell formation by oskar. *Nature*, 358(6385), 387-392.

Erdélyi, M. és mtsai., 1995. Requirement for Drosophila cytoplasmic tropomyosin in oskar mRNA localization. *Nature*, 377(6549), 524-527.

Friedman, A. és Perrimon, N., 2007. Genetic screening for signal transduction in the era of network biology. *Cell*, 128(2), 225-231.

Gilboa, L. és Lehmann, R., 2004. How different is Venus from Mars? The genetics of germ-line stem cells in Drosophila females and males. *Development (Cambridge, England)*, 131(20), 4895-4905.

Gilboa, L. és Lehmann, R., 2006. Soma-germline interactions coordinate homeostasis and growth in the Drosophila gonad. *Nature*, 443(7107), 97-100.

Golumbeski, G.S. és mtsai., 1991. tudor, a posterior-group gene of Drosophila melanogaster, encodes a novel protein and an mRNA localized during midoogenesis. *Genes és Development*, 5(11), 2060-2070.

González-Reyes, A., Elliott, H. és St Johnston, D., 1995. Polarization of both major body axes in Drosophila by gurken-torpedo signalling. *Nature*, 375(6533), 654-658.

Guarente, L., 1993. Synthetic enhancement in gene interaction: a genetic tool come of age. *Trends in Genetics: TIG*, 9(10), 362-366.

Hackler, L. és mtsai., 2003. Development of chemically modified glass surfaces for

nucleic acid, protein and small molecule microarrays. *Molecular Diversity*, 7(1), 25-36.

Hay, B., Jan, L.Y. és Jan, Y.N., 1990. Localization of vasa, a component of Drosophila polar granules, in maternal-effect mutants that alter embryonic anteroposterior polarity. *Development (Cambridge, England)*, 109(2), 425-433.

Hays, T.S. és mtsai., 1989. Interacting proteins identified by genetic interactions: a missense mutation in alpha-tubulin fails to complement alleles of the testis-specific beta-tubulin gene of Drosophila melanogaster. *Molecular and Cellular Biology*, 9(3), 875-884.

Herrero, J. és mtsai., 2003. GEPAS: A web-based resource for microarray gene expression data analysis. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3461-3467.

Herron, M.D. és mtsai., 2009. Triassic origin and early radiation of multicellular volvocine algae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(9), 3254-3258.

Hunter, C.P., 1999. Genetics: a touch of elegance with RNAi. *Current Biology: CB*, 9(12), R440-442.

Illmensee, K. és Mahowald, A.P., 1974. Transplantation of posterior polar plasm in Drosophila. Induction of germ cells at the anterior pole of the egg. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71(4), 1016-1020.

Jankovics, F., Sinka, R. és Erdélyi, M., 2001. 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(3), 1177-1188.

Jankovics, F. és mtsai., 2002. MOESIN crosslinks actin and cell membrane in Drosophila oocytes and is required for OSKAR anchoring. *Current Biology: CB*, 12(23), 2060-2065.

Jenny, A. és mtsai., 2006. A translation-independent role of oskar RNA in early Drosophila oogenesis. *Development (Cambridge, England)*, 133(15), 2827-2833.

Johansen, J. és Johansen, K.M., 2009. The spindle matrix through the cell cycle in Drosophila. *Fly*, 3(3), 213-220.

Johnstone, O. és Lasko, P., 2001. Translational regulation and RNA localization in Drosophila oocytes and embryos. *Annual Review of Genetics*, 35, 365-406.

Kaiser, D., 2001. Building a multicellular organism. *Annual Review of Genetics*, 35, 103-123.

Kennerdell, J.R. és Carthew, R.W., 2000. Heritable gene silencing in Drosophila using double-stranded RNA. *Nature Biotechnology*, 18(8), 896-898.

King, R.C., Ovarian Development in Drosophila nelanogaster Academic Press New

York 1970

Kirilly, D. és Xie, T., 2007. The Drosophila ovary: an active stem cell community. *Cell Research*, 17(1), 15-25.

Kobayashi, S., Amikura, R. és Okada, M., 1993. Presence of mitochondrial large ribosomal RNA outside mitochondria in germ plasm of Drosophila melanogaster. *Science (New York, N.Y.)*, 260(5113), 1521-1524.

Kobayashi, S. és mtsai., 1996. Essential role of the posterior morphogen nanos for germline development in Drosophila. *Nature*, 380(6576), 708-711.

Koizumi, K. és mtsai., 2007. RNA interference screen to identify genes required for Drosophila embryonic nervous system development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(13), 5626-5631.

Kunwar, P.S. és mtsai., 2008. Tre1 GPCR initiates germ cell transepithelial migration by regulating Drosophila melanogaster E-cadherin. *The Journal of Cell Biology*, 183(1), 157-168.

Lane, M.E. és Kalderon, D., 1994. RNA localization along the anteroposterior axis of the Drosophila oocyte requires PKA-mediated signal transduction to direct normal microtubule organization. *Genes és Development*, 8(24), 2986-2995.

Leatherman, J.L. és Jongens, T.A., 2003. Transcriptional silencing and translational control: key features of early germline development. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 25(4), 326-335.

Lécuyer, E., Yoshida, H. és Krause, H.M., 2009. Global implications of mRNA localization pathways in cellular organization. *Current Opinion in Cell Biology*, 21(3), 409-415.

Lécuyer, E. és mtsai., 2007. Global analysis of mRNA localization reveals a prominent role in organizing cellular architecture and function. *Cell*, 131(1), 174-187.

Lukacsovich, T. és mtsai., 2001. Dual-tagging gene trap of novel genes in Drosophila melanogaster. *Genetics*, 157(2), 727-742.

Mahowald, A.P., 2001. Assembly of the Drosophila germ plasm. *International Review* of Cytology, 203, 187-213.

Markussen, F.H. és mtsai., 1995. Translational control of oskar generates short OSK, the isoform that induces pole plasma assembly. *Development (Cambridge, England)*, 121(11), 3723-3732.

Matsushita, M. és mtsai., 1998. Identification and characterization of a novel SH3domain binding protein, Sab, which preferentially associates with Bruton's tyrosine kinase (BtK). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 245(2), 337-343.

Mhlanga, M.M. és mtsai., 2009. In vivo colocalisation of oskar mRNA and transacting proteins revealed by quantitative imaging of the Drosophila oocyte. *PloS One*, 4(7), e6241.

Michod, R.E. és mtsai., 2006. Life-history evolution and the origin of multicellularity. *Journal of Theoretical Biology*, 239(2), 257-272.

Morris, J.Z., Navarro, C. és Lehmann, R., 2003. Identification and analysis of mutations in bob, Doa and eight new genes required for oocyte specification and development in Drosophila melanogaster. *Genetics*, 164(4), 1435-1446.

Naito, Y. és mtsai., 2005. dsCheck: highly sensitive off-target search software for double-stranded RNA-mediated RNA interference. *Nucleic Acids Research*, 33(Web Server issue), W589-591.

Nakamura, A. és mtsai., 1996. Requirement for a noncoding RNA in Drosophila polar granules for germ cell establishment. *Science (New York, N.Y.)*, 274(5295), 2075-2079.

Palotás, A. és mtsai., 2004. The effect of citalopram on gene expression profile of Alzheimer lymphocytes. *Neurochemical Research*, 29(8), 1563-1570.

Perrimon, N. és Gans, M., 1983. Clonal analysis of the tissue specificity of recessive female-sterile mutations of Drosophila melanogaster using a dominant female-sterile mutation Fs(1)K1237. *Developmental Biology*, 100(2), 365-373.

Pilot, F. és mtsai., 2006. Developmental control of nuclear morphogenesis and anchoring by charleston, identified in a functional genomic screen of Drosophila cellularisation. *Development (Cambridge, England)*, 133(4), 711-723.

Polesello, C. és mtsai., 2002. Dmoesin controls actin-based cell shape and polarity during Drosophila melanogaster oogenesis. *Nature Cell Biology*, 4(10), 782-789.

Puskás, L.G. és mtsai., 2003. Short-term administration of omega 3 fatty acids from fish oil results in increased transthyretin transcription in old rat hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(4), 1580-1585.

Raz, E., 2000. The function and regulation of vasa-like genes in germ-cell development. *Genome Biology*, 1(3), REVIEWS1017.

Reinke, V. és mtsai., 2000. A global profile of germline gene expression in C. elegans. *Molecular Cell*, 6(3), 605-616.

Renault, A.D. és Lehmann, R., 2006. Follow the fatty brick road: lipid signaling in cell migration. *Current Opinion in Genetics és Development*, 16(4), 348-354.

Robertson, H.M. és mtsai., 1988. A stable genomic source of P element transposase in Drosophila melanogaster. *Genetics*, 118(3), 461-470.

Rongo, C., Gavis, E.R. és Lehmann, R., 1995. Localization of oskar RNA regulates oskar translation and requires Oskar protein. *Development (Cambridge, England)*, 121(9), 2737-2746.

Rørth, P., 1998. Gal4 in the Drosophila female germline. *Mechanisms of Development*, 78(1-2), 113-118.

Rozen, S. és Skaletsky, H., 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 132, 365-386.

Rubin, G.M., 2000. Biological annotation of the Drosophila genome sequence. *Novartis Foundation Symposium*, 229, 79-82; discussion 82-83.

Ruohola, H. és mtsai., 1991. Role of neurogenic genes in establishment of follicle cell fate and oocyte polarity during oogenesis in Drosophila. *Cell*, 66(3), 433-449.

Salz, H.K. és Erickson, J.W., 2010. Sex determination in Drosophila: The view from the top. *Fly*, 4(1), 60-70.

Shigenobu, S. és mtsai., 2006. Molecular characterization of embryonic gonads by gene expression profiling in Drosophila melanogaster. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(37), 13728-13733.

Sinka, R. és mtsai., 2002. poirot, a new regulatory gene of Drosophila oskar acts at the level of the short Oskar protein isoform. *Development (Cambridge, England)*, 129(14), 3469-3478.

Smith, D. és mtsai., 1993. hobo enhancer trapping mutagenesis in Drosophila reveals an insertion specificity different from P elements. *Genetics*, 135(4), 1063-1076.

Smith, J.L., Wilson, J.E. és Macdonald, P.M., 1992. Overexpression of oskar directs ectopic activation of nanos and presumptive pole cell formation in Drosophila embryos. *Cell*, 70(5), 849-859.

Sperger, J.M. és mtsai., 2003. Gene expression patterns in human embryonic stem cells and human pluripotent germ cell tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(23), 13350-13355.

Spradling, A.C. és mtsai., 1995. Gene disruptions using P transposable elements: an integral component of the Drosophila genome project. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(24), 10824-10830.

Staab, S., Heller, A. és Steinmann-Zwicky, M., 1996. Somatic sex-determining signals act on XX germ cells in Drosophila embryos. *Development (Cambridge, England)*, 122(12), 4065-4071.

Stein, J.A. és mtsai., 2002. Slow as molasses is required for polarized membrane growth and germ cell migration in Drosophila. *Development (Cambridge, England)*, 129(16), 3925-3934.

Strome, S. és Lehmann, R., 2007. Germ versus soma decisions: lessons from flies and worms. *Science (New York, N.Y.)*, 316(5823), 392-393.

Szabad, J. és mtsai., 1989. Isolation and characterization of dominant female sterile mutations of Drosophila melanogaster. II. Mutations on the second chromosome. *Genetics*, 122(4), 823-835.

Szuperák, M., Zvara, A. és Erdélyi, M., 2005. Identification of germ plasm-enriched mRNAs in Drosophila melanogaster by the cDNA microarray technique. *Gene Expression Patterns: GEP*, 5(5), 717-723.

Tomancak, P. és mtsai., 2002. Systematic determination of patterns of gene expression during Drosophila embryogenesis. *Genome Biology*, 3(12), RESEARCH0088.

Trucco, A., Gaspar, I. és Ephrussi, A., 2009. Assembly of endogenous oskar mRNA particles for motor-dependent transport in the Drosophila oocyte. *Cell*, 139(5), 983-998.

Tsukita, S. és Yonemura, S., 1999. Cortical actin organization: lessons from ERM (ezrin/radixin/moesin) proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(49), 34507-34510.

Tukey, J.W., 1977. Some thoughts on clinical trials, especially problems of multiplicity. *Science (New York, N.Y.)*, 198(4318), 679-684.

Vilmos, P. és mtsai., 2007. 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 Biologica Hungarica*, 58 Suppl, 81-94.

Wang, C. és Lehmann, R., 1991. Nanos is the localized posterior determinant in Drosophila. *Cell*, 66(4), 637-647.

Wieschaus, E. és Szabad, J., 1979. The development and function of the female germ line in Drosophila melanogaster: a cell lineage study. *Developmental Biology*, 68(1), 29-46.

Wolpert, L. és Szathmáry, E., 2002. Multicellularity: evolution and the egg. *Nature*, 420(6917), 745.

Yamada, Y., Davis, K.D. és Coffman, C.R., 2008. Programmed cell death of primordial germ cells in Drosophila is regulated by p53 and the Outsiders monocarboxylate transporter. *Development (Cambridge, England)*, 135(2), 207-216.

Ye, P. és mtsai., 2005. Gene function prediction from congruent synthetic lethal interactions in yeast. *Molecular Systems Biology*, 1, 2005.0026.

SAJÁT KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

A Doktori értekezésben tárgyalt közlemények listája

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

2 JANKOVICS F, SINKA R, <u>ERDELYI M</u> 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, <u>ERDELYI M</u> 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, <u>ERDELYI</u> <u>M</u>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, <u>ERDELYI M</u> 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 <u>ERDELYI M</u>*, 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, <u>ERDÉLYI M</u> 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

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

Egyéb közlemények

1 SZABAD J, <u>ERDELYI M</u>, 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, <u>ERDELYI M</u>, 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

<u>**3** ERDELYI M</u>, 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 , <u>ERDELYI M</u>, 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

<u>**5** ERDELYI M</u>, 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, <u>ERDELYI M</u>, 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

7 LIPPAI M, TIRIAN L, BOROS I , MIHALY J , <u>ERDELYI M</u>, 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, <u>ERDELYI M</u>, 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, <u>ERDELYI M</u>, 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, <u>ERDELYI M</u>, 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, KEREKES I, <u>ERDELYI M</u>, 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, <u>ERDELYI M</u>, 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

dc_39_10

Saját közlemények száma:	20
Idézetek száma:	787
Független idézetek száma:	674
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 Dorsophila Genetikai tudományos iskolának. Köszönettel tartozom Anne Ephrussinak, hogy megismertetett 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 Intézetbéli Drosophilás csoportvezető-társaimtól. Rendkívül szerencsésnek mondhatom magam, hogy együtt dolgozhattam Závorszky Péterrel, Jankovics Ferenccel, Sinka 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 és nagyszüleik a legmesszebbmenően segítettek céljaim elérésében, aminek megköszönésére nehéz lenne megfelelő szavakat találni.