

**Az ivarsejtek kialakításában szerepet játszó *poiro* gén  
azonosítása és jellemzése *Drosophila melanogaster*ben**



Ph.D. értekezés tézisei

Készítette: Sinka Rita

Témavezető: Dr. Erdélyi Miklós

MTA Szegedi Biológia Központ

Genetika Intézet

Szeged, 2002



## Bevezetés és célkitűzés

A *Drosophilaban melanogasterben*, mint a legtöbb szervezetben az ivarsejtek ősei már az egyedfejlődés korai stádiumában elkülönülnek a testi sejtektől. Ezek az ősvarsejtek egy meghatározott differenciálódási programot követnek, melynek eredményeként jönnek létre a petesejtek és a hímivarsejtek. A muslica petéjére jellemző egy speciális citoplazma rész, az úgynevezett ivarplazma vagy poláris plazma, amely már az oogenezis alatt a fejlődő petekezdemény hátulsó részén kialakul, majd az érett petében is fennmarad.

A *Drosophila melanogasterben* az ivarplazma összeszervezéséért az *oskar* géntermék a felelős. Az *oskar* mRNS a fejlődő oocyta citoplazmájának poszterior részén lokalizálódik, majd ott helyspecifikusan transzlálódik. Az Oskar fehérje hatása így az érett pete leghátsó citoplazmarészletére korlátozódik, ahol feladata a speciális ribonukleoprotein rögzítőkből álló ivarplazma megszervezése, amelyből az embrionális ivarsejtek fűződnek le.

A poláris plazma kutatása a *Drosophilában* jól kidolgozott, genetikai módszerek felhasználásával lehetséges. Ivarsejthiányos mutáns fenotípussal számos poláris plazma komponenst azonosítottak. Ezen mutációk genetikai vizsgálata feltárta, hogy a poláris plazma összeszerveződése lépcsőzetes folyamat, a kialakításában szereplő gének lineáris hierarhiába szerveződnek

Laboratóriumunk célja az ivarsejtek kialakításában szerepet játszó új gének azonosítás, illetve már ismert gének ivarsejtspecifikus funkciójának megállapítása és jellemzése. Ennek megvalósításában nagy segítséget jelentenek a *Drosophila* genom programok által a muslica genomban előállított és térképezett nagy számú transzpozon inszerciós vonalak. Ezeknek a vonalaknak a vizsgálatával lehetőség nyílik új és már ismert gének különböző erősségű mutáns alléljeinek izolálására és azokban az ivarsejtspecifikus génfunkció vizsgálatára. Különböző típusú transzpozonok használata azért lehet eredményes, mert eltérő inszerciós specificitással rendelkeznek.

Értekezésem egy új poszterior gén, a *poirot* azonosításáról és jellemzéséről szól. A *hobo* transzpozon indukálta homozigóta életképes

mutáns vonalakat vizsgáltuk ivarsejthiányos fenotípusra. A *prt<sup>85</sup>* vonal utódai 70%-os ivarsejthiányos fenotípussal rendelkeznek. Genetikailag és molekulárisan is jellemeztük a *prt<sup>85</sup>* mutáns vonalat és azonosítottuk a *poirot* gént. Megállapítottuk, hogy a Poirot fehérje a poláris plazma kialakításában központi helyen lévő Osk fehérje poszterior kikötődéséhez szükséges.

## **Alkalmazott módszerek**

- # *Drosophila melanogaster* tenyésztése, fenntartása, keresztezése, transzpozon mobilizálása, transzgént tartalmazó vonalakkal menekítési kísérletek
- # Embrionális kutikula preparátum készítése
- # *Drosophila* ováriumok és embriók immun-hisztokémiai festése
- # Digoxigenin jelölt DNS próba előállítása és azzal *in situ* hibridizálás nyálmirigy óriáskromoszómán és petekezdemenyen
- # Ivarvonal transzformálás *Drosophila*-ban
- # DNS munkák: Klónozás, PCR és menekítő konstrukció készítése
- # RNS munkák: Totál RNS tisztítás, Northern hibridizáció, RT-PCR
- # Fehérje munkák: Fehérje preparálás, Western blot, Prt-GST fúziós fehérje előállítása, Prt-GFP fúziós fehérje előállítása

- # Prt ellenanyag termeltetése nyúlban
- # Konfokális és fénymikroszkóp használata és mikroszkópi felvételek készítése

## Eredmények és következtetések

Értekezésemben egy új poszterior gén, a *poirot* genetikai azonosításáról, részletes genetikai és molekuláris vizsgálatáról számolunk be.

1. A *poirot* gént 70%-os penetranciájú unokátlan fenotípust mutató *prt<sup>gs</sup>* mutáns alléljával azonosítottuk egy *hobo* mutánsgyűjtemény szisztematikus szűrésével.
2. 18°C-on tartott homozigóta *prt<sup>gs</sup>* nőstények utódai az ivarsejthiányos fenotípus penetranciájának emelkedése mellett abdomenhiányt is mutattak.

Az abdomennek és az ivarsejteknek együttes hiánya az ún. poszterior géncsoport mutációira jellemző, amikor a mindkét struktúra kialakításáért felelős poláris plazma sérül. A *prt<sup>gs</sup>* mutációt, a 18°C-on

tapasztalt összetett fenotípusa alapján a poszterior mutánsok csoportjába soroltuk.

3. A mutáns vonalat genetikailag jellemeztük. Genetikai és molekuláris módszerekkel megállapítottuk a mutációt okozó *hobo* transzpozon beépülésének helyét.

A deléciós térképezés fényt derített a *prt<sup>gs</sup>* mutáció természetére is. A *prt<sup>gs</sup>* mutáció defficienciákkal szemben mutatott unokátlan fenotípusa közel azonos volt a *prt<sup>gs</sup>* homozigóta fenotípusának penetranciájával. Az a tény, hogy a *prt<sup>gs</sup>* mutáció homo- és hemizigóta fenotípusának penetranciája közel azonos, arra enged következtetni, hogy a *prt<sup>gs</sup>* allél egy null mutáció.

4. Annak bizonyítására, hogy valóban a *hobo* elem inszerciója felelős a *prt<sup>gs</sup>* mutációért, *hobo* remobilizációs kísérletet végeztünk.

A szemszín változás alapján 7 vonalat különítettünk el, melyek közül 5 a *prt<sup>gs</sup>* mutáció fenotípusos revertánsának bizonyult. A revertáns vonalakban a *hobo* transzpozon elmozdulása *prt<sup>gs</sup>* fenotípus elvesztéséhez vezetett, bizonyítva, hogy az ivarsejthiányos fenotípust a *hobo* transzpozon inszerciója okozta.

## 5. Azonosítottuk és jellemeztük a vad típusú *poirot* gént

A *hobo* transzpozon környezetének molekuláris jellemzésénél az adapteres PCR technika segítségével megállapítottuk a *prt<sup>gs</sup>* vonalba beépült *hobo* elem széli szekvenciáit. Azonosítottuk az inszerciós pont környezetében a CG7761 prediktált gént, amelyet *poirot*-nak neveztünk el. A *poirot* (*prt*) gén 4 exonból áll. Az első exont egy nagy intron követi, ez tartalmazza a *prt<sup>gs</sup>* vonalban a *hobo* transzpozont.

A Prt fehérje N-terminális része nagyfokú homológiát mutat az ember és az egér Sab fehérjével, illetve egy prediktált Q91Y80 jelű patkány és egy K03E6.7 jelű *Caenorhabditis elegans* fehérjével. Az emberben azonosított Sab fehérjét, egy SH3 domén kötő fehérjéként írták le, amely a Bruton-tirozin-kináz fehérjét köti annak SH3 doménjén keresztül és e kapcsolaton keresztül negatívan regulálja annak működését. A fehérje szekvencia homológia alapján a Prt fehérjét egy SH3 domén kötő fehérjecsalád új tagjaként definiáltuk.

6. RNS szinten kimutattuk, hogy a *prt* gén elrontása a *prt<sup>gs</sup>* vonalban null mutációt eredményez.



7. Megállapítottuk, hogy a *prt* gén első exonja és a *prt<sup>gs</sup>* mutációt okozó *hobo* transzpozon *mini-white* riportergénjének fúziója megakadályozza a vad típusú géntermék képződését a *prt<sup>gs</sup>* mutánsban.

8. Prt fehérje ellen poliklonális ellenanyagot termeltettünk nyulakban, és ezzel is bizonyítottuk a *prt<sup>gs</sup>* mutáció null jellegét.

9. *prt* cDNS-t tartalmazó konstrukciót készítettünk, melynek felhasználásával transzgenikus vonalat készítettünk és ivarvonal-specifikus expresszióval menekítettük a *prt<sup>gs</sup>* mutáció ivarsejthiányos fenotípusát.

Mivel a *prt* transzgént ivarvonal-specifikusan expresszáztattuk, a menekítési kísérlet azt is megmutatta, hogy a *prt<sup>gs</sup>* mutáció a petekezdemények ivarvonal-eredetű sejtjeit érinti.

10. Prt-GFP fúziós fehérjét termelő transzgenikus *Drosophila* törzseket hoztunk létre és meghatároztuk a Prt sejten belüli elhelyezkedését a petefejlődés különböző stádiumaiban.

A Prt-GFP transzgénnel sikeresen menekítettük az *prt<sup>gs</sup>* utódjainak ivarsejthiányos fenotípusát, bizonyítva, hogy a Prt-GFP fúziós fehérje

működőképes, tehát az minden valószínűség szerint hűen tükrözi a vad típusú Prt fehérje expressziós mintázatát. A vad típusú petekezdeményeken a Prt-GFP fehérje a korai stádiumokban a dajkasejtek magja körül, halmozódik fel, kis granulumok formájában. Az oogenezis középső stádiumaiban a dajkasejtek mellett a petesejtben is megtalálhatók a granulumok, majd a fejlődés későbbi szakaszaiban a Prt-GFP fehérjét a petesejt sejthártyája alatt, szubkortikálisan figyeltük meg. A Prt fehérje egy eddig még nem azonosított módon szállítódik a dajka sejtekből a fejlődő petekezdeménybe.

11. A *btk29A* allélok ivarvonalában homozigóta ivarvonal klónokat hoztunk létre, majd az életképes utódokban az ivarsejthiányos fenotípusra vizsgáltunk.

Megállapítottuk, hogy a vizsgált *btk* alléleknek nincs ivarsejthiányos fenotípusa. Ezen eredmények alapján megerősíthető, hogy *btk29A* aktivitás sem a potroh kialakításához, sem az ivarvonal kialakításhoz nem szükséges.

12. A *prt<sup>gs</sup>* és az ismert *bkt* allélokkal (*k00206*, *k05610*, *fic<sup>PL</sup>*) kettős mutánsokat készítettünk.

A homozigóta életképes  $bt\kappa29A^{ficPL-prt^{gs}}/ bt\kappa29A^{ficPL-prt^{gs}}$  kettős mutánsokban az eredeti fenotípusok eltűnését tapasztaltuk és a fenotípus jelentős szupresszióját figyeltük meg a  $bt\kappa29A^{k05610-prt^{gs}}/bt\kappa29A^{ficPL-prt^{gs}}$  és a  $bt\kappa29A^{k00206-prt^{gs}}/bt\kappa29A^{ficPL-prt^{gs}}$  rekombinánsok esetében is. Egy null mutáció szupressziója hipomorf mutációkkal, negatív regulációra utal. A szerkezeti homológián túl beláttuk, hogy az emberhez hasonlóan, *Drosophilában* is a Prt fehérje negatív regulátora lehet a *Drosophila*  $bt\kappa29A$ -nak.

13. Megvizsgáltuk a poszterior géncsalád központi szereplőjéről az *osk* génről átíródó *osk* mRNS szintjét és elhelyezkedését a  $prt^{gs}$  mutáns petekezdeményekben, amit vad típusúnak találtunk.

A Staufen fehérje (az *osk* mRNS eloszlás fehérjemarkereként szokás használni) a homozigóta  $prt^{gs}$  homozigóta nőstények petekezdeményeiben az *osk* mRNS-hez hasonlóan vad típusú eloszlást mutatott.

14. Az poszterior lokalizációval rendelkező Osk fehérje fokozatos csökkenését tapasztaltuk a  $prt^{gs}$  homozigóta nőstények

petekezdeményeiben illetve az általuk rakott petékben, ellenanyagos festési kísérletekben.

A *prt<sup>gs</sup>* mutánsok ováriumában az *osk* transzlációja elindul, mivel a korai stádiumokban normális lokalizációt mutat, majd az oogenezis előrehaladtával az Osk fehérje szintje csökken a poszterior póluson. Konfokális mikroszkóppal a homozigóta *prt<sup>gs</sup>* nőstények 10. stádiumú petekezdeményeinek 38%-ban Oskar fehérje delokalizációt tapasztaltunk, amikor is a fehérje leszakadozik a poszterior pólusról. A hibás lokalizáció jelensége a pete fejlődésének előrehaladtával fokozódik, és a pete lerakása után, az embrionális korban a legerőteljesebb. A homozigóta *prt<sup>gs</sup>* nőstényektől származó embriók 90%-ában az Osk nem mutatható ki vagy mennyisége jelentősen mértékben csökken. Az Osk fehérje elválk a poszterior szubkortikális régiótól és degradációra utaló jeleket mutat a *prt<sup>gs</sup>* mutánsok ováriumában és az embriókban egyaránt.

15. Az Osk fehérjecsökenést *prt<sup>gs</sup>* homozigóta nőstények ováriumában Western blotton is kimutattuk és megállapítottuk hogy csak a

rövidebb Osk izoforma szintje csökken, a hosszabb Osk izoforma mennyisége megegyezik a vad típuséval.

Ezekből az eredményekből arra a következtetésre jutottunk, hogy a Prt fehérje a rövidebb Osk izoformán keresztül fejt ki hatását.

16. A Prt-GFP fúziós fehérje és az Osk fehérje a 10. stádiumban a poszterior szubkortikális régióban átfedő lokalizációt mutat.

Ez a térbeli elhelyezkedés megteremti a lehetőségét a Prt fehérje és az Osk fehérje lokalizációjában szerepet játszó fehérjék közötti fizikai kapcsolatnak.

Mivel a Prt fehérje a vad típusú petesejt azon szubkortikális részén található, ahol az Osk fehérje képződése és kihorgonyzódása történik, feltételezzük, hogy a Prt fehérje negatív szabályozással megszünteti a szubkortikális Btk fehérje aktivitását. Hipotézisünk szerint, amikor a Prt, mint feltételezett negatív szabályozó hiányzik, a mutáns petekezdeményekben egy ektópikus fehérje aktivitás megzavarja a poszterior gén-hierarchia normális szabályozását. Úgy gondoljuk, hogy a *prt<sup>gs</sup>* mutánsokban, egy eddig még ismeretlen módon, a szabályozatlan

Btk kináz aktivitás a rövid Osk kihorgonyozását módosítja, amely megnyilvánul mind a két rövid Osk izoforma delokalizációjában és degradációjában. Mivel csak a foszforilált rövid Osk izoformát detektáltuk a *prt<sup>gs</sup>* mutánsban, feltételezzük, hogy ez az izoforma, vagy ennek az izoformának a poszterior póluson történő kihorgonyozódása stabilabb.

Úgy gondoljuk tehát, hogy a Prt-Btk kapcsolat további biokémiai vizsgálata és sejtbiológiai funkciójának alaposabb megismerése elősegítené az Osk fehérje poszterior póluson történő kihorgonyozódási folyamatának megértését.

## Summary

Embryonic germ cell formation and abdomen development in *Drosophila* requires localisation and site specific translation of *oskar* mRNA in the posterior part of the oocyte. Targeting of *oskar* function to the posterior pole of the oocyte needs a large set of proteins and RNAs, encoded by posterior group genes. Consequently, mutations in the posterior group genes can result in embryos without abdomens and/or germ cells.

During a systematic *hobo*-mediated mutant isolation screen, we identified *poirot*, a novel posterior group gene, due to its germ cell-less phenotype.

We show that the lack of *poirot* activity dramatically decreases Oskar protein levels, without affecting the *oskar* mRNA distribution. In *poirot* mutant oocytes, delocalised Oskar protein is observed, indicating that wild type *poirot* has a role in the anchoring process of the Oskar protein at the posterior pole. Furthermore, we demonstrate that *poirot* acts in an isoform-specific manner, only the short Oskar isoform is affected, while

the long Oskar isoform remains at wild type levels in *poirot* mutants. We found the PRT protein in large protein aggregates that are localized subcortically in the oocytes.

The Sab protein, the human homologue of the *prt* gene preferentially binds to the Bruton tyrosine kinase (Btk) protein and negatively regulates its function. The genetic interaction found between *prt* and *Drosophila Btk29A* indicates that the the PRT regulatory function is evolutionary conserved.

We propose that, in wild type oocytes, PRT inactivates the Btk protein in the subcortical region. We suggest that uncontrolled Btk kinase activity modifies the anchoring capability of short Osk directly or indirectly to the subcortical region, resulting in delocalisation and degradation of both phosphorylated and unphosphorylated short Osk proteins.



## Közlemények jegyzéke

**SINKA, R.**, JANKOVICS F., SOMOGYI K., SZLANKA T., LUKÁCSOVICH T. and ERDÉLYI M., 2002 *piorot*, a new regulatory gene of the *Drosophila oskar* act at the level of the short Oskar protein isoform. **Development** 129 (14)

Impakt faktor (2000): 9.353

JANKOVICS, F., **SINKA R.** and ERDÉLYI M.: 2001 An interaction type of genetic screen reveals a role of the *Rab11* gene in *osk* mRNA localization in the developing *Drosophila melanogaster* oocyte. **Genetics** **158**: 1177-1188

Impakt faktor (2000): 4.687

JANKOVICS F., **SINKA R.**, LUKÁCSOVICH T., ERDÉLYI M., 2002 Dmoesin crosslinks actin and cell membrane in *Drosophila* oocyte and is required for OSKAR anchoring. **Current Biology** közlésre benyújtva

EVA KURUCZ, CARL-JOHAN ZETTERVALL, **RITA SINKA**, PETER VILMOS, ANDOR PIVARCSI, SOPHIA EKENGREN, ZOLTÁN HEGEDÜS, **ISTVAN ANDO** AND DAN HULTMARK, 2002 Hemese, a transmembrane protein from *Drosophila* blood cells,

affects the cellular immune response to a parasitoid wasp. **EMBO Reports** közlésre benyújtva