# Az ivarsejtek kialakításában szerepet játszó *poirot* gén azonosítása és jellemzése *Drosophila melanogasterben*

Ph.D. értekezés tézisei

Készítette: Sinka Rita

Témavezető: Dr. Erdélyi Miklós

MTA Szegedi Biológia Központ

Genetika Intézet

Szeged, 2002

BEVEZETÉS	4
Általános bevezetés és célkitűzés	4
IRODALMI ÁTTEKINTÉS	10
A Drosophila melanogaster petefejlődése és korai embriogenezise	10
A petekamra polaritásának kialakulása	15
Az osk mRNS és fehérje szabályozása	16
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	18
Tenyésztési körülmények és a felhasznált <i>Drosophila</i> törzsek	18
A <i>hobo</i> elem kiugrasztása	19
Embrionális kutikula preparátum	19
Drosophila embriók immun-hisztokémiai festése	20
Drosophila ováriumok immun-hisztokémiai festése	21
Digoxigenin jelölt DNS próba előállítása	22
RNS <i>in situ</i> hibridizálás	23
Óriáskromoszóma in situ hibridizálás	25
Ivarvonal transzformálás Drosohilában	27
Fehérje preparálás, Western blot	28
Klónozás és a menekítő konstrukt elkészítése	30
Totál RNS tisztítás	31
Northern hibridizáció	32
Reverz transzkripció, RT-PCR	34
Prt-GST fúziós fehérje előállítása	35
Prt ellenanyag termeltetés nyúlban	38
Prt-Gfp fúziós fehérje előállítása	39
A kísérletek során használt, általunk tervezett szintetikus primerek	40

Internetes adatbázisok, szolgáltatások és felhasznált szoftverek	40
EREDMÉNYEK	41
A <i>prt<sup>gs</sup></i> mutáció azonosítása és fenotípusos jellemzése	41
A <i>prt<sup>gs</sup></i> mutáció térképezése	44
A <i>prt<sup>gs</sup></i> gén klónozása és jellemzése	46
A <i>prt<sup>sg</sup></i> mutáció molekuláris jellemése	49
Az ivarsejthiányos fenotípus menekítése <i>prt</i> transzgénnel	53
A Prt protein kimutatása ellenanyaggal és sejten belüli eloszlásának megállapíta	ísa 54
Az osk mRNS és fehérje lokalizációjának és a fehérje mennyiségének vizsgálata	59
A <i>prt<sup>gs</sup></i> és a <i>btk29A</i> allélok genetikai interakciója	66
AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA	68
AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA	70
FÜGGELÉK	77
Az osk mRNS lokalizációjában szerepet játszó gének	77
Az oskar mRNS transzlációjában szerepet játszó gének	91
SUMMARY	95
IRODALOMJEGYZÉK	101
KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE	108
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	109

# Bevezetés

# Általános bevezetés és célkitűzés

A *Drosophila melanogaster*-ben, mint a legtöbb szervezetben az ivarsejtek ősei már az egyedfejlődés korai stádiumában elkülönülnek a testi sejtektől, majd az ősivarsejtek egy meghatározott differenciálódási programot követnek. Ennek 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 poláris plazma, szik mentes, fénymikroszkópban is látható, áttetsző citoplazma részlet. A poláris plazma az anyai hatású géntermékeket, RNS-eket és fehérjéket speciálisan szervezett formában tartalmazza, mely szükséges és elégséges feltétele az embrionális ivarsejtek kialakulásának. Ezek az embrionális ivarsejtek lesznek a kifejlett állat ősivarsejtjei.

Geigy mutatta be először (1931), hogy a poszterior póluson lévő poláris plazma beépül az embrionális ivarsejtekbe és szükséges azok lefűződéséhez. A korai embrionális korban végzett UV besugárzás hatására a poláris plazma szétroncsolható, a megtermékenyített petéből steril felnőtt állat fejlődik. Geigy azt is megmutatta, hogy az ivarszerveknek a testi sejt eredetű komponensei az ivarsejtek hiányában is kialakulnak, melyből arra következtetett, hogy az ivarszervek testi eredetű és ivarvonal specifikus komponensei független fejlődési vonalat képviselnek. Okada (1974) UV fénnyel besugarazott embrióba vad típusú poláris plazmát ültetett és ivarsejtek képződését tapasztalta (Okada *és mtsai.*, 1974). Ezzel bizonyította, hogy a poláris plazma elegendő az ivarsejtek képzéséhez. Ezt ektopikus helyre történő poláris plazma átültetéssel

megerősítették Mahowald és munkatársai (Illmensee és Mahowald, 1974). A poláris plazma átültetése során azt tapasztalták, hogy bár kis mértékben, de mind az embrió anterior, mind közép-ventrális részére történt poláris plazma átültetés ektopikus embrionális ivarsejtek kialakulásához vezetett. Számos biokémiai vizsgálat irányult a poláris plazma alkotórészeinek elkülönítésére petesejtben és az embrióban egyaránt, de nem sikerül olyan frakciót elkülöníteni, amely poláris plazma alkotórészeket tartalmazott volna (Warren és Mahowald, 1979).

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 (Lehmann és Nusslein-Volhard, 1986; Ephrussi *és mtsai.*, 1991). Az ivarplazma kialakulásának feltétele a poszterior pólus kijelölése a fejlődő petesejtben.

Az oskar (osk) mRNS és fehérje poszterior lokalizációja kulcsfontosságú elem a poszterior pólus és a poláris plazma kialakításában és fenntartásában a petefejlődés késői és az embriogenezi korai stádiumaiban. Ezt bizonyítja, hogy embrionális ivarsejtek képződését tapasztalták ektopikus, anterior *osk* mRNS lokalizációt követően, illetve az *osk* túltermeltetésével szám feletti, míg expressziójának csökkentésével jelentősen lecsökkent számú embrionális ivarsejt kialakulását tapasztalták (Smith *és mtsai.*, 1992; Ephrussi és Lehmann, 1992).

A poláris plazma nemcsak az ivarsejtek, hanem a potroh kiakításához is szükséges. Mivel a potrohképződés megvalósulhat ivarsejtek kialakulása nélkül is, így

megállapítható, hogy alacsonyabb Osk fehérje mennyiség elegendő a potroh, mint az embrionális ivarsejtek kialakításához. Ezt egészíteti ki Ephrussi és Lehmann kísérlete, amelyben az *osk* mRNS kódoló részét az anterior morfogén *bicoid* lokalizációját szabályozó 3'-UTR részével építették össze. A hibrid *osk* mRNS képes volt a *bicoid* lokalizációs és transzlációs szabályozásának megfelelően az anterior póluson lokalizálódni, transzlálódni, poláris plazmát összeszervezni és potrohot és embrionális ivarsejteket képezni az anterior póluson (Ephrussi és Lehmann, 1992). Tehát az *osk* géntermék szükséges és elégséges feltétele a poláris plazma összeszervezésének, az ivarsejtek és a potroh determinálásának. Az *osk* ektopikus kifejeztetésével lehetőség nyílt elkülöníteni azokat a géneket, amelyek az ivarplazma kialakításához, illetve azokat, amelyek az *osk* mRNS poszterior póluson történő lokalizációjához szükségesek.

Az osk mRNS lokalizációja tehát kulcsfontosságú kezdőlépése a poláris plazma megszervezésének. Az osk géntermékek sejtbiológiai vizsgálata megmutatta, hogy nemcsak az osk mRNS-nek, hanem a fehérjének is rögzülnie kell a poszterior pólushoz. Sem az osk mRNS, sem az Osk fehérje poszterior pólushoz való kötődésének a pontos mechanizmusa még nem ismert. Abban az esetben, ha mind az RNS lokalizációja, transzlációja és a fehérje kikötődése is normális, akkor megteremtődik újabb elemek poláris plazmához való kapcsolódásának a lehetősége. Ilyen a Vasa fehérje (Hay *és mtsai.* 1988), majd ezt követi a Tudor fehérje lokalizációja (Boswell, Mahowald, 1985). A fenti fehérjék mindegyike a poláris plazma kialakításán keresztül a potroh és az ivarsejtek kialakításához is szükséges, hiányuk ivarsejthiányos és potrohhiányos fenotípussal jár együtt. Habár a potroh kialakításában kulcsfontosságú *pumilio* és *nanos* morfogének is a poláris plazmába lokalizálódnak, de ezek nem szükségesek a poláris plazma

összeszerveződéséhez. A potroh kialakításában van funkciójuk, illetve a már lefűződött embrionális ivarsejtek vándorlásához szükségesek (Wang és Lehmann, 1991). A poláris plazmának olyan komponensei is ismeretesek, amelyek kizárólag az ivarsejtek kialakításához szükségesek, a potrohképzéshez nem. Ilyen a *germ cell-less* RNS és fehérje, a *mitokondriális nagy riboszómális* RNS és a *poláris plazma komponens* RNS. Ezek egyike sem tud önmagában ektopikus helyen embrionális ivarsejteket indukálni, szemben a fő poláris plazma komponenssel az *osk*-ral.

A poláris plazma összeszerveződése rendkívül összetett sejtbiológiai folyamat, melyben számos pleiotrop jellegű géntermék játszik szerepet, amelyek nemcsak az ivarsejtek kialakításához, hanem más életfolyamatokhoz is szükségesek. Az ilyen, az ivarsejtek kialakításában is szerepet játszó gének azonosítására különböző típusú mutánsizolálási technikákat alkalmaznak.

A genetikai mozaikosságon alapuló módszer alkalmas lehet pleiotrop gének azonosítására. Ebben az esetben a homozigóta ivarsejtekből és a heterozigóta testi sejtekből álló, ún. mozaikos állatokban vizsgálható a kérdéses mutáció szerepe az ivarsejtsors kialakításában (Wieschaus és Szabad, 1979). Ebben az elrendezésben, mivel a testi sejtek heterozigóták, az egyed túlél, de benne az egyes mutációkra nézve homozigóta ivarsejtek mutáns fenotípusa vizsgálható. Ivarsejt-testisejt genetikai mozaikokat a mitótikus rekombináció módszerével lehet előállítani. A mitótikus rekombináció a kromatidák indukált törésén és a nem testvérkormatidák egyesülésén alapuló rekombinációs módszer. A FLP-FRT rendszer segítségével az adott kromoszómakarokon az FRT helytől disztálisan elhelyezkedő mutációk hozhatók homozigóta formába. *Drosophilában* rendelkezésre áll a FLP-FRT rekombinációs

rendszer a két nagy autoszóma jobb és bal karján, valamint az X kromoszómán egyaránt (Chou és Perrimon, 1992). Ezeket a törzseket felhasználva mind kémiai mutagén által indukált, mind transzpozon indukálta letális mutációk ivarvonal klónokban történő vizsgálatára lehetőség nyílik.

A transzpozonos mutánsizolálási technikával próbáltak már kizárólagosan az ivarsejtek kialakításához szükséges, úgynevezett ivarsejtfaktorokat azonosítani. A nagy méretű mutagenezis vizsgálat ellenére a hagyományos P elem segítségével nem sikerült új ivarsejtfaktort azonosítani. A homozigóta életképes P elem inszerciós vonalak tesztelésével azonban azonosították pl. a pleiotrop funkciói között aktinkötő képességgel is rendelkező *tropomiozin II* gént, melynek gyenge mutáns alléljei ivarsejthiányos fenotípussal rendelkeznek és az *osk* mRNS poszterior lokalizációjában hibásak. Így bizonyítást nyert, hogy az anyai hatású mRNS-k lokalizációjában szerepe van az aktin sejtváznak (Erdélyi *és mtsai.*, 1995).

Laboratóriumunk célja az ivarsejtek kialakításában szerepet játszó új gének azonosítása, 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 specifitással rendelkeznek. Kiss István (SZBK, Genetika Intézet) és munkacsoportja mind a széles körben használt P elemmel, mind a *hobo* elemmel létrehozott egy-egy mutánsgyűjteményt.

Értekezésem egy új poszterior gén, a *poirot* azonosításáról és jellemzéséről szól. A *hobo* transzpozon indukálta homozigóta életképes mutáns vonalakat vizsgáltuk ivarsejthiányos fenotípusra, melynek során azonosítottuk a *prt<sup>gs</sup>* vonalat az utódjaikban megnyilvánuló 70%-os ivarsejthiányos fenotípussal. A *prt<sup>gs</sup>* mutáns vonalat genetikai és molekuláris módszerekkel jellemeztük. Megállapítottuk, hogy a Poirot fehérje a poláris plazma kialakításában központi helyen lévő Osk fehérje poszterior póluson történő kikötődéséhez szükséges.

# Irodalmi áttekintés

# A Drosophila melanogaster petefejlődése és korai embriogenezise

A *Drosophila* nőstények két petefészke egyenként körülbelül 16 petecsőből áll, amelyek egy-egy független petefejlődési vonalat képviselnek. A petecsövek terminális, csúcsi részét germáriumnak hívjuk, melyek a testisejt eredetű terminális filament sejtekben végződnek. A germárium csúcsában petecsövenként három ősivarsejt helyezkedik el, melyek osztódása két különböző leánysejtet, egy újabb ősivarsejtet és egy cisztoblasztot eredményez (1. ábra).



**1. ábra**. (**A**) A petefejlődés sematikus rajza, a különböző fejlődési stádiumú petekezdeményekkel és az őket körülvevő testi eredetű sejtekkel. (**B**) A nőstény *Drosophila* belső szaporítószervei (King 1970).

A cisztoblaszt 4, nem teljes mitótikus osztódás után cisztává fejlődik (2. ábra). Az egyes petecsöveken belül 14 morfológiai stádium különböztethető meg anterior-poszterior irányban. Az ősivarsejtek osztódását követő négy mitózis során a ciszta sejtjei nem válnak el egymástól, köztük az ún. gyűrűcsatornák segítségével megmarad a citoplazmatikus kapcsolat (1. ábra).



**2. ábra**. A germárium szerkezete (Spradling 1997). (A) A germárium hosszmetszete és (B) sematikus rajza az egyes régiók feltüntesével.

A gyűrűcsatornákat filamentózus aktin és aktin kötő fehérjék alkotják amelyek biztosítják a csatorna szerkezetét és növekedését a pete fejlődése során. Mind a gyűrűcsatornák kialakításában, mind az osztódások irányultságának szabályozásában döntő szerepe van egy fuzóma nevű citoplazmatikus képződménynek, amely az összes ciszta sejtet összeköti (Lin 1995, Spradling 1997). A fuzóma struktúrájára jellemző, hogy minden mitózis után egy központi tengelyből ágacskák sarjadnak ki, melyekhez az osztódási orsók az egyik pólusukkal kötődnek. A fuzómának bizonyítottan szerepe van abban a folyamatban is melynek során a 16 tagú cisztából egy sejt petesejté válik. A petesejt differenciálódása után a fuzóma eltűnik. A 16 sejtből álló, follikuláris sejtekkel borított cisztában 15 sejt dajkasejté, egy, 4 gyűrűcsatornával rendelkező pedig petesejtté differenciálódik, és innen petekezdeményről beszélünk. A petesejt a petekezdemény a poszterior pólusán található, amely az első jele a petekezdemény anterior-poszterior aszimetriájának (2, 3.ábra).

A petekezdemény érése során a dajkasejtek magja politenizálódik, bennük erős transzkripció kezdődik, míg a petesejt magja inaktív marad. A transzkripció nélküli petesejtet a dajkasejtekben termelődött RNS-k és fehérjék tartják életben. A dajkasejtekből a petesejtbe irányuló anyagtranszport a gyűrűcsatornákon keresztül zajlik. A transzportban a gyűrűcsatornákon átnyúló mikrotubuláris rendszernek, valamint a mikrotubulus motorfehérjéknek, a dineinnek és a kinezinnek alapvető szerepe van (Gonzalez-Reyes *és mtsai.*, 1995; Munn és Steward, 1995).

A germárium 2B stádiumától kezdődően a petekezdeményeket a petecsövek falából származó mezoderma eredetű follikuláris sejtek borítják, melyek a pete és a dajkasejtek térfogatának növekedésével egyidőben mitótikusan osztódnak, számuk a korai 80-ról 1200-ra nő (Szabad és Hoffmann, 1989; Woodruff és Tilney, 1998). A follikuláris sejtek a hemolimfából tápanyagokat juttatnak a petesejt citoplazmájába. A petekezdemények érésében a follikuláris sejteknek sokrétű szerepe van, ennek megfelelően a peteérés során maguk is differenciálódnak. A petekezdemény anterior és poszterior pólusán elhelyezkedő sejtek a poláris follikuláris sejtek. Az anterior poláris follikuláris sejtek, az ún. határsejtekké (border cells) válnak melyek a dajkasejtek között poszterior irányba vándorolnak egészen a dajkasejt-petesejt határvonalig (3. ábra). A

differenciálódnak, melyek a petesejt szimmetriatengelyének kialakításában játszanak szerepet. A dajkasejteket borító follikuláris sejtek ellapult ún. strech sejtekké, míg az oocitát borítók pedig oszlopos epithéliális sejtekké válnak. Végül megkülönböztetjük az ún. centripetális follikuláris sejteket, melyek a petesejt és az egyre kisebb dajkasejtek közé nyomulnak és mintegy lelökik a degenerálódott dajkasejteket. A peteérés utolsó fázisaiban a follikuláris sejtek megkezdik a peték burkoló rétegeinek szintézisét, a belső vitellin membránét és a külső koriontét, miközben maguk degenerálódnak.



**3. ábra**. A peteérés utolsó fázisai. A centripetális follikuláris sejtek a petesejt és a dajkasejtek közé vándorolnak, a dajkasejtek citoplazmája benyomul a petesejtbe, elindul az operkulum kialakulása és végül kialakul a korionnal borított kifejlett pete.

A burkoló rétegek jellegzetes képződményei a hátoldali függelékek valamint a mikropílus, ahol a spermium behatol a petébe (3. ábra) (Margaritis *és mtsai.*, 1980). A 10.

stádiumtól kezdődően a dajkasejtek citoplazmája a gyűrűcsatornákon át fokozatosan a petesejtbe áramlik, ezzel a petesejt mérete megnövekszik, míg a dajkasejtek fokozatosan kiürülnek, hogy a folyamat végén programozott sejthalállal elpusztuljanak.

A petekezdemények képződésének utolsó szakaszában a petesejt magjában elkezdődik a meiozis. Az érett pete az első meiotikus osztódás metafázisában várja a megtermékenyülést.

A nőstények az úgynevezett spermiumtarisznyában tárolt hímivarsejtek egyikével termékenyítik meg az érett petét (1. ábra). A megtermékenyülés után a petesejt magja befejezi a meiózist. A négy anyai eredetű haploid magból három sarki testté, a negyedik női pronukleusszá alakul. Eközben a spermium kromatinja fellazul és a női pronukleusszal együtt kész az első mitotikus ún. gonomerikus osztódásra. A gonomerikus osztódás után a duplikálódott anyai és apai kromoszómák diploid sejtmagokká egyesülnek. A két diploid mag 13 gyors osztódáson megy keresztül, mely DNS szintézisből és mitózisból áll, citokinézis nélkül. Az így keletkezett kb. 8000 mag nagy része az anyai eredetű citoplazmában a kérgi állomány felé mozog és cellularizálódik. Azok a sejtmagok amelyek a pete poszterior részében találhatók és a poláris plazmába jutnak, azzal együtt lefűződve embrionális ivarsejtekké válnak. Néhány sejtmag a pete belsejében marad és politenizálódik. Ezek a sejtek a szikanyag lebontásában vesznek részt (Glover, 1991). A cellularizációval a szincíciális stádiumból az úgynevezett celluláris blasztoderma stádiumba kerül az embrió és ehhez a fejlődési stádiumhoz köthető a zigótikus géntermékek expressziójának kezdete. Egészen eddig a stádiumig az anyai eredetű géntermékek látnak el minden fejlődési folyamatot.

#### A petekamra polaritásának kialakulása

A pete és az embrionális tengelyek kialakulása már a korai oogenezisben megkezdődik. Az antero-poszteriorális és a dorzo-ventrális tengelyek kialakulása között sok a közös elem (Gonzalez-Reyes *és mtsai.*, 1995; Anderson, 1995; Munn és Steward, 1995). Mindkét tengely kialakulásakor alapvető jelentőségű a petesejt és a follikuláris sejtek közötti kölcsönös információcsere.

A petesejt follikuláris sejt kommunkiáció első lépése a poszterior elhelyezkedésű petesejt magját körülvevő *gurken* mRNS és fehérje által küldött ún. *gurken* szignál. A *gurken* jel hatására a petesejttel érintkező poláris follikuláris sejtek poszterior poláris follikuláris sejtekké válnak, majd ezekből a sejtekből származó szignál hatására a petesejtek mikrotubulus vázának irányultsága megváltozik (Anderson, 1995). A a 8. stádiumú petekezdeményben mikrotubulusok pozitív vége a korábbi anteriorral irányultsággal ellentétben a poszterior pólus felé mutat. A mikrotubulus rendszer átalakulása azt eredményezi, hogy a petesejt magja, a *gurken* RNS-sel együtt a mikrotubulusok mentén anterodorzális irányba vándorol. Az anterodorzális sarokban lokalizálódó mag körül a *gurken* RNS jelöli ki a petekezdemény dorzális oldalát olymódon, hogy az közelébe lévő follikuláris sejteket dorzális sorsúvá alakítja. Ezidő alatt a *bicoid* RNS a petekezdemény anterior, míg az *osk* mRNS a poszterior oldalon lokalizálódik. A fent említett három mRNS lokalizációja kijelöli a petekezdemény

#### Az osk mRNS és fehérje szabályozása

Az osk mRNS a dajkasejtekben képződik az oogenezis korai stádiumaitól kezdődően és a mikrotubuláris rendszer segítségével a gyűrűcsatornákon keresztül jut a dajkasejtekből a petesejtbe. Az osk mRNS korai stádiumokban egyenletes eloszlást mutat, majd a 6. stádiumban egy rövid ideig gyűrűszerűen helyezkedik a petesejt anterior részében. A 7-8. stádiumban kezdődik meg az osk mRNS poszterior lokalizációja, mely a petefejlődés későbbi stádiumaiban is fennmarad. Az osk mRNS poszterior lokalizációján túl a fehérjének is a poszterior póluson kell lokalizálódnia. Az osk nonszensz mutáns petesejtekben az osk mRNS a 9. stádiumban eljut a poszterior pólusra, ott a 10. stádiumban is még megfigyelhető, de a későbbi stádiumokban szétdiffundál a petesejt citoplazmájában. A poszterior póluson képződött Osk fehérje ugyanis hozzájárul az osk mRNS poszterior pólushoz rögzüléséhez, ami egy pozitív visszacsatolást hoz létre az osk szabályozásában (Rongo és mtsai., 1995; Markussen és mtsai., 1995).

Az osk mRNS nem transzlálódó (UTR) szekvenciáihoz szabályozó fehérjék kötődését mutatták ki. Az osk mRNS 5'UTR szekvenciájához kapcsolódnak a lokalizációt szabályozó fehérjék. Ilyen az RNS kötő Staufen fehérje, amely együtt lokalizálódik a poszterior póluson az osk mRNS-el (St Johnston és mtsai., 1991). Az osk mRNS 5'UTR szekvenciájához az RNS transzlációjának elősegítésében résztvevő Vasa fehérje is kapcsolódik. Az osk mRNS-nek a dajkasejtekből a petesejtbe történő szállításában fontos szerepe van az RNS-ket és fehérjéket is tartalmazó ún. Exu-RNP komplexnek. Ez a komplex tartalmazza az osk mRNS-t, valamint annak szabályozásában résztvevő Yps és Orb fehérjéket (Wilhelm és mtsai., 2000). A nem lokalizált osk mRNS transzlációja gátolt, amelyért az osk mRNS 3'UTR szabályozó szekvenciához több

helyen is kötődő Bruno és Apontic fehérjék a felelősek. A lokalizált RNS-ről két fehérje izoforma képződik két transzlációs starthely használatával. Az M1 metioninról egy hosszú Osk nevű izoforma (71 kDa), míg az M2 metioninról egy rövid Osk nevű izoforma képződik (55 kDa), ami poszttranszlációs módosítás eredményeképpen foszforilálódni képes (57 kDa) (Markussen *és mtsai.*, 1995). Ebben a foszforilációban a Par1 fehérje vesz részt, amely fehérjének már az oogenezis korai stádiumaiban a dajkasejt-petesejt ekülönülésben is van szerepe.

A Függelék részben foglaltam össze az eddig ismert, az *osk* mRNS lokalizációját és transzlációját befolyásoló géneket.

# Anyagok és Módszerek

# Tenyésztési körülmények és a felhasznált Drosophila törzsek

A *Drosophila* törzsek fenntartásához az általánosan használt kukoricadara-élesztő alapú muslica táptalajt használtunk. A keresztezések 25°C-on történtek, az ettől eltérő hőmérsékleteket az adott kísérleteknél feltüntettük. Vad típusként Oregon-R törzset használtunk.

Kiss István munkacsoportja a *hobo* elemes mutánsgyűjtemény elkészítésénél a H[pHlw2] jelű transzpozont használta (Smith *és mtsai.*, 1993). A gyűjteménynek a 750 homozigóta életképes *hobo* inszerciós vonalból álló részét teszteltük ivarsejthiányos fenotípusra úgy, hogy a törzsekből származó homozigóta nőstényeket vad típusú hímekkel kereszteztük és ezek utódjai között boncolással ivarsejthiányos egyedeket kerestünk. A *prt<sup>gs</sup>* mutáció térképezéshez a következő mutáns kromoszómákat használtunk: Df(2R)XTE58, Df(2R)XTED1, Df(2R)I4, Df(2R)JP1 és T(2;3)Ta<sup>L</sup>, (Flybase, (Underwood *és mtsai.*, 1990). A Western blot analízis során *osk54, Df p* <sup>XT103</sup>, *vasa<sup>PD</sup>* illetve *vasa<sup>D1</sup>* mutáns vonalakat használtunk (Flybase). Az UAS-*prt* és az UAS-*prt-GFP* transzgéneket a P(nosGal4VP16) jelű ivarsejtspecifikus driver segítségével fejeztettük ki (Rorth, 1998). Az interakciós kísérletekben a Bruton tirozin kináz allélokat (*btk29A<sup>k00206</sup>* és *btk29Afic*<sup>PL</sup>) használtuk (Roulier *és mtsai.*, 1998).

# A hobo elem kiugrasztása

A *prt* lókuszban található H[pHlw2] *hobo* inszerciót a P[ry<sup>+</sup> HBL1] *hobo* transzpozáz transzgén segítségével remobilizáltuk (Smith *és mtsai.*, 1993). y w/y w; *prt<sup>gs</sup>*/CyO nőstényeket kereszteztünk CyO P[ry<sup>+</sup> HBL1] /Bc Elp hímekkel. Az utódok közül egyedi w/Y; CyO [ry<sup>+</sup> HBL1] hímeket válogattunk és y w/y w; *prt<sup>gs</sup>* /CyO P[ry<sup>+</sup> HBL1] nőstényekkel kereszteztük őket. A következő genetrációban a fehér szemű y w/Y; *prt<sup>gsR</sup>*/SM6b utódokból w/w; SM6b/Sco és w/Y; SM6b/Sco törzsek segítségével revertáns törzseket (SM6b/*prt<sup>gsR</sup>*) alapítottunk. A revertáns vonalakat a szemszín megváltozása és az ivarsejthiányos fenotípus elvesztése alapján válogattuk ki.

# Embrionális kutikula preparátum

A homozigóta nőstényeket aktív szénnel színezett kemény agar táptalajon (22.5g agar, 25g cukor, 750ml vízben felfőzve és 250ml almaszörppel kiegészítve) petéztettük, majd a petéket összegyűjtöttük és 50% Chlorox hypoban dekorionizáltuk. PBS-ben való mosás után tárgylemezen Hoyer's médium:tejsav 1:1 arányú keverékében kezeltük 1 napig 60°C hőmérsékleten. A preparátumok kiértékelése sötétlátóterű, illetve fáziskontraszt mikroszóppal történt.

# Drosophila 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 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH=7.5) mosást követően fixáltuk. A fixáló pufferhez (0,1M PIPES, 2mM MgSO<sub>4</sub>, 1mM EGTA, 0,03% NaN<sub>3</sub>, 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% NaN<sub>3</sub>) hígítottunk a kimerített anti-Oskar esetében 1:500, míg a kimerített anti Vasa esetében 1:750 arányban. 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 1:200 arányban az anti-nyúl ellenanyag esetében, 1:100 arányban az anti-patkány ellelanyag esetében. Ezt követően 2 órától egy éjszakán át mostuk PBT-ben. A FITC konjugált anti-nyúl másodlagos ellenanyagok (Jakson Immuno Research Laboratories) esetében 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. A peroxidáz konjugált antipatkány ellenanyag (Amersham) esetében a mosásokat egy 0,1M citromsav, 0,05M ammónium-acetát (pH=7.5 NH<sub>4</sub>OH-val beállítva) festőpufferrel történő öblítés követett. A festéshez 980µl festőpufferhez 20µl DAB oldatot (25mg/ml DAB 0,1M TRIS (pH=7.5)-ben oldva) és 2µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ot (30% törzsoldat) adtunk és ebben inkubáltuk az embriókat folyamatosan ellenőrizve mikroszkóp alatt a jel intenzitását. A jel megjelenésekor a festőelegyet PBT-vel öblítettük le. A mintát glicerin-PBT 9:1 arányú keverékében tárgylemezen fedtük le. A preparátumokat mikroszkóp alatt, látható fényben vizsgáltuk. A mikroszkópi felvételek elkészítéséhez Axiocam CCD kamerát használtunk.

#### Drosophila ováriumok immun-hisztokémiai festése

Az ováriumokat EBR (10mM HEPES pH=6.9, 130mM NaCl, 5mM KCl, 2mM CaCl<sub>2</sub>) oldatban boncoltuk, Eppendorf csőbe gyűjtöttük és jégen tároltuk a fixálásig. A mintákat 10 percig folyamatosan forgatva fixáltuk 1 térfogat fixáló puffer (100mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH=6.8, 450mM KCl, 150mM NaCl, 20mM MgCl<sub>2</sub>), 4 térfogat dH<sub>2</sub>O 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 (nyúl anti-Oskar 1:500, nyúl anti-Staufen 1:2000, egér anti-GFP 1:100, nyúl anti-GFP 1:100, nyúl anti-Me31B 1:3000, nyúl anti-Exu 1:2000, egér anti-Orb

1:100, patkány anti-Cup 1:50) 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 hígított FITC konjugált anti-nyúl másodlagos ellenanyaggal kezeltük (Jakson Immuno Research Laboratories), 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.

#### Digoxigenin jelölt DNS próba előállítása

A munka során pBluescript-SK+ vektorba klónozott *oskar*, *prt* cDNS-eket jelöltünk. A plazmidokból a restrikciós térképek alapján megállapított enzimekkel cDNS-t tartalmazó szakaszokat vágtunk ki (Bluescript-*osk*: SacI 2.1 kb fragment, Bluescript-*prt* EcoRI-XhoI 1.5 kb fragment). Az emésztményeket 0.8% agaróz gélen (Low gelling temperature) futtattuk, majd a megfelelő fragmentumot tartalmazó gélkockákat kivágtuk, hogy a DNS-t visszaizoláljuk. A DNS-t tartalmazó gélkockákat 10 percig 65°C-on tartottuk, majd egy fenolozási lépés következett. A megolvadt gélkockákat vízzel 100µl-re kiegészítettük, majd azonos térfogatú vízzel telített fenolt adtunk hozzá. A mintát 1 perces vortexelést követően 5 percig centrifugáltuk 12000g fordulaton asztali centrifugán. A felső, vizes fázissal a tisztítási lépést kloroform alkalmazásával megismételtük. A cDNS fragmenteket 1/10 térfogat 3M NaAc (pH=5.2) és 2 térfogat etanol hozzáadásával –20°C-on fél óra

alatt kicsaptuk. A mintákat 12000g-vel centrifugáltuk 10 percig. A csapadékot 70% etanollal mostuk, majd újabb centrifugálás következett. Az összes folyadék eltávolítása után a csapadékot szobahőmérsékleten 10 percig szárítottuk, végül a jelöléshez megadott mennyiségű vízben feloldottuk. A jelölési reakciót 20µl-ben végeztük a Boehringer DIG jelölő készletben javasolt recept alapján, majd ugyanezzel a készlettel ellenőriztük a jelölés hatékonyságát (DIG DNA Labeling and Detection Kit Boehringer Mannheim Biochemica Cat. No. 1093657).

#### RNS in situ hibridizálás

2-3 napos, élesztővel kiegészített táptalajon tartott nőstényekből az ováriumokat PBT-ben (PBS+0.1%Tween20) boncoltuk. A kiboncolt ováriumokat fixálásig PBT-ben, jégen tartottuk. A fixálás 20 percig, 1ml 4% paraformaldehid (PBS-ben oldva), 100µl 2% Chlorox és 100µl DMSO oldatban történt, szobahőmérsékleten, folyamatosan forgókeréken forgatva. Az ováriumokról a fixáló oldatot kihegyezett Pasteur pipetta segítségével eltávolítottuk, majd 1ml PBT-ben 2x5 percig mostuk folyamatos forgatással. A mintát ezután PBT-ben oldott 50µg/ml ProteinázK-val (Sigma) kezeltük szobahőmérsékleten. A ProteinázK kezelés időtartamát minden új törzsoldatnál beállítottuk, ami 5-30 percig terjedt. A ProteinázK kezelést néhány perces 2mg/ml koncentrációjú PBT-ben oldott glicinnel történő mosással állítottuk le. Ezt egy újabb 5 perces PBT-s mosás követte. Az ováriumokat 4% PBT-ben oldott paraformaldehidben 20 percig útófixáltuk, majd 2x5 percig PBT-ben mostuk. A mintát legalább fél óráig 9:1 arányú metanol:DMSO oldatban –20°C-on tartottuk, majd 2x5 percig mostuk PBT-ben. Az ováriumokat ezután 1ml 1:1 arányú PBT és hibridizációs puffer (50% formamid, 5xSSC, 0.1% Tween 20, pH=6,5 1M citromsavval beállítva) keverékében öblítettük. A mintát 55°C-on 1-3 óráig 100µg/ml tRNS-el és 50µg/ml heparinnal (Sigma) kiegészített hibridizációs pufferben előhibridizáltuk. Az előhibridizálást követően a hibridizáció a kiegészített, 100µl hibridizációs pufferben oldott 1µl DIG jelölt cDNS próbával egy éjszakán keresztül 55°C-on történt. Másnap az ováriumokat előmelegített hibridizációs oldattal mostuk 30 percig 55°C-on, majd hibridizációs puffer:PBT, 1:1 arányú eleggyel ismét 30 percig mostuk azonos hőmérsékleten. Két 10 perces PBT-s mosást alakalmaztunk szobahőmérsékleten. Ezután az ováriumokat 1:2000 arányban PBT-ben hígított, kb. 200-300µl, kimerített anti-DIG-alkalikus foszfatáz konjugált ellenanyaggal (Boehringer) inkubáltuk szobahőmérsékleten 1 órán keresztül. (Kimerítés: 50µl-nek megfelelő fixált ováriumot 400µl PBT és 20µl anti-DIG-AP ellenanyaggal egy éjszakán keresztül forgatjuk, majd az így nyert kb. 20x hígítású ellananyagot használjuk a későbbiekben). Ezt egy 2x15 perces PBT-s mosás követett. Az előhívást a festőpufferben (100mM TRIS-HCl, 100mM NaCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1%Tween 20, pH=9.5) történő mosás előzte meg. Az ováriumokat mikrotiter lemezre helyeztük, ahol azokat festőoldattal kezeltük (4.5µl NBT-t és 3.5µl X-phosphate 1ml festőpufferben higítva). Az előhívás sötétben, 30 perctől 2 óráig terjedően történt. Mikroszkóp alatt, rendszeresen ellenőriztük a jel intenzitását. A színreakció leállítása 10mM EDTA-t tartalmazó PBT-s mosásokkal történt. Az ováriumokat mikroszóp alatt tárgylemezre helyeztük és wolfram tű segítségével a petecsöveket elválasztottuk egymástól, hogy minden stádium vizsgálható legyen. A preparátumokat Aqua-Polymount (Polysciences) médiumban fedtük le és Zeiss Axioscope II mikroszkóp Nomarski optikáját használva vizsgáltuk őket.

#### Óriáskromoszóma in situ hibridizálás

A *hobo* elem inszerciós helyének pontos meghatározása nyálmirigy óriáskromoszóma *in situ* hibridizálással történt. Oregon R vad típusú lárvákat 18°C-on neveltünk élesztővel dúsított általános táptalajon. Harmadik stádiumos lárvákból nyálmirigyeket preparáltunk 45%-os ecetsavban ügyelve a zsírtest maradéktalan eltávolítására. A nyálmirigyeket ecetsav:etanol 3:1 arányú keverékében inkubáltuk 2 percig. A nyálmirigyeket ezután szilikonizált fedőlemezre cseppentett 45%-os ecetsavba helyeztük, majd óvatosan ráhelyeztünk egy tárgylemezt. A fedőlemez óvatos nyomogatásával, illetve kis méretű gumikalapáccsal történő ütögetéssel, az óriáskromoszómákat szétterítettük. A preparátumot 15 percig 60°C-on szárítottuk majd cseppfolyós nitrogénbe mártottuk és a fedőlemezt lepattintottuk. Az preparátumot 5 percig 70%-os majd újabb 5 percig 96%-os etanolban dehidratáltuk A preparátumokat ezután megszárítottuk és a hibridizációig száraz helyen tároltuk.

A hibdidizáció DIG jelölt H[pHlw2] specifikus LacZ illetve *white* DNS próbákkal történt. A jelölés és annak ellenőrzése a DIG jelölő készletben javasolt recept alapján történt (DIG DNA Labeling and Detection Kit Boehringer Mannheim Biochemica Cat. No. 1093657).

A hibridizáció első lépéseként a krmoszómapreparátumokat 30 percig 65°C-os 2xSSC-ben inkubáltuk (0.3M NaCl, 0.03M Na-citrát). A preparátumokat 65°C-ra

előmelegített 70% majd 96% etanolt tartalmazó festőkádakba helyeztük 10-10 percre, miközben az oldatokat szobahőmérsékletre hűtöttük. Ezt egy 10 perces 96% etanolos szobahőmérsékleten történő inkubálás követte. A dehidrált kromoszómákat frissen készített 70mM NaOH oldatban 2 percig denaturáltuk, amit 3 egyenként 5 perces 2xSSCs mosás követett. Kétszer 5 percig a lemezeket újra dehidratáltuk 70%-os etanolban, majd 5 percig 96% etanolban, majd szobahőmérsékleten megszárítottuk őket.

A hibridizációs elegy összetétele a következő volt: 40% Formamid, 5% SSC, 0.1% SDS, 20mMNaPO<sub>4</sub> (pH=7), 0.5-1µl DIG-jelölt próba. A Dig jelölt DNS próbákat először 10 percig forraltuk, majd sós jégen hirtelen lehűtöttük. Ezután mértük hozzá a hibridizációs elegy többi komponensét. 10µl hibridizációs elegyet használtunk lemezenként amit 20x30mm-es szilikonizált fedőlemezzel fedtünk le és gumioldattal körberagasztottunk, hogy megakadályozzuk a próba elpárolgását. A hibridizációt 37°C-on egy éjszakán keresztül 2xSSC-vel telített nedveskamrában végeztük. Másnap a fedőlemezeket eltávolítva a preparátumokat Puffer1-ben (100mM TRIS, 150mM NaCl pH=7.5) 2x3 percig mostuk, majd 30 percig Puffer2-ben blokkoltuk (Puffer1+0.5% blokkoló reagens (Kit) 65°C-on oldva) szobahőmérsékleten. Ezután 2x5 perces Puffer1ben történő mosás következett. Alkalikus foszfatáz konjugált DIG ellenanyagot 1:1000 arányban hígítottuk Puffer1-ben, majd a preparátumot 50µl hígított ellenanyagban nagy méretű fedőlemezzel lefedtük és 1 órát szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezt 2x15 perces Puffer 1-ben történő mosás követte. Az előhívás előtt a preparátumot 2x15 percig Puffer3-ban inkubáltuk (100mM TRIS, 100mM NaCl, 50mM MgCl<sub>2</sub> pH=9.5). A lemezekre 100µl előhívó oldatot helyeztünk (ml-enként 4.5µl NBT (Kit) és 3.5µl Xfoszfát oldattal (Kit) kiegészített Puffer3) lefedtük őket és sötétben tároltuk 15 perctől 2 óráig, mikroszkóp alatt folyamatosan ellenőrizve a jel megjelenését. A reakciót Puffer4-el (10mM TRIS, 1mM EDTA pH=8) állítottuk le. Ezután a lemezeket GIEMSA oldattal festettük (0.1% NaPO<sub>4</sub>, 5% GIEMSA) és fáziskontraszt mikroszkópon határoztuk meg a hibridizációs jel kromoszómális lokalizációját.

# Ivarvonal transzformálás Drosohilában

A pUASp-prt, valamint a pUASp-prt-GFP plazmidokat a  $\Delta 2$ -3 helper plazmiddal 3:1 arányban, 0,6µg/µl végkoncentrációban injektáló pufferben oldottunk (5mM KCl, 0,1mM K-foszfát puffer pH=6.8). A plazmideleggyel white1118/white1118 Drosophila törzs petéit transzformáltunk. A legyeket 3 nappal az injektálás előtt élesztővel etettük és az injektálás előtt fekete táptalajon (22.5g agar, 25g cukor, 750ml vízben felfőzve és 250ml almaszörppel kiegészítve) tartottuk őket sötétben, 25°C-on. Az embriók sorbarakását és az injektálást 18°C-on végeztük. A petéket 30 percenként gyűjtöttük, Ringer oldatban mostuk és 50% hypoban dekorionizáltuk, majd újra Ringer oldatos mosás következett. A petéket egy petényi távolságra sorba raktuk agarkockán, majd egy kétoldalas ragasztóval fedőlemezre ragasztottuk őket. Hideg levegőt fújó hajszárítóval 7 percig szárítottuk őket, hogy a citoplazma viszkózusabbá váljon és a pete turgora csökkenjen. Ezután Voltalef 10S halokarbon olajjal befedtük őket (Atochem). A plazmidkeverék injektálását Eppendorf 5246 típusú mikroinjektáló készülék és Work Precision Instruments mikromanipulátor segítségével kis nagyítású összetett mikroszkóp alatt végeztük. Az injektálás helye a peték lehető leghátsó citoplazma részlete volt. Az injektált DNS mennyiségét az injektáló nyomás változtatásával kontrolláltuk. A petéket az injektálás

után élesztőpasztával megkent kemény agar táptalajra helyeztük és nedveskamrában tartottuk őket 25°C-on a kikelésig. A kikelt lárvákat folyamatosan gyűjtöttük, majd az általánosan használt táptalajra helyeztük őket. A kikelő legyeket egyesével *white1118/white1118* törzzsel kereszteztük és ezek utódjai között piros szemű transzformánsokat kerestünk, majd belőlük stabil transzformáns törzseket alapítottunk és megállapítottuk a transzgén kromoszómális lokalizációját.

#### Fehérje preparálás, Western blot

A Ringer oldatban preparált ováriumokat megközelítőleg 10-szeres térfogatú mintapufferben 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 membránt TTBS-ben (25mM TRIS-Cl, 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 anti-OSK ellenanyagot 1:1000 arányban, az anti-γ-tubulin (Sigma) ellenanyagot 1:1000 arányban, az anti-VAS ellenanyagot 1:10000 arányban és az anti-Prt ellenanyagot 1:3000 arányban hígítottuk blokkoló pufferben. Az ellenanyagos kezelés után a membránt 2-szer 5 percig desztillált vízben, majd 2-szer 10 percig TTBS-ben mostuk. A másodlagos ellenanyagot blokkoló pufferben hígítottuk és 2 órán át inkubáltuk a membránokat szobahőmérsékleten. Az elsődleges nyúl ellenanyagok esetében peroxidáz konjugált kecske anti-nyúl másodlagos ellenanyagot (Jakson) használtunk 1:5000-szeres hígításban. A patkányban termeltetett elsődleges ellenanyag esetében 1:300-szeres peroxidáz konjugált anti-patkány másodlagos ellenanyagot (Amersham) alkalmaztunk. A másodlagos ellenanyagokkal való inkubálás után a membránokat desztillált vízzel öblítettük, majd 5-ször 5 percig mostuk TTBS-ben. A peroxidáz konjugált másodlagos ellenanyagok enzimatikus aktivitását felerősített kemolumineszcencia (ECL) rendszerrel detektáltuk. (25µl 90mM Coumaric, 50µl 230mM Luminol, 3µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10ml 100mM TRIS pH=8.5 15 perc inkubálás).

#### Klónozás és a menekítő konstrukt elkészítése

A *hobo* transzpozont határoló genomi szekvencia meghatározásához az adapteres PCR technika vezetett eredményre, így annak részletes menetét ismertetem. Genomiális DNS-t izoláltunk a homozigóta *prt<sup>gs</sup>* vonalból. LacZ próba alkalmazásával Southern hibridizációs kísérlettel megállapítottuk az inszerció környezetének restrikciós térképét a *hobo* transzpozon közelében. A genomiális DNS-t ezek után AatII restrikciós enzimmel emésztettük, majd 16°C-on 15µl térfogatban egy éjszakán keresztül ligáltuk az AatII hasítóhelyre specifikus szintetikus adapterrel (AD1, AD2). Az amplifikálást adapter specifikus AD1 és a *hobo* transzpozon lacZ szekvenciájára specifikus LacZ-F1 primerpárral végeztük, Fermentas Taq polimeráz alkalmazásával.

# Az amplifikációs PCR program a következő lépésekből állt:

#### 1. 94 °C-on 2 perc

- 2. 94 °C-on 1 perc
- 3. 60 °C-on 45 perc  $\rangle$  30 ciklus
- 4. 72 °C-on 2 perc
- 5. 72 °C-on 5 perc

A PCR termék 1/50-ned részét egy belső primerpárral (AD1-gyel és LacZ-F2-vel) újra amplifikáltuk, az első PCR reakcióval megegyező körülmények között. A PCR termékeket agaróz gélen választottuk el, majd izoláltuk a gélből, végül pBR322 vektorba szubklónoztuk. Az inszertek szekvenciáit meghatároztuk (ABI Prism 310 Sequencer,

Perkin Elmer). A szekvenciákat BLAST program segítségével helyeztük el a Drosophila genomi szekvencián. A GadFly adatbázisban az inszerció környezetében géneket, exonokat kerestünk. A Berkeley Drosophila Genome Project-től megrendeltük az inszerció környezetébe eső, a szekvenciával homológiát mutató EST-ket (GH09755.3, GH09755.5, GH09756.5, HL01519.5, LD15816.5, LD16133.5, RE09730.5), melyek a CG7761 számú csoportba (clot) tartoznak (Adams és mtsai., 2000; Rubin és mtsai., 2000). A HL01519 számú EST-ből mely Bluescript vektorban XhoI-EcoRI helyre klónozva állt rendelkezésünkre, menekítő konstruktot készítettünk. A HL01519-Bluescript plazmidot először Xho restrikciós endonukleázzal emésztettük, majd Klenow DNS polimerázzal tompa véget készítettünk. A felnyitott plazmidot ezt követően Notl restrikciós endonukleázzal emésztettük, ami egy 2,2 kb hosszú fragmentet eredményezett. A pUASp jelű Drosophila transzformáló vektort (Rorth, 1998) XbaI restrikciós endonukleázzal emésztettük, Klenow DNS polimerázzal tompa véget készítettünk, majd a Notl restrikciós endonukleázzal emésztettük. A 2.2 kb-os EST fragmentet blant vég-NotI helyre klónoztuk a pUASp vektorba.

#### Totál RNS tisztítás

50 felnőtt legyet 1.5ml-es Eppendorf csőben cseppfolyós N<sub>2</sub>-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.

#### Northern hibridizáció

Formaldehid gél készítése és a minták futtatása:

200ml 1.5%-os gélhez 3 g agarózt, 146ml dH<sub>2</sub>O-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 dH<sub>2</sub>O volt. A minta előkészítése során ~ 10µg totál RNS-t oldottunk 5µl DEPC kezelt dH<sub>2</sub>O-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% ficol, Brómfenolkék) adtunk hozzá. A minták felvitele előtt a gélt előfuttatuk 5 percig 5V/cmel, 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 & 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/cm<sup>2</sup> teljesítményű UV kezeléssel a membránnal keresztkötöttük. A membránt ezután hibridizáló csőbe helyeztük és módosított Church és Gilbert féle hibridizáló oldatban (0.5M NaPO<sub>4</sub> 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 protein) használtunk, amelyet párhuzamosan jelöltünk a próbával. Az prt-RNS próba előállításánál a templát linearizálásával kezdődött, a HL01519 plazmid EcoRI emésztésével és tisztításával, majd a komplementer RNS átírása a vektorban található T7 promóterről Fermentas T7 RNS polimeráz alkalmazásával és radioaktív  $\left[\alpha^{32}P\right]$  dCTP (3000Ci/mmol) felhasználásával történt. A be nem épült nukleotidokat Sephadex G50 oszlop segítségével távolítottuk el. Egy Pasteur pipetta aljába steril üveggyapotot tettünk, majd feltöltöttük az előkezelt Sephadex gyönggyel (30g Sephadex G50 gyöngyöt 250ml TE pH=8.0-be). Ezután az oszlopot 1 térfogat TEvel mostuk, majd rámértük a jelölési reakciót. Az oszlopot TE oldattal mostuk és 200µles frakciókat szedtünk. 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 NaPO<sub>4</sub> 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 PhosphoImmager-rel tettük láthatóvá.

#### Reverz transzkripció, RT-PCR

A reverz transzkipciós kísérletekben Trizolos módszerrel izolált totál RNS-t használtuk templátként. 3-5µg totál RNS-t 10pmol reverz primerrel, illetve 5µl 1µg/µl koncentrációjú random hexamerrel (pd(N)<sub>6</sub> Amersham Pharmacia Biotech) mértünk össze és a reakcióelegyet dH<sub>2</sub>O-val 10µl-re egészítettük ki. Az elegyet 70°C-os vízfürdőben inkubáltuk 10 percig, majd 5 percre jégre raktuk. 10µl 5x koncentrációjú transzkripció puffert (Fermentas), 4µl 10mM dNTP-t, 0,5µl RNáz inhibítort (Fermentas), 3µl MMLV Reverse Transzkriptázt (Fermentas) és 22,5µl dH<sub>2</sub>O-t mértünk ki és ehhez adtuk hozzá az RNS-t és a primert tartalmazó keveréket. A mintát 37°C-on 1 óráig inkubáltuk, majd 5 percig 70°C-on inaktiváltuk a reverz transzkriptáz enzimet. A PCR reakció során 50µl reakciótérfogatban dolgoztunk a következő komponensek felhasználásával: 5µl 10x puffer, 5µl 25mM MgCl<sub>2</sub>, 1µl 10mM dNTP, 1µl 20pmol/µl forward primer (PRT1F vagy rp49-Forward), 1µl 20pmol/µl reverse primer (PRT4R, rp49-Reverse, white-3R), 1µl Taq DNS polimeráz (Fermentas), 1.5µl templát cDNS.

"Hot start"-ot alkalmaztunk, amely azt jelenti, hogy csak az első denaturálási lépés után adjuk a reakcióelegyhez a polimeráz enzimet.

Az amplifikációs PCR program a következő lépésekből állt:

1. 95 °C-on 5 perc

2. 95 °C-on 30 másodperc

61°C-on 40 másodperc

Hot start+Taq

72 °C-on 25 perc



4. 72 °C-on 5 perc

A reakcióelegyből 15µl-t 0.8%-os agaróz gélen futtattunk.

#### Prt-GST fúziós fehérje előállítása

A GST fúziós fehérje előállítása során a pGEX-4T-1 (Amersham) vektort alkalmaztuk. *Prt* génspecifikus primereket szintetizáltattunk, melyek végére hasítóhelyeket terveztünk. Az F1-GST primer EcoRI helyet tartalmazott és a *prt* kódoló szekvencia kezdő metioninjától tartalmazta a *prt* specifikus DNS szekvenciát. Az F2-GST primer szintén EcoRI helyet tartalmazott és a *prt* gén közepétől a 250. aminosavtól kezdődően volt *prt* DNS specifikus. Az R-GST primert használtuk mindkét forward primer esetében, amely XhoI hasítóhelyet tartalmazott az 5' végén és a *prt* stopkodon környezetének szekvenciájával volt komplementer. A PCR-ket tisztított HL01519 plazmid DNS-en végeztük. Az F1-GST – R-GST PCR eredménye egy 1200 bázispár hosszú, míg az F2-GST – R-GST PCR reakcióból egy 600 bázispár hosszú terméket kaptunk, az előzetes számításoknak megfelelően. A PCR termékeket valamint a pGEX-4T-1 vektort EcoRI és XhoI enzimekkel 20-20µl-ben emésztettük. Az emésztményét 1%-os agaróz gélen (Low Geling Temperature Agarose, Sigma) futattuk, és a fragmenteket a fent említett fenolozásos módszerrel izoláltunk vissza. A tisztított vektort és inszerteket 1:6 arányban Fermentas T4 DNS ligáz segítségével, 15µl-ben, 16°C-on egy éjszakán keresztül ligáltuk. Következő nap a T4 DNS ligázt 65°C-on 10 percig hőinaktiváltuk, majd a ligátumból 5µl-t DH5α kompetens sejtbe transzformáltuk. A baktériumokat ampicillines lemezre szélesztettük és 37°C-on egy éjszakán át növesztettük. Egyedi kolóniákból 3ml-es folyadék kultúrákat növesztettünk egy éjszakán át és DNS-t tisztítottunk belőlük a Promega MiniPrep tisztító rendszer segítségével az ott megadott recept alapján. A pozitív klónokat EcoRI-XhoI kettős emésztéssel választottuk ki. A pozitív klónok inszertjeit részleges szekvenálással ellenőriztük. Az ellenőrzött klónokat BL21 gazdasejtbe transzformáltuk. Egy egész éjszakán LB-ben növesztett kultúrát 1:10 arányban hígítottunk és 37°C-on OD<sub>600</sub>=0.7-ig növesztettünk, majd a fúziós fehérje indukálása érdekében 250µM végkoncentrációban izopropil-tiogalactopiranozid-ot (IPTG) adtunk a tenyészethez és 30°C-on 4-6 óráig tovább növesztettük. Az indukció mértékét a baktériumokból tisztított fehérjék SDS poliakrilamid gél elektroforézisével ellenőriztük. Az indukált és az indukálatlan baktériumtenyészetek esetében egyaránt szonikálással és forralással tártuk fel a sejteket mintapufferben, majd 1 perces centrifugálás után a fehérjék kis részét megfuttattuk és a fehérje futási képének Coomassie festése utáni
összehasonlításával megállapítottuk az indukció sikerességét. Ezután a fehérjepreparálást a következő módon megismételtük: az indukált kultúrát centrifugáltuk, majd a sejteket felszuszpendáltuk lízispufferben, ami PBS-ben tartalmazott 1% Triton X-100-t, 0.2% SDS-t, 0.5% NP40-t, 0.1% Tween-20-t, 1mM fenil-metil-szulfonil fluoridot (PMSF) és 10µg/ml chymostatint, 10µg/ml leupeptint, 10µg/ml antipaint, 10µg/ml pepstatint és 1/10 térfogat 10mg/ml frissen oldott lizozimet és jégen 30 percig inkubáltuk. Ezt követően a mintát szonikáltuk és 12000g-vel 10 percig centrifugáltuk. Ezzel eltávolítottuk a sejtes elemeket míg a baktérium fehérjék a felülúszóban maradtak. A felólúszóhoz 50%-os koncentrációban Glutathione Sepharose 4B gyöngyöket (Amersham Pharmacia Biotech) adtunk. A felhasznált gyöngy/baktérium kultúra arányt az Amersham álltal ajánlottak alapján számítottuk. A fúziós fehérje és a gyöngy közötti kötés kialakulása érdekében 4 órát forgattuk 4°C-on. A gyöngyöket 10 másodpercig maximális fordulaton leülepítettük, majd jéghideg lízispufferrel 3-szor mostuk. Ezt 2 PBS-es mosás követte. Végül a gyöngyöket mintapufferben vettük fel, és a fehérjéket 5 perces forralással a gyöngyökről eluáltuk. Az üres gyöngyöket centrifugálással kiülepítettük, majd a felülúszóból kis mennyiséget SDS poliakrilamid gélen megfuttattunk és ellenőriztük a fúziós fehérje mennyiségét és minőségét.

Az immunizálásokhoz 500µg fehérje volt szükséges mindkét fehérje esetében és ezt nagy térfogatú indukcióval és preparatív tisztítással oldottuk meg, majd a mintákat a felvivő SDS pufferben tároltuk a felhasználásig -80°C-on.

#### Prt ellenanyag termeltetés nyúlban

Az immunizálás előtt a fűziós fehérje preparátumokat SDS poliakrilamid gélen futattuk. A fehérjéket 20 perces vízben oldot 0.05% Coomassie Brilliant Blue festéssel tettük láthatóvá. A gélt desztillált vízzel mostuk és kivágtuk a fűziós fehérjét tartalmazó géldarabot. Az izolált géldarabot szikével apróra vágtunk, majd egy az alján 25G-s inzulinos fecskendővel kilyukasztott PCR csőből egy Eppendorf csőbe centrifugálva tovább fragmentáltuk a géldarabokat. A gélfragmentumokat 1 ml-es végtérfogatra PBSsel felszuszpendáltuk. Ezután a szuszpenziót szemcseméretét 18G-s injekciós tűn való többszöri átszívással csökkentettük. Ezt az eljárást 20G-s és 22G-s tűvel megismételtük. A poliakrilamiddal együtt történő immunizálásnak a hátránya, hogy a poliakrilamid neurotoxikus és néha tumorok képződése is beindul az injekció helyén, másfelől előnye, hogy a poliakrilamid erős antigén, amely gyors immunválasz kiváltását eredményezi.

Az immunizálandó nyulak fülvénájából egy héttel az immunizálás előtt vért vettünk, és preimmun szérumot készítettünk a következő módszerrel: a vért egy éjszakán keresztül 4°C-on tároltuk, majd 1000rpm-el centrifugáltuk és a savót azid nélkül -80°C-on, vagy 0.02% Na azid hozzáadásával 4°C-on tároltuk. Mindkét fúziós fehérjével két 2 kg-os, albino, nőstény nyulat immunizáltunk. Az immunizálásnál 200µg fehérjét használtunk az első kettő, majd 100µg-ot a következő oltásnál. Az első immunizálásnál 1ml PBS-ben felszuszpendált akrilamid töredéket 1ml komplett Freund adjuvánssal (Difco Laboratories) kevertük össze, míg kellő sűrűségű kolloid oldat keletkezett. A nyulakat a hátukon *subcutan* oltottuk, 5-6 helyre elosztva az oltóanyagot. 7 nappal később 1ml PBS-ben felszuszpendált akrilamid töredéket 1ml 10:1 arányú,

komplett:inkomplett Freund adjuvánssal szuszpendáltuk és ezzel oltottuk a nyulakat. Három hét múlva a harmadik immunizálásnál 1ml PBS-ben felszuszpendált akrilamid töredéket 1ml inkomplett adjuvánssal szuszpendáltunk. Az oltásokat követő 7. napokon próbavért vettünk, savót preparáltunk és azok ellenanyagtiterét Western blottal ellenőriztük.

### Prt-Gfp fúziós fehérje előállítása

A HL01519 jelű, teljes hosszúságú EST-t használtuk a Prt-GFP fúziós fehérjét tartalmazó vektor elkészítésénél. A pβ-Glo-2GFP vekrort használtunk, melyet Juergen Knoblich bocsájtott rendelkezésünkre (nem publikált). A *prt* cDNS-t a leolvasási keret megőrzésével a pβ-Glo-2GFP vektor GFP szekvenciájának N-terminális végére klónoztuk. A cDNS irányított klónozását *prt* specifikus, hasítóhelyeket is tartalmazó primerekkel (ForwN-GFP, RewN-GFP) amplifikált *prt* cDNS-sel valósítottuk meg. A PCR amplifikációt Pwo DNS polimerázzal végeztük, melynek a tévesztése minimális az amplifikáció során. BamHI-SalI helyre klónoztuk a BgIII-SalI enzimmel emésztett PCR terméket, majd restrikciós emésztésekkel ellenőriztük a klónokat. A Prt-GFP fúziós terméket ezután a pUASp jelű *Drosophila* transzformáló vektorba, NotI-XbaI helyre klónoztuk. A pozitív klónokat restrikciós emésztéssel és szekvenáltatással is ellenőriztük. Qiagen MidiPrep tisztító rendszerrel állítottunk elő az ellenőrzött konstrukcióból nagy tisztaságú, injektálásra alkalmas DNS-t.

## A kísérletek során használt, általunk tervezett szintetikus primerek

A primerek tervezésénéla az alábbi internet címen található programot használtuk.

http://www.idtdna.com/program/main/home.asp

AD1 5'-ACCAGCTAAACGCAACCCTAAGACGT-3' AD2 5'-CTTAGGGTTGCGTTTAGCTGGT-3' LacZ-F1 5'-GGATAGGTTACGTTGGTGTAG-3' LacZ-F2 5'-TCGCACTCCAGCCAGCTTTCCGG-3' PRT1F 5'-TAATACCTGCTGCTGTTACC CGCA-3' PRT4R 5'-GGCCCCCTAAGGTTGCTCACTATT-3' rp49-Forward 5'-GCATACAGGCCCAAGATCCGT-3' rp49-Reverse 5'-CAATCTCCTTGCGCTTC TTG-3' white-3R 5'-GTGTGCTGACATTTGCTGA-3' F1-GST 5'-GCGGAATTCATGTCGAGTGCAGAA-3' F2-GST 5'-TCCGAATTCCTGCCCGATTTCCAG-3' R-GST 3'-AGAGACCTTATCACTGAGCTCCCC-5' ForwN-GFP 5'-CGCAGATCTGATGTCGAGTGCAGAA-3' RewN-GFP 3'-TCCGCGAGAGACCTTGGCAGCAGCTGCGCG-5'

# Internetes adatbázisok, szolgáltatások és felhasznált szoftverek

http://www.fruitfly.org http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/BLAST/ http://www.fruitfly.org/blast/index.html http://fly.ebi.ac.uk:7081/ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/ http://www.expasy.ch/ http://www.idtdna.com/program/main/home.asp

# Eredmények

### A prtgs mutáció azonosítása és fenotípusos jellemzése

Egy 750 homozigóta életképes hobo transzpozon inszerciót tartalmazó mutánsgyűjteményt teszteltünk ivarsejthiányos fenotípusra, amit Kiss István laboratóriumában állítottak elő (nem publikált). A gyűjtemény előállításánál a  $H[pH{Lw2}]$  módosított mesterséges transzpozont és a P[rv<sup>+</sup>, HBL1] transzpozáz forrást használták (Smith és mtsai., 1993). A gyűjtemény egyes vonalaiból homozigóta nőstényeket gyűjtöttünk és kereszteztük Oregon-R vad típusú hímekkel, majd ezek felnőtt utódjait teszteltük ivarsejthiányos fenotípusra. A H1173 számú inszerciós vonal (a poirot génben történt inszerció miatt a mutáns vonalat ezután prtgs-nek hívom) felnőtt utódjai nem teljes penetranciájú, ivarsejthiányos fenotípust mutattak. Ezt a fenotípust unokátlan fenotípusnak is hívják, mivel a mutáns nőstények utódjainak már nem lesznek utódjai. A felnőtt utódok gonádjainak 70%-a ivarsejthiányos, 30% pedig vad fenotípusú volt. A felboncolt egyedeknek 10%-a mozaikos fenotípust mutatott, azaz az egyik petefészek vagy here ivarsejthiányos, míg a másik vad típusú volt (4. ábra). A felnőttekben megfigyelt mozaikos mutáns fenotípus kialakulását a prt<sup>gs</sup> mutáció korai hatásával magyarázzuk. A feltételezett korai fejlődési rendellenesség csökkent számú ivarsejtet eredményezhet, ami az embrionális ivarsejtek jobb és bal oldali gonádokra való szétosztódása során egy egyedben mutáns és vad típusú ivarszervek kialakulásához vezet (5. ábra). A prt<sup>gs</sup> mutáció ivarsejtképzésre gyakorolt korai hatását mutáns nőstényektől származó embriók vizsgálatával bizonyítottuk.



4. ábra. A prt<sup>gs</sup>/prt<sup>gs</sup> mutáns nőstények utódjainak ivarsejthiányos fenotípusa petefészekben. (A) Vad típusú nőstény petefészke a különböző fejlődési stádiumban lévő petekezdeményekkel. (B, C) A prt<sup>gs</sup>/prt<sup>gs</sup> nőstények felnőtt utódjainak ivarsejthiányos fenotípusa a nőstények petefészkében.(B) A petekezdemények hiányoznak, csak a testisejt eredetű petecsövek és traheák láthatók. (C) Mozaikos petefészek, amely a csökkent mennyiségű embrionális ivarsejt lefűződés eredményeként jön létre.



5. ábra. A prt<sup>gs</sup>/prt<sup>gs</sup> mutáns nőstények által lerakott petékben az embrionális ivarsejtek hiányoznak. (A) Egy poláris plazma komponens, a Vasa fehérje ellenanyagos festésével tettük láthatóvá a poszterior póluson lefűződött embrionális ivarsejteket a vad típusú blasztoderma stádiumú embrióban, míg (B) ezek hiányoznak a prt<sup>gs</sup>/prt<sup>gs</sup> mutáns nőstények által lerakott petékben.

A *prt<sup>gs</sup>* utódok mintegy 70%-ban az embrionális ivarsejtek hiányát, vagy nagyon erős számbeli csökkenését mutattuk ki. Ezen felül a *prt<sup>gs</sup>* mutáció korai hatására utal az a tény is, hogy a 18°C-on tartott homozigóta nőstények utódjai az unokátlan fenotípus penetranciájának emelkedése mellett potrohhiányos fenotípust is mutattak (6. ábra, 1. táblázat). 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.

Ha a *prt<sup>gs</sup>* homozigóta nőstényeket *prt<sup>gs</sup>* homozigóta hímekkel kereszteztük és a keresztezést 18°C-on végeztük akkor az utódokban a poszterior fenotípuson kívül a feji struktúrák különböző mértékű hibáját és az embrionális kutikulán ún. kutikulalyukakat is tapasztaltunk, ami megemelkedett mértékű embrió letalitással párosult. Ebben az esetben a *prt<sup>gs</sup>* anyai hatású fenotípusa a zigótikus géntermék hiánya miatt megerősödött, ami azt jelzi, hogy a *prt* génnek zigótikus funkciója is van. A fenotípus analízis során azt is megfigyeltük, hogy a *prt<sup>gs</sup>* homozigóta nőstények peterakási képessége elmarad a vad típustól (1. táblázat). A csökkent peterakási képesség arra utal, hogy a *prt* génnek a peteérés folyamatában, a poláris plazma kialakulása előtt is van szerepe. A *prt<sup>gs</sup>* mutáció tehát a poszterior fenotípuson kívül egyéb pleiotróp fenotípusokat is mutat.

Munkánk során a felsorolt *prt* fenotípusok közül az anyai hatású, ivarsejthiányos fenotípust jellemeztük genetikai és molekuláris módszerek segítségével.



6. ábra. A prt<sup>gs</sup>/prt<sup>gs</sup> mutáns vonal poszterior fenotípusa. (A) Vad típusú embrió, 8 potrohszelvénnyel rendelkezik 18°C-on is (nyilak). (B) prt<sup>gs</sup>/prt<sup>gs</sup> nőstény poszterior fenotípusú petéjében a potrohszelvények jelentős számbeli redukciója tapasztalható 18°C-on.

ţ	poszterior fe pete 18 No	notípusú 3°C %	ivarsejth fenotípu No	niányos us 18°C %∖	ivarsejth fenotípu No	iiányos s25°C %	2 pete/nő No	:5ºC ístény/nap pete No		8°C ístény∕nap
vad	331	0	160	0	100	0	100	14	331	8,275
prt <sup>gs</sup> / prt <sup>g</sup>	<b><sup>98</sup> 3</b> 57	5,04	162	84,6	116	70	100	3,2	357	2,47

 táblázat. Potrohhiányos és ivarsejthiányos fenotípus és a peterakási képesség különböző hőmérsékleteken. No: A vizsgált embriók és felnőtt egyedek száma. %: A mutáns fenotípus százalékos megoszlása. A poszterior fenotípust embrionális kutikula preparátumon vizsgáltuk. A felnőtt ivarsejthiányos fenotípust boncolással állapítottuk meg. A peterakási képességet 3 napos felnőtt nőstényekben vizsgáltuk.

# A prt<sup>gs</sup> mutáció térképezése

A *prt<sup>gs</sup>* mutáns vonal genetikai analízisét a mutáció térképezésével kezdtük. A H[pH{Lw2}] *hobo* transzpozon két úgynevezett riporter gént (*white* és *lacZ*) tartalmaz (7. ábra), melyek segítségével a beépülés helyét a genomban *in situ* kromoszóma hibridizálással megállapíthatjuk. A *white*, és *lacZ* specifikus próbákkal vad típusú nőstények homozigóta hímekkel történt keresztezéséből származó lárvákból preparált

nyálmirigy óriáskromoszómákat hibridizáltunk. Az endogén white lókuszban tapasztalt hibridizációs jelet belső pozitív kontrollként használtuk. A második kromoszómán hibridizációs jelet tapasztaltunk, ezzel a H[pH{Lw2}] hobo inszerciót a második kromoszóma jobb karjára az 51 D9-E1-2 kromoszómális régióba térképeztük. A következő lépésben, az 51-es kromoszómális régióban deléciós térképezéssel kerestük a prt<sup>gs</sup> allél pontosabb térképhelyzetét. A kísérletben a Df(2R)XTE58, Df(2R)JP1, Df(2R)l4 és DfXTED1 átfedő deléciókat használtuk. A Df(2R)XTE58, Df(2R)JP1 és a Df(2R)l4 deléciók nem, míg a *DfXTED1* komplementálta a *prt<sup>gs</sup>* utódjainak unokátlan fenotípusát. A deléciók ismert töréspontjai alapján a *prt<sup>gs</sup>* mutációt 2R 51 D9-11 régióba térképeztük. A deléciós térképezés fényt derített a prt<sup>gs</sup> mutáció természetére is. A prt<sup>gs</sup> mutáció deficienciákkal szemben mutatott unokátlan fenotípusa (68%) közel azonos volt a prt<sup>gs</sup>/prt<sup>gs</sup> homozigóta fenotípusának penetranciájával (70%). 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 amorf vagy null mutáció. A későbbiekben a null mutáció tényét molekulárisan is bizonyítottuk.

Annak bizonyítására, hogy valóban a *hobo* elem inszerciója felelős a  $prt^{gs}$  mutációért, *hobo* remobilizációs kísérletet végeztünk. A H[pH{Lw2}] elem remobilizációját a P[ry<sup>+</sup> HBL1] transzpozáz forrás segítségével végeztük úgy, hogy a transzpozon mozgását *white*- háttéren a *white*+ markergén expressziójának változásával követtük. 455 keresztezést végeztünk, melyekben a H[pH{Lw2}]-inszerciót transzpozáz forrással kereszteztük. A *white* markergén elesztése alapján 7 vonalat különítettünk el, melyek közül 5 a  $prt^{gs}$  mutáció fenotípusos revertánsának bizonyult. A revertáns vonalakban a *hobo* transzpozon precíz kivágódása  $prt^{gs}$  fenotípus reverziójához vezetett,

bizonyítva, hogy az ivarsejthiányos fenotípust a *hobo* transzpozon inszerciója okozta. A 7 megváltozott szemszínű vonalból 2 letális fenotípust mutatott. A 2 letális vonal sem egymást, sem az 51-es régiót átfedő deléciók fenotípusát nem komplementálta. Ezekről a vonalakról azonban PCR reakciókkal illetve az eredeti *prt<sup>gs</sup>* alléllal való keresztezéssel bizonyítottuk, hogy a *hobo* elem nem mozdult el a *prt* lokuszból, illetve az ivarsejthiányos fenotípus nem revertálódott. Úgy gondoljuk, hogy mindkét letális vonal esetében a *prt* lokusztól független, új letális mutációk keletkeztek az eredeti *hobo* elem környezetében. Ezeket a vonalakat a továbbiakban nem vizsgáltuk.

### A *prt<sup>gs</sup>* gén klónozása és jellemzése

A hobo transzpozon környezetének molekuláris jellemzésénél, a határoló szekvenciák megállapításához a szokásos plazmidmenekítés és az inverz PCR kísérletek nem vezettek eredményre. Végül az adapteres PCR technika segítségével tudtuk megállapítani a beépült hobo elem széli szekvenciáit. Adapteres PCR technika segítségével a  $H[pH{Lw2}]$ inszerció 1.5kb széli szekvenciáját amplifikáltuk, maid azt megszekvenáltattuk. A kapott szekvenciával BLAST keresést végeztünk a Drosophila genom ismert szekvenciáival. Az inszerció pontos helyét az ismert szekvenciájú DS04940 jelű, 72kb-os, Drosophila genomi inszertet tartalmazó P1 fág 34569 bázisánál állapítottuk meg (7. ábra). A DS04940 jelű P1 fágot a Drosophila Genom Program az 51D-E régióra térképezte, ugyanoda, ahova mi korábban genetikailag és in situ hibridizációval is térképeztük a hobo elemet.

Az inszerciós pont környezetében különböző génkereső programok (ORF Finder, Genescan) segítségével már azonosított vagy prediktált géneket kerestünk. Ennek eredményeképpen azonosítottuk az inszerciós pont környezetében a CG7761 prediktált gént. Megvásároltuk a CG7761 génre specifikus részlegesen szekvenált EST-ket és a restrikciós térképezés alapján leghosszabbnak bizonyultat, a HL01519 számút végigszekvenáltattuk. A teljes hosszúságú EST szekvencia ismeretében megállapítottuk a gén szerkezetét, az exon-intron határokat. A gént kalandos megtalálása és későbbi rejtélyes viselkedése miatt a híres belga detektívről Poirotnak neveztük el.



7. ábra. A poirot gén szerkezete és a beépült hobo tanszpozon helye a prt<sup>gs</sup> vonalban. A poirot gén 4 exont tartalmaz, melyeket elválasztó 3 intron közül az elsőbe épült be a hobo tarnszpozon. A transzláció (\*) az első exonról indul el. A hobo transzpozon az ismert DS04940 P1fág szekvenciáján a 34569. bázisnál épült be a prt<sup>gs</sup> vonalban. Az ábrán látható az RT-PCR során használt primerek helyzete.

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 (7. ábra). Számítógépes program segítségével lefordítottuk a teljes *prt* cDNS-t fehérjévé mind a három leolvasási keretben. Ezek közül a 477 aminosav hosszú teljes egyezést mutatott a *Drosophila* Genomprogram annotációs adatbázisában talált aminosav szekvenciával. Ezzel a fehérje szekvenciával egy általános fehérje BLAST keresést (http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/BLAST/) végeztünk.

Az adatbázis számos élőlényből tartalmaz már azonosított és jellemzett vagy prediktált homológ fehérje szekvenciákat. Az összehasonlítás eredményeként megállapítottuk (8. ábra), hogy a Prt fehérje 257 aminosav hosszú N-terminális része 48% azonosságot és 66% hasonlóságot mutat a ember Sab fehérjével, 45% azonosságot és 63% hasonlóságot mutat az egér Sab fehérjével, 48% azonosság és 66% hasonlóság mutat a Q91Y80 jelű patkány fehérjével, 38% azonosság és 56% hasonlóság mutat a K03E6.7 jelű Caenorhabditis elegans fehérjével, valmint 38% azonosság és 54% hasonlóság mutat a CG14408 prediktált Drosophila fehérjével. A Prt fehérje 120 aminosav hosszú C terminális szakasza egyedi szekvenciának bizonyult. Ennek ellenére úgy gondoljuk, hogy az N terminális szakasszal tapasztalt szekvencia hasonlóságok magas foka egy fehérjecsaládot jelöl ki, amelynek új tagja a Prt fehérje. Az emberben azonosított Sab fehérjét, egy SH3 domén kötő fehérjéként írták le, amely a Brutontirozin-kináz fehérjét köti annak SH3 doménjén keresztül és e kapcsolaton keresztül negatívan regulálja annak működését (Matsushita és mtsai., 1998). Megállapították, hogy a Sab fehérjén belül egy 32 aminosav hosszú szakasz felelős az SH3 domén kötésért. Ez a szakasz a Poirot fehérjében is létezik, amely 48% azonosságot és 73% hasonlóságot mutat a ember Sab fehérje megfelelő régiójához. Az SH3 domén kötő szakasz hasonlósága alapján elképzelhető, hogy a két fehérje hasonló funkcióval bír.

			•	20	•	40	•	60	•	80	•	
human Sab				-MEQGLE E	EE E 5	JDPRIGGELER	LUCSTODINT	RETELEDARO	KFR SVLVE AT V	KL DE LUKKIG	KAVE :	66
Mouse Sab				-MEGGLEE	EE EE 5	JOPRIOGELEN	LNOST DD INT	RETELEGARO	KPR SVLVE AT V	KL DE LAKKIG	KAVE :	67
Pairat				-MSSAEDG	EI	L DPOIO IELE)	LN SAT DE IND	LEIELBEANS	TER IL LUE STR	RL KV SSK KLG	DICIE	64
C. electros X03E6	7 .	MORTATSER	UTE TE VED	PTTROPEE	CHPPLE TR	LUMINEELEN	LUISTOVIN	ARAIG TOURS	DERETONOMSE	KL KELSKOYS	SO TA	90
								arm. American		and successive -		
		10	0	•	120	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	140		160	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	120	
de2 nemud	:	D SKP YWEAR	ICA CRAVE	I O DI AXQAE	PORA IEVLRI	AAKEII SLAE(	RLLED - D KRO	KIMEOWA209 (	DEABOURDEAR	ik ir sel vhx	ETAA :	155
mouse Sab		D SKP YWEAR	IGA OR AVA	EAGKA IG D	FORATEVLR	AAKETI SLAE(	RLLED - D KRO	PDS AWQENLY	DEADOVEDIAN	IK IR SEL VHK	ETAA :	156
Poicot	:	KARP YYEAL	I GA BRAND	EC OKAAVK	<b>LARIEKARO</b>	AAKEIVAL AE(	RP MSH SH EW(	KIMEOWARD'	I BA DOW XO TAR	ORABCHABHO	RL IX :	154
C. elegana XO3B6.	.7 :	XARP FYELK	IKERSLRE	ESQKARER	PERAISILG	IAKOOVSL IOI	SL SRQ IS	ATSECTEATN	HHIGRVREVEE	ERTAAESLHA	SKAH :	177
			•	200	•	220		240	•	260	•	
de2 nemed		R YNA AMORNI	ROLEXXLX	RA INK SK P	YPEL KAK YYS	NOLEOT XX IAI	DLOAKLILAD	CEY KMALKNL	emi sdeiherr	RSSA202P	RG-C :	241
mouse Sab	:	R YNA AMCRAI	ROLEXXLX	RAINKSKP	YP EL KAK YY	AOT EOT XX LAL	DEGAKLALAN	CEYKAALK SL	ERISDEIHERR	RSMANCP	RG-C :	242
Paicat	1	L FNA AE QKL	OOLEDRER	RS INK SRP	ALEE KOAGO	DOLOIOKHRIC	EL QOO VA GAN	STY STALRNL	ERI SE DIHROR	GD F - PIP PGP	RE-P :	242
C. elegans X03E6.	.7 :	AMINLAEKI:	RAMEX DUR	YA IKK SRL	YFEKRLEFI	K IL BAQ KA TII	CLEAE VROKI	CHOY II SLRNL	ERI SE RIHEE R	SIGSLESA	VSSD :	265
										1		
10000000000000000		25			300		520		590		360	
veway 255		GVGREG	SSISVEDL			SV6REDUIL	-VASEAFEU-	-uses	MEASED	05E105V5	SESS :	296
Mouse Sab	- 53	GVGREG	SINSVERL	P		SKPBPDAIS	SVASEAFEU-		NFO SE O	USEIUSVS	SESS :	292
Poleot		GUGRELNSP	ISSAL PSL	POPOLELE.	KC DY PSIACS	SOMSIGAKI	POARAEIEDE	SEDACO YDE IC	ACELACOVDER	OL EAL ROX VX	ILAU :	330
C. elegana KO3B6.	. 7 :	GEOGXS	OFKSSESL	P	@	PP PYA PI APE	PYEOXYLID	C-0005	-IAPAWIK JEO	ee egekrusk	SICS :	330
			•	380	•	400	•	420	•	440	•	
human Sab	-	GP	ISP SE	MP DOP PAW	UR PC	SSL DLP SPVSI	SE PG	GMPPVLGPR-S	ECSGASSP	E CEVERGO	RAEG :	359
mouse Sab		G8	IXP SE	MP DOP PAV.	AR PO	SL DLP SPVSI	SE PG	GMPP IL GPR - S	EC SGASSP	E CEVERGO	RAEG :	361
Pairat		RP	IEGGS GOO	ON DOWENE:	LK A.	VOXLOHL MAN	KE TAKROOT	ALKSIEGR-P	DSLGAEAL	KRHC DVVEV-	KVIS :	402
C. elegans X03E6.	.7 :	GVILLAGOL	IGH GH S	TEXHWITP	PRHCEEADIS	YH TREVELSI	GSDUSEVSSI	ASPHIGODOT	VSKAL MSH SEL	IKEC AAIKIE	AISV :	412
								a		. and		
		46	0	•	420	•	500	•	520	•		
human Sab		ABHKISDK-	-ANNUMBEL	5555GS	DESEXSQ SS:	EKE LA COE 92 1	POKOT STOCS	GRD	GI IAD IKM	VQIG : 4	25	
mouse Sab		AENKNS DK-	-ANNURVL	GS INGG	SGRERSQ SSI	I SLESQALEIF	MAGLSLOCS	(GR0	GI IAD IXM	VQIG : 4	27	
Poicot		CATTASLP-	-VIPH HOL	HLAPP	TP IX KLO GOI	LAPLP-SVNVS	MRELPLLAR	SWELL DRS SA	AFGGURKILRR	RSLE : 4	77	
C. elegana XO3B6.	.7 :	I AVA XX PON	ROLPKLOV	ADXPRLPR	IF BC KEQ IX	SILI-SLOID	LANOSIVEED	I SMAVGERGYP	PPFLSLEC FRR	VSGICR : 4	99	

**8. ábra**. Fehérje szekvencia homológia viszonyok a Prt, az ember, illetve az egér Sab fehérjék és a K03E6.7 prediktált *C. elegans* fehérje között. A homológ szakaszokat szürkével jelöltük. A fekete mező jelzi az ember Sab fehérjében az SH3 domén kötésért felelős részt.

### A prt<sup>sg</sup> mutáció molekuláris jellemése

A *hobo* transzpozon pontos helyének megállapítása és a környezetében lévő prediktált gének összegyűjtése után nyilvánvalóvá vált, hogy a *hobo* elem a *poirot* gén első intronjában található. Genetikai adataink azt sugallták, hogy a transzpozon beépülése null mutációt eredményezett. Hogy ezt molekuláris eszközökkel is igazoljuk, a mutáns vonal molekuláris vizsgálatát Northern hibridizációval kezdtük. Totál és mRNS-t izoláltunk vad

típusú és a prt<sup>gs</sup> homozigóta nőstények ováriumából, és mind poirot cDNS, mind komplementer poirot RNS próbával végeztünk Northern hibridizációt. A poirot próba esetében nem kaptunk egyértelmű hibridizációs jelet a vad típusban sem, míg az rp49 (riboszomális protein 49) belső kontroll, melyhez hasonlítottuk a kísérletben használt RNS mennyiségét, mindvégig erős jelet adott. Ezekből a kísérletekből nyilvánvalóvá vált, hogy a *prt* RNS mennyisége a vad típusban is nagyon kevés, így a *prt<sup>gs</sup>* transzkripció jellemzésére a sokkal érzékenyebb RT-PCR módszert választottuk. Totál RNS-ről random hexanukleotid felhasználásával reverz transzkripciót végeztünk, mely lehetővé tette, hogy a szintetizált cDNS-t több, különböző PCR reakcióban is felhasználjuk templátként, illetőleg egy reakción belül két primerpárt egy időben alkalmazzunk. A prt gén első, második és a negyedik exonjára (7.ábra) valamint belső kontrollként használható rp49 génspecifikus primereket terveztünk. A prt specifikus és az rp49 specifikus primerpárokat azonos PCR reakcióban használtuk. A prt első és negyedik exonjára specifikus primerpárral egy 1749bp hosszú szakaszt, míg az rp49 specifikus primerpárral 316bp hosszú szakaszt amplifikáltunk a vad típusú nőstények ováriumából készített cDNS templát felhasználásával. A prt<sup>gs</sup> homozigóta nőstények ováriumából készített cDNS templátról csak az rp49 specifikus primerpárral kaptunk amplifikátumot. Ebből arra következtethetünk, hogy a prt génről a mutáns vonalban nem keletkezik RNS, amely most már molekulárisan is megerősíti a *prt<sup>gs</sup>* null mutáns voltát (9.ábra A). Vad típusú, 0-21 órás embriókból készített cDNS-ről szintén kaptunk amplifikátumot, melynek mennyisége nagyobb volt, mint az azonos mennyiségű ováriumból származó RNS templátról kapott amplifikátumé, ami nagymértékű zigótikus transzkripcióra utal (9.ábra A). prt<sup>gs</sup> homozigóta nőstények vad típusú hímekkel történt keresztezéséből

származó embrióknál szintén kaptunk amplifikátumot, amely szerintünk a hímből származó zigótikus géntermékről keletkezett. Ennek tisztázására a *prt<sup>gs</sup>* homozigóta nőstényeket *prt<sup>gs</sup>* homozigóta hímekkel kereszteztük és az ebből a keresztezésből származó petékből készített cDNS templátról már nem kaptunk aplifikátumot.



9. ábra. RT-PCR eredmények vad típusú és mutáns ováriumokban és embriókban. Belső kontrollként a kísérletek során az rp49 specifikus primerpárokat használtunk azonos reakción belül, amellyel egy 316bp-os amplifikátumot kaptunk. (A) (a) Molekulasúly marker (b) az 1. és 4. exonra specifikus primerpárral 1747bp hosszú szakaszt amplifikáltunk a vad típusú nőstények ováriumából készített cDNS-ről, míg a (c) *prt<sup>gs</sup>/prt<sup>gs</sup>* nőstények ováriumából nem kaptunk amplifikátumot. (d) 24 órás embriókban nagy mennyiségű amplifikátumot kaptunk, amely nagy mértékű zigótikus transzkripcióra utal. (e) Ha homozigóta nőstényeket vad típusú hímekkel kereszteztük, akkor egy zigótikus géntermékre utaló amplifikátumot kaptunk. (f) Ha mind a nőstény, mind a hím homozigóta volt a prtgs/prtgs mutációra nézve, akkor az utódokban nem kaptunk amplifikátumot, ezek az embriók anyai és zigótikus nullok voltak a prtgs mutációra nézve. (B) Az helytelen intronkivágódás molekuláris bizonyítása RT-PCR kísérlettel. (a) Molekulasúly marker (b) A prt 1. exonjára specifikus és a mini-white 3. exonjára specifikus primerpárokkal történt RT-PCR reakciók során (b) az Oregon R ováriumból származó templátot használtunk kontrollként, ahol nem kaptunk amplifikátumot, míg (c) a prt<sup>gs</sup> nőstények ováriumából származó templátról egy 882bpos terméket kaptunk.

Ezek a peték anyai és zigótikus nulloknak tekinthetők (9.ábra A). A fenti RT-PCR kísérleteket a 2. és 4. exonra specifikus primerpárral is elvégeztük, amelyek hasonló eredményt adtak.

Az irodalomból már ismert, hogy az intronba inszertálódott transzpozonok egy helytelen intronkivágódás eredményeképpen összeépülhetnek annak a génnek az exonjaival, amelyek az inszerciós pont előtt találhatók (Baba és mtsai., 1999). Speciális PCR reakciót terveztünk, melyben a *poirot* gén és a *hobo* transzpozon markergénjeinek exonjai között létrejött mutáns splice terméket kívántuk megvizsgálni. A hobo inszerció beépülésének iránya alapján ez a speciális összeépülés csak a white markergénnel jöhet létre. Így a prt gén első exonjára specifikus primert és a hobo transzpozonban található *mini-white* gén 3. exonjára specifikus primert használtunk a *prt<sup>gs</sup>* vonalból származó RNS templáton végzett reverz transzkripciót követő PCR reakció során, az esetleges mutáns RNS termék kimutatására. Ebből a PCR reakcióból csak abban az esetben kaphatunk amplifikátumot, ha képződik olyan RNS amely tartalmazza mind a két primerrel komplementer szakaszt. A PCR reakcióban egy 882bp hosszú terméket kaptunk, melynek szekvenáltatása után kiderült, hogy a *poirot* gén első exonja és a *mini-white* gén második exonja egy helytelen intronkivágódás eredményeképpen összeépült (9. ábra B). Mivel a *mini-white* transzlációs starthelye a harmadik exonjában található, így elképzelhető, hogy a mutáns vonalban a poirot gén szabályozása alatt, a kiméra RNS-ről White fehérje keletkezik, amit a prt<sup>gs</sup> mutánsok halvány narancsszínű szeme is jelezhet. Ez az összeépülés egyben megakadályozza a *poirot* génről a vad típusú mRNS képződését is.

#### Az ivarsejthiányos fenotípus menekítése prt transzgénnel

A  $prt^{gs}$  allél genetikai és molekuláris analízise feltárta, hogy az ivarsejthiányos mutációt a hobo transzpozon inszerciója eredményezte, valamint, hogy a hobo transzpozon a CG7761 gén első exonjába épült be. Annak bizonyítására, hogy a CG7761 annotált génben történt mutáció felelős az ivarsejthiányos fenotípusért, transzgenikus menekítési kísérletet végeztünk. A rendelkezésre álló CG7761 specifikus EST-kből kiválasztottuk azt amely tartalmazza a teljes kódoló szekvenciát (HL01519) és ezt pUASp Drosophila transzformáló vektorba, az UAS promóter szekvenciák után klónoztuk. Az így létrejött pUAS-prt vektort white1118 törzsbe transzformáltuk, majd harmadik kromoszómás transzgenikus pUAS-prt vonalakat alapítottunk. A pUAS-prt transzgént a nosGal4Vp16 ivarvonal specifikus Gal4 forrással fejeztettük ki, mivel ez a rendszer ivarvonalban képes aktiválni az UAS-t és rajta keresztül a beépített transzgént (Rorth 1998, Van Doren et al 1998). A menekítéshez olyan törzset készítettünk, amely a második kromoszómáján homozigóta volt a *prt<sup>gs</sup>* mutációra és a harmadik kromoszómáin a pUAS-*prt*, valamint a nosGal4Vp16 transzgéneket tartalmazta. Az ilyen nőstények utódjainak gonádjai 100%ban vad fenotípust mutattak, azaz a transzgénről keletkező CG7761 géntermék maradéktalanul menekítette az ivarsejthiányos fenotípust. Abban az esetben, ha csak a pUAS-prt transzgén vagy csak a nosGal4Vp16 transzgén volt jelen a homozigóta prt<sup>gs</sup> mutáns vonalban, akkor annak ivarsejthiányos fenotípusa megmaradt, jelezve, hogy a menekítésért valóban a CG7761 gén kódoló részét tartalmazó pUAS-prt volt a felelős.

Ezek az eredmények azt bizonyítják, hogy a *poirot* gén elrontása a felelős a *prt<sup>gs</sup>* unokátlan fenotípusáért, valamint, hogy a transzformált cDNS a teljes *prt* funkciót

tartalmazta. Mivel a pUAS-*prt* transzgént az ivarvonal specifikus *nosGal4Vp16* Gal4 forrással expresszáltattuk, az ivarsejthiányos fenotípus menekítése azt is bizonyította, hogy a *prt<sup>gs</sup>* mutáció a petekezdeményeknek csak az ivarvonal eredetű sejtjeiben nyilvánul meg.

## A Prt protein kimutatása ellenanyaggal és sejten belüli eloszlásának megállapítása

Már a menekítési kísérlet is arra utalt, hogy a *prt* génnek a petekezdemények ivarvonal eredetű sejtjeiben kell expresszálódnia. Egy új gén jellemzése során azonban a szövetspecificitáson túl mind az RNS, mind a fehérjetermék sejten belüli lokalizációjának ismerete közelebb vihet bennünket a gén funkciójának megismeréséhez. A *poirot* esetében először a *poirot* mRNS sejten belüli elhelyezkedését *in situ* hibridizációval vizsgáltuk vad típusú fejlődő petezdeményeken. Sajnos ezirányú próbálkozásunk nem vezetett eredményre. A hibridizációs jel hiánya a Northern hibridizáció sikertelenségének fényében nem volt meglepő, melyből úgy gondoljuk, hogy az RNS szintű expressziós vizsgálatok sikertelensége a *prt* RNS alacsony koncentrációjával magyarázható.

A továbbiakban a Poirot fehérje a fejlődő petesejten belüli eloszlásának megállapítására poliklonális ellananyagot termeltettünk nyulakban. A teljes hosszúságú, valamint a 227 aminosav hosszú C terminális Prt fehérjedarabból GST-Prt fúziós fehérje termelésére alkalmas konstrukciót készítettünk. Fehérje termelést indukáltunk baktériumban, majd a tisztított fehérjékkel nyulakat immunizáltunk. A savókat Western blottal teszteltük és kiválasztottuk a legerősebb jelet adó ellenanyagot (C terminális elleni) és a további kísérletekben azt használtuk. Vad típusú és *prt<sup>gs</sup>* mutáns hímekből

illetve nőstényekből fehérje preparátumot készítettünk, amelyeket Western blotton anti-Prt ellenanyaggal vizsgáltunk. A számítógépes molekulasúly becslésnek megfelelően a vad típusú fehérjepreparátumban 54-56 kDa-os relatív molekulatömeg tartományban egy Prt specifikus kettős csíkot kaptunk (10. ábra a-d). Megjegyzendő, hogy megfelelő intenzitású jelet csak abban az esetben kaptunk, ha a gélre az irodalomban ajánlott (Markussen *és mtsai.*, 1995) fehérjemennyiség háromszorosát vittük fel.



10. ábra. Western blot analízis Prt poliklonális ellenanyaggal. Belső kontollként a γ-Tubulin ellenanyagot használtuk. Vad típusú nőstényekből (a) és hímekből (b) származó fehérjepreparátum esetében 54 és 56 kDa-nál kapunk jelet. *prt<sup>gs</sup>/prt<sup>gs</sup>* nőstényekben (c) és hímekben (d) sem kapunk jelet ebben a mólsúlytartományban.

Számítógépes vizsgálataink alapján a fehérjén lehetségesek poszttranszlációs módosítások. Számos lehetséges foszforilációs hely található a Prt aminosav szekvenciájában. Úgy gondoljuk, hogy az 56 kDa mólsúlyú Prt fehérje egy ilyen módosítás eredményeképpen jön létre. Természetesen a módosítás típusát biokémiai vizsgálatokkal kell megállapítani. Az anti-Prt ellenanyaggal a vad típusban specifikusan reagáló két fehérje a *prt<sup>gs</sup>* homozigóta mintákból teljesen hiányzott. Ezekkel az adatokkal

most már nemcsak genetikai, és RNS szinten, hanem fehérje szinten is sikerült kimutatnunk a *prt<sup>gs</sup>* mutáns null jellegét.

A Western blot kísérletekben jól működő a Prt fehérje C terminális szakasza ellen termeltetett ellananyaggal próbáltuk a Prt fehérje petesejten belüli eloszlását meghatározni. A petekezdemények ellenanyagos festése során különböző Prt ellenanyag hígításokat és fixálási módokat alkalmaztunk, de mindezek ellenére nem kaptunk specifíkus jelet. Az irodalomból számos esetet ismerünk, ahol a Western blotban jól működő ellenanyag nem volt alkalmas hisztokémiai vizsgálatokra (Harris és Macdonald, 2001; Newmark *és mtsai.*, 1997). Ennek egyik oka lehet, hogy a sejten belüli natív fehérje nem hozzáférhető az ellenanyag számára. Esetünkben azonban az a magyarázat a valószínűbb, hogy a kimutatást a *prt* gén alacsony expressziója tette lehetetlenné.

Az irodalomból tudjuk, hogy ezeket a problémákat úgy próbálják kiküszöbölni, hogy az alacsony mértékben kifejeződő fehérjéket jelző fehérjékkel építik össze, és azt nagy mennyiségben termeltetik az adott sejtféleségben, majd a fúziós fehérje eloszlását vizsgálják (Harris és Macdonald, 2001; Newmark *és mtsai.*, 1997). Az ilyen jellegű kísérletek eredménye azonban csak akkor mérvadó ha a fúziós géntermék megőrzi eredeti funkcióját. A Prt fehérje sejten belüli kimutatására Prt-GFP fúziós fehérjét kódoló kiméra DNS-t építettünk pUASp *Drosophila* expressziós vektorba, majd transzgenikus *Drosophila* törzseket hoztunk létre. A Prt-GFP fúziós fehérjét *nosGal4VP16* transzgén segítségével fejeztettük ki *Drosophila* ivarvonal sejtekben. A transzgénnel sikeresen menekítettük az *prt<sup>gs</sup>* mutáció unokátlan fenotípusát, bizonyítva, hogy a Prt-GFP fúziós fehérje működőképes és minden valószínűség szerint hűen tükrözi a vadtípusú Prt fehérje expressziós mintázatát (11. ábra). A Prt-GFP fehérje a petefejlődés korai stádiumaiban (2-4. stádium) a dajkasejtek magja körül halmozódik fel, kis granulumok formájában. Az oogenezis középső (3-7. stádium) stádiumaiban a dajkasejtek mellett a petesejtben is megtalálhatók a granulumok, majd a fejlődés későbbi (8-10. stádium) szakaszaiban a Prt-GFP fehérje a petesejt sejthártyája alatt, szubkortikálisan figyelhető meg. Ezekben a stádiumokban a dajkasejtek és a petesejt megközelítőleg azonos mennyiségű Prt-GFP fehérjét tartalmaz.

A Prt-GFP fúziós fehérje petekezdeményen belüli elhelyezkedése és granuláris jellege nagyon hasonlít egy már jól jellemzett, fehérjéket és RNS-ket is tartalmazó, úgynevezett RNP komplex sejten belüli lokalizációjához (Wilhelm *és mtsai.*, 2000;Nakamura *és mtsai.*, 2001; Mansfield *és mtsai.*, 2002).



11. ábra. A Prt-GFP fúziós fehérje eloszlása az oogenezis különböző stádiumaiban (st). A korai stádiumokban a dajka sejtek magja körül figyelhetők meg a Prt-GFP partikulumok, míg a későbbi stádiumokban a fejlődő petesejt szubkortikális részén is.

Ezt a komplexet az először azonosított és jellemzett tagjáról, az Exuperantia-ról Exu-RNP-nek is nevezik, amely mintegy 7 fehérjét, valamint az *osk* és *bic* mRNS-t is tartalmazza. Az RNP komplex tagjainak szerepe van az *osk* mRNS lokalizációjában és transzlációs szabályozásában, így az ivarsejtek kialakításában. Az Exu-RNP komplex mellett a Cup fehérje sejten belüli eloszlása hasonló a Prt-GFP fúziós fehérjéhez (Keyes és Spradling, 1997). A Cup fehérje feladata sokrétű a petekezdemény fejlődése során és független az Exu-RNP-től. Általánosságban elmondható, hogy a Cup fehérje a petekezdemény növekedéséhez és fejlődéséhez szükséges. A fentiek ismeretében kombinált ellenanyagos festésekkel megvizsgáltuk, hogy vajon a Prt-GFP az Exu-RNP komplex tagjaival vagy a Cup fehérjével mutat-e azonos lokalizációs mintázatot. Az Exu-RNP komplex három tagját, az Exuperantia-t, a Me31B-t és az Orb fehérjét vizsgáltuk. Kettős ellananyagos festéseket végeztünk GFP, illetve Exu, Me31B, Orb és Cup fehérjék elleni ellenanyagokkal. Két különböző fluorokrom csoporttal (CyTM2, CyTM3) konjugált másodlagos ellenanyagot használtunk, az elsődleges ellananyagok gazdaszervezetét figyelembevéve.



12. ábra. A Prt-GFP fúziós fehérje és az Exu-RNP egy tagjának a Me31B-nek az ellenanyagos festése azonos preparátumon. (A) PRT-GFP, (B) Me31B és (C) a két eloszlási mintázat együtt megjelenítve ugyanazon a petekezdeményen. Látható, hogy az eloszlás bár hasonló, de nem átfedő.

Konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk a kettősen festett petekezdeményeket. Bár a festési mintázat eloszlása és granuláris jellege hasonló volt, a Prt-GFP fehérje egy esetben sem mutatott teljesen azonos lokalizációs mintázatot sem és az Exu-RNP komplex három vizsgált komponensével (Exu, Me31B, Orb), sem a Cup fehérjével (12. ábra). Ezek az eredmények azt valószínűsítik, hogy a Prt-GFP fehérje a fenti fehérjéktől független módon szállítódik a dajka sejtekből a fejlődő petekezdeménybe. Biokémiai vizsgálatokra lenne szükség annak eldöntésére, hogy a Prt-GFP fehérje komplexben szállítódik-e, és ha igen, akkor melyek a komplexnek a további komponensei, milyen mechanizmussal, illetve milyen motormolekulák felhasználásával történik a szállítása.

#### Az osk mRNS és fehérje lokalizációjának és a fehérje mennyiségének vizsgálata

A *prt<sup>gs</sup>* mutáció mind ivarsejthiányos, mind potrohhiányos fenotípussal rendelkezik, ami alapján a poszterior géncsoportba soroltuk. A poszterior gének között az *osk* kulcsszereppel rendelkezik, hiszen elsőként lokalizálódik a poszterior póluson, ahol megszervezi a poláris plazmát. Így felmerült a kérdés, hogy a *prt* gén funkciója hogyan viszonyul az *osk* mRNS és fehérje elhelyezkedéséhez, illetve mennyiségéhez; az *osk*-on keresztül vagy attól függelenül fejti-e ki hatását?

Elsőként az osk mRNS eloszlását és mennyiségét vizsgáltuk a *prt<sup>gs</sup>* mutáns vonalban. Dig jelölt osk cDNS-el vizsgáltuk *in situ* hibridizációs technika segítségével az osk mRNS eloszlását az oogenezis folyamán. A vad típusú osk mRNS eloszlásához viszonyítva nem találtunk szignifikáns különbséget a homozigóta *prt<sup>gs</sup>* nőstények petekezdeményeiben (13. ábra A-B). Az osk mRNS a petesejt fejlődése során mindvégig kötődik a Staufen RNS kötő fehérjével, így vele együtt lokalizálódik a poszterior póluson is. A Staufen fehérjét ezért az osk mRNS eloszlás fehérje markereként szokás használni (St Johnston *és mtsai.*, 1991). A Staufen fehérje, a homozigóta *prt<sup>gs</sup>* nőstények petekezdeményeiben az osk mRNS-hez hasonlóan vad típusú eloszlást mutatott (13. ábra C-D). Amennyiben az osk mRNS lokalizációja a poszterior póluson a nyolcadik stádiumban rendben megtörténik, elkezdődik a fehérje transzlációja.



13. ábra. oskar RNS in situ hibridizáció és Staufen ellenanyagos festés. (A) Mind a vad típusú 10. stádiumú petekezdeményeken, mind (B) a prt<sup>gs</sup>/prt<sup>gs</sup> nőstények ugyanilyen korú petekezdeményein normális poszterior osk mRNS loaklizációt tapasztaltunk. Az osk mRNS-hez kapcsolódó Staufen fehérje is a poszterior pólusra lokalizálódik (C) a vad típushoz hasonlóan a (D) prt<sup>gs</sup> mutáns petekezdeményekben is.

A *prt<sup>gs</sup>* petekezdeményekben a keletkező Osk fehérje mennyiségét, és eloszlását Osk fehérje elleni ellenanyagos festéssel vizsgáltuk meg (14. ábra A, F, G). A *prt<sup>gs</sup>* homozigóta nőstényekben az *osk* mRNS poszterior lokalizációja megtörténik, ennek megfelelően azt tapasztaltuk, hogy a fehérje transzlációja megkezdődik és a képződő Osk fehérje lokalizációja az oogenezis 8-9. stádiumában normálisnak tekinthető. A 10. stádiumtól kezdődően azonban csökkent mértékű poszterior lokalizáltságú Osk fehérjét mutattunk ki. Konfokális mikroszkóppal a homozigóta *prt<sup>gs</sup>* nőstények 10. stádiumú petekezdeményeinek 38%-ában az Osk fehérje lokalizációja hibás, vagyis a fehérje mennyisége a poszterior póluson csökken illetve leszakadozik a poszterior pólusról (14. ábra B-E, 2. táblázat). A hibás lokalizáció jelensége a pete fejlődésének előrehaladtával fokozódik, és a pete lerakása után, az embrionális korban a legerőteljesebb.



14. ábra. Osk ellenanyagos festése petekezdeményeken és embriókon. (A) Vad típusú 10. stádiumú petekezdemény a poszterior póluson lokalizálódó Osk fehérjével. A prt<sup>gs</sup>/prt<sup>gs</sup> mutáns nőstények petekezdeményeiben az Osk fehérje eloszlása különböző mértékű csökkenést mutat, (B) van ahol teljesen hiányzik, (C-E) van ahol pedig a poszterior pólusról leszakadozik. (F) Az Osk fehérje az embrióban is poszterior lokalizációt mutat és (G) az embrionális ivarsejtekben a citoplazmában is megtalálható azok lefűződése után. (H-J) A prt<sup>gs</sup>/prt<sup>gs</sup> mutáns nőstények embrióiban az Osk fehérje erős csökkenését tapasztaltuk, mivel megszünt a vad típusra jellemző poszterior lokalizáció.

	Vad típu	isú OSK	Csökkent vagy hiányzo		
	feh	érje	OSK fehérje		
	No	%	No	%	
Vad pete10. stádium	97	95	5	5	
n# <sup>gs/</sup> n# <sup>gs</sup> pete 10. stádium	65	61	41	38	
vad embrió	81	100	0	0	
<i>prt<sup>gs</sup>∕ prt<sup>gs</sup></i> embrió	4	9	45	91	

2. táblázat. Az Osk fehérje lokalizációja petesejtben és embrióban. No: A vizsgált petesejtek és embriók száma. %: A százalékos megoszlása az petesejteben és embrióban a vad típusú és az abnormális Osk fehérje lokalizációnak



15. ábra. Western blot Osk ellenanyag és belső kontrollként γ-Tubulin ellenanyag felhasználásával. (A) (a) Vad típusú ováriumból készült fehérjepreparátumban mind a rövid Osk (55kDa), és annak foszforilált formája (57kDa), mind a hosszú Osk (71kDa) izoforma kimutatható. (b) A prt<sup>gs</sup>/prt<sup>gs</sup> mutáns nőstények ováriumában a hosszú Osk mennyisége nem változott, míg a foszforilálatlan rövid Osk szinte eltűnt és a foszforilált rövid Osk mennyisége is jelentős mértékben redukálódott. (c) Negatív kontrollként Osk54/Df nőstényeket használtunk (B) A két izoforma alternatív start kodon használattal keletkezik az érett mRNS-ről.

A homozigóta *prt<sup>gs</sup>* nőstényektől származó embriók 90%-ában az Osk nem mutatható ki vagy mennyisége jelentősen mértékben csökken (14. ábra H-J, 2. táblázat). A fehérjecsökkenés mennyiségi vizsgálatára és a csökkenés esetleges izoformaspecifitásának megállapítására Western blot analízist alkalmaztunk. Az *osk* mRNS-ről alternatív startkodon használattal egy rövid (55kDa) és egy hosszú (71kDa) izoforma képződik. Osk Western blotton azonban egy harmadik Osk fehérjetermék, a rövid forma foszforilált változata (57kDa) is megfigyelhető (15. ábra B) (Markussen *és mtsai.*, 1995; Markussen *és mtsai.*, 1997)

A vad típusú ováriumokból készített fehérjepreparátumban mind a két Osk izoforma és a foszforilált rövid Osk izoforma egyaránt megtalálható volt (15. ábra A). A homozigóta *prt<sup>gs</sup>* nőstények ováriumából készített fehérjepreparátumban a foszforilálatlan rövid Osk (55kDa) izoforma mennyisége jelentős mértékben csökkent, míg a hoszú Osk (71kDa) mennyisége a vad típussal közel megegyező volt (15. ábra A) Western blot analízisben vizsgálva. A foszforilált rövid Osk (57kDa) mennyisége a vad típushoz viszonyítva szintén jelentős mértékben csökkent. Ezekből az eredményekből arra a következtetésre jutottunk, hogy a Prt fehérje a rövidebb Osk izoformán keresztül fejíti ki hatását, hiszen a mutánsokban csak ennek az izoformának a mennyisége változik. A *prt<sup>gs</sup>* mutáns petekezdeményekben a helyesen lokalizált *osk* mRNS-ről elindul a transzláció, de a fehérje stabilitása vagy a fehérje kihorgonyzása nem megfelelő és ez okozza a poszterior pólusról való leszakadását, majd degradálódását, amely fehérje csökkenést mennyiségileg is kimutattunk.

Az irodalomban találunk kísérleti eredményeket arra vonatkozólag a poláris plazma komponens Vasa fehérjét kódoló gén mutációiban, a mi esetünkhöz hasonlóan, kizárólag a rövid Osk izoforma csökkenése megfigyelhető meg (Rongo és mtsai., 1995; Markussen és mtsai., 1995). További hasonlóság, hogy a vasa mutánsokban szintén a foszforilálatlan rövid Osk izoforma mennyisége csökken jelentősebben a foszforilált formához viszonyítva. Ez felveti annak a lehetőségét, hogy esetleg a prt a Vasa fehérjén keresztül hat az Osk fehérje mennyiségére. A feltételezett prt-Vasa szabályozási út tanulmányozására Vasa Western blot analízist végeztünk homozigóta prt<sup>gs</sup> nőstények ováriumaiból készített fehérjepreparátumon (16. ábra). A Western blot kvantitatív értékelése alapján kiderült, hogy a Vasa fehérje mennyisége a vad típussal megegyező a prt<sup>gs</sup> nőstények ováriumában, így megállapítottuk, hogy a Prt fehérje nem a Vasa fehérje mennyiségi szabályozásán keresztül hat az Osk fehérje szintjére. A fenti kísérlet természetesen nem zárja ki annak a lehetőségét, hogy a prt egyéb módon befolyásolja a Vasa fehérje aktivitását és így esetleg mégis a Vasa fehérjén keresztül hat az Osk géntermékre.

A Prt-GFP fúziós fehérje segítségével megállapítottuk, hogy a Prt fehérje a 10. stádiumtól kezdődően a fejlődő petesejt szubkortikális régiójába lokalizálódik. Az Osk fehérje a 10. stádiumban a poszterior póluson horgonyzódik ki. Egy kettős ellenanyagos festési kísérlettel és konfokális mikroszkópia felhasználálásával megállapítottuk, hogy a Prt-GFP és az Osk fehérje lokalizációja a 10. stádiumban a poszterior szubkortikális régióban átfedést mutat, amely megteremti a lehetőségét a Prt fehérje és az Osk fehérje lokalizációjában szerepet játszó fehérjék közötti fizikai kapcsolat kialakulásának.



16. ábra. Western blot Vasa ellenanyag és belső kontrollként γ-Tubulin ellenanyag felhasználásával. (A) (a) Vad típusú ovárium fehérjepreparátumban a Vasa fehérje 72kDa-nál ad specifikus jelet a Vasa ellenanyaggal. (b) A prt<sup>gs</sup>/prt<sup>gs</sup> mutáns nőstények ováriumában szintén 72kDa-nál kapunk specifikus jelet. A γ-Tubulin belső kontrollhoz és a vad típushoz viszonyítva nem mutatható ki mennyiségi különbség a prt<sup>gs</sup>/prt<sup>gs</sup> mutáns nőstényekben. (c) Negatív kontrollként vasa<sup>PD</sup>/vasa<sup>D1</sup> nőstényeket használtunk.



17. ábra. A Prt-GFP és az Osk fehérje együtt lokalizálódik a 10. stádiumú petesejt poszterior szubkortikális régiójában. (A) A Prt GFP eloszlása a petesejtben GFP ellenanyagos festéssel. (B) az Osk fehérje eloszlása a petesejtben Osk ellenanyagos festéssel. (C) A GFP és az Osk festés együttes megjelenítése ugyanazon a petesejten.

### A prt<sup>gs</sup> és a btk29A allélok genetikai interakciója

A Prt emberi homológjának, a Sab fehérjének funkcióját *in vivo* és *in vitro* kísérletekkel bizonyították (Matsushita és mtsai., 1998; Yamadori és mtsai., 1999). Ezen eredményeből tudjuk, hogy az emberi Sab fehérje a Bruton tirozin kinázhoz annak SH3 doménjén keresztül kötődik, és negatívan szabályozza annak működését. A Bruton tirozin kináz fehérje *Drosophila* homológját, a *btk29A* gén kódolja. A fehérje homológia adatok alapján joggal vetődött fel a kérdés, vajon a Sab funkciója evolúciósan konzervált-e, azaz a prt a Sab-hoz hasonlóan negatív regulátora-e Drosophila btk29A génnek? Ennek a kérdésnek megválaszolására prt-btk29A kettős mutáns nőstényeket állítottunk elő. A prt<sup>gs</sup> null, illetve a *btk29A* hipomorf (*k00206*, *k05610*, *fic<sup>PL</sup>*) allélokból rekombinációval kettős mutáns törzseket hoztunk létre (Baba és mtsai., 1999; Roulier és mtsai., 1998), majd a rekombináns kromoszómákat keresztezéssel egy genomba vittük. A kettős mutáns nőstények utódainak ivarsejthiányos fenotípusát vizsgáltuk. Azt tapasztaltuk, hogy az eredeti 70%-os unokátlan fenotípus teljesen visszaszorult a btk29A<sup>ficPL</sup> prt<sup>gs</sup>/btk29A<sup>ficPL</sup> prt<sup>gs</sup> kettős mutáns nőstényekben, míg a btk29A<sup>k05610</sup> prt<sup>gs</sup>/btk29A<sup>ficPL</sup> prt<sup>gs</sup> és a btk29A<sup>k00206</sup> prt<sup>gs</sup> /btk29A<sup>ficPL</sup> prt<sup>gs</sup> mutáns nőstényekben az unokátlan fenotípus penetranciája erőteljesen, 4.4% illetve 4.0%-ra csökkent.

Mivel a *btk29A* genetikai kölcsönhatást mutatott a poszterior csoportba sorolt *prt* génnel felmerült, hogy magának a *btk29A* génnek is lehet poszterior fenotípusa. A *btk29A* mutációknak a petekezdemények gyűrűcsatornáinak normális növekedését érintő illetve anyai hatású korai embriónális fejhibával járó fenotípusáit már korábban leírták. (Roulier *és mtsai.*, 1998 ; Li *és mtsai.*, 2000) A letális *btk29A* mutáns allélok esetében

ivarsejtvonal-klón idukcióval vizsgálták a homozigóta petekezdemények és az abból származó embriók fenotípusát, de poszterior, potroh- vagy ivarsejthiányos fenotípusról egyik kutatócsoport sem számolt be. Elhatároztuk, hogy megismételjük a *btk29A* homozigóta ivarvonal klónanalízist a korábban is használt *btk29A<sup>k00206</sup>* valamint *btk29A<sup>k05610</sup>* allélekkel. A FLP-FRT rendszer segítségével homozigóta ivarvonal klónokat hoztunk létre. Az ivarvonal klónokban az előzetesen már leírt gyűrűcsatorna hibából származó ún. dumpless fenotípust (az embrió kisebb és a háti függelékek hibásak) és embrionális fejhibákat tapasztaltunk, de potrohhiányos embriókat nem találtunk. Mindkét esetben 20-20 homozigóta (*btk*) petéből származó életképes utódot ivarsejthiányos fenotípusra is megvizsgáltunk és megállapítottuk, hogy a vizsgált *btk* alléleknek nincs ivarsejthiányos fenotípusa. Ezen eredmények alapján megerősíthető, hogy *btk29A* aktivitás sem az potroh kialakításához, sem az ivarvonal kialakításhoz nem szükséges.

Mivel a *prt<sup>gs</sup>* null mutáns unokátlan fenotípusa csak abban az esetben nyílvánul meg, ha a *btk* gén vad típusú aktivitása is jelen van és a *btk29A* alléloknak nincs az ivarsejtek kialakításában betöltött szerepe, valamint a hipomorf funkcióvesztéses *btk* allélok visszaszorították az eredeti *prt* fenotípust, úgy gondoljuk, hogy a *prt* negatív regulátora lehet a *Drosophila btk29A*-nak. Ebben az esetben a feltételezett negatív szabályozás hiányában, a *btk* túlműködése lehet a felelős a *prt<sup>gs</sup>* unokátlan fenotípusáért. Amennyiben a szabályozási út mindkét eleme, a szabályozó (*prt*) és a szabályozott (*btk*) is hiányzik, akkor az eredeti fenotípus eltűnését tapasztaljuk, ugyanis nem keletkezhet szabályozatlan módon *btk* géntermék, amely a poszterior géntermékek lokalizációját megzavarhatná.

## Az eredmények összefoglalása

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

A *poirot* gén 70%-os penetranciájú unokátlan fenotípust mutató *prt<sup>gs</sup>* mutáns allélját azonosítottuk egy *hobo* mutánsgyűjtemény szisztematikus szűrésével.

A mutációt jellemeztük genetikailag. Genetikai és molekuláris módszerekkel megállapítottuk a mutációt okozó *hobo* transzpozon beépülésének helyét. A *prt<sup>gs</sup>* vad típusú revertánsait állítottuk elő a *hobo* transzpozon mobilizálásával.

Azonosítottuk és jellemeztük a vad típusú *poirot* gént. Szekvencia homológia alapján a Prt fehérje egy SH3 domén kötő fehérjecsalád új tagja. A szerkezeti homológián túl genetikai interakciós kísérletek alapján beláttuk, hogy az emberhez hasonlóan, *Drosophilában* is a Prt fehérje negatív regulátora lehet a *Drosophila btk29A*-nak.

RNS szinten kimutattuk, hogy a *prt<sup>gs</sup>* egy null mutáció. Megállapítottuk, hogy a *prt* gén első exonjának és a mutációt okozó *hobo* transzpozon *mini-white* riportergénjének összeépülése megakadályozza a vad típusú géntermék képződését.

A *prt* kódoló régiót tartalmazó konstrukció felhasználásával transzgenikus vonalat készítettünk és ivarvonal specifikus expresszióval menekítettük *prt<sup>gs</sup>* utódjainak ivarsejthiányos fenotípusát.

A Prt fehérje ellen ellenanyagot termeltettünk és ezzel is bizonyítottuk a *prt<sup>gs</sup>* mutáció null jellegét. Prt-GFP fúziós fehérjét termelő transzgenikus *Drosophila* törzseket alapítottunk és meghatároztuk a Prt szubcelluláris elhelyezkedését a petefejlődés különböző stádiumaiban.

Kimutattuk, hogy a *prt<sup>gs</sup>* mutáns petekezdeményekben, a poszterior géncsalád központi szereplőjéről az *osk* génről átíródó *osk* mRNS szintje és elhelyezkedése a vad típussal megegyező.

Osk ellenanyagos festési kísérletekben kimutattuk, hogy a *prt<sup>gs</sup>* mutánsok ováriumában az *osk* transzlációja elindul azonban a korai normális lokalizációt követően az oogenezis előrehaladtával az Osk fehérje szintje csökken. Az Osk fehérje elválik a poszterior szubkortikális régiótól és degradálódik a *prt<sup>gs</sup>* mutánsok ováriumában és az embriókban egyaránt.

Az Osk fehérje csökenését mennyiségileg is kimutattuk és megállapítottuk hogy a *prt<sup>gs</sup>* mutáció csak a rövidebb Osk izoforma szintjét befolyásolja, a hosszabb Osk izoforma mennyisége megegyezik a vad típuséval a *prt<sup>gs</sup>* mutánsokban.

# Az eredmények megvitatása

Az Osk fehérje a fejlődő petesejt poszterior pólusán képződik és horgonyzódik ki, ami a megtermékenyítést követően is fennmarad, egészen az embrionális ivarsejtek képződéséig. Mind a petesejtben, mind az embrióban megfigyelhető egy erőteljes citoplazma áramlás, de ez nem befolyásolja a lokalizált osk mRNS-nek és a lokalizált Osk fehérjének az elhelyezkedését. Abban az esetben ha nem lokalizáltak az osk géntermékek, akkor a citoplazmaáramlás elsodorja őket, majd degradálódnak (Pokrywka és Stephenson, 1995; Glotzer és mtsai., 1997). Habár a kihorgonyzódás egy fontos lépése az osk szabályozásának, annak pontos mechanizmusa kevéssé ismert. A Osk fehérje lokalizáció mechanizmusának vizsgálata különösen nehéz, mivel az Osk fehérje rendelkezik egy pozitív szabályozó tulajdonsággal. Az Osk fehérje szükséges az osk mRNS poszterior póluson történő kikötéséhez (Rongo és mtsai., 1995; Markussen és mtsai., 1995). Így az osk szabályozásában résztvevő gének azon mutációi, amelyek az Osk fehérje kihorgonyzását érintik, általában hatással vannak az osk mRNS lokalizációjára is, bonyolulttá téve az analízist. Például az aktin-kötő fehérjét kódóló TmII génben bekövetkezett mutáció megszünteti mind az osk mRNS, mind a fehérje lokalizációját (Erdelyi és mtsai., 1995). Közvetett bizonyítékok alapján feltételezhető, hogy a TmII, és így az aktin sejtváz közvetlenül résztvesz az Osk fehérje kihorgonyzásában, és ezért az Osk fehérje lokalizációs hibája a mutánsban nem egyszerűen csak az osk mRNS poszterior póluson tapasztalható hiányára vezethető vissza.

Kísérleteink során a *prt<sup>gs</sup>/prt<sup>gs</sup>* nőstények petekezdeményeiben az Osk fehérje hibás lokalizációját figyeltük meg. Az *osk* mRNS az oogenezis összes fázisában a vad típussal megegyező módon lokalizálódott a poszterior póluson és vele együtt vad típusú volt a Staufen RNS kötő fehérje eloszlása is, amely az RNS-hez kötődve azzal együtt lokalizálódik. Ezekből az eredményekből úgy gondoljuk, hogy a *prt<sup>gs</sup>* mutáció nem az *osk* mRNS transzportját és nem is annak lokalizációját befolyásolja. Ez viszont azt is feltételezi, hogy az Osk fehérje csökkenés csak részleges, mivel a fehérje-RNS pozitív reguláció a *prt<sup>gs</sup>/prt<sup>gs</sup>* petekezdeményekben megvan.

A korai stádiumokban a vad típusú és a *prt<sup>gs</sup>/prt<sup>gs</sup>* nőstények petekezdeményeiben azonos mennyiségű Osk fehérje lokalizáció volt megfigyelhető a poszterior póluson, amely az előző állítást alátámasztja. A késői stádiumokban azonban az Osk fehérje fokozatos "leszakadását" figyeltük meg a *prt<sup>gs</sup>/prt<sup>gs</sup>* mutáns petekezdemények szubkortikális régiójából. Azt tapasztaltuk, hogy ez a hibás Osk lokalizációs fenotípus folyamatosan erősödik az oogenezis előrehaladtával és legkifejezettebb az érett petében, illetve az embrióban. Eredményeink azt valószínűsítik, hogy a *poirot* nem az Osk fehérje képződésére van hatással, hiszen a transzláció folyamata elindul és a korai stádiumokban normális fehérjeszint és fehérjeeloszlás figyelhető meg. Sokkal valószínűbb, hogy a prt az Osk fehérje kihorgonyzásában vagy a kihorgonyzott Osk fehérje stabilitásának növelésében játszik szerepet. A *prt<sup>gs</sup>* mutáns utódjaiban tapasztalt ivarsejthiányos fenotípus a legvalószínűbben azzal magyarázható, hogy a későbbi stádiumokban tapasztalt hibás Osk lokalizáció és csökkent fehérjeszint kevesebb poláris plazma kialakítására képes, amely kevesebb embrionális ivarsejt kialakulásához vezet. Eredményeink alapján az osk mRNS lokalizációja elkülöníthető az Osk fehérje lokalizációjától.

Kimutattuk, hogy a homozigóta *prt<sup>gs</sup>* mutánsban csak a rövid Osk izoforma mennyisége csökken, míg a hosszú Osk izoforma mennyisége a vad típuséval megegyező szinten marad, azaz a Prt fehérje csak a rövid Osk izoforma lokalizációjában játszik szerepet. Ismert, hogy a hosszú Osk izoforma elégséges az *osk* mRNS poszterior póluson történő kihorgonyzódásához (Rongo *és mtsai.*, 1995; Markussen *és mtsai.*, 1995), így a *prt<sup>gs</sup>* mutánsban tapasztalt vad típusú *osk* mRNS lokalizáció a vad típusú hosszú Osk izoformával magyarázható.

A *prt<sup>gs</sup>* az első eset, amikor egy Osk fehérje lokalizációs mutánsban a fehérje pozitív visszacsatolásos folyamata nem sérül. Ugyanakkor a *prt<sup>gs</sup>* izoforma specifitásából arra is következtethetünk, hogy a két Osk izoforma eltérő kihorgonyzódási mechanizmussal rendelkezik, amelyben szerepe lehet az eltérő poszttranszlációs módosításnak is. A *prt<sup>gs</sup>* null mutánsban az oogenezis során mindvégig kell lenni egy kis mennyiségű funkcióképes rövid Osk fehérjének, hiszen a rövid Osk izoforma teljes hiánya nem csak ivarsejthiányos, unokátlan, hanem egy komplex abdomen- és ivarsejthiányos fenotípust eredményezne (Markussen *és mtsai.*, 1995). Ezek az adatok arra utalnak, hogy a *prt* működése az Osk fehérje kihorgonyzódásában nem kizárólagos. Valószínűleg *prt<sup>gs</sup>* mutánsban a poszterior pólus Osk fehérje kötő képessége vagy magának az Osk fehérjének a poszterior pólushoz való kötődése gyengül.

A Prt fehérje petesejten belüli elhelyezkedése összeegyeztethető az osk szabályozásában betöltött szerepével. Az Osk fehérje transzlációjának idején a Prt a petesejt szubkortikális régiójában lokalizálódik, amelynek poszterior részén maga az Osk fehérje is kihorgonyozódik. A genetikai tesztben funkcióképes Prt-GFP fehérje az Osk fehérjével kolokalizálódik a vadtípusú petekamrák poszterior szubkortikális régiójában,
így a Prt fizikai közelsége révén részt vehet az Osk fehérje kihorgonyzásának szabályozásában.

Azt tapasztaltuk, hogy a Prt fehérje aggregátumokat képez, amelyek mind a dajka sejtek, mind a petesejt citoplazmájában megtalálhatók. Néhány, az osk mRNS transzlációs szabályzásában szerepet játszó fehérje, amelyek egy nagyméretű ribonukleoprotein komplexet (RNP) formálnak, a Prt-GFP-hez hasonló expressziós mintázatot mutatnak a petesejtbe történő transzportjuk során. Biokémiai adatok bizonyítják, hogy ez az RNP az EXU fehérje melett legalább 7 másik fehérjét, valamint magát az osk és bicoid mRNS-t is tartalmazza (Wilhelm és mtsai., 2000). Ezért megvizsgáltuk, hogy a Prt tagja lehet e ennek a komplexnek. Kimutattuk, hogy a Prt-GFP fehérje nem mutat azonos lokalizációs mintázatot a dajka sejtekben sem az EXU-RNP tagjaival (EXU,Me31,Orb), sem a hasonló szubcelluláris elhelyezkedést mutató (Keyes és Spradling, 1997), de az Exu-RNP komplextől független CUP fehérjével. Összegzésképpen megállapítottuk, hogy dacára a hasonló szubcelluláris lokalizációnak a Prt aggregátumok mind az EXU komplextől, mind a CUP fehérjétől függetlenek. A Prt fehérje transzportja a dajkasejtekből a petesejtbe tehát egy eddig még nem ismert módon valósul meg. A továbbiakban érdekes lenne megállapítani a transzport pontos mechanizmusát.

A Prt fehérje nagyfokú szekvencia homológiát mutat egy SH3 domén-kötő, Sab fehérjecsalád tagjaival, amelyek megtalálhatók különböző eukariótákban a *C. eleganstól* az emberig. Ezidáig csak az emberi Sab fehérjét jellemezték és kimutatták, hogy specifikusan kötődik és negatívan szabályozza a Bruton-tirozin-kinázt (Btk) annak SH3 doménjén keresztül (Yamadori *és mtsai.*, 1999). A Btk fehérje SH3, SH2 és plextrin

homológ régiókat tartalmaz és mind emberben, mind egérben szerepet játszik a B limfociták fejlődésében. (Smith *és mtsai.*, 2001). Hiánya emberben az X kromoszómához kötött agammaglobulémiát és egérben az X kromoszómához kötött immunhiány betegségét okozza (Rawlings *és mtsai.*, 1993; Tsukada *és mtsai.*, 1993). A *Drosophila* genom csak egyetlen *btk* homológot, a *btk29A*-t tartalmazza, amely 2 fehérje izoformát kódol (Roulier *és mtsai.*, 1998). A *btk29A* génnek számos pleiotróp funkciója ismert, szerepet játszik többek között a hím fertilitásban és a petekezdeményben a gyűrűcsatornák kialakításában. A *btk29A* gén kifejlett állatokban az agyban, a lárvális immunszervekben és még számos más szövetben is kifejeződik (Vincent, *és mtsai.*, 1989; Wadsworth *és mtsai.*, 1990; Roulier *és mtsai.*, 1998; Baba *és mtsai.*, 1999).

Megvizsgáltuk, hogy a nagyfokú fehérje szekvencia homológia funkcionális homológiát is jelent-e, azaz a *Drosophilaban* is a Prt a Btk29A negatív regulátora. Ezt a negatív szabályozást *prt<sup>gs</sup>* és a *btk29A* allélek közötti genetikai kölcsönhatás segítségével mutattuk ki. A homozigóta életképes *btk29A<sup>ficPL</sup>-prt<sup>gs</sup>/ btk29A<sup>ficPL</sup>-prt<sup>gs</sup>* kettős mutánsokban az eredeti unokátlan fenotípus eltűnését tapasztaltuk és a fenotípus jelentős csökkenését figyeltük meg a *btk29A<sup>k05610</sup>-prt<sup>gs</sup>/btk29A<sup>ficPL</sup>-prt<sup>gs</sup>* és a *btk29A<sup>k00206</sup>prt<sup>gs</sup>/btk29A<sup>ficPL</sup>-prt<sup>gs</sup>* rekombinánsok esetében is. Vagyis egy null mutáció fenotípusának hipomorf mutációkkal történő szupressziója, negatív regulációra utal.

Mivel a Prt fehérje a vad típusú petesejt azon szubkortikális részén található, ahol az Osk fehérje képződése és kihorgonyzódása történik, feltételeztük, hogy a Prt fehérje negatív szabályozással gátolja a szubkortikális Btk fehérje aktivitását. Hipotézisünk szerint, ha a Prt, mint feltételezett negatív regulátor hiányzik, akkor a mutáns petekezdeményekben jelentkező ektópikus fehérje aktivitás megzavarja a poszterior génhierarchia normális szabályozását. A modell alapján a negatívan szabályozott *btk* gén funkcióvesztéses mutációja nem eredményez poszterior fenotípust. A letális *btk29A<sup>k05610</sup>* és *btk29A<sup>k00206</sup>*allélek mozaik-analízise megerősítette feltételezésünket, mivel a vizsgált *btk29A* alléloknak nem detektáltunk semmilyen hatását az ivarsejt képzésben. A *btk29A* poszterior szerepére a *prt<sup>gs</sup>* mutánsban két elképzelés lehetséges, a szabályozatlan *btk* vagy csökkenti a petesejt szubkortikális komponenseinek lokalizációs kapacitását, vagy a rövid Osk fehérjének a foszforilációs mintázatát módosítja. Véleményünk szerint ez utóbbi lehetőség kevésbé valószínű, mert habár a *prt<sup>gs</sup>* mutánsban a rövid Osk fehérje foszforilációs mintázata érintett, nem találtunk extra mennyiségű foszforilált rövid Osk izoformát. Ezzel szemben azt tapasztaltuk, hogy az 57kDa mólsúlyú foszforilált rövid Osk izoforma mennyiségé is szignifikánsan csökkent a *prt<sup>gs</sup>* mutáns nőstényekben, bár a nem foszforilált rövid Osk izoformához viszonyítva a csökkenés mértéke itt kisebb volt.

Úgy gondoljuk, hogy a *prt<sup>gs</sup>* mutánsokban, egy eddig még ismeretlen mechanizmus révén, a szabályozatlan Btk kináz aktivitás a rövid Osk kihorgonyzását módosítja, amely megnyilvánul mind a két rövid Osk izoforma delokalizációjában és degradációjában. Mivel csak a foszforilált rövid Osk izoformát tudtuk kimutatni a *prt<sup>gs</sup>* mutánsban, feltételezzük, hogy ez az izoforma stabilabb, vagy ennek az izoformának a poszterior póluson történő kihorgonyzódása erősebb.

Modellünk szerint *prt<sup>gs</sup>* mutánsokban a poszterior pólushoz nem megfelelően kötött Osk fehérje a petesejtben és az embrióban is jelenlévő citoplazmatikus áramlás révén elsodródik és lebomlik. Így a *prt<sup>gs</sup>* mutánsokban a poszterior póluson maradt kevesebb Osk fehérje kevesebb poláris plazma kialakítására képes, ami utódokban ivarsejthiányos fenotípusban nyilvánul meg.

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

## Függelék

#### Az osk mRNS lokalizációjában szerepet játszó gének

Az alábbiakban szeretném ismertetni az *osk* mRNS lokalizációjában szerepet játszó eddig azonosított géneket, azok kapcsolatát egymással és a szállításban részt vevő aktin és mikrotubuláris halózattal, illetve bemutatni a petesejt és az azt körülvevő follikuláris sejtek közötti információ kulcsszereplőit (18. ábra).

Az anyai hatású mRNS-k lokalizációjában mind az aktinhálózat, mind a mikrotubuláris hálózat részt vesz, mind az oogenezis, mind az embriogenezis során. A mikrofilamentumok ugyanakkor nem játszanak szerepet ebben a transzportban, lokalizációban.

A *bicaudal-C*, *fs*(1) *K10*, és *orb* mRNS-k érzékenyek a mikrotubuláris hálózat szétesését előidéző drogokra (kolhicin), ezzel szemben vannak amelyek csak részleges lokalizációs hibát mutatnak, ilyen a b*icoid* mRNS, míg az *osk* mRNS szinte rezisztensnek mondható. Különbözően reagálnak a mikrotubulus stabilizáló drogokra is (taxol). Mindezek azt sugallják, hogy a mikrotubuláris hálózaton kívül egyéb faktorok is szerepet játszanak ebben a folyamatban (Pokrywka és Stephenson, 1995). Az aktin citoszkeletonon belül az aktin és tubulin részek közötti kapcsolat fontos ehhez a folyamatboz.

A *chicakadee* lókusz által kódolt **Profilin**, mely az aktin sejtváz része, fizikailag is kölcsönhatásba lép lép a Capuccino fehérjével, mely viszont a mikrotubulus sejtváz része.



**18. ábra**. Az ivarsejt és a testi sejtek közötti kapcsolatok, az *osk* szabályozásában részt vevő és a poláris plazma kialakulásához szükséges gének hierarhiája.

A *chicakadee* és *capuccino* mutánsok petekezdeményeiben a Staufen fehérje és az *osk* mRNS sem lokalizálódik normálisan (Manseau *és mtsai.*, 1996).

Egy P-elem mutagenezis eredményeképpen 9 allélját izolálták az aktinkötő fehérjét kódoló *tropomiozin II* génnek, melyek az *osk* mRNS poszterior lokalizációjában voltak hibásak. Ez újabb példa az aktin sejtváz RNS lokalizációban betöltött szerepére (Erdelyi *és mtsai.*, 1995)

A **Swallow** fehérje az RNS lokalizációs folyamat egy tagja. A *bicoid*, a *Hu-li tai shao* (hts) és az *osk* mRNS hibásan lokalizálódik a *swallow* mutáns petesejtekben. Úgy gondolják, hogy a *swallow* egy általános, a sejtváz szervezésében és szabályozásában szerepet játszó komponens (Pokrywka *és mtsai.*, 2000).

A mikrotubuláris hálózat és rajta keresztül annak a pozitív végéhez kapcsolódó mikrotubulus motormolekula a **kinezinI** (KHC) is szükséges az *osk* mRNS és az azzal kapcsolódó Staufen fehérje poszterior póluson történő lokalizációjához. Az ivarvonal klónokban végzett vizsgálatok alapján megállapítható, hogy a kinezinI hiányában a ősivarsejtek osztódása és az oogenezis is megtörténik, viszont az embriógenezisig már nem érnek el a homozigóta klónok, legtöbbször csak a blasztoderma stádiumig jutnak el, sőt az embrionális ivarsejtek is hiányoznak. Ez a fenotípus egy korábbi folyamat hibájára hívja fel a figyelmet, nevezetesen az *osk* lokalizációjára. Megvizsgálták az *osk* és a *bicoid* morfogén mRNS-k eloszlását az oogenezis során és azt tapasztalták, hogy míg a *bicoid* mRNS teljesen normálisan lokalizálódik az *osk* mRNS a dajkasejtekből való megérkezés után normálisan az anterior póluson halmozódik fel, majd a 8-10. stádium között a normális poszterior lokalizáció helyett az anterior lokalizációjú marad. Ez a lokalizáció

hiba teljesen menekíthető a vad típusú *kinezinI* cDNS-t tartalmazó transzgénnel (Clark *és mtsai.*, 1994). Felvetődőtt az a lehetőség, hogy az *osk* lokalizációs hibáért nem közvetlenül a KinezinI hiánya a felelős, hanem a mikrotubuláris rendszer felbomlásával ez csupán egy korábbi hibás folyamat következménye. Ha csupán a mikrotubuláris rendszer felbomlásáról lenne szó, akkor az *osk* mRNS-en kívül többek között a petesejt magja sem tudna az anterior-dorzális sarokba vándorolni, mint ahogy ezt mikrotubulus rendszert felbontó drogok alkalmazása során láthatjuk. A *kinezinI* mutánsokban a petesejt magja a megfelelő helyen van és a körülötte felhalmozódó fehérjék elhelyezkedése is normális. Ezenkívül a mikrotubuláris rendszer szervező központ (MTOC) Centrosomin fehérje komponense is normálisan lokalizálódik az anterior részen.

A mikortubuláris hálózatot egy olyan hibrid fehérjével vizsgálták, amely tartalmazta a motor részét a KHC fehérjének valamint a beta-galaktozidáz riporter fehérjét (Clark *és mtsai.*, 1994). A transzgenikus vonalban a mikrotubulusok pozitív végéhez lokalizálódott a fúziós fehérje, viszont nem menekítette mutáns háttéren a KHC fenotípust. Vad típusú 9-10. stádiumú petesejtekben a KHC-béta-Gal a poszterior póluson lokalizálódik. A KHC null petesejtekben a KHC-beta-Gal a legtöbb esetben a poszterior póluson koncentrálódik, jelezve ezzel, hogy 9-10. stádiumban a mikrotubulusok pozitív vége a poszterior póluson halmozódik fel. Ez a megfigyelés, valamint a normális anterior strukturák azt erősítik, hogy a mutáns petesejtekben tapasztalt hibás *osk* mRNS lokalizáció nem a mikortubuláris rendszer hibás szerveződésének következménye. A KHC mutánsokban a Staufen fehérje esetében az *osk* mRNS-hez hasonló hibás lokalizációt tapasztaltak, ami nem meglepő, ha figyelembe vesszük, hogy a Staufen közvetlenül kötődik a *osk* mRNS-hez. Összegzésként elmondható, hogy a

mikrotubulusok pozitív végéhez kapcsolódó motormolekula szükséges mind az *osk* mRNS, mind a Staufen fehérje poszterior lokalizációjához (Clark *és mtsai.*, 1994; Brendza *és mtsai.*, 2000).

A fejlődő petefészekben egy ciszta 16 sejtet tartalmaz, amelyek a mikrotubuláris hálózat alkotórészeivel, citoplazmatikus hidakkal vannak összekötve. Ezen sejtekből egy alakul petesejtté és 15 dajkasejt marad. Röviddel a 16 sejt kialakulása után a szincíciumban megalakul a MTOC és ezzel egyidőben eldől az is, hogy melyik sejt lesz a petesejt, amely mikrotubulusokkal összeköttetésben áll a környező dajkasejtekkel. A recesszív mutációt hordozó *bicaudal-D* és *egalitarian* vonalakban a petesejt kialakulása gátolt, nem alakul ki a polarizált mikrotubuláris hálózat és nem halmozódik fel az osk mRNS a petesejtben. A BicD domináns mutánsok vizsgálatával nézték, hogy az egalitarian és a bicaudal-D közvetlenül hat e az osk mRNS lokalizációra. A vad típusú egl dózisát csökkentve mérséklődött az ektopikus anterior lokalizációja az osk mRNS mennyisége, míg a vad típusú egl dózisának növelése fokozta az osk mRNS hibás lokalizációját az anterior póluson. Mivel a BicD domináns hatása függ az egl vad típusú funkciójától, ez a két fehérje azonos útban játszik szerepet, a két fehérje összehangoltan szabályozza az osk mRNS lokalizációját. Megjegyzendő, hogy az egl és BicD mutáns vonalakban a gurken mRNS mennyisége is csökkent, így a dorzális-ventrális polaritásban is szerepe van ennek a két fehérjének (Mach és Lehmann, 1997).

A *capulet* gént, amely egy ciklázhoz kapcsolt fehérjét kódol, egy mozaik analízises kísérletben azonosították, az aktin hálózat zavarát tapasztalva az ivarvonal klónokban (Baum *és mtsai.*, 2000). Kimutatták, hogy a Cap fehérje az aktin polimerizációt, az aktin monomerek szétválását gátolja *in vitro* és *in vivo* körülmények

között. A Cap fehérje elősorban a petesejtben halmozódik fel, ahol az F-aktin szintjét szabályozni kell. A fehérje aktinkötő képességét a fehérje C-terminális régiója szabályozza. Azonosítottak a **Protein kinázA** (*pka*) katalítikus régiójában egy mutációt, amely a dajkasejtek kortikális aktinjának felbomlását és ektopikus lokalizációját eredményezte. A Cap-Pka kettős mutánsokban az aktinhiba drasztikusan megnő, azaz a pka ezen fenotípusa érzékeny a Cap fehérje mennyiségére. Feltételezhető, hogy a két fehérje funkcionális együttműködése szükséges az aktinhálózat normális szervezéséhez. A cap homozigóta mutáns ivarvonal klónokban mind az osk, mind a bicoid mRNS lokalizációja megváltozik. Az osk mRNS a 8-10. stádiumú Cap homozigóta ivarvonal klónok 76%-ban hibásan lokalizálódik, vagyis az anterior lokalizációtól a laterális irányba történő elmozdulásig többféle fenotípus is megfigyelhető. Ugyanakkor a bicoid mRNS az esetek 65%-ban abnormális, főként az RNS poszterior lokalizációja figyelhető meg. A *cap* mutáns klónokban az RNS-k nem képesek a petekezdemény polaritásának megfelelő helyre lokalizálódni, illetve megfelelő erősséggel kapcsolódni a kéreghez. Megállapítható, hogy az evolúciósan konzervált Cap fehérjének fontos szerepe van az aktinhálózat helyes szerveződésében és ezen keresztül a lokalizált RNS-k szabályozásában (Baum és mtsai., 2000).

A *pka*-t mutáns vonalakban mind a mikrotubuláris hálózat, mind az RNS lokalizáció hibás (Lane és Kalderon, 1994). Míg a normális petekezdeményekben a 7-8. stádium környékén a mikrotubuláris hálózat irányultsága megváltozik (negatív anterior, pozitív poszterior) az *osk*, majd a *bicoid* mRNS-k lokalizálódnak, addig a *pka* mutánsokban nem alakul ki az új MTOC (mikortubuláris szervező központ). Az *osk* mRNS nem lokalizálódik a poszterior póluson, a *bicoid* mRNS viszont mindkét póluson

megtalálható. Hasonló RNS lokalizációs hibákat figyeltek meg a Notch és Delta mutánsokban (Ruohola-Baker *és mtsai*., 1994), valószínűsítve ezzel, hogy a PKA egy szignált közvetít a poszterior follikuláris sejtekből, melynek hatására a mikrotubuláris hálózat újraszerveződik, a pozitív végével a poszterior pólus felé fordul (Lane és Kalderon, 1994).

Ismert, hogy a Drosophila **Staufen**, RNS-kötő fehérje szükséges az *osk* mRNS poszterior és a *bicoid* mRNS anterior valamint az osztódó idegsejtekben a *prospero* mRNS bazális lokalizációjához. Az öt dsRBD, RNS kötő domén és a prolin gazdag régió, melyek esszenciálisak a fehérje mRNS kötő funkciójában és a Stau-mRNS komplex lokalizációjában szerepet játszó faktorok megkötésében, evolúcionárisan konzerváltak. A dsRBD2 doméntől megfosztott, módosított Staufen fehérje képes az *osk* mRNS-sel kapcsolódni, és aktiválni a transzlációját, de az osk RNS nem lokalizálódik a poszterior pólusra. A Staufen fehérje dsRBD5 doménjének hiányában az *osk* mRNS normálisan lokalizálódik, de nem indul be annak transzlációja. Így a dsRBD2 a mikrotubulus függő lokalizációjához, míg dsRBD5 a lokalizált *osk* mRNS transzlációjának derepressziójához szükséges (Micklem *és mtsai.*, 2000).

A kettős szálú RNS kötő domén (dsRBD) egy általános RNS kötő motívum, amely számos, az RNS érésben vagy lokalizációban résztvevő fehérjében megtalálható. Ennek a doménnek az RNS-kötő képességét vizsgálták a dsRBD3 domén in vitro mutagenezisével. A mutáns domént tartalmazó konstrukcióval transzformáns törzset készítettek. Ez a domén optimálisan az RNS stem-loop régiójához kapcsolódik. Azonosították azt a 12 aminosavat, amely ebben a kapcsolatban vesz részt.

Megállapították, hogy a dsRBD3-nak az RNS kötő aktivítása szükséges a Staufen függő *osk* és *bic* mRNS lokalizációhoz (Ramos *és mtsai.*, 2000).

A *barentsz* mutánsokban teljes egészében blokkolt az *osk* mRNS poszterior lokalizációja, míg a *bicoid* és a *gurken* mRNS-k lokalizációja, a mikrotubuláris hálózat és a poláris plazma összeszerveződésének a későbbi lépései normálisak és a mutáns embriók nagy részének normálisan fejlődik a potroha. A Barentsz fehérje kolokalizálódik a poszterior póluson az osk mRNS-sel és a Staufen fehérjével is egyidőben, bár az oogenezis késői stádiumaiban az osk mRNS-sel való lokalizáció megszűnik, nem úgy mint a Staufen esetében, ahol ez mindvégig megmarad. Az osk mRNS, a Staufen fehérje és a Barentsz is anterior felhalmozódást mutat a *TmII* és a kinezin nehéz lánc mutánsok oocitáiban. Ezek alapján úgy tűnik, hogy a Barentsz kolokalizálódik az osk mRNS-sel annak transzportja előtt és transzportja alatt. Úgy tűnik, hogy a Staufen szükséges a Barentsz-osk mRNS kapcsolat kialakításához, vagy a kapcsolat stabilizálásához (van Eeden és mtsai., 2001). A Barentsz biokémiai funkcióját nehéz megállapítani, mivel a szekvenciája nem tartalmaz egyetlen ismert fehérje motívumot sem. A mutánsban tapasztalt osk mRNS lokalizációs hiba hasonlít a khc mutánsokban tapasztalthoz, sőt a *khc* mutánsokban blokkolt a Barentsz poszterior lokalizációja, amely az *osk* mRNS-sel együtt az anterior oldalon marad. Mivel a KinezinI egy plusz vég irányított mikrotubulus motorfehérje, egyszerű magyarázat az osk mRNS lokalizációjában játszott szerepére, hogy tulajdonképpen ez szállítja az osk mRNS-t a mikrotubulusok plusz végéhez a poszterior póluson (Brendza és mtsai., 2000). Ha ez valóban így történik, akkor a mutáns fenotípus és a Barentsz lokalizációja arra enged következtetni, hogy az valahol a osk mRNS és a KinezinI között hat. Például, a Barentsznek szerepe lehet az osk mRNS kinezinhez való kapcsolásában vagy a motor aktivációjában, még a komplexxel való kapcsolódás előtt. Közvetlen kapcsolatot nem tudtak kimutatni a Barentsz fehérje és a KinezinI között ovárium extraktumban, bár ez magyarázható azzal is, hogy az összes Barentsz fehérjének csak egy része lokalizálódik az osk mRNS-sel, ez is csak a 9-10. stádiumra korlátozódik, ami csak kis része a fejlődő petesejteknek, így ez a kimutathatósági határon van. Ezen következtetések nagy része a Mago nashi-ra is elmondható, amely mutánsaiban nagyon hasonló osk mRNS hiba figyelhető meg. Hasonlóan a Barentszhez, a Mago nashi fehérje is perinukleáris lokalizációjú a dajkasejtekben és átmenetileg lokalizálódik csak a poszterior pólushoz a 9-10. stádiumban (a dajkasejtek magjában a karioszómához kötődve is található Mago fehérje) (Newmark és mtsai., 1997). A Mago és a Barentsz fehérje kölcsönösen szükségesek egymás poszterior lokalizációjához, hiszen a Mago lokalizációja hibás a barentsz mutánsokban és fordítva ugyanígy. Mivel a mago mutánsokban a Barentsz perinukleáris lokalizációja a dajkasejtekben megszűnik, lehetséges, hogy a Mago szükséges a funkcióképes Barentsz fehérjéhez és ez a két fehérje ugyanannak a komplexnek a tagja már a petesejtbe szállítódást megelőzően, bár erre még nincsenek biokémiai bizonyítékok. Az a tény, hogy a Barentsz fehérje a dajkasejtek nukleáris membránjával lokalizálódik, a Mago főleg nukleáris, de a membránon is megtalálható és hogy az osk mRNS a dajkasejtek magjában expresszálódik, felveti annak a lehetőségét, hogy a Mago kötődik a magban az osk mRNS-sel, majd a Barentsz akkor kapcsolódik a komplexhez, amikor az a citoplazmába szállítódik. Ezzel összevág az is, hogy az emberi homológja a Mago-nak interakcióba lép egy magi citoplazmatikus szállító fehérjével, az RBM8/Y14gyel, ami az érett mRNS-khez kapcsolódik, majd kapcsolatban marad azokkal a citoplazmába szállítódás után is.

Az RNS kötő **Tsunagi** fehérje kolokalizálódik a Mago nashi fehérjével és immunoprecipitációs kísérletekben is azonos komplex tagjaiként mutatták ki őket (Mohr *és mtsai.*, 2001). A *tsunagi* mutáns petekezdeményekben a petesejt magja nem tud elvándorolni az anterior-dorzális sarokba, az *osk* mRNS nem lokalizálódik a poszterior pólusra és dorzális-ventrális hibák is megfigyelhetők. Ezek alapján úgy gondolják, hogy azonos komplex tagjaiként együttesen szükségesek az *osk* mRNS megfelelő loklizációjához..

Mind az emberben, mind a Drosophilában, a **Y14** nukleáris fehérje interakcióba lép a Mago-nashi fehérjével. Immunhisztokémiai eredmények alapján a Y14 elsősorban nukleáris, de az *osk* mRNS-el együtt lokalizálódik a poszterior póluson. Az Y14 mutáns petesejtekben az *osk* mRNS lokalizációja hibás, de az aktin váz érintetlen és mind a *gurken*, mind a *bicoid* mRNS lokalizációja normális. A Y14 funkciójára vonatkozólag csak feltételezések vannak, az ember homológ analógiájára hivatkozva. Az emberben a Y14 az RNS splicing-ban játszik szerepet és ha *Drosophila*-ban is ez a funkciója, akkor elképzelhető, hogy az *osk* mRNS splicing-jában játszhat szerepet. Az Y14 mutánsokban valószínűleg nem képződik megfelelő mRNS, amely gátolja a szállító és/vagy rögzítő komplex összeszerveződését (Hachet és Ephrussi, 2001).

Sokáig az **Exuperantia** fehérjét a *bicoid* mRNS lokalizációjához szükséges faktornak tartották (Wang és Hazelrigg, 1994). Az Exu mind az anterior, mind a poszterior póluson felhalmozódik az oocitában. Az *osk* mRNS poszterior pólusra szállítása előtt, az *osk* mRNS és a *bic* mRNS időlegesen együtt lokalizálódik az anterior

póluson. Az exu null mutánsokban mind a dajkasejtekben, mind a petesejtben hibás az osk és a bicoid mRNS lokalizációja és ezek apikális felhalmozódása figyelhető meg dajkasejtekben. Ezek az eredmények alátámasztják azt a lehetőséget, hogy ez a két mRNS szállítása együtt történik (Wang és Hazelrigg, 1994). Később leírták, hogy csökkent mennyiségű osk mRNS lokalizálódik már az exu mutáns oociták poszterior pólusán, bár ennek penetranciája nem teljes. Az exu mutánsokban a poszterior hiba összekapcsolódik az osk mRNS lokalizációjának csökkenésével a 9-10. stádiumban, amely viszont részben orvosolható a beinduló citoplazmatikus áramlás révén odasodródott osk mRNS poszterior lokalizációjával. Ennek a feltételezésnek az alátámasztását szolgálja a fluoreszcensen jelölt osk mRNS injektálása a petesejtekbe, amely a citoplazmatikus áramlás beindulásával képes volt a poszterior pólusra szállítódni és ott kihorgonyozódni (Glotzer és mtsai., 1997). Az osk mRNS lokalizációjának összetett mechanizmusa indokolja azt a tényt, hogy az exu mutánsok nem mutatnak kimondott poszterior fenotípust.

Az Exu fehérjét egy nagy RN-áz érzékeny komplex fő komponenseként azonosították, amely még legalább másik hét fehérjét és különböző RNS-ket tartalmaz (Wilhelm *és mtsai.*, 2000). Az egyik tagja egy RNS kötő fehérje, a **Ypsilon Schachtel** (Yps), amely közvetlenül kapcsolódik az Exu-hoz és együtt lokalizálódik vele mind a dajkasejtekben, mind az oocitában. Meglepődve tapasztalták, hogy ez a komplex az *osk* mRNS-t is tartalmazza, sőt az Exu/Yps partikulumok térbeli és időbeli eloszlása megegyezik az *osk* mRNS eloszlásával (Wilhelm *és mtsai.*, 2000). Felmerült a kérdés, hogy mi lehet a szerepe a Yps-nek ebben a komplexben. A Yps egy olyan RNS kötő fehérjecsalád tagja, amely fehérjék a transzláció szabályozásában, illetve az mRNS-kel

kötődve másodlagos szerkezet kialakításában vesznek részt a Xenopus petesejtjében. Elképzelhető, hogy a Yps-nek hasonló szerepe van Drosophilában is, hiszen ismeretes, hogy az osk mRNS transzlációsan represszált állapotban van mindaddig, amíg a poszterior póluson nem lokalizálódik. A Yps-nek ugyanakkor Exu független funkciója is van, hiszen a yps széles körben expresszálódik, míg az exu csak az ivarvonalban. Elképzelhető, hogy a Yps egy RNS lokalizációs mechanizmus tagja, az ivarvonalon kívül is, hasonlóan a Staufenhez, egy RNS kötő fehérjéhez, ami mind az ivarvonalban, mind testi sejtekben az mRNS lokalizációban vesz részt. A transzlációs szabályozásban betöltött szerepére már kísérletes biznyítékok is rendelkezésre állnak (Mansfield és *mtsai.*, 2002). A yps genetikai interakciót mutat az orb-al, ami egy pozitív regulátor az osk mRNS lokalizációjában és transzlációjában. A yps null allél menekíti az orb-bal kapcsolatos *osk* mRNS lokalizációs és transzlációs hibát az orb<sup>mel</sup> hipomorf háttéren, ahol van egy kevés funkcionális Orb fehérje. Az erős vagy null orb allélok nem menekítik a yps mutációt. A yps, orb kettős mutánsokban a yps menekíti az orb osk mRNS lokalizációs és transzlációs hibáját, míg az *orb* mutációval kapcsolatos fenotípusok nem változnak, megmarad a dorso-ventrális korionhiba és a grk mRNS lokalizációs hibája is. Valószínűleg a *yps* antagonisztikus szerepet játszik az *orb*-bal. Biokémiailag azt is bizonyították, hogy az Orb képes fizikailag kapcsolódni mind a Yps, mind az Exu fehérjéhez. Ezen modell szerint a Yps és az Orb egymással kompetícióban vannak az osk mRNS-hez való kötődésben (Mansfield és mtsai., 2002).

A *lar* mutánsok szervezetlen elrendeződésű follikuláris sejtekkel, leállt petekamra növekedéssel és hiányzó *osk* mRNS lokalizációval lettek azonosítva. A mutánsokban elmarad a poszterior follikuláris sejtek kialakulása, mely együtt jár a follikuláris sejtek

aktin sejtvázának hibájával. A Lar fehérje a Laminin-nidogen komplex tagjaként lett azonosítva, feltehetőleg szerepet játszik a LamininA receptor útban, bár eddig még nem ismert a módja, hogy pontosan miként kapcsolódik az extracelluláris mátrix, a LamininA és a Lar fehérje, illetve hogyan közvetítenek a petesejt felé (Frydman és Spradling, 2001).

Az **Ovarian tumor** (**OTU**) fehérje szükséges a *pumilio* és az *osk* mRNS helyes eloszlásához, de a *bic-D*, *k10* és a *staufen* mRNS-k vad típusnak megfelelően lokalizálódnak az *otu* mutáns vonalakban. Az Otu fehérje C-terminális része homológiát muata egy emlős mikrotubulus asszociált fehérjével. Ennek a fehérje résznek az elrontása megnövelte az RNS lokalizációs hibákat az *otu* mutánsokban (Tirronen *és mtsai.*, 1995).

Egy újabb tagja az evolúcionárisan konzervált fehérjének és funkciónak a **Par-1** fehérje. A Par-1 fehérje kináz aktivitása a poszterior ivarvonal determinánsok lokalizálásához szükséges mind *C. elegansban*, mind *Drosophilaban*. A Par-1 korai funkciója a petesejt azonosságának és az anterior-poszterior tengely kialakításában van. A Par1 fehérje fűzomához kapcsolódva megteremti annak lehetőségét, hogy aszimetrikusan kiválasztódjon a leendő petesejt (Cox *és mtsai.*, 2001; Huynh *és mtsai.*, 2001b). A késői polarizációhoz szintén szükséges a Par-1 fehérje aktivitása, hiszen hiányában hibásan lokalizálódik az *osk* mRNS és a hozzá kapcsolódó Staufen fehérje, amelynek különböző erősségű poszterior fenotípust eredményez (Tomancak *és mtsai.*, 2000). Érdekes kérdés, hogy vajon a korai és a késői funkció egymással összefügghet-e és ha igen, akkor csupán a korai funkció következménye lenne a 9. stádiumban tapasztalható *osk* mRNS loaklizáció hiba? Ez a lehetőség nem tűnik valószínűnek, mivel a 7. stádium alatt az összes eddig ismert polaritási faktor lokalizációja megváltozik, a korai polaritási viszonyok felbomlanak és a poszterior follikuláris sejtek felől érkező jel hatására indul meg az új polaritási központ kialakulása. Ezt erősíti, hogy a legtöbb hipomorf *par-1* mutáns petesejtekben az Orb fehérje anterior-poszterior mozgása megtörténik és a poszterior lokalizációja szintén. Továbbá a *osk* mRNS lokalizációs hibája menekíthető a *par-1* transzgénnel, amely csak azután fejeződik ki, hogy a ciszta elhagyta a germáriumot. Sokkal valószínűbb tehát, hogy a Par-1 fehérjének az oogenezis két különböző stádiumában is szerepe van az anterior-poszterior polarizáció kialakításában (Huynh *és mtsai.*, 2001b) A par 1 fehérjéről azt is bebizonyították, hogy mind *in vitro*, mind *in vivo* képes foszforilálni az Osk fehérjét. Azt is bizonyították kísérletesen, hogy ez a foszforiláció megnöveli a foszforilált Osk fehérje stabilitását (Riechmann *és mtsai.*, 2002).

A *rab11* gén egy kis monomer GTP fehérjét kódol, amely szerepet játszik számos vezikuláris transzport folyamatban, de az *osk* mRNS lokalizációjához is szükséges. A *rab11* mutánsokat az *osk* és *tropomiozinII* mutációkat hordozó alacsony penetranciájú poszterior vagy ivarsejthiányos fenotípust mutató alaptörzs EMS mutagenizált vonalaiból szelektálták az alaptörzs fenotípus penetranciájának szignifikáns emelkedése alapján. A *rab11* mutáns petesejtekben az *osk* lokalizációs hiba mellett mikrotubulus váz hiba is megfigyelhető. Ezen eredmények alapján feltételezhető, hogy a belső membrán strukturák fontos szerepet játszanak a mikrotubuláris hálózat megszervezésében, ezen keresztül az *osk* mRNS lokalizációjában (Jankovics *és mtsai.*, 2001).

A *ter94* mutáns petesejtekben az *osk* mRNS nem lokalizálódik a poszterior póluson és az endoplazmatikus retikulumok is abnormálisak. A Ter94 membrán fúziós fehérje szerepet játszik az endoplazmatikus retikulumok homotipikus fúziójában a mitózis alatt. A Ter94 fehérje a dajkasejtekből már bejutott *osk* mRNS lokalizációjához

kell a petesejtben. A szerzők felvetették a gondolatot, hogy esetleg az *osk* mRNS membránba csomagolt partikulomokként szállítodhat. (Ruden *és mtsai.*, 2000).

*Licorne* gén egy Map kináz fehérjét kódol. A *licorne* mutáns embriókban az anyai hatású poszterior gének (osk, vasa, nanos) mutánsaira jellemző szegmentációs hibák figyelhetők meg. Az embrionális ivarsejtek száma csökken, és egyidejűleg a Vasa fehérje poszterior lokalizációja is csökken. Megállapították, hogy a Vasa lokalizációját megelőző osk mRNS lokalizációja is csak a 8. stádiumig normális. A későbbi stádiumokban az osk mRNS szétterjed a poszterior pólusról az anterior pólus felé, mennyisége folyamatosan csökken. Ilyen fenotípus az osk mis-sense mutánsokban figyelhető meg, azt sugallva, hogy az Osk fehérje szükséges az RNS későbbi lokalizációjához. A licorne mutáns petekezdeményekben a sejtmag vándorlása normális, sőt a mikrotubulusok pozitív végét jelölő kinezin-lacZ lokalizációja is normális. Ellenanyagos festéssel a mutáns petekamrákban nem tudtak fehérje csökkenést kimutatni, ezért úgy gondolják, hogy az RNS lokalizáció és a osk transzláció egymástól elválasztható folyamat (Suzanne és mtsai., 1999). Ez a hipotézis ellentmondásos, hiszen ha jelentős mértékben redukálódik a lokalizált RNS, akkor a fehérje szintjén is meg kellene ennek nyilvánulnia, függetlenül attól, hogy a két folyamat hogyan viszonyul egymáshoz.

#### Az oskar mRNS transzlációjában szerepet játszó gének

Az *osk* mRNS lokalizációját szabályozó géntermékek és a transzláció gátlásában szerepet játszó fehérjék is az *osk* mRNS 3'UTR szekvenciájához kapcsolódnak. A **Bruno** az *arrest* gén által kódolt RNS-kötő fehérje, amely a petesejtben együtt lokalizálódik az *osk* mRNS-el.. A Bruno fehérje az *osk* mRNS 3'UTR szekvencia (BREs) három

szakaszához kötődik. Mutáns BRE szekvenciákat hordozó *osk* transzgén, *osk* mutáns háttéren idő előtti *osk* transzlációt eredményezett (Kim-Ha *és mtsai.*, 1995). Ha az *exuperantia* 3'UTR szekvenciákhoz BRE szekvenciákat kapcsoltak, akkor az *exuperantia* transzláció represszióját tapasztalták.

Az **Apontic** fehérje kapcsolódik a Brunoval, amit mind élesztő kettős hibrid rendszerben, mind biokémiailag bizonyítottak. A transzheterozigóta kombinációja az *arrest* és az *apontic* mutáncióknak az embrióban az anterior, feji struktúrák hibáját mutatják. Ez a fenotípus szupresszálható a *nanos* géntermék csökkentésével, azt sugallva, hogy az ektopikus Osk fehérje okozta a fenotípust. Így hasonló szerepe lehet az Aponticnak az *osk* transzlációs szabályozásában, mint a Brunonak (Lie és Macdonald, 1999).

A **p50** fehérje *osk* mRNS-nek mind a 3' UTR régiójához, mind az 5' végéhez kapcsolódik. A p50 kötés gyengítése elősegíti a Bruno kötést (Gunkel *és mtsai.*, 1998). Sajnos mutációt még nem azonosítottak a *p50* génben, de előállítottak egy olyan transzgént amelyben a p50 kötés nagyon gyenge volt és ebben a transzgenikus vonalban idő előtti *osk* transzlációt tapasztaltak, amelyből a Brunohoz hasonló funkciót gondolnak a p50-nek is, nevezetesen a represszált állapot fenntartását.

A **Bic-C** egy *in vitro* RNS kötésre képes fehérje. A *bic-C* heterozigóta nőstények embriói között bicaudal fenotípusú is előfordul, ami egy ektopikus, anterior Osk aktivitásra utal. A homozigóta *bic-C* mutáns petékben az *osk* mRNS nem lokalizálódik a poszterior pólusra, korábban transzlálódik, mint a vad típusban. Ezek alapján úgy tűnik a Bic-C-nek szintén az *osk* mRNS transzlációjának gátlásában van szerepe (Saffman *és mtsai.*, 1998). A **Staufen** fehérje az *osk* mRNS poszterior lokalizálásához és a transzlációjához egyaránt szükséges. A Staufen fehérje kettős szálú RNS kötő doménjei közül a 2-es az *osk* mRNS lokalizálásához szükséges, míg az 5-öst az *osk* mRNS transzlációs gátlásának feloldásához. A Staufen szerepét nem könnyű tisztázni, hiszen az RNS lokalizáció hiányában a transzláció sem valósulhat meg. Különböző *in vitro* mutáltatott transzgének segítségével tudták a domének funkcióját megállapítani. Az 5-ös domén kiütésével hasonló *osk* transzlációs hibát tapasztaltak, mint *osk* mRNS derepresszorok elrontásával (Micklem *és mtsai.*, 2000).

Az **Orb** fehérjéről bebizonyították, hogy az Exu-RNP komplex tagjaként közvetlenül kötődik az *osk* mRNS-hez (Mansfield *és mtsai.*, 2002). Az *orb* mutánsokban az *osk* mRNS nem lokalizálódik a petesejt poszterior pólusán és *osk* mRNS transzlációja is hibás. Az Orb fehérje nagy homológiát mutat a Xenopus citoplazmatikus poliadenilációs fehérjével, így elképzelhető, hogy az Orb fehérje *osk* mRNS transzlációját is poliadeniláción keresztül aktiválja (Chang *és mtsai.*, 1999).

Az Aubergine fehérje mindkét Osk izoforma felhalmozódásához szükséges, hiányában az *osk* mRNS nem képes a poszterior pólusra lokalizálódni, és ezért kevés Osk fehérje képződik. Ha az *osk* mRNS 3'UTR szekvenciáját a *bicoid* mRNS 3'UTR szekvenciájával helyettesítették, akkor az anterior részen kifejeződő *osk* mRNS az *aub* mutánsokban is lefordítódik és a fehérje az anterior póluson lokalizálódik. Ezért valószínű, hogy az Aub fehérje nem az Osk fehérje stabilitásához, hanem a transzláció aktivációjához szükséges az endogén *osk* mRNS 3'UTR szekvencia jelenlétében (Wilson *és mtsai.*, 1996). Az Aubergine fehérje az embrionális ivarsejtekben halmozódik fel, ahol

kapcsolódik a transzlációs inciációs faktor 2C (TIF2C) fehérjével és az *osk* mRNS transzlációját segíti (Harris és Macdonald, 2001).

A **Me31B** DEAD-box fehérje tagja az Exu-t, a Yps-t és az Orb-t, sőt az *osk* mRNS-t is tartalmazó citoplazmatikus RNP komplexnek (Nakamura *és mtsai.*, 2001). Az oogenezis alatt a fenti fehérjék és a Me31B fehérje együtt lokalizálódik a fejlődő petekezdeményekben, sőt a Me31B fehérje a *bic*, *nos*, *orb*, *pgc* és a *gcl* RNS-kkel is együtt lokalizálódik. A *me31B* mutáns petekezdeményekben a lokalizált RNS-k (*osk*, *bicaudal-D*) idő előtti transzlációja figyelhető meg már a dajkasejtekben. Az eredmények alapján úgy gondolják, hogy a Me31B fehérje korai RNS transzláció visszaszorításában játszik szerepet az RNS-k szállítása során. Mivel egy RNP komplexben található mind az *osk* mRNS, mind a Me31B fehérje, így az a modell is újabb bizonyítékot nyert, hogy az RNS szállítás és transzlációs szabályozás összekapcsolódik, a szabályozó fehérjék és a szabályozott RNS-k együtt utaznak (Nakamura *és mtsai.*, 2001).

### Summary

The embryonic polarity of many organisms is defined by maternally provided determinants that are localised in the oocyte during egg development. Localisation and the subsequent site-specific translation of mRNAs provides one of the mechanisms that restrict the biological functions of determinants to specific cytoplasmic regions within the oocytes. This type of regulation has been studied most extensively in *Drosophila melanogaster*, since the antero-posterior and the dorso-ventral embryonic body axes, and germ line differentiation is governed by maternally provided localised determinants. In many organisms the germ-cell determinants, germ plasm, are localised to an identifiable part of the cytoplasm of the developing embryo (Beams and Kessel, 1974; Eddy, 1975).

The assembly of the germ plasm is interconnected with processes required for forming the anterior-posterior axis of the oocyte and for localising RNAs to specific place during oogenesis. Germ plasm contains all of the components required to determinant the germ cell fate. As a first step of germ cell formation a small subset of syncytial nuclei migrate into the germ plasm and the arriving nuclei are directed into a germ cell fate by molecules stored in the posterior cytoplasm as a collection of mitochondria, fibrils, and electrodense polar granules (Mahowald, 1962). This induce the formation of the pole cells, which are restricted to germline fate in the posterior end of the blastula *Drosophila* embryo (Hay *et al.*, 1988; Lasko and Ashburner, 1990). The pole cells undergo a patterned migration to the embryonic gonad during the later gastrulation.

Embryonic germ cell formation and abdomen development in *Drosophila* requires localisation and site specific translation of *oskar* (*osk*) mRNA in the posterior part of the oocyte. Targeting of *osk* 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. Posteriorly anchored Osk protein is a key component of the germ plasm and subsequent embryonic germ cell formation. Although, the anchoring process is an important aspect of *osk* regulation very little is known about its mechanism. Genetic analysis of the anchoring mechanism is especially difficult, since Osk anchoring is interdependent both on the presence of the mRNA and the protein at the posterior region (Markussen *et al.*, 1995). Therefore, mutations of regulatory genes that interfere with Osk protein localisation often also result in mRNA delocalisation, making it impossible to separate these two processes. An example of the above is provided by the *TmII* mutation, which abolishes the localisation of both *osk* mRNA and protein (Erdelyi *et al.*, 1995; Tetzlaff *et al.*, 1996). Therefore, the actin binding TmII protein and the actin cytoskeleton may be directly connected, not only to the mRNA but also the Osk protein, at the posterior pole.

Thus, by making use of the germ cell-less phenotype, very sensitive genetic screens can be developed for isolating new members of the posterior gene hierarchy. Several posterior group genes have been identified in this way (Siegel *et al.*, 1993; Erdelyi *et al.*, 1995). To isolate novel grandchildless genes we decided to use a *hobo* mutator element developed by (Smith *et al.*, 1993), which has a pattern of insertion different from that of the commonly used P elements, and allows the rapid cloning of the tagged genes. We screened a non-lethal *hobo* induced mutant collection, and isolated  $prt^{gs}$  as a new grandchildless mutation.

We found that null mutant of *prt* produces embryos that display a significant reduction in the number of germ cells, show a reduction of short Osk protein levels and

abnormal Osk distribution. We showed that *prt<sup>gs</sup>* and the BTK29A mutations interact genetically. We found the PRT protein in large protein aggregates that are localized subcortically in the oocytes.

Interestingly, in *prt<sup>gs</sup>* mutants the Osk protein delocalisation does not seem to be coupled with *osk* mRNA delocalization. While *osk* mRNA was localised normally at the posterior pole in all stages of oogenesis, some Osk protein was detached from the subcortical region in *prt<sup>gs</sup>/prt<sup>gs</sup>* mutant ovaries. This delocalisation can reduce Osk concentration significantly at the posterior pole. The decreased Osk level leads to germ plasm reduction and the formation of fewer pole cells, which explain the *prt* mutant phenotype. As in early stages of oogenesis Osk localisation seems completely normal and only becomes abnormal gradually during the subsequent stages, *prt* is very unlikely to interfere with Osk translation, rather it plays a role in Osk protein anchoring at the posterior pole or increases the stability of the anchored Osk protein.

In *prt<sup>gs</sup>* mutants only the short Osk isoform level was found to be reduced while the long isoform remained at wild type levels. This may explain the normal Osk mRNA distribution, since the long Osk isoform can maintain its own mRNA at the posterior pole as described earlier (Markussen *et al.*, 1995). However, the isoform specificity of *prt<sup>gs</sup>* reveals that the two Osk isoforms may utilise independent posterior anchoring mechanisms or can be subjected to different post-translational regulation processes during their anchoring. On the other hand genetic and molecular evidences suggest that some residual short Osk must still be present in *prt<sup>gs</sup>* null mutants, because the complete loss of the short Osk isoform would not only result in grandchildless but rather a complete abdomen and germ cell-less phenotype. This result also demonstrates that *prt* function in Osk anchoring must be redundant.

Subcellular localisation of PRT is reconcilable with *osk* regulatory function, since at the subcortical region their localisation overlaps. This colocalisation potentiates the functional interaction. Some *osk* translational regulatory proteins, which form a large ribonucleoprotein (RNP) complex, demonstrate a similar expression pattern during their transport to oocytes to that of PRT. Biochemical evidence exists that this RNP contains EXU and at least seven other proteins in addition to *osk* and *bicoid* mRNAs (Wilsch-Brauninger *et al.*, 1997; Wilhelm *et al.*, 2000). We demonstrated that Exu, Orb, and Me31, three elements of the above RNP complex, as well as CUP, an RNP independent protein with similar localisation pattern (Keyes and Spradling, 1997), are not colocalised with PRT in nurse cells. Consequently PRT aggregates, in spite of their similar subcellular localisation, have an independent transport system to either the EXU or the CUP complexes.

The genetic interaction found between *prt* and *BTK29A* indicates that the the PRT regulatory function is evolutionary conserved. This is especially interesting, since the Drosophila BTK homologue is not required in germ cell formation(Baba *et al.*, 1999). However, our germ line clone analysis of the two hypomorhic alleles failed to reveal a role in germ cell formation. The Drosophila genome contains a single BTK homologue *Btk29A*, which encodes for two protein species. *Btk29A* has several pleiotropic functions such as male fertility and ring canal formation. It is expressed in the adult head, the larval immune system, the male and female gonads and several other tissues (Vincent, *et al.*, 1989; Wadsworth *et al.*, 1990).

Based on the structural conservation of the Sab and PRT proteins, we anticipated that PRT might also exhibit a negative regulatory function similarly to Sab. According to this hypothesis, when PRT, the presumed negative regulator is absent, an ectopic BTK activity would interfere with the normal function of the posterior gene hierarchy. Being normally suppressed, loss of function of such a negatively regulated gene would not be expected to cause any posterior phenotype. Indeed, the suppression of *prt<sup>gs</sup>* phenotypes by hypomorphic *Btk29A* alleles indicates that in Drosophila, also PRT negatively regulates BTK29A.

Therefore we propose that, in wild type oocytes, PRT inactivates the BTK protein in the subcortical region. In  $prt^{gs}$  mutants however, unregulated BTK interferes either with the localisation of subcortical cellular components in the oocyte, or it modifies the phosphorylation pattern of the short Osk protein itself. We find that the latter is a less feasible explanation, because in  $prt^{gs}$  mutants we do not find increased levels of phosphorylated short Osk that would be the result of extra kinase activity, instead the level of 57 kDa phosphorylated short Osk isoform is also significantly reduced. 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. Since only the phosphorylated short Osk isoform was detected in  $prt^{gs}$  mutants, we suppose that either this protein is more stable or it is better anchored to the posterior pole, compared to the unphosphorylated one. The weakly anchored Osk protein is displaced by the cytoplasmic streaming and loses its pole plasm organizing activity. Future research should be directed towards determining the precise biochemical function of PRT and elucidating the anchoring mechanism of Osk protein.

# Irodalomjegyzék

Adams, M.D., et al. (2000). The genome sequence of Drosophila melanogaster. Science 287, 2185-2195.

Anderson, K. (1995). One signal, two body axes. Science 269, 489-490.

Baba,K., Takeshita,A., Majima,K., Ueda,R., Kondo,S., Juni,N., Yamamoto,D. (1999). The Drosophila Bruton's tyrosine kinase (Btk) homolog is required for adult survival and male genital formation. Mol.Cell Biol. *19*, 4405-4413.

Baum, B., Li, W., Perrimon, N. (2000). A cyclase-associated protein regulates actin and cell polarity during Drosophila oogenesis and in yeast. Curr.Biol. *10*, 964-973.

Beams,H.W., Kessel,R.G. (1974). The problem of germ cell determinants. Int.Rev.Cytol. *39*, 413-479.

Boswell, R.E., Mahowald, A.P. (1985). *tudor*, a gene required for assembly of the germ plasm in Drosophila melanogaster. Cell 43, 97-104.

Brendza, R.P., Serbus, L.R., Duffy, J.B., Saxton, W.M. (2000). A function for kinesin I in the posterior transport of oskar mRNA and Staufen protein. Science 289, 2120-2122.

Chang, J.S., Tan, L., Schedl, P. (1999). The Drosophila CPEB homolog, orb, is required for oskar protein expression in oocytes. Dev.Biol. 215, 91-106.

Chou, T.B., Perrimon, N. (1992). Use of a yeast site-specific recombinase to produce female germline chimeras in Drosophila. Genetics *131*, 643-653.

Clark, I., Giniger, E., Ruohola-Baker, H., Jan, L.Y., Jan, Y.N. (1994). Transient posterior localization of a kinesin fusion protein reflects anteroposterior polarity of the Drosophila oocyte. Curr.Biol. *4*, 289-300.

Cox, D.N., Lu, B., Sun, T.Q., Williams, L.T., Jan, Y.N. (2001). Drosophila par-1 is required for oocyte differentiation and microtubule organization. Curr. Biol. *11*, 75-87.

Eddy,E.M. (1975). Germ plasm and the differentiation of the germ cell line. Int.Rev.Cytol. *43*, 229-280.

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

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

Erdelyi,M., Michon,A.M., Guichet,A., Glotzer,J.B., Ephrussi,A. (1995). Requirement for Drosophila cytoplasmic tropomyosin in oskar mRNA localization [see comments]. Nature *377*, 524-527.

Frydman,H.M., Spradling,A.C. (2001). The receptor-like tyrosine phosphatase lar is required for epithelial planar polarity and for axis determination within drosophila ovarian follicles. Development *128*, 3209-3220.

Glotzer, J.B., Saffrich, R., Glotzer, M., Ephrussi, A. (1997). Cytoplasmic flows localize injected oskar RNA in Drosophila oocytes. Curr.Biol. 7, 326-337.

Glover, D.M. (1991). Mitosis in the Drosophila embryo--in and out of control. Trends Genet. 7, 125-132.

Geigy, R. (1931). Action de l'ultra-violet sur le pole germinale dans l'oeuf de *Drosophila melanogaster*. Rev. Suisse Zool. *38*, 187-288.

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

Gunkel,N., Yano,T., Markussen,F.H., Olsen,L.C., Ephrussi,A. (1998). Localizationdependent translation requires a functional interaction between the 5' and 3' ends of oskar mRNA. Genes Dev. *12*, 1652-1664.

Hachet, O., Ephrussi, A. (2001). Drosophila Y14 shuttles to the posterior of the oocyte and is required for oskar mRNA transport. Curr.Biol. *11*, 1666-1674.

Harris, A.N., Macdonald, P.M. (2001). Aubergine encodes a Drosophila polar granule component required for pole cell formation and related to eIF2C. Development *128*, 2823-2832.

Hay, B., Ackerman, L., Barbel, S., Jan, L.Y., Jan, Y.N. (1988). Identification of a component of Drosophila polar granules. Development *103*, 625-640.

Huynh,J.R., Petronczki,M., Knoblich,J.A., St Johnston,D. (2001a). Bazooka and PAR-6 are required with PAR-1 for the maintenance of oocyte fate in Drosophila. Curr.Biol. *11*, 901-906.

Huynh, J.R., Shulman, J.M., Benton, R., St Johnston, D. (2001b). PAR-1 is required for the maintenance of oocyte fate in Drosophila. Development *128*, 1201-1209.

Iida, T., Kobayashi, S. (1998). Essential role of mitochondrially encoded large rRNA for germ-line formation in Drosophila embryos. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A *95*, 11274-11278.

Illmensee,K., Mahowald,A.P. (1974). Transplantation of posterior polar plasm in Drosophila. Induction of germ cells at the anterior pole of the egg. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A *71*, 1016-1020.

Jankovics, F., Sinka, R., Erdelyi, 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*, 1177-1188.

Keyes,L.N., Spradling,A.C. (1997). The Drosophila gene fs(2)cup interacts with otu to define a cytoplasmic pathway required for the structure and function of germ-line chromosomes. Development *124*, 1419-1431.

Kim-Ha,J., Kerr,K., Macdonald,P.M. (1995). Translational regulation of oskar mRNA by bruno, an ovarian RNA-binding protein, is essential. Cell *81*, 403-412.

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

Lasko, P.F., Ashburner, M. (1990). Posterior localization of vasa protein correlates with, but is not sufficient for, pole cell development. Genes Dev. *4*, 905-921.

Lehmann,R., Nusslein-Volhard,C. (1986). Abdominal segmentation, pole cell formation, and embryonic polarity require the localized activity of oskar, a maternal gene in Drosophila. Cell *47*, 141-152.

Li,W., Noll,E., Perrimon,N. (2000). Identification of autosomal regions involved in Drosophila Raf function. Genetics *156*, 763-774.

Lie, Y.S., Macdonald, P.M. (1999). Translational regulation of oskar mRNA occurs independent of the cap and poly(A) tail in Drosophila ovarian extracts. Development *126*, 4989-4996.

Mach,J.M., Lehmann,R. (1997). An Egalitarian-BicaudalD complex is essential for oocyte specification and axis determination in Drosophila. Genes Dev. 11, 423-435.

Manseau,L., Calley,J., Phan,H. (1996). Profilin is required for posterior patterning of the Drosophila oocyte. Development *122*, 2109-2116.

Mansfield, J.H., Wilhelm, J.E., Hazelrigg, T. (2002). Ypsilon Schachtel, a Drosophila Ybox protein, acts antagonistically to Orb in the oskar mRNA localization and translation pathway. Development *129*, 197-209.

Margaritis,L.H., Kafatos,F.C., Petri,W.H. (1980). The eggshell of Drosophila melanogaster. I. Fine structure of the layers and regions of the wild-type eggshell. J.Cell Sci. *43*, 1-35.

Markussen, F.H., Breitwieser, W., Ephrussi, A. (1997). Efficient translation and phosphorylation of Oskar require Oskar protein and the RNA helicase Vasa. Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol. *62*, 13-17.

Markussen, F.H., Michon, A.M., Breitwieser, W., Ephrussi, A. (1995). Translational control of oskar generates short OSK, the isoform that induces pole plasma assembly. Development *121*, 3723-3732.

Matsushita,M., Yamadori,T., Kato,S., Takemoto,Y., Inazawa,J., Baba,Y., Hashimoto,S., Sekine,S., Arai,S., Kunikata,T., Kurimoto,M., Kishimoto,T., Tsukada,S. (1998). Identification and characterization of a novel SH3-domain binding protein, Sab, which preferentially associates with Bruton's tyrosine kinase (BtK). Biochem.Biophys.Res.Commun. *245*, 337-343.

Micklem, D.R., Adams, J., Grunert, S., St Johnston, D. (2000). Distinct roles of two conserved Staufen domains in oskar mRNA localization and translation. EMBO J. *19*, 1366-1377.

Mohr,S.E., Dillon,S.T., Boswell,R.E. (2001). The RNA-binding protein Tsunagi interacts with Mago Nashi to establish polarity and localize oskar mRNA during Drosophila oogenesis. Genes Dev. *15*, 2886-2899.

Munn,K., Steward,R. (1995). The anterior-posterior and dorsal-ventral axes have a common origin in Drosophila melanogaster. Bioessays *17*, 920-922.

Nakamura, A., Amikura, R., Hanyu, K., Kobayashi, S. (2001). Me31B silences translation of oocyte-localizing RNAs through the formation of cytoplasmic RNP complex during Drosophila oogenesis. Development *128*, 3233-3242.

Nakamura, A., Amikura, R., Mukai, M., Kobayashi, S., Lasko, P.F. (1996). Requirement for a noncoding RNA in Drosophila polar granules for germ cell establishment. Science 274, 2075-2079.

Newmark,P.A., Mohr,S.E., Gong,L., Boswell,R.E. (1997). mago nashi mediates the posterior follicle cell-to-oocyte signal to organize axis formation in Drosophila. Development *124*, 3197-3207.

Okada, M., Kleinman, I.A., Schneiderman, H.A. (1974). Restoration of fertility in sterilized Drosophila eggs by transplantation of polar cytoplasm. Dev. Biol. *37*, 43-54.

Pokrywka,N.J., Fishbein,L., Frederick,J. (2000). New phenotypes associated with the swallow gene of Drosophila: evidence for a general role in oocyte cytoskeletal organization. Dev.Genes Evol. *210*, 426-435.

Pokrywka,N.J., Stephenson,E.C. (1995). Microtubules are a general component of mRNA localization systems in Drosophila oocytes. Dev.Biol. *167*, 363-370.

Ramos, A., Grunert, S., Adams, J., Micklem, D.R., Proctor, M.R., Freund, S., Bycroft, M., St Johnston, D., Varani, G. (2000). RNA recognition by a Staufen double-stranded RNAbinding domain. EMBO J. *19*, 997-1009. Rawlings,D.J., Saffran,D.C., Tsukada,S., Largaespada,D.A., Grimaldi,J.C., Cohen,L., Mohr,R.N., Bazan,J.F., Howard,M., Copeland,N.G., . (1993). Mutation of unique region of Bruton's tyrosine kinase in immunodeficient XID mice. Science *261*, 358-361.

Riechmann, V., Gutierrez, G.J., Filardo, P., Nebreda, A.R., Ephrussi, A. (2002). Par-1 regulates stability of the posterior determinant Oskar by phosphorylation. Nat.Cell Biol. *4*, 337-342.

Robertson,S.E., Dockendorff,T.C., Leatherman,J.L., Faulkner,D.L., Jongens,T.A. (1999). germ cell-less is required only during the establishment of the germ cell lineage of Drosophila and has activities which are dependent and independent of its localization to the nuclear envelope. Dev.Biol. *215*, 288-297.

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

Rorth, P. (1998). Gal4 in the Drosophila female germline. Mech. Dev. 78, 113-118.

Roulier,E.M., Panzer,S., Beckendorf,S.K. (1998). The Tec29 tyrosine kinase is required during Drosophila embryogenesis and interacts with Src64 in ring canal development. Mol.Cell *1*, 819-829.

Rubin,G.M., Hong,L., Brokstein,P., Evans-Holm,M., Frise,E., Stapleton,M., Harvey,D.A. (2000). A Drosophila complementary DNA resource. Science 287, 2222-2224.

Ruden,D.M., Sollars,V., Wang,X., Mori,D., Alterman,M., Lu,X. (2000). Membrane fusion proteins are required for oskar mRNA localization in the Drosophila egg chamber. Dev.Biol. *218*, 314-325.

Ruohola-Baker, H., Jan, L.Y., Jan, Y.N. (1994). The role of gene cassettes in axis formation during Drosophila oogenesis. Trends Genet. *10*, 89-94.

Saffman,E.E., Styhler,S., Rother,K., Li,W., Richard,S., Lasko,P. (1998). Premature translation of oskar in oocytes lacking the RNA-binding protein bicaudal-C. Mol.Cell Biol. *18*, 4855-4862.

Siegel, V., Jongens, T.A., Jan, L.Y., Jan, Y.N. (1993). pipsqueak, an early acting member of the posterior group of genes, affects vasa level and germ cell-somatic cell interaction in the developing egg chamber. Development *119*, 1187-1202.

Smith,C.I., Islam,T.C., Mattsson,P.T., Mohamed,A.J., Nore,B.F., Vihinen,M. (2001). The Tec family of cytoplasmic tyrosine kinases: mammalian Btk, Bmx, Itk, Tec, Txk and homologs in other species. Bioessays *23*, 436-446.

Smith,D., Wohlgemuth,J., Calvi,B.R., Franklin,I., Gelbart,W.M. (1993). hobo enhancer trapping mutagenesis in Drosophila reveals an insertion specificity different from P elements. Genetics *135*, 1063-1076.

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

St Johnston, D., Beuchle, D., Nusslein-Volhard, C. (1991). Staufen, a gene required to localize maternal RNAs in the Drosophila egg. Cell *66*, 51-63.

Suzanne, M., Irie, K., Glise, B., Agnes, F., Mori, E., Matsumoto, K., Noselli, S. (1999). The Drosophila p38 MAPK pathway is required during oogenesis for egg asymmetric development. Genes Dev. *13*, 1464-1474.

Szabad, J., Hoffmann, G. (1989). Analysis of follicle-cell functions in Drosophila: the Fs(3)Apc mutation and the development of chorionic appendages. Dev.Biol. *131*, 1-10.

Tetzlaff,M.T., Jackle,H., Pankratz,M.J. (1996). Lack of Drosophila cytoskeletal tropomyosin affects head morphogenesis and the accumulation of oskar mRNA required for germ cell formation. EMBO J. *15*, 1247-1254.

Tirronen, M., Lahti, V.P., Heino, T.I., Roos, C. (1995). Two otu transcripts are selectively localised in Drosophila oogenesis by a mechanism that requires a function of the otu protein. Mech. Dev. *52*, 65-75.

Tomancak, P., Piano, F., Riechmann, V., Gunsalus, K.C., Kemphues, K.J., Ephrussi, A. (2000). A Drosophila melanogaster homologue of Caenorhabditis elegans par-1 acts at an early step in embryonic-axis formation. Nat.Cell Biol. *2*, 458-460.

Tsukada,S., Saffran,D.C., Rawlings,D.J., Parolini,O., Allen,R.C., Klisak,I., Sparkes,R.S., Kubagawa,H., Mohandas,T., Quan,S., . (1993). Deficient expression of a B cell cytoplasmic tyrosine kinase in human X-linked agammaglobulinemia. Cell *72*, 279-290.

Underwood,E.M., Briot,A.S., Doll,K.Z., Ludwiczak,R.L., Otteson,D.C., Tower,J., Vessey,K.B., Yu,K. (1990). Genetics of 51D-52A, a region containing several maternaleffect genes and two maternal-specific transcripts in Drosophila. Genetics *126*, 639-650.

van Eeden, F.J., Palacios, I.M., Petronczki, M., Weston, M.J., St Johnston, D. (2001). Barentsz is essential for the posterior localization of oskar mRNA and colocalizes with it to the posterior pole. J.Cell Biol. *154*, 511-523.

Vincent,W.S., Gregory,R.J., Wadsworth,S.C. (1989). Embryonic expression of a Drosophila src gene: alternate forms of the protein are expressed in segmental stripes and in the nervous system. Genes Dev. *3*, 334-347.

Wadsworth,S.C., Muckenthaler,F.A., Vincent,W.S., (1990). Differential expression of alternate forms of a Drosophila src protein during embryonic and larval tissue differentiation. Dev.Biol. *138*, 296-312.

Wang, C., Lehmann, R. (1991). Nanos is the localized posterior determinant in Drosophila [published erratum appears in Cell 1992 Mar 20;68(6):1177]. Cell 66, 637-647.

Wang,S., Hazelrigg,T. (1994). Implications for bcd mRNA localization from spatial distribution of exu protein in Drosophila oogenesis. Nature *369*, 400-403.

Warren, T.G., Mahowald, A.P. (1979). Isolation and partial chemical characterization of the three major yolk polypeptides from Drosophila melanogaster. Dev.Biol. *68*, 130-139.

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

Wilhelm,J.E., Mansfield,J., Hom-Booher,N., Wang,S., Turck,C.W., Hazelrigg,T., Vale,R.D. (2000). Isolation of a ribonucleoprotein complex involved in mRNA localization in Drosophila oocytes. J.Cell Biol. *148*, 427-440.

Wilsch-Brauninger, M., Schwarz, H., Nusslein-Volhard, C. (1997). A sponge-like structure involved in the association and transport of maternal products during Drosophila oogenesis. J.Cell Biol. *139*, 817-829.

Wilson, J.E., Connell, J.E., Schlenker, J.D., Macdonald, P.M. (1996). Novel genetic screen for genes involved in posterior body patterning in Drosophila. Dev. Genet. *19*, 199-209.

Woodruff,R.I., Tilney,L.G. (1998). Intercellular bridges between epithelial cells in the Drosophila ovarian follicle: a possible aid to localized signaling. Dev.Biol. 200, 82-91.

Yamadori, T., Baba, Y., Matsushita, M., Hashimoto, S., Kurosaki, M., Kurosaki, T., Kishimoto, T., Tsukada, S. (1999). Bruton's tyrosine kinase activity is negatively regulated by Sab, the Btk-SH3 domain-binding protein. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A *96*, 6341-6346.

# 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., <u>SINKA R.</u> 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., ERDELYI 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, <u>RITA SINKA</u>, 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 asp. **EMBO Reports** közlésre benyújtva
## Köszönetnyilvánítás

Köszönetem fejezem ki témavezetőmnek Erdélyi Miklósnak, hogy a csoportjában lehetőséget biztosított számomra és köszönöm a munkám során nyújtott segítségét. Köszönöm Jankovics Ferencnek, Selen Muratoglunak, Lukácsovich Tamásnak, Komonyi Orbánnak, Török Tibornak, Mihály Józsefnek, Sipos Lászlónak, Gausz Jánosnak, Sandy Péternek, Gyurkovics Henriknek és Cserpán Imrének a szakmai segítséget és a kritikai észrevételeket.

Köszönöm Kiss Istvánnak, hogy rendelkezésünkre bocsájtotta a mutánsgyűjteményét.

Köszönöm Kalmár Tibornak a szekvenciák kezelése során nyújtott segítségét.

Köszönöm a 6. emeleten dolgozó összes kollegámnak a támogatását.