

***A Drosophila mir-282* mikroRNS gén szerkezeti és
funkcionális jellemzése**

Ph.D. értekezés

Bujna Ágnes

Témavezető: Dr. Erdélyi Miklós

Szegedi Tudományegyetem, Biológia Doktori Iskola
MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Genetikai Intézet

2015
Szeged

TARTALOMJEGYZÉK

BEVEZETÉS	1
A génműködés RNS alapú szabályozása	1
A mikroRNS-ek	2
A mikroRNS-ek felfedezése	2
A mikroRNS-ek genomi elhelyezkedése	3
A mikroRNS-ek keletkezése és működése	4
A mikroRNS-ek által szabályzott céltranszkriptumok	8
A mikroRNS-ek nevezéktana	9
A mikroRNS-ek funkciói	9
mikroRNS-ek az ecetmuslicában	10
A mikroRNS-ek jelentősége	11
A <i>Drosophila mir-282</i> nevű mikroRNS génje	12
CÉLKITŰZÉS	13
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	14
<i>Drosophila</i> törzsek	14
Genomi DNS tisztítása	14
Inverz PCR	15
<i>mir-282</i> deléción létrehozása	17
Transzgenikus <i>Drosophila</i> vonalak létrehozása:	18
<i>mir-282</i> expressziós törzsek	18

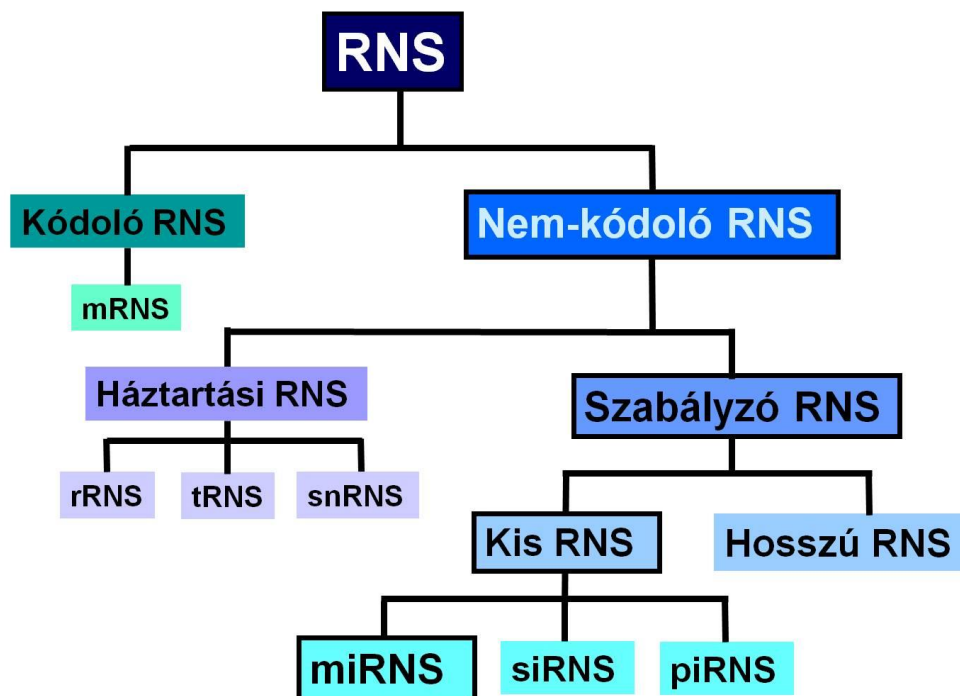
<i>mir-282</i> menekítő konstrukció	20
A <i>rutabaga</i> EGFP 3`UTR konstrukció	21
Felhasznált P-elemek, plazmidok, Gal4 `driverek`, ellenanyagok	21
Adatbázis vizsgálatok	23
Totál RNS izolálása ováriumokból	23
A <i>mir-282</i> elsődleges transzkriptum hosszának meghatározása	24
Élethossz és petehozam mérés	26
<i>Wolbachia</i> fertőzés kizárása	27
Northern-blot analízis	28
Immunfestés	28
Ivarsejt transzplantációs kísérletek	29
Kvantitatív real-time PCR	29
EREDMÉNYEK	31
A <i>mir-282</i> genomi környezete	31
A <i>mir-282</i> gén molekuláris meghatározása	34
A <i>mir-282</i> genomi régiójának vizsgálata	36
A <i>mir-282</i> ektopikus expressziója	39
Funkcióvesztéses <i>mir-282</i> mutáns törzs létrehozása	40
Az érett <i>miR-282</i> kimutatása	44
A <i>mir-282</i> null allél szemiletalist és csökkent élethossz fenotípust okoz	45
A <i>mir-282</i> null allél petehozam csökkenést okoz	48

A <i>mir-282</i> null mutáns csökkent petehozamot okozó fenotípusának fókusza a testi sejtekben van	51
A <i>mir-282</i> null mutáns petefészkében az apoptotikus aktivitás megemelkedik .	53
A <i>mir-282</i> a <i>rutabaga</i> gén negatív regulátora	56
EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA	61
ÖSSZEFOGLALÓ	67
SUMMARY	70
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	73
IRODALOMJEGYZÉK	74

BEVEZETÉS

A génműködés RNS alapú szabályozása

A 90-es években indult genomprogramoknak köszönhetően ismerté vált, hogy a magasabb rendű élőlények genomjának nagy része transzkripcionálisan aktív (Berretta & Morillon 2009; Ulveling et al. 2011). Így például a muslica (*Drosophila melanogaster*) genomjának legalább 85%-a átíródik RNS-sé (Stolc et al. 2004), azonban csak 30%-áról keletkezik érett hírvivő RNS (messenger, mRNS) (Manak et al. 2006). A fehérjét nem kódoló RNS-ek nagy része ún. 'háztartási' feladatokat lát el (riboszómális: rRNS; transzfer: tRNS; kis magi: snRNS), míg a 2000-es évek elején újabban felfedezett csoportjaik szabályozó funkcióval rendelkeznek, melyek legfontosabb szerepe a génműködés poszttranszkripciós szabályozásában van (1. Ábra) (N. C. Lau et al. 2001).



1. Ábra: Az RNS-ek funkcionális csoportosítása: A miRNS-ek a nem-kódoló, szabályzó, kis RNS-ek csoportjába tartoznak.

A szabályozó funkcióval rendelkező RNS-eknek több fajtája ismeretes, ezeket legegyszerűbben méret szerint csoportosíthatjuk. Kis nem-kódoló RNS-eknek nevezzük a 200 nukleotidnál rövidebb RNS-molekulákat. Ide soroljuk a genom stabilitást fenntartó piRNS-t (Piwi interacting RNS); az RNS csendesítésben részt vevő siRNS-t (small interfering RNS), valamint a mikroRNS-eket (miRNS). A nem kódoló kis RNS-eken kívül még többféle hosszú, kevésbé jellemzett RNS csoportról tudunk (Pauli et al. 2011; Ernst & Morton 2013).

A mikroRNS-ek

A mikroRNS-ek endogén, egyszálú szabályzó RNS-ek, melyek hajtű alakú (*stem-loop*) átmeneti transzkriptumból (pre-miRNS) keletkeznek. Végleges, körülbelül 22 nukleotid hosszú méretüket a Dicer nevű RNáz aktivitású fehérje hasítása által nyerik el. Az érett miRNS-ek az RNS indukálta géncsendesítő komplexbe épülve (miRISC: *miRNA-containing RNA induced silencing complex*) a céltranszkriptumok 3' nem transzlálódó (3' UTR: 3' *untranslated region*) végéhez komplementer módon kapcsolódnak. Részleges vagy teljes bázis komplementaritás révén akár több száz céltranszkriptumot is szabályozhatnak úgy, hogy lebontják azokat, vagy transzlációjukat gátolják. (V. N. Kim 2005). Ezen negatív szabályzó funkción kívül néhány esetben beszámoltak már a miRNS-ek ritka, pozitív szabályzó funkciójáról is (Vasudevan et al. 2007; Buchan & Parker 2007; Ørom et al. 2008).

A mikroRNS-ek felfedezése

A mikroRNS-család alapító tagját, a lin-4-et 1993-ban *Caenorhabditis elegans*-ban fedezték föl egy genetikai screen során, mint a lin-14 magi fehérjét kódoló gén represszorát. A lin-4 lókuszt pontosabb feltérképezése során kiderült, hogy

fehérjekódoló mRNS helyett csupán egy 22 nukleotid hosszú, érett RNS termék képződik a génről, mely részleges bázis-komplementaritást mutat a lin-14 gén mRNS-ének 3' UTR-ében hét kópiában megtalálható konzervált szakaszokkal. A második miRNS-t, a let-7-et csak később, 2000-ben azonosították szintén fonalféregben, hagyományos (forward) genetikai megközelítéssel (Du & Zamore 2005). Ahogy fény derült a let-7 széleskörű filogenetikai konzerváltságára, úgy kezdték felismerni a miRNS-ek általános jelentőségét. Kis RNS-ek klónozásával, expressziós analízissel azonosítottak egy tucat miRNS-t, melyek mintájára már bioinformatikai módszerekkel folytatódott a miRNS-ek előrejelzése az egész élővilágban (Lagos-Quintana 2001; Lai et al. 2003). Az utóbbi évtizedben miRNS-ek ezreit azonosították emberben, állatokban, növényekben, valamint vírusokban is (Griffiths-Jones et al. 2008; Pfeffer et al. 2004).

A mikroRNS-ek genomi elhelyezkedése

A miRNS gének általában intergenikus régiókban, ismert fehérjekódoló génektől több kilobázisra lokalizálódnak, saját promóterrel és szabályozó régióval rendelkeznek. Kisebb részük fehérjét nem kódoló transzkripciós egységekben is előfordulhat, de fehérjekódoló gének intronjába beépülve is elhelyezkedhetnek. Az intronikus miRNS-ek keletkezése kissé eltér a nagy többségtől, hiszen az RNS érése a gazda gén splicing-jával kapcsolt módon történik meg. Az intronikus miRNS-eket éppen ezért külön alcsoportba sorolják, és mirtronnak nevezik (Ruby et al. 2007; Okamura et al. 2007). A genomikus elhelyezkedéstől függetlenül a miRNS-ek egyesével, vagy egymáshoz közel, klaszterekben is elhelyezkedhetnek, és ilyenkor az érvényben levő modell szerint policisztronos transzkripciós egységként íródnak át (V. N. Kim 2005; Du & Zamore 2005). A *Drosophila* genomban az ismert miRNS-ek megközelítőleg fele fehérjekódoló

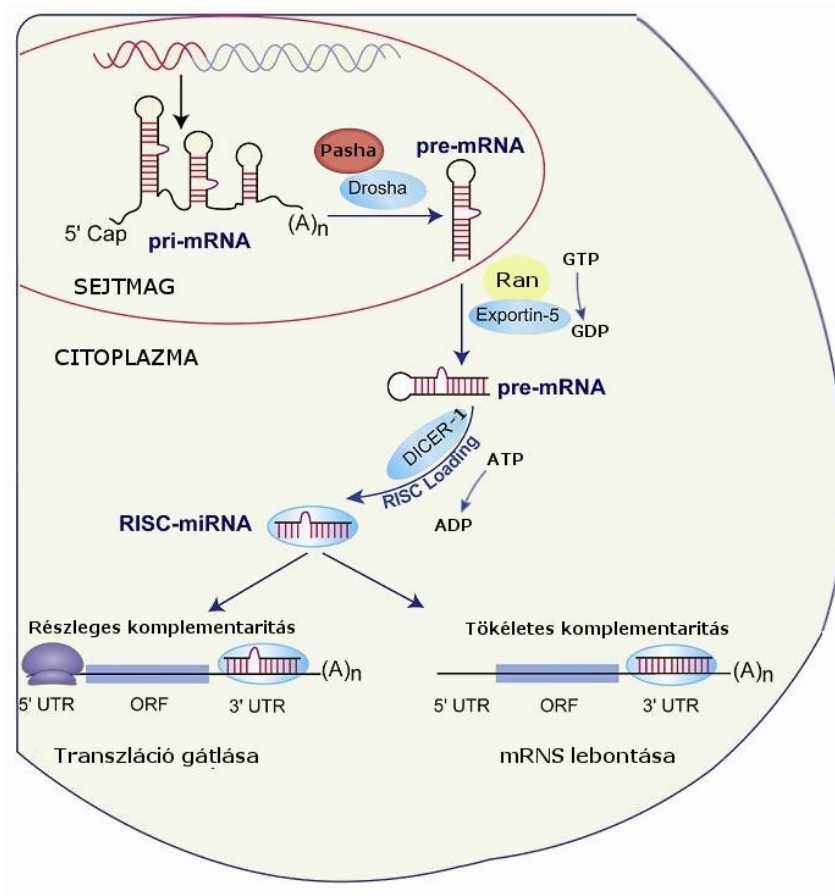
gének intronjában foglal helyet, és több mint fele klaszterben található (Jaubert et al. 2007).

A mikroRNS-ek keletkezése és működése

A legtöbb miRNS elsődleges transzkriptumát (pri-miRNS) az RNS polimeráz II (pol II) írja át a DNS-ről, bár például az ALU szekvenciák között elhelyezkedő emlős miRNS-ek átíródásáért az RNS polimeráz III felelős (Borchert et al. 2006). A pol II-höz kötődő szabályzó elemeknek köszönhetően a miRNS-ek térben és időben szabályzott expressziós mintázatot mutathatnak, és az mRNS-ekhez hasonlóan a pri-miRNS-eket is 5' végi CAP struktúra, és 3' végi polyA farok határolja (Cai et al. 2004; Lee Y. et al. 2004). A pri-miRNS-ek hossza változatos: egy, de akár húsz kilobázisos elsődleges transzkriptumot is leírtak már (Kadener et al. 2009).

Az érett miRNS az elsődleges transzkriptumból hajtú szerkezetű átmeneti alakon keresztül, két kivágódási lépés során alakul ki. Ez a két lépés egymástól térben elkülönülve a magban, illetve a citoplazmában történik (2. Ábra). A Drosha fehérje kofaktorai segítségével már a magban fölismeri a pri-miRNS másodlagos szerkezetét. Ezután az elsődleges miRNS transzkriptum végén lévő huroktól két hélix fordulatra, 3' túlnyúló véget eredményezve kivágja a körülbelül 70 nukleotid hosszú pre-miRNS-t. A Drosha fehérje az egész állatvilágban konzerválódott. *Drosophilában* a Drosha két RNáz III domént (RIIID), és egy kettős szálú RNS kötő domént (dsRBD: *double-stranded RNA-Binding Domain*) tartalmaz. A Drosha és kofaktorai (köztük a legfontosabb a két dsRBD domént tartalmazó Pasha fehérje) egy hozzávetőlegesen 500kDa relatív molekulatömegű enzim komplexet alkotnak, melyet gyakran mikroprocesszor komplexnek is hívnak (V. N. Kim 2005). A mirtronok esetében a

Drosha-tól független, splicing függő miRNS érési útvonalon keresztül jön létre a pre-miRNS (Ruby et al. 2007; Okamura et al. 2007).



2. Ábra: A miRNS-ek keletkezése *Drosophilában*: módosított ábra a www.genscript.com/images/sirna/miRNA.jpg ábra alapján.

A pre-miRNS-t az exportin-5 fehérje és kofaktora, a Ran szállítja ki a citoplazmába a magi pórus komplexen keresztül. A transzport energiaigényét a GTP hidrolízise fedezi (E. Lund et al. 2004). A pre-miRNS további hasítását egy másik RNáz III aktivitású enzim, a Dicer végzi a citoplazmában. A Dicer fehérje az eukarióta szervezetekben konzerválódott, magasabb rendű élőlények genomjában rendszerint több homológja is megtalálható. *Drosophilában* két homológ ismert, melyek közül a Dicer-1-nek nevezett fehérje játszik szerepet a miRNS érésben. A Dicer-1 két RIIID-t, egy dsRBD-t, valamint egy hosszú N-terminális részt tartalmaz. Az N-terminálison egy helikáz (Dead-Box RNA Helicase Domain), egy ismeretlen funkciójú (DUF283), és egy

Paz domén található. A Paz domén a pre-miRNS 3' túlnyúló végéhez kötődik, a helikáz ATP hidrolízist használva a kettős szálú RNS molekulát széttekeri, majd az RNáz III domének lehasítják a miRNS duplexet. A Dicer fehérjének több kölcsönható partnere is ismert, de ezek a hasításhoz nem szükségesek, szerepük a miRNS stabilitásában és az effektor komplex kialakításában van (Y. S. Lee, Nakahara, et al. 2004; Ye et al. 2007). A miRNS érés következő lépéseként a miRISC komplex központi eleme, az Argonaute1 (Ago1) fehérje kapcsolódik a miRNS duplexhez. A miRISC komplexbe a miRNS duplexnek csak az egyik szála kötődik be. A szálszelekcióban feltehetőleg az Ago fehérjéknek van meghatározó szerepük. Az érett miRNS szál kiválasztódása hierarchikus szabályok alapján történik, melyben a duplex struktúrája, a bázispárosodás mértéke élvez prioritást. Az 5' végen kevésbé stabilan párosodott szálból lesz az érett miRNS, az ún. vezető szál (V. N. Kim 2005). A duplex másik szálát, melyet kísérő szálnak nevezünk, és csillaggal jelölünk (miR*), exoribonukleázok lebontják. Legújabb kutatási eredmények szerint a kísérő szálnak is lehet biológiai funkciója. Nemrégiben kimutatták ugyanis, hogy a kísérő szál (miR*) bizonyos esetekben az siRNS útvonal központi effektorához, az Ago2 fehérjéhez kötődik. Mind *in vitro*, mind *in vivo* kísérletekben bizonyították, hogy az Ago2-höz kötött miR* szál is képes a céltranszkriptum csendesítésére (Czech et al. 2009; Okamura et al. 2009). Czech és Okamura munkája első ízben mutatott rá az siRNS és a miRNS útvonal közvetlen találkozására. A két poszt-transzkripcionális szabályzó útvonal sok szempontból rokonítható egymással, hisz számos hasonlóságot mutatnak, korábban mégis egyedi, jól elkülöníthető tulajdonságaikra fókuszáltak (L. He & Hannon 2004).

A miRNS vezető szálának kiválasztódása bizonyos esetekben nemcsak termodinamikai alapon dől el. Ha a két szál termodinamikai stabilitása megegyezik, akkor a céltranszkriptum (target) jelenléte is stabilizálhatja az egyik vagy másik szálát

(target mediált miRNS védelem), vagyis a céltranszkriptum szintje visszahat a miRNS szintre, megvédve a miRNS-t a lebomlástól (Chatterjee et al. 2011). A miRNS-ek jellemzően uridinnel kezdődnek, melynek szintén szerepe lehet a szálszelekcióban. Legtöbbször ugyanis a duplex uridinnel kezdődő szálából lesz a vezető szál (Czech & Hannon 2011). Az érett miRNS-ek fehérjékkel komplexben stabilnak mondhatók, féléletidejük a citoplazmában az mRNS-ekénél általában hosszabb (Bail et al. 2010). Ez feltehetően annak köszönhető, hogy a miRNS érés utolsó lépéseként az érett, egyszálú miRNS a 3' végén metilálódik, ami hathatós védelmet nyújt a degradáció ellen (Czech & Hannon 2011).

A miRNS-ek működésének hatásmechanizmusáról még nincs teljesen letisztult képünk. Ha a miRISC komplexben levő érett miRNS szekvencia teljes komplementaritást mutat a célgén mRNS-ének 3' UTR-ében lévő célszekvenciáival, a transzkriptum degradálódik. A transzkripció gátlás során a miRNS-ek a céltranszkriptumot a citoplazmatikus P-testekbe (processing body) irányítják, ahol nagy mennyiségben vannak jelen az 5' végi CAP struktúrát lehasító enzimek és 5'-3' nukleázok. Ha azonban a miRNS-ek és célszekvenciáik részleges bázispárosodást mutatnak, akkor a transláció inicializálásának gátlása következik be (Valencia-Sanchez et al. 2006; Behm-Ansmant et al. 2006). Míg növényekben a miRNS-célszekvencia teljes komplementaritása jellemzőbb, állatok esetében inkább részleges bázispárosodás figyelhető meg, ami a célgének számítógépes jóslását megnehezíti (Stark, Brennecke, et al. 2003). Fel nem oldott ellentmondás azonban az, hogy egyre több kísérleti adat tanúsága szerint a mRNS degradáció állatokra, míg translációs gátlás a növényekre jellemzőbb (Huntzinger & Izaurralde 2011). Mások humán sejtkultúrán végzett kísérleteik alapján arra a következtetésre jutottak, hogy mérsékelt represszió

transzlációs gátlás révén alakul ki, míg erőteljesebb kifejeződési változásokat csak mRNS destabilizációval lehet elérni (Baek et al. 2008).

A mikroRNS-ek által szabályzott céltranszkriptumok

Az állatvilágban a miRNS céltranszkriptumok előrejelzésében az alapvető kihívást a részleges bázispárosodás adja. Emiatt az egyszerű genom összehasonlítások nem használhatók a céltranszkriptumok előrejelzésében. A legkorábbi tanulmányokban ezért riporter rendszereket használva térképezték fel a miRNS – mRNS kapcsolat legfontosabb elemeit, majd ezen eredmények alapján fejlesztettek különféle célgén prediktáló algoritmusokat. A miRNS 5' végi 6-7 nukleotidja a 2. és 8. pozíció között a célszekvencia felismerésében kitüntetett szereppel bír. Ezt a lényeges részt el is nevezték központi, ún. 'seed' régiónak (Stark, Brennecke, et al. 2003). A *seed* régió maga is tartalmazhat kihurkolódásokat, nem párosodott nukleotidokat, melyeket a 3' végi erősebb párosodás kompenzál (Brennecke et al. 2005). Mindezen felismerések mellett a célgén prediktáló algoritmusok figyelembe veszik az evolúciós konzerváltságot, valamint azt, hogy a miRNS kötőhelyek rendszerint több kópiában fordulnak elő a szabályozott RNS-ek 3' UTR-ében. A miRNS kutatás rengeteget köszönhet a bioinformatikának, de a célgének azonosításában a kísérletes bizonyítékok elengedhetetlenek. A kísérletesen is bizonyított miRNS célgének száma egyre nő, de még mindig elenyésző az összes feltételezett miRNS-hez képest (R. C. Friedman et al. 2009; Hammell 2010). Becslések szerint magasabb rendű állatok genomjában minden századik fehérjekódoló génre jut egy miRNS (Lai et al. 2003; D. P. Bartel & C.-Z. Chen 2004a).

A mikroRNS-ek nevezéktana

Az érvényben lévő megállapodások szerint miRNS-nek tekinthető az a rövid RNS, amely a következő kritériumok közül legalább kettőnek eleget tesz: 1, expressziója Northern-blottal, esetleg reverz transzkripció kapcsolt polimeráz láncreakcióval, primer extenziós analízissel, vagy microarray-el bizonyított; 2, a hajtú alak (stem-loop) egyik karján, nagyobb belső hurkok nélkül helyezkedik el az érett miRNS; 3, az érett miRNS és általában az előalak is filogenetikailag konzerválódott; 4, a miRNS érés útvonalát gátolva intermedier forma felhalmozódása mutatható ki.

A mikroRNS-ek elnevezésekor a 3-4 betűs, fajra utaló előtagot vagy az érett miRNS-szekvencia jele (miR) vagy az előalak (mir) rövidítése követi, attól függően, hogy melyik alacról beszélünk. A név egy számmal ér véget, mely ortológok esetében a különböző fajokban megegyezik. Példaként a dolgozatomban vizsgált, az *ecetmuslica* egyik érett miRNS-ét jelölő szabatos elnevezés: *dme-miR-282* (Ambros, B. Bartel, et al. 2003; V. N. Kim 2005; Griffiths-Jones et al. 2006).

A mikroRNS-ek funkciói

A miRNS-ek funkcionális elemzése még gyermekcipőben jár. Az eddig leírt miRNS fenotípusok alapján azonban már nyilvánvalóvá vált, hogy a miRNS-ek részt vesznek a legkülönfélébb biológiai folyamatok szabályozásában, és gyakran összetett fejlődési mechanizmusok finom szabályozásában töltenek be fontos szerepet. Az egyes miRNS-ek funkciójának megismerését nehezíti, hogy egy-egy miRNS akár több száz fehérjekódoló gént is szabályozhat, és a miRNS-ek funkciójában is redundancia figyelhető meg (Abbott et al. 2005; Sokol 2008). Az alacsony szinten kifejeződő miRNS-ek hatása gyakran csak egymással kombinálva érvényesül a célgénnek

finomhangolásában (D. P. Bartel & C.-Z. Chen 2004b; Krek et al. 2005). A miRNS-ek funkcionális analízise során a legtöbb esetben valószínűleg az előbb említett okok miatt kevés magas expresszivitású és penetranciájú miRNS mutáns fenotípust azonosítottak. Például a *Caenorhabditis elegans* miRNS génjeinek szisztematikus eltávolítása általában nem okozott könnyen azonosítható fenotípusokat laboratóriumi körülmények között (Miska et al. 2007). Genetikailag érzékenyített háttéren azonban már sok esetben megmutatkozott a miRNS gén eltávolításának hatása (Brenner et al. 2010). Barthel és Chan a miRNS targetek három kategóriáját jegyzi. Egyrészt a kapcsoló jellegű targeteket (switching target), melyek a miRNS hatására ki- vagy bekapcsolják a célgén kifejeződését, másrészt a finom szabályozásban résztvevőket (tuning target), melyek enyhe hatást mutatnak csak a célgén kifejeződésére, valamint a semleges targeteket (neutral target), melyek hatása elenyésző, a jelen fenotipizálási eszköztárral nem mutatható ki (D. P. Bartel & C.-Z. Chen 2004b).

mikroRNS-ek az ecetmuslicában

Modell organizmusunkban, az ecetmuslicában (*Drosophila melanogaster*) jelenleg 256 miRNS-t tartanak számon (miRBase release 21: 2014 June). A feltételezett célgének száma pedig meghaladja a 12000-t, ami a muslica génjeinek több mint 90%-át jelenti. A miRNS útvonal egyes elemeinek szisztematikus gátlása muslicában nőstény sterilitást, sejtosztódási zavarokat, embrionális szegmentációs hibákat, memória zavarokat és embrionális letalitást okozhat. Egyedi *Drosophila* miRNS-ek közül mindeddig csupán körülbelül egy tucatról készült részletes leírás (Flybase www.flybase.org). Ezeken kívül a többi, jó kétszáz prediktált miRNS gén funkciójáról szinte semmit nem lehet tudni. *Drosophila melanogaster*-ben az első, kísérletesen vizsgált egyedi miRNS a sejtnövekedést és apoptózist szabályzó *bantam*. A *bantam* az

apoptózist gátolja és sejtproliferációt indukálva növekedést idéz elő. A *bantam* célszekvenciákat az apoptózist indukáló *hid* (*head involution defective*) gén 3' UTR-ében azonosították, majd funkcionális kísérletekkel bizonyították a *bantam*nak a *hid* transzlációját gátló hatását (Brennecke et al. 2003). A muslica *miR-14* nevű génjét szintén hagyományos genetikai megközelítéssel azonosították sejthalált és zsír felhalmozódást befolyásoló funkciójára alapján (Xu et al. 2003; V. Ambros 2004). Az anyai hatással és zigotikusan kifejeződő *miR-184* hiányában többféle defektus lép fel az oogenezis és a korai embriogenezis során, mely egyes esetekben a petesejtek teljes hiányához is vezethet (Iovino et al. 2009). Soni és munkatársai nemrégiben bizonyították a *Drosophila miR-34* anyai hatását. A *miR-34* a zigotikus átmenetet megelőzve a korai idegi differenciációban tölt be fontos szerepet (Soni et al. 2013).

A mikroRNS-ek jelentősége

A miRNS-ek jelentőségét a magasabb rendű állatokban alig egy évtizede ismerték föl, azonban mutációikat máris egy sor humán betegség kialakulásával hozták kapcsolatba. Neurodegeneratív (Alzheimer és Parkinson kór), ill. kardiovaszkuláris betegségek, valamint a rák legkülönbözőbb típusainak hátterében azonosítottak már miRNS mutációkat. Ugyanakkor találtak már ritkább betegségeket okozó miRNS mutációkat is. Az autoszómás, domináns progresszív sükettség, vagy a Feingold-szindróma hátterében is miRNS rendellenesség állhat (Friedman & Jones 2009; Hammell 2010; Farazi et al. 2011). A miRNS-ek érési folyamatairól, a génszabályozásban betöltött szerepéről, a szabályozott gének köréről általánosságban egyre szélesebb körű ismereteink vannak, azonban az egyedi miRNS-eket kódoló gének terén még szegényes a tudásunk. A bioinformatika ugrásszerű fejlődésével hatalmas

adathalmazok jöttek létre a miRNS-ekkel kapcsolatban, melyek legnagyobb része még értelmezésre és kísérletes megerősítésre vár.

A *Drosophila mir-282* nevű mikroRNS génje

PhD dolgozatom a bioinformatikai módszerekkel előrejelzett *mir-282* nevű *Drosophila melanogaster* miRNS gén molekuláris és fenotípusos jellemzésével foglalkozik. Munkám kezdetekor a *Drosophila* genomprogramnak köszönhetően mindösszesen egy 97 bázispár hosszú, mikroRNS-ekre jellemző hajtú alakú struktúráról lehetett tudni, melynek érett alakja a becslések szerint 27 bázispár hosszú (Lai et al. 2003). A *mir-282* miRNS génje a muslica 3. kromoszómájának bal karján, a 63C1 régióban található. Ezen kívül ismert volt még, hogy ortológjai más *Drosophila* fajokban is megtalálhatók. Northern-blot segítségével Leaman és munkatársai *Drosophila melanogaster* bábban és felnőtt nőstényekben alacsony szintű kifejeződését tapasztalták (Leaman, P. Y. Chen, et al. 2005). Munkánk során bizonyítottuk a *mir-282* létezését. Megmutattuk, hogy a *mir-282*-t független, önálló gén kódolja. Kimutattuk, hogy a *mir-282* szerepet játszik a muslicák élethosszának szabályozásában, valamint a nőstények fertilitásában. Bizonyítottuk, hogy a *mir-282* a cAMP szintézisért felelős adenil cikláz gén negatív regulátora.

CÉLKITÚZÉS

A miRNS-ek keletkezéséről és szerepéről általánosságban már széleskörű ismereteink vannak, azonban a nagyszámú miRNS előrejelzéshez képest az egyedi miRNS-eket kódoló gének szerkezetéről és funkciójáról még keveset tudunk (Smibert & Lai 2008). Ezért célul tűztük ki az ivarsejthiányos szűrővizsgálat kapcsán látóterünkbe került mikroRNS-t kódoló gén szerkezeti és funkcionális vizsgálatát.

Terveink között szerepelt elsőként a *Drosophila melanogaster mir-282* miRNS génjének létezését kísérletesen megerősíteni, ortológjait felkutatni. A *mir-282* gén szerkezetének pontosabb megismerése érdekében meg kívántuk határozni a *mir-282* keletkezése során az elsődleges transzkriptum hosszát, valamint azt, hogy a *mir-282* elsődleges transzkriptum esetlegesen valamely szomszédos fehérjekódoló gén egyik 'splice' variánsa-e, azaz mirtron, vagy önálló transzkripció egységként átíródó miRNS.

A *mir-282* gén szerkezeti jellemzése mellett másik fő célunk a gén funkciójának megismerése volt. Ennek érdekében szándékoztuk feltérképezni a *mir-282* közvetlen közelébe beépült *P*-elem inszerciós mutánsok fenotípusát, valamint létrehozni null allélokat, és ektopikus expressziót biztosító transzgenikus vonalakat.

További célunk volt a *mir-282* számos lehetséges célgénje közül legalább egy esetben belátni, hogy a célgén 3'UTR-ében jelenlevő *mir-282* célszekvencián keresztül a *mir-282* valóban a célgén csökkent kifejeződését okozza.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Drosophila törzsek

A vad típusnak tekintett w^{118} -as törzs, a P-elem remobilizáláshoz transzpozáz forrásként használt második kromoszómás *CyO*Δ2-3/*Bc,Gl,Fr* genotípusú törzs, a kromoszómális markerként igénybe vett e^s , valamint a transzgének meghajtásához használt driverek (*act5C*>Gal4; *act5C*>Gal4/*CyO* GFP; *da*>Gal4; *tub*>Gal4; *twist*>Gal4) a Bloomingtoni *Drosophila* Törzsközpontból származnak. A *nos*>Gal4VP16 Gal4 forrást Ruth Lehmann bocsátotta rendelkezésünkre. A rekombinációt gátló ún. balanszer kromoszómákat tartalmazó TM2,*Ubx*/TM6a,*Sb*; TM3,*Sb*/TM6,*D*³; *CxD,ry*^{BW}/TM3,*Sb*¹*Ser*¹; SM6b/*Sp*; *CxD*/TM3,*Sb*¹*Ser*¹ genotípusú törzseket szintén a Bloomingtoni *Drosophila* Törzsközpontból kaptuk. A P{EP}3689, P{EP}3560, P(EP)3718, P{EP}3034, P{EP}3139, P{EP}714, P{EP}3628, P{EP}1151, P(EP)3041, P{EP}3370, P(EP)3738, P(lacW)S147703, P(RS)CB-6303-3, P(RS)CB-5453-3, P(RS)CB-5442-3, P(RS)HA-1664-3 és Df(3L)ED208/TM2*Ubx* jelű törzsek a Szegedi *Drosophila* Törzsközpontból származtak. A kísérletekben vizsgált P-elem inszerciót hordozó *Drosophila* törzsek inszerciós helyzetének meghatározásához a FlyBase adatbázis határoló (flanking) szekvencia adatait használtuk (inverz PCR; lsd. később). Az *ovo*^{D1} (Fs(1)K1237) domináns nőstény steril mutációt hordozó törzset (Komitopoulou et al. 1983) Szabad János bocsátotta rendelkezésünkre.

Genomi DNS tisztítása

Genomi DNS (gDNS) preparálásához 30 felnőtt, nőstény legyet homogenizáltunk kétszer 200μl feltáró pufferben (100mM Tris HCl pH=7,5; 100mM EDTA; 100mM NaCl; 0,5% SDS). Fél óras, 65°C-os inkubálást követően 800μl 3/5M-os KAc-ot és

6M-os LiCl-ot tartalmazó puffert adtunk hozzá, mellyel szobahőmérsékleten egy órán keresztül inkubáltuk. Ezt követően a mintát 15 percig centrifugáltuk 16000 g gyorsulással, majd a felülúszóból 1ml-t új Eppendorf csőbe helyeztünk át, és 600µl izopropanollal kicsaptuk a benne levő nukleinsavakat. A tizenöt perces, 4°C-on történő (14000 g) centrifugálást követően a csapadékot két lépésben mostuk -20°C-os 70%-os, ill. 96%-os etil-alkoholban. A mosási lépések közben a mintát 2 percig 16000 g gyorsulással centrifugáltuk. A beszárított csapadékot 80-100 µl steril, háromszorosan desztillált vízben (TDvíz) oldottuk föl, és -20°C-on tároltuk.

A P-elem remobilizálással létrehozott mutáns jelölt törzseken a várt deléció ellenőrzését egyetlen légyből nyert gDNS-en végeztük. Az élesztős táptalajon tartott hím legyet 100µl feltáró pufferben (50mM EDTA; 100mM Tris HCl pH=9; 5% SDS) homogenizáltuk, majd 30 percig 65°C-on inkubáltuk. Ezt követően 400 µl 5M-os KAc-ot adtunk hozzá, és jégen tartottuk fél órán keresztül. A mintát kétszer 10 percig centrifugáltuk 4°C-on 12000 g gyorsulással, majd a felülúszóhoz 1ml szobahőmérsékletű, 96%-os etanolt adtunk. Szobahőmérsékleten történő 10 perces centrifugálást (16000 g) követően a csapadékot -20°C-os, 70%-os alkohollal mostuk. A beszárított gDNS-t 5µl steril desztillált vízben oldottuk föl.

Inverz PCR

Az inszerciós mutáns *Drosophila* törzsekben a P-elemek térképhelyzetének pontos megállapítására inverz polimeráz láncreakciót (iPCR) végeztünk. A P-elem végeinek pontos szekvenciája ismert, restriktív enzim felismerő-helyeket, és PCR sokszorozásra, ill. szekvencia meghatározásra alkalmas primer tapadási helyeket tartalmaznak. A P-elemek 3' végi határoló szekvenciáinak meghatározásakor egy-egy restriktív enzimmel (HindIII vagy HpaII, 10U/µl, Fermentas) emésztettük a genomi DNS-t. A

DNS fragmenteket T4 DNS ligáz (Fermentas, 5U/μl) enzimmel 400μl végtérfogatban 4°C-on éjszakán át inkubálva cirkuláris DNS-sé zártuk, majd az így létrejött cirkuláris DNS gyűjteményen P-elemre specifikus primerek segítségével felsokszoroztuk a P-elemet határoló genomi szakaszt. A PCR reakcióelegy összetétele a következő volt: 29,5μl steril TDvíz, 1μl 10μM forward primer, 1μl 10μM reverz primer, 5μl 2,5 mM dNTP mix, 5μl HindIII-mal emésztett, majd ligált gDNS, 3μl 25 mM MgCl₂, 5μl 10X Taq puffer, 0,5μl Taq/Pfu polimeráz 20:1 keverék (Fermentas, Taq: 5u/μl, Pfu: 2,5u/μl). A PCR reakciót a PTC-200 (MG Research) készüléken a következő programmal végeztük:

5 perc	95°C (aktiválás)	
30 mp	95°C (denaturálás)	} 35X
1 perc	60°C (primer hibridizáció)	
2 perc	68°C (láncosszabbítás)	
10perc	72°C (végső extenzió)	

A PCR terméket 1%-os agaróz gélen választottuk szét, az egyes fragmenteket UV fény alatt a gélből kivágtuk és a QIAquick Gel Extraction Kit-tel (Qiagen) izoláltuk vissza. A szekvencia megállapítása a P-elem végre specifikus primerrel történt. A különböző P-elem inszerciós helyek megállapítása más-más irányból, restriktációs emésztéssel és primerekkel történt, ezeket az adatokat az 1. táblázat foglalja össze.

P-elem	P-elem vég	Restriktációs emésztés	PCR primer	Szekvenáló primer
P {EP}EP 1151	3' vég	HindIII	pry1	pry2
P {lacW}S1477/3	3' vég	HindIII	pry1	pry2
P {EP}CG14959 ^{EP3718}	5' vég	HpaII	Pwht1	plac1
P {RS5}5-HA-1664	5' vég	HpaII	plac4	plac1
P {EP}CG14959 ^{EP3041}	5' vég	HpaII	Pwht1	plac1
P {EP}EP 3370	5' vég	HpaII	Pwht1	plac1
P {RS3}CB-5453-3	5' vég	HpaII	plac4	plac1
P {EP}EP 3034	3' vég	HindIII	pry1	pry2
P {EP}CG14959 ^{EP3738}	5' vég	HpaII	Pwht1	plac1

1. Táblázat: Az iPCR-hez használt primerek összefoglalása: A használt primerek hibridizációs hőmérséklete minden esetben 60°C volt, a primerek szekvenciái a következők:

Pry1	(26)	- CCT TAG CAT GTC CGT GGG GTT TGA AT
Pry2	(28)	- CTT GCC GAC GGG ACC ACC TTA TGT TAT T
Plac4	(27)	- ACT GTG CGT TAG GTC CTG TTC ATT GTT
Plac1	(24)	- CAC CCA AGG CTC TGC TCC CAC AAT
Pwht1	(29)	- GTA ACG CTA ATC ACT CCG AAC AGG TCA CA

***mir-282* deléció létrehozása**

Mir-282 null mutáns törzsek létrehozásához két *P*-elemet remobilizáltunk nagy, átfedő deléció felett. Az érett *miR-282* mikroRNS 5' végétől mintegy 26 illetve 58 bázispárra beékelődött EP (P(EP)3738) illetve RS (P(RS3)CB-5453-3) típusú *P*-elemek remobilizálását a 63C1-63F5 régiót átfedő, 664 kilobázisos delécióra heterozigóta ivarsejtekben (Df(3L)ED208/TM2*Ubx*) hajtottuk végre. A jelölt deléciós vonalak molekuláris ellenőrzését polimeráz láncreakció (PCR) segítségével hajtottuk végre két különböző primer párral. Az 5vfor4 (GCCGGTCCGAAATAGAAAGC) és rev2 (ACAAGCAGTGCAACCGTTGT) primerek a *miR-282*-től körülbelül 1-1 kb-ra tapadnak ki, így ennek a két primernek a segítségével egy körülbelül 2 kb-os 'ablakot' tudunk vizsgálni. A nagyobb méretű deléciók kiszűrésére beállítottunk egy másik PCR-t is a mirFw1 (GAGCAGAGGTGGATTCTAAC) és a mirRev1 (GACCCTGCTA TTCCTACAT) primer párral. A forward primer a *miR-282*-től ~3,5 kb-ra, míg a reverz primer attól ~0,6 kb-ra tapad ki, így a vad típusú termék mérete 4194kb.

Transzgenikus *Drosophila* vonalak létrehozása: *mir-282* expressziós törzsek

A *mir-282* túltermelést biztosító transzgenikus törzsek a *pre-mir-282* hajtú alakú, átmeneti formáját is tartalmazó genomi szekvencia beépítésével készültek. A λ fág helyspecifikus rekombinációján alapuló GATEWAY klónozó rendszert használtuk a *mir-282* túltermelést biztosító konstrukció megfelelő vektorba juttatásához (Huynh & Zieler 1999). Integrációs és kivágódásos rekombinációs reakciók képezik a GATEWAY *in vitro* rendszer alapjait, melyet a következőképpen szemléltethetünk: *attB* x *attP* (*att*=attachment; BP reakció = integráció) \Leftrightarrow *attL* x *attR* (LR reakció = kivágódás) [“x” szimbolizálja a rekombinációt]. A BP és LR reakciókat más-más enzimek katalizálják, melyek egy-egy lépésben biztosítják a gyors, hatékony és specifikus rekombinációt, melynek során sem a leolvasási keret, sem az orientáció nem változik.

A *mir-282* túltermelése céljából egy 690 bázispáros genomi szakaszt sokszoroztunk föl *attB* rekombinációs helyeket tartalmazó primerek segítségével. A forward primer tartalmazta az *attB1* adaptert, és a *miR-282*-től 430 bp-ra elhelyezkedő génspecifikus részt (*attB1* adapter aláhúzva: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCA GGCTCAAACATGGGCTCTACGAGT), míg a reverz primer az *attB2* adaptert és a *miR-282*-től 232bp-ra elhelyezkedő reverz génspecifikus részt (*attB2* adapter aláhúzva: GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGAAAATAGGCCAGCCAGATG).

Az integrációs reakció során az *attB* rekombinációs helyekkel rendelkező PCR termékünket pDONRTM221 donor vektorba rekombináltattuk. A gyártó által ajánlott protokolltól a térfogatok csökkentésében (5 μ l végtérfogatban: 1 μ l PCR termék; 1,5 μ l donor vektort (100ng/ μ l); 1,5 μ l TE puffer; 1 μ l BP CLONASE II enzim) és az éjszakan keresztüli inkubálásban tértünk el. A rekombinációt 1 μ l proteináz K (20mg/ml) hozzáadásával és 10 perces 37°C-ra melegítéssel állítottuk le. A PCR terméket hordozó ún. entry klón 6 μ l-ével 200 μ l OmniMAX 2T1 kompetens sejtet (Invitrogen)

transzformáltunk. A transzformáció során a gyártói protokolltól eltérően a kompetens sejteket egy percre hősokkoltuk, majd pedig 800 µl folyékony LB táptalajjal inkubáltuk és kanamicin (Kn) antibiotikumot tartalmazó LB lemezekre szélesztettük, melyből másnap egyedi baktériumtelepeket leoltva készítettünk tenyészetet. A tenyészet egy részét 87%-os glicerinnel -80°C-on lefagyasztottuk, a maradékból pedig a Wizard Plus Miniprep DNA Purification System-et (Promega) használva plazmid DNS-t preparáltunk. A kompetens sejtek sikeres transzformálásáról VspI restrikciós enzimmel történő hasítással ellenőriztük: az enzim az üres donor vektort háromszor hasítja, míg a PCR fragmentumot is tartalmazó vektorban négy helyen található meg az enzim által felismert szekvencia, így az emésztését követően 1% agaróz gélen elektroforetizálva négy restrikciós fragmentumot kaptunk (méreteik: 59bp, 561bp, 1148bp, 1473bp).

A következő lépésben az *attR* rekombinációs helyeket tartalmazó célvektorokba (pPW, pTW) klónoztuk át az entry klónt. Az LR reakció során a gyártói protokolltól a térfogatok csökkentésében (2,5µl TE puffer; 1µl entry klón (100ng/µl); 0,5µl célvektor; 1µl LR CLONASE II enzim) és az éjszakán keresztüli inkubálásban térünk el. Az LR reakció leállítását és a transzformálást ugyanúgy végeztük, mint előzőleg a BP reakció esetében, a transzformált sejteket azonban ampicillin antibiotikumot tartalmazó LB lemezekre szélesztettük. Az elkészült konstrukciók teljes szekvenciáját ellenőriztük két belső primer (5v primer: GAGGGTCCGGGCTTATCAAGCAGT és 1for primer: TCGTGAGAGGAGGAGAAGAG) segítségével. Az injektáláshoz plazmid DNS-t tisztítottuk a Qiagen HiSpeed Plasmid Midi kittel. A preparált DNS-minta koncentrációját és tisztaságát fotometriás méréssel ellenőriztük. Ammónium-acetát és izopropanol elegyével kicsaptunk 50µg-nyi DNS-t, és 10µl injektáló pufferben (5mM KCl; 0,1 mM Na₃PO₄; pH=6,8) feloldottuk.

A konstrukciókat vad típusú, w^{1118} embriókba injektáltuk. A transzformált G_0 állatokat egyenként w^{1118} ; SM6b/Sp; CxD/TM3,Sb¹,Ser¹ négy balanszer kromoszómát tartalmazó segédtörzzsel kereszteztük. A w^+ transzformációs markergént kifejező G_1 utódgeneráció egyedeit ismételten a w^{1118} ; SM6b/Sp; CXD/TM3,Sb¹,Ser¹ balanszeres törzshöz keresztezve az egyes inszerciókat a két nagy autoszómára térképeztük, és törzseket alapítottunk.

Az általános ektopikus *mir-282* kifejeződés letálfázisának meghatározása során a lárvastádiumok elkülönítését az anterior spirákulumok szerint határoztuk meg Demereck Biology of *Drosophila* című könyve alapján.

Transzgenikus *Drosophila* vonalak létrehozása: *mir-282* menekítő konstrukció

A *mir-282* menekítő konstrukció a két szomszédos gén (5` irányban a CG43389, valamint 3` irányban a ckd) közötti 9,1 kikobázisos genomszakasz PCR-es sokszorozásával készült. A polimeráz láncreakció során a BglII restrikciós hasítóhelyet tartalmazó mir_gen_Fw4Bgl primert (GTCCGTACAAGATCTCCCACAATCTTGAC CGCTAC), valamint vele szemben a KpnI hasítóhelyet tartalmazó mir_gen_Rev4Kpn primert (GATGAGTCCTGAGGGTACCGACTTGGCCCAAACACTTGAC) használtuk. Az így létrehozott PCR terméket a számos klónozó hellyel rendelkező, helyspecifikus integrációt biztosító *pattB* vektorba klónoztuk. A vektorokat a fent részletezett módon kompetens sejtbe transzformáltuk, végül az elkészült konstrukciók teljes szekvenciáját ellenőriztük, hogy nem keletkezett-e mutáció a PCR vagy a klónozás során. Az injektáláshoz plazmid DNS-t tisztítottunk, és *Drosophila* embriókba injektáltuk.

Transzgenikus *Drosophila* vonalak létrehozása: a *rutabaga* EGFP 3'UTR

konstrukció

A *mir-282* transzkripciót szabályzó hatását a *rutabaga* 3'UTR-ében lévő *mir-282* célszekvencia tesztelésével végeztük. A *rutabaga* 3'UTR-ét EGFP fluoreszcens fehérjét kódoló szekvencia mögé klónoztuk. A fluoreszcens fehérje általános kifejeződését *actin5C* promóterrel biztosítottuk. A pAGW *Drosophila* Gateway vektorból HindIII és PstI hasítóhelyeket tartalmazó primerek segítségével PCR-rel hoztuk létre az EGFP-t és az *actin5C* promótert kódoló szekvenciát tartalmazó terméket. A *rutabaga* 3'UTR-t genomi DNS templátról SalI és EcoRI restrikciós helyeket tartalmazó primerekkel sokszoroztuk. Végül a PCR termékeket P-elem eredetű *Drosophila* expressziós pCaSpeR vektorba klónoztuk (Thummel et al. 1988). A vektort először HindIII és PstI enzimekkel hasítottuk, majd beligáltuk az EGFP-t és *actin5C* promótert kódoló szekvenciát. Majd ettől 3' irányban SalI és EcoRI restrikciós enzimekkel emésztettük a vektort, és beligáltuk a *rutabaga* 3'UTR-t. Végül szekvenálással ellenőriztük az amplifikációk hűségét és a klónozás pontosságát.

Felhasznált P-elemek, plazmidok, Gal4 'driverekek', ellenanyagok

Az EP-elemek olyan módosított P-elemek (transzpozonok), melyek élesztő eredetű ún. UAS (Upstream-Activating Sequence) szekvenciákat és egy promótert (azaz 'Enhanser-Promóter' szakasz (EP)) tartalmaznak (Brand & Perrimon 1993). Az UAS szekvenciákhoz kötődő Gal4 fehérje, mint meghajtó ('driver') az EP-elem inszerciós helyétől erőltetett transzkripciót indít.

RS (Re-arrangement Screen) P-elemek segítségével hely specifikus rekombinációval hozhatók létre deléciók *Drosophilában* (Golic & Golic 1996). Két meghatározott orientációban inszertálódott RS-elem közötti genomszakasz az élesztő

FLP (flipase) - FRT (flipase recombination target) rekombinációs rendszer segítségével távolítható el.

pUAS_t: UAS szekvenciát tartalmazó P-elem eredetű vektor, mely Gal4 által meghajtott szomatikus expressziót tesz lehetővé *in vivo*.

pUAS_p: UAS szekvenciát tartalmazó P-elem eredetű vektor, mely Gal4 által meghajtott szomatikus és csíravonal expressziót is lehetővé tesz *in vivo*.

pCaSpeR vector (Thummel et al. 1988): P-elem eredetű *Drosophila* expressziós vektor, mely az ivarvonalba transzformálható. Citoplazmikus *actin5C* promótert és poliadenilációs szignált tartalmaz, így a kettő közé helyezett idegen DNS-ről konstitutív módon termeltethető RNS ill. fehérje.

Muslicákban transzgenikus fehérjeként térben és időben meghatározott módon termeltethető a Gal4 transzkripció faktor, mely UAS szekvenciához kötődve, attól 3' irányban transzkripciót indít. A Gal4 fehérjét kódoló szekvenciát szövetspecifikus enhanszer előz meg. A drivert hordozó muslica vonalakat ez alapján nevezzük meg. Kísérleteinkben a következő Gal4 drivereket használtuk, jelölve azok kifejeződését:

twi>Gal4 (*twist*) - embrionális mezoderma

elav>Gal4 (*embryonic lethal abnormal vision*) - idegrendszer

vg>Gal4 (*vestigial*) - embrionális kor; szárny és haltera diszkusz

ptc>Gal4 (*patched*) - korai embriótól báb korig a szegment határokat kijelölve

A9>Gal4 - szárny és haltera diszkusz

tub>Gal4 (*tubulin*), *act5C*>Gal4 (*actin*), *da*>Gal4 (*daughterless*) - általános

nos>Gal4VP16 (*nanos*) - ivarsejt specifikus

sgs3>Gal4 (*salivary gland secretion 3*) - nyálmirigy

A Hts 1B1 ellenanyag sejtváz alkotórészeket magába foglaló citoplazmatikus sejtstruktúrákat, az ún. spektroszómákat jelöli a csíravonal összejtek, valamint az azokból differenciálódó cisztoblasztok esetében. A cisztoblasztokból tovább osztódó cisztákban

pedig a spektroszóma eredetű fuzómák kimutatására alkalmas az anti-Hts 1B1 ellenanyag.

Adatbázis vizsgálatok

A *dme-mir-282* ortológok szintenikus viszonyát tekintve a legtöbb esetben (*Drosophila* fajok, *Anopheles gambiae*, és *Tribolium castaneum*) a Flybase információira hagyatkoztunk, azonban a *Drosophila melanogaster* CG14960 és CG12017 génjeinek *A. gambiae* ortológjait manuális kereséssel azonosítottuk nagyfokú szekvencia egyezés és genomi pozíció alapján. A háziméhre (*Apis mellifera*) vonatkozó szinténia adatok az NCBI szekvencia és homológia adatain alapulnak (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). A génkifejeződési adatok a *D. melanogaster mir-282* régiójában a Flybase és a modENCODE program publikált adataiból származnak. A *mir-282* targetjeinek listáját a miRanda algoritmust használó EMBL MicroCosm Targets (ötödik verzió) adatbázis tartalmazza (Griffiths-Jones et al. 2008).

Totál RNS izolálása ováriumokból

Az RNS mintakészítéshez 50 darab, élesztős táptalajon tartott, kétnapos nőstény *Drosophila* petefészket boncoltunk ki jéghideg *Drosophila* Ringer oldatban. Az RNS bomlékonysága miatt dietil-pirokarbonáttal (DEP, Sigma-Aldrich) RNáz-mentesített anyagokkal és eszközökkel dolgoztunk a kísérletek során. Az ováriumokat 1ml TRIzol-lal homogenizáltuk, 5 perces szobahőmérsékletű inkubációt követően 4°C-on centrifugáltuk (12000 g) 10 percig, majd a felülúszóhoz 200µl kloroformot adtunk. 3 perces szobahőmérsékleten való inkubációt követően 15 percig 4°C-on centrifugáltuk (10000g) a mintát, és a felső vizes fázist új Eppendorf csőbe helyeztük. A nukleinsavakat 500µl izopropanollal csaptuk ki és 10 percig szobahőmérsékleten

inkubáltuk. 10 perces centrifugálás (4°C, 12000 g) után a csapadékot 1ml -20°C-os, 75%-os etanollal mostuk, szárítottuk. A beszárított csapadékot 100µl DEP-kezelt vízben oldottuk föl. A minta tisztaságát és koncentrációját az optikai denzitása alapján számítottuk ki (1 OD₂₆₀=40µg/ml ribonukleinsav), valamint 1µl RNS mintát 2%-os agaróz gélen is ellenőriztünk.

Ezután 5µl mintához 5µl 10X-es MgCl₂-ot tartalmazó puffert (Fermentas), 45 µl DEP-kezelt desztillált vizet, 5µl RNáz-mentes DNázI enzimet (Fermentas, 1U/µl) és 2 µl RiboLock RNáz Inhibitor (Fermentas, 40U/µl) adtunk. Homogenizálás után 30 percig 37°C-on inkubáltuk a mintát. A reakciót 5 perces, 75°C-os melegítéssel állítottuk le, végül a mintát jégen lehűtöttük.

Bábból történő RNS izoláláshoz 30 darab kétnapos (fehér) bábót gyűjtöttünk, majd desztillált vízben történő mosás után 15 percig -80°C-ra helyeztük őket. Ezután az RNS tisztítást az előzőekben ismertetett módon végeztük.

A *mir-282* gén 3' végének meghatározásához fiatal *w¹¹¹⁸*-as nőstényekből izoláltunk totál RNS-t az RNeasy Mini Kit-tel (Qiagen). A gyártói protokoll utasításaitól annyiban térünk csak el, hogy a feltárást követően háromszor centrifugáltuk a mintát maximális fordulatszámon a megfelelő tisztaság elérése érdekében. Az RNS-t 35µl RNáz mentes vízben oldottuk le az oszlopról. Az RNS minta koncentrációját és tisztaságát, valamint degradáltságának mértékét NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific) spektrofotométer készülékkel mértük meg.

A *mir-282* elsődleges transzkriptum hosszának meghatározása

A *mir-282* 5' végének meghatározása céljából TRIzol reagens segítségével izoláltunk RNS-t vad típusú (*w¹¹¹⁸*) felnőtt nőstényekből, majd pedig a GeneRacer™ Kit-et (Invitrogen) használtuk. A használati útmutató szerint először defoszforiláltuk a

degradálódott RNS-eket, majd a teljes hosszúságú mRNS-ek 5' végi CAP struktúráját távolítottuk el, hogy ezt követően az RNS-hez tudjuk ligálni a GeneRacer™ RNA Oligo-t (CGACUGGAGCACGAGGACACUGACAUGGACUGAAGGAGUAGAAA). Mivel a polyT primerrel készített cDNS mintával nem sikerült az 5' RACE reakciót végrehajtani, ezért a reverz transzkripciót génspecifikus primerrel (5v primer: GAGGGTCCGGGCTTATCAAGCAGT) hajtottuk végre. A cDNS 5' végi felsokszorozását egyrészt az RNS oligóval komplementer GeneRacer™ 5' primerrel (CGACTGGAGCACGAGGACACTGA) és a *mir-282* specifikus 5v primerrel végeztük. A belső PCR reakcióban a GeneRacer™ 5' nested primer (GGACTGACATGGACTGAAGGAGTA) és az 5v nested (GTTCGCCTTGGTACACCTAACCTCTT) primert alkalmaztuk. A PCR programot a RACE protokollnak megfelelően, 1 perces lánchosszabbítási lépést alkalmazva végeztük.

A *mir-282* 3' végének meghatározása céljából normál táptalajon tartott, fiatal felnőtt nőstényekből izolált totál-RNS mintáról egyedi adapter részt tartalmazó GeneRacer Oligo(dT)₂₄ oligonukleotid primer (GCTGTCAACGATACGCTACGTAACGGCATGACAGTGT) alkalmazásával egyszálú cDNS gyűjteményt készítettünk. A cDNS minták készítése során 5µg RNS-hez 1µl GeneRacer Oligo(dT)₂₄ primert (10mM), 1µl dNTP keveréket és 9,5µl nukleáz mentes vizet mértünk jégen. Az RNS bomlás megakadályozására 0,5µl RiboLock RNáz Inhibitor (Fermentas) is adtunk a mintához. A primer kitapadásához 5 percig 65°C-on inkubáltuk az elegyet, majd jégen lehűtöttük. Ezt követően adtunk hozzá 4µl 5X Reverse Transcriptase reakció puffert (Fermentas), 2µl RevertAid Premium Reverse Transcriptase enzimet (Fermentas 20U/µl) és a reakció lejátszódásához 30 percen keresztül 50°C-ra helyeztük a mintát. Öt perces 85°C-os melegítéssel állítottuk le a reakciót, majd jégen hűtöttük le az elkészített cDNS-t. A cDNS-en 3'RACE reakciót

hajtottunk végre. A PCR reakcióhoz a következő reakcióelegyet mértük össze: 4,5µl steril TDvíz, 12,5µl Dream Taq MasterMix 4,5µl GeneRacer 3'primer (10µM; GCTGTCAACGATACGCTACGTAACG), 1,5µl 7for primer (10µM; *mir-282* specifikus; TAGCTGGCACCTGCTGAAGT), 2µl cDNS templát. A PCR programot a RACE protokollnak megfelelően végeztük, 30 másodperc 60°C-os primer hibridizációs és 3 perc 72°C-os lánchosszabbítási lépést alkalmazva. A PCR termékeket 1% agaróz gélen futtattuk meg.

Élethossz és petehozam mérés

Az élethossz és a petehozam vizsgálatok során a muslicákat 25°C-os hőmérsékleten, normál táptalajon és folyamatos tápanyagellátás mellett tartottuk.

A kikelési arány vizsgálatokor a muslicákat orvosi szénnel színezett, normál táptalajon petéztettük. A fiolákban nagyjából megegyező számú, körülbelül száz pete fejlődését vizsgáltuk. A kísérletet öt párhuzamos mintával, legalább 450 lerakott petével végeztük. A peterakástól számított 15. napon számoltuk meg a kikelt muslicákat, majd a kapott adatokat statisztikailag elemeztük és ábráztuk. A szemiletalitás megállapítását követően életszakaszonként is megvizsgáltuk a letalitást. Ebben a vizsgálatban már legalább harmincöt párhuzamos mintával dolgoztunk.

Az adult muslicák élethossz vizsgálatokor 30-30 szűz nőtényt illetve hímet tartottunk ötösével külön-külön fiolában. A táptalajt minden másnap frissre cseréltük, az elhullott állatok számát naponta följegyeztük. A *mir-282* mutánsok menekítési kísérletében szűz nőtényeket egyenként kereszteztünk öt vad típusú hímmel (a biztos megtermékenyülés végett).

A petehozam mérések során 30-30 szűz nőtényt kereszteztünk egyenként w^{1118} hímeikkel. A muslicákat minden nap friss, orvosi szénnel feketére színezett táptalajra

helyeztük, majd az előző nap lerakott peték számát följegyeztük. A menekítési kísérletben ugyanígy jártunk el. A kísérletet tíz napon keresztül végeztük.

A hímek fertilitás vizsgálatakor 30-30 frissen kelt hímet kereszteztünk egyenként öt-öt darab két napos, vad típusú (w^{118}) szűz nősténnyel. A hímeket minden másnap friss táptalajra helyeztük és új szűz nőstényekkel kereszteztük. A 18. napon számoltuk meg a hímek kikelt utódait, mielőtt a második utódgeneráció teljesen kifejlődött volna.

Az éheztetéses kísérletben 30-30 mutáns és kontroll nőstényt vizsgáltunk, melyeket egyenként 3-3 azonos genotípusú hímmel kereszteztünk. A muslicákat minden nap friss táptalajra helyeztük, és az előző nap lerakott petéket megszámláltuk. A negyedik és ötödik nap élesztőmentes táptalajra (1% agar, 0,5% propionsav – foszforsav (9:1), 5% szukróz) helyeztük mindkét vizsgált populációt, majd visszatértünk az eredeti, sztenderd táptalajra (Terashima & Bownes 2004). A kísérletet tíz napon keresztül végeztük.

A kísérletek statisztikai értékelése során adatainkból átlagot számítottunk, valamint meghatároztuk a szórás mértékét. A különbségek szignifikanciáját kétmintás t-próbával ellenőriztük.

Wolbachia fertőzés kizárása

A citoplazmatikus parazita fertőzés kizárására a *Wolbachia pipientis* 16S RNS-ére specifikus PCR reakciót végeztünk. Az egyik primer (TTGTAGCCTGCTATGGTATA ACT) a V1 variábilis régióra volt specifikus, míg a másik (GAATAGGTATGATTTTC ATGT) a V6-os reverz komplementje (O'Neill et al. 1992). A további fertőzések kizárása érdekében antibiotikum (100 μ g/ml ampicillin, 100 μ g/ml sztreptomicin és 0,25mg/ml tetraciklin) tartalmú táptalajon tartottuk a muslicákat két generáción keresztül.

Northern-blot analízis

A Northern-blot kísérleteket a Várallyai és munkatársai által publikált protokoll (Várallyay et al. 2008) alapján Várallyai Éva csoportjával együttműködésben végeztük. Próbaként az érett *Drosophila miR-282*-re specifikus, 28bp hosszú, kémiaailag módosított (mindkét végén digoxigeninnel (DIG) jelölt), ún. miRCURY™ LNA (Locked Nucleic Acid) próbát alkalmaztunk (Exiqon), melyet ³²P radioaktív foszfor izotóppal is megjelöltünk. Ehhez T4 polinukleotid kináz segítségével gamma ATP-t használtunk. Vad típusú, mutáns, és *nos>Gal4VP16* driver által meghajtott *mir-282* túltermelő nőstényekből 60-60µg totál RNS-t vittünk föl a gélre. A hibridizációt 48°C-on, éjszakán keresztül végeztük. A jeleket egy hét expozíciós idő után Molecular Dynamics Phosphorimager autoradiográfiás készülékkel tettük láthatóvá.

Immunfestés

Az ivarvonal sejtek festésére a monoklonális anti-Hts 1B1 ellenanyagot [1:50, Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB)] használtuk. Immunfestéshez a nőstények ováriumait PBS-ben kiboncoltuk, és 4% formaldehidet tartalmazó PBS-ben fixáltuk 15 percen keresztül, majd PBT-ben (PBS and 0.1% Triton X-100) ötször 15 percig mostuk. A petefészkeket 0.5%-os, PBT-vel hígított BSA-ban (Bovine serum albumin) 30 percig inkubáltuk. Mintáinkat az elsődleges ellenanyaggal 4°C-on, éjszakán keresztül inkubáltuk, majd háromszor öt perces rövid mosást követően, fél órán át mostuk PBT-ben, majd újabb fél órát BBT-ben. A másodlagos ellenanyaggal ismét 4°C-on, éjszakán keresztül inkubáltunk. A mintát ezt követően háromszor 10 percig PBT-ben mostuk, tárgylemezre helyeztük és ProLong Gold Antifade Mountant-oldatban (Invitrogen, Molecular Probes) fedtük le. A mikroszkópos felvételeket az Olympus Fluoview FV1000 konfokális mikroszkóppal készítettük.

A TUNEL assayhez (BD Biosciences APO-BRDU™ Kit, product number: 556405 USA) 10 napos, jól táplált nőstények petefészkeit jéghideg PBS-ben kiboncoltuk, majd szétszedtük petecsövekre és 4% formaldehidet tartalmazó PBS-ben fixáltuk 15 percen keresztül. A festést a gyártó által ajánlott protokollnak megfelelően végeztük, attól csak a DNS jelölési és antitest inkubációs idő meghosszabbításában (éjszakán keresztül) térünk el. A mintákat 96% glicerinben fedtük le, majd a fluoreszcenciát konfokális mikroszkóppal (Olympus Fluoroview1000) vizsgáltuk.

Ivarsejt transzplantáció

Ivarvonal kimérákat embrionális ivarsejt (poláris sejt) transzplantációval készítettünk Szabad Jánossal együttműködve (Lehmann & Nüsslein-Volhard 1986). Öt-tíz *mir-282^{RSX}* null mutáns és kontroll (*RS5453,e^s*) poláris sejtet ültettünk be a befogadó gazda embriók poszterior pólusára, melyek vad típusú nőstények (*Ore-R*) és *ovo^{DI}* hímek keresztezéséből származtak (Komitopoulou et al. 1983). A transzplantált állatokat két napig 18°C-on tartottuk, majd a kikelő lárvákat 25°C-ra helyeztük. A kikelő szűz nőstényeket egyenként kereszteztük vad típusú (*w¹¹¹⁸*) hímekkel és a kimérák petehozamát tíz napon át számoltuk.

Kvantitatív real-time PCR

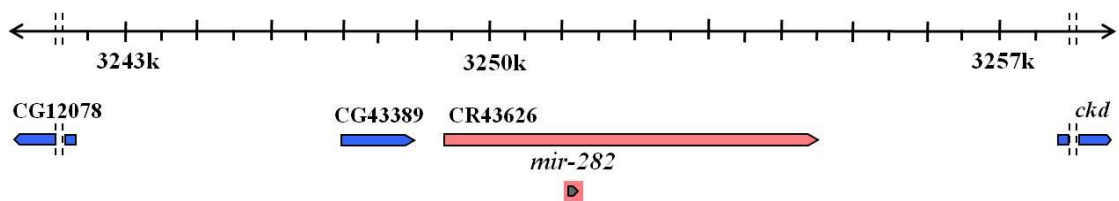
A jelölt célgének transzkriptumának kifejeződési szintjét kvantitatív real-time (RT) PCR technika segítségével Michal Zurovec csoportjával kooperálva mértük meg. A kísérletekhez az RNS-t RNA Blue reagenssel (Top-Bio) izoláltunk, majd a mintákat NucleoSpin RNA II kittel (Macherey-Nagel) tisztítottuk, és DNS-mentesítettük. A cDNS mintákat PrimeScript reverz transzkriptázzal (Takara), 1µg totál RNS-ből oligo(dT)₁₇ primerrel készítettünk. A primerek tervezéséhez a Lasergene PrimerSelect szoftvert (DNASTAR) használtuk a maximális specificitás elérése érdekében. A

polimeráz láncreakciókat Eco Real-Time PCR készüléken (Illumina) végeztük. A PCR reakciókat 20 μ l végtérfogatban HOT FIREPol EvaGreen qPCR Plus mix-szel (Solis BioDyne) végeztük 5 μ l hígított cDNS templát és 250 nM primer felhasználásával. Egy kezdeti polimeráz aktiváló lépést (15 perc 95°C-on) követően 45 PCR ciklust végeztünk (15 másodperc a 95°C-os denaturáció, 30 másodperc a primer pártól függő hőmérsékleteken a primerek hibridizációja, végül 20 másodperc 72°C-os extenzió). Minden mintát három párhuzamos vizsgálatnak vetettünk alá. Az EvaGreen fluoreszcens DNS festék segítségével fluorimetriásan követtük nyomon a PCR ciklusok előrehaladtával a kettős szálú DNS termékek mennyiségének növekedését. A termékek méretét gélelektroforézissel ellenőriztük. Az adatok számszerűsítését és elemzését az EcoStudy (Illumina) szoftverrel végeztük. A kapott értékeket a *Rack1* és az *rp49* (*Rack1*: riboszómális 'scaffold' (állvány) fehérjét kódoló gén; *rp49*: riboszómális fehérjét kódoló háztartási gén) transzkriptumok kifejeződési szintjéhez hasonlítottuk, majd a kontroll nőstény ill. báb mintákra normalizáltuk (a kísérleteknek megfelelően). Az eltérések szignifikanciáját t-próbával ellenőriztük.

EREDMÉNYEK

A *mir-282* genomi környezete

A *dme-mir-282* pre-miRNS-ről a Berkeley Drosophila Genome Project (<http://www.fruitfly.org/>; S. Tweedie, M. Ashburner, et al. 2009) adott előrejelzést, mely szerint a *mir-282* miRNS a harmadik kromoszóma bal karján, a 63C1-es citológiai régióban, a CG43389 és a *cracked* (*ckd*) gének közötti 9,4kb hosszú, fehérjekódoló gén nélküli (intergenikus) régióban helyezkedik el. Az RNA-Seq adatokat is felhasználó *Drosophila* genom annotálás során (Mortazavi et al. 2008) korábban egy 2096 bp-os gént jelöltek ki CR43626 néven, mely a *miR-282*-t tartalmazza. A legfrissebb Flybase adatok alapján azonban a CR43626-os gén 5164bp hosszú (FB 2014_06) (3. Ábra).



3. **Ábra:** A *Drosophila mir-282* elhelyezkedése a harmadik kromoszóma bal karján: a szélső gének az ábrán nem méretarányosak, a függőleges szaggatott vonalak jelölik a gének megszakítását, majd folytatását.

A *mir-282* az ízeltlábúak között evolúciós konzerváltságot mutat. Ortológjai az összes ismert genom szekvenciájú Drosophilidae fajban, a teljes átalakulással fejlődő (Holometabola, Endopterygota) rovarokban, mint például szúnyogokban (*Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti* (Li et al. 2009)), bogarakban (*Tribolium castaneum* (Singh & Nagaraju 2008)), lepkékben (*Bombyx mori* (P.-an He et al. 2008), *Manduca sexta* (Zhang et al. 2012), *Heliconius melpomene* (Heliconius Genome Consortium 2012)) és hártvány szárnyúakban (*Apis mellifera* (Weaver et al. 2007), *Nasonia vitripennis* (Werren et al. 2010)), valamint egy legújabb közlemény alapján egy mandibuláta csoportba tartozó fajban (*Strigamia maritime*) is megtalálható (Rota-Stabelli et al. 2011). Más többsejtű állatcsoportban azonban ez idáig *mir-282* homológot nem találtak.

A *mir-282* régió konzerváltsági fokának becslése céljából feltártuk a *mir-282* lókusz szinténia viszonyait (2. Táblázat). A melanogaster alcsoportban (*D. simulans*, *D. sechellia*, *D. yakuba*, *D. erecta*) a szomszédos gének megegyeznek a *D. melanogaster* fajban meglévőkkel. A *D. willistoni*-ban azonban már csak a második 5' irányban elhelyezkedő gén, valamint az első két 3' irányban elhelyezkedő gén jelöl ki egy minimális szintenikus csoportot (figyelmen kívül hagyva mindkét irányban egy-egy feltételezett minigént, melyek létezésére egyelőre nincsenek megalapozott bizonyítékok (CG43389 és CG34265)). Inverziós eseményt figyeltünk meg az *obscura*, *repleta* és *virilis* csoportokban a *mir-282* körül, de ezen események nem szüntették meg teljesen a szintenikus viszonyokat: legalább két szomszédos gén a *mir-282* mindkét oldalán megőrizte pozícióját (*D. persimilis*). A szúnyogok és bogarak képviselőiben négy szomszédos gén (a CG14968-tól a CG14960-ig) áll a *mir-282*-vel szintenikus viszonyban, a házi méh esetében azonban már nem találtunk szinteniát. Ezek az adataink arra utalnak, hogy a *mir-282* nem kapcsolódik közvetlen szomszédos fehérjekódoló génekhez. Érdekes módon minden vizsgált fajban jelentős méretű génmentes régiót találunk a *mir-282* körül, ami promóter és más fontos szabályzó régiót feltételez ezen a szakaszon. A *mir-282* tehát valószínűleg egy egyedi transzkripció egységet képez.

gén faj	<i>RpL28</i>	CG17737	CG11505	CG17746	CG12078	CG43389	<i>mir-282</i>	<i>ckd</i>	CG34265	CG14960	CG12017	CG12009	CG14968	<i>ZnT63C</i>
Dmel	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
mel. sg.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dana	+	+	+	+	+			+	+		+	+	+	+
Dpse [i]	+	+	+	+				+	+		+	+	+	+
Dper [i]	+			+				+			+	+		
Dwil				+				+	+		+			
Dmoj [i]	+	+	+	+	+			+	+		+	+		
Dvir [i]	+	+	+	+	+			+	+		+	+	+	+
Dgri	+	+	+	+				+	+		+	+	+	+
Agam[i]								+			+	+	+	+
Tcas								+			+	+	+	+
Amel								+						

2. Táblázat. Szinténikus viszonyok a *mir-282* régiójában:

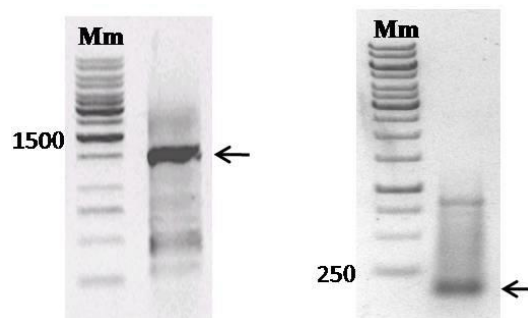
Dmel – *D. melanogaster*, mel. sg. – melanogaster subgroup, Dana – *D. ananassae*, Dpse – *D. pseudoobscura*, Dper – *D. persimilis*, Dwil – *D. willistoni*, Dmoj – *D. mojavensis*, Dvir – *D. virilis*, Dgri – *D. grimshawi*, Agam – *Anopheles gambiae*, Tcas – *Tribolium castaneum*, Amel – *Apis mellifera*. “+” jelöli a *mir-282* környezetében meglévő homológ gént a *D. melanogaster* kromoszómális régiójához viszonyítva (a gének felsorolása a *D. melanogaster* genom sorrendjét tükrözi). [i]– inverziót jelöl a régióban, * - A CG43389-as jelű gén nemrégiben került a *mir-282* szomszédságába a legújabb *D. melanogaster* genom annotációban (FB2014_06). Homológ genom szekvenciát csak a melanogaster alcsoport fajainak genomjában tudtunk azonosítani. # A CG34265-ös jelű gén homológ szekvenciája a melanogaster alcsaládban is csak részben, a *D. simulans* és *D. sechellia* fajokban található meg.

A *mir-282* gén molekuláris meghatározása

Szisztematikus Northern-blot kísérletben, melyben az összes számítógéppel előrejelzett *Drosophila* miRNS kifejeződési mintázatát vizsgálták, a *mir-282* jelenlétét báb és felnőtt nőtény mintákban mutatták ki (Leaman, P. Y. Chen, et al. 2005). Később a nagy áteresztőképességű szekvencia analízis eljárásoknak köszönhetően *Drosophila* embriókban is megtalálták a *mir-282*-t (Ruby et al. 2007; Fernandez-Valverde et al. 2010). A miRBase adatbázisa a 97 nukleotid hosszú, ún. pre-miRNS-t, és a 28 bázispáros, érett *miR-282* predikcióját tartalmazta (Griffiths-Jones et al. 2008). Az új szekvenálási eljárások adatai azonban rövidebb, mindössze 22 nukleotidos érett miRNS-t mutatnak (UAGCCUCUACUAGGCUUUGUCU) (miRBase 21).

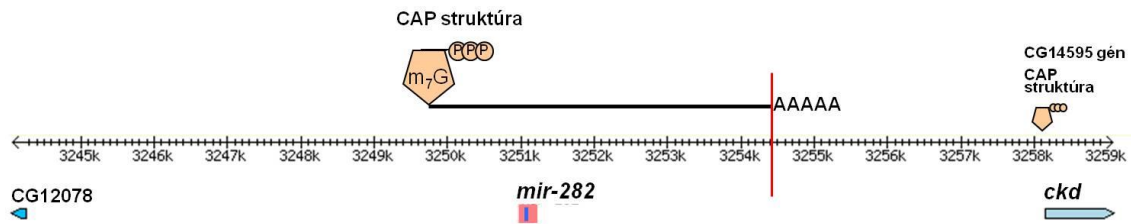
A szintén vizsgálatok a *mir-282* gént önálló transzkripció egységként valószínűsítik. Mivel azonban a *mir-282* és a szomszédos *ckd* gén azonos orientációban helyezkedik el, megvan annak lehetősége, hogy a *Drosophila melanogaster mir-282* valójában csak az őt követő *ckd* gén egy 'splice' variánsának része. Ezt megvizsgáló cDNS gyűjteményt készítettünk bábból és felnőtt nőtényekből, és közös 'splice' variánsokat kerestünk, melyek mind a *mir-282* transzkriptumát, mind a *ckd* exonjait tartalmazzák. A *ckd* gén minden exonjára terveztünk PCR primert. A PCR reakciók során azonban csak a pri-miRNS egy részét (~600 bp), illetve a *ckd* gén 5' végére specifikus (~580 bp) szakaszt tudtuk fősokszorozni. Ez utóbbit a cDNS könyvtárunk kontrolljaként. Azonosítani viszont nem tudtunk olyan közös 'splice' variánst, amely mind a *mir-282*, mind a *ckd* transzkriptum egy részét tartalmazná. Ebből arra következtethettünk, hogy a *mir-282* és a *ckd* gének független transzkripció egységet képeznek. Annak érdekében, hogy ezt a megállapításunkat még biztosabb alapokra helyezzük, meghatároztuk a *ckd* gén 5' végi transzkripció startpontját RACE

technikával. A *ckd* gén 5' CAP struktúráját a 3L: 3,257,938 genomi pozícióban találtuk, mely 217 bp-ra van 5' irányban a Flybase (www.flybase.org) adatbázisában jelenleg előrejelzett transzkripció kezdőponttól. Ez a genomi pozíció azonban még mindig körülbelül 7 kilobázisra 3' irányban helyezkedik el az érett *miR-282*-től. Vizsgálataink tehát arra utalnak, hogy a ~ 9 kb-os intergenikus régióban a CG43389 és *ckd* gének között egy független RNS-t kódoló gén található, melyről a *mir-282* pri-miRNS transzkriptuma íródik át. A *mir-282* lókusztól átíródó elsődleges transzkriptum 5' és 3' végeinek meghatározására a RACE technikát alkalmaztuk (4. Ábra).



4. Ábra: A *mir-282* 5' és 3' végeinek meghatározása RACE technikával: A nyilak jelzik a PCR reakciók fő termékeit. Mm: 1kb-os DNS molekulású marker (NEB ill. Fermentas).

A pri-miRNS CAP struktúrával védett 5' végét a genomi szekvencián a 3L: 3,249,590 pozícióban azonosítottuk, mely az érett miRNS első bázisától 1444 bp-ra található 5' irányban. A 3' RACE technika alkalmazása során a GeneRacer oligo(dT) primer (mellyel a cDNS gyűjteményt készítettük) adapteres részére specifikus primerek alkalmazásával a *mir-282* polyA szakaszának kezdőpontját a 3L: 3,254,504 genomi pozícióban határoztuk meg, ami 3446 bp-ra található az érett miRNS-től. Mindezen eredményeink a *mir-282* elsődleges transzkriptumaként egy 5' CAP struktúrával és 3' polyA szekvenciával rendelkező, 4918bp hosszú RNS molekulát mutatnak (5. Ábra).



5. **Ábra: A *mir-282* elsődleges transzkriptuma:** A pri-miRNS-t fekete vonal jelzi, melynek 5' végén az ötszöggel jelölt CAP struktúra, míg 3' végén polyA farok található. A piros vonal jelzi az elsődleges transzkriptum végét. A *mir-282*-vel szomszédos *ckd* gén 5' végi CAP struktúráját kis ötszög jelzi.

A *mir-282* genomi régiójának vizsgálata

A *mir-282* biológiai funkciójának feltárását az érett *miR-282* RNS-t kódoló szakasz közelébe beékelődött transzpozon (P-elem) mutánsok vizsgálatával kezdtük. A *mir-282* közelében 16 transzpozon inszerciós mutáns törzs állt rendelkezésünkre, melyek között homozigóta letális és életképes inszerciók is voltak. Annak érdekében, hogy a beépülés pontos helye és a néhány törzsben megfigyelt letalitás között összefüggést tárjunk fel, inverz PCR módszer segítségével 9 esetben a transzpozonok széli szekvenciáit mi magunk is meghatároztuk. A P(EP)3689 és P(EP)3560, a P(EP)3718 és P(RS)CB-6303-3, valamint a P(EP)3034 és P(RS)CB-5453-3 párok esetében a P-elemek ugyanabba a genom pozícióba térképeződtek, a P(EP)3139 és P(EP)714, valamint a P(EP)3628 és P(RS)CB-5442-3 törzsek transzpozon inszerciós pontja pedig csak egy bázispárral különbözött egymástól. Az azonos térképhely ellenére a P(EP)3689-es inszerció homozigóta letális, míg a P(EP)3560-as inszerció homozigóta vad fenotípust mutatott. Ugyanígy viselkedtek a P(EP)3718 és P(RS)CB-6303-3, a P(EP)3034 és P(RS)CB-5453-3, a P(EP)3139 és P(EP)714, valamint a P(EP)3628 és P(RS)CB-5442-3 párok is. A letalitás és a *mir-282* régió közötti kapcsolat tisztázása érdekében a letális P-elem inszerciós mutáns törzseket (P(EP)1151, P(lacW)S147703, P(EP)3370, P(EP)3628, P(EP)3689, P(EP)3034, P(EP)3738) nagy átfedő delécióval is kikeresztettük (Df(3L)ED208). A deléciót tartalmazó kromoszóma az összes esetben komplementálta a letális fenotípust. Így tehát megállapítottuk, hogy a letális fenotípust

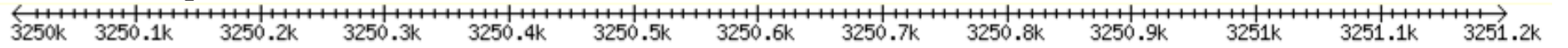
minden esetben háttér mutációk, és nem a *mir-282* funkció vesztése okozta. A *mir-282* lókuszban levő P-elem beépüléseket a 3. táblázat foglalja össze, a *mir-282* régió áttekintő térképét pedig a 6. ábra tartalmazza.

Név	Térkép pozíció (bp)	Homozigóta életképes?	Meghajtva életképes?
P {EP}3689	3,250,540	†	†
P {EP}3560	3,250,540	✓	†
P {EP}3718	3,250,542*	†	†
P {RS3}CB-6303-3	3,250,542	✓	
P {EP}3034	3,251,096*	†	✓
P {RS3}CB-5453-3	3,251,096*	✓	
P {EP}3139	3,250,540	†	†
P {EP}714	3,250,541	✓	✓
P {EP}3628	3,250,550	†	
P {RS3}CB-5442-3	3,250,549	✓	
P {EP}1151	3,250,015*	†	✓
P {lacW}S147703	3,250,426*	†	
P {RS5}5-HA-1664	3,250,564*	✓	
P {EP}3041	3,250,619*	✓	✓
P {EP}3370	3,250,486*	†	
P {EP}3738	3,251,064*	†	

3. Táblázat: A *mir-282* régiót érintő mutáns *Drosophila* törzsek összefoglalása.

* – térkép pozíció saját adatokkal megerősítve, † - letális, ✓ - életképes

Részletes térkép:



miRNS:

miR-282

Transzpozon inszerciós helyek:



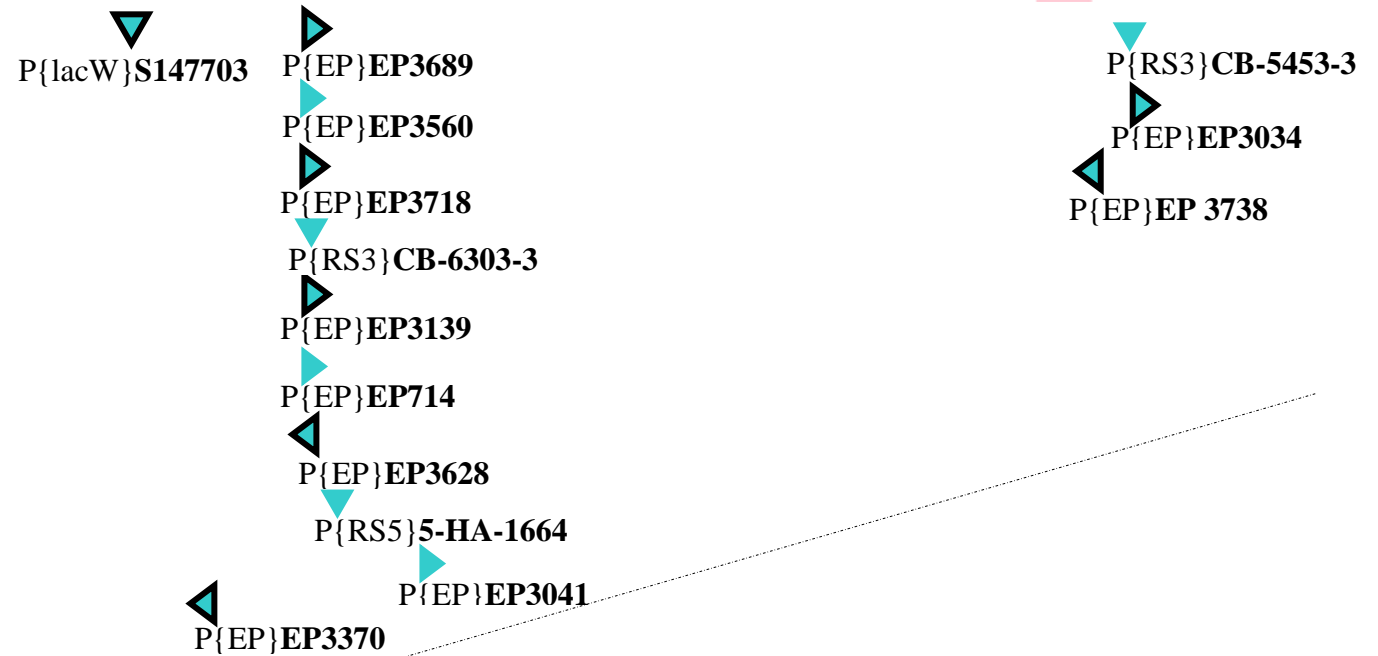
P{EP}EP1151

Jelmagyarázat:

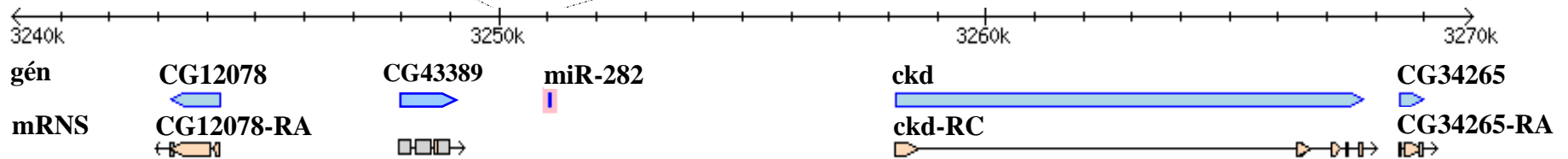
Letális elem ▼

Életképes elem ▼

A Δ iránya megegyezik az EP-elem aktiválási irányával



Áttekintő térkép:



6. Ábra. A *mir-282* közelébe inszertálódott P-elemek részletes térképe és a *mir-282* régió áttekintő térképe

A *mir-282* ektopikus expressziója

Az EP-elemek UAS szekvenciákat tartalmaznak, melyek Gal4 fehérje hatására az inszerció helyétől erőltetett transzkripciót indítanak (Brand & Perrimon 1993). Az EP3560-as vonalban az EP-elem orientációja alapján Gal4 aktiválás hatására a *mir-282* szensz szálának erőltetett átírását, ektopikus *mir-282* hatást várunk. Az *actin* promóter által általánosan kifejeződő Gal4 fehérje (*act5C*>Gal4 driver) hatására a homozigóta formában egyébként életképes EP3560-as inszerció letalitást mutatott. Ez alapján feltételeztük, hogy a *mir-282* transzkriptum biológiai funkcióval rendelkezik. Feltételezésünk helyességét indukálható, transzgenikus *mir-282* túltermelő vonalak segítségével bizonyítottuk. A pre-miRNS szekvenciát tartalmazó 690bp-os genomikus szakaszt PCR módszerrel sokszoroztuk (forward primer: CAAACATGGGCTCTACGAGT; reverse primer: GAAAATAGGCCAGCCAGATG), majd a fragmentumot ivarsejtekben illetve testi sejtekben aktív UAS-promóter szakaszt tartalmazó vektorokba (pUAS_T és pUAS_p) klónoztuk. Három olyan transzformáns *Drosophila* törzset hoztunk létre, melyek a megfelelő indukció hatására csak ivarsejtekben fejezik ki a transzgént (pUAS_p), míg tizenegy olyan törzs áll rendelkezésünkre, melyek a *miR-282*-t testi sejtekben képesek túltermelni (pUAS_T). A *mir-282* túltermeléséhez embrionális (*twist*), szövetspecifikus (*elav* - idegrendszeri, *vg*, *ptc* és *A9* a szárny diszkuszban, *nanos* az ivarsejtekben való kifejeződésre) valamint általános (*Tub*, *act5C*, *da*) expressziót biztosító Gal4 forrásokat használtunk. A pUAS_T promóterrel indukált általános túltermeltetés 100%-ban letalitást eredményezett. A letális fázis megállapításához második kromoszómás *act5C*>Gal4/CyO,GFP drivert és harmadik kromoszómás homozigóta pUAS_T>*mir-282* túltermelő törzset használtunk. A GFP negatív egyedek fejlődését a második lárvastádiumig

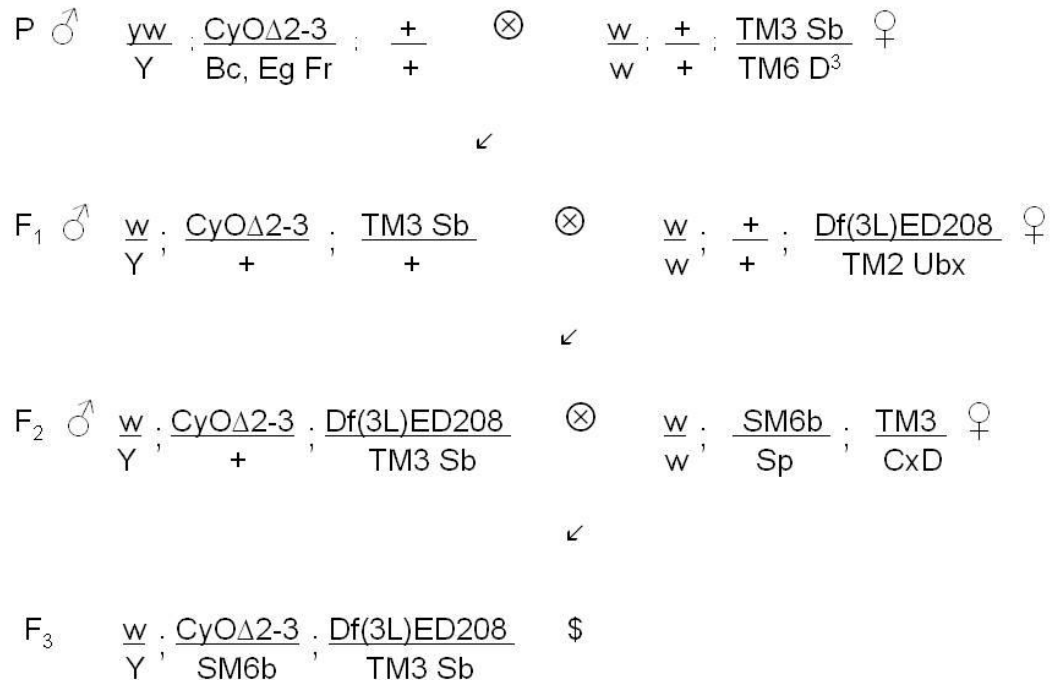
lehetett követni. A második lárvastádiumon túl a *mir-282* általános túltermelése letalitást okoz. Más Gal4 forrásokat használva nem tapasztaltunk ilyen hatást. A *mir-282*-t az ivarvonalonban *nos>Gal4VP16* driverrel fejeztettük ki. A második generáció utódainak fenotípusát vizsgáltuk, de a *mir-282* túltermelése nem okozott látható fenotípust, a muslicák életképesek és fertilisek voltak. A *mir-282* általános ektopikus túltermelése testi sejtekben az étellel össze nem egyeztethető változásokat hoz létre, ami a *mir-282* releváns biológiai funkciójára utal.

Funkcióvesztéses *mir-282* mutáns törzs létrehozása

Mivel a *mir-282* lókuszban lévő transzpozonok nem okoztak mutáns fenotípust, általuk nem kerültünk közelebb a *mir-282* funkciójának megismeréséhez, ezért P-elem remobilizálással *mir-282* deléciós mutáns alléleket generáltunk. Az érett *miR-282*-t kódoló szakaszhoz legközelebb beépült két transzpozont (P(RS3)CB-5453-3 és P(EP)3738) remobilizáltuk egy nagy, a *mir-282* lókuszt átfedő deléció (Df(3L)ED208) felett. A P-elem inszerciót hordozó kromoszómákra az *ebony* markergén *e^s* mutáns allélját rekombináltuk, hogy a későbbiekben az *e^s* fekete testszín fenotípusra tudjunk szelektálni. A kísérletsorozat keresztezési sémája alább látható.

A P(EP)3738 törzs esetében a rekombinációval a letalitást okozó másodlagos mutációt is eltávolítottuk, az *e^s* marker mutációval jelölt inszerciós törzs tehát már homozigóta formában fenntartható volt. Ezzel párhuzamosan (keresztezési séma A része) létrehoztunk egy olyan segédtörzset, melyben egyaránt megtalálható a harmadik kromoszómás átfedő deléció (Df(3L)ED208) valamint a transzpozonok remobilizálásához

szükséges CyOΔ2-3 P-elem transzpozáz forrás. Végül a létrehozott segédtörzsekkel végrehajtottuk a P-elem remobilizálást (keresztezési séma B része).



A; Keresztezési séma – mir-282 deléciós null mutáns létrehozása: A harmadik kromoszómás deficienciát (Df(3L)ED208) és a második kromoszómás transzpozáz forrást (CyOΔ2-3) tartalmazó törzs létrehozása



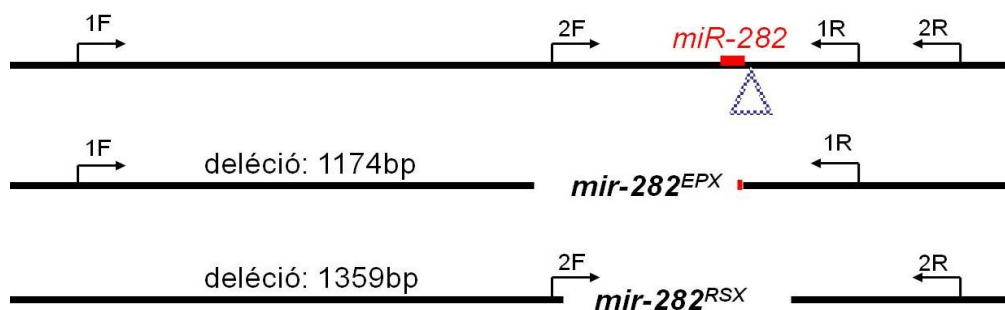
B; Keresztezési séma – mir-282 deléciós null mutáns létrehozása: P-elem remobilizálás

Három-három e^s jelölt RS- ill. EP-elemet hordozó homozigóta vonallal (RS5453e^s No.17 (RSe^s17), RS5453e^s No.20 (RSe^s20), RS5453e^s No.28 (RSe^s28), valamint EP3738e^s No.19 (EPe^s19), EP3738e^s No.44 (EPe^s44), EP3738e^s No.47 (EPe^s47)) végeztük el a P-elem remobilizálást úgy, hogy a P-elemek w⁺ markerének vesztésére szelektáltunk. Az EP3738 remobilizálásával 102 excíziós törzset, míg az RS5453 elem remobilizálásával 75 törzset alapítottunk. Összességében 177 P-elem excíziós törzset alapítottunk, melyekben a P-elemek nem precíz kivágódása deléciókat okozhatott. A létrehozott 177 excíziós mutáns törzsben PCR módszerével kerestünk az érett *miR-282*-t kódoló szakaszt eltávolító deléciókat. A nagyobb méretű deléciók kiszűrésére a mirFw1 (*miR-282*-től 3461bp-ra 5' irányban) és a mirRev1 (*miR-282*-től 707bp-ra 3' irányban) primereket használtuk. Ez esetben a vad típusú termék mérete már meghaladta a 4kb-t (4196bp), és a reakció nem minden esetben működött. A törzsek tesztelését tehát a *miR-282*-től körülbelül 1 és 1,1 kb-ra kitapadó 5vfor4 (*miR-282*-től 1019bp) és rev2 (*miR-282*-től 1112bp) primerekkel is elvégeztük, mellyel így egy 2 kb-os (2159 bp) 'ablakot' tudtunk vizsgálni (7. Ábra). A 177 deléziós jelölt törzsből hat esetben (Δ EP47/5; Δ EP47/23; Δ EP28/9; Δ EP28/3; Δ RS17/18; Δ EP44/5) mutattunk ki deléciót (4. Táblázat). Négy esetben a PCR termék szekvenciáját meghatározva azonban kiderült, hogy a deléció a *miR-282*-t nem érinti, attól 3' irányban történt. A kísérletben végül két *miR-282* deléziós mutánst tudtunk azonosítani, melyeket a kiindulási törzsek alapján *mir-282*^{RSX} és *mir-282*^{EPX} alléloknak neveztünk el (7. Ábra).

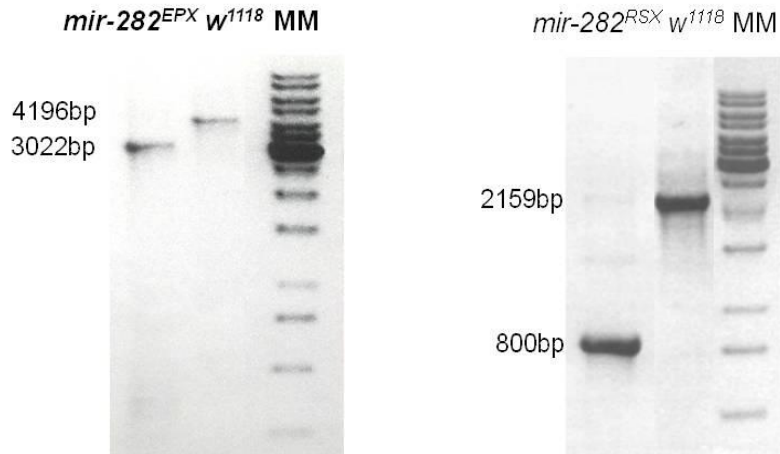
Kiindulási, jelölt P- elem inszerciós törzs	Független deléció jelölt törzsek (db)	ellenőrző PCR reakciók, (azonosított deléciók) (db)	
ΔEPe^s19	58	12	} 102
ΔEPe^s44	15	7 (1)	
ΔEPe^s47	29	27 (2)	
		46	
ΔRSe^s17	31	12 (1)	} 75
ΔRSe^s20	12	7	
ΔEPe^s28	32	10 (2)	
		29	
	$\Sigma: 177$	$\Sigma \text{ PCR}: 75$	

4. Táblázat: *mir-282* deléció jelölt, mutáns törzsek azonosítása és ellenőrzése PCR-rel

A *mir-282^{RSX}* esetében 1359, míg a *mir-282^{EPX}* esetében 1174 nukleotid deletálódott (8. Ábra). A deléciók csak és kizárólag a *mir-282* régiót érintik. A *mir-282^{RSX}* esetében a teljes pre-miRNS szakaszt eltávolítottuk, ezért ezt null mutánsnak tekintettük és a további kísérletek során ezt a vonalat használtuk. A kísérletekben kontrollként a deléció készítés kiindulási törzsét, az RS5453, *e^s* No.17 törzset választottuk, melyet ezentúl kontrollként vagy RS-kontrollként említünk.



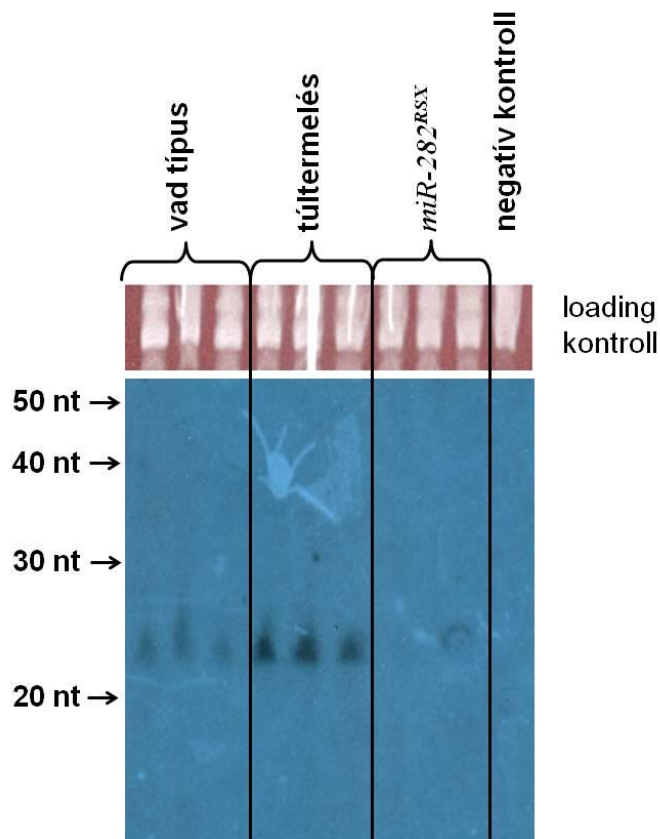
7. Ábra: *mir-282* deléciók szűrése PCR reakciók segítségével - sematikus ábra: Kék háromszög jelöli a kivágódott P-elem inszerció helyét a *mir-282*-höz képest. Nyilak jelölik a PCR primerek tapadási helyét és orientációját. Az egyik PCR reakció során a vad típusú mintán 4196bp-os fragmentumot sokszoroz föl az 1F:mirFw1 valamint az 1R:mirRev1 primer pár, a másik vad típusú mintán 2159bp-os fragmentumot sokszoroz föl a 2F:5vfor4 valamint 2R:rev2 primerekkel.



8. Ábra: *mir-282* deléciók kiszűrése PCR reakciók segítségével: A deléciókat hordozó *mir-282^{EPX}* és *mir-282^{RSX}*, valamint a vad típusú (*w¹¹¹⁸*) mintákon készült PCR termékek gélelektroforetikus futása DNS molekulásúly marker (MM) mellett.

Az érett *miR-282* kimutatása

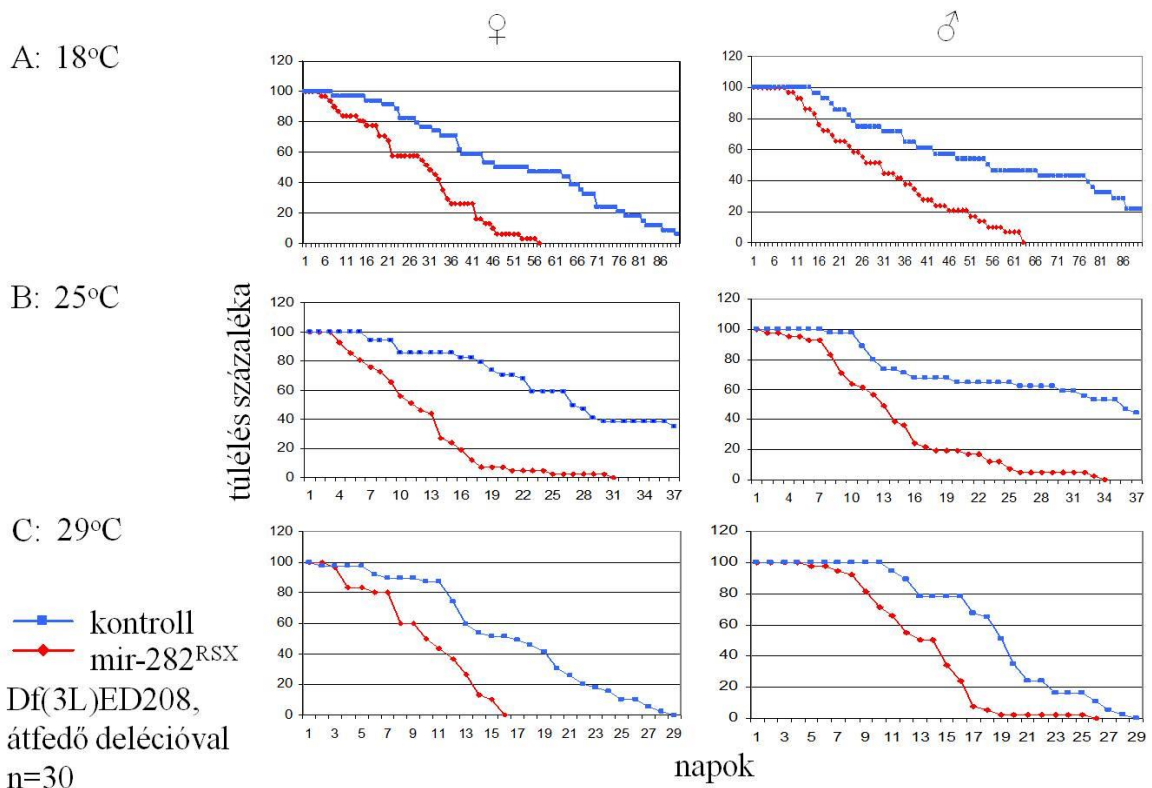
Northern-blot kísérletet végeztünk, hogy megbizonyosodjunk arról, hogy a *mir-282* lókusztól átíródó elsődleges transzkriptumról valóban képződik-e érett miRNS, illetve, hogy a *mir-282^{RSX}* null allélunk, valamint a Gal4-UAS rendszerrel való túltermelés valóban emelkedett szintű expressziót mutat-e. Az RNS mintát adult nőstényekből nyertük, a Northern-blot-ot radioaktívan jelölt miRCURY LNA miRNS próbával hívtuk elő. Összehasonlítottuk a vad típusú, a null mutáns, valamint az ivarsejtekben *mir-282*-t túltermelő (UASp>*mir-282*; *nos*>Gal4) vonalból származó *mir-282* szinteket. A Northern-blot kísérlet tanúsága szerint a vad típusú nőstényekben termelődik *mir-282*, míg a *mir-282^{RSX}* mutánsunkban transzkripció nem mutatható ki. Az UASp>*mir-282*; *nos*>Gal4 túltermelő vonalban pedig a vad típusnál kétszer nagyobb expressziót tapasztaltunk. (9. Ábra). A *mir-282* lókusztól termelődő érett *miR-282* hosszát ezen kísérlet eredményei alapján körülbelül 23-24 nukleotid hosszúságúra becsüljük, szemben az adatbázisokból ismert 28 nukleotidos adattal. Mindezt egybevetve a fenotípusos vizsgálatainkkal azt mondhatjuk, hogy a *mir-282* gén egy funkcionális transzkriptum forrása.



9. **Ábra: Az érett *miR-282* kifejeződése Northern-blot kísérletben:** vad típus: *w¹¹¹⁸*; túltermelő: UASp>*mir-282*;nos>Gal4; *miR-282^{RSX}* deléziós mutáns: *miR-282^{RSX}/mir-282^{RSX}*; negatív kontroll: *Nicotiana benthamiana* levél.

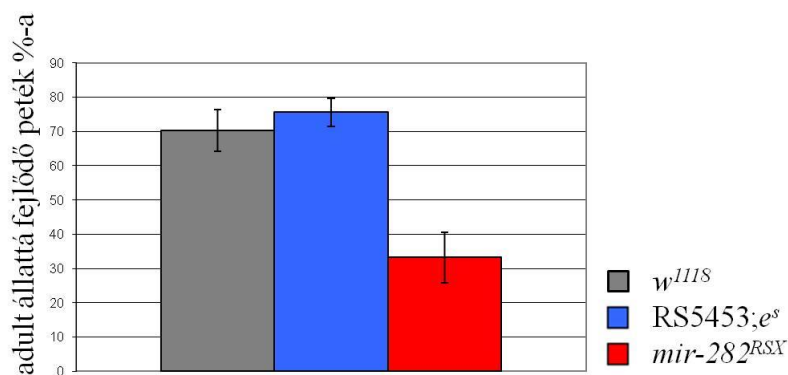
A *mir-282^{RSX}* null allél személetális és csökkent élethossz fenotípust okoz

A *mir-282^{RSX}* mutáns törzs homozigóta formában életképes és első ránézésre nem mutatott látható fenotípust sem. A törzs azonban gyöngé törzsnek bizonyult, mely fenntartása is nehézkes volt. Ezért a *mir-282^{RSX}* törzs életképességét részletesen megvizsgáltuk. Méréseink szerint a *mir-282^{RSX}* homozigóta mutáns adult muslicák rövidebb ideig élnek, mint a kontroll csoport egyedei. Élethossz csökkenést tapasztaltunk 18, 25, és 29°C-on egyaránt, mind a hímek mind a nőstények esetében (10. Ábra). A csökkent élethossz fenotípust átfedő delécióval hemizigóta formában is tapasztaltuk, ami azt jelzi, hogy az élethossz csökkenés valóban a *mir-282* gén funkcióvesztéses fenotípusa.



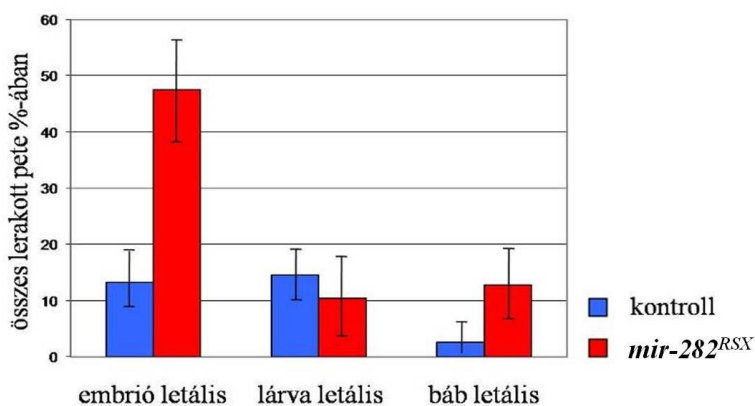
10. Ábra: Kontroll és *mir-282^{RSX}* mutánsok élethossz vizsgálata átfedő delécióval hemizigóta formában:
Kontroll: RS5453,*e^s*/Df(3L)ED208; *mir-282^{RSX}* mutáns: *mir-282^{RSX}*/Df(3L)ED208 A: Túlélés százaléka 18°-on; B: 25°-on; C: 29°-on, nőstények ill. hímek esetében.

Megfigyeltük továbbá, hogy a *mir-282^{RSX}* mutáns törzs egyedei már az adult kor elérése előtt elpusztulnak, azaz a törzs szemiletális fenotípust mutat. Méréseink szerint a lerakott petéknek csak egyharmadából fejlődik adult muslica, mely az RS5454*e^s* kontroll törzs kikelési arányának kevesebb, mint a fele. Ebben a kísérletben a belső kontrollunk mellé vad típusú (*w¹¹¹⁸*) muslicákat is bevontunk (11. Ábra).



11. Ábra: $mir-282^{RSX}$ mutánsok szemiletalítás vizsgálata belső kontroll és vad típusú törzsekhez viszonyítva: A kísérletet öt párhuzamos mintával, összesen legalább 450 egyedet vizsgálva végeztük. vad típus: w^{1118} , belső kontrollként: RS5453, e^S /RS5453, e^S ; $mir-282^{RSX}$ mutáns: $mir-282^{RSX}/mir-282^{RSX}$,

A szemiletalítás pontosabb feltérképezése érdekében életszakaszonként is megvizsgáltuk a fejlődő muslicák letalítását. A mutáns törzsben közel 50%-os embrió letalitást mértünk a kontroll alig 13%-os értékével szemben (12. Ábra). A lárva stádiumokban a mutáns és a kontroll csoport között nem tapasztaltunk jelentős eltérést, 10 és 14%-ot mértünk a mutáns ill. a kontroll törzsekben. A bábkori letalításnál azonban ismét jelentős eltérést kaptunk. A mutáns vonalban ugyanis közel 13%-os báb letalitást mértünk a kontroll 2,6%-os értékével szemben (12. Ábra).

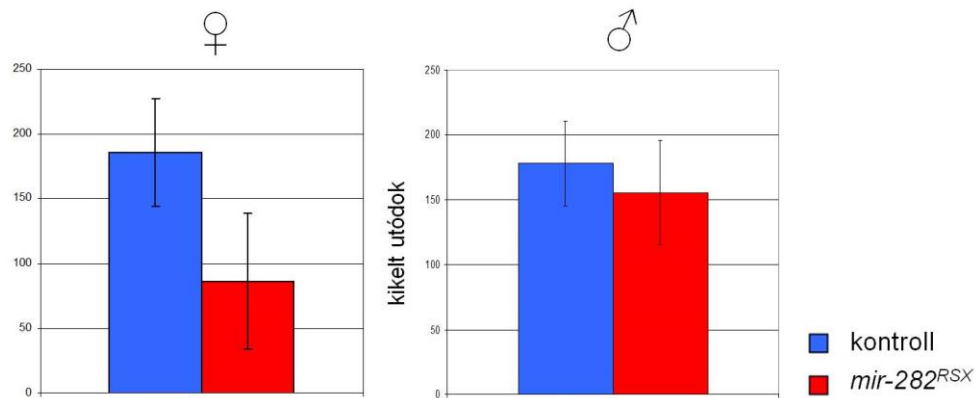


12. Ábra: A szemiletalítás vizsgálata életszakaszonként a kontrollban és a $mir-282^{RSX}$ mutánsban: Az összes, ~4500 kontroll és ~5500 $mir-282^{RSX}$ lerakott petéhez viszonyított embrió, lárva és báb letalítás mértéke látható a grafikonon a $mir-282^{RSX}$ mutáns ($mir-282^{RSX}/mir-282^{RSX}$) és kontroll (RS5453, e^S /RS5453, e^S) esetében.

A *mir-282* null allél petehozam csökkenést okoz

Mivel a *mir-282* null mutáns gyöngé és nehezen fenntartható törzsnek bizonyult, megvizsgáltuk a törzs fertilitását is. A 10 napig tartó petehozam mérések szerint a nőstények által lerakott peték száma átlagosan 55%-kal kevesebb volt a kontrollhoz képest.

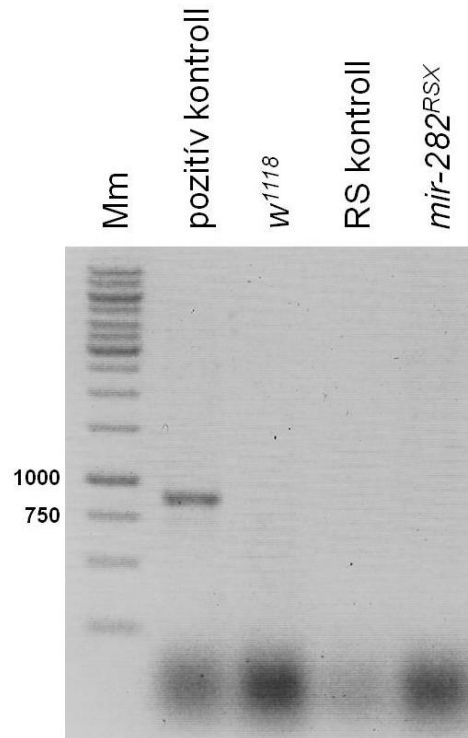
A *mir-282* null mutáns hímek normális fertilitást mutatnak (13. Ábra).



13. Ábra: A mutáns és a kontroll nőstények petehozama ill. a hímek fertilitása 10 napos vizsgálat során: A *mir-282^{RSX}* mutáns nőstények petehozama több, mint 50%-kal kevesebb a kontrollénál, míg a *mir-282^{RSX}* mutáns és kontroll hímek fertilitása közel egyenlő: *mir-282^{RSX}:mir-282^{RSX}/mir-282^{RSX}*; kontroll: *RS5453,e^s/RS5453, e^s*

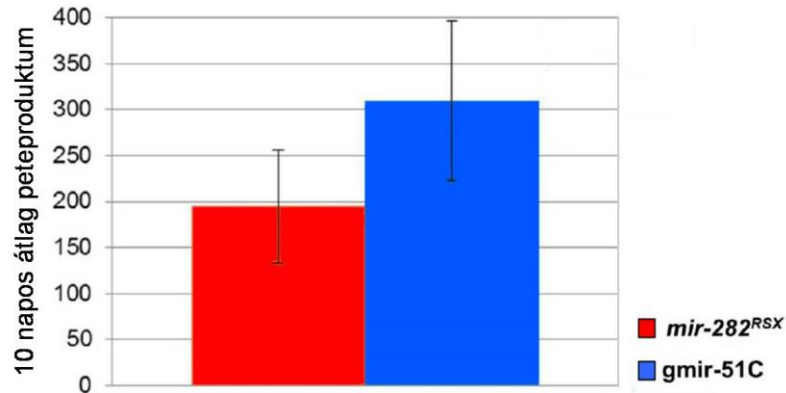
Jól ismert az intracelluláris gram-negatív *Wolbachia* baktérium reproduktív parazitizmusa rovarokban, mely a *mir-282* null mutánshoz hasonló, csökkent peteproduktumot eredményezhet (Clark et al. 2005). *Wolbachia* az általánosan használt laboratóriumi törzsekben is előfordulhat, ezért a fertilitási tesztekben használt törzseinken *Wolbachia* tesztet végeztünk. A mutáns és kontroll nőstények petefészkekének egyszerű DNS festésével az intracelluláris parazita DNS-ét kerestük a citoplazmában. Emellett a *Wolbachia* 16S rRNS-ét megkíséreltük PCR technikával kimutatni törzseinkben (14. Ábra). Mindkét kísérleti megközelítésben pozitív kontrollként használtuk a *nos>Gal4VP16* transzgén hordozó törzset, melyről korábban már kiderült, hogy *Wolbachia* fertőzést hordoz. Mind a DNS festés, mind a PCR alapú *Wolbachia* kimutatási teszt egyértelműen

bizonyította, hogy a *mir-282* mutáns törzsek kórokozómentesek, így kizártuk annak lehetőségét, hogy a csökkent petehozam okozója a *Wolbachia* fertőzés lenne.



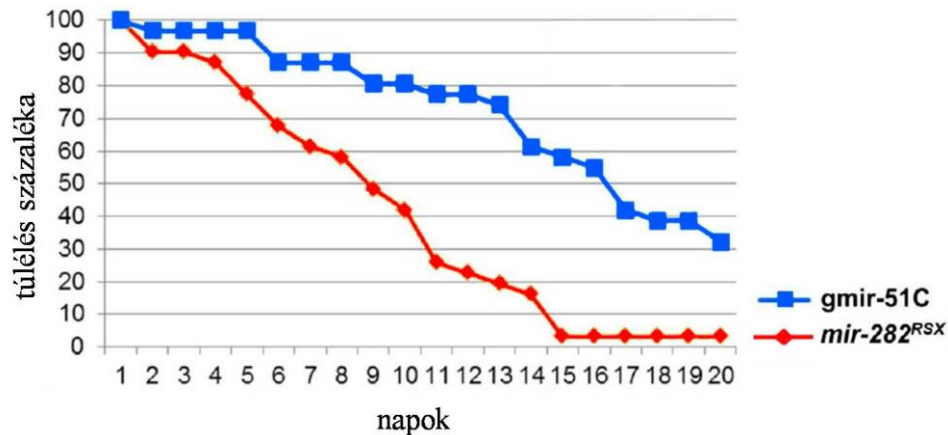
14. Ábra: *Wolbachia* fertőzés kimutatása PCR technikával: A *Wolbachia* 16S rRNS-ét kódoló genomi szakaszra specifikus PCR vizsgálattal nem mutatható ki az intracelluláris parazita jelenléte a *mir-282^{RSX}*, a kontroll és a vad típusú törzsek esetében sem. A PCR reakció működését a pozitív kontroll bizonyítja. Pozitív kontroll: nos>Gal4 transzgént hordozó törzs; vad típus: *w¹¹¹⁸*; *mir-282^{RSX}*: *mir-282^{RSX}/mir-282^{RSX}*; kontroll: *RS5453, e^s/RS5453, e^s*

A *mir-282^{RSX}* csökkent petehozam fenotípusának menekítését is elvégeztük, hogy belássuk, a fenotípusért valóban a *mir-282* hiánya a felelős. Olyan transzgenikus muslica vonalat hoztunk létre, mely tartalmazza a *mir-282* két szomszédos génje (*CG43389* és *ckd*) közötti 9,1 kilobázisos genomszakaszt, a *mir-282* elsődleges transzkriptumával együtt (*gmir-51C*). A *mir-282* null muslicákat (*mir-282^{RSX}/Df(208)*) a *mir-282*-t kifejező *gmir-51C* transzgénnel sikeresen menekítettük (15. Ábra).



15. Ábra: A *mir-282* mutáció által okozott csökkent petehozam fenotípus menekítése a *mir-282* genomi szakaszt hordozó transzgénnel: A *mir-282* genomi DNS-t hordozó *mir-282^{RSX}* transzgenikus nőstények jelentősen több petét raknak, mint a *mir-282^{RSX}* mutáns nőstények a vizsgált 10 nap alatt. *mir-282^{RSX}*: *mir-282^{RSX}/Df(208)*; *gmir-51C*: *gmir51C/+*; *mir-282^{RSX},e^s/Df(208)*

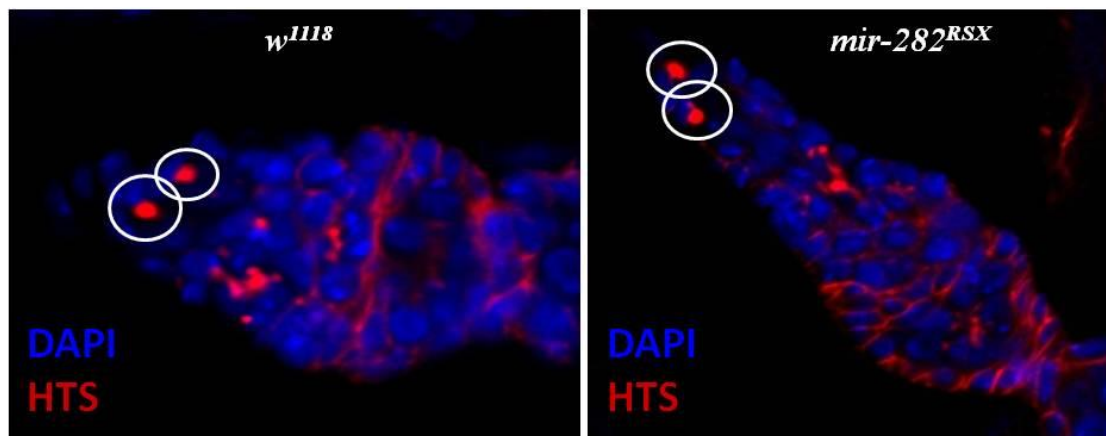
A *mir-282* genomi szakaszt hordozó transzgénnel a *mir-282* null mutáns csökkent élethosszú eredményező fenotípusát is sikeresen menekítettük (16. Ábra). A csökkent petehozam és élethossz csökkenést okozó fenotípusok sikeres menekítése minden kétséget kizárólag megmutatja, hogy a csökkent petehozam és életképesség fenotípusokért a *mir-282* hiánya felelős.



16. Ábra: A *mir-282* null mutáció által okozott csökkent élethossz fenotípus menekítése a *mir-282* genomi szakaszt hordozó transzgénnel: A *mir-282* genomi DNS-t hordozó *mir-282^{RSX}* transzgenikus nőstények életképessége a harmadik héten is még 30%-kal jobb, mint a *mir-282^{RSX}* mutáns nőstényeké. *mir-282^{RSX}*: *mir-282^{RSX}/Df(208)*; *gmir-51C*: *gmir51C/+*; *mir-282^{RSX},e^s/Df(208)*

A *mir-282* null mutáns csökkent petehozamot okozó fenotípusának fókusza a testi sejtekben van

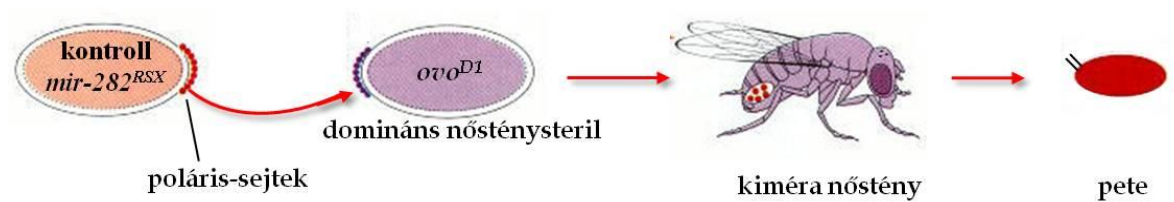
Megfigyeléseink szerint a *mir-282* mutáns nőstények napról-napra kevesebb petét raktak le a 10 napos vizsgált időszak alatt. Ennek hátterében az ősvarsejtek pusztulása, a jól ismert ún. petesejt kiürüléssel fenotípus is állhat. Ennek lehetőségét az ősvarsejtek kimutatására alkalmas Hts ellenanyaggal történő immunfestéssel vizsgáltuk meg. A kísérletben 10 napos mutáns nőstények petefészkeiket boncoltuk ki, és festettük meg Hts ellenanyaggal. Azon kívül, hogy a mutáns petefészkek csúcsi része (ún. germárium) elnyúlt, hosszúkás alakot vett föl, a pontszerű Hts festődést mutató ősvarsejtek vad fenotípust mutattak (17. Ábra). A petehozam csökkenése tehát nem az ivarvonal őssejték elvesztésére vezethető vissza.



17. Ábra: Az ősvasejtek Hts ellenanyaggal történő immunfestése: A *mir-282^{RSX}* nőstények petefészének csúcsi részében épek az ősvarsejtek: DAPI (kék) - A pontszerű HTS (piros) festődést mutató ősvarsejtek fehér karikával kijelölve. vad típus: *w¹¹¹⁸*; *mir-282^{RSX}*; *mir-282^{RSX}/mir-282^{RSX}*

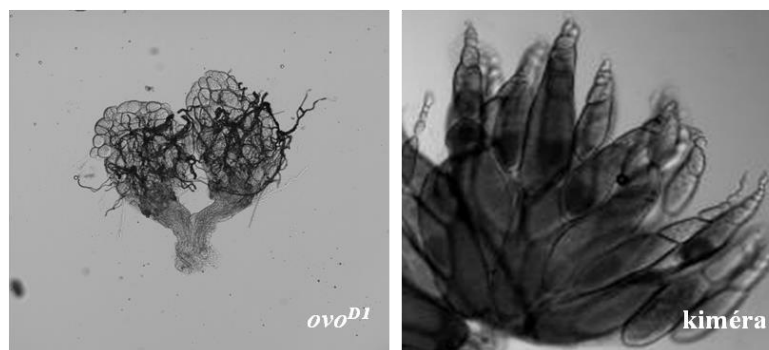
A csökkent petehozamot ivari vagy testi eredetű hiba egyaránt eredményezheti. Annak megállapítására, hogy a *mir-282^{RSX}* mutáció fókusza ivar- vagy testi eredetű sejtekben van-e, kísérleteket végeztünk embrionális ivarsejtek (ún. poláris sejt) átültetésével. Gazdaként egy ivarvonal függő, domináns nőstény steril mutációt (*ovo^{D1}*)

hordozó törzset választottunk, melyben a petesejtek érése a fejlődés egy korai szakaszában, a vitellogenezis kezdetén már leáll, így az *ovo^{D1}* mutáns nőtény érett petéket nem képes létrehozni (Komitopoulou et al. 1983). A transzplantációs kísérletek során a *mir-282^{RSX}* mutánsból és a *RS5453, e^s* kontroll törzsből származó poláris sejteket ültettünk át az *ovo^{D1}* mutációt hordozó gazdába (18. Ábra).

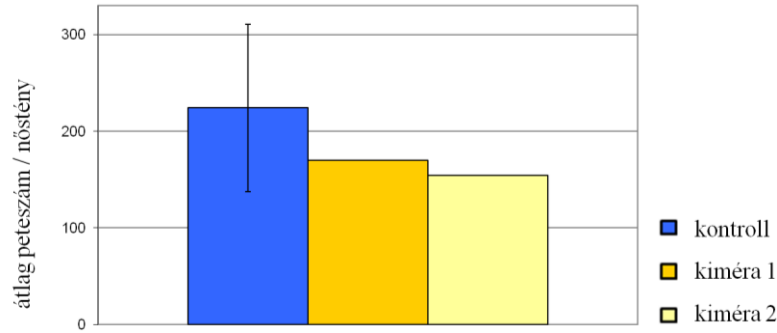


18. Ábra: A poláris sejt transzplantációs kísérletek folyamata: *mir-282^{RSX}* mutáns (*mir-282^{RSX}/mir-282^{RSX}*) és kontroll (*RS5453, e^s/RS5453, e^s*) embriók poláris sejtjeit ültettük át *ovo^{D1}* (*ovo^{D1}/ Ore-R*) domináns nőtény steril mutációt hordozó embriók csúcsi részére. Az embriókból fejlődő kiméra nőtények peterakását vizsgáltuk.

A kiméra állatokban fejlődő érett peték ezáltal csak a donorból beültetett embrionális petesejtekből származhattak (19. Ábra). A *mir-282^{RSX}* mutánsból poláris sejteket kapott kimérák peterakásának mértéke nem mutatott jelentős eltérést a kontroll törzsből származó poláris sejteket kapott kimérákhoz képest (20. Ábra).



19. Ábra: Az *ovo^{D1}* mutáns és az átültetett poláris sejtekkel rendelkező kiméra petefészke: A bal oldali képen a poláris sejt transzplantációs kísérletek gazdájának, az *ovo^{D1}* domináns nőtény steril mutációt hordozó, csökevényes petefészke látható, melyben nem képződnek érett peték, míg a jobb oldali képen a poláris sejt transzplantációs kísérletből származó kiméra nőtény jól fejlett, érett petékkal teli petefészke figyelhető meg.

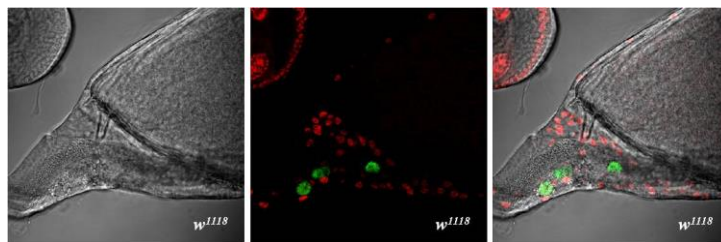


20. Ábra: A poláris sejt transzplantációs kimérák petehozama: kontroll: RS5453, e^s /RS5453, e^s ; kiméra: $mir-282^{RSX}/mir-282^{RSX}$ petéből származó poláris sejtek ovo^{Dl} gazdába átültetve

Mindebből arra következtethetünk, hogy a $mir-282^{RSX}$ mutánsok ivarvonal sejtjei funkcióképesek, vagyis a mutáció fókusza nem az ivarsejtekben, hanem a testi sejtekben van. Ezt támasztja alá továbbá az a megfigyelésünk is, hogy a funkcionális petecsövek száma a kimérákban mindig magasabb volt, mint amennyi embrionális poláris sejtet átültettünk, vagyis az átültetett poláris sejtek osztódni is képesek voltak a gonád formálódása során.

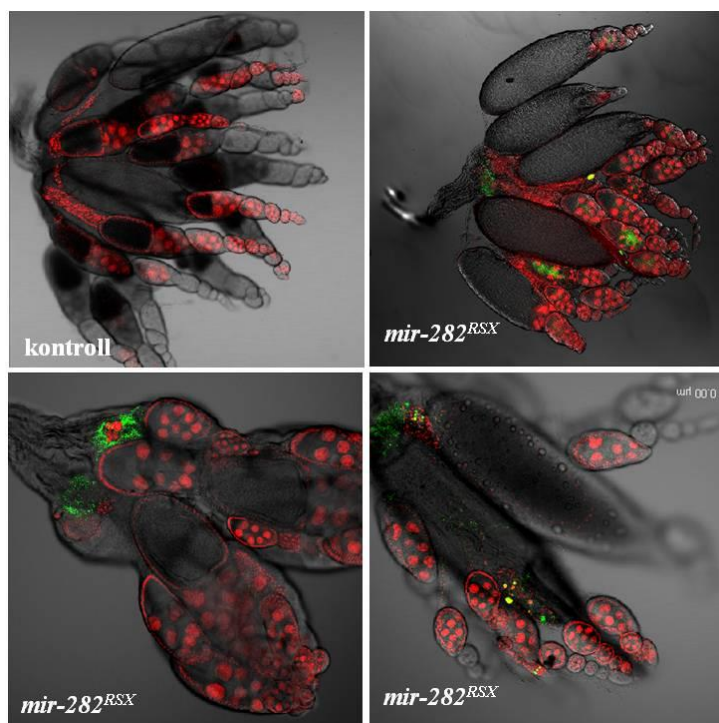
A $mir-282$ null mutáns petefészkeiben az apoptotikus aktivitás megemelkedik

Ahogy a $mir-282^{RSX}$ mutáns nőstények életkora nő, petefészkeikben egyre kevesebb petekezdeményt láttunk, ami degradációra, vagy sejthalálra utal, ezért megvizsgáltuk a mutáns petefészkek apoptotikus aktivitását. Jól ismert jelenség ugyanis a peteérés 8. stádiuma körüli ellenőrző pontban a rendellenesen fejlődő peték apoptózisa. Ebben az ellenőrző pontban ugyanis még az 'energiaigényes' nagyarányú növekedési fázis előtt bekövetkezik az abnormális petekezdemények apoptózisa. Az abnormális petefejlődésen túl a normál *Drosophila* petefejlődés során is találkozhatunk apoptózissal. A peteérés végén, miután a dajkasejtek már kiszolgálták a fejlődő petesejtet, apoptózissal eliminálódnak a petefejlődés 12. stádiumában (21. Ábra); (Nezis et al. 2000).



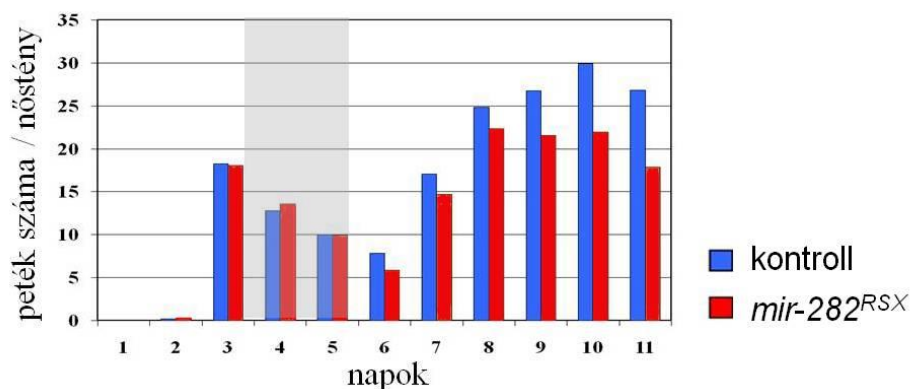
21. Ábra: Dajkasejtek apoptózisa a petefejlődés 12. stádiumában: A képeken vad típusú (w^{1118}), 12. stádiumos fejlődő pete anterior része látható a pusztuló dajkasejtekkel. Propidium jodiddal jelölt intakt DNS (piros), APoBRDU-FITC jelölt feldarabolódott DNS darabok (zöld).

Tíz napos null mutáns és kontroll nőstény muslicák petefészkében TUNEL assay segítségével vizsgáltuk meg az apoptotikus aktivitást. Vizsgálataink rámutattak arra, hogy mutáns nőstényeink petefészkében a 8. stádiumban aktív ellenőrző ponton áthaladt petesejtek is apoptotizálnak, valamint, hogy a petevezeték proximális végében apoptotikus törmelék felhalmozódása figyelhető meg. Az $RS5453, e^s$ kontroll csoportban ilyen apoptotikus aktivitást nem észleltünk (22. Ábra).



22. Ábra: Apoptotikus aktivitás kimutatása kontroll és $mir-282^{RSX}$ mutáns nőstények petefészkében: Apoptotikus aktivitás nem látható a kontroll ($RS5453, e^s/RS5453, e^s$) nőstények petefészkében. $mir-282^{RSX}$ mutáns ($mir-282^{RSX}/mir-282^{RSX}$) petefészkekben apoptotikus törmelék halmozódik fel. Propidium jodiddal jelölt az intakt DNS (piros), APoBRDU-FITC-cel jelölt a feldarabolódott DNS (zöld).

Éheztetés hatására a 8. stádiumos ellenőrző ponton a petekezdemények fokozott apoptotikus aktivitása figyelhető meg (Terashima et al. 2005). Megvizsgáltuk annak lehetőségét, hogy alultápláltság, vagy alacsony energiaellátottság állhat-e a *mir-282^{RSX}* mutáns nőtények petefészkében tapasztalt megnövekedett apoptotikus aktivitás hátterében. Megmértük tehát, hogy éheztetés hatására hogyan alakul a mutáns és a kontroll nőtényeknek petehozama. A tápanyag megvonása egy napon belül drasztikus visszaesést okoz a vad típusú muslicák petehozamában. Ha a kísérleti állatokat ismételten gazdag táptalajra helyezük, a petehozam gyorsan visszaáll a normál szintre (Drummond-Barbosa & Spradling 2001). Két napos élesztőtmentes táptalajon való éheztetés hatására mind a mutáns, mind a kontroll nőtények peterakása visszaesett, majd teljes táptalajra visszahelyezve őket, a petehozam görbéjének kinetikája mindkét esetben hasonló felfutást mutatott (23. Ábra). Az újbóli gazdag tápanyag-ellátottság ellenére azonban a *mir-282^{RSX}* mutáns nőtények egyre kevesebb petét raknak a kontrollhoz képest, ahogy ezt korábbi kísérleteink során is megfigyeltük már.



23. Ábra: Tápanyag megvonás hatásának vizsgálata a nőtények petehozamára: A *mir-282^{RSX}* mutáns nőtények peteproduktuma éheztetés hatására a kontroll nőtényekhez hasonlóan alakul: A muslicákat a kikeléstől számított 4. és 5. nap (szürke sáv) élesztőtmentes, később ismét gazdag táptalajon tartottuk. kontroll: RS5453,*e*^s/RS5453,*e*^s; *mir-282^{RSX}*; *mir-282^{RSX}/mir-282^{RSX}*.

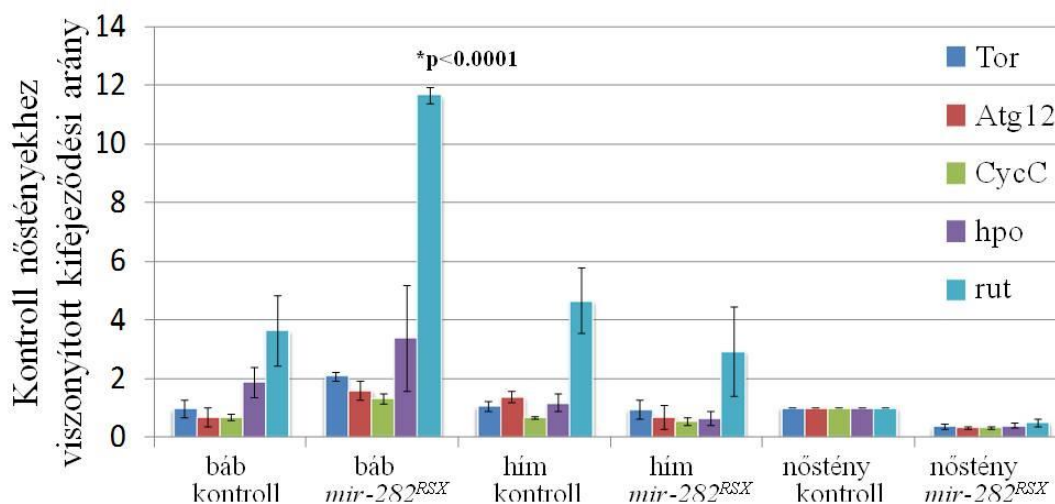
A kísérlet eredményéből arra következtettünk, hogy a *mir-282^{RSX}* mutánsok normál fiziológiai reakciót képesek mutatni az átmeneti tápanyag megvonásra, vagyis a *mir-282^{RSX}* mutáns esetében a megnövekedett apoptotikus aktivitás háttérében nem a megváltozott energiaellátás áll. A petevezetőnél az apoptotikus törmelék fölhalmozódása, valamint a 8. stádiumos ellenőrző pont utáni apoptózis így inkább peterakási defektusra utal, mint abnormális petefejlődésre.

A *mir-282* a *rutabaga* gén negatív regulátora

Annak érdekében, hogy kísérletesen bizonyítsuk a *mir-282* feltételezett negatív génszabályzó funkcióját, kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakcióval (RT-PCR) meghatároztuk néhány feltételezett céltranszkriptum kifejeződési szintjét *mir-282^{RSX}* mutáns és kontroll egyedekben. A *miR-282* bioinformatikai módszerekkel előrejelzett 358 célgénjének listáját az EMBL MicroCosm Targets adatbázisa közli (Enright et al. 2003; Griffiths-Jones et al. 2008). A feltételezett célgének listáját génontológiai besorolásuk (a géntermékek biológiai valamint molekuláris funkciója és lokalizációja) alapján szűrtük, figyelembe véve a *mir-282* mutáns és túltermelt fenotípusait, kifejeződését bábkorban és felnőtt nőstényekben. A listából olyan célgéneket választottunk, melyek minél kevesebb másik miRNS által szabályozottak (maximum másik négy). Ezen kritériumok alapján öt jelölt célgént választottunk a további RT-PCR vizsgálatokhoz: *Target of rapamycin (Tor)*, *Autophagy-related gene 12 (Atg12)*, *Cyclin C (CycC)*, *Hippo (hpo)*, és *rutabaga (rut)*. A *Tor (target of rapamicin)* a róla elnevezett jelátviteli útvonal központi génje. A Ser/Thr protein kinázt kódoló génnek fontos szerepe van a növekedésben, az anyagcsere folyamatok szabályzásában, a stressz helyzetekhez történő alkalmazkodásban (mint pl. éhezés), valamint autofág folyamatok elindításában. Mindezek által kihatással van az őssejtek

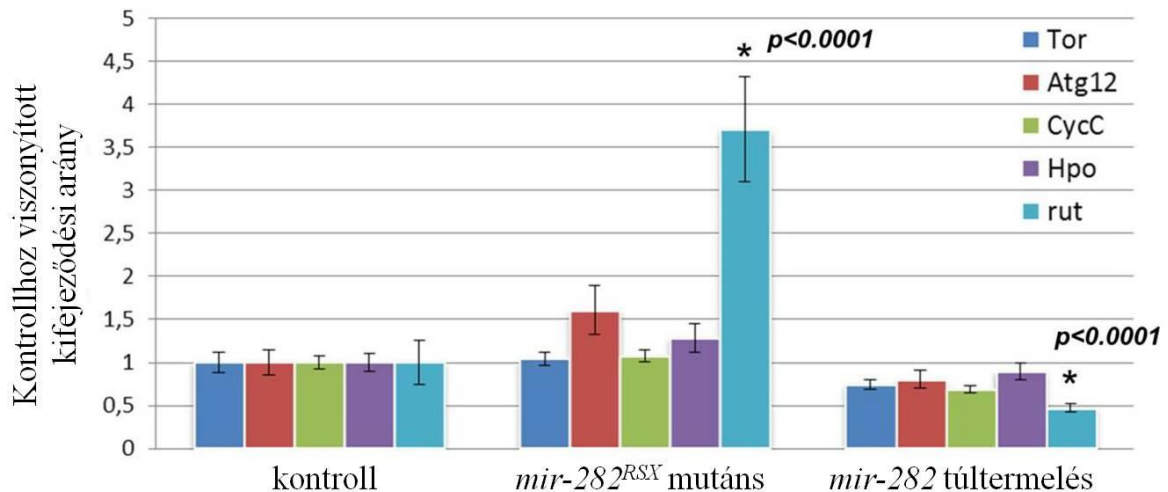
fenntartására, a nőstények termékenységre és a muslicák élettartamára (LaFever et al. 2010; Partridge et al. 2010; Mulakka et al. 2014). Az *Atg12* (*AuTophaGy related gene 12*) egy ubiquitinszerű fehérjét kódol, mely az autofágia során az autofagoszóma kialakulásához szükséges (Mulakka et al. 2014). A *CycC* (*CyclinC*) gén terméke a petefészkekben és az embrióban fejeződik ki és a sejtciklus szabályzásában vesz részt (G1/S valamint G2/M átmenet)(Lahue et al.1991; Liu et al 1998). A *hpo* (*hippo*) egy Ser/Thr protein kinázt kódol, ami sejtosztódást és apoptózist szabályoz (Wu et al. 2003). A *rutabaga* (*rut*) egy Ca^{2+} /kalmódulin függő adenil ciklázt kódol, mely az ATP - cAMP átalakulást katalizálja. Fő kifejeződési helye az agyban a gombatest, bár alacsonyabb szinten test szerte megtalálható (Han et al. 1992; Graveley et al. 2011). A *rutabaga* mutáns alléljai életképesek és fertilisek, azonban gyengén teljesítenek memória és tanulási tesztekben. A *rut* gént is ez alapján azonosították (Livingstone et al. 1984; Feany et al. 1990; Levin et al. 1992).

A *mir-282^{RSX}* mutánsokban a szabályozott gének transzkripciós aktivitásának növekedését vártuk. A transzkripciós változásokat a vizsgált géneknek a kontroll nőstényekben mért transzkripciós szintjére normalva értelmeztük. A kiválasztott célgének kifejeződési szintjének kvantitatív mérése megmutatta, hogy a *rut* gén transzkripciós szintje az elvárt módon nőtt a *mir-282^{RSX}* mutáns bábokban (24. Ábra). A többi célgén kifejeződési szintje csak kisebb különbséget mutatott báb, illetve adult korban. A transzkripciós mérésekből arra következtettünk, hogy a *mir-282* a *rutabaga* gén negatív regulátora. A szabályzásra feltételezésünk szerint a metamorfózis során kerül sor.



24. Ábra: A feltételezett céltranszkriptumok kifejeződési szintjének változása kontroll és *mir-282^{RSX}* mutáns bábokban, hímekben és nőstényekben kvantitatív real-time PCR vizsgálat során: A nőstényekben mért egységnyi kifejeződési szinthez képest láthatók a gének változó kifejeződési szintjei (Y-tengely) a kontroll (RS5453,*e^s*/RS5453,*e^s*) és *mir-282^{RSX}* mutáns (*mir-282^{RSX}*/*mir-282^{RSX}*) bábokban, hímekben ill. nőstényekben (X-tengely). (T-próba: **p*<0.0001)

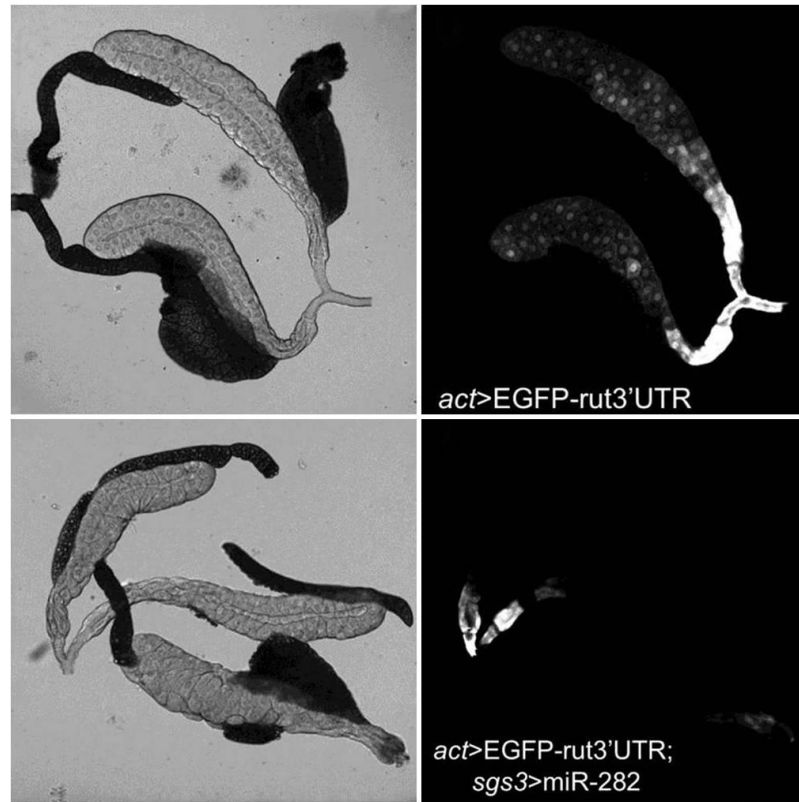
A *rutabaga* gén *miR-282* általi szabályzását megerősítendő, megmértük a *rutabaga* kifejeződési szintjét *mir-282*-t túltermelő bábokban is. Mivel a *rutabaga* maga is legfőképp idegrendszeri kifejeződést mutat, idegrendszer-specifikus *elav*>Gal4 meghajtóval termeltettük túl a *mir-282*-t (*elav*>Gal4; UAS*t*>*mir-282*; +). A kísérletben kontrollként *mir-282^{RSX}* mutáns bábokat is bevontunk, valamint megvizsgáltuk a négy másik feltételezett céltranszkriptum kifejeződési szintjét is. A metamorfózis során az idegrendszerben ektopikusan túltermelt *mir-282* hatására a *rutabaga* mRNS szintje szignifikánsan csökkent (25. Ábra).



25. Ábra: A feltételezett céltranszkriptumok kifejeződési szintjének változása *mir-282^{RSX}* mutáns és *mir-282-t* túltermelő bábokban: A kontroll (RS5453,*e^s*/RS5453,*e^s*) bábokban mért egységnyi kifejeződési szinthez képest láthatók a gének változó kifejeződési szintjei (Y-tengely) a *mir-282^{RSX}* mutáns (*mir-282^{RSX}/mir-282^{RSX}*) valamint a *mir-282-t* az idegrendszerben túltermelő (*elav>Gal4;UAS>mir-282*;+) bábokban (X-tengely). (T-próba: **p*<0.0001)

A *mir-282* és a *rutabaga* közti szabályzó kapcsolat további megerősítése érdekében a *rutabaga* 3'UTR-ében lévő *mir-282* célszekvencia érzékenységét transzgenikus konstrukcióval is teszteltük. Olyan muslica törzset hoztunk létre, melyben az EGFP-t kódoló szekvencia mögé klónoztuk a *rutabaga mir-282* célszekvenciát tartalmazó 3'UTR-ét (*act5C>EGFP-rut3'UTR*). Konstrukciónkban a transzgén az *actin5C* általános kifejeződést biztosító promóteréről fejeződött ki. A kísérlet során nyálmirigy-specifikus *sgs3>Gal4* forrással termeltettük a *mir-282-t act5C>EGFP-rut3'UTR* transzgént hordozó legyek nyálmirigyében, és vizsgáltuk a transzgénről expresszálandó EGFP fluoreszcenciájának mértékét. Kontrollként az EGFP-t általánosan kifejező *act5C>EGFP-rut3'UTR* transzgenikus legyeket használtuk *mir-282* aktiváció nélkül (26. Ábra). A kontroll egyedek nyálmirigyében erős fluoreszcens jel látható. A *mir-282-t* túltermelő egyedek nyálmirigyében azonban a fluoreszcens jel eltűnését ill. jelentős gyengülését

tapasztaltuk, mely újabb egyértelmű bizonyítékaul szolgál a *mir-282* és a *rutabaga* közötti negatív szabályzásra.



26. Ábra: *rut* 3'UTR-t tartalmazó EGFP transzgén kifejeződés *Drosophila* lárva nyálmirigyében: A felső képen az EGFP kifejeződése látható a nyálmirigyben (*act5C>EGFP-rut3'UTR*; *sgs3>Gal4*). Az alsó képen az EGFP szintjének visszaesése látható a nyálmirigyben túltermelt *mir-282* hatására (*act5C>EGFP-rut3'UTR/UAS>mir-282*; *sgs3>Gal4/+*).

EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

A miRBase nevű miRNS adatbázisban folyamatosan tüntetnek föl újabb és újabb miRNS predikciókat, és ezzel párhuzamosan revízió alá is vonják az eddigi adatokat. A bizonytalan, kísérletesen nem alátámasztott miRNS jóslatokat elvetik, törölik az adatbázisból (Farazi et al. 2011). A *Drosophila mir-282* létezése kísérleti eredményeink következtében már nem kérdés. A *Drosophila melanogaster mir-282* nevű miRNS génjének molekuláris (RT-PCR) jellemzése során beláttuk, hogy a prediktált *mir-282* gén a bábban a metamorfózis során, valamint felnőtt nőstényekben fejeződik ki. A *mir-282* régió vizsgálatából arra következtettünk, hogy a *mir-282* génje nem fed át szomszédos fehérjekódoló génnel. A *mir-282* körül azonban létezik egy 9,4-27 kb hosszú konzervált, fehérjekódoló gént nem tartalmazó régió, mely promóter és egyéb fontos szabályozó elemek jelenlétére utalhat. Az önálló kifejeződést támasztja alá a modENCODE adatbázisban feltüntetett egyes típusú határoló elem a *mir-282*-től 5' irányban (Nègre et al. 2010). Nègre és munkatársai egyes típusú határoló elemként jegyzik azokat a DNS szakaszokat, ahova képesek bekötni a CP190, BEAF-32 ill. CTCF inzulátor-asszociált fehérjék, így választva el egymástól különbözőképpen kifejeződő géneket. Az ID003082 azonosítóval rendelkező szigetelő elem a *mir-282*-től 5' irányban, a vele ellenkező orientációban lévő második és harmadik gének (CG12078 és CG17746) között helyezkedik el. A határoló elemen belül eső szomszédos CG12078-as gén a *mir-282*-vel ellenkező orientációja megerősíti feltételezésünket, miszerint a *mir-282* önálló transzkripcióss egységként fejeződik ki.

A dolgozat összeállítása közben jelent meg a Flybase legújabb génannotálásában (FB 2014_06) a CG43389-es gén a *mir-282*-től 5' irányban, annak közvetlen szomszédjaként. A

CG43389-nek még nem jelzik homológját egyetlen rokon fajban sem. A feltételezett gén szekvenciájának bizonyos részei a melanogaster alcsoportban mutatnak kisebb homológiát, de távolabbi fajokban már egyáltalán nem találni homológ szakaszokat. Ezért úgy gondoljuk, hogy ez az újonnan jósolt gén nem képezheti részét a *mir-282* transzkriptumnak.

Génszerkezeti megfigyelésekre irányuló kísérleteink eredménye összhangban áll a Kadener és munkatársai által publikált adatokkal (Kadener et al. 2009). Ha a miRNS képződést befolyásoló kulcsfehérjét, a Droshát poszt-transzkripcionálisan csendesítették, többek között a *mir-282* elsődleges transzkriptumának felhalmozódását tapasztalták S2 sejtekben. A *pri-mir-282* tehát a Drosha-Pasha komplex szubsztrátja, és ez önmagában is kizárja annak lehetőségét, hogy biogenezise esetleg egy fehérjekódoló génnel összekapcsolódna. Az intronokba beépült miRNS-ek, a mirtronok ugyanis Drosha független módon keletkeznek (Flynt et al. 2010). Kadener kísérletei tehát megerősítik az általunk tett megállapítást, miszerint a *mir-282* egy önálló miRNS gén. Közleményünkben ezenkívül a felhalmozódott *pri-miRNS* hosszát meghatározva egy viszonylag tág becslést is adnak az elsődleges transzkriptumok méretéről: a *pri-miRNS* méretét 1-5 kilobázisos tartományba helyezik el. Az általunk meghatározott génméret (4918bp) jól illeszkedik a Kadener és munkatársai által közölt eredményekhez. A Flybase adatbázisában korábban a CD43626-es miRNS gén mérete jócskán eltért az általunk meghatározottól. A legfrissebb, RNA-Seq adatokra hagyatkozó Flybase verzióban azonban már jobban egyezik az adatbázisban megadott (5165bp) és a saját adatunk (4918bp) a *mir-282* génjének méretéről. Az RNA-Seq által meghatározott értékek a polyA+ transzkriptum nagy áteresztőképességű szekvencia analízis eljárások eredményeire alapoznak, míg mi a RACE technika segítségével a *mir-282* CAP struktúrájának és poly A végének pontos térképezését végeztük el.

A miRBase adatbázisa az érett *miR-282* molekulát korábban 28 nukleotid hosszúnak írta le (a legújabb verzióban már csak 24 nukleotid hosszúként szerepel), míg az új szekvencia meghatározási eljárások adatai szerint az érett *miR-282* mindössze 22 nukleotid hosszú. Az érett *miR-282* kimutatására irányuló Northern-blot kísérleteink során 23-24bp-os miRNS-t tudunk kimutatni. A miRNS-ek 3' végi heterogenitása, azaz 3' végi változó hossza ismeretes. Ezt a jelenséget korábban a pontatlan Drosha vagy Dicer hasításnak tulajdonították. Ma már tudjuk, hogy a miRNS-ek 3' végéhez a genom által nem kódolt, ún. templát nélküli adenzinok is kapcsolódhatnak (Fernandez-Valverde et al. 2010; Kozomara & Griffiths-Jones 2011), ami a heterogenitás hátterében állhat. Han és munkatársai 2011-ben kimutatták, hogy az esetek egy részében a néhány nukleotidos méretkülönbséget a Nibble nevű 3'exoribonukleáz elégtelen funkciója is okozhatja. A *Drosophila* miRNS-ek több mint egy negyede ugyanis, az AGO1-hez való kapcsolódása után, keresztülmegy még egy 3' végi hasításon. A RISC komplex felépülésének utolsó mozzanataként tehát, a Nibble fehérje feltételezett kofaktoraival együtt határozza meg a miRNS végső méretét (Han et al. 2011).

A *mir-282* hiánya *Drosophilában* szemiletalitást, élethossz csökkenést, valamint csökkent peterakást, míg a *mir-282* általános, ektopikus kifejeztetése lárvakori letalitást okoz. Esslinger és munkatársai a közelmúltban a *Drosophila mir-277*-ről bizonyították, hogy szintén élethossz szabályzó szerepe van, mégpedig az elágazó láncú aminosavak metabolizmusán keresztül. A szabályozás mértéke relatíve mérsékeltnek mondható, ahogy az egy mérsékelt termelő miRNS-től elvárható. A magasabb rendűekben nem konzerválódott *mir-277* jelentőségét a szerzők inkább a hosszútávú adaptációban látják, mint a gyors változások követésében (pl. tápanyag-ellátottságban bekövetkezett

változások); (Esslinger et al. 2013). Ezen következtetések ugyanígy igazak lehetnek az általunk vizsgált *mir-282* esetében is. A *mir-277*-hez hasonlóan a *mir-14* is metabolikus szabályzó funkcióval rendelkezik, és kihat az életképességre is. A mutáns *Drosophila mir-14* törzs fenotípusa abnormális lipid anyagcsere, és szintén csökkent élettartam (Xu et al. 2003). Egy fonálféreggel végzett genetikai tanulmány szerint bizonyos miRNS-ek csökkent kifejeződése vagy túlermelése érintheti a fonálférgek élethosszát a DNS károsodáson és az inzulin/IGF útvonalon keresztül is. A tanulmány szerzői ezen miRNS kör jelentőségét, optimalizáló szerepét extrém, stressz körülmények között (hőmérséklet, táplálékhiány) találták (de Lencastre et al. 2010). A *Drosophila mir-282* esetében azonban hasonló extrém körülmény fenotípus módosító hatását nem tapasztaltuk, a *mir-282* gén szerepe normál körülmények között bizonyítható.

A *mir-282^{RSX}* mutáns nőtények jelentősen kevesebb petét képesek rakni a kontroll csoporthoz képest. A csökkent petehozam háttérében megnövekedett apoptotikus aktivitást figyeltünk meg a mutáns nőtények petefészkében, melynek oka testi eredetű, talán a cAMP szabályzás révén. A szómafüggő csökkent petehozam fenotípus és a *mir-282* jelenléte a petefészekben és a korai embrióban arra utal, hogy a *Drosophila mir-282* anyai hatású miRNS gén, melynek funkciója nem szükséges a peteképződéshez, de az embrionális fejlődés első lépéseihez már igen (Ruby et al. 2007; Fernandez-Valverde et al. 2010).

A miRNS-ek funkciójának és célgénjeinek meghatározása nem könnyű feladat. A mutáns egyedek gyakran egyáltalán nem, vagy csak enyhe fenotípust mutatnak a vad egyedekhez képest (Miska et al. 2007). A legtöbb miRNS általában csak kevesebb, mint kétszeres fehérjeszint változást okoz (Selbach et al. 2008). Egy-egy miRNS-nek több száz célgént jósolnak, melyek azonban a különböző adatbázisokkal meglehetősen gyenge

átfedést mutatnak (Baek et al. 2008; Chi et al. 2009; Hammell 2010b). A miRNS célgéneket jósló programokkal szemben gyakran megfogalmazódó kritika, hogy a bioinformatikai adatok alapján megtalált célgén valójában normál körülmények között az élőlényben feltételezett szabályzó miRNS-ével soha nem is fejeződik ki együtt (Bushati & Cohen 2007; Jost et al. 2011). Ugyanis a miRNS-ek kifejeződése, a célgénekéhez hasonlóan szövet- és fejlődési állapot specifikus lehet. A sejtekben fellelhető miRNS-ek mennyisége mérések szerint, akár 10-30000 kópia között is változhat (C. Chen et al. 2005; B. D. Brown & Naldini 2009). Ezen ismeretek alapján hajtottuk végre a *mir-282* célgénjeinek keresését. Egyéb szűrő feltételeket is alkalmazva csak azon gének transzkripcionális szintjét vizsgáltuk meg mutáns háttéren, amelyek kifejeződése a *mir-282* kifejeződésével átfedhet. Bioinformatikai és molekuláris módszerekkel a *mir-282* célgénjeként a *rutabaga* gént azonosítottuk, mely a központi idegrendszerben feldúsulást mutató adenil-cikláz kódolja. A *mir-282^{RSX}* mutáns bábokban a kontrollhoz képest a *rut* gén háromszoros transzkripció kifejeződési szintjét tapasztaltuk. Mivel a *rut* mRNS-ének 3'UTR-ében négy különböző miRNS kötőhely jelenlétét jósolják, és a *mir-282*-nek is számos, egyéb lehetséges célgénjét jelezték előre, ezért nehéz megmondani, hogy a *rut* szabályzása lenne-e a *mir-282* fő feladata. Adataink alapján elképzelhető, hogy a *mir-282* egyik funkciója az adenil cikláz aktivitás szabályozása az idegrendszerben a metamorfózis során. Erre utal a *mir-282^{RSX}* törzsben a kontrollhoz képest ötszörösére emelkedett bábkori letalítás, melyet a teljes átalakulás folyamán létrejövő fejlődési rendellenesség okozhat. Ezt az elképzelésünket erősíti, hogy a holometabola csoportban, a teljes átalakulással fejlődők körében konzerválódott *mir-282* báb korban aktív. A rendelkezésünkre álló lehetőségekkel a *mir-282* poszttranszkripció szabályzó hatását tudtuk csak vizsgálni, a transláció szinten

kifejtett hatásokat nem. Könnyen elképzelhető, hogy a többi jelölt célgént, vagy azok egy részét csak transzlációs szinten szabályozza a *mir-282*. A *lin-4* miRNS anélkül csökkenti a *lin-14* fehérje mennyiségét, hogy a *lin-14* mRNS szintjét befolyásolná (Lee et al. 1993; Wightman et al. 1993). Ma már tudjuk, hogy csekély mértékben mégiscsak érinti a *lin-14* mRNS szintjét is, de sok más példa is ismert arra, hogy a mRNS szint parányi változása mellett a fehérjeszintben jelentős változás figyelhető meg (Valencia-Sanchez et al. 2006). A transzkripció gátlás és a transzláció gátlás jelentősége még vita tárgyát képezi a miRNS kutatásban, de a párhuzamos kvantitatív proteomikai és transzkriptomikai analízisek a legtöbb esetben ugyanazokat a miRNS céltranszkriptumokat azonosítják (Esslinger et al. 2013).

ÖSSZEFOGLALÓ

A sejtek dinamikusan változó génkifejeződési mintázatainak kialakításában a szabályozó fehérjék szerepe már régóta ismert. Az utóbbi bő egy évtizedben azonban RNS alapú regulátor komplexeket azonosítottak, melyek szintén részt vesznek a génaktivitás szabályozásában. A rövid, nem transzlálódó RNS-ek csoportjába tartozó mikroRNS-ek (miRNS) néhány fehérjével komplexet alkotva poszttranszkripcionális szinten fejtik ki negatív szabályozó hatásukat.

A miRNS-ek jellegzetes, hajtú alakú átmeneti formán keresztül képződnek. Ez a jellemző másodlagos szerkezet tette lehetővé, hogy bioinformatikai módszerekkel több ezer új miRNS létezésének előrevetítsék emberben, állatokban, növényekben és vírusokban. Egy-egy miRNS-nek több száz célgénjét is jósolják. Ily módon hatalmas adathalmaz jött létre, melynek legnagyobb része még kísérletes megerősítésre és értelmezésre vár. A miRNS-ek érési folyamatairól, a génszabályozásban betöltött szerepéről, a szabályozott gének köréről általánosságban egyre szélesebb körű ismereteink vannak, azonban az egyedi miRNS-eket kódoló gének terén még szegényes a tudásunk. Célul tűztük ki ezért a *Drosophila mir-282* mikroRNS-t kódoló gén részletes analízisét, szerkezeti és funkcionális vizsgálatát.

A *Drosophila melanogaster mir-282* génjének bizonyítottuk transzkripció aktivitását, kifejeződésének és elsődleges szerkezetének leírásával alátámasztottuk a korábbi gén előrejelzést. A *mir-282* elsődleges transzkriptumáról beláttuk, hogy nem kapcsolódik a vele szomszédos fehérjekódoló gén exonjaival, vagyis önálló transzkripció egységként íródik át RNS-sé. Különböző fajokban eltérő méretű intergenikus régiókban helyezkedik el a *miR-282*-t kódoló gén, bioinformatikai vizsgálataink a rokon fajokban is az

önálló génkifejeződést erősítik. A RACE technika egy továbbfejlesztett változatával meghatároztuk az elsődleges transzkriptum hosszát, mely az 5' végi CAP struktúrától a 3' végi polyA végig 4,9 kb hosszú.

A *miR-282* gén szerkezeti jellemzése mellett másik fő célunk a gén funkciójának megismerése volt, újonnan indukált *mir-282*-re specifikus deléciók, valamint ektopikus expressziót biztosító transzgenek segítségével. Bizonyítottuk, hogy a *mir-282* lókuszt funkcionális transzkriptumot kódol, mely befolyásolja az életképességet, az élethosszt és a petehozamot, míg a *mir-282* általános, ektopikus túltermelése letalitáshoz vezet a második lárva stádiumban. A mutáns fenotípusok menekítése céljából létrehoztunk olyan transzgenikus legyeket, melyek a *mir-282* elsődleges transzkriptumát is magába foglaló genomszakaszt tartalmazzák. A transzgen a mutáns háttérű legyekben sikeresen menekítette a megrövidült élethossz és csökkent petehozam fenotípusokat, megerősítve ezzel, hogy a mutáns fenotípusokért a *mir-282* hiánya felelős. A *mir-282* deléciós mutáns nőstények csökkent petehozamának háttérében jelentős, megnövekedett apoptotikus aktivitást figyeltünk meg petefészkeikben. Poláris-sejt transzplantációs kísérletekkel bizonyítottuk, hogy a *mir-282* mutáció fókusza nem az ivarsejtekben, hanem a testi sejtekben van.

Megvizsgáltuk a *mir-282* potenciális célgénjeit is, és a *mir-282* negatív génszabályozó funkcióját kísérletesen bizonyítottuk. A *mir-282* több száz, bioinformatikai módszerrel jóslott célgénje közül öt jelöltet választottunk ki. Jelöltjeinkkel *mir-282* mutáns és vad genetikai háttéren génexpressziós vizsgálatokat végeztünk, mely során a *rutabaga* esetében sikerült bizonyítani a *mir-282* negatív szabályzó hatását. A *rutabaga* egy idegrendszer specifikus adenil cikláz. A *rutabaga* mRNS-ében négy különböző, lehetséges miRNS kötő hely van, és bár a *mir-282*-nek is sok más célgénjét jósolják, eredményeink

alapján mégis úgy feltételezzük, hogy a báb korban is kifejeződő *mir-282* az idegrendszeren keresztül hatva fejti ki szabályzó hatását a metamorfózis során.

SUMMARY

The role of proteins in the formation of dynamic gene expression patterns in cells has been known for a long time. However, only in the past few decades that RNA-based regulatory complexes were identified, which have shown to be involved in regulation of gene expression. MicroRNAs (miRNAs), a large class of short, non-protein coding RNAs, inhibit gene expression post-transcriptionally through sequence specific base-pairing with target mRNAs.

The approximately 22-nucleotide long mature miRNAs are derived from a hairpin-loop precursor. This specific secondary structure enabled bioinformatics to predict thousands of new miRNAs in humans, animals, plants, and even viruses. Each miRNA has hundreds of predicted target genes. This lead to the generation of a huge dataset, however these still need to be interpreted and verified experimentally.

We have gained an understanding of the miRNA maturation process, and their role in gene regulation, the scope of gene regulation; however, there is still very little known about the miRNA coding genes.

Our aim therefore was a detailed structural and functional analysis of *Drosophila melanogaster mir-282* microRNA gene.

The earlier gene prediction of *Drosophila mir-282* was confirmed by the characterization of the hairpin-loop structure of the pre-miRNA and by observing a weak expression of the *mir-282*. We have demonstrated the transcriptional activity of *mir-282* gene and identified the primary miRNA. *mir-282* is not connected to any exon of the adjacent protein coding gene (*cracked*), so there is a separate transcriptional unit that is transcribed into RNA. Although the *mir-282* encoding gene is located in different species in

different size of intergenic regions; our bioinformatic analysis revealed separate expression in holometabola insects. The length of the primary transcript was determined by an enhanced version of the RACE technique. The primary *mir-282* transcript is 4.9 kb from its 5' CAP structure to the 3' terminal polyA tail.

In addition to the structural characterization of the *mir-282* gene, our other major goal was to elucidate the function of the gene via the introduction of gene-specific deletions. We have showed that the *mir-282* locus encodes a functional transcript that could affect viability, lifespan and female's egg yields. While the general, ectopic overexpression of *mir-282* leads to lethality in the second larvae stage. Our viability experiments indicated shortened adult lifespan, as well as semi-lethality before reaching adult stage. Mutant females exhibited reduced egg production. Furthermore we have generated transgenic flies carrying a genomic fragment containing *mir-282* primary transcript. This genomic fragment was able to rescue both the reduced viability and the decreased egg production phenotypes in the mutants confirming that these phenotypes are indeed caused by the loss of *mir-282* function.

In the background of the decreased egg yield in these flies, we have observed a remarkable increase in apoptotic activity of the *mir-282* mutant female ovaries. Pole cell transplantation experiments demonstrated that *mir-282* mutant's germ line is not impaired, whereas the somatic cells of the ovaries are unable to function properly, likely due to nervous system deficiency. To support this hypothesis, we have investigated the potential target genes of *mir-282* as well.

The list of computationally predicted targets for *mir-282* was manually screened, taking in account our findings about *mir-282*. Five candidates from the hundreds of

potential *mir-282* target genes were selected. Gene expression studies were performed on these genes that revealed the *rutabaga* gene, as a target of *mir-282*. The *rutabaga* gene is a nervous system-specific adenylate cyclase. The *rutabaga* mRNA has predicted regulating sites for four different potential miRNAs and *mir-282* has many other potential targets, probably the regulation of *rutabaga* is not the only function of *mir-282*. However, based on our data, we hypothesize that one of the main functions of *mir-282* is the regulation of adenylate cyclase activity in the nervous system during metamorphosis.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálás köszönet témavezetőmnek, Dr. Erdélyi Miklósnak, hogy lehetőséget biztosított doktoranduszi tanulmányaim elvégzéséhez, ellátott tanácsaival és megosztotta tapasztalatait. Köszönöm, hogy dolgozatomat kritikus szemmel átnézte, korrigálta.

Köszönöm Dr. Vilmos Péternek a közös munkát, a sok hasznos tanácsot, segítséget. Hálásan köszönöm, hogy miután távoztam a csoportból, vállalta a munka befejezését.

Köszönettel tartozom továbbá a dolgozat alapjául szolgáló publikáció társszerzőinek, hogy munkájukkal hozzájárultak a téma mélyebb megértéséhez. Köszönöm Ugrainé Szathmári Margitnak, hogy mindig készségesen segítette munkámat. Köszönöm Dongóné Gyányi Edit segítségét. Köszönöm Dr. Pál Margitnak és Velkeyné Krausz Ildikónak a transzgenikus *Drosophila* törzsek létrehozásában nyújtott segítségüket.

Végül köszönetet mondok a csoport minden tagjának, hogy mellettük mindig jó hangulatban végezhettem munkámat.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Abbott, A.L. et al., 2005. The let-7 MicroRNA family members mir-48, mir-84, and mir-241 function together to regulate developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Cell*, 9(3), o.403-414.
2. Ambros, V., 2004. The functions of animal microRNAs. *Nature*, 431(7006), o.350-355.
3. Ambros, V. et al., 2003. A uniform system for microRNA annotation. *RNA (New York, N.Y.)*, 9(3), o.277-279.
4. Baek, D., Villén, J., Shin, C., Camargo, F.D., Gygi, S.P. & Bartel, D.P., 2008. The impact of microRNAs on protein output. *Nature*, 455(7209), o.64-71.
5. Bail, S., Swerdel, M., Liu, H., Jiao, X., Goff, L.A., Hart, R.P., & Kiledjian, M. 2010. Differential regulation of microRNA stability. *RNA* 16: 1032–1039.
6. Bartel, D.P. & Chen, C.-Z., 2004. Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs. *Nature Reviews. Genetics*, 5(5), o.396-400.
7. Behm-Ansmant, I., Rehwinkel, J., Doerks, T., Stark, A., Bork, P., & Izaurralde, E. 2006. mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes & development* 20: 1885–1898.
8. Berretta, J. & Morillon, A., 2009. Pervasive transcription constitutes a new level of eukaryotic genome regulation. *EMBO Reports*, 10(9), o.973-982.
9. Borchert, G.M., Lanier, W., & Davidson, B.L. 2006. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nature structural & molecular biology* 13: 1097–1101.

10. Brand, A.H., & Perrimon, N. 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development (Cambridge, England)* 118: 401–415.
11. Brennecke, J. et al., 2003. bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in *Drosophila*. *Cell*, 113(1), o.25-36.
12. Brennecke, J. et al., 2005. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biology*, 3(3), o.e85.
13. Brenner, J.L. et al., 2010. Loss of individual microRNAs causes mutant phenotypes in sensitized genetic backgrounds in *C. elegans*. *Current Biology: CB*, 20(14), o.1321-1325.
14. Brown, B.D. & Naldini, L., 2009. Exploiting and antagonizing microRNA regulation for therapeutic and experimental applications. *Nature Reviews. Genetics*, 10(8), o.578-585.
15. Buchan, J.R. & Parker, R., 2007. Molecular biology. The two faces of miRNA. *Science (New York, N.Y.)*, 318(5858), o.1877-1878.
16. Bushati, N. & Cohen, S.M., 2007. microRNA functions. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 23, o.175-205.
17. Cai, X., Hagedorn, C.H., & Cullen, B.R. 2004. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* 10: 1957–1966.
18. Chatterjee, S., Fasler, M., Büssing, I., & Grosshans, H. 2011. Target-mediated protection of endogenous microRNAs in *C. elegans*. *Developmental cell* 20: 388–396.
19. Chen, C. et al., 2005. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 33(20), o.e179.

20. Chi, S.W. et al., 2009. Argonaute HITS-CLIP decodes microRNA-mRNA interaction maps. *Nature*, 460(7254), o.479-486.
21. Clark, M.E. et al., 2005. Widespread prevalence of wolbachia in laboratory stocks and the implications for *Drosophila* research. *Genetics*, 170(4), o.1667-1675.
22. Czech, B. et al., 2009. Hierarchical rules for Argonaute loading in *Drosophila*. *Molecular Cell*, 36(3), o.445-456.
23. Czech, B., & Hannon, G.J. 2011. Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes. *Nature reviews. Genetics* 12: 19–31.
24. Demereck M. 1950. *Biology of Drosophila*. New York: John Wiley and Sons
25. Drummond-Barbosa, D. & Spradling, A.C., 2001. Stem cells and their progeny respond to nutritional changes during *Drosophila* oogenesis. *Developmental Biology*, 231(1), o.265-278.
26. Du, T. & Zamore, P.D., 2005. microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. *Development (Cambridge, England)*, 132(21), o.4645-4652.
27. Enright, A.J. et al., 2003. MicroRNA targets in *Drosophila*. *Genome Biology*, 5(1), o.R1.
28. Ernst, C., & Morton, C.C. 2013. Identification and function of long non-coding RNA. *Frontiers in cellular neuroscience* 7: 168.
29. Esslinger, S.M., Schwalb, B., Helfer, S., Michalik, K.M., Witte, H., Maier, K.C., Martin, D., Michalke, B., Tresch, A., Cramer, P., & Förstemann, K. 2013. *Drosophila* miR-277 controls branched-chain amino acid catabolism and affects lifespan. *RNA biology* 10: 1042–1056.
30. Farazi, T.A. et al., 2011. miRNAs in human cancer. *The Journal of Pathology*, 223(2), o.102-115.

31. Feany M. B. 1990. Rescue of the learning defect in *dunce*, a *Drosophila* learning mutant, by an allele of *rutabaga*, a second learning mutant. *Neurobiology*, Vol. 87, pp. 2795-2799
32. Fernandez-Valverde, S.L., Taft, R.J. & Mattick, J.S., 2010. Dynamic isomiR regulation in *Drosophila* development. *RNA (New York, N.Y.)*, 16(10), o.1881-1888.
33. Flynt, A.S. et al., 2010. MicroRNA biogenesis via splicing and exosome-mediated trimming in *Drosophila*. *Molecular Cell*, 38(6), o.900-907.
34. Friedman, J.M. & Jones, P.A., 2009. MicroRNAs: critical mediators of differentiation, development and disease. *Swiss Medical Weekly*, 139(33-34), o.466-472.
35. Friedman, R.C. et al., 2009. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Research*, 19(1), o.92-105.
36. Golic K. G. and Golic M. M. (1996) Engineering the *Drosophila* Genome: Chromosome Rearrangements by Design. *Genetics* 144: 1693-1711
37. Graveley, B.R., May, G., Brooks, A.N., Carlson, J.W., Cherbas, L., Davis, C.A., Duff, M., Eads, B., Landolin, J., Sandler, J., Wan, K.H., Andrews, J., Brenner, S.E., Cherbas, P., Gingeras, T.R., Hoskins, R., Kaufman, T., Celniker, S.E. 2011. The *D. melanogaster* transcriptome: modENCODE RNA-Seq data for dissected tissues <http://www.modencode.org/Celniker.shtml>
38. Griffiths-Jones, S. et al., 2006. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Research*, 34(Database issue), o.D140-144.
39. Griffiths-Jones, S., Saini, H.K., van Dongen, S. & Enright, A.J., 2008. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Research*, 36(Database issue), o.D154-158.
40. Hammell, M., 2010. Computational methods to identify miRNA targets. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 21(7), o.738-744.

41. Han, B.W., Hung, J.-H., Weng, Z., Zamore, P.D., & Ameres, S.L. 2011. The 3'-to-5' exoribonuclease Nibbler shapes the 3' ends of microRNAs bound to Drosophila Argonaute1. *Current biology: CB* 21: 1878–1887.
42. Han, P.L., Levin, L.R., Reed, R.R., Davis, R.L. 1992. Preferential expression of the *Drosophila rutabaga* gene in mushroom bodies, neural centers for learning in insects. *Neuron* 9: 619-627.
43. He, L. & Hannon, G.J., 2004. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature Reviews. Genetics*, 5(7), o.522-531.
44. He, P.-an et al., 2008. Identification and characteristics of microRNAs from *Bombyx mori*. *BMC Genomics*, 9, o.248.
45. Heliconius Genome Consortium. 2012. Butterfly genome reveals promiscuous exchange of mimicry adaptations among species. *Nature* 487: 94–98.
46. Huntzinger, E. & Izaurralde, E., 2011. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nature Reviews. Genetics*, 12(2), o.99-110.
47. Huynh, C.Q. & Zieler, H., 1999. Construction of modular and versatile plasmid vectors for the high-level expression of single or multiple genes in insects and insect cell lines. *Journal of Molecular Biology*, 288(1), o.13-20.
48. Iovino, N., Pane, A. & Gaul, U., 2009. miR-184 has multiple roles in *Drosophila* female germline development. *Developmental Cell*, 17(1), o.123-133.
49. Jaubert, S. et al., 2007. MicroRNAs in *Drosophila*: the magic wand to enter the Chamber of Secrets? *Biochimie*, 89(10), o.1211-1220.
50. Jost, D., Nowojewski, A. & Levine, E., 2011. Small RNA biology is systems biology. *BMB Reports*, 44(1), o.11-21.

51. Kadener, S. et al., 2009. Genome-wide identification of targets of the drosha-pasha/DGCR8 complex. *RNA (New York, N.Y.)*, 15(4), o.537-545.
52. Kim, V.N., 2005. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 6(5), o.376-385.
53. Komitopoulou, K. et al., 1983. Isolation and Characterization of Sex-Linked Female-Sterile Mutants in DROSOPHILA MELANOGASTER with Special Attention to Eggshell Mutants. *Genetics*, 105(4), o.897-920.
54. Kozomara, A., & Griffiths-Jones, S. 2011. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic acids research* 39: D152–157.
55. Krek, A. et al., 2005. Combinatorial microRNA target predictions. *Nature Genetics*, 37(5), o.495-500.
56. LaFever L, Feoktistov A, Hsu HJ, Drummond-Barbosa D. 2010. Specific roles of *Target of rapamycin* in the control of stem cells and their progeny in the *Drosophila* ovary. *Development*. 2010 Jul;137(13):2117-26
57. Lagos-Quintana, M., 2001. Identification of Novel Genes Coding for Small Expressed RNAs. *Science*, 294(5543), o.853-858.
58. Lai, E.C. et al., 2003. Computational identification of Drosophila microRNA genes. *Genome Biology*, 4(7), o.R42.
59. Lahue E. E., Smith A.V., and Orr-Weaver T.L. 1991. A novel cyclin gene from *Drosophila* complements CLN function in yeast *Genes & development* 5:2166-2175
60. Lau, N. C., 2001. An Abundant Class of Tiny RNAs with Probable Regulatory Roles in Caenorhabditis elegans. *Science*, 294(5543), o.858-862.
61. Leaman, D. et al., 2005. Antisense-mediated depletion reveals essential and specific functions of microRNAs in Drosophila development. *Cell*, 121(7), o.1097-1108.

62. Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S.H., & Kim, V.N. 2004. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO journal* 23: 4051–4060.
63. Lee, Y.S. et al., 2004. Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell*, 117(1), o.69-81.
64. Lee R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75: 843-854.
65. Lehmann, R. & Nüsslein-Volhard, C., 1986. Abdominal segmentation, pole cell formation, and embryonic polarity require the localized activity of *oskar*, a maternal gene in *Drosophila*. *Cell*, 47(1), o.141-152.
66. De Lencastre, A., Pincus, Z., Zhou, K., Kato, M., Lee, S.S., & Slack, F.J. 2010. MicroRNAs both promote and antagonize longevity in *C. elegans*. *Current biology: CB* 20: 2159–2168.
67. Levin L. R., Han P.-L., Hwang P. M., Feinstein P. G., Davis R. L., et al., 1992. The *Drosophila* learning and memory gene *rutabaga* encodes a Ca²⁺/calmodulin-responsive adenylyl cyclase. *Cell* 68: 479–489.
68. Li, S. et al., 2009. Direct sequencing and expression analysis of a large number of miRNAs in *Aedes aegypti* and a multi-species survey of novel mosquito miRNAs. *BMC Genomics*, 10, o.581.
69. Liu Z.J., Ueda T., Miyazaki T., Tanaka N., Mine S, Tanaka Y, Taniguchi T, Yamamura H, Minami Y. 1998. A critical role for *cyclin C* in promotion of the hematopoietic cell cycle by cooperation with *c-Myc*. *Mol Cell Biol*. 18(6):3445-54.
70. Livingstone M.S., Sziber P.P., and Quinn W. G. 1994. Loss of Calcium/Calmodulin Responsiveness in Adenylate Cyclase of *rutabaga*, a *Drosophila* Learning Mutant *Cell*, Vol. 37, 205-215

71. Lund, E. et al., 2004. Nuclear export of microRNA precursors. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5654), o.95-98.
72. Manak, J.R. et al., 2006. Biological function of unannotated transcription during the early development of *Drosophila melanogaster*. *Nature Genetics*, 38(10), o.1151-1158.
73. Miska, E.A. et al., 2007. Most *Caenorhabditis elegans* microRNAs are individually not essential for development or viability. *PLoS Genetics*, 3(12), o.e215.
74. Mortazavi, A. et al., 2008. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature Methods*, 5(7), o.621-628.
75. Mulakkal N.C., Nagy P., Takats S., Tusco R., Juhász G., Nezis I.P. 2014. Autophagy in *Drosophila*: From Historical Studies to Current Knowledge. *Biomed Res Int*. 2014:273473.
76. Nezis, I.P. et al., 2000. Stage-specific apoptotic patterns during *Drosophila* oogenesis. *European Journal of Cell Biology*, 79(9), o.610-620.
77. Nègre, N. et al., 2010. A comprehensive map of insulator elements for the *Drosophila* genome. *PLoS Genetics*, 6(1), o.e1000814.
78. Okamura, K. et al., 2007. The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell*, 130(1), o.89-100.
79. Okamura, K., Liu, N. & Lai, E.C., 2009. Distinct mechanisms for microRNA strand selection by *Drosophila* Argonautes. *Molecular Cell*, 36(3), o.431-444.
80. O'Neill, S.L. et al., 1992. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(7), o.2699-2702.

81. Ørom, U.A., Nielsen, F.C. & Lund, A.H., 2008. MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Molecular Cell*, 30(4), o.460-471.
82. Partridge L, Alic N, Bjedov I, Piper MD. 2010. Ageing in *Drosophila*: the role of the insulin/*Igf* and *TOR* signalling network. *Experimental Gerontology* 46(5):376-81
83. Pauli, A., Rinn, J.L. & Schier, A.F., 2011. Non-coding RNAs as regulators of embryogenesis. *Nature Reviews. Genetics*, 12(2), o.136-149.
84. Pfeffer, S. et al., 2004. Identification of virus-encoded microRNAs. *Science (New York, N.Y.)*, 304(5671), o.734-736.
85. Rota-Stabelli, O. et al., 2011. A congruent solution to arthropod phylogeny: phylogenomics, microRNAs and morphology support monophyletic Mandibulata. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, 278(1703), o.298-306.
86. Ruby, J.G., Jan, C.H. & Bartel, D.P., 2007. Intronic microRNA precursors that bypass Droscha processing. *Nature*, 448(7149), o.83-86.
87. Ruby, J.G., Stark, A., et al., 2007. Evolution, biogenesis, expression, and target predictions of a substantially expanded set of *Drosophila* microRNAs. *Genome Research*, 17(12), o.1850-1864.
88. Selbach, M. et al., 2008. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature*, 455(7209), o.58-63.
89. Sharp, P.A., 2009. The centrality of RNA. *Cell*, 136(4), o.577-580.
90. Singh, J. & Nagaraju, J., 2008. In silico prediction and characterization of microRNAs from red flour beetle (*Tribolium castaneum*). *Insect Molecular Biology*, 17(4), o.427-436.
91. Smibert, P., & Lai, E.C. 2008. Lessons from microRNA mutants in worms, flies and mice. *Cell cycle* 7: 2500–2508.

92. Sokol, N.S. 2008. An overview of the identification, detection, and functional analysis of *Drosophila* microRNAs. *Methods in molecular biology* 420: 319–334.
93. Soni, K., Choudhary, A., Patowary, A., Singh, A.R., Bhatia, S., Sivasubbu, S., Chandrasekaran, S., & Pillai, B. 2013. miR-34 is maternally inherited in *Drosophila melanogaster* and *Danio rerio*. *Nucleic acids research* 41: 4470–4480.
94. Stark, A. et al., 2003. Identification of *Drosophila* MicroRNA Targets. *PLoS Biology*, 1(3), o.e60.
95. Stolc, V. et al., 2004. A gene expression map for the euchromatic genome of *Drosophila melanogaster*. *Science (New York, N.Y.)*, 306(5696), o.655-660.
96. Terashima, J., & Bownes, M. 2004. Translating available food into the number of eggs laid by *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 167: 1711–1719.
97. Terashima, J. et al., 2005. Nutritional status affects 20-hydroxyecdysone concentration and progression of oogenesis in *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Endocrinology*, 187(1), o.69-79.
98. Thummel, C.S., Bulet A. M., and Lipshitz H. D. 1988 Vectors for *Drosophila* P-element-mediated transformation and tissue culture transfection. *Gene*, 74: 445-456
99. Tweedie, Susan, Ashburner, Michael, et al., 2009. FlyBase: enhancing *Drosophila* Gene Ontology annotations. *Nucleic Acids Research*, 37(Database issue), o.D555-559.
100. Ulveling, D., Francastel, C. & Hubé, F., 2011. When one is better than two: RNA with dual functions. *Biochimie*, 93(4), o.633-644.
101. Valencia-Sanchez, M.A., Liu, J., Hannon, G.J., & Parker, R. 2006. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes & development* 20: 515–524.

102. Vasudevan, S., Tong, Y. & Steitz, J.A., 2007. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science (New York, N.Y.)*, 318(5858), o.1931-1934.
103. Várallyay, E., Burgyán, J. & Havelda, Z., 2008. MicroRNA detection by northern blotting using locked nucleic acid probes. *Nature Protocols*, 3(2), o.190-196.
104. Weaver, D.B. et al., 2007. Computational and transcriptional evidence for microRNAs in the honey bee genome. *Genome Biology*, 8(6), o.R97.
105. Werren, J.H. et al., 2010. Functional and evolutionary insights from the genomes of three parasitoid *Nasonia* species. *Science (New York, N.Y.)*, 327(5963), o.343-348.
106. Wu S, Huang J, Dong J, Pan D. 2003. *hippo* encodes a Ste-20 family protein kinase that restricts cell proliferation and promotes apoptosis in conjunction with *salvador* and *warts*. *Cell*. 2003 Aug 22;114(4):445-56.
107. Xu P, Vernooy SY, Guo M, Hay BA. 2003. The *Drosophila* microRNA Mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism. *Current Biology: CB*, 13(9), o.790-795.
108. Ye, X., Paroo, Z. & Liu, Q., 2007. Functional anatomy of the *Drosophila* microRNA-generating enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(39), o.28373-28378.
109. Zhang, X., Zheng, Y., Jagadeeswaran, G., Ren, R., Sunkar, R., & Jiang, H. 2012. Identification and developmental profiling of conserved and novel microRNAs in *Manduca sexta*. *Insect biochemistry and molecular biology* 42: 381–395.