

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

Bujna Ágnes

*Ph.D. értekezés tézisei*

Témavezető: Dr. Erdélyi Miklós

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

2015

## Bevezetés

A sejtek dinamikusán 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 mikroRNS-ek (miRNS) endogén, egyszálú szabályzó RNS-ek, melyek hajtű alakú átmeneti transzkriptumból keletkeznek. Az érett, körülbelül 22 nukleotid hosszú miRNS-ek néhány fehérjével komplexet alkotva poszt-transzkripcionális szinten fejtik ki negatív szabályozó hatásukat. A céltranszkriptumok 3' nem transzlálódó végéhez komplementer módon kapcsolódva lebontják azokat, vagy translációjukat gátolják. Az állatvilágban a miRNS-ek és a céltranszkriptumok között részleges a bázispárosodás, emiatt az egyszerű genom összehasonlítások nem használhatók a céltranszkriptumok előrejelzésében, a kísérletes bizonyítékok elengedhetetlenek. 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.

Modell organizmusunkban, az ecetmuslicában (*Drosophila melanogaster*) jelenleg 256 miRNS-t tartanak számon (miRBase release 21: 2014 Június). A feltételezett célgének száma pedig meghaladja a 12000-t, ami a muslica génjeinek több mint 90%-át jelenti. A miRNS-ek jelentőségét a magasabb rendű állatokban alig egy évtizede ismerték föl, azonban mutációikat máris egy sor humán betegség kialakulásával hozták kapcsolatba.

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 hajtű alakú struktúráról lehetett tudni, melynek érett alakja a becslések szerint 27 bázispár hosszú.

## Célkitűzések

A miRNS-ek érési folyamatairól, a génszabályozásban betöltött szerepéről általánosságban már egyre szélesebb körű ismereteink vannak, azonban az egyedi miRNS-eket kódoló gének terén még szegényes a tudásunk. 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 transzkripciós egységként átíródó miRNS.
- 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 allélokot, 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.

## **Alkalmazott módszerek**

- A *dme-mir-282* ortológok szintenikus viszonyát a legtöbb esetben a Flybase és az NCBI adatbázisok alapján tártuk föl, azonban egyes esetekben manuális kereséssel azonosítottunk ortológokat nagyfokú szekvencia egyezés és genomi pozíció alapján.
- Az elsődleges transzkriptum hosszának megállapítását a RACE technika egy továbbfejlesztett változatával végeztük.
- Az érett miRNS kimutatására Northern-blot analízist végeztünk.
- *mir-282* null mutáns törzsek létrehozásához két *P*-elemet remobilizáltunk nagy, átfedő deléción felett.
- Transzgenikus *Drosophila* vonalakat hoztunk létre: a *mir-282* null mutáns menekítésére; a *mir-282* ektopikus túltermelésére; a *rutabaga* 3'UTR-ében lévő *mir-282* célszekvencia tesztelésére.
- A *mir-282* null mutáns törzs fenotípusának megállapítására életképesség, élethossz és petehozam vizsgálatokat végeztünk különböző körülmények között.
- Immunfestést végeztünk az ősvarsejtek elkülönítésére.
- TUNEL assayjel vizsgáltuk meg az ovárimokban végbemenő apoptózist.
- Ivarvonal kimérákat embrionális ivarsejt (poláris sejt) transzplantációval készítettünk.
- A jelölt célgének transzkriptumának kifejeződési szintjét kvantitatív real-time PCR technika segítségével mértük meg.

## Eredmények

A *Drosophila melanogaster mir-282* génjének bizonyítottuk transzkripció aktivitását, kifejeződésének és elsődleges szerkezetének leírásával alátámasztottuk a korábbi gén előrejelzést:

A *mir-282* az ízeltlábúak között evolúciós konzerváltságot mutat. Ortológjai az összes ismert genom szekvenciájú Drosophilidae fajban, valamint a teljes átalakulással fejlődő rovarokban megtalálhatók. A *mir-282* régió konzerváltsági fokának becslése céljából feltártuk a *mir-282* lókuszt szinténia viszonyait. Bioinformatikai vizsgálataink a rokon fajokban önálló génkifejeződésre utal.

A *mir-282* lókusztól átíródó elsődleges transzkriptum hosszát RACE technikával meghatároztuk, mely az 5' végi CAP struktúrától a 3' végi polyA végig 4,9 kb. A *mir-282* elsődleges transzkriptumáról beláttuk, hogy nem kapcsolódik a vele szomszédos fehérjekódoló gén exonjaival, vagyis önálló transzkripció egységként íródik át RNS-sé.

Northern-blot kísérletet végeztünk, hogy megbizonyosodjunk arról, hogy a *mir-282* lókusztól átíródó elsődleges transzkriptumról valóban képződik-e érett miRNS. A *mir-282* lókusztól termelődő érett *miR-282* hosszát ezen kísérlet eredményei alapján körülbelül 23-24 nukleotid hosszúságúra becsüljük.

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. Megállapítottuk, hogy a letális fenotípust minden esetben háttér mutációk, és nem a *mir-282* funkció vesztese okozta.

A *mir-282* általános ektopikus túltermelése testi sejtekben a második lárvastádiumon túl az étellel össze nem egyeztethető, 100%-ban letalitást eredményezett, ami a *mir-282* releváns

biológiai funkciójára utal. Northern-blot kísérlettel megerősítettük, hogy a túltermelés valóban emelkedett szintű expressziót eredményez.

Újonnan indukált *mir-282*-re specifikus deléciókat azonosítottunk. A null mutáns fenotípus vizsgálatával bizonyítottuk, hogy a *mir-282* lókuszt funkcionális transzkriptumot kódol, mely befolyásolja az élethosszot, az életképességet és a petehozamot:

A *mir-282* homozigóta null mutáns adult muslicák esetében élethossz csökkenést tapasztaltunk 18, 25, és 29°C-on egyaránt, mind a hímek mind a nőstények körében. Megfigyeltük továbbá, hogy a *mir-282* null mutáns törzs egyedei már az adult kor elérése előtt elpusztulnak, azaz a törzs szemiletalís fenotípust mutat. A lerakott petéknek egyharmadából fejlődik csak adult muslica. A szemiletalitás pontosabb feltérképezése érdekében életszakaszonként is megvizsgáltuk a fejlődő muslicák letalítását. A *mir-282* null mutáns peték közel fele már embrió korban elpusztul, majd báb korban mértünk ismét jelentősebb letalítást a kontrollhoz képest. A petehozam mérések rávilágítottak arra, hogy a nőstények által lerakott peték száma is csökkent; a kontroll petehozamának kevesebb, mint a fele. A *mir-282* null mutáns hímek normális fertilitást mutatnak. Jól ismert az intracelluláris gram-negatív *Wolbachia* baktérium reproduktív parazitizmusa rovarokban, mely a *mir-282* null mutánséhoz hasonló, csökkent peteproduktumot eredményezhet. 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 *Wolbachia* fertőzés lenne.

A mutáns fenotípusok menekítése céljából létrehoztunk olyan transzgenikus legyeket, melyek a *mir-282* elsődleges transzkriptumát is magába foglaló genomszakaszt tartalmazzák. A transzgén a mutáns háttérű legyekben sikeresen menekítette a megrövidült élethossz és csökkent petehozam fenotípusokat, megerősítve ezzel, hogy a mutáns fenotípusokért a *mir-282* hiánya a felelős.

Megfigyeléseink szerint a *mir-282* mutáns nőstények napról-napra kevesebb petét raknak le, melynek hátterében az ősvarsejtek pusztulása, a jól ismert ún. petesejt kiürüléssel fenotípus is állhat. Az ősvarsejtek azonban vad fenotípust mutattak Hts ellenanyaggal történő immunfestéssel. A petehozam csökkenése tehát nem az ivarvonal őssejtek elvesztésére vezethető vissza.

A csökkent petehozamot ivari vagy testi eredetű hiba egyaránt eredményezheti. A mutáció fókuszának megállapítására embrionális ivarsejt átültetési kísérleteket végeztünk. A *mir-282* null mutánsból poláris sejteket kapott kimérák peterakásának mértéke nem mutatott jelentős eltérést a kontroll törzsből származó poláris sejteket kapott kimérákhoz képest. Mindebből arra következtethetünk, hogy a *mir-282* null mutánsok ivarvonal sejtjei funkcióképesek, vagyis a mutáció fókusza nem az ivarsejtekben, hanem a testi sejtekben van.

A *mir-282* deléciós mutáns nőstények csökkent petehozamának hátterében jelentős, megnövekedett apoptotikus aktivitást figyeltünk meg. Vizsgálataink rámutattak arra, hogy mutáns nőstényeink petefészkeben a 8. stádiumban aktív ellenőrző ponton áthaladt petesejtek is apoptotizálnak, valamint, hogy a petevezeték proximális végében apoptotikus törmelék felhalmozódása figyelhető meg. Éheztetés hatására a 8. stádiumos ellenőrző ponton a petekezdemények fokozott apoptotikus aktivitása figyelhető meg. A *mir-282* null mutánsok normál fiziológiai reakciót képesek mutatni az átmeneti tápanyag megvonásra, vagyis a megnövekedett apoptotikus aktivitás hátterében nem a megváltozott energiaellátás áll. Az újbóli gazdag tápanyag-ellátottság ellenére azonban a *mir-282* null mutáns nőstények egyre kevesebb petét raknak a kontrollhoz képest, ahogy ezt korábbi kísérleteink során is megfigyeltük már.

Megvizsgáltuk a *mir-282* potenciális célgénjeit is, és a *mir-282* negatív génszabályozó funkcióját kísérletesen bizonyítottuk. A *mir-282* több száz, bioinformatikai módszerrel jósolt célgénje közül öt jelöltet választottunk ki. Jelöltjeinkkel *mir-282* mutáns és vad genetikai háttéren génexpressziós vizsgálatokat végeztünk. A *mir-282* null mutáns mintákban a szabályozott gének transzkripciós aktivitásának növekedését vártuk. A kiválasztott célgénnek

kifejeződési szintjének kvantitatív mérése megmutatta, hogy a *rutabaga* gén transzkripció szintje az elvárt módon nőtt a *mir-282* null mutáns bábokban. A *rutabaga* gén egy idegrendszer specifikus adenil ciklázt kódol. A *rutabaga* gén *miR-282* általi szabályzását megerősítendő, megmértük a *rutabaga* kifejeződési szintjét *mir-282*-t túltermelő bábokban is. Az idegrendszerben ektopikusan túltermelt *mir-282* hatására a *rutabaga* mRNA szintje a vártnak megfelelően szignifikánsan csökkent. A *mir-282* és a *rutabaga* közti szabályzó kapcsolat további megerősítése érdekében a *rutabaga* 3'UTR-ében lévő *mir-282* célszekvencia érzékenységét transzgenikus riporter konstrukcióval is bizonyítottuk. A *rutabaga* mRNA-ében négy különböző, lehetséges miRNA 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 fejt ki szabályzó hatását a metamorfózis során.

## Összefoglalás

A fent részletezett eredmények alapján a következő új megállapításokat fogalmazhatjuk meg:

- A *dme-mir-282* gén önálló transzkripció egységként íródik át
- A CAP és polyA véggel rendelkező elsődleges transzkriptum hossza 4,9 kb hosszú
- 23-24nt-os érett *miR-282* detektálható
- A *mir-282* hiányának következménye szemletalítás és élethossz rövidülés, valamint petehozam csökkenés
- A *mir-282* mutációjának fókusza a testi sejtekben van
- A *miR-282* negatívan szabályozza a *rutabaga* gén kifejeződését



## 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 munkámat mindig mindenben készségesen segítette. Köszönöm Dongóné Gyányi Edit segítségét a légy munkákban. Köszönöm Dr. Pál Margitnak és Velkeyné Krausz Ildikónak a transzgenikus *Drosophila* törzsek létrehozásában nyújtott segítségüket.

Köszönetet mondok korábbi csoportom minden tagjának, hogy mellettük mindig jó hangulatban végezhettem munkámat.

Végezetül köszönöm családom kitartó támogatását, ösztönzését, türelmét.

## Közlemények listája

### A disszertáció alapját képező közlemény:

Vilmos Péter\*, Bujna Ágnes\*, Szuperák Milán, Havelda Zoltán, Várallyay Éva, Szabad János, Kucerova Lucie, Somogyi Kálmán, Kristó Ildikó, Lukácsovich Tamás, Jankovics Ferenc, Henn László, Erdélyi Miklós (2013) Viability, longevity, and egg production of *Drosophila melanogaster* are regulated by the *miR-282* microRNA. Genetics 195: 469–480.

\*megosztott első szerzők

IF: 4,389

### Egyéb közlemények:

Jankovics Ferenc, Henn László, Bujna Ágnes, Vilmos Péter, Kiss Nóra, Erdélyi Miklós (2011) A functional genomic screen combined with time-lapse microscopy uncovers a novel set of genes involved in dorsal closure of *Drosophila* embryos. PloS One 6: e22229.

IF: 4,092

Jankovics Ferenc, Henn László, Bujna Ágnes, Vilmos Péter, Spirohn Kerstin, Boutros Michael, Erdélyi Miklós (2014) Functional analysis of the *Drosophila* embryonic germ cell transcriptome by RNA interference. PloS One 9: e98579.

IF: 3,730

Összesített IF: 12,211

## NYILATKOZAT

Mint az alábbi közlemény felelős szerzője igazolom, hogy a Ph.D. jelölt Bujna Ágnes jelentős mértékben hozzájárult az alábbi cikk létrehozásához és az értekezésében illetve a téziseiben felhasznált eredményeket más Ph.D. értekezésben nem használjuk fel.

Vilmos Péter\*, Bujna Ágnes\*, Szuperák Milán, Havelda Zoltán, Várallyay Éva, Szabad János, Kucerova Lucie, Somogyi Kálmán, Kristó Ildikó, Lukácsovich Tamás, Jankovics Ferenc, Henn László, Erdélyi Miklós (2013) Viability, longevity, and egg production of *Drosophila melanogaster* are regulated by the *miR-282* microRNA. *Genetics* 195: 469–480.

Dr. Erdélyi Miklós  
tudományos tanácsadó  
MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont  
Genetikai Intézet

Szeged, 2015. szeptember 1.

## NYILATKOZAT

Mint az alábbi közlemény megosztott első szerzője igazolom, hogy Bujna Ágnes a cikk létrehozásához jelentős mértékben hozzájárult és kijelentem, hogy az értekezésében és a téziseiben felhasznált eredményeket más Ph.D. értekezésben nem használjuk fel.

Vilmos Péter\*, Bujna Ágnes\*, Szuperák Milán, Havelda Zoltán, Várallyay Éva, Szabad János, Kucerova Lucie, Somogyi Kálmán, Kristó Ildikó, Lukácsovich Tamás, Jankovics Ferenc, Henn László, Erdélyi Miklós (2013) Viability, longevity, and egg production of *Drosophila melanogaster* are regulated by the *miR-282* microRNA. *Genetics* 195: 469–480.

Dr. Vilmos Péter  
tudományos főmunkatárs  
MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont  
Genetikai Intézet

Szeged, 2015. szeptember 1.