

**Ivarsejtek kialakulásában szerepet játszó faktorok
azonosítására alkalmas genomszintű vizsgálati módszerek
kidolgozása *Drosophila melanogaster*ben**

Ph.D. értekezés tézisei

Szegedi Tudományegyetem
MTA Szegedi Biológiai Központ, Genetika Intézet

Készítette: Szuperák Milán
Témavezető: Dr. Erdélyi Miklós

Szeged, 2006

Bevezetés és célkitűzés

Az állatvilágban az embrionális ivarsejtek igen változatos módon alakulnak ki, és különülnek el a testi sejtektől. Néhány organizmusban anyailag szintetizált ivarplazma határozza meg az ivarsejtsors kialakulását (pl. *Drosophila melanogaster*), míg más élőlényekben sejt-sejt közötti interakciók szükségesek az ivarsejtek kialakulásához (pl. *Mus musculus*). Attól a pillanattól fogva azonban, hogy az elkülönülés megtörtént, az egyes fajok ivarsejtjei igen nagyfokú alaktani és működésbeli hasonlóságot mutatnak. Az ivarsejtek képviselik az egyedek közötti folytonosságot, így életük egy örökké megújuló ivarsejt-ciklusnak fogható fel. A *Drosophila melanogaster* ivarsejtjei az új egyedben az embriogenezis ötödik stádiumában, az embrió poszterior végén a poszterior középbéli primordium kialakulási helyéhez közel lefűződő, körülbelül húsz gömbölyű poláris sejt formájában jelennek meg. A gasztruláció

során az embrió dorzális oldalán szállítódnak, szoros kapcsolatban maradv a középbél primordiummal. Amikor a primordium betűródik, az ivarsejtek vele együtt az embrió belsejébe szállítódnak. Ezután aktív mozgással átjutnak a középbél epitéliumán, majd dorzális irányba migrálnak annak bazális felületén. Végül az ivarsejtek elvándorolnak a középbéltől a szomszédos mezoderma irányába, ahol kapcsolatba lépnek a gonádok szomatikus prekursor sejtjeivel. Az embriogenezis tizennegyedik stádiumában aztán közösen alakítják ki az embrionális gonádokat. A peteképzés a felnőtt nőstények petefészket alkotó petecsövekben történik. A sztemsejt jellegű ősvarsejtek cisztoblasztokat fűznek le, amelyek 16 sejtes cisztákat hoznak létre. A ciszta egy sejtje petesejtté differenciálódik, míg a maradék 15 dajkasejtté alakul. A dajkasejtek látják el a petét mindazokkal az anyagokkal, amelyek a fejlődéséhez elengedhetetlenül szükségesek. Ezek között a faktorok között találjuk azokat az RNS-eket és fehérjéket, amelyek egy speciális citoplazmarészletet, az ivarplazmát alakítják ki. Az ivarplazma

tartalmazza mindazokat a faktorokat, amelyek az embrionális ivarsejtek kialakulásához szükségesek.

Munkám célja olyan genom szintű vizsgálati rendszerek kidolgozása volt, melyek alkalmasak a *Drosophila melanogaster* ivarsejtjeinek kialakulásában, valamint a korai ivarsejtfejlődésben szerepet játszó faktorok azonosítására. Célul tűztük ki egy microarray technikán alapuló, lokalizált RNS-ek azonosítására alkalmas módszer kifejlesztését. Megterveztük egy nagy hatékonyságú funkcionális assay kidolgozását, mellyel az ivarplazmában lokalizált faktorok génjeit vizsgálhatjuk. Elhatároztuk a teljes genomszintű reverz genetikai kísérletsor modell-kísérletének végrehajtását.

Alkalmazott módszerek

Drosophila törzsek fentartása, keresztezése

Microarray analízis

Digoxigenin (DIG) jelölt DNS illetve RNS szintézis

RNS *in situ* hibridizáció embriókon

A staufen oskar TropomyosinII (SOT) érzékenyítő rendszer
tesztelése

Komplementációs analízis

Molekuláris DNS-technikák (Genomi DNS tisztítás, a P-elem
inszerciók széli szekvenciájának meghatározása inverz PCR-al)

Számítógépes szekvencia elemzés

Eredmények és következtetések

Kidolgoztunk és sikeresen alkalmaztunk egy új módszert a *Drosophila melanogaster* fejlődő petéinek poszterior pólusán lokalizálódó RNS-ek azonosítására. A kísérletsorozatunk a microarray analízist újszerű megközelítésben, RNS stabilitás mérésére használta fel. A feltételezésünk az volt, hogy ha az ivarplazma összeszerelődését megakadályozzuk, akkor az ott tárolt RNS-molekulák stabilitása lecsökken, amit az RNS-molekulák koncentrációjának mérésére szolgáló DNS-microarray technikával kimutathatunk. Az ivarplazma mennyiségét szabályozó mutációkat hordozó nőstények petefészkeiből RNS-t tisztítottunk, azokról jelölt cDNS-eket készítettünk, és 3200 ismert *Drosophila* gén cDNS-ét tartalmazó microarray lemezekre hibridizáltuk. Kiválasztottuk azokat az RNS-eket, amelyeknek mennyisége az ivarplazma mennyiségével változtatásával együtt növekedett és csökkent. RNS *in situ* hibridizációval ellenőriztük, hogy az így kapott 60 jelölt közül melyek azok a gének, amelyek RNS-ei

valóban a poszterior póluson lokalizálódnak. 17 esetben beigazolódott a feltételezésünk, ivarplazmában lokalizálódó RNS-eket detektáltunk.

Az ivarplazma összeszerelődésében, az embrionális ivarsejtek kialakulásában szerepet játszó gének azonosítására kidolgoztunk egy genetikai interakción alapuló kísérleti rendszert amely alkalmas a DNS-microarray kísérletből származó gének funkcionális analízisére is. Rendszerünk alapját egy olyan *Drosophila* tesztelő törzs képezi, amely három, az ivarsejtek kialakulásában szerepet játszó gén mutációját hordozza transz-heterozigóta formában. A tesztelő törzs önmagában gyenge ivarsejthiányos fenotípust mutat, ami genetikai interakciók révén erősödhet. A tesztelő törzset úgy alakítottuk ki, hogy genomjába újabb mutációkat egyetlen keresztezéssel bevihetünk. Amennyiben egy bevitt mutáció felerősíti a tesztelő törzs ivarsejthiányos fenotípusát, úgy a mutációval azonosítható gének minden bizonnyal szerepe van az ivarsejtek kialakulásának szabályozásában. Ezt a kísérleti rendszert egy harmadik

kromoszómás, letális P-elem gyűjteményen teszteltük. 680 mutáns vonalat kereszteztünk az érzékenyített háttérhez, és ebből 24 emelte a tesztörzs alappenetranancia-értékét az általunk szigorúan megszabott érték fölé. A genetikai interakciós vizsgálati módszerünk alkalmasnak bizonyult nagy számú mutáns vonal gyors és egyszerű funkcionális analízisére. A jelöltek vizsgálatából eredő tapasztalataink azt mutatták, hogy az érzékenyített háttéren erős enhanszerként viselkedő mutánsok között vannak olyanok melyek önmagukban nem mutattak ivarsejthiányos fenotípust (nem közölt adat). Valószínűleg ezek a gének redundáns funkciójúak, és helyettesíthetők más gének termékei által. Az a tény viszont, hogy interakciót mutattak a tesztelő rendszerünkben, arra sarkallt minket, hogy eredményeinket a redundáns genetikai funkció elemzésére alkalmas hálózati biológia módszereivel értékeljük. Kidolgoztunk egy fehérje-fehérje interakción alapuló biológiai hálózatot melyben együtt szerepelnek a poszterior géncsalád azon elemei, melyekkel a két kísérletsorozatban azonosított gének közvetlenül, vagy egy összekötő tagon keresztül kapcsolódnak. A

hálózat elemzésének kezdeti eredményei azt mutatják, hogy a fehérje-fehérje kölcsönhatások alapján bővített génhálózat új, ivarsejtkialakításban szerepet játszó gének felismerését teszi lehetővé.

Mindezek alapján elmondhatjuk, hogy kidolgoztunk egy olyan többkomponensű tesztrendszer, melynek segítségével a *Drosophila melanogaster* ivarsejtjeinek kialakulásában szerepet játszó géneket azonosíthatunk nagy mennyiségben, genomi szinten. Ez a két tesztrendszer, valamint a fehérje interakciókon alapuló hálózatba rendezés egyetlen, reverz genetikai kísérleti módszerrel szervezhető.

Tudományos közlemények:

Szuperák M., Zvara Á., Erdélyi M.

Identification of germ plasm-enriched mRNAs in *Drosophila melanogaster* by the cDNA microarray technique.

Gene Expression Patterns. 2005 Jun;5(5):717-23.

Kókai E., **Szuperák M.**, Alphey L., Gausz J., Ádám G., Dombrádi V.

Germ Line Specific Expression of a Protein Phosphatase Y Interacting Protein (PPYR1) in *Drosophila*.

Gene Expression Patterns. Elfogadva 2005 dec. 21.

Szuperák M.

Developing a novel method to identify genes involved in germ line induction of *Drosophila melanogaster* embryos.

(disszertáció összefoglaló)

Acta Biologica Szegediensis. 2005 49(3-4):63