

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

Ph.D. értekezés

Szegedi Tudományegyetem
MTA Szegedi Biológiai Központ, Genetika Intézet

Készítette: Szuperák Milán
Témavezető: Dr. Erdélyi Miklós

Szeged, 2006

Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni elsősorban témavezetőmnek, Dr. Erdélyi Miklósnak, aki szakmai tudásával, kedvességével és türelmével mindig támogatott és lehetővé tette, hogy ez a munka megszülethessen. Hálával tartozom szüleimnek és kedvesemnek, akik mindig mellettem álltak. A munkámban sokat segített laborunk tagjainak hozzáértése és segítőkészsége, köszönöm Jankovics Ferencnek, Ugrainé Szathmári Margitnak, Sinka Ritának, Vilmos Péternek és Henn Lászlónak. A szegedi *Drosophila* közösség baráti légköre is fontos volt számomra, köszönettel tartozom nekik is.

Tartalomjegyzék

Köszönetnyilvánítás	2
Tartalomjegyzék	3
Bevezetés	5
Az ivarsejtek kialakulása és vándorlása	6
A peteérés folyamata	9
Az ivarplazma összetétele	15
Célkitűzés	16
Anyagok és módszerek	18
<i>Drosophila</i> törzsek	18
Microarray lemezek előállítása	18
A microarray analízis folyamata	19
Digoxigenin (DIG) jelölt DNS illetve RNS szintézis	21
RNS <i>in situ</i> hibridizáció embriókon	22
RNS és DNS <i>in situ</i> hibridizáció ováriumokon	23
<i>A staufen oskar TropomyosinII</i> (SOT) érzékenyítő rendszer	24
Komplementációs analízis	25
Genomi DNS tisztítás	26
A P elem inszerciók széli szekvenciájának meghatározása	27
Számítógépes szekvencia elemzés	28
Eredmények	29
A microarray analízis kidolgozása	29
Összehasonlítások	30
A microarray analízis ellenőrzése	33
Az azonosított gének ontológiai jellemzése	36
A SOT kísérleti rendszer kidolgozása	38
SOT enhanszerek azonosítása	40
A P elemek inszerciós helyének meghatározása	44
A SOT enhanszerek ontológiai jellemzése	45

Az eredmények megvitatása	50
A microarray analízis értékelése	50
Az interakciós kísérletek értékelése	54
A két kísérletsorozat kapcsolata	57
Összefoglalás	60
Summary	63
A dolgozatban szereplő gének és rövidítésük	66
Referenciák	67
Tudományos közlemények	82

Bevezetés

Biológiai szempontból minden egyes élőlény életében az egyik legfontosabb feladat a szaporodás. A magasabb rendűekben ezt a feladatot az ivarsejtek látják el.

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. A legszembeötlőbb hasonlóság az ivarsejtek gömbölyű alakja, illetve az aktív sejtmozgásra való képesség. Az ivarsejtek további közös sajátossága a sztemsejt jellegű működés, valamint az egyedfejlődés korai szakaszában megfigyelt génexpressziós inaktivitás. Ezeken felül minden eddig megvizsgált állati ivarsejtre jellemző egy elektrondenz, RNS és fehérje tartalmú rögzítőből álló sejtalkotó, az úgynevezett nuage (Snee és Macdonald, 2004). Attól függetlenül hogy hogyan indukálódik az ivarsejtek kialakulása, a különböző fajokból származó primordiális ivarsejtek közös tulajdonsága, hogy ivarsejteken kívül semmilyen más sejtípust nem tudnak létrehozni ha transzplantálják őket egy másik embrióba (Donovan és De Miguel, 2003). Az ivarsejtek kialakulásuk után sok organizmusban különböző típusú szomatikus szöveten vándorolnak keresztül, míg elérik a gonádok testi sejt eredetű építőelemeit. Ezekkel egyesülve alakítják ki a majdani gonádokat (Santos és Lehmann, 2004a). Ezen hasonlóságok alapján azt feltételezhetnénk, hogy a különböző fajokból származó ivarsejtekben nagyszámú homológ gén termékét azonosították már, ez azonban nincs így. Meglehetősen kevés

evolúciósan konzervált ivarsejt-specifikus gént azonosítottak idáig. Ennek legfőbb oka az, hogy az ivarsejtek biológiáját kutató csoportok általában a hagyományos genetika módszerét alkalmazták és az ivarsejtek kifejlődését irányító kulcs (szelektor) gének vizsgálatára helyezték a hangsúlyt. Az ivarsejtek kialakulásáért és működéséért felelős úgynevezett végrehajtó gének azonosításának ugyanis mindezidáig technikai korlátai voltak. A végrehajtó gének száma szelektor génekhez képest minden bizonnyal igen nagy, így az egyes fajok ivarsejtjei között meglévő hasonlóságot csak transzkriptom szinten lehet értelmezni. Korunk legújabb génexpressziót vizsgáló technikái alkalmasak nagy számú gén együttes vizsgálatára, így lehetővé válik a várhatóan evolúciósan konzervált, végrehajtó gének azonosítására alkalmas módszerek kidolgozása. Dolgozatomban a *Drosophila melanogaster* embrionális ivarsejtjeiben működő végrehajtó gének azonosítására alkalmas módszereket mutatok be.

Az ivarsejtek kialakulása és vándorlása

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 maradva a középbél-primordiumával. 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 középbélből a szomszédos mezoderma irányába, ahol kapcsolatba lépnek a gonádok szomatikus prekurzor-sejtjeivel. Az embriogenezis tizennegyedik stádiumában aztán közösen alakítják ki az embrionális gonádokat (Santos és Lehmann, 2004a) (1. ábra)



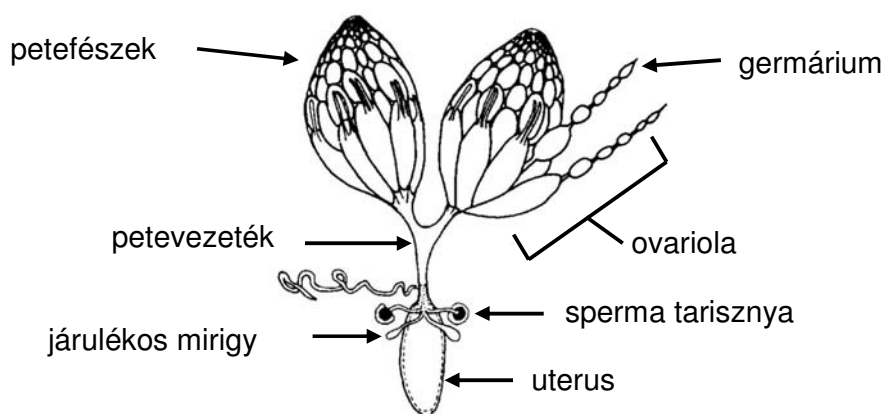
1. ábra. Az embrionális ivarsejtek vándorlása az embriófejlődés során (Flymove)

A lefűződött és középbélhez kapcsolódó ivarsejtek önálló, aktív mozgást mutatnak a blasztoderma állapotban és a gasztruláció során. Korábban úgy tartották, hogy az ivarsejtek nem képesek önálló mozgásra. Kimutatták azonban, hogy a blasztoderma állapotból származó ivarsejtek a középbélbe transzplantálva képesek áthaladni az epitéliumon, tehát elméletileg képesek önálló mozgásra (Jaglarz és Howard, 1994). Egy a közelmúltból származó közlemény pedig bemutatta, hogy a Jak/Stat szignáltranszdukciós útvonal szerepet játszik az ivarsejtek és a szomatikus sejtek szoros kapcsolatának kialakításában, emellett állábakhoz hasonló nyúlványokat növesztenek, amelyek segítségével aktív mozgásra képesek (Li és mtsai., 2003). Az aktív ivarsejtmozgás jeleit elsőként a középbél falán való átjutáskor figyelhetjük meg, addig a bélprimordiummal együtt vándorolnak. Kimutatták, hogy az epitelsejtek apikális junkciói meglazulnak, rések keletkeznek, amelyeken az ivarsejtek képesek átjutni (Callaini és mtsai., 1995). Azokban a mutánsokban, ahol ezek a léziók nem alakulnak ki (például a *serpent* vagy a *huckebein* gének mutációi esetében), az ivarsejtek nem képesek áthaladni a bélfalon, és csapdába esnek a bélben belül (Warrior, 1994; Moore és mtsai., 1998). Miután az ivarsejtek átjutottak a bélfalon, a bélhám felszínén vándorolnak tovább az embrió dorzális oldala felé. A mozgás irányát repellens molekulák határozzák meg, amelyek a középbél ventrális oldalán termelődnek (*wunen*, *wunen-2*) (Zhang és mtsai., 1997; Starz-Gaiano és mtsai., 2001). A középbélből az ivarsejtek a majdani ivarszerveket kialakító mezodermális szövethez vándorolnak. Kimutattak egy attraktánst, amely képes a mezoderma felé vonzani a vándorló ivarsejteket, a 3-hidroxi 3-metilglutaril koenzim A-t (*Hmgcr*). *Hmgcr* mutáns embriókban az ivarsejtek nem válnak el a középbélből, ektopikusan expresszálva pedig odavonzza azokat (Van Doren és mtsai., 1998). Az HMGCoAR fehérje a koleszterin és az izoprenoidok bioszintézisének egyik résztvevője. Megvizsgálták

ennek a bioszintézis-útvonalnak a többi résztvevőjét is, és azt tapasztalták, hogy a HMGCoAR-hoz hasonlóan képesek irányítani az ivarsejtek vándorlását (Santos és Lehmann, 2004b). Ezek alapján azt feltételezik, hogy az attraktánsnak izoprenilálódnia kell ahhoz, hogy az ivarsejteket irányítani tudja.

A peteérés folyamata

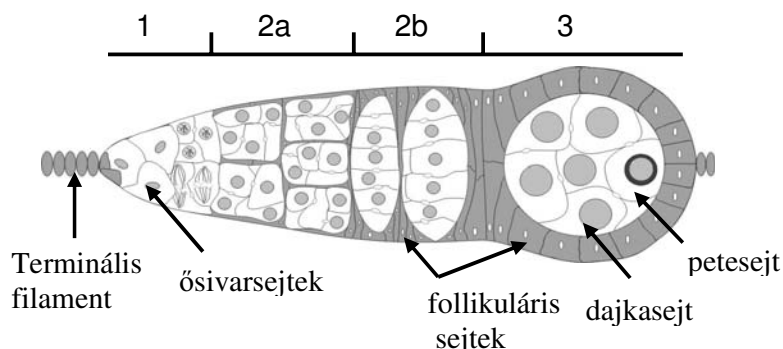
Az ivarsejtek szomatikus partnereikkel egyesülve kialakítják az embrionális gonádokat, amelyekből majd a felnőtt egyedek ivarszervei kialakulnak. A peteképzés a felnőtt nőstények petefészket alkotó petecsövek (ovariolák) csúcsi részében elhelyezkedő germáriumokban kezdődik. (2. ábra) (Spradling és mtsai. 1997).



2. ábra A nőstény *Drosophila melanogaster* szaporító szerve. (Miller, 1950)

A germárium anterior végében sztemsejt jellegű ősvarsejtek találhatók, melyek aszimmetrikus osztódással cisztoblasztokat, illetve újabb ősvarsejteket hoznak létre, így biztosítva a folyamat állandóságát. A cisztoblaszt négy mitotikus osztódáson megy keresztül, amelyeket nem követ citokinezis. Ennek következtében

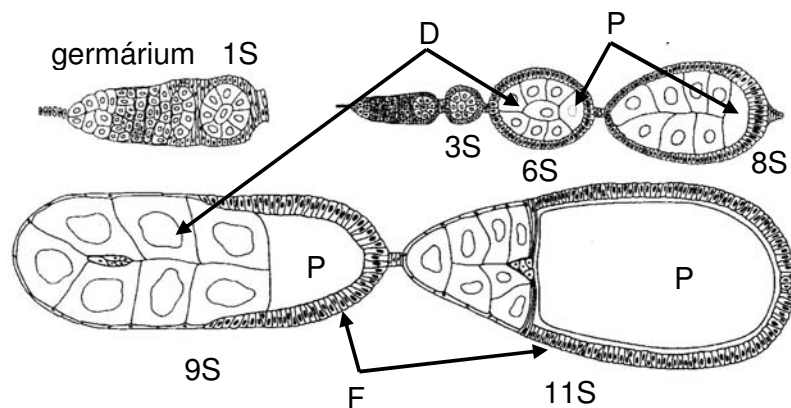
létrejön egy 16 sejtes ciszta, melynek sejtjei gyűrűcsatornákon (King, 1970) (Warn és mtsai., 1985) keresztül kapcsolódnak egymáshoz. A 16 sejtből 15 dajkasejtté alakul, míg egy sejt petesejtté differenciálódik. Az ivarsejtképzésnek ezt a módját cisztás fejlődésnek hívjuk, és ez a jelenség a *Drosophilától* a békákon át az egerekig általános az állatvilágban (Pepling és mtsai., 1999; Pepling és Spradling, 1998). A germárium 2a és 2b szakasza között eldől, hogy a két, 4 gyűrűcsatornával rendelkező sejt közül melyik lesz a petesejt (3. ábra). A germárium 2b jelű szakaszában a cisztákat szomatikus eredetű follikuláris sejtek veszik körül, létrehozva a petekamrákat. A 3-as szakaszban kerül a petesejt a petekamrán belül a poszterior pólusra, ami meghatározza az összes későbbi polarizálódási eseményt (Gonzalez-Reyes és St Johnston, 1994). A germáriumot az első stádiumos petekamra hagyja el (3. ábra).



3. ábra. A germárium sematikus rajza. Szürke szín jelöli a szomatikus eredetű sejteket, a fehér az ivarsejt eredetű sejteket. Az 1, 2a, 2b, 3 a germárium egyes régióit jelöli.

A dajkasejtek feladata a fejlődő petesejt tápanyaggal, sejtalkotókkal, valamint anyai hatású anyagokkal való ellátása. A dajkasejtek a petefejlődés tizenegyedik szakaszában teljes citoplazmatikus állományukat a petesejtbe ürítik, majd elpusztulnak. A petekezdemény fejlődésében a szomatikus follikuláris sejtek szintén fontos szereppel bírnak. Részt vesznek a petesejt szimmetriatengelyeinek

kialakításában, valamint létrehozzák a peteburok fő fehérjéit, majd elpusztulnak. Az érett petét végül egyetlen élő sejt, a megtermékenyítésre kész petesejt alkotja.



4. ábra. Különböző stádiumú petekamrák sematikus rajza. 1S: 1. stádiumú petekamra, 3S: 3. stádiumú petekamra, 6S: 6. stádiumú petekamra, 8S: 8. stádiumú petekamra, 9S: 9. stádiumú petekamra, 11S: 11. stádiumú petekamra, D: dajkasejt, P: petesejt, F: follikuláris sejt.

Morfológiai adatok alapján a petekamrák fejlődését 14 szakaszra osztották, ebből mutat be néhányat a 4. ábra.

A peteérés folyamán a poszterior póluson egy speciális citoplazmarészlet, az úgynevezett ivarplazma alakul ki. Az ivarplazma egy meglehetősen bonyolult szerkezetű, összetett citoplazmarészlet, amelyben RNS és fehérjerögök mellett mitokondriumok, Golgi készülékek és riboszómák halmozódnak fel nagy mennyiségben (Cox és Spradling, 2003). Az ivarplazma hiányát okozó mutációk hatására nem fűződnek le embrionális ivarsejtek, az utód steril lesz, vagyis az eredeti mutációt hordozó egyednek nem lesznek unokái, ezért ezt a fenotípust unokátlan (grandchildless) fenotípusnak nevezzük. Az embrionális ivarsejteknek szánt anyagot a petesejt csak tárolja és továbbítja, a szintézis a dajkasejtekben történik. A könnyen nyomon követhető sorsú embrionális ivarsejtek egy szellemes embriológiai kísérlet

végrehajtását tették lehetővé. Az ivarplazmából mintát vettek, majd azt egy másik embrió elülső részébe injektálták (Illmensee és mtsai., 1976). Az ivarplazma átültetése működőképes, ektopikus ivarsejteket eredményezett. Mindez azt bizonyítja, hogy az ivarplazma az ivarsejtek kialakulását irányító faktorok mindegyikét tartalmazza, kezdve a szelektor géntermékektől a szabályozási ranglétra alsó részén helyet foglaló végrehajtó géntermékekig.

Az ivarplazma összeszerelődése a petesejt poszterior végén történik, ezt a folyamatot részleteiben is igen jól ismerjük. Az összeszerelődést az elsőként lokalizálódó molekula, az *oskar* gén terméke irányítja (Ephrussi és mtsai., 1991). Abban az esetben, ha az *oskar* mRNS-t ektopikusan lokalizáljuk, kialakul az ivarplazma, ami végül ektopikusan lefűződő embrionális ivarsejteket eredményez (Ephrussi és Lehmann, 1992), hasonlóan az ivarplazma-átültetési kísérlethez. Az *oskar* gén az ivarplazma összeszerelő funkcióját koncentrációfüggően végzi. Alacsony *oskar* mRNS koncentráció kevés ivarplazmát és kevesebb számú lefűződő ivarsejtet eredményez, míg a vad típusnál magasabb mRNS koncentráció nagyobb számú ivarsejt kialakulásához vezet. Azoknak a mutációknak a segítségével, amelyek az *oskar* mRNS mennyiségét befolyásolják, irányítottan változtathatjuk az ivarplazma mennyiségét, illetve a lefűződő embrionális ivarsejtek számát. Az *oskar* mRNS teljes hiányában nemcsak az ivarplazma, de a potroh sem alakul ki és az embrió elpusztul.

Az *oskar* mRNS lokalizációját sokrétű, összetett sejtbioológiai folyamat szabályozza. A 8. stádiumban a petesejt mikrotubulusai pozitív végeikkel a poszterior pólus felé mutatnak és ezen a polarizált mikrotubulus hálózaton a Kinezin I motormolekula szállítja az *oskar* mRNS-t (Brendza és mtsai., 2000). Így az *oskar* mRNS felhalmozódásért a petesejt mikrotubulus hálózatának épsége és megfelelő polarizáltsága szükséges. Már korábban leírtak olyan géneket, amelyek a petesejt

mikrotubulus hálózatainak polarizáltságaért felelősek. A *cappuccino* és a *spire* gének mutációi a plusz végekkel a poszterior pólus felé mutató mikrotubulus hálózat helyett szubkortikális eloszlású mikrotubulus hálózatot hoznak létre, és így akadályozzák meg az *oskar* mRNS helyes lokalizációját (Emmons és mtsai., 1995). A *mago-nashi*, *par-1* és *rab11* gének mutációi nem stabilizálják kellőképpen a mikrotubulusok pozitív végeit a petesejt poszterior pólusán, ami szintén *oskar* delokalizációhoz vezet (Micklem és mtsai., 1997) (Shulman és mtsai., 2000) (Jankovics és mtsai., 2001). A *Notch* és a *Delta* mutációk megakadályozzák a poszterior follikuláris sejtek kialakulását, amelyek szignáljai nélkül az oocitában szimmetrikus mikrotubulus hálózat alakul ki, ami az *oskar* mRNS-t középre szállítja (Ruohola és mtsai., 1991).

Az *oskar* mRNS nem közvetlenül, hanem egy nagy ribonukleoprotein komplex részeként kapcsolódik a Kinezin I motormolekulához. Ennek a komplexnek jónéhány tagját biokémiai módszerekkel már azonosították (*Me31*, *orb*, *Y-sachtel*) (Mansfeld és mtsai. 2002; Nakamura és mtsai. 2001; Wilsch-Brauninger és mtsai. 1997). A *Staufen*-ról, egy kettősszálú RNS kötő fehérjéről pedig sejtbioológiai módszerekkel mutatták ki, hogy mindig az *oskar* mRNS-el lokalizálódik (St. Johnston és mtsai., 1991).

Amennyiben az *oskar* mRNS poszterior lokalizációja megtörténik, elkezdődik annak transzlációja. A helyspecifikus transzlációt három géncsoport teszi lehetővé. A transzlációs represszorok, mint például a *aret*, *apontic*, *Bicaudal-C* (Kim-Ha és mtsai., 1995), (Webster és mtsai., 1997), (Lie és Macdonald, 1999), (Saffman és mtsai., 1998) az *oskar* mRNS 3' nem transzlálódó régiójához kötődnek, és megakadályozzák annak transzlálódását a transzportfolyamatok alatt. A poszterior póluson úgynevezett derepresszor molekulák szabadítják fel a mRNS-t ez alól a gátlás alól, pl. a *p50* (Gunkel és mtsai., 1998), *p68*, *staufen* (Micklem és mtsai., 2000) gének

termékei. Az *osk* translációt irányító gének harmadik csoportjába a pozitív translációs aktivátorok sorolhatók, mint pl. *aubergine* (Wilson és mtsai., 1996), *vasa* (Breitwieser és mtsai., 1996).

A helyspecifikusan translálódott Oskar fehérje a petesejt szubkortikális aktinvázához kötődik. Az Oskar fehérje kihorgonyzódásához szükséges gének termékeit is sikerült azonosítani. Az aktinváz épségéért felelős két gén, a *TmII* és a *Moesin* mutációja az Oskar fehérje poszterior pólusról való delokalizációját eredményezi (Erdelyi és mtsai., 1995; Jankovics és mtsai., 2002).

E köré a lokalizált és helyben tartott Oskar fehérje köré szerveződik az ivarplazma többi komponense, mint például a *germcell-less*, *lmtrRNS*, *smtrRNS*, *Pcg*, *pumillio*, *nanos* és a *vasa* gének termékei (Cooperstock és Lipshitz 2001).

Az *oskar* mRNS lokalizációjában, helyspecifikus translálódásában, a fehérje kihorgonyzásában szerepet játszó, valamint egyes ivarplazma komponenseket kódoló gének mutációi közös, az embrió poszterior részét érintő fenotípussal rendelkeznek. A gyenge mutációk ivarsejthiányos, míg az erősebbek ivarsejt- és abdomenhiányos fenotípust okoznak. Ezeket a géneket az úgynevezett poszterior géncsaládba szokták sorolni (St Johnston és Nusslein-Volhard, 1992).

Az ivarplazmában tárolt anyai faktorok számának azonban jóval magasabbnak kell lennie, mint amennyit pusztán az ivarsejt irányú differenciáció megindítása igényel. Az embrionális ivarsejtek ugyanis a testi sejtektől nagymértékben eltérő fejlődési programjukat úgy hajtják végre, hogy mindeközben transzkripcionálisan inaktívak maradnak egészen addig, míg a gasztruláció során át nem haladnak a bélfalon (Zalokar, 1973). Ez arra utal, hogy az ivarplazma a korai ivarsejtek működését szabályozó faktorokat is tartalmaz. Az ivarplazma összetételének

vizsgálatával tehát az ivarsejtsors kialakulásának mikéntje valamint a korai ivarsejt működésre jellemző transzkriptumok egyaránt tanulmányozhatók.

Az ivarplazma összetétele

A poszterior csoportba tartozó gének szisztematikus vizsgálatával a kilencvenes évek elején azonosítottak néhány ivarplazmában lokalizálódó génterméket. Ezek a Staufén, Tudor és Vasa fehérjék, illetve a *nanos*, *spire* és *pumilio* RNS-ek (St Johnston és mtsai., 1991; Wang és Lehmann, 1991; Bardsley és mtsai., 1993; Barker és mtsai., 1992). Párhuzamosan folytak olyan kísérletek is, amelyek más szemszögből vizsgálták a korai *Drosophila* fejlődést, melyek során további ivarplazmában lokalizálódó RNS-eket azonosítottak: *CyclinB*, *germ cell-less* és *mtlrRNA* (Raff és mtsai., 1990; Jongens és mtsai., 1992; Kobayashi és mtsai., 1993). A Berkeley *Drosophila* Genome Project (BDGP) munkatársai genomszintű *in-situ* hibridizációs kísérletet folytatnak, melynek során idáig 5270 gént vizsgáltak meg, ezek közül 33-ról állapították meg hogy RNS-e az ivarplazmában is megtalálható (Tomancak és mtsai., 2002).

Az ivarplazma meglétének köszönhetően a *Drosophila melanogaster* kiválóan alkalmas fordított irányú vizsgálatokra. Mivel az ivarplazma a testi sejteknek szánt anyai információktól elkülönülve helyezkedik el, lehetőség adódik az ivarsejtfaktoroknak elhelyezkedésük alapján való azonosítására is. Az ivarsejt faktorok azonosítása ivarplazmában lokalizált géntermékek kereséséből, valamint az ezeket kódoló gének funkcionális analíziséből áll. Az utóbbi időben több fordított irányú, úgynevezett reverz genetikai vizsgálat indult ilyen céllal. Ivarsejthiányos és vad típusú embriók differential display módszerrel történő összehasonlításával

azonosítottak egy speciális, fehérjét nem kódoló, az ivarplazmában lokalizálódó RNS-t, melynek génje a *polar granule component (Pgc)* nevet kapta (Nakamura és mtsai., 1996). A DNS microarray technológia megjelenése új lehetőségeket nyújt. DNS microarray módszerrel különböző fejlődési stádiumban levő, vad típusú és ivarsejthiányos egyedek génexpressziós mintázatait hasonlították össze, és közel 100 ivarsejtspecifikus gént azonosítottak (Arbeitman és mtsai., 2002). Idáig azonban még nem azonosítottak ivarplazmában lokalizált RNS-eket microarray technikával.

Célkitűzés

Érdeklődésem középpontjában két kérdés áll. Az egyik az, hogy milyen géntermékekre van szükségük az ivarsejteknek ahhoz, hogy fejlődésük elkülönüljön a testi sejtektől? A másik pedig hogy milyen géntermékekkel látja el az anya az utódgeneráció ivarsejtjeit, amelyek túlélésükhöz és korai egyedfejlődésükhöz elengedhetetlenül szükségesek?

Az irodalomban jelenleg megközelítőleg ötven ivarplazmában lokalizálódó génterméket jegyeznek, de túlnyomó többségük funkciójáról nincsenek adataink. Rendelkezésünkre áll a teljes *Drosophila* genom szekvencia, ami megkönnyíti a genom szintű vizsgálatok kiértékelését. Napjainkban már szinte teljesen telítve van a *Drosophila* genom beszerezhető mutánsokkal, így megvizsgálhatnánk a teljes genomot az ivarsejtkialakulásra nézve, de nincs erre alkalmas, megfelelő hatékonyságú assay. Rendelkezésre áll a teljes *Drosophila* genomot lefedő DNS chip, de ivarplazma komponensek azonosítására nem használták fel ezidáig. Mindezek alapján látható, hogy a *Drosophila melanogaster* egy kiváló kísérleti objektum és PhD munkám megkezdésekor minden készen állt egy genom szintű reverz genetikai

kísérleti rendszer kidolgozásához. Munkám célja tehát 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 és végrehajtottuk a teljes genom szintű reverz genetikai kísérletsor modell-kísérletét.

Anyagok és módszerek

Drosophila törzsek

A *Drosophila* törzseket hagyományos élesztő-kukoricaliszt táptalajon tartottuk fenn. A keresztezéseket 25 °C-on végeztük, vad típusként w^{1118} -as izogén vonalakat használtunk. A SOT törzs három poszterior csoportba tartozó gén (*staufen*, *oskar* és *TropomyosinII*) mutáns allélját hordozza heterozigóta illetve transzheterozigóta formában. A $TmII^{gs1}$ egy P elem indukált hipomorf mutáció, a $TmII^{eg9}$ és $TmII^{eg20}$ mutációk a P elem imprecíz kivágódásával jöttek létre, míg a $TmII^{eglxl}$ az eredeti $TmII^{gs1}$ vonal P elemének precíz kivágódásából eredő revertáns allél (Erdelyi és mtsai., 1995). Az *osk-bcd3'UTR* egy kiméra transzgén, amely az *oskar* gén promóterét és kódoló szekvenciáit illetve a *bicoid* gén 3' nem transzlálódó régióit hordozza. Az osk^{54} és osk^{A87} mutáns vonalak az *osk* null alléljeit hordozzák (Markussen és mtsai., 1995).

Microarray lemezek előállítása

A *Drosophila* Gene Collection Release1 (Rubin és mtsai., 2000) cDNS könyvtárból 3200 annotált gén cDNS-ét plazmid specifikus primerek segítségével sokszorozítottuk. A cDNS-ek mennyiségét és minőségét agaróz gél elektroforézis segítségével ellenőriztük, majd a cDNS-eket MultiScreen PCR plate kittel (Millipore) tisztítottuk. A tisztított terméket 50 %-os DMSO-ban oldottuk fel, majd FMB cDNS tárgylemezre (Full Moon BioSystems) vittük fel két példányban (Hackler, Jr. és

mtsai., 2003). Az utófeldolgozás és blokkolás egy már korábban leírt módon folyt (Palotas és mtsai., 2004).

A microarray analízis folyamata

3-5 napos gs^1/gs^1 , eg^9/eg^9 , eg^{20}/eg^{20} , gs^1ex^1/gs^1ex^1 , $osk-bcd/+$, $wwosk^{A87}/osk^{54}$, $w+osk^{A87}/osk^{54}$, és w^{1118} genotípusú, jól beetett nőtények ováriumából totál RNS-t tisztítottunk. Az RNS tisztítás a Macherey-Nagel (Macherey-Nagel, Düren, Germany) cég által forgalmazott RNS tisztító kit-tel történt a mellékelt útmutató szerint. A tisztított RNS-t a szilika membránról eluáltuk és a továbbiakban 30U Prime RNáz inhibitor (Eppendorf) jelenlétében $-80C^0$ -on tároltuk. A tisztított RNS minőségét agaróz gélelektóforézissel, mennyiségét spektrofotometriával (NanoDrop, Rockland, DE, USA) ellenőriztük. A cDNS átírás és a jelölés a Genisphere cég által forgalmazott kit-tel történt a gyártó utasításai szerint (Genisphere Expression Array 350 Detection Kit system). A tisztított RNS-ből 2 mikrogrammot SuperScript II RNáz H⁻ Reverz transcriptáz (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) enzimmel cDNS-sé alakítottunk. A reakció 0.2 µg/µl random primer, 0.1 µg/µl oligo-dT primer, 1x First-Strand Buffer (250mM Tris-HCl (pH.:8.3), 375mM KCl, 15mM MgCl₂), 500nM dNTP mix (500nM) 0.01M DTT, 40U Prime RNáz inhibitor (Eppendorf) és 200 units SuperScript II RNáz H⁻ Reverz transcriptáz (Invitrogen Carlsbad, CA, USA) jelenlétében, 20µl végtérfogatban, $42C^0$ -on 2 órán keresztül zajlott. A reverz transzkripciót (RT) megelőzően az RNS és a primerek elegyét $80C^0$ -on 10 percig denaturáltuk. Az analizálandó és a kontroll mintát minden esetben a különböző fluoreszcens festékeket (Cy3 és Cy5) hordozó dendrimerekre specifikus oligonukleotidokkal jelöltük. Az első hibridizálási lépésben a specifikus

oligonukleotidokat tartalmazó cDNS került a 3200 annotált gén cDNS-ét hordozó tárgylemezekre. A hibridizációt 42 °C-on hat órán át végeztük FGL2 hibridizációs pufferben (10x Denhart oldat, 0,25M pH 7.0 nátrium-foszfát, 1mM EDTA, 1x SSC, 0,5% SDS) (*cDNS hibridizáció*). A második hibridizálási lépésben pedig a fluoreszcens festékeket hordozó dendrimereket hibridizáltuk a chip felületére. Ez a lépés 200 µl 2,5-2,5 µl Cy3 és Cy5 Dendrimert tartalmazó „Chiphyb” hibridizáló oldatban (Ventana) történt két órán át 42 °C-on (*jelölés*). A hibridizációk után a lemezeket 0,2x SSC-ben mostuk kétszer tíz percig, szobahőn, majd megszáritottuk. A mosást követően a lemezeket konfokális lézer szkennelőrrel (ScanArray Lite, GSI Lumonics) leolvastuk, detektáltuk a Cy3 és Cy5 fluoreszcencia értékeket. A szkennelés és az adatok nyers kiértékelése a korábban leírt módon történt (Puskas és mtsai., 2003). A pontok kiértékelése ScanAlyze és GenePix analízáló programmal történt. A számszerűsített adatokat Excell program segítségével, minőségi paraméterek figyelembe vételével értékeltük és normalizáltuk. A fenti kísérleteket Zvara Ágnes, a Funkcionális Genomikai Labor munkatársa végezte el. Az egyes microarray pontokon mért Cy3 és Cy5 emissziók medián értékét egymáshoz arányítottuk. Az egyes mérőpontokra számolt arányokat az összes mérőponton mért arányok mediánjára normalizáltuk, majd a *cluster* nevű program segítségével az eredményeket K-means módszerrel hasonlóságuk alapján 100 csoportba rendeztük. Ezután az eredményt a *treewiew* program segítségével színekkel vizualizáltuk (Eisen és mtsai., 1998). Meghatároztuk azokat a csoportokat, melyeknek tagjai a leginkább hasonlítottak az általunk elvárt mintázathoz, és ezek közül a részletes analízishez végül hatvanat választottunk ki.

Digoxigenin (DIG) jelölt DNS, illetve RNS szintézis

DNS jelöléshez a kívánt célszekvenciát hordozó plazmidot megfelelő enzimekkel linearizáltuk, majd gélből visszaizoláltuk. 1 µg DNS-t tíz percig denaturáltuk 100 °C-on, majd hozzáadtunk random hexanukleotid keveréket, a jelölt nukleotidokat is tartalmazó dNTP keveréket és Klenow enzimet, majd 16 órán át inkubáltuk az elegyet 37 °C-on (a Roche protokollja szerint). A reakciót 2 µl 0,2M pH 8-as EDTA-val állítottuk le, majd 2,5 µl 4M LiCl-ot és 75 µl -20 °C-os 96%-os etilalkoholt adtunk hozzá és -80 °C-on a termékeket kicsaptuk. Centrifugálás és 75%-os alkohollal való mosás után a csapadékot beszárítottuk, majd 50 µl TE pufferben oldottuk fel. A próba ellenőrzéséhez 1µl mintához 5 µl 5xSSC-t adtunk, az elegyet 5 percig forraltuk, majd gyors lehűtés után tíz-, száz- és ezerszeres hígítást készítettünk, és 2 µl-t pozitívan töltött poliamid membránra cseppentettünk. Száradás után a DNS-t UV fénnel keresztkötöttük a membránra. A filtert eppendorf csőbe helyeztük, majd kétszer öt percig mostuk PBT-ben. Ezután a mintát harminc percig állni hagytuk blokkoló oldatban (0,5% Roche blokkoló reagens PBT-ben). A membránt kétezerszeres hígítású alkalikus foszfátazzal konjugált anti-Digoxigenin ellenanyaggal inkubáltuk egy órán keresztül, majd festő pufferrel (100mM 9,5 pH Tris, 100mM NaCl, 50mM MgCl₂) mostuk háromszor öt percig. A színreakció előhívó pufferben (3,5 µl X-foszfátot és 4,5 µl NBT-t tartalmazó festő puffer, 1 ml) játszódtott le, amit kétszeres PBT-s mosással állítottunk le. A jelölés sikerességét a Roche jelölt kontroljaihoz hasonlítottuk.

Az RNS-jelöléshez a kívánt célszekvenciát hordozó plazmidot megfelelő enzimekkel linearizáltuk, majd 2,5 µl 4M LiCl-ot és 75 µl -20 °C-os 96%-os etilalkoholt adtunk hozzá és a termékeket -80 °C-on kicsaptuk. Centrifugálás és 75%-

os alkohollal való mosás után a csapadékot beszárítottuk, majd 50 µl DEPC kezelt vízben feloldottuk. A jelölő reakcióelegybe 1,5 µg DNS-t, 4 µl 5x transkripció puffert, 1 µl ribonukleáz inhibítort, 2 µl RNS polimerázt és 1,5 µl Digoxigenin jelölt NTP-t is tartalmazó NTP keveréket tettünk, majd a reakcióelegyet vízzel kiegészítettük 20 µl-re. A reakcióelegyet egy éjszakán át 37 °C-on inkubáltuk. A reakciót 2 µl 0,2M EDTA hozzáadásával állítottuk le, majd a termékeket LiCl-os kicsapással tisztítottuk. A jelölt RNS-eket 50 µl hibridizációs oldatban oldottuk fel.

RNS *in-situ* hibridizáció embriókon

A *Drosophila* Gene Collection Release1 cDNS gyűjteményből származó plazmidokat Promega miniprep express plazmidizoláló kittel tisztítottuk, majd megfelelő enzimekkel linearizáltuk. Antiszensz digoxigenin-jelölt RNS próbákat szintetizáltunk DIG RNS jelölő kit segítségével (Roche). *w¹¹¹⁸* és *osk-bcd3'UTR* transzgént hordozó egyedeket aktív szemet tartalmazó táptalajon petéztettük. 0-3 órás petéket gyűjtöttünk, 50%-os hypóban enyhe rázogatóással 2-3 perc alatt dekorionizáltunk, végül műanyaghálón összegyűjtve folyó vízzel alaposan leöblítettük. Az embriókat n-heptán:fixáló oldat 1:1 arányú elegyében rázatva 20 percig fixáltuk (a fixáló összetétele: 0,05M EGTA, 10% formaldehid PBS oldatban). A fixálót tartalmazó alsó fázist -20 °C-os metanolra cseréltük le, és erős rázással az embriók vitellin burkát eltávolítottuk. Ezután eltávolítottuk a felső, szerves fázist, majd az embriókat néhányszor metanollal mostuk. A fixált embriókat vagy rögtön felhasználtuk, vagy a további kísérletekig -20 °C-on tároltuk. Az embriókat metanol:PBT (0.1% Tween20-at tartalmazó PBS) 1:1 arányú elegyében 5 percig forgatva rehidráltuk, majd a mintákat 4% formaldehidet tartalmazó PBT-ben 25

percig újra fixáltuk. A fixáló oldatot ötszöri PBT-ben való mosással távolítottuk el. Az embriókat 5µg/ml Proteináz-K-t tartalmazó PBT oldattal kezeltük. A mintát újra ötször mostuk PBT-vel, majd 4%-os formaldehid tartalmú PBT-ben utófixáltuk. Négy újabb mosás után az embriókat PBT:hibridizációs oldat (50% formamid, 0.1% Tween20, 0.05 mg/ml heparin és 0.1 mg/ml tRNS 5XSSC oldatban) 1:1 arányú elegyében inkubáltuk 10 percig szobahőn, majd hibridizációs oldatban 55 °C-on egy órán át. 100 ng DIG jelölt RNS-t öt percig 80 °C-on kezeltük, majd 50 µl hibridizációs oldatban feloldottuk, majd a mintákra helyeztük, és 55 °C-on egy éjszakán át hibridizáltattuk. Másnap az embriókat hibridizációs oldatban mostuk hatszor húsz percig 55 °C-on, majd egy órán keresztül 2000-szeres hígítású, embriókon kimerített, alkalikus foszfátazzal konjugált anti-Digoxigenin ellenanyaggal inkubáltuk. Az ellenanyagot kétszer tíz perces PBT-s mosással távolítottuk el, majd a jelet 0,45% NBT-t és 0,35% X-foszfátot tartalmazó festő oldat segítségével hívtuk elő. Az embriókat mosás után tárgylemezre helyeztük, és glicerín:10xPBS 9:1 arányú elegyében fedtük le, majd Zeiss Axioscope II interferencia-kontraszt mikroszkóppal vizsgáltuk, és a készülék AxioCam CCD kamerájával és AxioVision szoftverével képeket készítettünk.

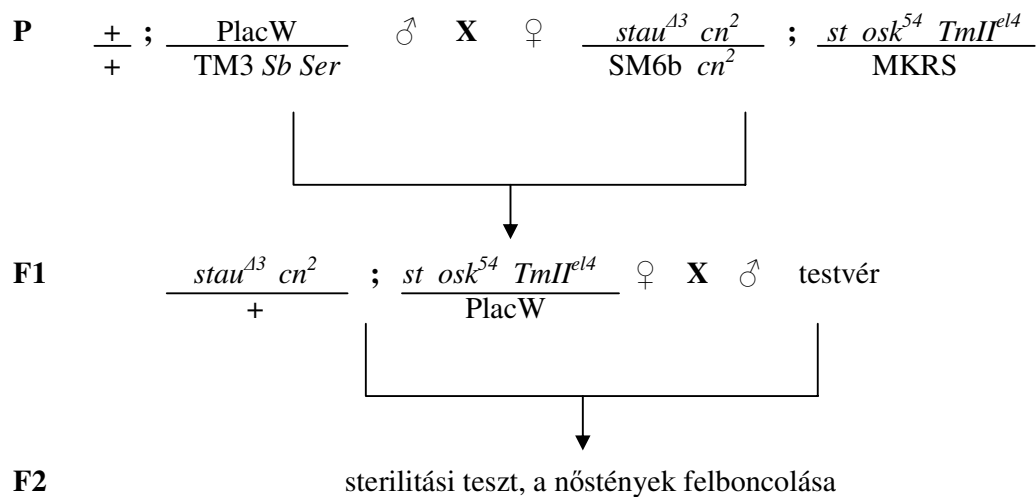
RNS és DNS *in situ* hibridizáció ováriumokon

A kétnapos, jól táplált nőstények petefészkeit jégen, PBT oldatban boncoltuk ki, majd 4% paraformaldehidet, 0,2% CLOROX hypo-t és 10% DMSO-t tartalmazó PBT-ben fixáltuk 20 percen keresztül. Kétszeri ötperces PBT-s mosás után 5 percig 50 µg/ml töménységű Proteináz-K oldattal kezeltük. A Proteináz-K enzimet-t 2 mg/ml-es glicinnel blokkoltuk, a petefészkeket 5 percig PBT-vel mostuk, majd 20

percig -20 °C-on metanol:DMSO 9:1 arányú elegyében inkubáltuk. Ezután a mintákat kétszer öt percig PBT-ben, majd öt percig PBT:hibridizáló puffer 1:1 arányú elegyével mostuk. A prehibridizációt 55 °C-on, hibridizáló pufferben végeztük. A hibridizáció hibridizáló pufferben százszorosára hígított DIG-jelölt próbákkal 55 °C-on 16 órán keresztül történt. A petefészkeket ezután 15 percig 55 °C-os hibridizáló pufferben, majd újabb 15 percig szobahőmérsékletű PBT:hibridizáló puffer 1:1 arányú elegyében mostuk. A mintákat kétszer tíz percig PBT-vel öblítettük, majd egy órán át 2000-szeres hígítású, ováriumokon kimerített anti-DIG ellenanyaggal inkubáltuk szobahőmérsékleten. Az ellenanyagot kétszer tíz perces PBT-s mosással távolítottuk el, majd a jelet 0,45% NBT-t és 0,35% X-foszfátot tartalmazó festő oldat segítségével hívtuk elő. Az embriókat mosás után SuperFrost tárgylemezre helyeztük, és glicerin:10xPBS 9:1 arányú elegyében fedtük le, majd Zeiss Axioscope II interferencia-kontraszt mikroszkóppal vizsgáltuk, és a készülék AxioCam CCD kamerájával és AxioVision szoftverével képeket készítettünk.

A staufer oskar TropomyosinII (SOT) érzékenyítő rendszer

A harmadik kromoszómás, P-elem indukált mutációkat hordozó hímeket SOT szűz nőtényekhez kereszteztük (6. ábra). Az utódnemzedékből a balanszer kromoszómák hiánya alapján a *stau*^{A3} *osk*⁵⁴ és *TmII*^{el4} allélekre valamint a P-elem inszercióra transzheterozigóta F1 nőtényeket kiválogattuk és testvéreikkel kereszteztük.



6. ábra. A domináns interakció kísérlet keresztezési sémája.

Az F2 genetrációban kikelő nőstény utódokat felboncoltuk, az ivarsejthiányos fenotípus penetranciáját megállapítottuk és százalékos arányban adtuk meg. Azokkal a törzsekkel, amelyek szignifikáns mértékben emelték meg az érzékenyített háttér alappentranciáját, megismételtük a kísérletet. Amennyiben újra magas értéket adtak, akkor az adott törzset a továbbiakban jelölteknek nyilvánítottuk, és megtartottuk a további vizsgálatokhoz.

Komplementációs analízis

Mivel a harmadik kromoszómás P-elem inszerciós mutánsgyűjtemény tagjainak citológiai térképhelyzete rendelkezésre állt, a megfelelő régióból a nyilvános törzsközpontokban elérhető mutánsokat elkértük, és komplementációs keresztezéseket végeztünk velük. (<http://flystocks.bio.indiana.edu/>). A megrendelt mutációk mindegyike homozigóta formában letális volt, és a következő balanszer kromoszómák egyikével voltak kiegyensúlyozva: TM1, TM3 *Sb Ser*, MKRS, TM6b

Tb. Amennyiben a komplementációs keresztezésből nem keltek ki túlélő transzheterozigóta egyedek, a két törzset nem komplementálónak, tehát allélikusak tekintettük.

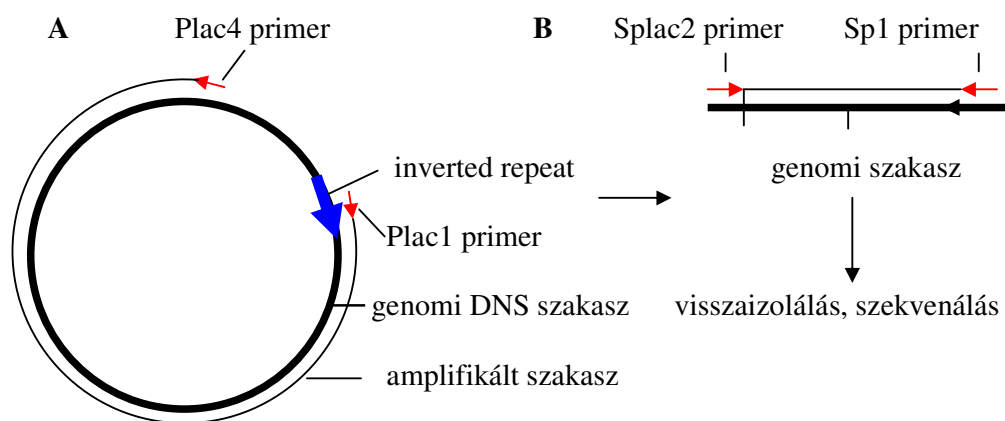
Genomi DNS tisztítás felnőtt *Drosophila melanogaster*ből

A P-elemeket tartalmazó törzsekből genomi DNS-t tisztítottunk. 100 µl feltáró pufferben (0,2M szacharóz, 0,1M, pH 9,2 TRIS puffer, 0,1M NaCl, 0,05M EDTA, 0,5%-os SDS) 30 felnőtt egyedet homogenizáltunk, majd a homogenizátumot 30 percig 65 °C-on inkubáltuk. 100 µl 8M Na-acetát hozzáadása után a mintát 30 percig jégen állni hagytuk, majd 10 percig 4 °C-on 12000 rpm-mel centrifugáltuk. A felülúszót új csőbe gyűjtöttük, és hozzáadtunk 660 µl, 96 %-os etilalkoholt. A minta alapos összekeverése után 2 óráig hagytuk -20 °C-on kicsapódni a nukleinsavakat. Ezután öt percig szobahőn, 12000 rpm-en centrifugáltuk, majd a felülúszót eltávolítottuk, végül a csapadékot 70 %-os etilalkohollal mostuk. A csapadékot öt percig vákuumban szárítottuk, majd 100 µl steril TE pufferben (pH 8) oldottuk fel.

A P elem inszerciók széli szekvenciáinak meghatározása

A PlacW-transzpozon széli szekvenciáinak meghatározására a Berkeley *Drosophila* Genom Project (BDGP) által kidolgozott módszert használtuk (<http://www.fruitfly.org/about/methods/inverse.pcr.html>). 10 µl (3 légynek megfelelő) tisztított genomi DNS-t négy bázis felismerésű restrikciós enzimekkel (MboI, HpaII) 3 óráig 20 µl végtérfigatban emésztettük. (10 µl gDNS, 2 µl 10x puffer, 1 µl RNáz 10 mg/ml, 6 µl dH₂O, 1 µl enzim.) Az emésztés során létrejött fragmenteket éjszakán át

taró T4 DNS ligáz kezeléssel 4 °C-on körré zártuk. (10 µl gDNS, 40 µl 10x ligáz puffer, 350 µl desztillált víz és 2 µl T4 DNS ligáz.) A széli szekvenciák amplifikálását inverz PCR segítségével, P-elem specifikus primerekkel (Plac1, Plac4) végeztük el. A reakcióelegy összetétele: 3 µl ligált, megközelítőleg 1/15 felnőtt légynek megfelelő genomi DNS, 1 µl 10mM-os dNTP keverék, 1 µl 10µM-os forward primer (Plac4), 1 µl 10µM-os reverse primer (Plac1), 5 µl 10x Taq puffer, 3 µl MgCl₂, 35.5 µl dH₂O és 0.5 µl rekombináns Taq polimeráz (Fermentas). Az amplifikációt a következő PCR program segítségével hajtottuk végre: 1x: 95 °C 5 perc, 35x: 95 °C 30 sec./ annealing hőmérséklet: 60 °C, 1 perc/ extenziós hőmérséklet: 68 °C, 2 perc, 1x: 72 °C 10 perc, majd 4 °C.



7. ábra. Az inverz PCR folyamata. A: Az első lépésben a megemésztett és cirkularizált fragmentről két külső, Placw-elem specifikus primerrel (Plac1, Plac4) amplifikáltuk a széli szekvenciákat. B: A nagyobb tisztaság érdekében két belső primerrel (Sp1 és Splac2) egy újabb reakciót indítottunk el.

A PCR reakció 1/10-ét 1%-os agaróz gélen vizsgáltuk meg. Ha a termék nem volt kellő tisztaságú, akkor az első PCR reakcióelegyet az 1000-szeresére hígítottuk, majd azt templátként használva egy második, nested PCR-t indítottunk, két belső, P elem specifikus primerrel (Sp1 és Plac2). A második PCR reakció paraméterei

megegyeztek az elsővel, kivéve az annealing hőmérsékletet, ami ebben az esetben 55 °C volt.

A PCR reakciókból a termékeket 1%-os, preparatív agaróz gélen választottuk el. A PCR termékeket géloncsolósos fragmentizálási technikával izoláltuk, majd Miniprep Express DNS tisztító mátrix segítségével tisztítottuk. A tiszta DNS mintákat az Sp1 primer segítségével megszekvenáltattuk.

Számítógépes szekvenciaelemzés

Az inverz PCR eljárás során kapott termékek P-elem szekvenciákból és a keresett széli genomi szekvenciákból állnak. A számítógépes elemzés előtt a P-elem szekvenciákat eltávolítottuk. Az így nyert tisztán genomi szakaszokat a BDGP kereső szervere segítségével a *Drosophila* teljes genomjával összehasonlítottuk (<http://www.flybase.org/blast>), és az inszerció helyét bázispár pontossággal megállapítottuk. A *Drosophila* annotációs adatbázis felhasználásával meghatároztuk, hogy a P-elem inszerció helyek milyen gént azonosítanak (<http://flybase.net/annot/>). Az így azonosított géneket a Flybase integrált adatbázisa segítségével vizsgáltuk tovább (<http://flybase.bio.indiana.edu/>).

Eredmények

A microarray analízis kidolgozása

Az ivarplazmában lokalizálódó RNS-ek azonosítására kidolgozott módszerünk egyrészt azon az elgondoláson alapult, hogy az ivarplazma mennyiségének csökkentésével, illetve teljes megszüntetésével, az abban normális esetben lokalizálódó RNS-ek stabilitása csökken, másrészt azon, hogy a csökkenés mértéke a cDNS microarray technika segítségével kimutatható. Tudjuk azt, hogy az *oskar* mRNS mennyiségének csökkentése az ivarplazma mennyiségének csökkenésével, növelése annak növekedésével jár (Smith és mtsai., 1992; Ephrussi és Lehmann, 1992). A vizsgálataink során különböző mutációk segítségével több, eltérő mértékben csökkent, illetve megnövekedett mennyiségű *oskar* RNS-el rendelkező peték RNS-einek mennyiségét hasonlítottuk vad típushoz. Esetünkben tehát a microarray technológiát nem a szokásos expressziós mintázatbeli különbségek detektálására használtuk fel, hanem mRNS-ek stabilitásának mérésére. Irodalmi ismereteink szerint ivarsejtfaktorokat mRNS-eik stabilitása alapján még nem azonosítottak.

Az *oskar* mRNS mennyiségét annak regulációjában szerepet játszó génnek, a *TropomyosinII*-nek három különböző erősségű mutációival (*eg9*, *eg20* és *gsI*) különböző mértékben csökkentettük (Erdelyi és mtsai., 1995). Mivel az *eg9* és *eg20* mutációk a transzpozon indukálta *gsI* allél származékai, ezért a három mutáció genetikai háttere nagymértékben hasonló. Annak érdekében, hogy a *TmII* mutációkat hordozó vonalak genetikai háttéréből származó kísérleti zajt csökkentsük, microarray kísérleteinkben felhasználtuk a *gsI* allélnek egy vad típusú revertánsát (*gsI^{exI}*) is. A *gsI^{exI}* allél nem mutat csökkenést az ivarplazma mennyiségében, ugyanakkor

genetikai háttere nagymértékben hasonlít a fenti *TmII* allélokéra. A *gslex1* revertáns allél használata lehetővé teszi tehát, hogy a vad típussal való összehasonlítás során megkülönböztessük a genetikai háttérből adódó expressziós különbségeket az ivarplazma hiányából adódó mRNS stabilitási különbségektől.

Az ivarplazma teljes hiányát az *oskar* gén két erős alléljének kombinációjával értük el (*osk^{A87}/osk⁵⁴*). Az *oskar* mutációktól független genetikai háttér ellenőrzése céljából két különböző genetikai háttéren hoztuk létre ezt az allélkombinációt (*ww osk^{A87}/osk⁵⁴* és *w+ osk^{A87}/osk⁵⁴*).

Az *oskar* mRNS mennyiségének megnövelésére egy *oskar-bicoid* kiméra transzgént hordozó törzset használtunk fel. Ebben a mutánsban a kiméra RNS a *bicoid* lokalizációs szignálnak megfelelően a pete anterior végébe szállítódik. A kiméra RNS hatására teljes értékű ivarplazma szerelődik össze, aminek következtében végül az embrió anterior végén is ivarsejtek fűződnek le, így nagyobb mennyiségű ivarplazmában loklizált mRNS stabilizálódik (Ephrussi és Lehmann, 1992).

Összehasonlítások

Minden mutáns kondíciót izogenizált *white* törzshöz hasonlítottunk, melyet gyakorlatilag vad típusnak tekinthetünk.

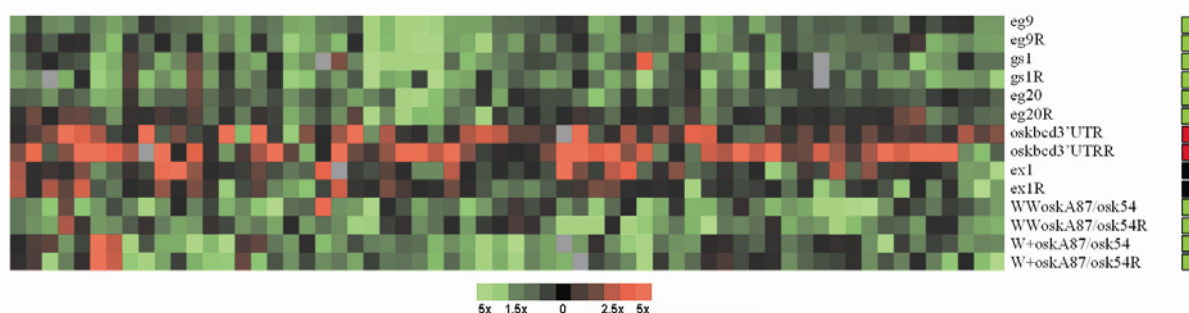
A *TmII* alléleket hordozó mutáns törzsekben kevesebb az ivarplazma mennyisége, csökken a lokalizálódó RNS-ek stabilitása, ezért intenzitásbeli csökkenést várunk a vad típushoz képest. Kontrollként a kiugrasztott revertáns allélt használtuk, ahol nem várunk az ivarplazmában lokalizálódó RNS-ek stabilitásában különbséget a vad típushoz képest.

Az *oskar* mutánsok felhasználásával létrehozott, teljes ivarplazmahiányos kondíciókban nagyobb mértékű stabilitáscsökkenést várunk a vad típushoz képest, mint a *TmII* allélokat hordozó mutánsok esetében. A valódi stabilitási adatok regisztrálásának érdekében különböző genetikai háttérrel rendelkező *oskar* mutáns törzseket hoztunk létre.

Az *oskar-bicoid* kiméra transzgént hordozó törzs és a vad típus összehasonlításában azt vártuk, hogy az ivarplazmában lokalizálódó mRNS-ek stabilitása megnövekszik, ezért több marad fenn a petékben a vad típushoz képest.

Annak érdekében, hogy csökkentsük a mérés zajszintjét, vagyis leszűkítsük az összehasonlításban szereplő minták mRNS komplexitását, a vizsgálandó nőtények ováriumait kiboncoltuk, és ezekből tisztítottunk RNS-t. Reverz transzkripció segítségével cDNS-t készítettünk róluk, és fluoreszcens festékekkel megjelöltük. Egy 3200 annotált gén cDNS-ét tartalmazó gyűjteményből microarray lemezt készítettünk, és erre a lemezre hibridizáltattuk a mintákat. A mintákban jelen levő RNS-ek mennyiségét a fluoreszcencia intenzitása alapján határoztuk meg. Mivel kísérletünkben az mRNS-ek mennyiségi változását stabilitáscsökkenés, és nem expressziós szintbeli változások eredményezik, a valódi változások kiválasztására nem a microarray kísérleteknél hagyományosan alkalmazott szignifikanciaszinteket alkalmaztuk. Úgy gondoltuk, hogy esetünkben sokkal kisebb mértékű mennyiségbeli változások is fontosak lehetnek. Ráadásul egyes ivarplazmában lokalizálódó RNS-ek mennyisége igen csekély is lehet, melyek stabilitási változásait a háttérzajtól a hagyományos értékelési mód képtelen megkülönböztetni. Kidolgoztunk egy kvalitatív kiértékelési rendszert, amely alkalmasabbnak mutatkozott az ivarplazmában lokalizált mRNS-ek kimutatására. Ennek érdekében az egyes microarray pontokon mért intenzitásértékek mediánjaiból képzett arányokat a microarray pontok medián értékére

normáltuk. Ezeket a normált adatokat a *Cluster* nevű kiértékelő program segítségével hasonlóság alapján csoportokba rendeztük. A *TreeView* nevű program segítségével az értékek mellé színkódokat rendelve a csoportokat láthatóvá tettük. Az értékelés kvalitatív módon történt. Kiválasztottuk azokat a géneket, amelyeknek RNS-ei az egyes összehasonlításban az általunk elvárt mintázathoz a legnagyobb mértékben hasonló mintázatot mutatták: kevesebb *oskar* RNS-t tartalmazó kondíciókban mennyiségük csökkent, az *osk-bcd* kimérát hordozó háttéren növekedett, a revertáns *Tropomyosin II* allél esetében pedig nem változott. Hét különböző kondíciót vizsgáltunk, minden kísérletet megismételve összesen 14 adatsorral rendelkezünk. A fenti kiértékelő módszerrel összesen hatvan gént választottunk ki a 3200 közül további vizsgálat céljából (8. ábra).



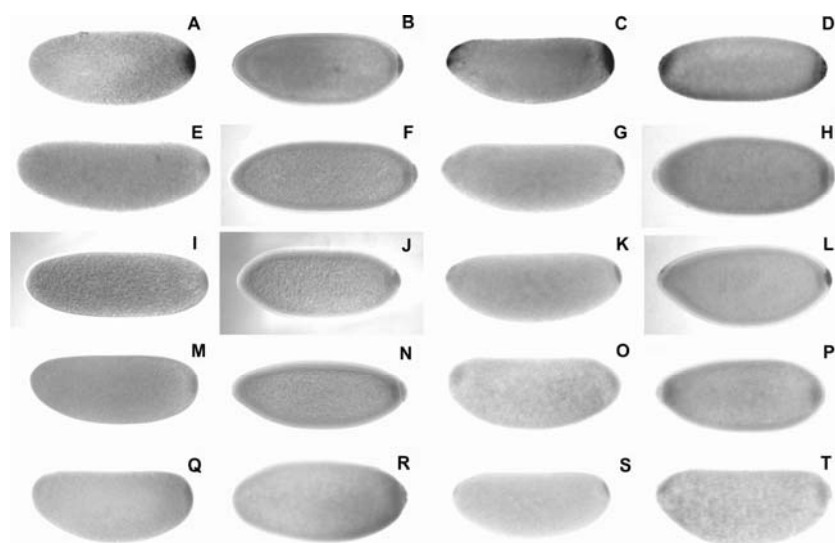
8. ábra. A microarray kísérletből kiválasztott 60 jelölt színkódja a 14 összehasonlításban. A zöld szín az RNS mennyiségének csökkenését jelenti a vad típushoz képest, a piros növekedést, a fekete pontokon nincs eltérés a két kondíció között, míg a szürke jelek nem értékelhető mérést jelentenek. A jobb oldali színskála az általunk elvárt mintázatot jelképezi. Az első három összehasonlítás a különböző *TmII* allélekkel általi ivarplazmacsökkenést, a piros szín az *osk-bcd* kiméra RNS-t tartalmazó összehasonlítást jelöli. Fekete színnel a revertáns *TmII* allél felhasználásával készült vizsgálat eredményét jelöltük. Az utolsó két összehasonlítás az *osk* null mutánsokat vizsgálta. Minden kísérlet duplán volt elvégezve (R).

A microarray analízis ellenőrzése

A legtöbb microarray kísérlet esetében a változásokat real-time PCR segítségével szokták ellenőrizni. Lokalizált mRNS-ekkel dolgozva azonban lehetőség adódik a microarray eredmények *in vivo* ellenőrzésére is. Mivel a microarray kísérletben azonosított jelölt génektől azt vártuk, hogy RNS-ük a poszterior póluson lokalizálódik, a legkézenfekvőbb ellenőrző eszköznek az RNS *in-situ* hibridizáció tűnt. Az összes jelölt gén cDNS-e rendelkezésünkre állt, így DIG jelölt antiszensz RNS-t készítettünk róluk, és ezekkel végeztük el az *in situ* RNS hibridizációt frissen lerakott petéken és három órás embriókon. A hatvan jelöltből 17-ről bizonyosodott be, hogy az RNS valóban a poszterior póluson lokalizálódik. Ebből a 17 génből háromról (*Miro*, *shu* és *myoglianin*) már korábban leírták, hogy termékük az ivarplazmában lokalizálódik (Tomancak és mtsai., 1998; Lo és Frasch, 1999), illetve a *Pros45*-ről ismeretes, hogy mRNS-e a lefűződő embrionális ivarsejtekben megtalálható (Cheng és mtsai., 1998). Ezek a tények megerősítik a feltevésünk helyességét, miszerint a microarray módszer alkalmas lokalizálódó RNS-ek stabilitáscsökkenését kimutatni.

A 17 gén RNS lokalizáció alapján három különböző csoportba sorolható be. 12 transzkriptum *oskar*-szerűen lokalizálódik, vagyis a frissen lerakott petékben szorosan a poszterior póluson található meg, majd a lefűződő embrionális ivarsejtekben is kimutatható marad (néhány példa a 9. ábrán látható).

Szinte minden megvizsgált RNS esetében gyengébb hibridizációt tapasztaltunk, mint az *oskar* kontrolban, ennek nagy valószínűséggel az az oka, hogy az *oskar* mRNS-ből, mint az ivarsejt-kialakulás központi szereplőjéből jóval több van jelen, mint az általunk felfedezett új ivarplazma komponensekből.

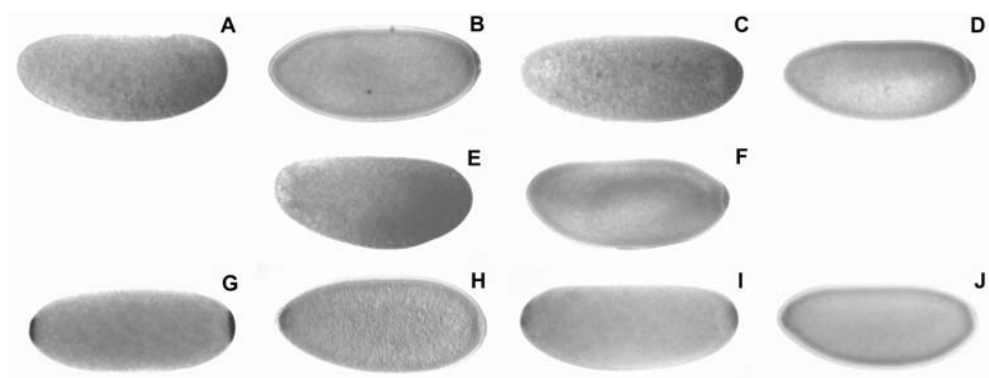


9. ábra. oskar-szerűen lokalizálódó RNS-ek *in-situ* hibridizációja. Kontrollként az *oskar* mRNS lokalizációját mutatjuk be vad típusú (A-B), illetve *oskar-bicoid* kiméra transzgént hordozó mutáns embriókon (C-D). Az *oskar* mRNS szigorúan a poszterior pólusra lokalizálódik a frissen rakott petékben (A), míg a későbbiekben csak a lefűződő embrionális ősvarsejtekben figyelhető meg (B). Példaként a kiválasztott jelöltekre a *CG11371* (E,F,G,H), *shu* (I,J,K,L), *Pros45* (M,N,O,P) és *tgo* (Q,R,S,T) gének termékeinek lokalizációját láthatjuk vad típusú (első két oszlop) és *osk-bcd* kiméra RNS-t hordozó embriókon (harmadik és negyedik oszlop).

A második RNS lokalizációs típusba három gént soroltunk be (*CG4424*, *mRpL54* és *CG2976*), ezek esetében a frissen rakott petékben gradiensszerű festődést figyeltünk meg, ami az anterior oldal felől erősödik a pete poszterior végéig, míg végül a jel a késői embriókban a lefűződő ivarsejtekben marad csak fent (10. ábra A-F).

A harmadik csoportba két gén tartozik (*CG5455* és *CG2493*). Ezeknek a géneknek az RNS-ei *oskar*-szerűen lokalizálódnak a frissen rakott peték ivarplazmájában, de nem fűződnek le az embrionális ivarsejtekkel. A *CG5455* és *CG2493* gének RNS-einek feltételezhetően az ivarplazma kialakulásában, vagy annak fenntartásában lehet szerepük (10. ábra G-J).

Annak bizonyítására, hogy az *in-situ* hibridizációval kimutatott poszterior lokalizáció valóban ivarplazma függő, az *oskar-bicoid* kiméra transzgént tartalmazó törzs felhasználható, hiszen itt ektopikusan, a pete anterior pólusán funkcionális ivarplazma jön létre. Abban az esetben, ha egy RNS valóban az ivarplazmában lokalizálódik, akkor az *oskar-bicoid* petékben anterior oldali festődést is várunk. Mind a hatvan jelölt esetében elvégeztük az RNS *in-situ* hibridizációs vizsgálatot *oskar-bicoid* petéken és embriókon is. A vad típuson végzett RNS *in-situ* hibridizáció eredményeit megerősítette, hogy a 17 poszterior lokalizáltságú RNS-t megtaláltuk az ektopikus ivarplazmában is (9-10. ábra). Ezek az eredmények szintén alátámasztják a feltételezésünket, miszerint a microarray kísérlet segítségével azonosítani tudunk ivarplazmában lokalizálódó RNS-eket.



10. ábra. Az *oskar*-tól eltérően lokalizálódó faktorok *in-situ* hibridizációs mintázatai. Három esetben anterior-poszterior gradiensszerű festődést figyeltünk meg (CG4424 A-B, *mRpL54* C-D és CG2976 E-F), míg két esetben a frissen lerakott petékben *oskar*-szerűen lokalizálódtak az RNS-ek, de nem mutathatóak ki a lefűződő ősvarsejtekből (CG5455 G-H és CG2493 I-J, *osk-bcd* kiméra RNS-t hordozó embriók).

Gén	Funkció	Fehérje domain	Biológiai folyamat
<i>tango</i>	DNS kötés	HLH PAS	nem ismert
<i>Orc2</i>	DNS kötés	Orc2	DNS függő DNS replikáció
<i>CG12104</i>	DNS kötés	HMG-Box	nem ismert
<i>cryptochrome</i>	nukleinsav kötés	DNS fotoliáz, FAD kötő	DNS javítás
<i>CG5455</i>	transzkripció faktor	alfa/béta hidroláz	nem ismert
<i>CG4424</i>	transzkripció faktor	Zn-finger	Transzkripció szabályozás
<i>shutdown</i>	izomeráz	Tetratricopeptid ismétlődés (TRP)	protein folding
<i>Pros45</i>	ATPáz	AAA ATPáz	proteolízis, peptidolízis
<i>CG2493</i>	karboxipeptidáz	Peptidáz S28, alfa/béta hidroláz	proteolízis, peptidolízis
<i>CG2976</i>	aciltranszferáz	Protein prenyltranszferáz	fehérje zsírsavkötés
<i>RpS5</i>	a riboszóma strukturális eleme, nukleinsav kötő	riboszómális S7	fehérje bioszintézis
<i>mRpL54</i>	mitokondriális riboszóma strukturális eleme	nincs ismert domainszerkezet	fehérje bioszintézis
<i>myoglianin</i>	növekedési faktor	Cystine-knot citokin	Sejt-sejt közötti jelátvitel
<i>Miro</i>	nem ismert	Ras GTPáz szupercsalád	nem ismert
<i>CycA</i>	ciklin függő protein kináz	Ciklin domain	sejtciklus, oogenesis
<i>CG8408</i>	nem ismert	ismeretlen fehérje domain	nem ismert
<i>debra</i>	nem ismert	nincs ismert domainszerkezet	nem ismert

1. táblázat. A microarray kísérletben azonosított gének listája. Az első oszlopban a gének neve, a másodikban azok funkciója található, amennyiben ismert. A harmadik oszlop a fehérje domainszerkezetéről tartalmaz információt, míg a negyedik oszlopban az adott gén biológiai folyamatokban játszott szerepéről kapunk információt.

Az azonosított gének ontológiai jellemzése

Az első táblázat bemutatja a kísérlet során azonosított géneket, melyeket ismert, vagy szekvenciájuk alapján kikövetkeztetett funkciójuk szerint öt különböző csoportba lehet beosztani. Az első nagy csoportba nukleinsav kötő doménnal rendelkező fehérjéket kódoló gének tartoznak. Kettőről közülük kizárólag elektronikus annotációkból származó adatok állnak rendelkezésre, funkciójuk a fehérjeszerkezet alapján valószínűsíthető (*CG12104* és *CG4424*). A *tango* génről

ismert, hogy terméke transzkripcionális szabályozási folyamatokat szabályoz a *Drosophila* központi idegrendszerében és tracheájában (Sonnenfeld és mtsai., 1997). Elképzelhető, hogy az ivarsejtfejlődéshez szükséges génexpresszió szabályozásában is szerepe lehet. Az *Orc2* gén terméke a DNS replikációban játszik szerepet (Loupart és mtsai., 2000). A *CG5455* génről kimutatták, hogy hímvarsejt-specifikusan expresszálódik (Arbeitman és mtsai., 2004). Jelenlegi tudásunk szerint a *cryptochrome* gén terméke a cirkadián ritmus kialakulását és fenntartását szabályozza (Panda és mtsai., 2002).

A következő nagyobb funkcionális csoportba szintén hat gén sorolható be, ezeknek termékei fehérjék bioszintézisében, érésében játszanak szerepet. A hatból kettőről (*shu* és *Pros45*) már bizonyították, hogy RNS-ük valóban a frissen lerakott peték poszterior pólusán lokalizálódik. A *shut-down* gén terméke a sejtosztódás szabályozásában játszik szerepet a 16 sejtes ciszták kialakulásában (Munn és Steward, 2000). A *Pros45* a 26S-es proteoszóma egyik szabályozó alegységét adja (Cheng és mtsai., 1998) Elképzelhető, hogy egyes fehérjék ivarsejtspecifikus lebontását szabályozza. Az azonosított gének között találunk két riboszómális fehérjét (*RpS5* és *mRpL54*). A *CG2493*-ről és a *CG2976*-ről kizárólag elektronikus összehasonlításokból származó információval rendelkezünk.

A *myoglianin* és *Miro* gének RNS-eiről szintén kimutatták, hogy az ivarplazmában lokalizálódnak (Lo és Frasch, 1999). A *Miro*-ról azt is tudjuk továbbá, hogy mitokondriumok szállításában játszik szerepet idegsejtnyúlványokban (Guo és mtsai., 2005). Figyelembe véve, hogy az ivarplazmában nagy mennyiségű mitokondrium található, valószínű, hogy a *Miro* gén termékének a mitokondriumok poszterior pólusra szállításában szerepe van.

A *CiklinA*-ról tudjuk, hogy szerepet játszik a tizenhat sejtes cisztában kitüntetett helyzetben levő petesejt kiválasztódásában (Lilly és mtsai., 2000). A *debra* nevű gén terméke a Ci transzkripció faktor poliubiquitinizációjáért felelős, és a szárny anterior/poszterior tengelyének kialakulásában játszik szerepet (Dai és mtsai., 2003). Tudjuk, hogy a petesejt tengelyeinek kialakulásának elengedhetetlen feltétele az ivarplazma kialakulása, így könnyen elképzelhető, hogy ennek a génnek a terméke ebben a folyamatban játszik szerepet.

A *CG8408* génről viszonylag kevés adat áll rendelkezésünkre, az általa kódolt fehérje egy eddig ismeretlen doménszerkezetet hordoz.

A SOT kísérleti rendszer kialakítása

A microarray módszer mellett kidolgoztunk egy genetikai interakción alapuló tesztrendszert is, melynek segítségével új, az ivarsejtek kialakulásában szerepet játszó faktorokat lehet hatékonyan azonosítani. Kutatócsoportunkban már folytak korábban hasonló, genetikai interakción alapuló kísérletek, amelyek ezt a feladatot célozták meg sikerrel. A korábbi kísérletek is érzékenyített háttéren folytak, ahol már ismert, az ivarsejtek kialakulásában szerepet játszó gének mutációit heterozigóta formában hordozó törzseket mutagenizáltak EMS-el. A kísérletsorozat során bebizonyosodott, hogy érzékenyített genetikai hátterekkel hatékonyan lehet ivarsejthiányos fenotípust mutató mutációkat azonosítani (Jankovics és mtsai., 2001). Ezek a kísérleti rendszerek azonban csak újonnan indukált mutációk vizsgálatára voltak alkalmasak, ezért a nagy hatékonyságú EMS mutagenézist kellett alkalmazni. Az EMS-es mutánsok feldolgozásánál azonban technikai nehézségek merülnek fel, így például a mutáció pontos helyét nehéz meghatározni. Elhatároztuk, hogy kidolgozunk egy

olyan speciális érzékenyített genetikai hátteret hordozó tesztrendszert, amihez bármilyen már meglévő mutáns keresztezhető, és ivarsejthiányos fenotípusra szelektálható. Felmerült, hogy a jelöltek feldolgozása sokkal egyszerűbb és gyorsabb lehetne, ha már meglévő P-elem indukálta mutánsokat tesztelnénk. A Szegedi Törzsközpont jóvoltából ezekből igen nagyméretű mutánsgyűjtemény állt helyben rendelkezésünkre, amelyet szabadon megvizsgálhattunk.

Az érzékenyített rendszert az ivarplazma kialakulására ható ismert mutációk kettős és hármas heterozigóta kombinációiból alakítottuk ki. Egyetlen kettős heterozigóta genotípus sem adott értékelhető fenotípust. A megvizsgált hármas transzheterozigóta mutánsok közül azonban több is enyhe anyai hatású ivarsejthiányos fenotípust adott (2. táblázat).

Ismert ivarsejthiányos fenotípusú mutációk heterozigóta kombinációi	vad típusú ováriumok száma	mozaikos fenotípus	teljes ivarsejthiányos fenotípus
<i>capu grk chal / st osk⁵⁴ TmII^{el4}</i>	25	5	4
<i>stau^{d3} / st osk⁵⁴ TmII^{H123}</i>	33	2	4
<i>Spir^{RP} stau^{d3} / st osk⁵⁴ TmII^{el4}</i>	38	2	1
<i>Mago¹ / st osk⁵⁴ TmII^{el4}</i>	35	1	0
<i>Spir^{RP} / st osk⁵⁴ TmII^{el4}</i>	35	0	0

2. táblázat. Az egyes poszterior gének mutációinak heterozigóta kombinációi különböző erősségű ivarsejthiányos fenotípust okoznak.

A későbbi munkákhoz ezek közül a legkevésbé komplex, értékelhető eredményt adó *stau^{D3}, osk⁵⁴ TmII^{el4}* hármas heterozigóta kombinációt választottuk ki. Előállítottunk egy *stau^{D3}/SM6b ; osk⁵⁴ TmII^{el4}/TM6* stabil, kiegyensúlyozott törzset (SOT törzs) amely 12,8 százalékban ivarsejthiányos fenotípust eredményezett. A SOT

törzshöz már bármilyen meglévő mutáns (*m*) keresztezhető és a *stau*^{D3}/+ ; *osk*⁵⁴ *TmII*^{el4}/*m* transzheterozigóták a balanszer kromoszómák domináns markerei alapján kiválogathatók (6. ábra). A teszt nőstények utódainak boncolásával megállapítható, hogy az *m* mutáció a SOT érzékenyített rendszer fenotípusának enhanszere-e.

SOT enhanszerek azonosítása

A SOT rendszer segítségével bármilyen típusú mutáns, illetve akár egész mutánsgyűjtemények is vizsgálhatóak. Választásunk a Szegedi Törzsközpont által fenntartott és részben jellemzett harmadik kromoszómás letális P-elem inszerciókat tartalmazó törzsgyűjteményre esett (Deák és mtsai., 1997). A mutánsgyűjtemény egyes tagjai a jellemzés mértékétől függően három csoportba oszthatók. A mutánsok mintegy harmadánál a P-elemek inszerciós helyét *in situ* hibridizációval meghatározták, és az adott kromoszómális régióban deléció térképezéssel letális allélt találtak. Ezeket *verified* törzseknek nevezzük. A mutáns vonalak egy részében a P-elem citológiai helyén letális mutációt nem sikerült azonosítani, ezek a mutánsok alkotják a *falsified* kategóriát. A mutánsok harmadik, *untested* csoportjába tartoznak azok a vonalak, melyek esetében a letalitás térképezése, vagy a P-elem citológiai térképezése nem történt meg.

A SOT rendszerrel a mutánsgyűjtemény *verified* és *untested* csoportjaiba tartozó vonalait vizsgáltuk meg. Az egyes mutáns vonalakból 5-6 hímet gyűjtöttünk, majd tíz, a SOT törzsből származó szűzzel kereszteztük őket. Az utódok közül a balanszer kromoszómák markermutációinak hiánya alapján 592 törzsből sikerült *stau*^{d3}/+ ; *osk*⁵⁴, *TmII*^{el4}/*m* genotípusú transzheterozigóta nőstényeket gyűjteni, majd ezeket testvérhímekkel párosztatni. A SOT rendszer enhanszereit a következő generációban a

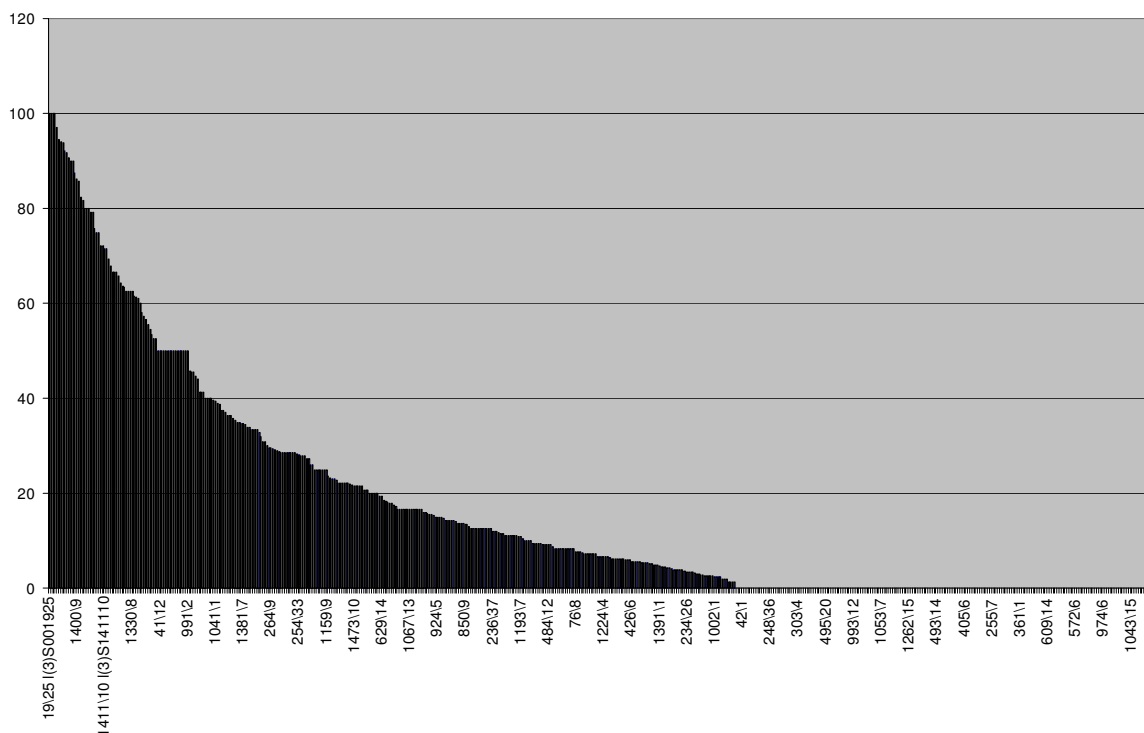
felnőtt egyedek boncolásával azonosítottuk. Az anyai hatású ivarsejthiányos fenotípus mindkét nemben megnyilvánul, de a petefészkek hiányát boncolással sokkal könnyebb megállapítani, ezért a kísérletsorozatban csak a nőstény utódok fenotípusát analizáltuk (11. ábra).



11. ábra. Vad típusú és mutáns ováriumok. A lefűződő poláris sejtek hiányában csökevényes ivarszervek képződnek, melyekben csak a gonádok szomatikus sejtjei találhatók meg (jobb oldal), míg kevés poláris sejt esetében mozaikos fenotípus figyelhető meg (középen). A bal oldalon vad típusú petefészkek láthatóak.

A tesztgenerációból minden kikelő nőstényt, átlagosan 19-et, minimum kettőt, összesen 11313 utódot boncoltunk fel. Az eredményeket a 12. ábra foglalja össze. Az ábra tanúsága szerint az egyes vizsgált mutánsok változatos mértékben emelték meg a rendszer ivarsejthiányos fenotípusának penetranciáját, néhány igen jelentősen, akár száz százalékosra, míg sok olyan eset is előfordult, ahol az alapérték alá csökkent.

Az ábrán ötven százalék körül egy váll figyelhető meg, ami megtöri az amúgy normál eloszlásra hasonlító görbét. Feltételeztük, hogy ez a kiugrás jelentőséggel bír, és az ötven százalék feletti penetranciaértékek genetikai interakciót, valódi enhanszer hatást jelentenek. Ellenőrzésképpen az adatok segítségével készítettünk egy normál eloszlási görbét, és ahhoz illesztettük az egyes törzseknél mért penetranciaértékeket tíz százalékos csoportosításban (13. ábra).

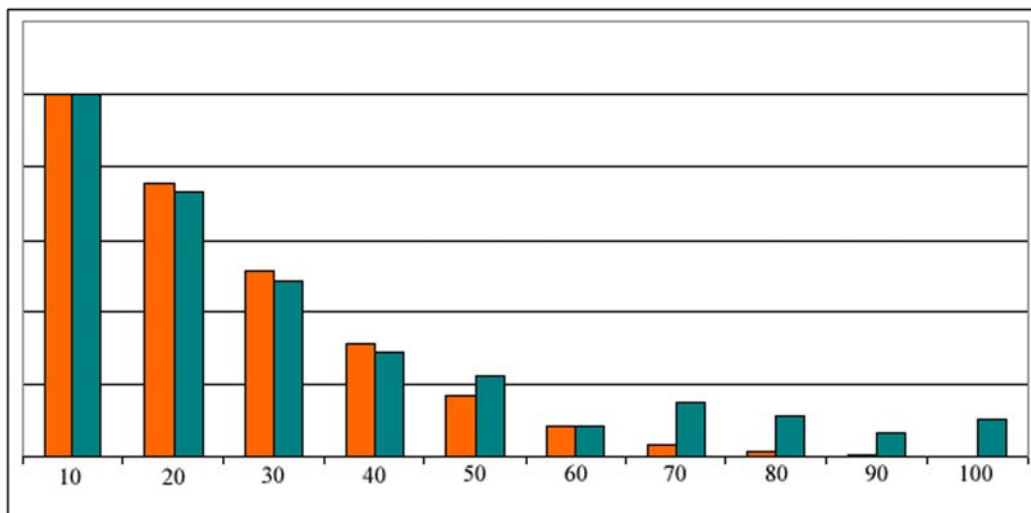


12. ábra. Az összes vizsgált mutáció ivarsejthiányos fenotípus (gs) penetranciája SOT háttéren. A függőleges tengelyen a penetranciaértékek láthatók százalékban megadva, a vízszintes tengelyen néhány reprezentatív törzset megneveztünk.

Jól megfigyelhető, hogy ötven százalék alatt az oszlopok magassága meglehetősen jól illeszkedik egymáshoz, míg e fölött az érték fölött már jelentős mértékben különböznek. Ezen adatok szerint kimondható, hogy az alappenetranciát ötven százalék fölé emelő, enhanszer törzsek nem véletlenszerűen emelik meg a penetranciát és valójában szerepet játszanak az ivarplazma összeszerelődésében.

A fentiekből kiindulva azokat a vonalakat tekintettük tehát jelölteknek, amelyek ötven százalék fölé emelték a tesztrendszer alappenetrancia értékét. A kísérletsorozat végén 55 törzs mutatott ilyen magas értéket. A törzsgyűjtemény egyik nagy előnye, hogy sok esetben egy mutáns gén több allélját is tartalmazza, így a

jelölteket végül 46 komplementációs csoportba lehetett besorolni, mivel több esetben egy gén több allélja is pozitív eredményt mutatott.



13. ábra. A vizsgált mutánsok ivarsejthiányos fenotípusának a normál eloszlás szerint várt, és a kísérletben mért eloszlása. A vízszintes tengelyen az egyes vonalak ivarsejthiányos fenotípusának penetranciáját ábrázoltuk 10 százalékos bontásban. Az oszlopok magassága az adott penetranciaértékbe eső mutánsok számával arányos. A narancssárga oszlopok a normál eloszlási értékeket, a zöldek a mért adatokat mutatják.

A kísérletet a jelöltekkel megismételtük. Végül 24 komplementációs csoportot tudtunk felállítani, ezeknek tagjai emelték meg újra az ivarsejthiányos fenotípus penetranciáját, a továbbiakban ezeket valódi harmadik kromoszómás SOT enhanszereként kezeltük.

A P-elemek inszerciós helyének pontos meghatározása

A P-elem indukálta mutánsok egyik nagy előnye, hogy az inszerciós pont helyét inverz PCR segítségével bázispárnyi pontossággal meg lehet határozni. A következő lépés tehát a P elemek széli szekvenciáinak meghatározása volt. Az inverz PCR reakció során keletkező DNS fragmentek bázissorendjét meghatároztuk, és a BDGP keresőszervere segítségével azonosítottuk a P elemek pontos helyét. Egy P-elem inszerciót akkor tekintettünk egy adott gén mutánsának, ha az a gén egyik exonjában, intronjában vagy 5' szabályozó régiójában helyezkedett el. A szekvencia alapú térképezési adatainkat összevetettük a Szegedi Törzsközpont nyilvántartásával. Megvizsgáltuk, hogy az általunk meghatározott térképhelyzet megfelel-e a delécióval térképezett letalitás, illetve az *in-situ* hibridizációs térképhelyzetnek. Mind a 24 vonal esetében egyezést tapasztaltunk, így az inszerciókat az adott gének új alléljeinek tekintettük. A harmadik táblázat bemutatja a kísérletsorozat során azonosított géneket.

Gén	Penetrancia	Fehérje domén	Biológiai folyamat
<i>Glut1</i>	100	glükóz transzporter	cukor transzport
<i>Simjang</i>	97,4	Nincs ismert doménszerkezet	p66 transzkripció represszor homológ
<i>ncRNA CR33327</i>	97,2	Nincs ismert doménszerkezet	nem ismert
<i>Taranis</i>	95	SERTA motívum	nem ismert
<i>Ten-m</i>	92,1	Keratin, RhsA domén	Sejt adhézió
<i>Calreticulin</i>	90,8	Calretikulin domén	unfolded protein kötő
<i>CG10311</i>	88,8	Nincs ismert doménszerkezet	nem ismert
<i>gilgamesh</i>	86,4	Szerin/treonin kináz	sejtvándorlás
<i>CG2211</i>	86	Nincs ismert doménszerkezet	nem ismert
<i>Ugt86Da</i>	84	UDP-glükuronozil transzferáz	Poliszacharidok metabolizmusa
<i>Delta</i>	83,3	Delta serrate ligand, Calcium kötő	Follikuláris sejt fejlődés
<i>Twins</i>	83,2	Protein foszfatáz 2A, WD-40 repeat	Wnt szignál út
<i>α-endosulfine</i>	79,3	Endoszulfín domén	oogenezis
<i>Sema-5c</i>	77,8	Semaforin, TSP1 domén	sejt adhézió
<i>CycA</i>	91,3	Ciklin domén	sejtciklus, oogenesis
<i>extra macrochaetae</i>	73,2	HLH DNS kötő domén	transzkripció korepresszor
<i>Malic enzyme</i>	71,8	SfcA, Malic enzim domén	malát metabolizmus
<i>miRNA CR33598</i>	67	Nincs ismert doménszerkezet	nem ismert
<i>Effete</i>	66,6	ubiquitin konjugáló E2 katalitikus domén	fehérje ubiquitinizáció
<i>CG5728</i>	62,5	S1 RNS kötő domén	rRNS érés
<i>CG5147</i>	58,9	RNS polimeráz III alegység	tRNS érés
<i>CG6400</i>	58,9	WD-40 repeat, Bromo domén	nem ismert
<i>SNF4Aγ</i>	58,8	CBS domén	zsírsavszintézis, sejten belüli jelátvitel
<i>seven up</i>	50,9	Zn-finger, HOLI domén	hormon receptor, transzkripció faktor

3. táblázat. A SOT enhanszer-azonosítási kísérletről származó gének. A táblázat összefoglaló képet mutat az azonosított génekről. A géneket ivarsejthiányos interakciós fenotípusuk erőssége, vagyis a SOT enhanszerhatásuk mértéke szerint rendeztük sorba. A táblázat információt nyújt az egyes gének fehérjéinek doménszerkezetéről, illetve az ismert vagy feltételezett szerepükről egyes biológiai folyamatokban.

A SOT enhanszerek ontológiai jellemzése

A P elemek inszerciós pontjainak meghatározása után az érintett géneket a Flybase annotációs adatbázisában vizsgáltuk tovább. A 24 jelöltből tizenhét olyan

géneket érintő mutációt hordoz, amelyeket már korábban leírtak és elneveztek. Ezek a következő gének: *Glut1*, *simjang*, *taranis*, *Cyclin A*, *Tenascin major*, *Delta*, *Ugt86Da*, *Calreticulin*, *gilgamesh*, *twins*, *endosulfine*, *Sema-5c*, *extra macrochaetae*, *Malic enzyme*, *seven up*, *effete* és *SNF4Aγ*. Öt mutáció eddig nem tanulmányozott, csupán annotációs számmal ellátott géneket érintett: *CG10311*, *CG2211*, *CG5728*, *CG5147* és *CG6400*, azonban ezekről is rendelkezésre állnak fehérje homológiai adatok, amelyek alapján a fehérje funkcióira következtetni lehet. A maradék két mutációt okozó mozgó genetikai elem olyan régióba ékelődött be, amely fehérjévé át nem íródó RNS-t kódol.

A microarray kísérletből származó génekhez hasonlóan, a SOT interakciós kísérletben azonosított gének közül is a legtöbb a transzkripcionális szabályozásban szerepet játszó gének csoportjába sorolható. Az *emc* gén terméke negatív transzkripciós regulátor, szerepet játszik az ivarmeghatározásban (Younger-Shepherd és mtsai., 1992), és kimutatták, hogy a hímivarsejtek érésben is részt vesz (Castrillon és mtsai., 1993). A *svp* gén terméke a szteroidhormon-receptorok családjába tartozik, receptor- és transzkripciósfaktor-aktivitással is rendelkezik, szerepet játszik többek között a *Drosophila* szem planáris polaritásának és az R7-es ommatidiának a kialakulásában (Domingos és mtsai., 2004). A *svp* tengeri sün homológjáról kimutatták, hogy anyai eredetű transzkriptuma az oocitákban megtalálható (Vlahou és mtsai., 1996). A *simjang* gén termékéről adatbázisokból származó hasonlósági adatok alapján tudjuk, hogy transzkripciós represszort kódol, a *p66* nevű emlős gén homológja. *Drosophilában* a szívfejlődés szabályozásában mutatták be a szerepét (Kim és mtsai., 2004). A *CG6400* által kódolt fehérjéről kimutatták, hogy kapcsolatba lép a *moesin* fehérjével, melyről kutatócsoportunk már megállapította, hogy szerepet játszik az ivarsejtek kialakulásában (Formstecher és mtsai., 2005; Jankovics és mtsai.,

2002). Feltételezésünk szerint egy nagy fehérjekomplex részeként szerepet játszhatnak az ivarsejtek kromatin szintű génexpresszió szabályozásában.

A következő csoportba azokat a géneket soroltuk, amelyeknek termékei feltételezhetően az ivarsejtek vándorlásában játszanak szerepet. A *Ten-m* gén egy extracelluláris fehérjét kódol, amely szignáltranszdukciós utak bekapcsolásában vesz részt (pl.: engrailed és a wingless), valamint felhalmozódik a poszterior középbéli lemezben, ahol a vándorló embrionális ivarsejtek is megtalálhatók (Baumgartner és mtsai., 1994). Ismert az a tény is, hogy sejtadhéziós folyamatokban vesz részt (Kiger és mtsai., 2003). A *gilgamesh* gén termékéről tudjuk, hogy egy szerin/threonin receptor kinázt kódol, és gliasejtek vándorlásában (Hummel és mtsai., 2002), illetve a spermatogenezisben játszik szerepet (Castrillon és mtsai., 1993). A Sema-5c fehérje sejt felszíni szignáltranszdukciós utakhoz köthető, továbbá sejt-sejt adhéziós folyamatokban és az axonnövekedésben bizonyítottan szerepet játszik, és az anyai eredetű RNS-e korai embriókban kimutatható (Dudu és mtsai., 2004; Khare és mtsai., 2000). Az *SNF4A γ* gén egy AMP aktivált kináz enzim egyik alegységét kódolja. Tudjuk, hogy érzékeli az AMP szintet a sejtben, és az ATP mennyiségének csökkenésére aktiválódik (Pan és Hardie, 2002). Azt is leírják viszont, hogy negatív regulátora a HMG-CoA reduktáz nevű enzimnek, ami az izoprenoidok bioszintézisében játszik szerepet. Ennek az útvonalnak több résztvevőjéről is kimutatták már, hogy mutációjuk miatt az embrionális ivarsejtek egy része eltéved az embriogenezis során (Tschape és mtsai., 2002; Santos és Lehmann, 2004b).

Három olyan gént azonosítottunk, melyek termékei az ivarsejtek energiaellátásában játszhatnak fontos szerepet. A testi és ivari őssejtek, illetve azok leszármazottainak osztódása erősen tápanyagfüggő. Gazdag táptalajon tartott nőtények három-négyszer annyi petét raknak mint a szegény táptalajon tartott

társaik. A táplálékbevitel változására a petetermelés az inzulin-út vonal segítségével válaszol. Több, ebben az út vonalban részt vevő gén mutációjáról kiderült, hogy nősténysterilitást okoz (Drummond-Barbosa és Spradling, 2001). Az *α -endosulfine* gén termékéről kimutatták, hogy sejtspecifikus inzulinszekréción indukál (Heron és mtsai., 1998). A *Malic* enzimről kimutatták, hogy *Xenopus* petesejtek energiaellátásában vesz részt (Nutt és mtsai., 2005), és mutációja a petesejt pusztulását eredményezi. A *Glut1* gén terméke cukortranszporterként biztosítja a sejtek energiaellátását (Escher és Rasmuson-Lestander, 1999).

A *CycA*-ról már a microarray kísérlet kapcsán leírtuk, hogy szerepet játszik a tizenhat sejtes cisztában kitüntetett helyzetben levő petesejt kiválasztódásában, az *effete* gén pedig egy ubiquitin konjugáló enzimet kódol, amely más fehérjék mellett a CiklinA-t is ubiquitinálja. Kimutatták, hogy nagyon pontos szabályozás alatt kell állnia a ciklinek lebontásának, köztük a CiklinA-nak is az oogenezis során, melyet más fehérjékkel együttműködve az *effete* gén terméke szabályoz (Ohlmeyer és Schupbach, 2003).

A microarray kísérlethez hasonlóan az interakciós tesztrendszerben is azonosítottunk nukleinsavkötő-fehérjéket kódoló géneket. Mindkét gén kizárólag annotációs számmal rendelkezik. A *CG5728*-as jelű gén fehérjéje a homológiák alapján RNS-kötő doménnel rendelkezik és a rRNS-ek érésében játszik szerepet, míg a *CG5147* fehérjéjében DNS-kötő motívumok találhatók, és feltételezhetően a tRNS-ek lebomlásában vesz részt.

A *Delta* génről már korábban kimutatták, hogy a poszterior terminális follikuláris sejtek kialakulásában vesz részt, és ezáltal szerepet játszik a petesejt anterior-poszterior tengelyeinek kialakulásában (Lopez-Schier és St Johnston, 2001).

Kimutatták, hogy a Twins fehérje kapcsolatba lép az Armadillo fehérjével (Greaves és mtsai., 1999) és a Wg/Wnt útvonal pozitív regulátora (Bajpai és mtsai., 2004), így a follikuláris sejtek érésében és a petesejt petekamrában való elhelyezkedésében bizonyítottan részt vesz (Deng és Lin, 2001; Dobens és Raftery, 2000).

A *taranis* gént a trithorax gének csoportjába sorolták be, és valószínűsítik, hogy a sejtciklus szabályozásában játszik szerepet (Calgaro és mtsai., 2002).

A *calreticulin* génről tudjuk, hogy terméke fehérjekötő képességgel rendelkezik és az idegrendszer fejlődésében mutatták ki a szerepét *Drosophilában* (Prokopenko és mtsai., 2000).

Az *Ugt86Da* gén a *UDP-glucose-glycoprotein glucosyltransferase* komplex egyik alegységét kódolja. A komplex fehérjék aminosavainak glikozilációját végzi (Zuber és mtsai., 2001).

Azonosítottunk két kisméretű RNS-t kódoló génszakaszt is. A *miRNA CR33598* egy úgynevezett mikroRNS-t kódol, míg az *ncRNA CR33327* jelű génszakasról fehérjét nem kódoló transzkriptum íródik át. A közelmúltban egyre több információ gyűlt össze arra nézve, hogy sok kis méretű RNS halmozódik fel a nuage-ban, és szerepet játszanak az oogenezis folyamataiban specifikus génexpressziós szabályozás útján (Grun és mtsai., 2005).

Két olyan gént azonosítottunk (*CG10311* és *CG2211*), amelyek kizárólag annotációs számmal rendelkeznek, és gyakorlatilag semmilyen információval nem rendelkezünk róluk, az általuk kódolt fehérjék semmilyen ismert doménszerkezettel nem rendelkeznek.

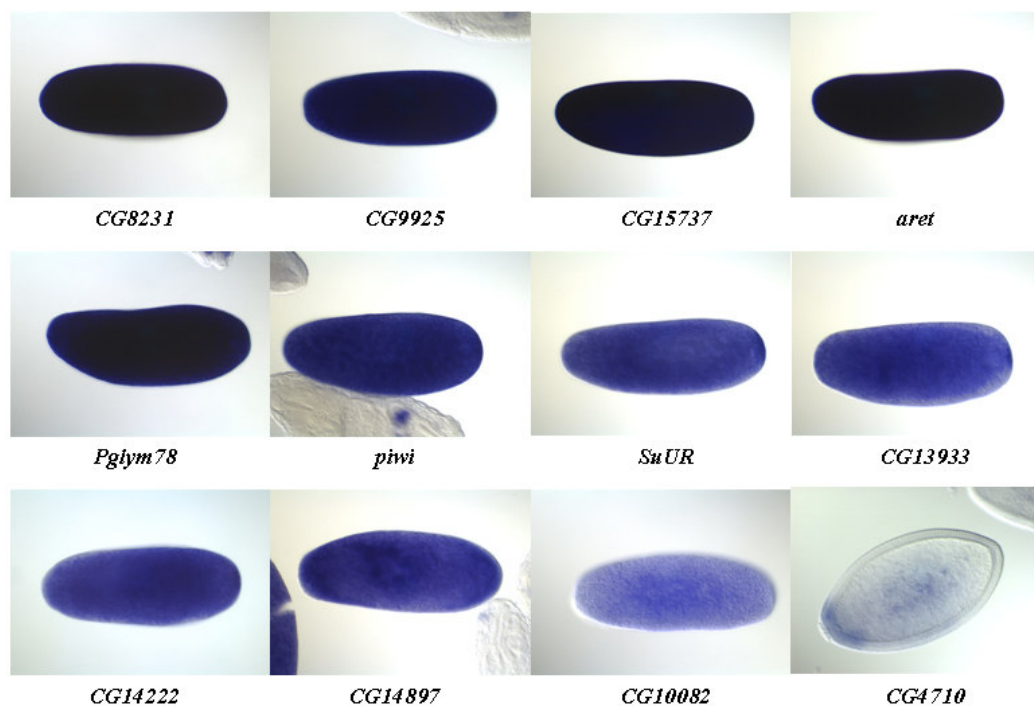
Az Eredmények megvitatása

A microarray analízis értékelése

Kidolgoztunk és sikeresen alkalmaztunk egy új módszert a *Drosophila melanogaster* fejlődő petéinek poszterior pólusán lokalizálódó RNS-ek azonosítására. Kísérletsorozatunk a microarray analízist újszerű megközelítésben, RNS stabilitás mérésére használta fel. Korábban ezt csak mikroorganizmusok esetében tették (Bernstein és mtsai., 2002; Selinger és mtsai., 2003; Grigull és mtsai., 2004; Wang és mtsai., 2002). Az RNS-ek stabilitása alapján a vizsgált 3200 génből 60-at választottunk ki részletes analízis céljából, 1,9%-át a vizsgált géneknek. Az *in-situ* hibridizációk alapján 17 génről bemutattuk, hogy RNS-ük valóban lokalizálódik az ivarplazmában (a teljes mintának 0,5%-a). A tizenhét génből négyről (*Pros45*, *myo*, *shu* és *Miro*) már korábban leírták, hogy RNS-ük a korai embriók poszterior pólusán lokalizálódik. Ezek az információk alátámasztják a kísérlet sikerességét.

Megvizsgáltuk a BDGP *in-situ* hibridizációs adatbázisát és összehasonlítottuk az eredményeinkkel. A genomprogram adatbázisa 33 ivarplazmában lokalizált RNS-t tartalmaz. Ezek közül 12 (*CG8231*, *CG9925*, *CG15737*, *CG13933*, *CG14222*, *CG14897*, *CG10082*, *CG4710*, *aret*, *Pglym78*, *piwi* és *SuUR*) az általunk készített microarray lemezen is vizsgálható volt, mégsem azonosítottuk őket a színcód alapján. A BDGP honlapján közzétett *in-situ* hibridizációs képeket megvizsgálva jól látható, hogy ezeknek a géneknek a hibridizációs mintázata jelentősen eltér az ivarplazmában lokalizált RNS-ekétől (14. ábra), ezért nem tudtuk azonosítani őket. Ezek alapján a képek alapján nem tudjuk, hogy miért nevezik a BDGP munkatársai ivarplazmában lokalizálódónak ezeket az RNS-eket. Az viszont könnyen belátható, hogy a hatalmas

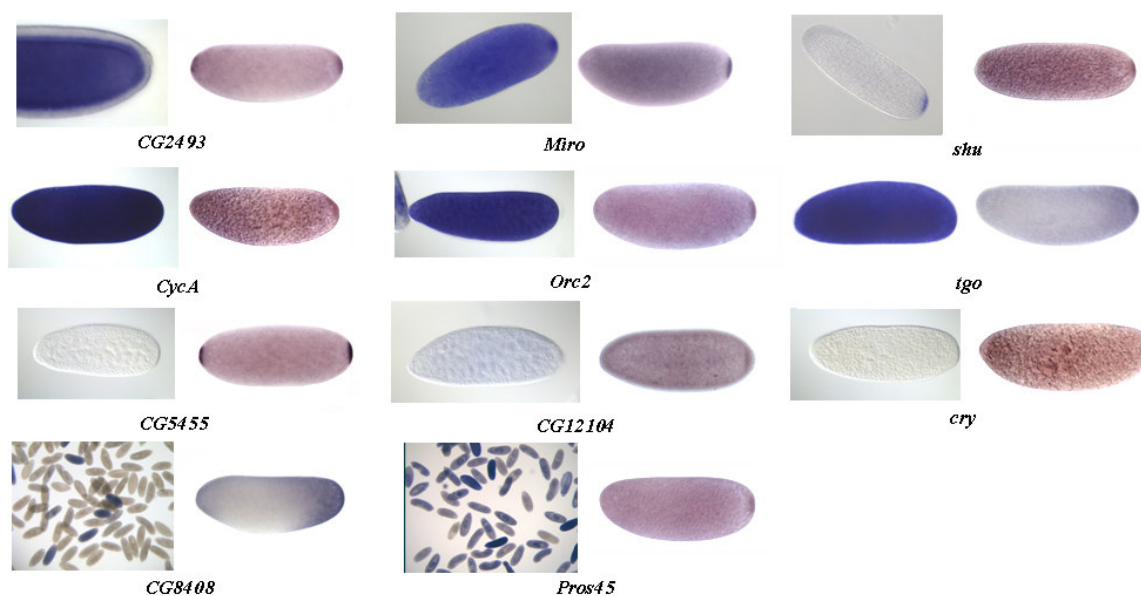
mennyiségű, egyenletesen eloszló anyai hatású RNS-ek stabilitása nem csökkenthető kimutatható mértékben a kis térfogatú ivarplazma hiányával, így nem meglepő, hogy a microarray kísérlet során nem azonosítottuk ezeket a géneket.



14. ábra. A BDGP által ivarplazmában lokalizálódó RNS-ek *in-situ* hibridizációs képe. Az ábrán azoknak az RNS-eknek a mintázata látható, amelyek a microarray lemezünkön is rajta voltak. Jól látható, hogy közelsem kizárólag az ivarplazmában találhatók meg ezek az RNS-ek, hanem a teljes petében egyenletesen oszlanak el. Kivételt képez a CG4710 annotációs számmal rendelkező gén. Esetében viszont szintén nem beszélhetünk ivarplazma-specifikus lokalizációról, ráadásul a lefűződött poláris sejtek sem festődnek.

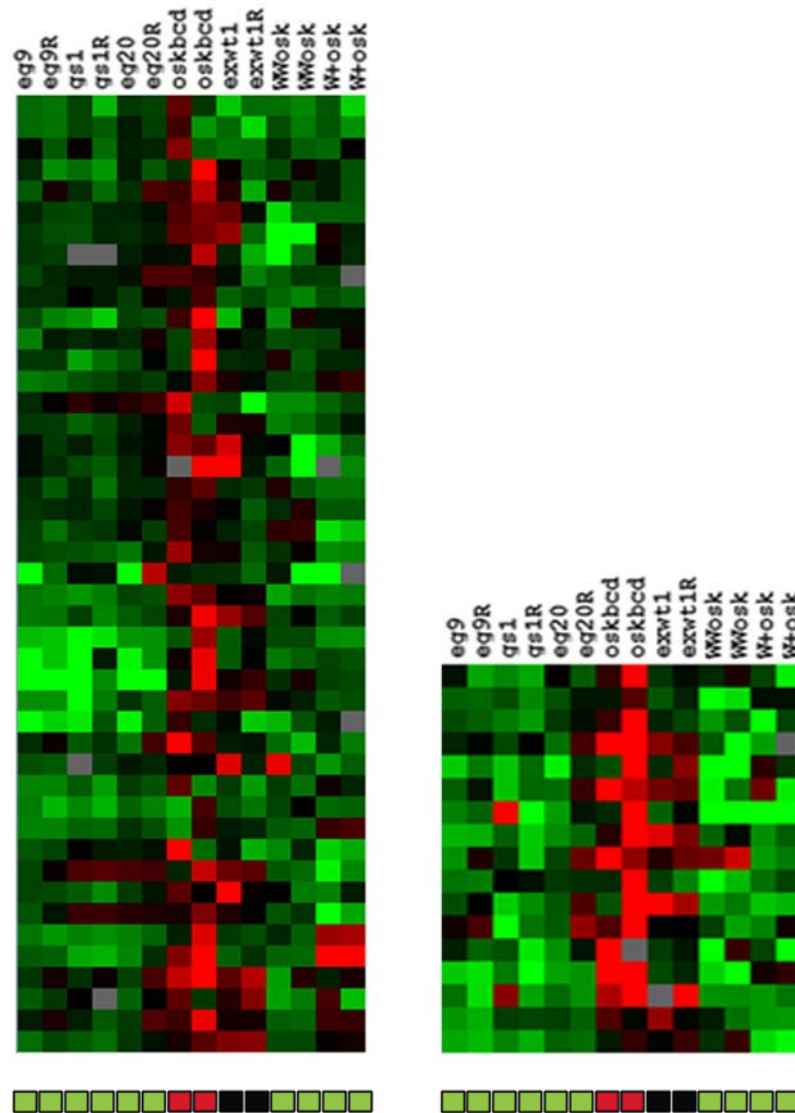
Fény derült a genomprogram kísérletsorozatának egyéb hiányosságára is. Találtunk ugyanis olyan géneket, amelyek RNS-ei kimutathatóak az ivarplazmában, a BDGP adatai pedig mást mutatnak. Ennek több oka is lehet. Az egyik, hogy néhány esetben kevés korai fejlődési stádiumban levő petét vizsgálnak, így az alacsony mintaszám nem elegendő a kísérlet kiértékeléséhez. Másrészt az automatizált

rendszerek nem elég finomak ahhoz, hogy az egyes RNS-ek mennyiségbeli különbségéből adódó kísérleti körülményeket minden esetben külön beállítsák. Könnyen előfordulhat hogy egyes minták alulexponáltak, míg másokat „túlhívnak”, és így úgy tűnhet mintha sok RNS lenne jelen az adott stádiumban. Mindkét esetre találtunk példát (15. ábra).



15. ábra. Az általunk ivarplazmában lokalizálódó RNS-ek *in-situ* hibridizációs mintázata a BDGP eredményeivel összehasonlítva. A *CG2493* gén esetében megegyezik az eredmény, miszerint a lefűződő poláris sejtekben nem mutatható ki az RNS, viszont a korai petében nagyon jól kimutatható, bár a BDGP képei erősen túl vannak exponálva. Sokkal meglepőbb a *Miro* és *shu* gének esete, ahol még a BDGP képein is látszódik a festődés az ivarplazmában, mégsem sorolják őket ebbe a csoportba. A következő három gén (*CycA*, *Orc2* és *tgo*) esetében véleményünk szerint a minták túlexponáltak, ezért nem detektálható az ivarplazmában önállóan a festődés. Ezzel szemben a *CG5455*, a *CG12104* és a *cry* esetében a minták alulexponáltak. A *CG8408* és a *Pros45* eredményéről csak ezeket a kis nagyítású képeket közlik, amelyek igen eltérő festődési mintázatot mutatnak.

Összehasonlítottuk a hatvan kiválasztott gén hibridizációs színekódját és megvizsgáltuk, hogy miben különbözik a valóban lokalizálódó tizenhét a nem lokalizálódóktól (16. ábra).



16. ábra. A poszterior póluson lokalizálódó 17 jelölt és a nem lokalizálódó 43 gén színekódjának összehasonlítása. A jobb oldalon található a poszterior póluson lokalizálódó RNS-ek színekódja, a bal oldali panel a nem lokalizálódókat mutatja. Jól látható, hogy a jobb oldali panelen intenzívebb csökkenés tapasztalható a teljes ivarplazmahányos háttéren a bal oldali panelhez képest. A kísérletben elvárt színekódot az ábra alján található csík mutatja.

Azt tapasztaltuk, hogy a valóban lokalizálódók sokkal jelentősebb csökkenést mutattak a teljes ivarplazmahíányos háttereken mint a *TropomyosinII* allélokkal csökkentett mennyiségű ivarplazmát tartalmazó mintákon.

A jövőben hasznosítani szeretnénk mindezeket a megfigyeléseket, terveink szerint a kísérletet a teljes *Drosophila* genomra nézve is szeretnénk elvégezni. Mivel a 3200 génből 17 mutatott ivarplazma lokalizálódást, feltételezésünk szerint a közel 15000 *Drosophila* génből megközelítőleg 100 lehet a teljes genomban microarray analízisben felfedezhető az ivarplazmában lokalizálódó RNS fajták száma.

Az interakciós kísérletek értékelése

Kidolgoztunk egy olyan genetikai interakción alapuló, érzékenyített háttérű tesztrendszert, amelynek segítségével az ivarplazma létrejöttében, az ivarsejtek kialakulásában szereplő géneket azonosíthatunk. A tesztrendszert egy harmadik kromoszómás, letális P elem gyűjteményen teszteltük le, és a megvizsgált közel hatszáz inszercióból 24 komplementációs csoport viselkedett erős enhanszerként. Figyelembe véve, hogy jelenleg a *Drosophila* gének számát megközelítőleg 15000-re teszik, a fenti kísérlet alapján nagyjából 500 lehet azoknak a géneknek a száma, melyeknek termékei szerepet játszanak az ivarsejtek kialakulásában.

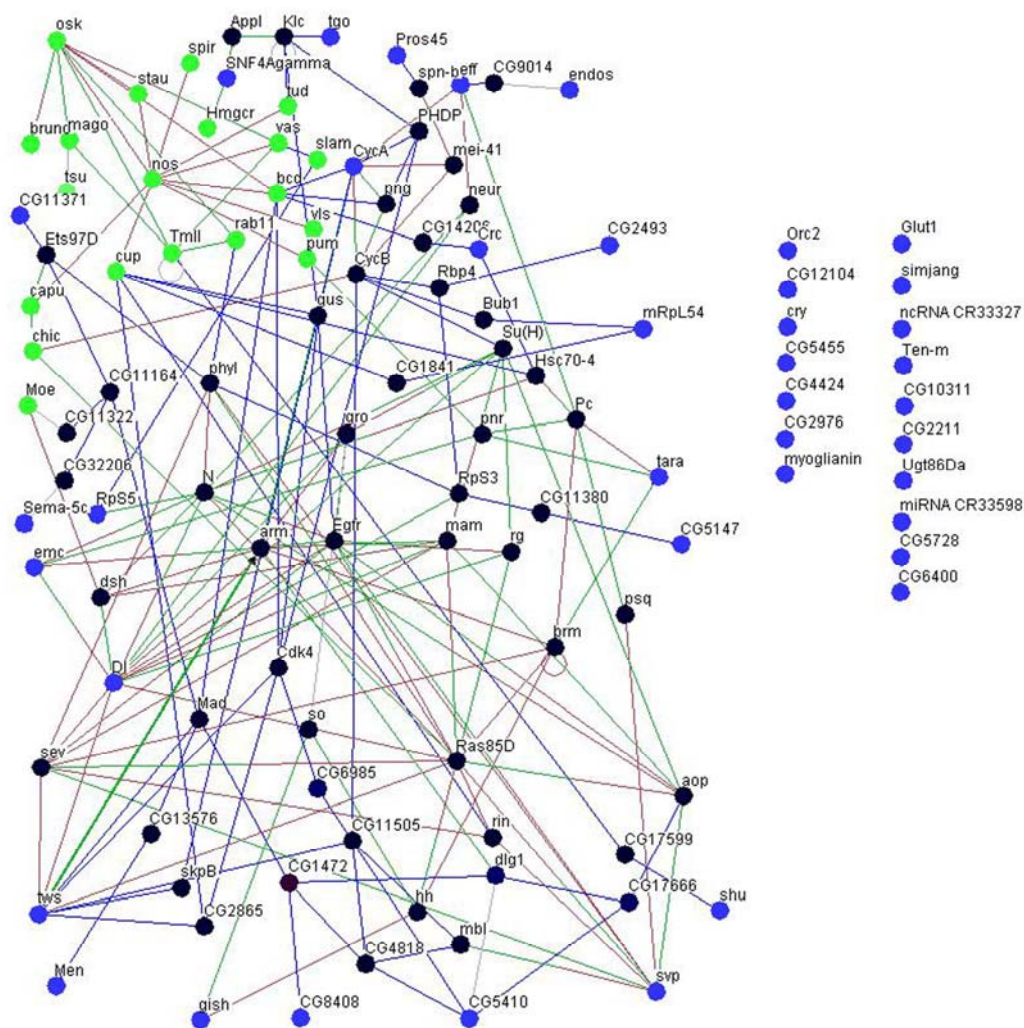
Kutatócsoportunkban már korábban is végeztek érzékenyített háttérű rendszerekkel mutánsizolálási kísérleteket (Jankovics és mtsai., 2001). Ebben a kísérletsorozatban két gén alléljeiből álló érzékenyített háttérrel alkalmaztak, és arányaiban megközelítőleg fele annyi enhanszert, 600 megvizsgált mutánsból 12 komplementációs csoportot azonosítottak. A későbbi vizsgálatok bemutatták, hogy a

12-ből csak egyetlen gén, a *Rab11* független mutánsai mutatnak önmagukban is ivarsejthiányos fenotípust, míg a maradék 11 esetében nem volt megfigyelhető ilyen hatás.

Elkezdjük a SOT kísérletből származó gének részletes analízisét. Jelenlegi ismereteink és megfigyeléseink alapján kijelenthetjük, hogy több gén bizonyíthatóan szerepet játszik az ivarsejtek kialakulásában. Számos erős enhanszer esetében a korábbi interakciós kísérletekben tapasztalható jelenség lépett fel. Azt tapasztaltuk ugyanis, hogy sem független alléljaik, sem homozigóta mutánsaik nem mutatnak ivarsejthiányos fenotípust. Nagyon valószínű, hogy ezeknek a géneknek a funkciói redundánsak. Nemcsak azt feltételezzük hogy az ivarsejtkialakulás mellett még más folyamatokban is részt vehetnek, de az is elképzelhető, hogy helyettesíthetők egy másik, közel azonos funkciójú gén termékével. A hagyományos genetikai analízis eszköztárával ezeknek az átfedő funkciójú géneknek az ivarsejtek kialakulásában játszott szerepe nem vizsgálható. Ashburnernek és munkatársainak a 2,9Mb hosszú ADH régió telítési mutagenézis-kísérletekből származó adatai szerint a saját fenotípussal nem rendelkező gének száma meglehetősen magas. Az ADH régióban található 218 annotált génből 148-nak egyáltalán nem találtak kimutatható, saját fenotípust (Ashburner és mtsai., 1999). Ezek az eredmények összeegyeztethetők a mi eredményeinkkel. Megfigyeltük továbbá, hogy genetikai interakciós kísérleteinkben az érzékenyítő elemek növelésével emelkedik a tesztrendszer érzékenysége, és egyre több enhanszert találunk. Ez a két gondolatmenet elvezetett minket a hálózatok biológiájához. Ma már tudjuk, hogy a biológiai hálózatok működését sok esetben sokkal erősebben lehet gátolni ha több, optimális esetben 3-5 hálózati csomópontot részlegesen gyengítünk, mintha egy fontos csomópontot teljesen kiiktatunk (Ágoston és mtsai., 2005). A biológiai hálózatok redundáns funkciójú elemekből álló komplex

rendszerek, melyekben csak nagyon ritkán találunk egyenes lefutású szabályozási útvonalakat. Így az egyes csomópontok (gének) kiiktatása önmagában nem feltétlenül eredményez értékelhető fenotípust, míg az érzékenyített háttérű genetikai rendszerek több útvonal együttes gyengítésével redundáns gének funkcióját is feltárhatják. Könnyen elképzelhető, hogy a SOT tesztrendszer esetében enhanszerként viselkedő gének termékei alternatív, redundáns útvonalak gyengítésével érik el az érzékenyítő elemek az ivarsejthiányos fenotípus erősödését. A teljes *Drosophila* genom leírása után jelenleg az egyes fehérjék élesztő kéthibrid interakcióinak feltérképezése folyik (Giot és mtsai., 2003). Az elérhető élesztő kéthibrid és genetikai interakciós információk és az Osprey nevű interakciós hálózatépítő program segítségével elkészítettük az általunk jelenleg ismert ivarsejt kialakulásban résztvevő fehérjék interakciós térképét, amelyre felvittük a két kísérletben újonnan azonosított géneket (17. ábra).

Az ábra jól szemlélteti, hogy a két általunk kialakított tesztrendszer által azonosított ivarsejt-kialakulásban szerepet játszó gének többsége egy-egy új interakciós partner beillesztésével (fekete színkód) hálózatba szervezhető. A hálózatba szervezés tehát több mint kísérleti eredmények könnyen átlátható ábrázolása, hiszen általa az ivarsejtekben működő génhierarchia új elemeit azonosíthatjuk.



17. ábra. Az általunk ismert, ivarsejtkialakulásban szerepet játszó gének interakciós hálózata. Zöld színnel jelöltük az irodalomból már ismert géneket, kékkel pedig a két kísérletsorozat folyamán azonosított géneket. A fekete pontok olyan géneket jelölnek, amelyek összeköttetéseket alkotnak a hálózaton belül a már ismert és az általunk azonosított gének között. Külön tüntettük fel azokat a géneket, amelyeket újonnan azonosítottunk, de nem találtunk olyan partnert, amely egy lépésen belül ehhez az egyszerűsített hálózathoz kapcsolná őket.

A két kísérletsorozat kapcsolata

A két kísérletsorozat alapvetően eltérő irányból közelíti meg az ivarsejtek kialakulásában szerepet játszó gének azonosítását, mégis az eredményekben

hasonlóságok fedezhetők fel. A microarray analízis során azonosított gének termékei az ivarplazmában lokalizálódnak. Ez alapján szerepet játszhatnak magának az ivarplazmának az összeszerelődésében és más, szintén a poszterior póluson lokalizálódó anyagok transzportjában. Ilyenek lehetnek az egyes nukleinsavkötő fehérjék. Ugyanezen fehérjék viszont felelősek lehetnek akár a majdani ivarsejtspecifikus génexpresszióért, vagy éppen a sokáig fennálló transzkripció gátlásért.

Meglehetősen sok fehérjeéréssel kapcsolatos gén terméke is lokalizálódik az ivarplazmában. Könnyen elképzelhető, hogy az embrionális ivarsejtekbe az anya által bejuttatott RNS-eknek meghatározott időpontban és helyen kell átíródnia, és ezeket a folyamatokat segítik a szintén anyai hatású gének által kódolt enzimek.

Az azonosított gének között egyes jelátviteli utak résztvevőit is megtaláltuk. Tudjuk, hogy nagyon intenzív jelátvitel figyelhető meg a petesejt és az azt körülvevő follikuláris sejtek között, ami elengedhetetlen a majdani embrió tengelyeinek kialakulásához.

A *CiklinA*-t mindkét kísérletünkben azonosítottuk. Ez a tény nemcsak kapocsként szolgál a két kísérletsorozat között, de arra is utal, hogy a *CiklinA*-nak az ivarsejtfejlődés későbbi szakaszában is fontos szerepe lehet. De nemcsak a *CiklinA* hoz létre kapcsolatot a két kísérletsorozat között. A SOT törzs segítségével azonosított gének között is találunk nukleinsavkötésre képes fehérjéket kódoló géneket. Feltételezésünk szerint ezek között is lehet olyan gén, melynek terméke az ivarsejtspecifikus génexpresszió szabályozását végezheti.

Mindezek alapján elmondhatjuk, hogy kidolgoztunk egy olyan többkomponensű tesztrendszert, 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. A genom szintű microarray kísérletet egy *in-situ* hibridizációs ellenőrzési folyamat követi majd, az újonnan azonosított gének mutánsait a SOT rendszerben interakciós vizsgálatoknak vethetjük alá, és végül az eredmények segítségével tovább bővítve a hálózatot az újonnan felfedezett elemek mutánsait szintén ellenőrizhetjük. Ez a kísérleti felépítés lett laboratóriumunk következő öt évének a kutatási terve.

Összefoglalás

A magasabbrendű élőlények között számos fajt találhatunk, melyekben a felnőtt egyed ivarsejtjeinek kialakulásáért felelős faktorok a petesejt egy jól meghatározott citoplasma-részletében helyezkednek el. A *Drosophila melanogaster* ezen fajok közé tartozik. Az oogenezis során a petesejt poszterior pólusán létrejön az úgynevezett ivarplazma, melyet az embriogenezis során az ott lefűződő sejtek magukba építenek. Az ivarplazmát magukba záró sejtek az ivarsejtsors irányában differenciálódnak tovább. Az ivarplazma létrejöttének mechanizmusát és összetevőit régóta nagy érdeklődéssel vizsgálják. Míg az ivarplazma összeszerelődését irányító sejtbiológiai folyamatok meglehetősen részletességgel ismertek, addig az ivarplazmát alkotó faktorok közül csak néhányat ismerünk. Munkánk célja az volt, hogy olyan kísérleti rendszereket dolgozzunk ki, melyek segítségével a *Drosophila melanogaster* ivarplazmájának összeszerelődésében szerepet játszó, illetve az ivarplazmában lokalizált faktorok a lehető legnagyobb számban azonosíthatók.

Az ivarplazmában RNS formában lokalizált faktorok azonosítására a DNS microarray technikát használtuk 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 génnek 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 alappenetranzia-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.

Ph.D. dolgozatomban ismertetem, hogy a microarray és a genetikai interakciós vizsgálati módszereinkből hogyan alakítottunk ki egy komplex kísérleti rendszert, melynek segítségével a *Drosophila* genom egészének vizsgálatát újabb ivarsejtfaktorok azonosítása céljából laboratóriumunk már elkezdte.

Summary

Embryonic germ cell development in *Drosophila melanogaster* depends on the germ plasm, the most posterior part of the ooplasm. There is experimental evidence that the germ plasm contains all the factors necessary for the formation of the embryonic germ cells. Though most of the germ plasm components have not been identified yet, it is known that at least in part the germ line factors are stored in the form of RNA. Besides factors that make the difference between the germ cell and the somatic cell fate, pre-localized germ plasm might also contain gene products that govern early development of the germ cells since their own genome becomes transcriptionally active only during the gastrulation stage when the germ cells move into the midgut invagination. In addition, determinants needed for the proper development of the posterior part of the soma are also localized in the germ plasm.

Assembly of the germ plasm is a stepwise process. First, during mid-oogenesis a founder molecule, the *oskar* (*osk*) mRNA, is tightly localized to the posterior pole where it gets translated. Then the posterior-restricted Osk protein recruits the other germ plasm components. The focus of germ cell formation depends exclusively on the site of the *osk* RNA localization since the anterior mislocalized *osk* mRNA results in anterior germ cells. A group of genes, collectively called posterior group genes, have been identified by their somatic mutant phenotype similar to that of *osk* loss of function mutations.

The aim of my work was to establish a method to identify novel germ plasm components on a genome scale level. To achieve our goals, we combined the cDNA microarray method with a genetic interaction type of assay.

In the cDNA microarray experiments, we compared deficient, normal and ectopic germ plasm conditions. We assumed that it was possible to affect the concentration of germ plasm specific RNAs by germ plasm mutations if the stability of such RNAs was dependent on the level and the existence of the germ plasm. In our experiments, we tried to measure differences in the stability of pole plasm specific RNAs. To do so, we performed transcript profiling of seven conditions in which the level of the germ plasm was genetically modified. Sixty RNA species out of 3200 were selected as exhibiting the expected microarray pattern. We investigated their distribution in wild type and ectopic germ plasm containing embryos using the *in situ* RNA hybridization technique. We found that seventeen out of sixty showed germ plasm specific localization.

For the functional analysis of the localized RNAs and in order to identify additional germ plasm specific RNAs, we established a genetic interaction type of assay. The assay is based on a *Drosophila* strain that carries three mutations of posterior group genes in heterozygous form resulting in a moderate germ cell deficient phenotype. Using this sensitized genetic background, we performed a screen on a third chromosomal P element insertion collection. 600 P element insertions were analyzed and 26 of them proved to be significant enhancers of the germ cell deficient phenotype. The sites of the P element insertions in these 26 lines were molecularly mapped and the affected genes were identified.

We arranged the newly identified genes into a network based on their earlier established protein-protein interactions. Besides the novel genes, this network contains all the posterior group genes which are linked to them with maximum one linker gene.

Our results indicate that we successfully developed elements of a reverse genetic experimental system which combines a genetic interaction assay with the cDNA microarray technique, and that it is applicable on a genome scale level.

A dolgozatban szereplő gének és rövidítésük

Gén:

oskar
cappuccino
spire
mago nashi
Rab-protein 11
Notch
Delta
ool18 RNA-binding protein
staufen
arrest
apontic
Bicaudal C
aubergine
vasa
Tropomyosin II
Moesin
pumilio
nanos
simjang
Glucose transporter 1
tango
Origin recognition complex subunit 2
cryptochrome
shutdown
Ribosomal Protein S5a
mitochondrial ribosomal protein L54
Mitochondrial Rho
Cyclin A
debra
SNF4/AMP-activated protein kinase gamma subunit
Polar granule component
myoglianin
par-1
Pros45
Germcell-less
CG6400
CG12104
CG5455
CG4424
CG2493
CG2976
CG8408

rövidítés:

osk
cap
spir
mago
Rab11
N
Dl
orb
stau
aret
apt
BicC
aub
vas
TmII
Moe
pum
nos
simj
Glut1
tgo
Orc2
cry
shu
RpS5a
mRpL54
Miro
CycA
dbr
SNF4A γ
Pgc
myo

Referenciák

1. Agoston,V., P.Csermely, és S.Pongor. 2005. Multiple weak hits confuse complex systems: a transcriptional regulatory network as an example. *Phys. Rev. E. Stat. Nonlin. Soft. Matter Phys.* 71:051909.
2. Arbeitman,M.N., A.A.Fleming, M.L.Siegal, B.H.Null, és B.S.Baker. 2004. A genomic analysis of *Drosophila* somatic sexual differentiation and its regulation. *Development* 131:2007-2021.
3. Arbeitman,M.N., E.E.Furlong, F.Imam, E.Johnson, B.H.Null, B.S.Baker, M.A.Krasnow, M.P.Scott, R.W.Davis, és K.P.White. 2002. Gene expression during the life cycle of *Drosophila melanogaster*. *Science* 297:2270-2275.
4. Ashburner,M., S.Misra, J.Root, S.E.Lewis, R.Blazek, T.Davis, C.Doyle, R.Galle, R.George, N.Harris, G.Hartzell, D.Harvey, L.Hong, K.Houston, R.Hoskins, G.Johnson, C.Martin, A.Moshrefi, M.Palazzolo, M.G.Reese, A.Spradling, G.Tsang, K.Wan, K.Whitelaw, S.Celniker, and . 1999. An exploration of the sequence of a 2.9-Mb region of the genome of *Drosophila melanogaster*: the Adh region. *Genetics* 153:179-219.
5. Bajpai,R., K.Makhijani, P.R.Rao, és L.S.Shashidhara. 2004. *Drosophila* Twins regulates Armadillo levels in response to Wg/Wnt signal. *Development* 131:1007-1016.
6. Bardsley,A., K.McDonald, és R.E.Boswell. 1993. Distribution of tudor protein in the *Drosophila* embryo suggests separation of functions based on site of localization. *Development* 119:207-219.

7. Barker,D.D., C.Wang, J.Moore, L.K.Dickinson, és R.Lehmann. 1992. Pumilio is essential for function but not for distribution of the *Drosophila* abdominal determinant Nanos. *Genes Dev.* 6:2312-2326.

8. Baumgartner,S., D.Martin, C.Hagios, és R.Chiquet-Ehrismann. 1994. Tenm, a *Drosophila* gene related to tenascin, is a new pair-rule gene. *EMBO J.* 13:3728-3740.

9. Bernstein,J.A., A.B.Khodursky, P.H.Lin, S.Lin-Chao, és S.N.Cohen. 2002. Global analysis of mRNA decay and abundance in *Escherichia coli* at single-gene resolution using two-color fluorescent DNA microarrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99:9697-9702.

10. Breitwieser,W., F.H.Markussen, H.Horstmann, és A.Ephrussi. 1996. Oskar protein interaction with Vasa represents an essential step in polar granule assembly. *Genes Dev.* 10:2179-2188.

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

12. Calgari,S., M.Boube, D.L.Cribbs, és H.M.Bourbon. 2002. The *Drosophila* gene *taranis* encodes a novel trithorax group member potentially linked to the cell cycle regulatory apparatus. *Genetics* 160:547-560.

13. Callaini,G., M.G.Riparbelli, és R.Dallai. 1995. Pole cell migration through the gut wall of the *Drosophila* embryo: analysis of cell interactions. *Dev. Biol.* 170:365-375.

14. Castrillon,D.H., P.Gonczy, S.Alexander, R.Rawson, C.G.Eberhart, S.Viswanathan, S.DiNardo, és S.A.Wasserman. 1993. Toward a molecular genetic analysis of spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*: characterization of male-sterile mutants generated by single P element mutagenesis. *Genetics* 135:489-505.
15. Cheng,L., N.Roemer, K.A.Smyth, J.Belote, J.R.Nambu, és L.M.Schwartz. 1998. Cloning and characterization of Pros45, the *Drosophila* SUG1 proteasome subunit homolog. *Mol. Gen. Genet.* 259:13-20.
16. Cox,R.T. és A.C.Spradling. 2003. A Balbiani body and the fusome mediate mitochondrial inheritance during *Drosophila* oogenesis. *Development* 130:1579-1590.
17. Dai,P., H.Akimaru, és S.Ishii. 2003. A hedgehog-responsive region in the *Drosophila* wing disc is defined by debra-mediated ubiquitination and lysosomal degradation of Ci. *Dev. Cell* 4:917-928.
18. Deak,P., M.M.Omar, R.D.Saunders, M.Pal, O.Komonyi, J.Szidonya, P.Maroy, Y.Zhang, M.Ashburner, P.Benos, C.Savakis, I.Siden-Kiamos, C.Louis, V.N.Bolshakov, F.C.Kafatos, E.Madueno, J.Modolell, és D.M.Glover. 1997. P-element insertion alleles of essential genes on the third chromosome of *Drosophila melanogaster*: correlation of physical and cytogenetic maps in chromosomal region 86E-87F. *Genetics* 147:1697-1722.
19. Deng,W. és H.Lin. 2001. Asymmetric germ cell division and oocyte determination during *Drosophila* oogenesis. *Int. Rev. Cytol.* 203:93-138.

20. Dobens,L.L. és L.A.Raftery. 2000. Integration of epithelial patterning and morphogenesis in *Drosophila* ovarian follicle cells. *Dev. Dyn.* 218:80-93.
21. Domingos,P.M., M.Mlodzik, C.S.Mendes, S.Brown, H.Steller, és B.Mollereau. 2004. Spalt transcription factors are required for R3/R4 specification and establishment of planar cell polarity in the *Drosophila* eye. *Development* 131:5695-5702.
22. Donovan,P.J. és M.P.De Miguel. 2003. Turning germ cells into stem cells. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 13:463-471.
23. Drummond-Barbosa,D. és A.C.Spradling. 2001. Stem cells and their progeny respond to nutritional changes during *Drosophila* oogenesis. *Dev. Biol.* 231:265-278.
24. Dudu,V., P.Pantazis, és M.Gonzalez-Gaitan. 2004. Membrane traffic during embryonic development: epithelial formation, cell fate decisions and differentiation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16:407-414.
25. Eisen,M.B., P.T.Spellman, P.O.Brown, és D.Botstein. 1998. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95:14863-14868.
26. Emmons,S., H.Phan, J.Calley, W.Chen, B.James, és L.Manseau. 1995. Cappuccino, a *Drosophila* maternal effect gene required for polarity of the egg and embryo, is related to the vertebrate limb deformity locus. *Genes Dev.* 9:2482-2494.

27. Ephrussi,A., L.K.Dickinson, és R.Lehmann. 1991. Oskar organizes the germ plasm and directs localization of the posterior determinant nanos. *Cell* 66:37-50.
28. Ephrussi,A. és R.Lehmann. 1992. Induction of germ cell formation by oskar. *Nature* 358:387-392.
29. Erdelyi,M., A.M.Michon, A.Guichet, J.B.Glotzer, és A.Ephrussi. 1995. Requirement for *Drosophila* cytoplasmic tropomyosin in oskar mRNA localization. *Nature* 377:524-527.
30. Escher,S.A. és A.Rasmuson-Lestander. 1999. The *Drosophila* glucose transporter gene: cDNA sequence, phylogenetic comparisons, analysis of functional sites and secondary structures. *Hereditas* 130:95-103.
31. Formstecher,E., S.Aresta, V.Collura, A.Hamburger, A.Meil, A.Trehin, C.Reverdy, V.Betin, S.Maire, C.Brun, B.Jacq, M.Arpin, Y.Bellaiche, S.Bellusci, P.Benaroch, M.Bornens, R.Chanet, P.Chavrier, O.Delattre, V.Doye, R.Fehon, G.Faye, T.Galli, J.A.Girault, B.Goud, J.de Gunzburg, L.Johannes, M.P.Junier, V.Mirouse, A.Mukherjee, D.Papadopoulo, F.Perez, A.Plessis, C.Rosse, S.Saule, D.Stoppa-Lyonnet, A.Vincent, M.White, P.Legrain, J.Wojcik, J.Camonis, és L.Daviet. 2005. Protein interaction mapping: a *Drosophila* case study. *Genome Res.* 15:376-384.
32. Giot,L., J.S.Bader, C.Brouwer, A.Chaudhuri, B.Kuang, Y.Li, Y.L.Hao, C.E.Ooi, B.Godwin, E.Vitols, G.Vijayadamodar, P.Pochart, H.Machineni, M.Welsh, Y.Kong, B.Zerhusen, R.Malcolm, Z.Varrone, A.Collis, M.Minto, S.Burgess, L.McDaniel, E.Stimpson, F.Spriggs, J.Williams, K.Neurath,

- N.Ioime, M.Agee, E.Voss, K.Furtak, R.Renzulli, N.Aanensen, S.Carrolla, E.Bickelhaupt, Y.Lazovatsky, A.DaSilva, J.Zhong, C.A.Stanyon, R.L.Finley, Jr., K.P.White, M.Braverman, T.Jarvie, S.Gold, M.Leach, J.Knight, R.A.Shimkets, M.P.McKenna, J.Chant, és J.M.Rothberg. 2003. A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*. *Science* 302:1727-1736.
33. Greaves,S., B.Sanson, P.White, és J.P.Vincent. 1999. A screen for identifying genes interacting with armadillo, the *Drosophila* homolog of beta-catenin. *Genetics* 153:1753-1766.
34. Grigull,J., S.Mnaimneh, J.Pootoolal, M.D.Robinson, és T.R.Hughes. 2004. Genome-wide analysis of mRNA stability using transcription inhibitors and microarrays reveals posttranscriptional control of ribosome biogenesis factors. *Mol. Cell Biol.* 24:5534-5547.
35. Grun,D., Y.L.Wang, D.Langenberger, K.C.Gunsalus, és N.Rajewsky. 2005. microRNA target predictions across seven *Drosophila* species and comparison to mammalian targets. *PLoS. Comput. Biol.* 1:e13.
36. Gunkel,N., T.Yano, F.H.Markussen, L.C.Olsen, és A.Ephrussi. 1998. Localization-dependent translation requires a functional interaction between the 5' and 3' ends of oskar mRNA. *Genes Dev.* 12:1652-1664.
37. Guo,X., G.T.Macleod, A.Wellington, F.Hu, S.Panchumarthi, M.Schoenfield, L.Marin, M.P.Charlton, H.L.Atwood, és K.E.Zinsmaier. 2005. The GTPase dMiro is required for axonal transport of mitochondria to *Drosophila* synapses. *Neuron* 47:379-393.

38. Hackler,L., Jr., G.Dorman, Z.Kele, L.Urge, F.Darvas, és L.G.Puskas. 2003.
Development of chemically modified glass surfaces for nucleic acid, protein
and small molecule microarrays. *Mol. Divers.* 7:25-36.
39. Heron,L., A.Virsolvay, K.Peyrollier, F.M.Gribble, A.Le Cam, F.M.Ashcroft, és
D.Bataille. 1998. Human alpha-endosulfine, a possible regulator of
sulfonylurea-sensitive KATP channel: molecular cloning, expression and
biological properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95:8387-8391.
40. Hummel,T., S.Attix, D.Gunning, és S.L.Zipursky. 2002. Temporal control of
glial cell migration in the *Drosophila* eye requires gilgamesh, hedgehog, and
eye specification genes. *Neuron* 33:193-203.
41. Illmensee,K., A.P.Mahowald, és M.R.Loomis. 1976. The ontogeny of germ
plasm during oogenesis in *Drosophila*. *Dev. Biol.* 49:40-65.
42. Jaglarz,M.K. és K.R.Howard. 1994. Primordial germ cell migration in
Drosophila melanogaster is controlled by somatic tissue. *Development*
120:83-89.
43. Jankovics,F., R.Sinka, és M.Erdelyi. 2001. An interaction type of genetic
screen reveals a role of the Rab11 gene in oskar mRNA localization in the
developing *Drosophila melanogaster* oocyte. *Genetics* 158:1177-1188.
44. Jankovics,F., R.Sinka, T.Lukacsovich, és M.Erdelyi. 2002. MOESIN
crosslinks actin and cell membrane in *Drosophila* oocytes and is required for
OSKAR anchoring. *Curr. Biol.* 12:2060-2065.

45. Jongens,T.A., B.Hay, L.Y.Jan, és Y.N.Jan. 1992. The germ cell-less gene product: a posteriorly localized component necessary for germ cell development in *Drosophila*. *Cell* 70:569-584.
46. Khare,N., N.Fascetti, S.DaRocha, R.Chiquet-Ehrismann, és S.Baumgartner. 2000. Expression patterns of two new members of the Semaphorin family in *Drosophila* suggest early functions during embryogenesis. *Mech. Dev.* 91:393-397.
47. Kiger,A.A., B.Baum, S.Jones, M.R.Jones, A.Coulson, C.Echeverri, és N.Perrimon. 2003. A functional genomic analysis of cell morphology using RNA interference. *J. Biol.* 2:27.
48. Kim,Y.O., S.J.Park, R.S.Balaban, M.Nirenberg, és Y.Kim. 2004. A functional genomic screen for cardiogenic genes using RNA interference in developing *Drosophila* embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101:159-164.
49. Kim-Ha,J., K.Kerr, és P.M.Macdonald. 1995. Translational regulation of oskar mRNA by Bruno, an ovarian RNA-binding protein, is essential. *Cell* 81:403-412.
50. King,R.C. 1970. The meiotic behavior of the *Drosophila* oocyte. *Int. Rev. Cytol.* 28:125-168.
51. Kobayashi,S., R.Amikura, és M.Okada. 1993. Presence of mitochondrial large ribosomal RNA outside mitochondria in germ plasm of *Drosophila melanogaster*. *Science* 260:1521-1524.

52. Li,J., F.Xia, és W.X.Li. 2003. Coactivation of STAT and Ras is required for germ cell proliferation and invasive migration in *Drosophila*. *Dev. Cell* 5:787-798.
53. Lie,Y.S. és P.M.Macdonald. 1999. Apontic binds the translational repressor Bruno and is implicated in regulation of oskar mRNA translation. *Development* 126:1129-1138.
54. Lilly,M.A., M.de Cuevas, és A.C.Spradling. 2000. Cyclin A associates with the fusome during germline cyst formation in the *Drosophila* ovary. *Dev. Biol.* 218:53-63.
55. Lo,P.C. és M.Frasch. 1999. Sequence and expression of myoglianin, a novel *Drosophila* gene of the TGF-beta superfamily. *Mech. Dev.* 86:171-175.
56. Lopez-Schier,H. és D.St Johnston. 2001. Delta signaling from the germ line controls the proliferation and differentiation of the somatic follicle cells during *Drosophila* oogenesis. *Genes Dev.* 15:1393-1405.
57. Loupart,M.L., S.A.Krause, és M.S.Heck. 2000. Aberrant replication timing induces defective chromosome condensation in *Drosophila* ORC2 mutants. *Curr. Biol.* 10:1547-1556.
58. Markussen,F.H., A.M.Michon, W.Breitwieser, és A.Ephrussi. 1995. Translational control of oskar generates short OSK, the isoform that induces pole plasma assembly. *Development* 121:3723-3732.

59. Micklem,D.R., J.Adams, S.Grunert, és D.St Johnston. 2000. Distinct roles of two conserved Staufen domains in oskar mRNA localization and translation. *EMBO J.* 19:1366-1377.
60. Micklem,D.R., R.Dasgupta, H.Elliott, F.Gergely, C.Davidson, A.Brand, A.Gonzalez-Reyes, és D.St Johnston. 1997. The mago nashi gene is required for the polarisation of the oocyte and the formation of perpendicular axes in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 7:468-478.
61. Moore,L.A., H.T.Broihier, M.Van Doren, L.B.Lunsford, és R.Lehmann. 1998. Identification of genes controlling germ cell migration and embryonic gonad formation in *Drosophila*. *Development* 125:667-678.
62. Munn,K. és R.Steward. 2000. The shut-down gene of *Drosophila melanogaster* encodes a novel FK506-binding protein essential for the formation of germline cysts during oogenesis. *Genetics* 156:245-256.
63. Nakamura,A., R.Amikura, M.Mukai, S.Kobayashi, és P.F.Lasko. 1996. Requirement for a noncoding RNA in *Drosophila* polar granules for germ cell establishment. *Science* 274:2075-2079.
64. Nutt,L.K., S.S.Margolis, M.Jensen, C.E.Herman, W.G.Dunphy, J.C.Rathmell, és S.Kornbluth. 2005. Metabolic regulation of oocyte cell death through the CaMKII-mediated phosphorylation of caspase-2. *Cell* 123:89-103.
65. Ohlmeyer,J.T. és T.Schupbach. 2003. Encore facilitates SCF-Ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis during *Drosophila* oogenesis. *Development* 130:6339-6349.

66. Palotas,A., L.G.Puskas, K.Kitajka, M.Palotas, J.Molnar, M.Pakaski, Z.Janka, B.Penke, és J.Kalman. 2004. Altered response to mirtazapine on gene expression profile of lymphocytes from Alzheimer's patients. *Eur. J. Pharmacol.* 497:247-254.
67. Pan,D.A. és D.G.Hardie. 2002. A homologue of AMP-activated protein kinase in *Drosophila melanogaster* is sensitive to AMP and is activated by ATP depletion. *Biochem. J.* 367:179-186.
68. Panda,S., J.B.Hogenesch, és S.A.Kay. 2002. Circadian rhythms from flies to human. *Nature* 417:329-335.
69. Pepling,M.E., M.de Cuevas, és A.C.Spradling. 1999. Germline cysts: a conserved phase of germ cell development? *Trends Cell Biol.* 9:257-262.
70. Pepling,M.E. és A.C.Spradling. 1998. Female mouse germ cells form synchronously dividing cysts. *Development* 125:3323-3328.
71. Prokopenko,S.N., Y.He, Y.Lu, és H.J.Bellen. 2000. Mutations affecting the development of the peripheral nervous system in *Drosophila*: a molecular screen for novel proteins. *Genetics* 156:1691-1715.
72. Puskas,L.G., K.Kitajka, C.Nyakas, G.Barcelo-Coblijn, és T.Farkas. 2003. Short-term administration of omega 3 fatty acids from fish oil results in increased transthyretin transcription in old rat hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100:1580-1585.

73. Raff,J.W., W.G.Whitfield, és D.M.Glover. 1990. Two distinct mechanisms localise cyclin B transcripts in syncytial *Drosophila* embryos. *Development* 110:1249-1261.
74. Rubin,G.M., L.Hong, P.Brokstein, M.Evans-Holm, E.Frise, M.Stapleton, és D.A.Harvey. 2000. A *Drosophila* complementary DNA resource. *Science* 287:2222-2224.
75. Ruohola,H., K.A.Bremer, D.Baker, J.R.Swedlow, L.Y.Jan, és Y.N.Jan. 1991. Role of neurogenic genes in establishment of follicle cell fate and oocyte polarity during oogenesis in *Drosophila*. *Cell* 66:433-449.
76. Saffman,E.E., S.Styhler, K.Rother, W.Li, S.Richard, és P.Lasko. 1998. Premature translation of oskar in oocytes lacking the RNA-binding protein bicaudal-C. *Mol. Cell Biol.* 18:4855-4862.
77. Santos,A.C. és R.Lehmann. 2004a. Germ cell specification and migration in *Drosophila* and beyond. *Curr. Biol.* 14:R578-R589.
78. Santos,A.C. és R.Lehmann. 2004b. Isoprenoids control germ cell migration downstream of HMGCoA reductase. *Dev. Cell* 6:283-293.
79. Selinger,D.W., R.M.Saxena, K.J.Cheung, G.M.Church, és C.Rosenow. 2003. Global RNA half-life analysis in *Escherichia coli* reveals positional patterns of transcript degradation. *Genome Res.* 13:216-223.
80. Shulman,J.M., R.Benton, és D.St Johnston. 2000. The *Drosophila* homolog of *C. elegans* PAR-1 organizes the oocyte cytoskeleton and directs oskar mRNA localization to the posterior pole. *Cell* 101:377-388.

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

82. Snee,M.J. és P.M.Macdonald. 2004. Live imaging of nuage and polar granules: evidence against a precursor-product relationship and a novel role for Oskar in stabilization of polar granule components. *J. Cell Sci.* 117:2109-2120.

83. Sonnenfeld,M., M.Ward, G.Nystrom, J.Mosher, S.Stahl, és S.Crews. 1997. The *Drosophila* tango gene encodes a bHLH-PAS protein that is orthologous to mammalian Arnt and controls CNS midline and tracheal development. *Development* 124:4571-4582.

84. St Johnston,D., D.Beuchle, és C.Nusslein-Volhard. 1991. Staufén, a gene required to localize maternal RNAs in the *Drosophila* egg. *Cell* 66:51-63.

85. St Johnston,D. és C.Nusslein-Volhard. 1992. The origin of pattern and polarity in the *Drosophila* embryo. *Cell* 68:201-219.

86. Starz-Gaiano,M., N.K.Cho, A.Forbes, és R.Lehmann. 2001. Spatially restricted activity of a *Drosophila* lipid phosphatase guides migrating germ cells. *Development* 128:983-991.

87. Tomancak,P., A.Beaton, R.Weiszmán, E.Kwan, S.Shu, S.E.Lewis, S.Richards, M.Ashburner, V.Hartenstein, S.E.Celniker, és G.M.Rubin. 2002. Systematic determination of patterns of gene expression during *Drosophila* embryogenesis. *Genome Biol.* 3:RESEARCH0088.

88. Tomancak,P., A.Guichet, P.Zavorszky, és A.Ephrussi. 1998. Oocyte polarity depends on regulation of gurken by Vasa. *Development* 125:1723-1732.
89. Tschape,J.A., C.Hammerschmied, M.Muhlig-Versen, K.Athenstaedt, G.Daum, és D.Kretzschmar. 2002. The neurodegeneration mutant lochrig interferes with cholesterol homeostasis and Appl processing. *EMBO J.* 21:6367-6376.
90. Van Doren,M., H.T.Broihier, L.A.Moore, és R.Lehmann. 1998. HMG-CoA reductase guides migrating primordial germ cells. *Nature* 396:466-469.
91. Vlahou,A., M.Gonzalez-Rimbau, és C.N.Flytzanis. 1996. Maternal mRNA encoding the orphan steroid receptor SpCOUP-TF is localized in sea urchin eggs. *Development* 122:521-526.
92. Wang,C. és R.Lehmann. 1991. Nanos is the localized posterior determinant in *Drosophila*. *Cell* 66:637-647.
93. Wang,Y., C.L.Liu, J.D.Storey, R.J.Tibshirani, D.Herschlag, és P.O.Brown. 2002. Precision and functional specificity in mRNA decay. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99:5860-5865.
94. Warn,R.M., H.O.Gutzeit, L.Smith, és A.Warn. 1985. F-actin rings are associated with the ring canals of the *Drosophila* egg chamber. *Exp. Cell Res.* 157:355-363.
95. Warrior,R. 1994. Primordial germ cell migration and the assembly of the *Drosophila* embryonic gonad. *Dev. Biol.* 166:180-194.

96. Webster,P.J., L.Liang, C.A.Berg, P.Lasko, és P.M.Macdonald. 1997.
Translational repressor bruno plays multiple roles in development and is
widely conserved. *Genes Dev.* 11:2510-2521.
97. Wilson,J.E., J.E.Connell, és P.M.Macdonald. 1996. aubergine enhances oskar
translation in the *Drosophila* ovary. *Development* 122:1631-1639.
98. Younger-Shepherd,S., H.Vaessin, E.Bier, L.Y.Jan, és Y.N.Jan. 1992. deadpan,
an essential pan-neural gene encoding an HLH protein, acts as a denominator
in *Drosophila* sex determination. *Cell* 70:911-922.
99. Zalokar,M. 1973. Transplantation of nuclei into the polar plasm of *Drosophila*
eggs. *Dev. Biol.* 32:189-193.
100. Zhang,N., J.Zhang, K.J.Purcell, Y.Cheng, és K.Howard. 1997. The
Drosophila protein Wunen repels migrating germ cells. *Nature* 385:64-67.
101. Zuber,C., J.Y.Fan, B.Guhl, A.Parodi, J.H.Fessler, C.Parker, és J.Roth. 2001.
Immunolocalization of UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase
indicates involvement of pre-Golgi intermediates in protein quality control.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 98:10710-10715.

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