

Ph.D. értekezés tézisei

**A *Drosophila* follikuláris sejtek származási
viszonyainak és funkciójának genetikai elemzése
nősténysteril mutációkkal**



DR. HOFFMANN GYULA

Készült az MTA Szegedi Biológiai Központ Genetikai
Intézetének fejlődésgenetikai csoportjában

Szeged, 1998.

BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

„Omne vivum ex ovo.” (Minden élő a petéből/tojásból lesz.)

William Harvey megállapítása, legalábbis a többsejtűek világában, általános érvényű. A petesejtek, peték vagy tojások az ovogenezis termékei, az új élet forrásai.

A muslica (*Drosophila melanogaster*) petéje két sejttípus összehangolt működésének az eredménye: az ivarsejtvonal eredetű sejtekének és a testisejt eredetű follikuláris sejtekének. Az ivarsejtvonal eredetű pete- és dajkasejtek főleg a peték **citoplazmájának** szintéziséért felelősek. Az utóbbi időben a follikuláris sejtekkel kapcsolatos ismeretek robbanásszerűen megszorodtak és felértékelődtek. Ma már bizton állíthatjuk, hogy a follikuláris sejtek nem csak a pete védőburkait alakítják ki, mint azt korábban hitték, hanem a petekezdemény egészének, a benne fejlődő petesejtnak majd — megtermékenyítés után — az embriók aszimmetriájának kialakításában is részt vesznek. Számos follikuláris sejtekben működő gént ismerünk melyeknek mutációja a pete és a benne fejlődő embrió fejlődését befolyásolja.

Az MTA SZBK Genetikai Intézetében Szabad János laboratóriumában szisztematikus domináns nősténysteril mutáns izolálási kísérletben négy follikuláris sejt függő mutációt azonosítottunk. Az *Fs(3)Apc*, *Fs(3)Avar*, *Fs(2)Ugra* és *Fs(2)Etre* heterozigóta a follikuláris sejtek diszfunkciója miatt sterilek.

Dolgozatom első része az *Fs(3)Apc* mutáció jellemzését tartalmazza, továbbá az *Apc*⁺ (+/+) mozaik foltok vizsgálatán alapulva a follikuláris sejtek fejlődését írja le. Dolgozatom második része az *Fs(2)Ugra* mutáció fejlődésgenetikai analízisét tartalmazza. Dolgozatomban leírom, hogy a két mutáció hogyan alkalmazható mint domináns szelektív marker a follikuláris sejtek genetikai analízisében. A dolgozat utolsó részében egy ivarsejtfüggő génnek a *tulipano* vagy *Nup154* génnek a follikuláris sejtek fejlődésére gyakorolt hatását mutatom be.

Dolgozatom célja a petekezdemény fejlődésének jobb megértése a follikuláris sejt-függő domináns nősténysteril mutációk genetikai vizsgálatával: a follikuláris sejtek eredetének, életének jobb megismerése, sejtvonalaik kapcsolatainak felderítése, és olyan metodika kifejlesztése volt, amely lehetővé teszi a génexpresszió tanulmányozását a follikuláris sejtekben.

Az *Apc* mutáció fejlődésgenetikai elemzése

Az *Apc* mutáció domináns nősténysteril mutáció, olyan gén funkcióját érinti, amely a nőstényekben, az ovogenezisben játszik szerepet. Az ovogenezis egy speciális lépését, a centripetális sejtek vándorlását gátolja.

A petefészek kimérák vizsgálata megmutatta, hogy az *Apc* mutáció a petefészek funkcióját befolyásolja és nincs hatással az egyéb testi szervekre, szövetekre: az *Apc* mutáció fókusza a petefészkekben van. A csíravonal-kimérák analízise megmutatta, hogy a fókusz a petefészek testi sejtjeiben van.

A rekombináns ivarsejvonal sejtekből származó utódok elemzésével az *Apc* mutációt a harmadik kromoszómán, a 39,5 cM-nal jellemzett helyre lokalizáltuk.

Mivel a mutáns fenotípus azonos volt az *Apc*/+ és az *Apc*/+/+ nőtények esetében, arra következtettünk, hogy az *Apc* mutáció ú.n. neomorf típusú: a mutáns fenotípus független a vad allélok számától.

Apc mutáció csak az előző follikuláris sejtek funkcióját befolyásolja. Röntgensugárzással mitotikus rekombinációt indukáltunk *Apc*/+ sejtekben. A mitotikus rekombináció folytán keletkező *Apc*⁺ follikuláris sejteket (is) tartalmazó petekezdeményekből teljesen vagy részben ép peték származhatnak, melyeket „kivételes” petéknek neveztünk.

Az adultként besugárzott nőtények kb. harmada rakott „kivételes” peté(ke)t. Valószínű, hogy az egy petéből álló klónok döntő többsége a már kialakult petekezdemények follikuláris köpenyében indukálódott *Apc*⁺ klónokat reprezentálta.

A két függeléket képező sejtek egységes sejtvonalat alkotnak a follikuláris sejtköpeny kialakulásakor; közösen fejlődtek és egyenértékűek.

A felnőttként besugárzott nőtények petéi között voltak olyanok is, amelyeknek a függelékei rövidebbek és vékonyabbak voltak, mint a vad típusúaké („heterogén” peték). A „heterogén” peték pusztá létezése döntő érv amellet, hogy a függelékek szintézisében több sejt is részt vesz.

A „kivételes” peték egy részéből kikelő lárvák azt bizonyítják, hogy az *Apc* sejtek utódaiból normálisan fejlett operkulum és gallér is keletkezhet.

Az összes elülső függelék képződéséért felelős follikuláris sejtek egyetlen sejtvonalba tartoznak, legalábbis a petekezdemények kialakulásakor.

A lárvaállapotban indukált *Apc*⁺ klónok elvárásainkat megerősítették, jelezve azt is, hogy a "kivételes" peték valóban *Apc* klónkat reprezentálnak.

Az *Ugra* mutáció

Az *Ugra* domináns nősténysteril mutáció. Az *Ugra*/+ nőstények agametikusak, petéik nincsenek.

Petefészkek és csíravonal kimérák segítségével történt annak a kimutatása, hogy az *Ugra* mutáció fenotípusa az ovárium szómájától függ. Az *Ugra*⁺ klónok analízise kimutatta, hogy a mutáció megakadályozza, hogy a follikuláris sejtek funkciójukat kifejtsék. Az ovogenezis 10. stádiumát követően a dajkasejtek sejtmagjai piknotikussá válnak, kromatinjuk jól kivehetően kondenzálódik, és a petekezdemények degenerálódnak.

A besugárzott *Ugra*/+ nőstényeknek alig több mint 1 %-a rakott petéket. ki. Nagy részüknek háti függelékei nem voltak hasonlóak. A felnőtt egyedekben indukált *Ugra*⁺ klónok további sajátága, hogy a nőstények a klónokat hordozó petéket késéssel, 18-24 nappal a besugárzás után rakják le. Az *Ugra* mutáció általános follikuláris sejt funkciókat érint, az *Apc* mutációtól eltérően csak nagy *Ugra*⁺ klónok esetén jelennek meg vadtípusú, vagy csaknem vadtípusú peték.

Apc mutáció alkalmas eszköznek bizonyult, annak vizsgálatára: érintik-e bizonyos recesszív nőstény-steril (*fs*) vagy zigotikus letális (*l*) mutációk az elülső follikuláris sejtek funkcióját; az *Ugra* mutáció pedig,

hogy a kérdéses mutációk érintik-e általában a follikuláris sejtek funkcióját. Mindkét mutációt eredményesen alkalmazták a domináns nőtényszeril technika keretében.

A *Nup154/tulipano* gén izolálása

Munkánk során alapítottunk egy olyan, 2900 törzsből álló törzsgyűjteményt, amelyben voltak olyan törzsek is, amelyeknél a *P*-elem a szomszédos régióba ugrott be. A későbbiekben a törzsgyűjteményt szűrtük olyan vonalakra, amelyekben az inszerció áthelyeződött az általunk vizsgált génekbe. Több steril-, és szemisteril vonalat izoláltunk. Komplementációs tesztek arra utaltak, hogy kettejük ugyanazt a gént azonosítja, és allélikus az *l(2)01501* letális mutációval a 32D1 régióban. A mutációt *tulipanonak* (*tlp*), a két allélt pedig *tlp*¹- és *tlp*²-nek neveztük el. Később a gén neve *Nup154* lett. A két allél komplementálja a 32 régióban lévő egyéb nőtényszeril mutációkat. A *tlp*¹ és *tlp*² allélok homozigóta állapotban nemcsak nőtény szemisterilitást, hanem teljes hímsterilitást is okoznak.

A gén klónozása után kiderült, hogy fehérjeterméke hasonlít a már ismert nukleoporinokhoz. Az izolált hipomorf allélok jellemzése lehetővé tette a gén funkciójának vizsgálatát a hím-, és női gametogenezis különböző lépéseiben.

Az ovogenezis idején a gén szükséges a petekezdemény zavartalan fejlődéséhez és az oocita növekedéséhez. A homozigóta nőtények petéi nagyobbrészt rendellenes háti függelékeket hordoztak, másoknak nem voltak függelékei. A *tlp*¹ homozigóta nőtények ováriumaiiban a petekezdemények

fejlődésében csak a 9-10. stádium környékén tapasztalható változás: az oocita mérete elmarad a vadtypusnál tapasztalttól, és a hátrafelé vándorló folliculáris sejtek kapcsolatban maradnak a legposzteriorálisabb dajkasejtekkel, és nem érik el az oocitát, nem vándorolhatnak be az oocita és a dajkasejtek közé, mint normális esetben. Minden bizonnyal a centripetális sejtek hiányának a következménye a furcsa, tulipán (kehely) alakú korion. Más esetekben túlzott számú folliculáris sejt vándorol az oocita anteriorális pólusa körül, és megváltozott morfológiájú háti függelékek keletkeztek.

A dolgozat legfontosabb eredményei

1. Több testisejt-függő domináns nősténysteril mutációt izoláltunk, amelyek közül kettőnek a fejlődésgenetikai analizisét elvégeztük.
2. Petefészek, és csíravonal kimérák, valamint klónanalízis segítségével bebizonyítottuk, hogy az *Apc* és *Ugra* mutációk fókusza a follikuláris sejtekben van. Az *Apc* mutáció fókuszát tovább szűkítettük az anteriorális follikuláris sejtekre.
3. Izoláltuk az első olyan (domináns) mutációt, az *Apc* mutációt, amelynek szerepe van a centripetális follikuláris sejtek vándorlásában.
4. Röntgenindukálta *Apc*⁺ mutáció klónok segítségével következtetéseket vontunk le a follikuláris sejtek sztemsejtjeinek létre vonatkozóan.
5. Röntgenindukálta *Apc*⁺ mutáció klónok segítségével következtetéseket vontunk le a follikuláris sejtek sejtvonalsajátságaira és a pete függeteléseinek fejlődésére vonatkozóan
6. Újfajta térképezési módszert dolgoztunk ki follikuláris sejt függő mutációkra.
7. Új marker mutációk alkalmazásával utat nyitottunk a bizonyos gének expressziójának tanulmányozásához a follikuláris sejtekben.
8. Lokális *P*-elem ugrások indukálásával új nukleoporin gént izoláltunk *Drosophilában*, amelynek szerepe van a centripetális follikuláris sejtek vándorlásában is.

KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

Az értekezés alapjául a 2., 3. és 6. közlemények szolgáltak.

1. BENYHE, S., **G. HOFFMANN**, E. VARGA, S. HOSTAFI, G. TÓTH, A. BORSODI AND M. WOLLEMAN, 1989 Effects of oxymorphasone in frogs: long lasting antinociception in vivo, and apparently irreversible binding in vitro. Life Sciences **44**: 1847-1857.
2. SZABAD, J. AND **G. HOFFMANN**, 1989 Analysis of follicle cell functions in *Drosophila*: The *Fs(3)Apc* mutation and development of chorionic appendages. Developmental Biology **131**: 1-10.
3. SZABAD, J., M. ERDÉLYI, **G. HOFFMANN**, J. SZIDONYA, AND T. R. F. WRIGHT, 1989 Isolation and characterisation of dominant female sterile mutations of *Drosophila melanogaster*. Mutations on the second chromosome. Genetics **122**: 823-835.
4. DORN, R., J. SZIDONYA, G. KORGE, M. SEHNERT, H. TAUBERT, E. ARCHOUKIEH, B. TSCHIERSCHE, H. MORAVIETZ, G. WUSTMANN, **G. HOFFMANN** AND G. REUTER, 1993 *P*-transposon induced dominant enhancer mutations of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. Genetics **133**: 279-290.
5. REUTER, G., **G. HOFFMANN**, R. DORN, J. GAUSZ AND H. SAUMWEBER, 1993 Construction and characterisation of a *TM3* balancer, carrying *P/(ry+)D2-3/* as a stable transposase source. DIS **72**: 78-79.

6. GIGLOTTI, S, G. CALLAINI, S. ANDONE, M. G. RIPARBELLI, R. PERNAS-ALONSO, **G. HOFFMANN**, F. GRAZIANI AND C. MALVA, 1998 *Nup154*, a new *Drosophila* gene essential for male and female gametogenesis is related to the *Nup155* vertebrate nucleoporin gene. J. Cell. Biol., **142**:1195-1207
7. **HOFFMANN, G.**, G. GAJDOS, M. CZAKÓ, M. KERÉNYI, V. TÓTH, L. EMÖDY AND T. TOMCSÁNYI, 1998 Diversity among clinical isoletes of *Proteus penneri* detected by random amplified polymorphic DNA analysis. Közlésre elfogadva a Zentralblatt für Bakteriologie-nál (kefelenyomat formában)
8. **HOFFMANN, G.**, G. GAJDOS, M. CZAKÓ, M. KERÉNYI, V. TÓTH, L. EMÖDY AND T. TOMCSÁNYI, 1998 Genetic diversity of *Proteus penneri*. Acta Biologica Hungarica, közlésre elfogadva

Társszerzői lemondó nyilatkozat

Alulírott nyilatkozom, hogy a Jelölt téziseit ismerem, a tézisekben foglalt tudományos eredményeket tudományos fokozat megszerzéséhez nem használtam fel, s tudomásul veszem, hogy azokat ilyen célból a jövőben sem használhatom fel.

Szeged, 1998. november 12.

Szabó János

Endreffy László

Bida Z.