

**Az oskar mRNS struktúrális szerepe a korai
oogenezisben**

Ph.D. értekezés tézisei

**Készítette: Závorszky Péter
Témavezető: Dr. Erdélyi Miklós
MTA Szegedi Biológiai Központ
Genetikai Intézet
Szeged, 2001.**



Köszönetnyilvánítás

Köszönöm Dr. Erdélyi Miklósnak, témavezetőmnek, azt a kiapadhatatlan emberi és szakmai támogatást, segítséget és ösztönzést, ami a munka minden szakaszán elkísért. Miklós azon kevesek egyike, aki mindvégig hitt bennem. Hálásan köszönöm ezt a bizalmat.

Köszönöm Dr. Anne Ephrussinak a lehetőséget, hogy érdemi munkát végezhettem kivételes légkörű és felszereltségű laboratóriumában. Anne mutatta meg, hogy másképp is lehet és ő volt a másik, aki mindvégig hitt bennem. Hálásan köszönöm.

Köszönöm Tóth Krisztinának hogy mellettem volt és szeretettel támogatott.

Köszönöm Dr. Antoine Guichet-nek, hogy eredményesen tudtunk együtt dolgozni a P elem mutagenézis során.

Köszönettel tartozom Dr. Andreas Jenny-nek a molekuláris genetikai munkákban nyújtott segítségéért.

Köszönöm az MTA SzBK Fejlődésgenetikai Csoport tagjainak és az EMBL Developmental Biology Program tagjainak, hogy olyan szakmai légkörben dolgozhattam, mely egyszerre volt vidám és ösztönző.

Köszönöm Anna Cyrkalff-nak az óriáskromoszóma *in situ* hibridizációban és Anne-Mari Voe-nek a transzgenikus legyek előállításában nyújtott munkáját.

Köszönöm az MTA SZBK Fotólabor részéről Bodacz-Nagy Balázs munkáját.

Bevezető:

A dolgozatomban bemutatom, hogy a mRNS-nek egy új funkciójára bukkantunk. Kísérleti rendszerünk az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) oogenezise, ahol a lokalizált mRNS-ek speciális tulajdonságai segítették az új mRNS funkció megtalálását.

Az *osk* mRNS már a korai oogenezis során átíródik a dajkasejtekben, ahonnan a gyűrűcsatornákon át szállítódva a petesejtben koncentrálódik, kitöltve annak térfogatát. A 7. stádiumban a petesejtben megkezdődik az *osk* RNS poszterior lokalizációja. Az oskar fehérje átírása az első 7 stádiumban gátolt. A 8. stádiumban a poszterior végen lokalizált *osk* mRNS-ről megkezdődik az oskar fehérje átírása, mely az RNS-hez hasonlóan poszterior lokalizált. Tehát az *osk* mRNS eddig ismert funkciója, hogy a poszterior végen létrehozza a lokalizált oskar fehérjét. A petesejt poszterior végén lokalizált oskar fehérje irányításával kialakul a poláris plazma, ami azokat a faktorokat, determinánsokat tartalmazza, melyek később az embrió ivarsejtjeit és abdomenét alakítják. Az *osk* RNS lokalizálódásának elmaradása abdomen hiányos és ivarsejt hiányos embriókat eredményez. Azaz az *oskar* esszenciális a poláris plazma létrehozásában.

Eredmények:

Nagyléptékű P elem indukálta mutagenézis kísérletben több ezer mutáns vonalat állítottunk elő. A mutánsok szűrésével egy letális (4000 vonal) és egy steril gyűteményt (500 vonal), valamint egy unokátlan csoportot (17 vonal) állítottunk elő. Mivel a sterilitás kapcsolatba hozható a poláris plazma kialakulásának hiányával, ami az esetek nagy részében egyben az abdomen hiányát is jelenti, a steril gyűtemény petét rakó tagjainál szisztematikus vizsgálattal, abdomen hiányos embriókat kerestünk. Reméltük, hogy számos új, eddig még nem ismert mutánst sikerül találjunk. Az 500 vonalból összesen 8 vonal mutatta a tipikus abdomen hiányos fenotípust, kettő pedig a szokatlan pair-rule fenotípust. A későbbi vizsgálatok megmutatták, hogy a pair-rule fenotípusú mutánsok a *ftz-F1* gén két új mutáns allélja. A 8 abdomen hiányos steril vonalat már ismert, abdomen hiányos mutánsokkal kereszteztük össze, hogy kiderítsük vannak-e közöttük új mutánsok. A komplementációs keresztezésekből kiderült, hogy a 8 abdomen hiányos vonalból 5 nem komplementálta az *osk*⁵⁴ allélt, azaz allélikusak az *oskar*ral, 2 nem komplementálta a *vasa* allélt, és egy a *staufer* allélt. Mivel laboratóriumunk egyik fő profilja az *oskar* gén tanulmányozása, a továbbiakban az új *oskar* mutánsokat vizsgáltuk.

Célul tűztük ki, hogy:

- az új *oskar* mutánsok fenotípusos és genetikai jellemzését elvégezzük

- az új mutánsokban meghatározzuk a mutáció természetét
- funkcionális tesztekben vizsgáljuk az új mutációk szerepét

A új homozigóta *osk* mutáns nőstények nem raktak petét. Az izolált 5 mutánsról kiderítettük, hogy azonosak. Kiválasztottuk az *osk*¹⁸⁷-et és a részletes vizsgálatokat ezzel a mutánssal végeztük el. Kooperációs partnerünk laboratóriumában, egy tőlünk független mutagenézis kísérlet során új *oskar* mutánst (*osk*^{A87}) azonosítottak, melynek ugyancsak pete hiányos fenotípusa volt. Megállapodás szerint, laboratóriumunkban végeztük az új mutánsok jellemzését. Az új *osk* mutánsok nem komplementálták a már ismert fehérje null *osk* allélokot és a transzheterozigóta nőstények abdomen és ivarsejt hiányos utódokat hoztak létre. Az új mutánsok egymással, illetve *oskar* delécióval komplementálva petehiányos fenotípust mutattak. A homozigóta és az *oskar* delécióval transzheterozigóta nőstények petefészkeinek kiboncolásakor minden esetben alulfejlett, kis méretű petefészkeket találtunk. Feltűnő volt, hogy egyetlen esetben sem láttunk idősebb és ennek megfelelő méretű petekamrákat. A petefészkek leginkább egy hasonló méretű gyöngyszemből álló gyöngyfüzérre hasonlítanak. Arra a kérdésre, hogy a petekamrák 14 stádiumra osztott fejlődési programjának, melyik szakaszát érik el fejlődésben az újonnan izolált mutánsok petekamrái, a következő egyszerű kísérlet adott választ. Normális esetben a petekamra fejlődésének 8-as stádiumában kezd a szikanyag (yolk) felhalmozódni a petesejtben.

A szikanyagnak erős autofluoreszcenciája van, amit fluoreszcens mikroszkóppal könnyű detektálni. A szikanyaggal kitöltött petesejt Nomarski optikával is jól megkülönböztethető a petesejtet körülvevő sejtektől. Az újonnan izolált *osk* mutánsok egyikénél sem sikerült megfigyelni a szikanyag jelenlétét. A mutánsok petekamrái a fejlődésben nem jutnak el a szikanyag felhalmozásáig, azaz a 8-as stádiumig.

A *BicD* fehérje kimutatásával, mint petesejt markerrel, igazoltuk, hogy az új mutánsokban kialakul a petesejt. A korai oogenezis első lépései normálisak. A rendellenesség első jele a 2-es, 3-as stádiumos petekamráknál figyelhető meg. A gömbölyű alakú karioszóma a kromoszómákat szorosan összecsomagolva tartalmazza a petesejt sejtmagján belül. Az új *osk* mutánsok karioszómai fragmentáltak, felbomlott szerkezetet mutatnak. A petekamrák morfológiáját F aktin festéssel is megvizsgáltuk. F aktin festéssel a petekamra fejlődésének első négy stádiumában a vad típusú *Ore-R* és a mutánsok petekamrái között nem találtunk különbséget. A 6. és 7. stádiumokban szabálytalan alakú follikuláris sejtek jelentek meg a petekamrákban. Végül a 7-es stádiumos petekamrákban nagy vakuólumok jelentek meg, majd a petekamrák szétestek és a maradványok felszívódtak, üresen hagyva a petecsövet.

Molekuláris genetikai vizsgálatokkal meghatároztuk az új mutánsok molekuláris természetét. Az *osk*¹⁸⁷-es mutánsban az *osk* gén 5' szabályzó régiójába egy *I faktorként (IF)* ismert mozgékony genetikai

elem inszertálódott. Az osk^{A87} mutánsban az osk gén első exonjába egy ZAM retrotranszpozon inszertálódott.

A mutagén elemek helyzetéből az osk transzkript temelésének csökkenését vártuk. A P elem mutagenézisből származó osk mutánsok petekamráin $oskar$ RNS *in situ* hibridizációt végeztünk, ahol DIG jelölt antiszensz $oskar$ RNS próbát használtunk az osk RNS kimutatására. A mutánsokban a vad típushoz képest gyengébb osk RNS festődést kaptunk. Az RNS mennyiségét Northern blottal ellenőriztük. Az osk^{187} homozigóta mutánsban az osk transzkript mennyisége jelentősen lecsökkent, míg a hemizigóta osk^{187} -ben nem tudtunk osk RNS-t kimutatni. Az osk^{A87} mutáns petekamrákban a DIG jelölt osk RNS *in situ* hibridizációval nem tudtunk osk RNS-t kimutatni. Ezért egy érzékenyebb detektálási eljárást alkalmaztunk, ahol fluoreszcens festékkel jelölt antiszensz osk RNS-t használtunk próbaként. A fluoreszcens festékkel jelölt próbával nem sikerült osk RNS-t kimutatni az osk^{A87} mutáns petekamráiban. Az *in situ* hibridizálási kísérlet és a Northern blot alapján az osk^{187} egy osk RNS hipomorf mutáns, míg az osk^{A87} egy osk RNS null mutáns.

Kíváncsiak voltunk, hogy az elégtelen osk mRNS felelős-e a korai oogenezis defektusért. Ezért $oskar$ transzgénnel menekítési kísérletet végeztünk. A $P(osk^+)$ transzgén az $oskar$ gén teljes genomikus szakaszát hordozza és az ismert erős osk mutánsok abdomen és ivarsejt hiányos fenotípusát teljes mértékben menekíti. A $P(M1L)$ transzgénben az M1 transzlációs iniciációs helyet elrontottuk, így csak a rövid fehérje

izoforma termelődik, amiről tudjuk, hogy menekíti az oskar fehérje null mutánsok abdomen és ivarsejt hiányos fenotípusát. A *P(M139L)* transzgenben az M2 translációs iniciációs helyet rontottuk el, így ez csak a hosszú fehérje izoformát termeli, ami nem menekíti a fehérje null mutánsokat. Mindhárom transzgen menekítette az újonnan izolált *osk* mutánsok petét nem rakó fenotípusát, bizonyítva, hogy az új mutánsok valóban *oskar* allélok.

A fehérje null *osk* mutánsok (*osk*⁵⁴, *osk*⁸⁴, *osk*³⁴⁶) mindegyike tartalmaz egy nonszensz mutációt, ami megakadályozza a normális *oskar* fehérje átíródását. A három fehérje null *osk* allél menekítette az új mutánsok petét nem rakó fenotípusát. Az a megfigyelés, hogy a csökkent *osk* RNS az oogenezis leállításához vezet és hogy az *osk* fehérje null mutánsok menekítik az új mutánsok petét nem rakó fenotípusát, felveti annak lehetőségét, hogy a korai *oskar* funkcióért az *osk* mRNS és nem az *oskar* fehérje a felelős. Az *oskar* fehérje null mutánsoknál nem tudjuk teljesen kizárni a csonkolt, nem stabil és így kimutathatatlan *oskar* fehérje létét. Ezért tesztekben vizsgáltuk meg, hogy az *oskar* fehérjére szükség van-e a korai oogenezisben. Különböző transzgeneket készítettünk, ahol az egyik esetben az *osk* RNS-ről nem íródhat át *oskar* fehérje, míg a másik esetben ugyan az RNS-ről átíródott *oskar* fehérje, de ez az *oskar* RNS szempontjából mutáns RNS-ről történt. Az *in vitro* előállított *oskar* fehérje null transzgenek menekítették az új *osk* mutánsok petét nem rakó fenotípusát. Az *oskar* fehérjét termelő, mégis mutáns *osk* RNS nem menekítette az új mutánsokat. Tehát az *oskar*

fehérje önmaga nem képes menekíteni az új mutánsok korai oogenezis fenotípusát. Ugyanakkor az *osk* RNS esszenciális az *osk* korai oogenezis funkciójához

Tisztázandó, hogy van-e az *osk* RNS-nek egy kitüntetett szerkezeti eleme, amely felelős a menekítésért, a következő menekítési kísérleteket végeztük el. Három transzgént használtunk, melyek az *oskar* gén különböző hosszúságú szakaszait tartalmazták. A *GFP-cTmG1* transzgén az *osk* génnek csak 30 bázispár hosszú szakaszát tartalmazza (15 bp 5' NTR és 15 bp kódoló szakasz). Az *M1M2lacZMed1* transzgén az 5' NTR-t és az *osk* gén M1 és M2 közötti szakaszát hordozta, amit a lacZ gén kódoló szakasza követett. Az *M1M2lacZwt* transzgén az *osk* 5' NTR-t, az M1 és M2 közötti szakaszt, az idegen lacZ gént és az *osk* gén 3' NTR szakaszát tartalmazta. A három transzgén közül egyik sem menekítette az új mutánsok petét nem rakó fenotípusát. Tehát az 5' NTR, a kódoló régió és a 3' NTR szakaszokra együtt van szükség a korai *osk* funkcióhoz.

Végül, mivel a menekítések során használt transzgének genomi szekvenciákat tartalmaztak megvizsgáltuk, hogy az *oskar* gén intron szakaszainak van-e valamilyen szerepük az *osk* korai oogenezis funkciójában. Az *MO4A* transzgén az *osk* gén cDNS-ét tartalmazta, amivel sikeresen menekítettük az új mutánsok petét nem rakó fenotípusát. Azaz nem az intron szakaszok felelősek az új *osk* mutánsok menekítéséért.

Eredmények összefoglalása és megbeszélése:

- Nagyléptékű P elem indukálta mutagenézis kísérletben több ezer vonalat állítottunk elő. Ezekből létrehoztunk egy letális gyűjteményt, egy steril gyűjteményt és az unokátlan mutánsok csoportját.
- A steril vonalak szűrésével már korábban ismert gének, így a *staufen*, a *vasa*, a *ftz-F1* és az *oskar* gének új mutáns alléljeit azonosítottuk. Részletesen a *vasa*, a *ftz-F1* és az új *osk* mutánsokat vizsgáltuk.
- Részletes komplementációs analízissel és *osk* transzgénnel történő menekítéssel bizonyítottuk, hogy az újonnan izolált mutánsok valóban az *osk* gén alléljai.
- Az oogenezis korai szakaszát érintő új *oskar* fenotípust részletesen leírtuk.
- Kimutattuk, hogy az új mutánsokban az *osk* RNS mennyisége erősen lecsökkent (*osk* RNS hipomorfok), illetve hiányzik (*osk* RNS null).
- Meghatároztuk az új *osk* mutánsok molekuláris természetét. A P elem mutagenézisből származó mutánsok esetében egy *I faktornak* (*IF*) nevezett transzpozon inszertálódott az *osk* gén 5' régiójába. Az *osk*^{A87} mutánsban egy *ZAM* retrotranszpozon inszertálódott az *osk* gén első exonjába.
- *Osk* mRNS-sel sikeresen menekítettük az új *osk* mutánsok petét nem rakó fenotípusát.

- **Kimutattuk, hogy az oskar fehérje önmaga nem képes menekíteni az új mutánsokat.**
- **Igazoltuk, hogy a mutánsok menekítéséhez a teljes hosszúságú *osk* RNS szükséges.**
- **Megmutattuk, hogy az érett *osk* mRNS felelős a menekítésért.**

Valószínű, hogy a lokalizált RNS-ek, mint pl. az *osk* mRNS, RNP komplexek formájában szállítódnak. Számos RNS kötő fehérje együtt lokalizálódik az *osk* mRNS-sel az oogenezis során. Lehetséges, hogy a petesejt fejlődésében fontos szerepet játszó fehérjék az *osk* mRNS-től, egy RNP komplex tagjaként, mint szerkezeti elemtől függenek. Azaz elképzelhető, hogy a korai oogenezis során az *osk* mRNS-hez, mint egyfajta állványzathoz, fehérjék kötődnek, melyek az RNS lokalizálásával a petesejtbe jutnak és ott kifejtik hatásukat. Úgy gondoljuk hogy más lokalizált RNS-ek esetében is lehetséges az *osk* mRNS-nél felfedezett kettős funkció, mely az eddig ismert paradigmánál differenciáltabb mRNS működésre utal.

Közleményék jegyzéke:

A Ph.D. tézishez nem kapcsolódó közlemények:

Deak,P, Závorszky,P, Maroy,P Moulting hormone regulates its receptor level in *Drosophila melanogaster*. INSECT BIOCHEM. 18: 847- (1988).
Impakt: 2.28 Idézet: 47 Független idézet: 46

Kulcsár,P, Polgár,L, Darvas,B, Závorszky,P Identification of ecdysone 20-hydroxy ecdysone and makisterone A in the vetch aphid, *Megoura viciae* Bick. ACTA PHYTOPATHOL.ENTOMOL. ASH. 29: 161-164 (1994).
Impakt: 0 Idézet: 1 Független idézet: 0

A Ph.D. tézishez kapcsolódó közlemények:

Guichet,A, Copeland,J.W.R, Erdelyi,M, Hlousek,D, Závorszky,P, Ho,J, Brown,S, Percival-Smith,A, Krause,H.M, Ephrussi,A The nuclear receptor homologue Ftz-F1 and the homeodomain protein Ftz are mutually dependent cofactors. NATURE 385: 548 - (1997).
Impakt: 29.49 Idézet: 58 Független idézet: 54

Tomancak,P, Guichet,A, Závorszky,P, Ephrussi,A Oocyte Polarity Depends on Regulation of Gurken by Vasa. DEVELOPMENT 125: 1723-1732 (1998).
Impakt: 10.08 Idézet: 33 Független idézet: 32

Závorszky, P; Jenny, A, St Johnston, D, Erdélyi, M, Ephrussi, A Structural role of *oskar* mRNA during oogenesis, Közlés alatt.