

**A sejtváándorlásban szerepet játszó gének azonosítása funkcionyerés
mutánsok létrehozása és analízise révén Drosophila melanogasterben**

PhD értekezés tézisei



Készítette: Szabó Kornélia

Magyar Tudományos Akadémia

Szegedi Biológiai Központ

Genetikai Intézet

Témavezető: Dr. Pernille Rorth

European Molecular Biology Laboratory

Developmental Biology Program

MTA Szegedi Biológiai Központ, Genetikai Intézet, 2003

Általános bevezetés és célkitűzések

Az *ecetmuslica* petefejlődése során végbemenő sejtvándorlási folyamat tanulmányozása volt mukám célja. Az újonnan formálódó petekamra kialakulása után kétféle eredetű sejtípust tartalmaz. A 15 dajkasejt és a petesejt csíravonal eredetű, ezeket a szomatikus eredetű follikulus sejtek egysejtű rétege veszi körül. Az oogenezis során a follikulus sejtek poszterior irányba kezdenek elmozdulni. Ezzel egyidőben az anterior póluson 6-10 sejt elválik a többitől, majd a dajkasejtek között a petesejt irányába indulnak, és a dajkasejtek és a petesejt közötti határig vándorolnak. Innen kapták a határsejt elnevezést. A vándorlási folyamat térben és időben szigorúan szabályozott. Ha a folyamat bármi zavart szenved, akkor a fejlődés későbbi szakaszában a mikropíle nevű struktúra, ami a megtermékenyítéshez elengedhetetlenül szükséges, hibás lesz, és a kialakuló peték nem termékenyíthetők meg. Azok a nőstények tehát, amelyek ilyen hibás fejlődésű petéket raknak, sterilek.

Ismertek olyan mutációk, melyekben a határsejtek vándorlása zavart szenved. Az un. *slbo* (*slow border cells*) mutáns petekamrákban például az anterior follikulus sejtek egyáltalán nem mozognak, vagy legalábbis késnek, a *slbo* allél erősségétől függően. A *slbo* lokusz a *Drosophila* C/EBP nevű transzkripciós faktort kódolja. Korábban már igazolták, hogy a C/EBP gén kifejeződik a határsejtekben, és a géntermék nélkülözhetetlen a sejtek vándorlásának ideje alatt. A *slbo* fenotípus, és az a tény, hogy C/EBP egy

transzkripciós faktor, azt sugallja, hogy valószínűleg olyan géneket regulál, melyeknek szerepe van az anterior follikulus sejtek vándorlásában. Ennek a lehetőségnek a vizsgálatára egy új típusú mutáns kollekciót hoztunk létre, és tagjainak felhasználásával genetikai interakción alapuló vizsgálatokat folytattunk.

Ha egy gént túlexpresszáltatva erősíthetjük vagy gyengíthetjük egy másik gén meglevő fenotípusát, akkor a két génről elmondhatjuk, hogy valószínűleg ugyanabban a folyamatban játszanak szerepet, vagyis interakció van közöttük. Ez az alapja az általunk elvégzett interakciós kísérleteknek, melynek során különböző géneket túlműködésre készítettük specifikusan a vándorló határsejtekben egy különleges, érzékenyített háttéren. Ehhez az általunk létrehozott EP vonalak közül 2083-t túlexpresszáltattunk az anterior follikulus sejtekben slbo1 mutáns állél jelenlétében. Az olyan kontrol nőstények, amelyek hordozzák ezt az állélt, sterilek, a határsejtek vándorlásának súlyos zavara miatt. 88 olyan törzset találtunk, melyek slbo szupresszorként viselkedtek tesztjeink során, vagyis menekítették a nősténysteril fenotípust. Számos olyan gént azonosítottunk, melynek behatóbb vizsgálata nagyban hozzájárulhat a határsejtek vándorlásának háttérében lezajló folyamatok jobb megértéséhez.

Alkalmazott módszerek

- Drosophila mutáns gyűjtemény létrehozása transzpozonos mutagenézises módszerrel egy új típusú transzpozon, az EP elem felhasználásával
- Az anterior follikulus sejtek vándorlásában szerepet játszó mutánsok izolálása (domináns genetikai interakción alapuló mutánsizolálási kísérletekben, funkcionyeréses mutánsok vizsgálatával)
- A transzpozon inszerciók térképezése genetikai és molekuláris módszerekkel (genetikai térképezés, az EP-elem inszerciók határoló szekvenciáinak meghatározása)
- Mutációk fenotipusos analízise β -Gal festéssel petekamrákon
- Mutációt szenvedett gének meghatározása cDNS könyvtár analízisével
- Molekuláris DNS és RNS technikák (genomikus DNS izolálás, PCR, plazmid menekítés, Southern analízis, cDNS könyvtár analízis, mRNS izolálás, Northern analízis)
- Mutációk részletes analízise immunhisztokémiai módszerekkel (poliklonális ellenanyag termeltetése, immunfestés petekamrákon)

Eredmények és következtetések

1. Az EP transzpozon felhasználásával egy nagyméretű, véletlenszerű transzpozon beépüléseket tartalmazó gyűjteményt hoztunk létre. Munkánk során mintegy 2296 új törzset izoláltunk, és korábban elvégzett hasonló kísérletekkel összehasonlítva jónéhány technikai módosítást vezettünk be. Maga az EP elem egy módosított P-elem, amely lehetővé tette funkcionyeréses vizsgálatok végzését random gének térben és időben szabályozott módon történő expresszáltatása révén. Mutatóként a transzpozont egy CyO kromoszómán hordozó törzset használtunk, ami lehetővé tette azt, hogy mi X kromoszómás beépüléseket is nagy számban izoláljunk. Erre azért volt szükség, mert más gyűjteményekben az ilyen vonalak száma alacsony volt az autoszómás beépülések számával összehasonlítva. A korábbiakkal ellentétben nemcsak hímekben, hanem nőstényekben is idukáltuk az EP elem mozgását. Ezzel lehetővé tettük, hogy a transzpozon mozgásának mechanizmusát vizsgálhassák más kutatók mindkét nem csíravonalában. A létrehozott törzseket törzscentrumokban helyeztük el, ahol mindenki számára hozzáférhetővé váltak.
2. Minden egyes EP vonal esetében meghatároztuk azt, hogy melyik kromoszómára történt a transzpozon beépülése genetikai térképezés módszerével.

3. Genetikai interakción alapuló kísérletekben olyan géneket kerestünk, melyeket a vándorló határsejtekben túlexpresszáltatva menekíteni tudjuk a homozigóta slbo mutáció jelenléte okozta sterilitást nőstényekben. 88 olyan törzset találtunk, melyek slbo szupresszorként viselkedtek az első tesztek során. Ezt követően meghatároztuk a határsejtek vándorlásának mértékét ezekben a nőstényekben oly módon, hogy megszámloltuk, hogy a 10. stádiumos petekamrák hány százalékában találunk vándorló anterior follikulus sejteket. 66 törzs esetén a vándorlás mértéke szignifikánsan eltérőnek bizonyult a kontrol értékekkel összehasonlítva.
4. Ellenőrző kísérletekkel igazoltuk, hogy az általunk tapasztalt szupresszió szigorúan Gal4 függő volt, ami azt sugallta, hogy a jelenséget az EP elem közvetlen szomszédságában található gének túlhajtott működése okozta.
5. Elvégeztük a transzpozon környezetében levő genomikus régiók izolálását plazmid menekítés módszerével mind a 66 slbo szupresszor esetén. A kapott DNS darabokat szekvenálásnak vetettük alá és, ahol ez lehetséges volt, Drosophila genomikus szekvenciákat tartalmazó adatbázisokban végzett kereséssel meghatároztuk az inszerciót tartalmazó lókuszokat.
6. A kapott adatok analízise során megállapítottuk a következőket:
 - az EP rendszer a hagyományos, P-elemes, funcióvesztéses mutagenézises módszerrel ellentétben alkalmas arra, hogy olyan redundáns géneket is vizsgáljunk vele, melyek átfedő funkcióval rendelkeznek. Korábban hiába generáltuk ezen gének

funkcióvesztéses mutánsait, hiszen a rokon funkcióval rendelkező átvehette a hiányzó gén feladatát az egyes folyamatokban. Példa rá a Hsp27 nevű gén (EP(3)297).

- Sikertült új biológiai funkciót találni más folyamatokban már megismert gének esetében. Így volt ez pl. az *α -adaptin* (EP(2)2519) vagy a *big brain* nevű géneknél.
- Bizonyítottuk, hogy egyes esetekben az EP elem antiszensz transzkriptum Gal4 függő létrejöttét eredményezte módon, és ez okozta az általunk megfigyelt *slbo* szupresszor hatást. Ezt tapasztaltuk az EP(2)2585 jelű vonal esetén.

7. Megvizsgáltunk olyan vonalakat is, ahol a transzpozon beépülése még korábban nem ismert génben történt. Ilyen esetekben cDNS könyvtárak analízisével meghatároztuk a mutáns gént. Ezek közül az egyik az EP(X)1487 jelű törzs volt, ahol az érintett gén a RIN1 jelű humán gén *Drosophila* homológjának bizonyult, és sprintnek neveztük el.

8. Northern analízissel igazoltuk, hogy valóban a sprint lókuszt expresszáltattuk túl az EP(X)1487 jelű törzsben. Igazoltuk, hogy a cDNS könyvtár vizsgálata során izolált mRNS izoformák mindegyike jelen volt a vad típusú ováriumokban.

9. Megmutattuk, hogy a *Drosophila* sprint gén funkcionális homológja a humán *RIN1* génnek. RIN1-et túlexpresszáltatva a vándorló anterior

follikulus sejtekben képesek voltunk részlegesen szuppresszálni a slbo mutáns nőstények steril fenotípusát.

10. Poliklonális ellenanyagot készítettünk a sprint protein ellen.

Megmutattuk, hogy az ellenanyag képes felismerni mind az endogén, mind pedig a túlexpresszált sprint proteint, és megvizsgáltuk ezek sejten belüli lokalizációját petekamrákon végzett immunfestéssel.

KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

1. RORTH, P., **SZABÓ, K.**, BAILEY, A., LAVERTY, T., REHM, J., RUBIN, G. M., WEIGMANN, K., MILAN, M., BENES, V., ANSORGE, W., COHEN, S.M: Systematic Gain-of-function Genetics in *Drosophila*. DEVELOPMENT, 125: 1049-1057 (1998)
2. RORTH, P., **SZABÓ, K.**, TEXIDO, G.: The level of C/EBP protein is critical for cell migration during *Drosophila* oogenesis and is tightly controlled by regulated degradation
MOLECULAR CELL 6 : 23-30 (2000)
3. SZABÓ, K., JÉKELY, G., RORTH, P.: Cloning and expression of sprint, a *Drosophila* homologue of RIN1. MECHANISMS OF DEVELOPMENT 101(1-2)259-62. (2001)

