

A pályázat rövid tudományos háttere

Drosophila melanogasterben az ivarsejtek valamint a testi sejtek fejlődési útjai az embrionális élet kezdetén elválnak egymástól. A két alapvető sejsors elválása a pete poszterior csúcsán elkülönült citoplazmarésznek, az ivarplazmának hatására történik meg. Régen bizonyított tény, hogy az ivarsejtjellegek kialakításához szükséges összes faktor az ivarplazmában megtalálható. *Drosophilában* tehát az ivarsejtsors kialakulásának kutatása valójában az ivarplazma szerkezeti és működési megismerését jelenti. Korábban az ivarplazmával kapcsolatos kutatás klasszikus genetikai megközelítésen alapult. A kutatás fő iránya pedig az ivarplazma petén belüli lokalizációjának mikéntjére irányult miközben kevés, mintegy fél tucat ivarplazma komponens tartak csupán fel. Kiderült, hogy az ivarplazma összeszerelődés kulcs lépése az oskar RNS lokalizációja, melyet több RNS és fehérje bekötődése követ. Az RNS kimutatásban bekövetkezett technikai fejlődés az ivarplazma kutatásban is új lehetőségeket hozott. A *Drosophila* genomprogram részeként rendszeres RNS *in situ* hibridizációs kísérletek indultak meg, és ezzel az ivarplazmában lokalizált ismert RNS-ek száma hirtelen megnőtt. Az egyenkénti génexpressziós vizsgálatok még nagy erőforrásokat felhasználó *Drosophila* genom program keretén belül is lassan haladnak, mindazonáltal irányt szabnak az ivarplazma kutatásnak is. Reális célnak tűnik az ivarplazma teljes RNS összetételének megállapítása, ezáltal az ivarplazma funkciójának reverz genetikai feltárása. A pályázat előkísérleteként egy 3200 cDNS mintát tartalmazó, saját készítésű chip segítségével ivarplazma hiányos és ivarplazma túlműködéses kondíciókat hasonlítottunk össze. Az ivarplazmában feldúsult RNS-ek *in situ* hibridizációját elvégeztük. Ezzel bemutattuk a chip technológia alkalmazhatóságát az ivarplazma kutatás területén.

A pályázat célja

Pályázatunk célja egy microarray alapú, genomszintű reverz genetikai kísérletsor végrehajtása volt ivarplazmában lokalizált RNS-ek azonosítása céljából *Drosophila melanogasterben*. További célunk az azonosított transzkriptumok funkcionális vizsgálata volt.

A pályázat részfeladatai

Munkatervünk három fő lépésből állt. 1. Ivarplazmában tárolt RNS-ek azonosítása teljes genom DNS microarray segítségével. 2. A teljes genom microarray eredmények ellenőrzése RNS *in situ* hibridizáció módszerrel. 3. A lokalizált RNS-eket kódoló gének funkcionális vizsgálata genetikai interakción alapuló kísérletekben. Ivarsejt funkcióval bíró gének részletes genetikai és fejlődésbiológiai jellemzése.

Ivarplazmában tárolt RNS-ek azonosítása teljes genom DNS microarray segítségével

Az microarray összehasonlításokat ivarplazma hiányos, ivarplazma túlműködéses és kontroll kondíciók alkalmazásával végeztük el. Teljes ivarplazma hiányos *Drosophila* nőstényeket egy oskar RNS null (oskarA87) és egy fehérje null (oskar oskar 54) allélokából álló genotípus segítségével állítottuk elő. Ivarplazma túltermelést egy oskar bicoid kiméra transzgen használatával valósítottuk meg. Az oskar A87/TM3 és az oskar 54/TM3 genotípusú nőstények reprezentatív mintáját az ivarplazma hiányos állapotra jellemző fenotípusra teszteltük és teljes ivarsejthiányra

utaló fenotípust kaptunk. Az *osk-bicoid* transzgenikus nőstények fenotípus tesztje teljes penetranciájú ektopikus *oskar* expresszióra utaló fenotípust mutatott, jelezve, hogy mind az ivarplazmahiányos mind az ivarplazma túlermelő genotípusok alkalmasak a microarray kísérletek végrehajtására. Vad típusú kontrolként a w^{1118} laboratóriumi törzsből származó nőstényeket használtunk.

A fent említett gentotípusú, fenotípusosan bevizsgált egyedek ováriumait kiboncoltuk, majd Trizol extakcióval majd Quiagen RNeasy RNS tisztító kit használatával teljes RNS kivonást végzünk. Az RNS minta minőségét az Agilent 2100 Bioanalyzer műszer segítségével ellenőriztük. Mindhárom kondícióból három-három tisztítást végeztünk. A kilenc minőségellenőrzött RNS mintán reverz transzkripcióval egyes szálú DNS lenyomatokat állítunk elő, melyet lineáris PCR reakcióval Cy5 fluorokrómmal jelölünk. Minden mintát két-két, összesen 18 darab kereskedelmi forgalomban kapható (*Drosophila* Genomics Resource Center) 3800 gén reprezentatív részét tartalmazó cDNS chipre hibridizáltuk.

A microarray kísérletek eredménye három kondícióból származó kilenc minta vadtypushoz illetve egymáshoz való páronkénti összehasonlításának számadatai voltak. Az Agilent Bioanalyzer használatának köszönhetően az előkísérleteknél tapasztalt kísérleti zaj ugyan jelentősen csökkent, de az eredmények statisztikai értékelése még így is erős kísérleti zajra utalt. A statisztikai analízis megmutatta, hogy az ivarplazmában tárolt RNS-ek mennyiségi különbségeinek kimérése pontosabb mérést igényel. Úgy ítéltük meg, hogy a microarray méréseink pontatlanságáért nem a minta előkészítés, hanem a választott jelölési mód, valamint a microarray lemezek minősége együttesen voltak felelősek. Ezért úgy határoztunk, hogy kísérleteinket Affymetrix (*Drosophila* genechip 2) oligonukleotid microarray lemezekben, Affymetrix jelölési eljárással készült próbákkal megismételjük. w^{1118} , osk^{A87}/osk^{54} , $TmII^{eg9}/TmII^{eg9}$, $osk-Bcd/+$, gentotípusú, fenotípusosan bevizsgált 3-5 napos jól táplált nőstény egyedek ováriumait kiboncoljuk, majd Trizolos kivonással majd Quiagen RNeasy RNS tisztító kit használatával teljes RNS tisztítást végzünk. Az RNS minták minőségét az Agilent 2100 Bioanalyzer segítségével ellenőriztük. A mintákat Affymetrix protokoll alapján jelöltük, hibridizáltuk. A hibridizáció körülményeit 6 beállító chip segítségével optimalizáltuk. A vizsgálatot 5 biológiai ismétléssel végeztük. Az eredményeket az Agilent Genespring analízáló programjával értékeltük ki. A statisztikai analízis megmutatta, hogy az Affymetrix platformon valóban kisebb háttérzajú, a korábbi kísérletünkénél reprodukálhatóbb eredményeket kaptunk.

A munkatervtől való eltérés: Munkatervünkben csupán a *Drosophila* Genomics Resource Center cDNS chipjének alkalmazása szerepelt. Az Affymetrix *Drosophila* genechip 2 oligonukleotid microarray alkalmazása jelentős anyagi terhet jelentet, melyet külső forrásból kellett fedeznünk. Mindazonáltal a pályázati célok csak ezzel a munkatervtől való eltéréssel voltak megvalósíthatók.

A teljes genom microarray eredmények ellenőrzése RNS in situ hibridizáció módszerrel

Az affymetrix microarray eredményeinkből, 200 jelölt gént választottunk ki, melyek *in situ* RNS hibridizációs kísérleteit megkezdjük. A jobb összehasonlítás érdekében úgy döntöttünk, hogy az *in situ* hibridizációhoz szükséges génmintákat egységes módszerrel, PCR technikával állítjuk

elő. Elhatároztuk, hogy a PCR amplifikációt a DGRC által használt egységese olvadáspontú (55°C), génspecifikus primerpárokkal hajtjuk végre. Ez lehetővé teszi számunkra, hogy egyszerre nagyszámú génmintát állítsunk elő. 26 db primerpárt megszintetizáltattuk, majd genomi DNS-en végzett PCR reakciókban kipróbáltuk. 24 esetben egyetlen, megfelelő méretű PCR terméket kaptunk. Eredményeink azt mutatják, hogy ezzel a módszerrel az összes vizsgálni kívánt génminta előállítható.

Korábban laboratóriumunkban RNS *in situ* hibridizációt jelölt antiszensz RNS-sel végeztünk. A PCR-rel előállított génminták esetében ez megfelelő promotérral ellátott vektorba való klónozást igényelne, ami tömeges analízis esetén nagyon munkaigényes út. A PCR-rel előállított génminták random priminggal való jelölése kivihető, de tapasztalataink alapján az így készült próbákkal végzett hibridizációk aspecifikus háttére nagy, így az ivarplazmában kis koncentrációban lokalizálódó RNS-ek kimutatására csak kevés alkalmas. Kidolgoztunk egy PCR alapú tömeges munkára alkalmas egyszálú jelölt antiszensz DNS molekulák előállítására alkalmas módszert. A módszer lényege, hogy DGRC által használt primerek segítségével, dUTP nukleotid tartalmú exon specifikus génszakaszt amplifikálunk. Ezt templátként használva aszimmetrikus PCR eljárással egyszálú, Dig-dUTP jelölt DNS szálat hozunk létre. A templátként használt dUTP tartalmú szál UDG enzimmel elbontható, így az *in situ* hibridizációt csak egy szálú, a kívánt gén exonjára specifikus, jelölt DNS-sel végezzük. Az új módszert az *oskar* génnel kipróbáltuk. Az *oskar* mRNS-t a korábbiaknál kisebb aspecifikus háttérrel, sikerrel detektáltuk a poláris plazmában. A 200 jelölt génből *in situ* hibridizációja folyamatban van.

A chip kísérletben azonosított 200 jelölből 42 gén expressziós mintázata található meg a *Drosophila* Genom Program RNS *in situ* hibridizációs adatbázisában illetve egyéb tudományos közleményekben. Az irodalmi adatok 30% ban támasztották alá a chip kísérletünkben tapasztaltakat. Összességében ez azt jelenti, hogy az Affymetrix *Drosophila* gene chip kísérletünkéből mintegy hatvan új ivarplazmában lokalizált RNS-féleséget várunk.

A munkatervtől való eltérés: A chip analízis nyomán feltételezett ivarplazma lokalizációjú RNS-ek RNS *in situ* hibridizációval történő ellenőrzése még jelenleg is tart. A késedelem oka egyrészt a pályázati munkák kezdetének, a kifizetés késéséből adódó, féléves késése volt. Ugyancsak késedelmet okozott a jobb minőségű microarray technikára való átállás, valamint az új jelöléstechnika bevezetése, melyet az RNS *in situ* hibridizáció minőségének növelése érdekében dolgoztunk ki. A késedelmet okozó technikai javítások adataink minőségi javulását hozták, így a pályázat sikeréhez elengedhetetlenek voltak. A hibridizációs kísérletek folytatását egyéb forrásból finanszírozzuk, és 2008 első félévében lezárjuk. Így a pályázat célkitűzései maradéktalanul megvalósulnak.

A bizonyítottan lokalizált RNS-eket kódoló gének funkcionális vizsgálata

Pályázati tervünk a lokalizált RNS-eket kódoló gének funkcionális vizsgálatát klasszikus mutánsoknak genetikai interakción alapuló fenotípusos vizsgálatával tervezte. Kidolgoztunk egy genetikai interakciós rendszert, amely három ivarsejt fenotípusáról ismert gén (*staufer* *oskar* *tropomyosin*) alléljaiból épült fel. A hármass homozigóta nőstények utódai 14%-ban ivarsejthiányosak fenotípust mutattak. Ezen az érzékenyített háttéren az ivarsejtek kialakulását befolyásoló gének alléljai már heterozigóta formában is mérhetően megemelik az érzékenyített háttér fenotípus erősségét. A microarray kísérleteinken azonosított, majd az RNS *in situ*

hibridizációval igazoltan ivarplazma lokalizációjú RNS-t kódoló gének alléljait mutánsgyűjteményekből kívántuk beszerezni azokat az általunk kifejlesztett érzékenyített genetikai háttéren megvizsgálni. Míg a klasszikus mutánsgyűjteményekben a gének mintegy felére találunk mutáns alléleket addig a kettősszalú RNS csendesítés minden ismert gén esetében megvalósítható, így teljes genom szintű vizsgálatokra alkalmasabb eszköznek bizonyul.

Beszereztünk egy 14 500 gén egyenkénti csendesítésére alkalmas kettős szalú RNS gyűjteményt, mely elemeit injektálással illetve Gene gun technológiával korai embriókba juttathatunk. Kontroll kísérleteinkben hatvan százalékos túlélés mellett több mint nyolcvan százalékos ivarsejthiányos fenokópiát értünk el az ivarplazmában lokalizált nanos RNS csendesítésére alkalmas kettős szalú RNS Gene gun-nal történő bejuttatásával. Az RNS csendesítés módszerével minden egyes gén szerepe vizsgálható a korai ivarsejtek kialakulásában. Gene gun technológia *Drosophila* petére történő adaptálásával teljessé vált a teljes genom szintű Reverz genetikai eljárás *Drosophila* ivarplazma lokalizált RNS-ek azonosítására és funkcionális analízisére.

A munkatervtől való eltérés: A munkaterv összeállításának idején a funkcionális vizsgálatok kivitelezéséhez még csak klasszikus mutánsgyűjteményekre számíhattunk, melyek csak a gének felére tartalmaznak mutáns alléleket. A pályázat beadása után kerültek kereskedelmi forgalomba olyan kettős szalú RNS gyűjtemények, melyekkel azonban már minden egyes gén analízise levégezhető. A microarray kísérlethez hasonlóan a funkcionális analízis esetében is az új, magasabb minőségű, az eredeti tervtől eltérő eljárás adaptálását választottuk. A kettős szalú RNS csendesítés esetében ez az RNS preparátumok tömeges bejuttatására alkalmas BioRad gene gun technológia *Drosophila* petékre történő adaptálását tette szükségessé.

Ivarsejt funkcióval bíró gének részletes genetikai és fejlődésbiológiai jellemzése

A *dMoesin* RNS az ivarplazmában és az embrionális ivarsejtekben feldúsul. Korábban megmutattuk (Jankovics és mtsai Curr Biol. 2002 10;12(23):2060-5), hogy a *dMoesin* mutációk az embrionális ivarsejtek hiányához vezetnek. Az ivarsejthiányos fenotípus leírásakor fedeztük fel, hogy a fixált mintákon az ivarsejtek egy részében a *dMoesin* az ivarsejtek magjában is megtalálható. Időfelbontásos mikroszkópiával kimutattuk, hogy a magi lokalizáció sejtciklus függő, a mitózis profázisának közepétől a magosztódás végéig figyelhető meg. A magi lokalizáció dinamikáját FRAP (Flourescence Recovery After Photobleaching) analízissel, valamint a számítógépes fehérjeanalízis nyomán feltételezett nukleáris lokalizációs szignál eltávolításával vizsgáltuk. Eredményeink szerint a magi lokalizáció a mitózis során fokozatosan megnyíló maghártyán keresztül passzív diffúzióval történik meg. Konfokális mikroszkópiával megmutattuk, hogy a *dMoesin* fehérje a magban a magorsó anyagához kötődik. A magorsóhoz való fizikai kötődés jelentőségét alátámasztja, az a megfigyelésünk, hogy az *dMoesin* mutáns alléljaink a klasszikus lárvaagy preparátumokon a kromoszómaszétválás hibáit mutatják. Kísérleteink nyomán a *dMoesin* fehérje új funkciójára derült fény. Az ivarsejthiányos fenotípust a hibás magorsókból adódó sejosztódási hibákra vezetjük vissza. Megfigyelésünk jelentőségét az adja, hogy nagy valószínűséggel a *dMoesin* magi funkciója az emlősök ezrin, moesin és radixin fehérjéből álló ERM családjára is megfigyelhetők lesznek.

Az oskar RNS az ivarplazmában legelsőként lokalizált faktor, mely a poláris plazma összeszerelődésének helyét kijelöli, majd az összeszerelődést irányítja. Oskar mutánsok

molekuláris vizsgálatokor bukkantunk egy RNS null és egy kevés RNS-t eredményező, hipomorf mutáns változatra. Az újonnan azonosított RNS null és hipomorf allélek a peteképződés zavarához vezettek, míg a korábban ismert oskar protein null mutációk ép peteképződés mellett az utódok ivarsejthiányos fenotípusához vezettek. Az RNS és protein null fenotípusok különbözősége arra utal, hogy az oskar RNS-nek translációtól független szerepe is lehet. A translációt akadályozó hairpin-t formáló RNS szakasz, nonszensz és frame shift mutációk együttes alkalmazásával előállítottunk egy oskar RNS változatot ami bizonyosan nem volt képes transzlálódni. Ezzel a mutáns RNS képes volt az RNS null mutációk fenotípusát komplementálni. Ezzel bizonyítást nyert, hogy az ivarplazma fő RNS komponensének kettős biológiai funkciója. Az oskar RNS nemcsak az oskar fehérjét kódolja tehát hanem saját RNS funkciója is van.

Kiegészítő minősítési eljárás iránti kérelem

Eredményeink egy részének közzétételét később, 2 éven belül tervezzük, ezúton kérjük, hogy a jelentésben foglaltak alapján született minősítést az OTKA kiegészítő eljárásban később módosítsa, figyelembe véve a később megjelent közleményeinket.