

Jelentés

A sebzáródásban szerepet játszó gének azonosítása *Drosophila melanogaster* embrióban

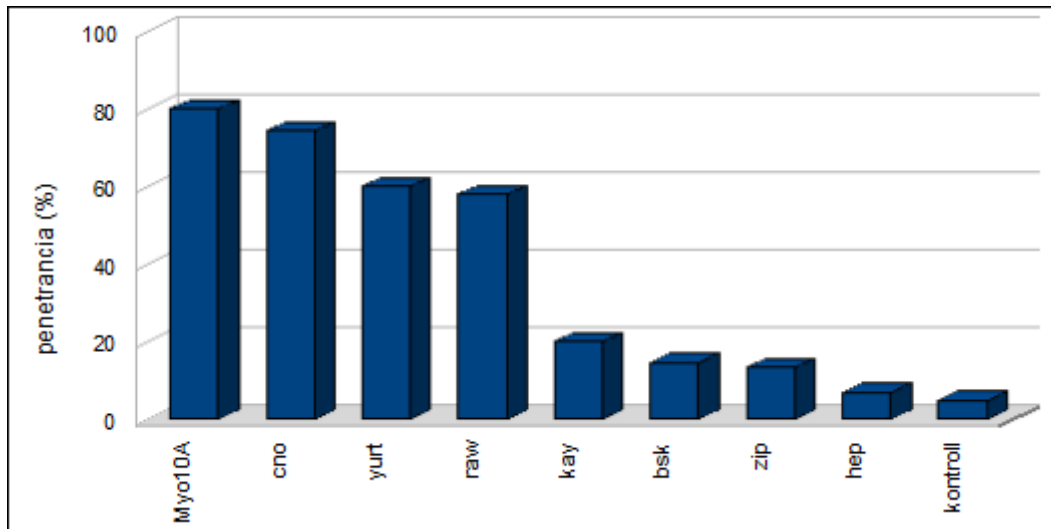
Ha egy élő szervezetet sérülés ér, a szövetek roncsolódása és a fertőződés megakadályozása érdekében a keletkezett sebet be kell zárni. Az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) egyedfejlődése során számos olyan folyamat zajlik le, például az embrió háti záródása vagy a tor záródása a metamorfózis alatt, amelyek során a sejtek a mesterségesen okozott seb záródásakor tapasztalt módon viselkednek. Az ecetmuslica így kitűnően alkalmas modellt kínál a sebzáródási folyamatok során lezajló molekuláris, illetve sejt- és szövetszintű változások *in vivo* vizsgálatához.

A hámszáródás folyamatának megértésében az elmúlt években tapasztalható előrelépések ellenére számos kérdés maradt megválaszolatlanul. Nem ismert, hogy milyen jelek indítják el a záródási folyamatokat. Azt sem tudjuk, hogy a jelátviteli kaszkádok hogyan aktiválják a különböző sejtvázelemeket. A záródási folyamatokban szerepet játszó sejtvázelemek, különösen a mikrotubulusváz funkciója alig ismert. Bár a hámsejtek mikrotubulusainak dinamikus átrendeződését nagy részletességgel leírtuk, az átrendeződést szabályozó molekulák továbbra is ismeretlenek. Bár számos nyilvánvaló párhuzamos vonás van a fejlődési és a sebzés okozta nyílások záródása között, még nem végeztek teljes körű összehasonlító vizsgálatot.

A végrehajtott kísérletsorozat a következő specifikus kérdéseket kívánta megválaszolni: Melyek azok a gének, amelyek az embrió háti záródásában szerepet játszanak? Ezen gének közül melyek szükségesek a tor záródásához is? A közös elemek közül melyek vesznek részt a sebzáródásban? A javasolt munka során nagyléptékű funkcionális genomikai megközelítést alkalmaztunk. A genom nagy részére kiterjedő nagy áteresztőképességű funkcionális genomikai szűréssel olyan géneket azonosítottunk, amelyek az embrionális háti záródáshoz szükségesek. Az így azonosított gének szerepét megvizsgáljuk a tor záródása alatt is. Azokat a géneket, amelyek mindkét folyamathoz szükségesek sebzáródási esszében vizsgáljuk tovább.

I. A háti záródás funkcionális genomikai szűrésének beállítása

A nagyléptékű szűrés elkezdése előtt sikeresen teszteltük a géncsendesítés hatékonyságát egy nyolc génből álló pozitív kontroll kettősszálú RNS-gyűjteménnyel (dsRNS). Az irodalmi adatok alapján háti záródáshoz szükséges géneket választottunk ki, melyekre specifikus dsRNS-eket készítettünk. A kontrol dsRNS-eket a *Drosophila* transzformációra kifejlesztett, hagyományos mikropillárisal történő injektálással juttattuk az embriókba. Számos tényező befolyásolja hogy egy adott gén csendesíthető-e dsRNS injektálásával. A csendesítés hatékonysága függhet az adott géntermék és az injektált dsRNS mennyiségi viszonyaitól, a kódolt fehérjék életidejétől, illetve a pleiotróp fenokópiák elfedhetik a háti záródás fenokópiát. Az előkísérletben a nyolcból négy gén esetében sikerült magas penetranciával abnormális háti záródásra jellemző fenokópiákat előidézni (1. ábra). A kontrolkísérletben megfigyelt csendesítési arány elég magas volt ahhoz, hogy a gének nagyléptékű csendesítésével új háti záródáshoz szükséges géneket tudjunk azonosítani.



1.ábra. A pozitív kontroll gének csendesítésével előidézett abnormalis háti záródás-fenokópiák penetranciája

A tervezett kísérletsorozatnak a háti záródás funkcionális genomikai vizsgálata volt a leginkább munka- és időigényes lépése, ezért a csendesítendő géneket előzetesen megszürtük és csak azokat csendesítettük, amelyek kifejeződnek a fejlődő embrióban. Ehhez a GEO integrált génkifejeződési adatbázist elemeztük és 6800 olyan gént találtunk és jelöltünk ki csendesítésre, melynek transzkriptuma jelen van a fejlődő embrióban.

A funkcionális genomikai szűrés esetén alapvető követelmény volt a gördülékeny, automatizált munkamenet, ami a nagyléptékűség előfeltétele. Az általunk javasolt kísérlet lépései a következők voltak:

1. Az embriók előkészítése és a dsRNS bejuttatása az embrióba
2. A fenotípus detektálása, felvételkészítés programozott mikroszkóppal
3. A létrehozott digitális adatok tárolása, az adatok kiértékelése

Ezeket a lépéseket egyenként optimalizáltuk, majd egy külön lépésben hangoltuk össze őket.

1. Az embriók előkészítése és a dsRNS bejuttatása az embrióba

A pályázat munkatervében a dsRNS-eknek a muslica embrióba történő bejuttatására használni kívánt módszer a Biorad Helios génpuskájával történő belövés volt. Első lépésben kísérletet tettünk ennek a módszernek optimalizálására. Ennek során a dsRNS-t szubcelluláris méretű arany szemcsékhez kötöttük, és ezeket gyorsítottuk fel annyira, hogy az embrió kemény burkán áttörve a dsRNS-t a sejtekbe juttassuk. Elsőként a dsRNS arany szemcsékre kötését optimalizáltuk. A szemcséket először hőkezeltük, majd spermidin segítségével a dsRNS-eket kicsaptuk a szemcsék felszínére. Az optimalizált módszerünk felhasználásával a bevitt RNS közel 50%-a csapódik rá a szemcsékre. Az arany szemcsék méretének és a kilövésükhöz használt nyomásnak a megfelelő beállításával elértük, hogy az embriók mintegy kétharmada túléli a szemcsék bejutását. Az optimális paramétereket használva az embriókba 20-25 szemcsé jutott be. Ezek után teszteltük a géncsendesítést is egy háti záródáshoz szükséges génen. A *panier* (*pnr*) géne specifikus dsRNS-t juttattunk be az embriókba, amelyek a géncsendesítés következtében képtelenek voltak a háti nyílás zárására. Az embriók egy részének kutikuláján a *pnr* gén

irodalomban leírt fenotípusával megegyező fenokópiákat észleltünk. A génpuskát a dsRNS-ek bejuttatására azonban a nagyléptékű kísérletben előre nem látható nehézségek miatt nem tudtuk használni. A génpuskás dsRNS-belövésével elérhető penetrancia lényegesen alacsonyabb volt a mikroinjektálással tapasztaltnál. A legnagyobb probléma azonban a génpuska használatával a módszer megbízhatatlansága volt. Az optimalizált, és mindig azonos módszerrel kezelt arany szemcséket a génpuska nem mindig lötte ki, így az eljárás nem minden esetben volt reprodukálható. A génpuskás dsRNS-bevitel hosszadalmas, sikertelen optimalizálása után kénytelenek voltunk eltérni az eredeti elképzeléstől és a dsRNS-eket az embriók, a kontrollkísérletben is használt, egyenkénti mikroinjektálásával bejuttatni. Az embriókat fedőlemezen a háti oldallal lefelé fordítva egyenként sorbarendeztünk és saját készítésű üvegapillárisal a szinciciális embrió laterális részébe injektáltuk a dsRNS-oldatot. A kapilláris méretének, az injektálás módjának beállításával megbízhatóan 80%-os túlélést tudtunk elérni.

2. A fenotípus detektálása, felvételkészítés programozott mikroszkóppal

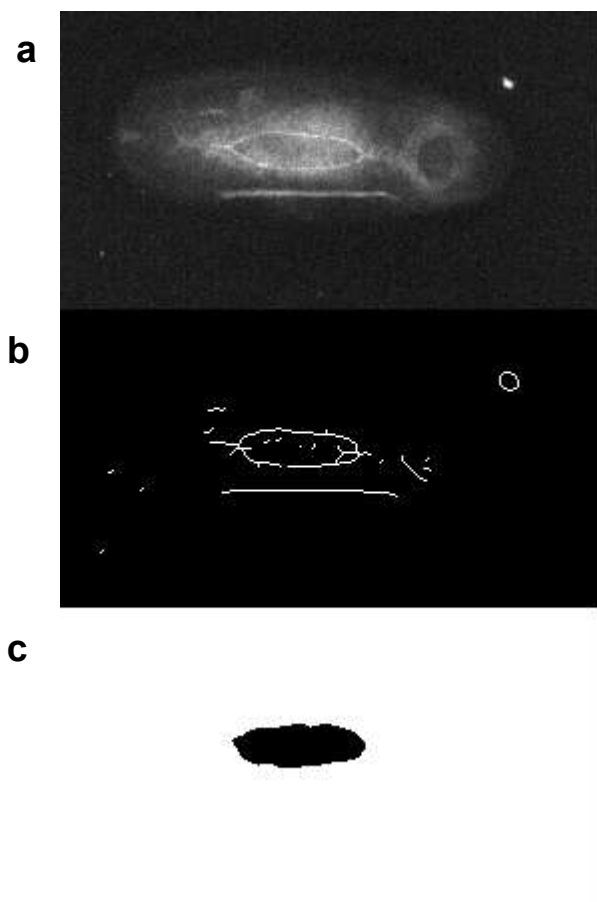
A kezelt embriókról automatizált *in vivo* fluoreszcens video mikroszkópiával 12 órás filmeket készítettünk egy programozható Olympus CellR spinning disc kvázi-konfokális fluoreszcens mikroszkóppal. A nagyléptékű kísérlet végrehajtásához speciális tárgylemeztartót terveztünk és gyártattunk le. A mikroszkóp és a kamera beállításait a nagyszámú embrió egyidejű filmezéséhez optimalizáltuk, így sikerült a fenotipizáláshoz elegendő térbeli és időbeli felbontást elérni. A megfelelő felbontás eléréséhez elengedhetetlen az erős fluoreszcens jel, ezért számos genotípusú embriót megvizsgáltunk. A vizsgált embriók különböző fluoreszcens fehérjéket fejeztek ki a háti záródás stádiumában a hámsejtekben. A Gal4/UAS bináris génaktivációs rendszert használva a moesin aktin-kötő fehérjével fuzionált GFP és cherry fluoreszcens fehérjéket fejeztettünk ki a hámban az *engrailed* génnek megfelelő kifejeződési mintázatban (enGal4>UAS-moe:cherry és enGal4>UAS-moe:EGFP). Kipróbáltuk továbbá a konstitutívan, az egész embrióban kifejeződő moesin aktin-kötő fehérjével fuzionált GFP-t is (SGMCA). Végül teszteltük a háti záródás stádiumában a záródó hám első sejt sorában GFP-t kifejező ZCL0432 protein-csapda vonalat is. A különböző genotípusú embriókról, különböző mikroszkópi beállításokkal készített filmeket összehasonlítva a ZCL0432 protein-csapda vonal bizonyult legalkalmasabbnak a nagyléptékű kísérletre. Ezt a vonalat használva a GFP fluoreszcenciája szépen kivilágítja a háti záródás frontját alkotó egyetlen hámsejtsort.

A funkcionális genomikai szűrés során egyenkénti mikroinjektálással a kísérlet felfutása után naponta átlagosan 1300 embriót kezeltünk dsRNS-sel, és naponta átlagosan 800 filmet készítettünk el. A kísérletsorozat végrehajtásához összességében 100000 embriót mikroinjektáltunk.

3. A létrehozott digitális adatok tárolása, az adatok kiértékelése

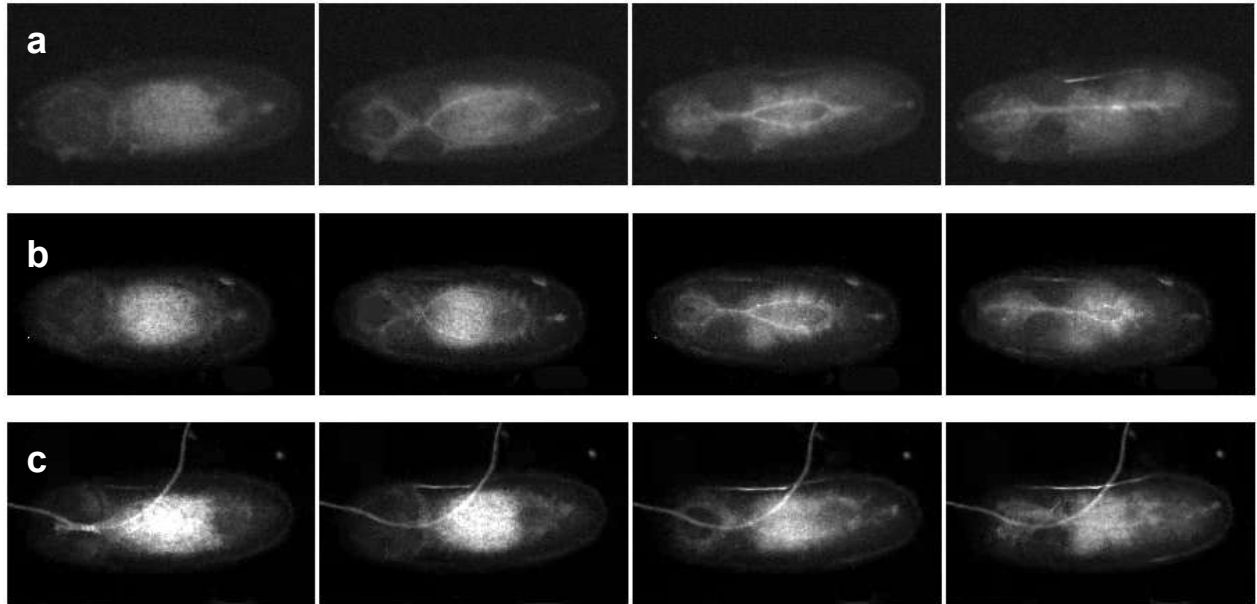
A háti záródás funkcionális genomikai szűréséhez 80000 filmet készítettünk el, ami 1 Terabyte tárhelyet foglal el. A mikroszkóp által generált nagy mennyiségű digitális adat megfelelő biztonságú tárolásához és az eltárolt adatokhoz történő megfelelő gyorsaságú hozzáférés biztosításához saját szervert állítottunk be. Minden egyes elkészült filmet személyesen megnéztünk valamint kifejlesztettük az automatizált, számítógépes fenotipizálást is. A filmek ember általi kiértékeléséhez az ImageJ szoftverhez általunk kifejlesztett plugint használtuk, ami lehetővé tette a nagyszámú film átnézését. Az egyes embriókról készült filmek részletes, automatizált vizsgálatához kidolgoztunk egy számítógépes szegmentálási algoritmust is mellyel a

háti nyílás fizikai paramétereit a számítógép automatikusan detektálja és a záródás dinamikáját számszerűsíti. (2. ábra)



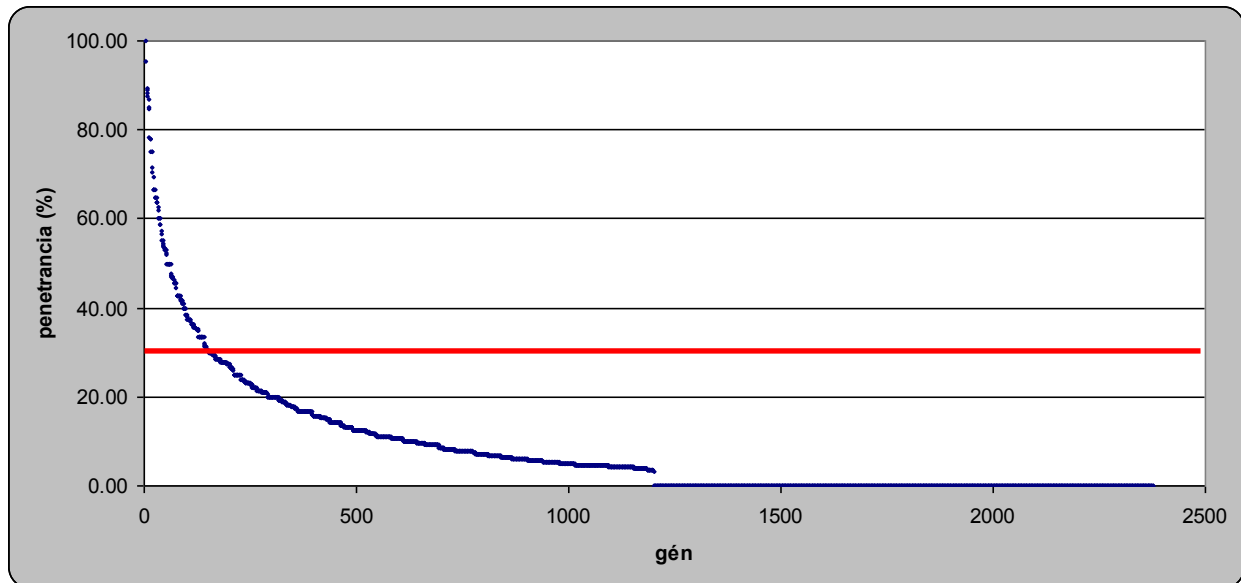
2. ábra. a. A záródó hám első sejtsorában EGFP-t kifejező ZCL0432 genotípusú embrió. b. A háti nyílás automatikus, számítógépes szegmentálással megállapított körvonala. c. A számítógép által kijelölt háti nyílás.

A nagy léptékű géncsendesítés az általunk kialakított eljárással sikeres volt, számos olyan gént találtunk, melyekre specifikus dsRNS mikroinjektálása abnormalis háti záródást okozott. A háti záródási hibákat fenotípus kategóriákba soroltuk be. Azonosítottunk olyan géneket, melyek hiánya összehangolatlan záródást, azaz a hámlemezek félrecsúszását illetve a záródás teljes hiányát okozza. (2. ábra).



3. ábra. Géncsendesítéssel előidézett abnormalis háti záródás fenokópiák. a. Vad típusú embrió. b. A *patched* gén csendesítése abnormalis dinamikájú háti záródást eredményez. c. A *canoe* gén csendesítése a záródás teljes hiányát okozza.

A szűrésre kiválasztott 6800 génnek megközelítőleg 40%-át, több mint 2500 gént, csendesítettük dsRNS-ek mikroinjektálásával. Mind a 2500 gén esetében meghatároztuk a dsRNS-sel előidézett géncsendesítéses háti záródás- fenokópia penetranciáját (4. ábra). A nagyléptékű funkcionális genomikai kísérletekben megszokott folyamatos eloszlást kaptuk. Azokat a géneket tekintettük potenciális „háti záródás”-génekknek, aminek a csendesítése az összes csendesítés átlagának négyszeresénél (30%-nál) magasabb penetranciát okozott. A 2500 csendesített gén közül 160 felelt meg ennek az általunk felállított kritériumnak. Ezeknek a génekknek a csendesítését megismételjük. Az ismétlés jelenleg folyamatban van, eddig 65 ismételt csendesített génből 13-nak sikerült megerősíteni a háti záródásban játszott szerepét. A már ismert háti záródást szabályozó gének (*canoe*, *Notch*, *DE-cadherin*) mellett eddig sikerült a számos új génről bizonyítani, hogy részt vesz a háti záródásban (*Akt1*, *RhoGAP19D*, *CG3985*, *CG4042*, *CG4374*, *patched*). Az újonnan azonosított gének egy része olyan folyamatokban vesz részt, amelyek hozzájárulását a háti záródáshoz kevéssé ismert. Az Akt1 kináz számos szignáltranszdukciós út központ eleme. A *RhoGAP19D* gén a Rho GTP-áz aktivitásának szabályozva hathat a záródást végző hámsejtek sejtvezérra. A *CG3985* génnek a vezikulaforgalomban, a *CG4042* és a *CG4374* génekknek a transzkripció szabályozásában jósolnak szerepet. Az eddig elvégzett munka alapján a teljes kísérletben kb. 30 új háti záródásban szerepet játszó gént fogunk azonosítani, ami a funkcionális genomikai megközelítésünk hatékonyságát jelzi.



3. ábra A nagyléptékű funkcionális genomikai szűrés során megfigyelt abnormalis háti záródás- fenokópiák penetranciája. A piros vonal a 30%-os penetrancia-határt jelzi.

II. Az azonosított gének torzáródásban betöltött szerepének vizsgálatára alkalmas törzsek előállítása

A kísérletsorozat második lépéseként meg kívánjuk vizsgálni, hogy az azonosított gének konzerváltak-e a hámszáródási folyamatok között. Ehhez egy másik záródási folyamatban, a torzáródás alatt fogjuk ezeket a géneket csendesíteni. A dsRNS-t transzgenről szövetspecifikusan a Gal4/UAS bináris expressziós rendszer segítségével fogjuk kifejezni. A kiválasztott gének dsRNS-eit a háti középvonalra specifikus pnr-GAL4 vonal felhasználásával fogjuk kifejeztetni. Mivel a transzgenről a Gal4/UAS expressziós rendszerrel történő géncsendesítés hatékonyságát a dicer-2 gén jelenléte fokozza, létrehoztuk a pnr-GAL4; UAS-dicer-2 rekombináns törzset. Ennek a törzsnek a használatával a felnőtt állatokban egyszerű keresztezések után nagyon gyorsan és könnyen meg tudjuk vizsgálni az azonosított gének szerepét a torzáródásban. Előállítottuk továbbá a pnr-GAL4; UAS-dicer-2, UAS-moe:cherry transzgenikus törzset is, ami a háti középvonal sejtjeiben az aktív moesin markerfehérjéhez kapcsolt fluoreszcens cherry fehérjét és a dicer-2-t fejezi ki. Ez a törzs a csendesített gének részletes sejtbiológiai vizsgálatában használható. Az indukálható dsRNS konstruktokat hordozó transzgenikus állatok hozzáférhetőek a bécsi törzsközpontban, ahol a pályázat írása óta elkészült az indukálható dsRNS konstruktok második, javított generációja. Ezekben az állatokban a dsRNS-ek a genomnak azonos pontjáról íródik át, kiküszöbölve ezáltal a transzgenek véletlenszerű genomba épüléséből adódó kifejeződési különbségeket. A géncsendesítést már ezekkel a javított dsRNS vonalakkal fogjuk elvégezni. A kísérletnek ebben a részében kb. 30 gén vizsgálatát tervezzük, ami megközelítőleg egy hónapot fog még igénybe venni.

III. A sebzáródási esszé optimalizálása

Azokat a géneket, amelyek az embrionális háti záródáshoz és a torzáródáshoz is szükségesek, sebzáródási esszében vizsgáljuk tovább. Ehhez sikeresen optimalizáltuk a sebzés

körülményeit az intézetünkben elérhető XYclone Laser rendszerrel vad típusú embriókon. A rendszer diódával 300mW teljesítményű, 1480 nm-es infravörös lézerfényt bocsát ki, ami az embrió körülhatárolt, kis részén a sejteket pillanatszerűen elpusztítja. Az optimalizált eljárással rutinszerűen tudunk 14. stádiumú embriókon 30µm sugarú reprodukálható sebeket ejteni. A kísérlet során kb. 10 gén dsRNS-ét fogjuk bejuttatni az embriókba, és figyelni a sebzáródásra gyakorolt hatásukat. A kísérlet várható ideje egy hónap.

IV Összegzés

A pályázat eredményeként kifejlesztettünk és sikeresen működtettünk egy nagyléptékű *in vivo* videó-mikroszkópiával kombinált funkcionális genomikai szűrési eljárást. Az alkalmazott módszerrel számos eddig ismeretlen gén szerepét bizonyítottuk az embrionális háti záródásban. A projekt leginkább munka- és időigényes részét sikerült így eredményesen lezárni. Beállítottuk és előkészítettük ezen túl az azonosított gének további funkcionális vizsgálatához szükséges eszközöket. A kísérleti terv eddig el nem végzett részeinek befejezése még két hónapig tart, amihez a szükséges anyagi forrást a Genetikai Intézettől megkapom. Így a kísérleti terv maradéktalanul meg fog valósulni.

A végrehajtott projekt egy hosszútávú kutatássorozatot alapozott meg, az eredményeként azonosított gének sebzáródásban játszott szerepének funkcionális *in vivo* elemzése egy új kutatócsoportnak évekre előre elegendő feladatot jelent majd. A pályázat sikeresen elindított a laborszervezés útján. Kialakítottunk egy muslica fejlődési folyamatainak genomszintű vizsgálatára alkalmas facilitást, és - ami talán ennél is fontosabb - létrejött egy lelkes fiatalokból álló csoport, akik hatékonyan képesek üzemeltetni azt. Az előttünk álló feladat a jövőben a mutáns hámsejtek nagy felbontású sejtbiológiai elemzésével az azonosított gének pontos hatásmechanizmusának megismerése lesz.

A projekt során kidolgozott funkcionális genomikai módszerről és a háti záródásban szerepet játszó, újonnan azonosított génekről egy összefoglaló cikk elkészítése folyamatban van. Ezután a gének egyenkénti aprólékos sejtbiológiai elemzésével további, részletező jellegű cikkeket fogunk megjelentetni.