

# ***A *Caenorhabditis elegans* anterior *Hox* gén *ceh-13* szerepe a sejtmigráció és sejtfúzió szabályozásában***

Doktori értekezés

**Tihanyi Borbála**



Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar  
Biológia Doktori Iskola  
Klasszikus és Molekuláris Genetika Doktori Program

A Doktori Iskola vezetője: dr. Erdei Anna akadémikus  
Programvezető: dr. Orosz László akadémikus  
Témavezető: dr. Vellai Tibor docens

Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar  
Genetikai Tanszék

Budapest  
2010

# Tartalomjegyzék

## Rövidítések jegyzéke

1. Bevezetés.....	7
1.1. A <i>Hox</i> gének szerepe az egyedfejlődésben.....	7
1.1.1. A homeotikus szelektor gének felfedezése.....	7
1.1.2. A <i>Hox</i> gének egyedfejlődés során betöltött funkciói, genomi szerveződése és evolúciós jelentőségük.....	8
1.1.3. A kolinearitás elve a <i>Hox</i> kluszterek működésében.....	12
1.1.4. A <i>Hox</i> gének orvosi biológiai jelentősége.....	15
1.2. A fonálféreg <i>Caenorhabditis elegans</i> , mint genetikai modellrendszer.....	16
1.2.1. A <i>C. elegans Hox</i> klusztter szerkezeti és működési sajátosságai.....	18
1.2.1.1. Esszenciális <i>C. elegans Hox</i> gének.....	21
1.2.1.2. Nem-esszenciális <i>C. elegans Hox</i> gének.....	22
1.3. A középső homológ <i>Hox</i> gének szerepe a <i>C. elegans</i> a posztembrionális fejlődésben.....	22
1.3.1. Neuroblaszt migráció.....	23
1.3.2. Sejtfúzió.....	26
1.3.3. Vulvafejlődés.....	28
2. Célkitűzések.....	31
2.1. A <i>C. elegans Hox</i> mutáns fenotípusok és <i>Hox</i> expressziós mintázatok összehasonlító elemzése.....	31
2.2. A <i>ceh-13</i> , <i>lin-39</i> és <i>mab-5</i> genetikai kölcsönhatásainak tanulmányozása.....	31
2.3. A <i>ceh-13</i> anterior <i>Hox</i> gén funkciójának vizsgálata a sejt vándorlás és sejt fúzió szabályozásában.....	32
2.4. A <i>C. elegans Hox</i> gének rokonságának vizsgálata bioinformatikai módszerekkel.....	33
2.5. A <i>C. elegans</i> szex-determinációs útvonal szerepe a vulvafejlődésben.....	34
3. Anyagok és módszerek.....	35
3.1. Használt törzsek geno- és fenotípusa.....	35
3.2. Törzsfenntartás és keresztezés.....	38
3.3. Mikroszkópos vizsgálatok.....	38
3.3.1. A Q leszármazott idegsejtek pozíciójának meghatározása.....	38
3.3.2. A Pn.p epidermális sejtek sorsának vizsgálata.....	39

3.4. Fenotípus elemzés, mutáns menekítési vizsgálatok.....	39
3.5. Transzgenikus törzsek létrehozása.....	39
3.6. RNS interferencia.....	40
3.7. Statisztikai módszerek.....	41
3.7.1. A Q leszármazott idegsejtek pozíció-változásainak vizsgálata.....	41
3.7.2. Vulva fenotípusok elemzése.....	41
3.8. Filogenetikai elemzés.....	42
4. Eredmények.....	43
4.1. A <i>C. elegans Hox</i> mutáns fenotípusok és <i>Hox</i> expressziós mintázatok összehasonlító elemzése.....	43
4.1.1. A <i>ceh-13</i> gén <i>ok737</i> alléljának jellemzése.....	43
4.1.2. A pleiotróp <i>Ceh-13(-)</i> fenotípus elemzése és összevetése más <i>C. elegans Hox</i> mutáns fenotípusokkal.....	45
4.1.3. A <i>C. elegans Hox</i> gének embrionális és lárvális expressziójának összehasonlítása.....	48
4.2. A <i>ceh-13</i> , <i>lin-39</i> és <i>mab-5</i> gének közötti genetikai kölcsönhatások vizsgálata.....	52
4.2.1. A <i>ceh-13(-)lin-39(-)</i> és <i>ceh-13(-)mab-5(-)</i> kettős mutánsok szintetikus fenotípusa.....	52
4.2.2. A <i>ceh-13(-)</i> mutánsok életképessége és morfológiai abnormalitása szupresszálnható hiperaktív <i>lin-39</i> és <i>mab-5</i> funkciókkal.....	55
4.3. A <i>ceh-13</i> szerepe <i>lin-39</i> és <i>mab-5</i> által szabályozott posztembrionális egyedfejlődési folyamatokban.....	59
4.3.1. A Q leszármazott idegsejtek pozíciója <i>ceh-13(-)</i> mutánsokban.....	60
4.3.2. A Pn.p epidermális sejtek fúziója <i>ceh-13(-)</i> mutánsokban.....	66
4.3.3. <i>ceh-13(-)</i> mutánsokban megfigyelhető vulvafejlődési rendellenességek.....	72
4.4. A <i>C. elegans Hox</i> gének szekvenciális hasonlóságának tanulmányozása bioinformatikai módszerekkel.....	76
4.5. A <i>tra-1</i> csökkent, illetve fokozott működésének a vulvaszámra gyakorolt hatása <i>synMuv</i> mutáns genetikai háttérben.....	79
5. Következtetések.....	82
5.1. A <i>Ceh-13(-)</i> fenotípus és <i>ceh-13</i> expresszió jellemzése.....	82
5.1.1. A <i>ceh-13</i> a középső és hátulsó testtájak morfogenezisét egyaránt befolyásolja.....	82

5.1.2.	A <i>ceh-13</i> expressziója átfed a <i>lin-39</i> és <i>mab-5</i> expressziós doménjával.....	83
5.2.	A <i>ceh-13</i> interakciója a <i>lin-39</i> és <i>mab-5</i> génekkel.....	83
5.2.1.	A <i>ceh-13</i> , <i>lin-39</i> és <i>mab-5 Hox</i> gének redundáns szerepe az embrionális fejlődés során.....	84
5.2.2.	A LIN-39 és MAB-5 HOX fehérjék képesek helyettesíteni a CEH-13 funkcióját az életképesség és morfogenezis szabályozásában.....	85
5.3.	A <i>ceh-13</i> funkciója a posztembrionális egyedfejlődésben.....	86
5.3.1.	A <i>ceh-13</i> szabályozza a Q leszármazott idegsejtek migrációját.....	86
5.3.2.	A <i>ceh-13</i> szabályozza a Pn.p sejtek fúzióját.....	88
5.3.3.	A <i>ceh-13</i> befolyásolja a vulva fejlődését.....	91
5.4.	A <i>ceh-13</i> legközelebbi paralógjai a <i>lin-39</i> és a <i>mab-5</i> .....	92
5.5.	A <i>C. elegans Hox</i> kluszter korai evolúciója.....	92
5.6.	A <i>tra-1</i> feltehetően egy <i>synMuv B</i> gén.....	95
6.	Összefoglalás.....	96
7.	Summary.....	97
8.	Irodalomjegyzék.....	98
9.	Köszönetnyilvánítás.....	109



## Rövidítések jegyzéke

<i>AbdB</i>	<i>AbdominalB</i> gén(csoport)
ANTP	<i>Antennapedia</i> gén után nevezett homeobox génosztály
<i>ceh</i>	<i>C. elegans</i> homeobox gén
DNS	deoxiribonukleinsav
Dpy	<i>dumpy</i> (tömzsi testalkat)
dsRNS	double stranded (dupla szálú) RNS
EGHbox	<i>En (engrailed) / Gbx (gastrulation brain homeobox) / Mnx(motor neuron restricted)</i> géneket tartalmazó homeobox géncsalád
<i>egl</i>	<i>egg laying defective</i> (embrió lerakás képtelen) fenotípust okozó gén
EMS	etil-metán-szulfonát
<i>exd</i>	<i>extradenticle</i> gén
<i>fem</i>	<i>feminization</i> (a szómát feminizáló) gén
<i>gf</i>	<i>gain of function</i> (funkciónyeréses mutáció vagy allél)
GFP	green fluorescens protein (zöld fluoreszkáló fehérje)
<i>her</i>	hermaphrodization (az XO állatokat szomatikusan hermafroditákká alakító) gén
HM	<i>Hth</i> gének után nevezett homeodomain
<i>Hox</i>	homeoboxnak nevezett konzervált nukleotid-szekvenciárészletet tartalmazó (gének)
Hth	<i>homothorax</i> gén
<i>lab</i>	<i>labial</i> gén
lacZ	$\beta$ -galaktozidáz enzimet kódoló gén
<i>lf</i>	<i>loss of function</i> (funkcióvesztéses mutáció vagy allél)
<i>lin</i>	<i>lineage defective</i> (abnormális sejtvonala) fenotípust okozó gén
<i>mab</i>	<i>male abnormal</i> (hím páرزószerv abnormalitását) okozó gén
Mb	megabázis
<i>Meis</i>	<i>myeloid ecotropic viral integration site 1 homolog</i> (egér) gén
mRNS	messenger RNS
NGM	nematode growth medium (fonálférgék tenyésztésére szolgáló közeg)
NK	<i>Drosophila</i> NK1-4 génekről nevezett homeodomain
<i>nob</i>	<i>kNOB-like posterior</i> (no backside) gén
PBC	<i>Pbx</i> géncsaládról nevezett homeodomain

<i>pbx</i>	<i>pre-B cell leukemia homeobox</i> gén
PCR	polimerase chain reaction (polimeráz láncreakció)
<i>php</i>	<i>posterior Hox gene paralog</i> gén
<i>Prep</i>	<i>prolyl endopeptidase</i>
Ras	Rat Sarcoma (GTPase fehérjék mutációja okozza)
RNS	ribonukleinsav
RSNi	RNS interferencia
<i>synMuv</i>	synthetic Multivulva fenotípust kialakító gének
TALE	three amino acid loop extension (homeodomént kódoló konzervált szekvenciárészlet)
<i>tra</i>	<i>transformer</i> (szexuálisan átalakító) gén
<i>unc</i>	<i>uncoordinated</i> fenotípust okozó gén
VPC	vulval precursor cell (vulva elősejt)
Vul	vulvaless (vulva nélküli) fenotípus
Wnt	Wingless jelátviteli út vonal

# 1. Bevezetés

## 1.1. A *Hox* gének szerepe az egyedfejlődésben

### 1.1.1. A homeotikus szelektor gének felfedezése

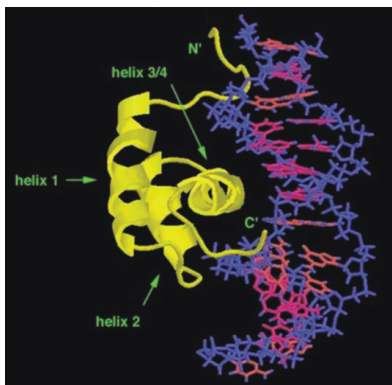
Az állati szervezetek testfelépítésében megnyilvánuló mintázatok sokfélesége lenyűgöző biológiai jelenség. A fejlődésbiológia egyik központi, ezidáig csak részben megválaszolt kérdése arra vonatkozik, hogyan alakulhat ki – a megtermékenyített petesejtekből - annyi egymástól eltérő felépítésű szervezet és milyen szabályozó mechanizmusok irányítják az alapvető fejlődési folyamatokat? Az elmúlt 50 év kutatásai rámutattak arra, hogy a különböző fajok egyedjeinek testszerveződésében megjelenő formák változatossága ellenére, az állatok egyedfejlődésének alapszabása nagymértékben konzervált módon szabályozódik. A kétoldali szimmetriával rendelkező állatfajok mindegyikében (az emberben is) lényegében azonos genetikai mechanizmusok felelősek az embrió hosszanti (anterior-poszterior) tengelyének a kialakításáért, illetve ennek mentén az egyes testtájak azonosságának meghatározásáért (McGinnis és Krumlauf 1992; Caroll, 1995). A XX. században különböző modellrendszeren végzett genetikai vizsgálatok számos olyan gén azonosítottak, amelyek mutációi drámai átrendeződéseket okoznak a testfelépítésben. Az 1940-es években a Thomas Morgan laboratóriumában dolgozó Edward B. Lewis izolált először olyan *Drosophila* mutánsokat, amelyekben az egyes szervek (pl. az antenna, láb, szárny) nem a megfelelő helyen vagy számban alakultak ki (**1. ábra**). Ezek a megfigyelések vezettek el az úgynevezett homeotikus szelektor (*Hox*) gének felfedezéséhez muslicában (Lewis, 1978). További kísérletek során sikerült azonosítani ilyen géneket – a *Drosophila Hox* gének ortológjait - mind alsóbbrendű (pl. csalánozók és férgek), mind magasabbrendű szerveződési szintet képviselő állattörzsekben (pl. gerincesek) is. Edward B. Lewis, Christiane Nüsslein-Volhard és Eric Wieschaus az egyedfejlődés genetikai szabályozásának kutatása terén elért eredményeikért orvosi Nobel-díjban részesültek 1995-ben.



**1. ábra. Homeotikus mutációk.** (a) Vad típusú *Drosophila* 3. torszelyvéből billérek fejlődnek. (b) A *Bithorax* génkomplexben bekövetkező mutációk némelyike a 3. torszelyvény sejtjeit a 2. szelvényre jellemző sejtekké transzformálja és az így kifejlődő mutáns egyednek 2 pár szárnya lesz (nyíl). (c) Az *Antennapedia* gén mutációjának hatására a mutáns állatok fején csápok helyett lábak fejlődnek (nyíl).

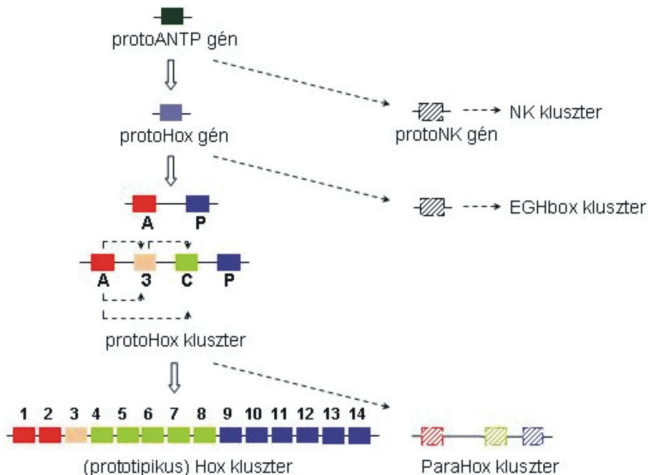
### 1.1.2. A *Hox* gének egyedfejlődés során betöltött funkciói, genomi szerveződése és evolúciós jelentőségük

A *Hox* gének az úgynevezett 'homeobox-gének' közé tartoznak. E géncsoport jellegzetessége, hogy valamennyi tagja rendelkezik egy konzervált 180 bázispár hosszú szekvenciárészlettel, amely egy 60 aminosavból álló 'homeodomén'-nek nevezett peptidet kódol (Scott és mtsi., 1989). A homeobox gének által kódolt 'homeodomén' fehérjék mindegyikében megtalálható ez a speciális *helix-turn-helix* térszerkezetű funkcionális egység, ami a szekvencia-specifikus DNS-kötésben játszik szerepet (**2. ábra**). A 'homeodomén'-t tartalmazó fehérjék általában transzkripciós faktorokként működnek, vagyis a génexpresszió szabályozásában játszanak szerepet (Levine és Hoey, 1988; Manak és Scott, 1994).



**2. ábra. A homeodomáin kapcsolódása a DNS-sel.** A *Hox* gének által kódolt fehérjék rendelkeznek egy speciális, *helix-turn-helix* szerkezetű, homeodoménnek nevezett funkcionális egységgel (a fehérje C-terminális végéhez közel), amely a DNS meghatározott szekvenciájú szakaszaihoz képes kötődni (helix 3/4). A képen a *Drosophila* ANTENNAPEIDIA HOX fehérje (sárga) és a kapcsolódó DNS részlet (a cukor-foszfát tengely kékkel, a bázisok pirossal vannak jelölve) sematikus rajza látható.

Leszármazás alapján a homeobox gének több nagy osztályba sorolhatók. Ezen belül a HOM-C / *Hox* gének az ANTP (az *Antennapedia* gén után elnevezett) génosztály egyik alcsoportját alkotják. (Az ANTP osztályba tartoznak továbbá az EGHbox, ParaHox és NK géncsaládok (Holland PW, 2001; Garcia-Fernandez, 2005). A homeotikus szelektor vagy *Hox* gének az állatok korai egyedfejlődése során töltenek be kulcsfontosságú szerepet a test hosszanti mintázatának kialakításában és a különböző testtájak azonosságának meghatározásában. Az egyes *Hox* gének a fejlődő embrió testének különböző részein, rájuk jellemző egyedi mintázatot mutatva expresszálódnak és működésük eredményeként az ott található sejteknek/sejtcsoportoknak egyedi sorsot biztosítanak. A *Hox* gének egyik érdekes jellemzője, hogy a genomban csoportokba rendeződve (ún. kluszterekben) helyezkednek el. Ez a kluszteres szerveződés az ANTP osztályba tartozó más géncsaládok tagjaira is jellemző. A *Hox* kluszterben az egymást követő gének szekvenciájának nagyfokú hasonlósága arra enged következtetni, hogy a kluszter egy ősi „*ProtoHox*-szerű gén” sorozatos tandem duplikációjának eredményeként jöhetett létre (3. ábra) (Lewis, 1951, Garcia-Fernandez, 2005).

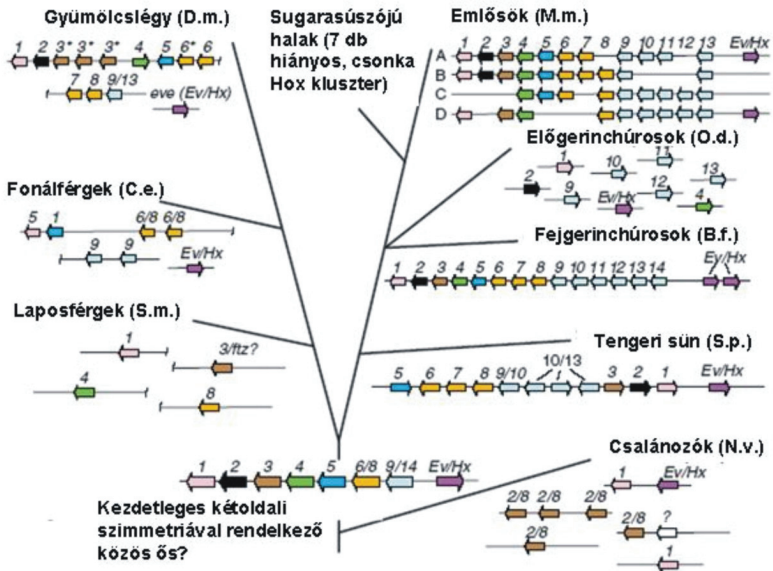


**3. ábra. A *Hox* kluszterek korai evolúciója.** A jelenlegi model szerint az ANTP kluszter egy ősi homeobox *ProtoANTP* génből származtatható. Az állatvilág evolúciójának korai fázisában a *ProtoANTP* gén megkettőződése eredményezte az ősi *ProtoHox* és *ProtoNK* gének létrejöttét. Ezt követően tandem duplikációk sorozata vezetett el az NK és a *Hox*-szerű kluszterek kialakulásához. A *protoHox* kluszter kialakulása során a „3” és a „C” gének (a középső *Hox* homológ csoportok ősei) feltehetően az anterior homológ („A”) ősgénből származtathatók. Az „A” az anterior, a „C” a centrális, a „P” a poszterior *Hox* paralóg csoportok őseit jelöli. Az ábra alján felvázolt prototipikus *Hox* kluszter jeleníti meg azt a génekompóziót, amellyel a feltételezések szerint az 6- és újszajúak utolsó közös őse rendelkezhetett.

Az állattörzsek közötti összehasonlító elemzések 14 kanonikus *Hox* homológ csoportot azonosítottak, amelyeknek a képviselői eltérő feladatok ellátására specializálódtak az evolúció során (de Rosa és mtsi., 1999). Mindemellett számos esetben figyelhető meg redundáns működés a különböző – jellemzően az egymással szomszédos - *Hox* paralógok között.

A *Hox* kluszteren belül a gének sorrendje megegyezik a különböző taxonokban. Ennek a konzervált génsorrendnek a funkcionális jelentősége, valamint a kluszteres szerveződés fennmaradása az evolúció során egyelőre számos nyitott kérdést hagy maga után.

A homeotikus szelektor gének homológ kluszterei minden kétoldali szimmetriájú többsejtű állattörzsben megtalálhatóak és többé-kevésbé azonos funkciót töltenek be az egyedfejlődés során (Graham és mtsi., 1989; Duboule és Dollé, 1989). Ez a megfigyelés azt a feltételezést támasztja alá, hogy a vizsgált taxonok azonos őstől származhattak az evolúció során. A különböző állattörzsekbe tartozó fajok eltérő számú és szervezettségű *Hox* kluszterrel rendelkeznek. Az egyszerűbb testfelépítésű állattörzsek képviselőinél (pl. csalánozók, laposférgek és hengeresférgek) a genomban egy, gyakran redukált, kevés génből álló, szétesett szerkezetű *Hox* kluszter található (Seo és mtsi., 2004; Ikuta és mtsi., 2004; Cameron és mtsi., 2006). Ezzel szemben a magasabbrendű, bonyolultabb szerveződési szintet képviselő taxonok (fejgerinchúrosok és gerincesek) komplex (sok génből álló) *Hox* kluszterrel rendelkeznek. A gerincesek különböző osztályaiban a *Hox* kluszter több (4-7 darab) kópiája is megtalálható, amelyek részben átfedő (redundáns) funkciót látnak el (**4. ábra**) (Maconochie és mtsi., 1996; Hurley és mtsi., 2005).



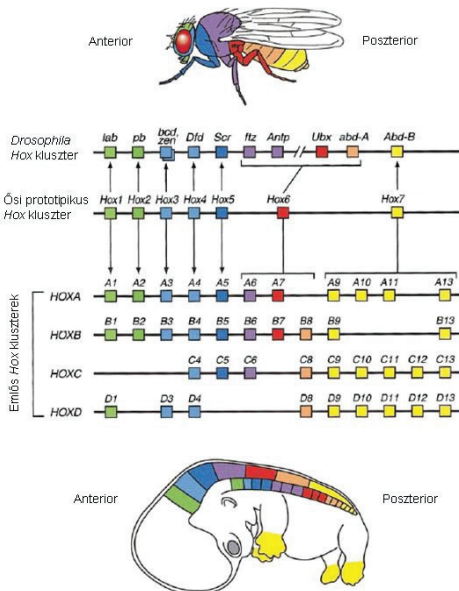
4. ábra. A testüreggel rendelkező állattörzsek *Hox* klusztereinek evolúciós kapcsolata. A kladogram néhány reprezentatív faj *Hox* géneinek kromoszomális helyzetét és elrendeződését ábrázolja. Az állatvilág törzsfeljedése során a kétoldali szimmetriával rendelkező taxonok eltérő módon és mértékben őrizték meg a feltételezhető közös őstől (6- és újszájúak utolsó közös őse) leszármazott prototipikus *Hox* klusztert. A kluszterek száma, mérete és szervezetsége feltételezhetően összefügg az adott törzs fejlettségi állapotával (Lemons és McGinnis, 2006 nyomán).

Lewis óta számos elmélet látott napvilágot arra vonatkozólag, hogy a *Hox* gének minőségi és mennyiségi változásai (gének elvesztése, újak keletkezése, a klusztter megtöbbszöröződése vagy szétदारabolódása, a génsorrend megváltozása) milyen mértékben függtek össze új formák létrejöttével. A különböző taxonokban megfigyelhető *Hox* gén kompozíció és klusztter szerkezet, valamint az adott taxon fejlettségi szintje közötti összefüggés arra utal, hogy a *Hox* klusztter evolúciója valóban szerepet játszott az új szerveződési formák megjelenésében (Burke és mtsi., 1995; Carroll, 2001; Gaunt, 1994). A *Hox* gének számának növekedése, valamint szerkezeti és funkcionális diverzifikációjuk egyre változatosabb és komplexebb szervezetek kialakulásához vezetett a törzsfeljedés során. Gerincesekben a *Hox* klusztter megsokszorozódása további alapot biztosított a fejlődéshez az evolúció során.

Feltehetően részben ezzel magyarázható a gerinces osztályok - különösen az emlősök - gyors adaptív szétterjedése.

### 1.1.3. A kolinearitás elve a *Hox* kluszterek működésében

A *Hox* kluszterek működésének jellegzetes vonása a *kolinearitás*, azaz a homológ gének kluszterben való elhelyezkedése (fizikai sorrendje), valamint expressziós és funkcionális doménjaik - pontosabban a domének anterior határai - közötti összefüggés (McGinnis és Krumlauf, 1992; Imura és Pourquie, 2007). Ennek alapján a *Hox* kluszter 3' végén található gének elsőként és a test elülső részében expresszálódnak az egyedfejlődés egy korai szakaszában (az elülső testtájak azonosságának meghatározásában játszanak szerepet), míg a kluszter 5' végén lévő gének működése időben később és a test hátulsó részében nyilvánul meg (5. ábra).



5. ábra. A kolinearitási elv *Drosophila*-ban és emlősökben. A *Hox* kluszter 3' végén elhelyezkedő gének az elülső, az 5' végén található gének a hátulsó testrészekben expresszálódnak a kromoszómán elfoglalt pozíciójuknak megfelelő sorrendben. A testtájuk megfelelő színei az azonos színnel jelölt *Hox* gének expressziós/funkcionális doménját jelölik. Felül a *Drosophila* *Hox* kluszter, középen az ősi *Hox* kluszter, alul az emlősök 4 *Hox* klusztere látható (emlősökben a *Hox* kluszter sorozatos duplikációja 4 kópiát – *HOXA*, *HOXB*, *HOXC*, *HOXD* - eredményezett, amelyek részben redundáns funkciót látnak el). A különböző *Hox* ortológok azonos színnel vannak jelölve (Veraksa és mtsi., 2000 nyomán).



A *Hox* gének expressziós mintázata nagyfokú hasonlóságot és konzerváltságot mutat a különböző állattörzsekben. Érdekes módon a *Hox* gének expresszióját megelőző korai embrionális fejlődés során a különböző taxonok változatos stratégiákat használnak az axiális aszimmetria kialakításához és az embrionális tengelyek meghatározásához. *Xenopus* embrióknál például kortikális rotáció, míg egerekben sejt-sejt interakciók sorozata eredményezi az axiális aszimmetria létrejöttét (Scott, 2000). A gyümölcslégy *Drosophila melanogaster* esetében az embrió elsődleges mintázatának kialakulása a soksejtmagvú syncytium állapotában történik meg, meghatározott fehérjegrádiensek mentén és hatására (Akam, 1987; Lawrence, 1992; Lawrence és Morata, 1994; Perrimon, 1994). Ezzel szemben a szöcskék és egyes bogarak (pl. *Tribolium* fajok) fejlődése során a testszegmentek egyenként, sorban keletkeznek egy poszterior növekedési központ irányításával (Nardelli-Haeffliger és mtsi., 1994; Hughes és Kaufman, 2002). A fonálféreg *Caenorhabditis elegans*-ban a zigóta aszimmetrikusan osztódik, amely különböző fejlődési potenciállal rendelkező utódsejtek létrejöttét eredményezi. A további sejtosztódások és az utódsejtek sorsa alapvetően sejt-sejt interakciók által meghatározott. A *Hox* expresszió iniciációjának módját, illetve az azt előkészítő egyedfejlődési folyamatokat jellemző változatosság ellenére a morfogenezis kezdetekor a fajok többségében megjelennek a konzervált „*Hox* szivárványok” a fejlődő embriók hossz tengelye mentén (Slack és mtsi., 1993).

Egyes állattörzsekben az egyedfejlődés során a térbeli kolinearitás mellé időbeli kolinearitás is társul az egymást követő paralógok aktiválódását illetően (Izpisua-Belmonte és mtsi., 1991; Duboule, 1994; Kmita és Duboule, 2003). Az alacsonyabb szerveződési szinteket képviselő taxonokban (pl. férgek, előgerinchúrosok, tüskésbőrűek) előfordulhatnak kivételek, ahol a homológ csoportok másodlagos elvesztése vagy a *Hox* kluszter szét darabolódása következtében a kolinearitás jelensége kevésbé figyelhető meg. A *Hox* gének expressziójára és funkciójára azonban az említett példák esetében is erős szövetspecifititás jellemző (Kmita és Duboule, 2003; Deschamps és van Nes, 2005). A *C. elegans* *Hox* rendszere szintén számos egyedi vonást hordoz. Ebben az állatban az egyedfejlődés során a sejtszarmazás invariáns, és a *Hox* gének expressziója és működése jellegzetesen sejtvonalakhoz, mintsem testtájakhoz kapcsolt (Streit és mtsi., 2002). (A *C. elegans* *Hox* rendszer további sajátosságait részletesen az 1.3. alfejezetben tárgyalom.)

A *Hox* kluszteren belül az egymást követő paralógok között hierarchikus szabályozási rend figyelhető meg: adott gének mesterséges úton történő hiperaktiválása (overexpressziója) során a poszterior gének elnyomják a tőlük anterior irányban elhelyezkedő gének aktivitását (Duboule és Morata, 1994). Természetes körülmények között azonban a különböző gének együttműködése a *Hox* rendszer normális működésének fontos részét képezi. Azon sejtek és

szövetek esetében, ahol a szomszédos *Hox* paralógok expressziós és funkcionális doménjai átfednek, a termelő HOX fehérjék mennyiségi és minőségi kombinációi lehetőséget nyújtanak pontosabb, kifinomultabb pozicionális információ kódolására (Kessel és Gruss, 1991; Clark és mtsi., 1993; Salser és mtsi., 1993; Castelli-Gair és Akam, 1995; Bienz és Hart, 1996; Duncan, 1996).

A szabályozás további szintjét képviselik az úgynevezett HOX ko-faktor fehérjék, amelyek a HOX fehérjékkel együttműködve fontos szerepet játszanak azok transzkripciót szabályozó tevékenységében. Szekvenciális és strukturális hasonlóságuk eredményeként - különös tekintettel a konzervált, DNS-kötő homeodomén-ra - a HOX transzkripció faktorok csaknem azonos és nagy affinitással kötődnek relatíve rövid, degenerált DNS-kötő konszenzus szekvenciákhoz, amelyek a genomban viszonylag gyakran fordulnak elő (Ekker és mtsi., 1994; Hoey és Levine, 1988; Mann, 1995). E tulajdonságukból következően a HOX fehérjékre jellemző a hasonló DNS kötőhelyekért való versengés, egymás potenciális helyettesítése vagy kiszorítása. Paradox módon azonban a HOX faktorok *in vivo* eltérő biológiai funkciókat látnak el. Ennek a látszólagos ellentmondásnak egyik lehetséges magyarázata lehet az, hogy a különböző *Hox* gének termékei részben azonos célgének - genetikai útvonalak - transzkripcionális szabályozásában vesznek részt, és HOX ko-faktorok segítségével tudják egyedi módon aktiválni, illetve gátolni azokat. Ezáltal a *Hox* gének ugyanazoknak az alapvető sejtlejtani folyamatoknak a szabályozásán keresztül képesek egymástól eltérő testtáj kialakítására. Ilyen folyamatok pl. a sejtosztódás sebessége és polaritása, sejtalak és sejt növekedés, sejtadhézió, sejt vándorlás, sejt differenciáció és a programozott sejt halál (Garcia-Bellido, 1975; Postlethwait, 1978; Lawrence, 1992; Castelli-Gair és mtsi., 1994; Liu és mtsi., 2005).

A HOX ko-faktorok jelentősége a HOX aktivitás specificitásának biztosításában rejlik (Mann, 1995; Wilson és Desplan, 1995). A legismertebb HOX ko-faktorok a TALE atipikus homeodoménnal rendelkező fehérjecsaldába tartozó tagok (Bürglin, 1997; Bürglin, 1998). A családba való sorolás alapját a fehérjék N-terminális részének - amely feltehetően részt vesz a fehérje kölcsönhatásokban - hasonlósága képezi (Bürglin, 1997; Abu-Shaar és mtsi., 1999). A PBC interakciós domént tartalmazó *Drosophila* EXD / humán PBX kofaktor fehérjék főleg az anterior és középső *Hox* homológ csoportokba tartozó gének (*Ubx*, *AbdA* / *Hox1-10*) által kódolt fehérjékkel kapcsolódnak és azok specifikus DNS-kötésében játszanak szerepet (Mann és Affolter, 1998; Mann és Chan, 1996; Chan és mtsi., 1994; van Dijk és Murre, 1994; Pöpperl és mtsi., 1995; Shen és mtsi., 1997b; Liu és mtsi., 2005). A HM interakciós doménnal rendelkező *Drosophila* HTH / humán MEIS és PREP fehérjék a vizsgált esetek többségében poszterior

HOX transzkripció faktorokkal (AbdB / HOX11-13) képeznek komplexet és azok specifikus működését segítik elő. Előfordulnak azonban LAB/HOXB1 fehérjékkel képzett funkcionális komplexekben is (Mann és Affolter, 1998; Shen és mtsi., 1997b; Jacobs és mtsi., 1999). Különböző modellszervezeteken (pl. *Drosophila* és gerincesek) végzett vizsgálatok kimutatták, hogy a PBC és MEIS családba tartozó kofaktor fehérjék egymással is kölcsönhatnak (Pai és mtsi., 1998; Ryoo és mtsi., 1999; Rieckhof és mtsi., 1997; Abu-Shaar és mtsi., 1999; Affolter és mtsi., 1999; Berthelsen és mtsi., 1999). Gyakran trimer komplexek képződése is megfigyelhető az *Exd/Pbx*, *Hth/Meis*, *Prep* és *Hox* gének termékei között (Berthelsen és mtsi., 1998; Ryoo és mtsi., 1999; Jacobs és mtsi., 1999; Ferretti és mtsi., 2000; Ebner és mtsi., 2005).

A *Hox* működés szabályozásának különböző taxonokban megfigyelhető konzerváltsága arra utal, hogy a homeobox gének szekvencia konzervációja mellett az általuk kódolt homeodomén fehérjék regulációs és interakciós hálózatának a működése is kiemelt evolúciós jelentőséggel bír. A *Hox* gének expressziós mintázatában (gének aktiválódásának helye, ideje és szintje), valamint a HOX fehérjék egymással és célgénjeikkel történő kölcsönhatásaiban bekövetkező változások szintén hozzájárulhattak az új formák megjelenéséhez az állatvilág fejlődése során (Botas, 1993; Caroll, 1995; Raff, 1996).

#### **1.1.4. A *Hox* gének orvosiológiai jelentősége**

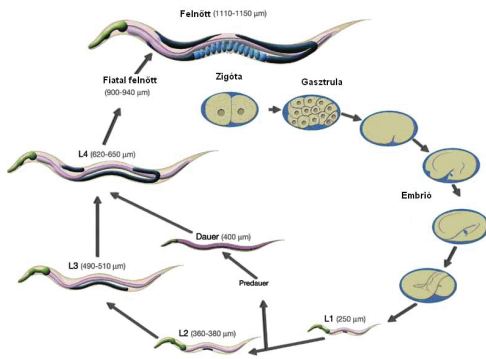
A *Hox* gének és kofaktoraik kulcsfontosságú szerepet töltenek be a korai egyedfejlődés során. E különleges helyzetükből adódóan a *Hox* gének hibás működése súlyos fejlődési rendellenességek kialakulásához vezethet, vagy akár a fejlődő embrió életképtelenségét is okozhatja. A *Hox* gének funkciója nélkülözhetetlen a váz- és izomrendszer vagy a különböző szervek normális kifejlődéséhez, illetve a vérképző rendszer normális működéséhez (Argiropoulos és Humphries, 2002; Vieille-Grosjean és mtsi., 2008). Emberben a felnőtt korban jelentkező rákos megbetegedések során is számos esetben kimutatható a *Hox* gének kóros aktiválódása (pl. Shears és mtsi., 1993; Plowright és mtsi., 2008; Segara és mtsi., 2009; Ono és mtsi., 2009). A HOX kofaktorok szintén fontos szerepet játszanak bizonyos szervek és szövetek normális fejlődésének és működésének biztosításában (Murphy és mtsi., 2009; Selleri, 2009).

Az egyedfejlődésben betöltött jelentőségük alapján a *Hox* gének az orvosiológiai kutatások fontos célpontjai. Az emberi embrionális fejlődés közvetlen vizsgálatának lehetőségei azonban sok szempontból korlátozottak (csupán eseti megfigyelésekből lehet következtetéseket levonni). Humán kutatók számára ezért nagy jelentőséggel bír az a tény, hogy az egyedfejlődés

genetikai szabályozása nagyfokú konzerváltságot mutat a különböző állattörzsek és az ember között. Ennek köszönhetően a morfogenezis egyszerűbb testfelépítésű modellszervezetekben történő vizsgálata fontos új információkkal szolgálhat az orvostudomány számára is. A fejlődési rendellenességek okainak és molekuláris hátterének megértéséhez jelentős mértékben járultak hozzá az állatkísérletekből származó eredmények és ismeretek. Doktori munkám során a fonálféreg *Caenorhabditis elegans*-t használtam modellszervezetként az anterior és középső homológ *Hox* gének sejt-vándorlás és sejt-fúzió szabályozásában betöltött szerepének, illetve az említett gének genetikai kölcsönhatásainak tanulmányozására.

## 1.2. A fonálféreg *Caenorhabditis elegans*, mint genetikai modellrendszer

A *Caenorhabditis elegans* egy szabadon élő, baktériumokkal táplálkozó, kifejlett állapotban 1,1-1,2 mm hosszúságú fonálféreg faj. Életciklusa viszonylag rövid, 25°C-on, normál körülmények között a vad típusú állatok kevesebb, mint 3 nap alatt fejlődnek ki négy lárvastádiumon (L1-L4) keresztül (6. ábra), majd átlagosan 2 hétig élnek. Nagy egyedsűrűség és tápanyagihiány mellett egy alternatív harmadik úgynevezett dauer lárvastádiumba alakulnak. Dauer lárvaként akár fél évig képesek túlélni.



6. ábra. A *C. elegans* fejlődésmenete.

Az embrióból 25°C-on folyamatos táplálékellátás mellett 40 óra alatt fejlődik ki az ivarérett felnőtt állat. Fejlődése 4 lárvastádiumon (L1-L4) keresztül megy végbe. Kedvezőtlen környezeti feltételek mellett egy alternatív L3 lárvastádiumba, az ún. dauer láva állapotba alakul. A dauer láva kedvező körülmények közé kerülve L4 láva állapotba képes alakulni, és innen folytatja a normális fejlődési pályát.

Laboratóriumi körülmények között a *C. elegans* törzsek műanyag Petri csészékbe öntött agarlemezekre, illetve folyadékkultúrában könnyen tenyészthetők. Az állatok -70 °C-on vagy folyékony nitrogénben korlátlan ideig eltarthatók. A *C. elegans*-t speciális ivari dimorfizmus

jellemzi; a populációt hím és hímnős egyedek alkotják (7. ábra). Az önmegtermékenyítő hímnős egyedek a tiszta genetikai vonalak fenntartását, a hímek a genetikai vonalak kombinálását teszik lehetővé. A hímek külső megtermékenyítése nélkül a hermaphroditák körülbelül 200-250 utódot hoznak létre.



7. ábra A *C. elegans ivari dimorfizmusa*. A természetes populációt többnyire hermaphroditák (fent) alkotják, a hímek (lent) csak 0,2%-ban fordulnak elő. A képen látható két felnőtt állat között 3 lerakott pete (kerek struktúrák) látható.

Az állat viszonylag egyszerű testfelépítésű, a kifejlett hermaphroditának 959, a hímnök 1031 testi sejtje van (Sulston és Horvitz, 1977). A sejtek egyedfejlődési leszármazása – egyedülként az eddig vizsgált élőlények között – invariáns. A féreg fénymikroszkópban áttetsző (transzparens) testfalának köszönhetően a sejtek sorsa könnyen nyomon követhető és meghatározható. A *C. elegans* teljes sejtleszármazási térképe megismert (Sulston és Horvitz, 1977).

A fent leírt tulajdonságai a *C. elegans*-t ideális kísérleti rendszerre teszik a genetikai kutatások számára. A *C. elegans*-ban rejlő lehetőségeket először Sydney Brenner ismerte fel és ő kezdte alkalmazni fejlődésgenetikai vizsgálatokhoz az 1970-as évek elején (Brenner, 1974). Kedvező tulajdonságainak köszönhetően a *C. elegans* azóta közkezdvelt modellállattá vált a genomikai, sejtbiológiai, idegrendszeri és öregedéskutatások terén is. A *C. elegans*-on végzett kutatásokat 2002-ben (Sydney Brenner, John Sulston és Robert H. Horvitz) és 2006-ban (Andrew Z. Fire és Craig C. Mello) orvosi Nobel-díjjal, míg 2008-ban (Marty Chalfie) kémiai Nobel-díjjal jutalmazták.

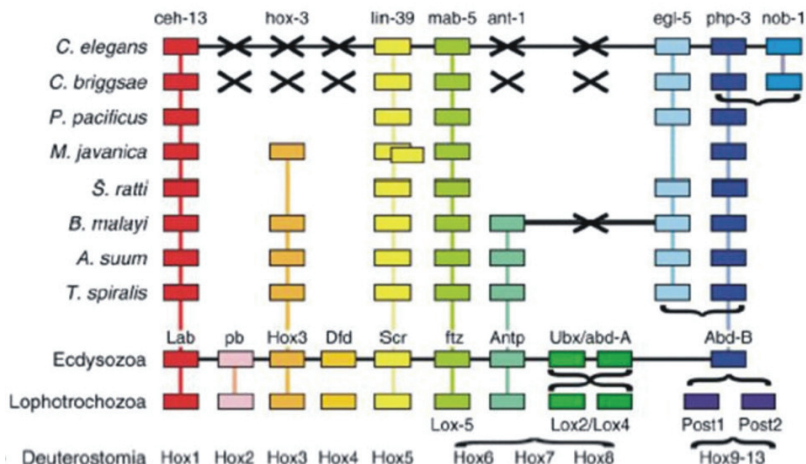
A *C. elegans* DNS állománya volt az első soksejtű genom, amelyet – a humán genom projekt előfutáraként – megszekvenáltak (Hodgkin és mtsi., 1998). Haploid genomja 5 testi, és 1 ivari kromoszómába szerveződve mintegy 100 Mb-ból áll, és körülbelül 19000 gént kódol. A féreg génjeinek legalább 50%-a szignifikáns szekvencia-hasonlóságot mutat emberi génekkel. A *C. elegans* genom különlegessége, hogy rendkívül kompakt szerveződésű, az egy génre jutó bázisszámot tekintve 30-szor tömörebb az emberi genomnál. Jellemzője az operonos szerkezet

(több gén közös szabályozó régióval rendelkezik), amely az eukarióták között csak a fonalférgekben ismert. Ezidáig közel 8000 *C. elegans* gén esetében izoláltak mutáns alléleket, illetve a jelenleg is futó ún. *gene knockout project* keretében további erőfeszítések folynak egy minden gént kiterjedő deléciós mutánsbank létrehozására. Laboratóriumi körülmények között mutáns *C. elegans* törzsek viszonylag könnyen állíthatók elő kémiai mutagének (pl. EMS - etil-metán-szulfonát – és psoralén), röntgensugárzás vagy transzpozonok (Tc1, Mos1) segítségével (Johansen és Baillie, 1988, Johansen és Baillie, 1997). Funkcionális (genetikai) vizsgálatokat mutáns allélek mellett RNS interferencia (RNSi - géncsendesítés) alkalmazásával is végeznek (Timmons és Fire, 1998; Conte és Mello, 2003). Az RNSi jelenségét duplaszálú RNS (dsRNS) váltja ki, amely a vele homológ szekvenciájú mRNS degradációjához vagy translációs gátlásához vezet. *C. elegans*-ban a módszer nagy hatékonysággal működik, valamint a hatás szisztematikus, tehát sejtről-sejtre terjed, és az utódokba is átjut (Fire és mtsi., 1998; Conte és Mello, 2003).

A *C. elegans* kutatások eredményeit internetes adatbázisok integrálják. A genetikai információk a WormBase portálon ([www.wormbase.org](http://www.wormbase.org)), az anatómiai adatbázis a Wormatlas-on ([www.wormatlas.org](http://www.wormatlas.org)), a féreggel kapcsolatos fejlődés- és sejtbiológiai ismeretek a Wormbook ([www.wormbook.org](http://www.wormbook.org)) honlapokon érhetők el. A nemzetközi törzsgyűjteményt a Minnesotai egyetemen tartják fenn (CGC: *Caenorhabditis Genetics Center*, <http://dbw.msi.umn.edu/cgcdb/search.php>).

### **1.2.1. A *C. elegans* Hox kluszter szerkezeti és működési sajátosságai**

A *Caenorhabditis elegans* egy viszonylag kis méretű, redukált, mindössze 6 db génből álló *Hox* kluszterrel rendelkezik. A fonalférgek törzsén belüli összehasonlító elemzések eredményei arra utalnak, hogy a törzs őse feltételezhetően rendelkezett az összajúak 9 kanonikus *Hox* paralógot tartalmazó *Hox* kluszterével (de Rosa és mtsi., 1999). A leszármazott taxonok további evolúciója során bizonyos *Hox* paralógok másodlagosan elvesztek (**8. ábra**) (Aboobaker és Blaxter, 2003). Ez a géntvesztés okozhatta például a testfelépítés specializálódását (egyszerűsödését), a sejtvonalspecifikus fejlődésre való áttérést, vagy *C. elegans* esetében a kétnemű szaporodás helyett a hermafroditizmus (hímnősség) megjelenését. Ezzel párhuzamosan néhány fonalférgek nemzetségében újabb *Hox* gének keletkezése is megfigyelhető.

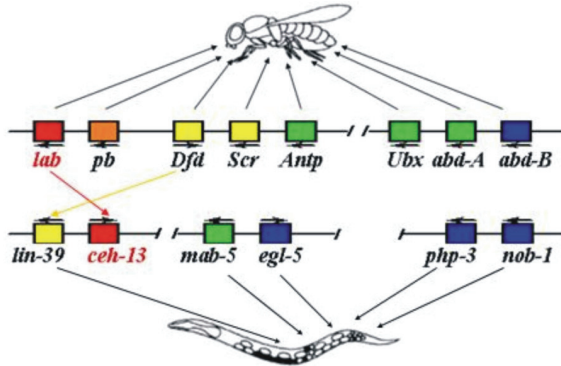


**8. ábra. A Hox klusztter evolúciója Nematodákban.** A fonálféreg törzsének evolúciója során a taxonok (az ábrán reprezentatív képviselőik) eltérő számban örítették meg a kanonikus Hox homológ csoportokat (azonos színnel jelölve a különböző fajokban). Összehasonlításként az újszájúak prototipikus Hox kluszttere (Hox1-13 kanonikus homológ csoportok) látható. A példaként kiragadott fonálféreg fajoknál másodlagos duplikációk figyelhetők meg egyes Hox paralógok esetében.

A *C. elegans* Hox gének: *ceh-13* (*C. elegans* homeobox), *lin-39* (lineage defective), *mab-5* (male abnormal), *egl-5* (egg laying defective), *nob-1* (no backside), *php-3* (posterior Hox gene paralog). Szekvencia hasonlóság és szekvencia illesztés alapján, a felsorolt gének 4 kanonikus homológ csoportot képviselnek: a *ceh-13* a *Drosophila labial*/humán *HoxB1*, a *lin-39* a *Deformed-Sex combs reduced/HoxB4-5*, a *mab-5* a középső *Antp-Abd-A/HoxB7* ortológjának tekinthető; az *egl-5*, *nob-1* és *php-3* gének pedig az *Abd-B/Hox9-13* poszterior homológ csoportok megfelelői *C. elegans*-ban (Kenyon, 1986; Schaller és mtsi., 1990; Bürglin és Ruvkun, 1993; Clark és mtsi., 1993; Wang és mtsi., 1993; Wittmann és mtsi., 1997; Brunswick és mtsi., 1999; Van Auken és mtsi., 2000). Az *egl-5* és *php-3* gének feltehetően Nematoda-specifikus duplikáció révén keletkeztek.

A *C. elegans* 6 Hox génje közül az első 4 valódi kluszttert alkot a III kromoszómán, míg a 2 poszterior Hox paralóg (*nob-1* és *php-3*) tőlük csaknem 1 Mbázis távolságra helyezkedik el, lazán kapcsolódva az első 4 taghoz (Ruvkun és Hobert, 1998; Van Auken és mtsi, 2000). A klusztter további strukturális sajátossága, hogy az anterior paralóg *ceh-13* és a klusztterben öt követő *lin-39* fizikai sorrendje - valószínűleg egy utólagos inverzió következtében -

felcserélődött a kromoszómán (9. ábra). Ez az egyedi elrendeződés érdekes kérdéseket vet fel a kolinearitási elv érvényesülését, valamint az érintett gének transzkripcionális szabályozását illetően, funkcionális következménye azonban egyelőre nem ismert.



**9. ábra.** A *Drosophila* és *C. elegans* Hox kluszterek szerkezete. A *C. elegans* 6 Hox génje laza klusztert alkot a III kromoszómán. A poszterior *php-3* és *nob-1* 1Mb távolságra helyezkedik el az első 4 tag alkotta köponti klusztertől. Az anterior ortológ *che-13* és a klusztterben őt követő középső homológ *lin-39* fizikai sorrendje egy inverzió következtében felcserélődött a kromoszómán (piros és sárga nyilak). Felül a *Drosophila*, alul a *C. elegans* Hox klusztter látható. A féreg és gyümölcslégy Hox ortológok azonos színekkel vannak jelölve. A fekete nyilak az adott Hox gének funkcionális doménjait jelölik.

A *C. elegans* Hox rendszer működésének jellegzetessége, hogy a Hox gének expressziója az esetek többségében nem a sejteknek a test hosszanti tengelye mentén való helyzetétől függ, hanem sejtvonalakhoz kötött (Cowing és Kenyon, 1996; Wittmann és mtsi., 1997). Ez a mechanizmus különbözik a gerincesekre vagy egyes rovaraxonokra jellemző pozíció-specifikus meghatározástól, ugyanakkor a homológ gének hasonló térbeli sávok expressziós mintázatát eredményezi – a kolinearitás szabályának megfelelően - az embrió hosszantengelye mentén, eltérően a más állattörzsekben megfigyeltektől. Ezalól az anterior ortológ *che-13* képez kivételt.

*C. elegans*-ban az embrionális fejlődés szempontjából csak az anterior homológ *che-13* és a poszterior homológ *nob-1* funkciója esszenciális (Brunschwig és mtsi., 1999; Van Auken és mtsi., 2000). Mind a *che-13*, mind a *nob-1* genetikai null mutációi súlyos morfológiai rendellenességekkel együttjáró embrionális vagy korai lárvális életképtelenséget eredményeznek. Ezzel szemben a Hox klusztter többi tagjának az inaktíválása nem okoz életképtelenséget: pl. *lin-39(-)mab-5(-)egl-5(-)* funkcióvesztéses hármast mutáns állatok is szaporodóképes felnőttekké tudnak fejlődni (Kenyon, 1997; Wrishnick és Kenyon, 1997). Ezen



*Hox* gének jellemzően a posztembrionális fejlődés során játszanak szerepet az egyes sejtek sorsának és a testtájak mintázatának meghatározásában (Kenyon és mtsi., 1997). Ennek a funkcionális mintázatnak a kialakulása egyelőre nem tisztázott. Egyes feltételezések szerint a középső homológ csoportokba tartozó *lin-39* és *mab-5* gének az evolúció során, másodlagosan specializálódtak bizonyos funkciók ellátására, míg ezzel párhuzamosan a *ceh-13* átvette az irányító szerepet az embrionális fejlődés során (Aboobaker és Blaxter, 2003).

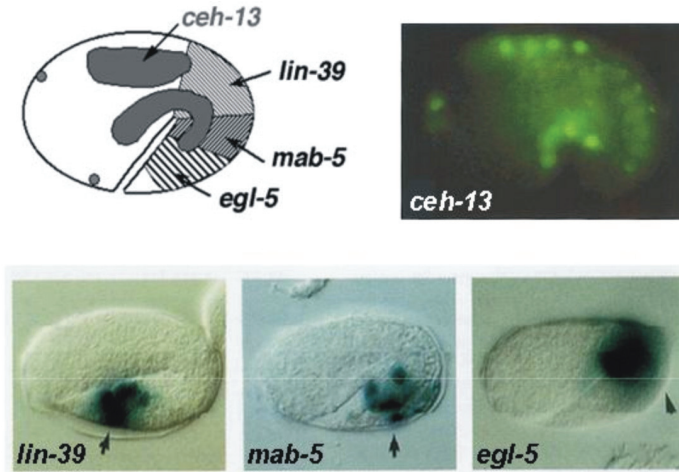
A *Hox* gének mellett a féregben is megtalálhatók a *Drosophila*-ban és gerincesekben azonosított HOX ko-faktorokat kódoló gének ortológjai is. Ezek a *ceh-20* és *ceh-40* (*Exd/Pbx* ortológok), illetve az *unc-62* (*Hth/Meis/Prep* ortológok), amelyek feltehetően – legalábbis részben – hasonló funkciót látnak el *C. elegans*-ban, mint más taxonokban leírt megfelelőik (Bürglin, 1992; Liu és Fire, 2000; Van Auken és mtsi., 2002). Működésüket az egymással, illetve a különböző homológ csoportokba tartozó *Hox* génekkel történő genetikai interakciók nagy száma jellemzi mind az embrionális, mind a posztembrionális fejlődési folyamatok szabályozása során (Streit és mtsi., 2002; Yang és mtsi., 2005; Takács-Vellai és mtsi., 2007; Jiang és Liu, 2009). A *ceh-20/ceh-40* vagy *unc-62* működés hiánya a *ceh-13*, illetve a *nob-1* null mutációk hatásához hasonló embrionális és lárvális életképtelenséget, valamint morfológiai rendellenességeket okoz (Streit és mtsi., 2002; Van Auken és mtsi., 2002). A *ceh-20* és *unc-62* funkcióvesztéses mutáns állatok részben *lin-39(-)* vagy *mab-5(-)* *Hox* mutánsokéhoz hasonló, részben azokétól eltérő fenotípusos jegyeket mutatnak (Liu és Fire, 2000; Yang és mtsi., 2005; Takács-Vellai és mtsi., 2007).

#### 1.2.1.1. Esszenciális *C. elegans Hox* gének

*C. elegans*-ban az embriogenezishez és életképességhez nélkülözhetetlen anterior és poszterior *Hox* paralogok működését illetően kevés ismeret áll rendelkezésre. A *C. elegans Hox* gének közül az anterior ortológ *ceh-13* a kluszter legkevesebbet tanulmányozott tagja. Az embrionális fejlődés során játszott esszenciális funkciója ellenére a sejtélettani folyamatokban játszott konkrét szerepe szinte egyáltalán nem ismert.

A *ceh-13* – az anterior *Hox* ortológoktól és a *C. elegans Hox* kluszter többi tagjától eltérő módon - embrionális korban a test csaknem teljes hosszára kiterjedő expressziót mutat (Brunschwig és mtsi., 1999). Érdekes módon a *ceh-13* expresszió még a fejlődő hím páرزószerv (farok) neuronjaiban is kimutatható (Stoyanov és mtsi., 2003). Embrionálisan a *ceh-13*

expressziós doménja átfed a középső és poszterior homológ *lin-39*, *mab-5* és *egl-5* *Hox* gének expressziós doménjaival (Wang és mtsi., 1993; Brunshwig és mtsi., 1999) (10. ábra).



10. ábra. A *ceh-13*, *lin-39*, *mab-5* és *egl-5* *Hox* gének expressziója vad típusú 'comma stage' embriókban. Zöld fluorescens fehérje GFP (zöld), illetve LacZ (sötétkék) riportergén-konstrukciók segítségével vizualizált *Hox* gén expressziós mintázatok. Az összehasonlításból látszik, hogy a *ceh-13* embrionális expressziója átfedést mutat a *lin-39*, *mab-5* és *egl-5* gének expressziós doménjaival.

Ez a szokatlan és egyedi *Hox* expressziós mintázat azt sejteti, hogy funkcionális szinten is előfordulhat interakció (esetleges redundáns működés) az említett *Hox* gének között. Egyelőre azonban tisztázatlan, hogy az esszenciális anterior és poszterior *Hox* paralógok (*ceh-13*, *nob-1*) milyen funkcionális kapcsolatban állnak a középső homológ csoportokba tartozó *Hox* génekkel (*lin-39*, *mab-5*). Nincs információ arról sem, hogy a *lin-39* és *mab-5* gének mennyiben járulnak hozzá az embrionális fejlődéshez, és kölcsönhatnak-e más *Hox* paralógokkal. Ugyancsak ismeretlen az, hogy a *ceh-13* játszik-e bármilyen szerepet a posztembrionális egyedfejlődési folyamatok szabályozásában.

### 1.2.1.2. Nem esszenciális *C. elegans* *Hox* gének

Az esszenciális *Hox* génekkel ellentétben a lárvális fejlődésben fontos szerepet játszó középső és poszterior homológ *Hox* paralógok (*lin-39*, *mab-5* és *egl-5*) funkciója jól ismert számos

poszt embrionális sejt- és szövetdifferenciálódási folyamat szabályozásában. A legtöbbet tanulmányozott erre vonatkozó szervfejlődési modellrendszerek az idegsejtvándorlás, a mezoderma differenciáció, a P ektodermális prekursor sejtek osztódása, valamint a pázószervek fejlődése (Wang és mtsi., 1993; Clark és mtsi., 1993; Salser és Kenyon, 1996; Maloof és Kenyon, 1998; Liu és mtsi., 2006). E folyamatok szabályozásában a *lin-39*, *mab-5* és *egl-5* gének - ortológjaikhoz hasonlóan - részleges funkcionális redundanciát mutatnak (Liu és Fire, 2000). Funkcionális doménjaik átfedő régióiban pedig az egymás által történő szabályozottság, illetve termékeiknek egymással való kölcsönhatása jellemzi a működésüket (lásd 1.3.2. alfejezet).

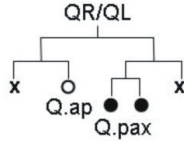
### **1.3. A középső homológ *Hox* gének szerepe a *C. elegans* poszt embrionális egyedfejlődésében**

#### **1.3.1. Neuroblaszt migráció**

*C. elegans*-ban az idegrendszer fejlődése sokat tanulmányozott és közkedvelt modellrendszer a *Hox* gének poszt embrionális fejlődési folyamatokban játszott szerepének vizsgálatára. Ezen belül az egyik legismertebb paradigma a Q sejtvonalba tartozó sejtek vándorlásának a *lin-39* és *mab-5* (és kofaktoraik) által történő regulációja. Az említett *Hox* gének a vándorló sejtekben expresszálódnak és sejt-autonóm módon befolyásolják az egyes sejtek mozgásának mértékét és irányát (Clark és mtsi., 1993; Wang és mtsi., 1993).

A QR és QL (jobb és bal) neuroblaszt sejtek a frissen kikelt L1 lárvák testének hátulsó részén található egymással átellenes pozícióban. A lárvális fejlődés során a QR sejt és leszármazottai a test elülső régiója, még a QL sejt és leszármazottai a test hátsó része felé vándorolnak, ahol az L4 (utolsó) lárvastádium végére 3-3 érzékelő neuront hoznak létre (Sulston és Horvitz, 1997) (**11. ábra**).

**A** A Q sejtvonalon



**B** A Q neuroblasztok pozíciója a migráció kezdetekor



A Q leszármazott idegsejtek pozíciója a migráció után

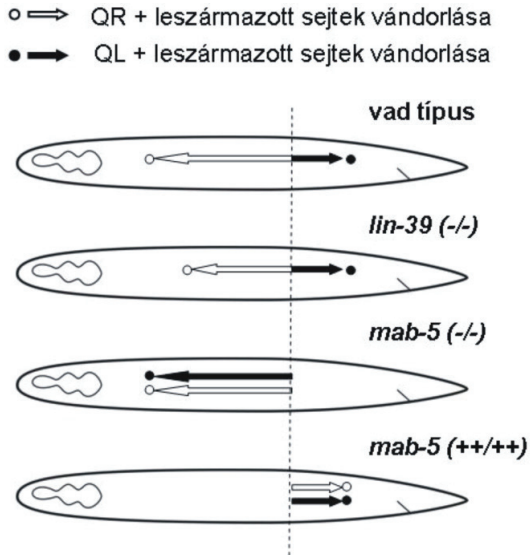


**11. ábra.** A Q sejtvonalba tartozó sejtek vándorlása az idegrendszer fejlődése során. (A) A QR és OL neuroblasztok több sejtosztódáson mennek keresztül a lárvális fejlődés során, amelyeknek eredményeként a L4 (utolsó) lárvastádium végére 3-3 db érzékelő idegsejtet hoznak létre. Az 'x'-szel jelölt sejtek programozott sejthalállal elpusztulnak. (B) A QR (rózsaszín) és QL (kék) sejtek a frissen kikelt L1 lárvákban a test poszterior régiójában helyezkednek el, egymással átellenes pozícióban. A további larva stádiumok során, a QR és leszármazottai (rózsaszín) az elülső testtájak felé vándorolnak (fehér nyíl: anterior irányú migráció). Ezzel ellentétben, a QL és leszármazottai (kékkel jelölve) a QL születési helyétől poszterior irányba mozognak (fekete nyíl) (Wang és mtsi., 1993 nyomán).

Az elülső-középső testtájakon az idegsejtek pozicionálását a *lin-39 Hox* gén (és kofaktorai) szabályozza (Clark és mtsi., 1993; Wang és mtsi., 1993). *lin-39* funkcióvesztéses állatokban az anterior irányú sejtmigrációk rövidülése figyelhető meg: a sejtek a vad típusú helyüknél poszteriorabb helyzetben állapodnak meg. A poszterior idegsejteket látszólag nem érinti a *lin-39* mutációk hatása, noha *lin-39* expresszió ezekben a sejtekben is kimutatható (Clark és mtsi., 1993; Wang és mtsi., 1993).

A főleg hátulsó testrészein a *mab-5 Hox* gén (és kofaktorainak) működése játszik döntő szerepet az idegsejtek pozíciójának meghatározásában. A *mab-5* funkciójának hiánya a poszterior sejtmigrációk abnormalitását eredményezi. A mutáns állatokban az érintett idegsejtek a test hátsó része helyett az elülső régiók felé vándorolnak. Ezzel szemben a *mab-5* túlműködése

funkcióyerékes mutánsokban az egyébként anterior irányba vándorló sejtek mozgásának irányát poszteriorra változtatja (Clark és mtsi., 1993; Wang és mtsi., 1993) (12. ábra).



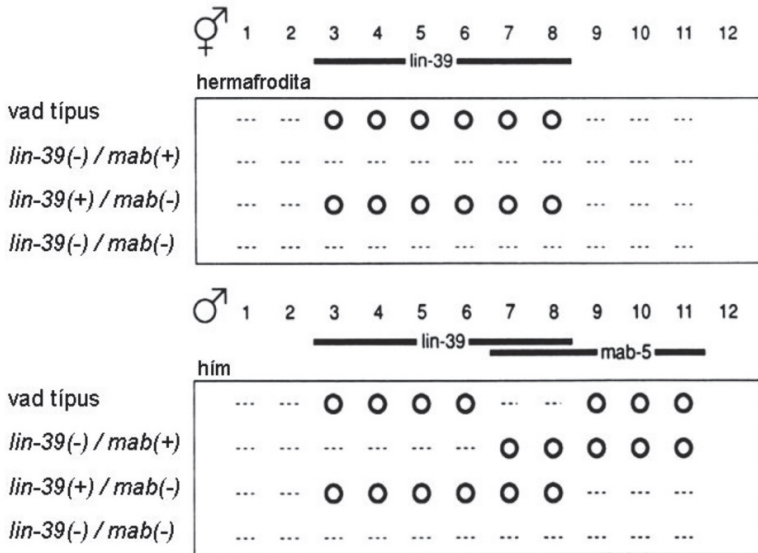
12. ábra A *lin-39* és *mab-5* *Hox* gének hatása QR/OL leszármazott sejtek vándorlására. A QR (fehér pötty) / QL (fekete pötty) neuronális prekursor sejtek a féreg testének középső-poszterior régiójában születnek (A függőleges szaggatott vonal a QR/QL neuroblasztok körülbelüli születési helyét jelzi.). A lárvális fejlődés során a QR és leszármazottai anterior (fehér nyíl), a QL sejt és leszármazottai pedig poszterior irányba (fekete nyíl) vándorolnak. *lin-39(-/-)* genetikai null mutánsokban az anterior sejt migrációk rövidülése figyelhető meg. A *mab-5* gén funkcióvesztéses mutációja a poszterior migrációk abnormalitását eredményezi. Az érintett sejtek vagy a vad típusú pozíciójuk elérése előtt megállapodnak, vagy az eredeti irányukkal ellentétben, hátulsó helyett elülső testtájuk felé vándorolnak. Ezzel szemben a *mab-5* funkcióyerékes mutációja az anterior sejt vándorlások irányát poszteriorra változtatja.

A Q leszármazott idegsejtek vándorlásának és pozicionálásának szabályozásában, a *ceh-20* és *unc-62* (*Hox* kofaktor) funkcióvesztéses mutánsok a *lin-39*, illetve *mab-5* *Hox* mutánsokéhoz hasonló fenotípust mutatnak. A *Hox* és *Hox* kofaktor mutációk együttes hatása azonban súlyosabb migrációs defektusokat eredményez, mint amik külön a *Hox(-)*, illetve *Hox kofaktor(-)* mutánsokban megfigyelhetők (Yang és mtsi., 2005). Ezt okozhatja a *ceh-20* és *unc-62* önálló, *Hox* génektől független funkciója vagy - alternatív módon - más *Hox* paralógok működésének a hatása a Q leszármazott sejtek vándorlásának a szabályozására.

### 1.3.2. Sejtfúzió

A Pn.p epidermális sejtek sorsának meghatározása széles körben használt modellrendszer a *C. elegans* posztembrionális fejlődése során a sejtosztódás és differenciáció szabályozásának a tanulmányozására. Ebben a rendszerben / a P ektodermális sejtvonal leszármazása során jól ismert a lárvális *Hox* géneknek (*lin-39* és *mab-5*) és ko-faktoraiknak a szerepe az említett folyamatok szabályozásában.

A korai L1 lárvák hasi testfelszínét 12 darab páros sorba rendeződő, ektodermális prekursor sejt alkotja: (P1-12). Az L1 lárvastádium végén, a P blaszt sejtek osztódnak, amelynek eredményeként egy Pn.a neuronális prekursor, illetve egy Pn.p epidermális utódsejt jön létre (Sulston és Horvitz, 1977). Születésük után rövid idővel a Pn.p sejtek egy része fuzionál – nemekre jellemző számban és mintázatot mutatva – a hipodermális szyncyciummal (*hyp7*). Ez a fúziós folyamat sejt-autonóm módon szabályozott a *lin-39* és *mab-5* (és kofaktoraik) által. Vad típusú hermafroditákban a középső helyzetű P(3-8).p sejteket a LIN-39 aktivitása tartja fuzionálatlan állapotban. A későbbi lárvális fejlődés során ezeknek a sejteknek a leszármazottai alakítják ki a hermafrodita párzószervet, a vulvát. *lin-39(-)* null mutáns állatokban az összes Pn.p sejt fuzionál a hipodermisszel (Clark és mtsi., 1993; Wang és mtsi., 1993). Vad típusú hímelekben a LIN-39 és MAB-5 fehérjék felelősek a P(3-6).p, illetve a P(9-11).p sejtek fúziójának megakadályozásáért az L1 lárvastádium végén. Mindkét nemben a *lin-39* és *mab-5* gének funkcionális doménjaik átfedő régiójában [P(7-8).p] együttesen alakítják ki a sejsorsokat szex-specifikus módon (**13. ábra**) (Clark és mtsi., 1993; Wang és mtsi., 1993).



**13. ábra.** A Pn.p epidermális sejtek fúziója az L1 lárvastádium végén. Vad típusú hermafroditákban a P(3-8).p sejtekben a LIN-39 aktivitása gátolja a sejt-fúziót. *lin-39* funkcióvesztéssel mutánsokban mindegyik Pn.p sejt fuzionál a hipodermisszel (*hyp7*). A *mab-5* működése nem befolyásolja ezt a fúziós eseményt. Vad típusú hímelekben a *lin-39* és a *mab-5 Hox* gének felelnek a P(3-6).p, illetve P(9-11).p sejtek fúziójának megakadályozásáért. A fekete karikák a nem fuzionáló sejteket, a számok a Pn.p sejteket jelölik. Külön-külön a *lin-39*, illetve a *mab-5* funkciója a fuzionálatlan állapot fenntartására irányul. Interakciójuk egy új sejsors kialakulását eredményezi: (a P(7-8).p sejt fuzionálnak.

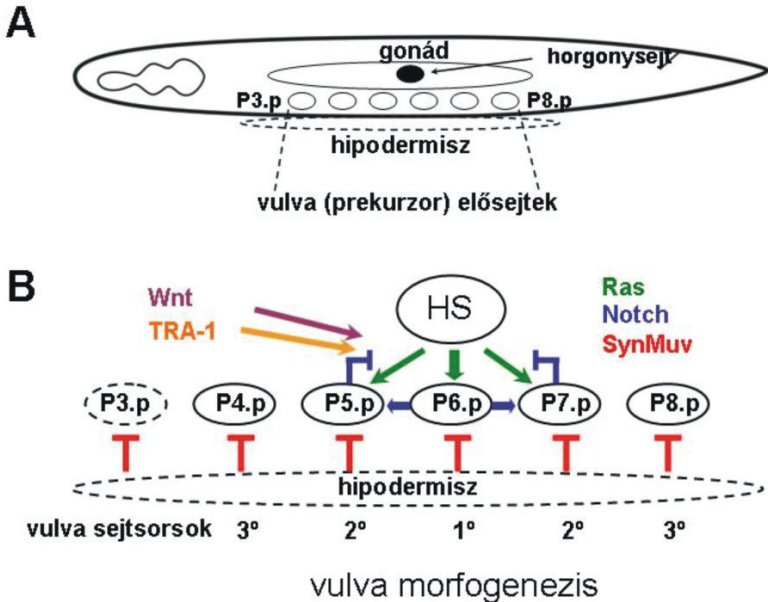
A *lin-39* és *mab-5 Hox* paralógokhoz hasonlóan a *ceh-20* és *unc-62* gének is szerepet játszanak a Pn.p epidermális sejtek sorsának meghatározásában az L1 lárvastádium végén bekövetkező fúziós esemény során. Érdekes módon hermafroditákban a *ceh-20*, illetve az *unc-62* működésének hiánya részben a *lin-39(-)* mutánsokéhoz hasonló, részben azzal ellentétes mutáns fenotípust eredményez. *ceh-20(-)* és *unc-62(-)* mutáns állatokban a vad típusban leírtnál kevesebb Pn.p epidermális sejt fuzionál a hipodermisszel, és ez a hatás – kisebb penetranciával – *lin-39(-)* null mutáns háttérben is megfigyelhető (Yang és mtsi., 2005). Ez a megfigyelés felveti annak a lehetőségét, hogy a *lin-39* és *mab-5* géneken kívül más *Hox* paralógok működése is befolyásolhatja a Pn.p sejtek fúzióját.

### 1.3.3. Vulvafejlődés

*C. elegans* hermafroditákban a vulvaszövet differenciálódása az L3 lárvastádium végén kezdődik. Az L3 lárvákban 6 darab [P(3-8).p] vulva prekursor sejt (VPC; *Vulval Precursor Cell*) található. Kezdetben a P(3-8).p sejtek azonos fejlődési potenciállal rendelkeznek. A vulva indukció során azonban a gonádból és a hipodermiszből érkező extracelluláris jelek kombinált hatására különböző vulva sejsorsokat adoptálnak. Ennek következményeként vad típusú állatokban a három középső VPC [P(5-7).p] leszármazottai vesznek csak részt a vulva kialakításában (Sulston és Horvitz, 1977; Sternberg, 2005). A VPC-k és leszármazottaik sorsának alakulását a vulvaszövet differenciálódása során különböző jelátviteli útvonalak bonyolult interakciója biztosítja. A vulvafejlődést szabályozó útvonalak közé tartoznak a Ras, Wnt és Notch jelátviteli útvonalak, valamint a redundáns működésük alapján A, B, C csoportba sorolható, úgynevezett szintetikus multivulva (*synMuv*, *synthetic MultiVulva*) útvonalak (14. ábra) (Sternberg, 2005; Harrison és mtsi., 2006). A *synMuv* géncsalád számos tagja a kromatin struktúra kialakításában játszik szerepet (Ceol és Horvitz, 2004; Harrison és mtsi., 2006; Fay és Yochem, 2007). *synMuv* gén például a retinoblasztóma (Rb) fehérje ortológját kódoló *lin-35* gén, a *let-418*, amely a NuRD (*Nucleosome Remodelling and histone Deacetylase*) komplexbe tartozó Mi-2/CHD3 hiszton deacetiláz enzimet kódoló gén ortológja, illetve az *efl-1* és *dpl-1* gének, az E2F/DP komplex fonálféreg megfelelői (Solan és Ahringer, 2000; Ceol és Horvitz, 2001; Unhavaithaya és mtsi., 2002; Myers és Greenwald, 2005).

A szignalizációban keletkező zavarok különböző rendellenességeket okoznak a vulva fejlődésében. Ennek eredményeként különböző vulva mutáns fenotípusok (morfológiák) jönnek létre. Változhat a vulva alakja, szerkezete (ez legtöbb esetben a vulva működésképtelenségével jár együtt) és száma (0 – 6 darab között). A jelátvitel hiperindukciójának hatására a központi P(5-7).p VPC-ken kívül a normálisan nem indukálódó P(3,4,8).p sejtek is indukálódhatnak (indukált 1. vagy 2. típusú vulva sejsorsot differenciálnak), ami a defektus mértékétől függően úgynevezett kiforduló (*Protruded*; *Pvl*) vulva vagy több vulva (*MultiVulva*; *Muv*) kifejlődéséhez vezet. A vulvaindukció hiánya a páرزszerv teljes hiányát eredményezi a kifejlett hermafroditákban (*Vulvaless*; *Vul*).



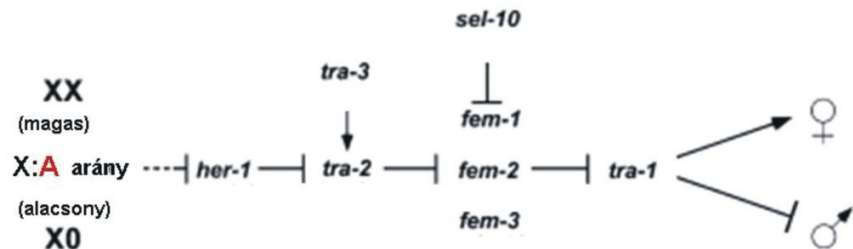


**14. ábra. Vulvaindukció *C. elegans*-ban.** (A) *C. elegans* hermafroditákban az L3 lárvastádiumban 6 db epidermális eredetű vulva (prekurzor) elősejt (VPC) található [P(3-8).p], amelyek a test középso hasi részén helyezkednek el (üres körök). Felettiük található a gonadális horgonysejt („HS”), amely a vulvaindukcióhoz szükséges jelet biztosítja. (B) Az L3 lárvastádium végén a gonadális horgonysejtből, illetve a hipodermiszből érkező extracelluláris jelek [a Wnt, Ras, Notch, SynMuv útvonalak és a szex-determinációs génkaszkád (TRA-1) jelei] hatására az eredetileg azonos fejlődési potenciállal rendelkező VPC-kben különböző vulva sejtsorsok differenciálódnak. A nyilak az aktiváló, a talpas nyilak a gátló hatását jelölik. A 3°-al jelölt sejtek a vulvafejlődés során fuzionálnak a hipodermális szyncyciummal. A 1° és 2° sorsú vulva sejtek leszármazottai vesznek részt a vulvaszövet kialakításában.

A vulva sejtsorsokat szabályozó jelátviteli rendszerek jelei a vulva prekurzor sejtekben expresszálandó *lin-39* középso homológ *Hox* gén promóterében integrálódnak (Maloof és Kenyon, 1998; Guerry és mtsi., 2007; Wagmeister és mtsi., 2006; Takács-Vellai és mtsi., 2007). A *lin-39* tehát központi szerepet játszik a vulvafejlődés szabályozásában (Clandinin és mtsi., 1997). A *lin-39* inaktíválása Vul fenotípus kialakulását eredményezi (Chen és Han, 1997). Érdekes módon *lin-39* hipomorf mutánsokban alacsony penetrációjú Muv fenotípus figyelhető meg (Takács-Vellai és mtsi., 2007). A vulvaindukció során (az L3 lárvastádiumban) szintén kimutatható a *ceh-20* *lin-39*-től független hatása a vulva sejtsorsok szabályozásában. A *ceh-20*

működésének hiánya Muv fenotípust eredményez, amely még *lin-39(-)* null mutáns háttérben is megfigyelhető (Yang és mtsi., 2005).

A vulva szöveti differenciálódása során a *lin-39* transzkripcionális szabályozásában részt vesz az ún. *tra-1* (*transformer-1*) gén is (Szabó és mtsi., 2009). A *tra-1* a *C. elegans* sex-determinációs génkaszkád terminális tagja (15. ábra). A *C. elegans* nemét (hímnős vs hím állat) a testi és ivari kromoszómák aránya határozza meg (Hodgkin, 1987; Meyer, 2000, Zarkower, 2006). A szomatikus szex kialakulása az egyedfejlődés során (adott nemnek megfelelő gonád, pároszervek kifejlődése) pedig az ún. szex-determinációs útvonal által szabályozott (Ceol és Horvitz, 2004; Harrison és mtsi., 2007; Fay és Yochem, 2007; Cui és Han, 2007). A szexuális fenotípus kialakulása a TRA-1A fehérje mennyiségétől (*tra-1* gén aktivitásától) függ.



15. ábra. A *C. elegans* szex-determinációs génkaszkád. A *C. elegans* nemét az ivari és autoszómás kromoszómák aránya határozza meg. A szomatikus szex-determinációs útvonalat egy kromoszoma-számláló mechanizmus (numerátor és denominátor gének – az ábrán nincsenek jelölve) indítja be, amely meghatározza az elsődleges szex-determinációs jelet. Ivari kromoszómák: „X”, autoszómák: piros „A”. A magas X:A arány a *her-1* gén gátlásához vezet, ami a terminális *tra-1* gén aktivitását eredményezi. A *tra-1* aktivitása a hermafrodita szexuális fenotípus kialakulását segíti elő. *tra-1* működés hiányában az állat szomatikusan hím lesz.

A *tra-1* által kódolt TRA-1A fehérje *in vitro* kötődik a *lin-39* promóteréhez, *in vivo* pedig kimutatható a *lin-39* expresszióját szabályozó hatása a VPC-kben (Szabó és mtsi., 2009). A vulva prekursor sejtekben a vulvaindukció ideje alatt TRA-1::GFP expresszió detektálható (Hargitai és mtsi., 2009). Ismert továbbá, hogy a szomatikus sejtorsók meghatározásában a *tra-1* alternatív módon funkcionál az azonos családba tartozó *tra-4* génnel, amely – működésének bizonyos aspektusai alapján - a *synMuv B* génosztályba sorolható (Grote és Conratt, 2006). A *synMuv B* osztályba tartozó gének a vulvafejlődés szabályozásában is szerepet játszanak. Az azonban ismeretlen, hogy kimutatható-e genetikai kölcsönhatás a *tra-1* és a *SynMuv* gének között.

## 2. Célkitűzések

### 2.1. *C. elegans Hox* mutáns fenotípusok és *Hox* expressziós mintázatok összehasonlító elemzése

A *ceh-13* gén az anterior *Hox* homológ csoport(ok) képviselője *C. elegans*-ban (Schaller és mtsi., 1990; Wittmann és mtsi., 1997; Brunschwig és mtsi., 1999). *Drosophila*-ban vagy gerinces rendszerekben az anterior *Hox* paralógok - a kolinearitás szabályának megfelelően - anterior testrészekben expresszálódnak és funkcionálnak és az elülső testtájuk morfogenezisét irányítják (McGinnis és Krumlauf, 1992; Imura és Pourquie, 2007). A *ceh-13* számos tulajdonságában eltér az anterior ortológoktól. A *ceh-13* működésének hiánya nem csupán az anterior testtájuk fejlődésének a rendellenességét idézi elő, hanem magas penetranciájú (97%) embrionális vagy korai lárvális életképtelenséget okoz (Brunschwig és mtsi., 1999). *ceh-13(-)* mutások 3-4%-a, ennek ellenére, képes szaporodóképes felnőtt állatokká fejlődni. Továbbá, a *ceh-13* embrionálisan a test csaknem teljes hosszára kiterjedő expressziós mintázatot mutat, amely – a kolinearitás szabályától eltérően - átfed a kluszterben öt követő *Hox* paralógok expressziós doménjával (Brunschwig és mtsi., 1999). Ezek a megfigyelések interakciót feltételeznek a *ceh-13* és a *C. elegans Hox* kluszter többi tagja között.

**Vizsgálataim során a pleiotróp *Ceh-13(-)* fenotípus részletes elemzését kívántam elvégezni, valamint összehasonlítani a többi *C. elegans Hox* gén mutációs inaktiválása által okozott fenotípusos jegyekkel. Továbbá, a *C. elegans Hox* kluszter tagjaira specifikus HOX::GFP riportergén-konstrukciók segítségével egy átfogó expressziós elemzés elkészítését terveztem a *C. elegans Hox* paralógok embrionális és lárvális expressziójának az összehasonlítására.**

### 2.2. A *ceh-13*, *lin-39* és *mab-5* genetikai kölcsönhatásainak vizsgálata

A *Hox* gének szekvenciális konzervációja arra enged következtetni, hogy a *Hox* kluszter egy ősi 'ProtoHox'-szerű gén sorozatos duplikációjának eredményeként jöhetett létre (Lewis, 1951, Garcia-Fernandez, 2005). A *Hox* paralógok szekvencia hasonlósága számos esetben funkcionális redundanciában nyilvánul meg az egyedfejlődési folyamatok szabályozásában. A

*C. elegans*-ban szintén kimutatható funkcionális redundancia a középső homológ csoportba tartozó *Hox* gének (*lin-39* és *mab-5*) között a mezoderma differenciációjának szabályozásában (Liu és Fire, 2000). A *C. elegans* embrionális fejlődése során az anterior ortológ *ceh-13* expressziója átfed a kluszterben hozzá legközelebb elhelyezkedő *Hox* paralógok expressziós doménjával (Brunschwig és mtsi., 1997). Az azonban ismeretlen, hogy funkcionális szinten is megnyilvánul-e ez az átfedés az említett *Hox* gének között. Brunschwig és munkatársai továbbá leírták, hogy a *ceh-13* funkciója esszenciális az embrionális fejlődéshez (1997). *ceh-13(-)* null mutánsok 3%-a azonban képes túlélni és szaporodóképes felnőtt egyedekké fejlődni. Ez felveti annak a lehetőségét, hogy más HOX fehérjék képesek helyettesíteni a hiányzó CEH-13 funkcióját.

**Vizsgálataim során annak a tanulmányozását tűztem ki célul, hogy a *lin-39* és *mab-5* gének hiperaktivitása, illetve az általuk kódolt fehérjék mennyiségének növelése a szervezetben képes-e szuppresszálni a *ceh-13(-)* mutánsok embrionális és lárvális életképtelenségét, valamint fejlődési, morfológiai rendellenességeit. Terveim közé tartozott annak a vizsgálata is, hogy tapasztalható-e genetikai interakció a felsorolt 3 *Hox* gén között az embrionális fejlődés során.**

### **2.3. A *ceh-13* anterior *Hox* gén funkciójának vizsgálata a sejtvándorlás és a sejtfüzió szabályozásában**

A *ceh-13* egyedfejlődési folyamatokban játszott konkrét szerepe szinte egyáltalán nem ismert. Vizsgálataim során egyik célom a *ceh-13* funkciójának tanulmányozása volt olyan egyedfejlődési folyamatokban, amelyek a *lin-39* és *mab-5* gének által is szabályozottak. A *C. elegans* posztembrionális egyedfejlődése során ugyanis a *ceh-20* vagy *unc-62* *Hox* ko-faktorokat kódoló gének mutációja részben a *lin-39(-)* és *mab-5(-)* *Hox* mutánsokéhoz hasonló, részben azoktól eltérő fenotípusos elváltozások kialakulását eredményezi. A *ceh-20* és *unc-62* az *Exd/Pbx* és *Hth/Meis*, *Prep* rovar és emlős *Hox* kofaktorokat kódoló gének *C. elegans* ortológjai. A *ceh-20* vagy *unc-62* génműködés hiánya - a *ceh-13* és *nob-1* mutációkhoz hasonlóan - embrionális vagy lárvális életképtelenséget, valamint morfológiai rendellenességeket okoz (Streit és mtsi., 2002; Van Auken és mtsi., 2002; Takács-Vellai és mtsi., 2007). A sejtvándorlás és sejtfüzió szabályozásában a *ceh-20* és *unc-62* a *lin-39* és *mab-5* *Hox* génektől részben független funkciójú (Liu és Fire, 2000; Yang és mtsi., 2005; Takács-Vellai és mtsi., 2007). Ez a megfigyelés felveti annak a lehetőségét, hogy a *C. elegans* HOX

kofaktorok önállóan, a HOX fehérjéktől függetlenül is funkcionálnak az egyedfejlődés során. Alternatív módon elképzelhető, hogy a *lin-39* és *mab-5* középső homológ csoportba tartozó *Hox* géneken kívül más *Hox* paralógok működése – így az anterior ortológ *ceh-13*-é - is hat a fentebb említett posztembrionális fejlődési folyamatok szabályozásában. Ezt az is alátámasztja, hogy emlős rendszerben jól ismert az anterior homológ csoportokba tartozó *Hox* géneknek (például a *HoxB1*-nek - a *C. elegans ceh-13* gén emlős ortológja) az idegsejtvándorlás szabályozásában játszott szerepe (Studer és mtsi., 1996; van der Akker és mtsi., 2010).

**Kísérleteim során arra a kérdésre kerestem a választ, hogy a *C. elegans* anterior ortológ *Hox* gén *ceh-13* működése hat-e a Q leszármazott idegsejtek vándorlására, illetve a Pn.p epidermális sejtek fúziójára. Mivel a *C. elegans* hermafroditákban a Pn.p sejtek leszármazottai vesznek részt a páرزószerv (vulva) kialakításában, megvizsgáltam azt is, hogy a *ceh-13* működésének a hiánya okoz-e rendelleneséget a vulva fejlődésében.**

## **2.4. *C. elegans Hox* gének rokonságának vizsgálata bioinformatikai módszerekkel**

A *Hox* kluszterek korai evolúciója során egy ősi „ProtoHox” gén tandem duplikációjának eredményeként jöhettek létre az anterior és poszterior *Hox* homológ csoportok ősei. A középső homológ csoportok származása azonban máig kérdéses. A leszármazás során egymással közeli rokonságban álló *Hox* paralógok között gyakran figyelhető meg részleges funkcionális redundancia: minél rövidebb idő telt el a génduplikáció bekövetkezése óta, annál kevesebb idő állt rendelkezésre, hogy a keletkezett új gén eltérő feladat ellátására specializálódjon az evolúció során. Mivel más kísérleteim során a *C. elegans* anterior *Hox* gén *ceh-13* és a középső homológ csoportba tartozó *Hox* paralógok közötti genetikai kölcsönhatásokat és az egyedfejlődési folyamatok szabályozásában megnyilvánuló funkcionális redundanciát vizsgáltam, tudni szerettem volna azt is, hogy ezek a gének milyen rokonságban állnak egymással a *Hox* kluszteren belül.

**Munkámban egyik célomként a *C. elegans Hox* gének szekvenciális hasonlóságának vizsgálatát kívántam elvégezni bioinformatikai módszerek segítségével a *Hox* paralógok rokonsági viszonyainak és a *Hox* kluszter evolúciója során való leszármazásuknak a tanulmányozására.**

## 2.5. A *C. elegans* szex-determinációs útvonal szerepe a vulvafejlődésben

A hermafrodita párzószerv, vulva szöveti differenciációját irányító *lin-39 Hox* gén transzkripciójának a szabályozásában részt vesz a *tra-1* gén is, amely a *C. elegans* szex-determinációs génkaszkád terminális tagja. A szomatikus szex kialakulását az egyedfejlődés során (adott nemnek megfelelő gonád, párzószervek kifejlődése) végső soron a *tra-1* aktivitása által meghatározott. A TRA-1A fehérje jelen van a vulva prekursor sejtekben a vulvaindukció ideje alatt és szabályozza a *lin-39* expresszióját (Hargitai és mtsi., 2009; Szabó és mtsi., 2009). Ismert továbbá, hogy a szomatikus sejtorsók meghatározásában a *tra-1* alternatív módon funkcionál az azonos családba tartozó *tra-4* génnel, amely – működésének bizonyos aspektusai alapján - a *synMuv B* génosztályba sorolható (Grote és Conradt, 2006). A különböző *synMuv* osztályokba tartozó gének szerepet játszanak a vulvafejlődés szabályozásában is. Az azonban ismeretlen, hogy van-e funkcionális kapcsolat a *tra-1* és a *synMuv* gének között.

**Kísérleteim során azt vizsgáltam, hogy kimutatható-e genetikai interakció a *tra-1* és a vulva fejlődés szabályozásában szerepet játszó *synMuv A*, illetve *synMuv B* géncsoportok tagjai között.**

### 3. Anyagok és módszerek

#### 3.1. Használt törzsek geno- és fenotípusa

Vad típusú *C. elegans* törzsként a Bristol N2 törzset használtam (Brenner, 1974).

A munkám során használt mutáns törzseket az alábbi táblázat foglalja össze:

genotípus	Jellemzés	Fenotípus
<i>ceh-13(sw1)III</i>	anterior <i>Hox</i> paralóg, transzkripció faktor	Embrionális/lárvális életképtelenség, abnormális morfológia, zömök testalkat, lassú fejlődés, csökkent utódszám
<i>ceh-13(ok737)</i> <i>III/hT2[bli-4(e937) let-</i> <i>?(q782) qIs48] (I;III)</i>	anterior <i>Hox</i> paralóg, transzkripció faktor	Vad típus (balanszált rendszer)
<i>ceh-13(ok737)III</i>	anterior <i>Hox</i> paralóg, transzkripció faktor	Embrionális/lárvális életképtelenség, abnormális morfológia, zömök testalkat, lassú fejlődés, csökkent utódszám
<i>mab-5(e1751gf)III</i>	középső <i>Hox</i> paralóg, transzkripció faktor	Hím farok abnormalitása
<i>lin-8(n111)II</i>	A osztályba tartozó synMuv gén, (a kódolt fehérje nem azonosított)	Vad típus
<i>lin-15B(n765ts)X</i>	B osztályba tartozó synMuv gén, (a kódolt fehérje nem azonosított)	Vad típus
<i>lin-15A(n765ts)X</i>	A osztályba tartozó synMuv gén, (a kódolt fehérje nem azonosított)	Vad típus
<i>lin-15(n767)X</i>	A osztályba tartozó synMuv gén, (a kódolt fehérje nem	Vad típus

	azonosított)	
<i>lin-53(n833)I</i>	Nukleoszóma remodelling faktor, A osztályba tartozó synMuv gén	Vad típus
<i>lin-38(n751)II</i>	A osztályba tartozó synMuv gén, (a kódolt fehérje nem azonosított)	Vad típus
<i>lin-35(n745)I</i>	humán Rb (Retinoblastoma) fehérjét kódoló gén ortológja, B osztályba tartozó synMuv gén	Embrionális/lárvális életképtelenség, abnormális morfológia, lassú fejlődés, csökkent utódszám
<i>lin-36(n766)III</i>	B osztályba tartozó synMuv gén, (a kódolt fehérje nem azonosított)	Vad típus
<i>dpl-1(n2994)II</i>	humán DB (E2F-típusú) nukleáris fehérjét kódoló gén ortológja, B osztályba tartozó synMuv gén	Embrionális/lárvális életképtelenség (kis penetrancia)
<i>dpl-1(n3643)II</i>	humán DB (E2F-típusú) nukleáris fehérjét kódoló gén ortológja, B osztályba tartozó synMuv gén	Embrionális/lárvális életképtelenség (kis penetrancia)
<i>tra-1(e1099)III</i>	humán GLI transzkripciós faktorokhoz hasonló „zinc- finger” fehérjét kódoló gén	Embrionális/lárvális életképtelenség, XX karyotípusú állatokat szomatikusan hímekké transzformálja
<i>fem-3(e2006)IV</i>	a kódolt fehérje nem azonosított	Steril

Transzgénikus törzsek:

*mul35*[MEC-7::GFP;*lin-15*(+)]*V*

*dpy-20*(*e1282*)*IV*; [TAX-4::GFP; *dpy-20*(+)]

*jcls1*[JAM-1::GFP; *unc-29*(+);*rol-6*(*su1006*)]

*swIsl* [*rol-6*(*su1006*) + *ceh-13*::*gfp*]



*zhls1* [LIN-39::GFP; *unc-119(+)*]  
*mulS16*[*dpy-20(+)*; MAB-5::GFP]  
*Bxls12* [EGL-5::GFP]  
NOB-1::GFP  
PHP-3::GFP

Keresztezéssel létrehozott többszörös mutáns / transzgenikus törzsek:

*lin-8(n111)II*; *lin-15B(n765ts)X*  
*lin-53(n833)I*; *lin-15A(n765ts)X*  
*ceh-13(sw1)III*; *lin-8(n111)II*; *lin-15B(n765ts)X*  
*ceh-13(ok737)III*; *lin-8(n111)II*; *lin-15B(n765ts)X*  
*ceh-13(sw1)III*; *lin-53(n833)I*; *lin-15A(n765ts)X*  
*ceh-13(sw1)III*; *mab-5(e1751gf)III*  
*mab-5(e1751gf)III*; *mulS35* [MEC-7::GFP; *lin-15(+)*]V  
*mab-5(e1751gf)III*; *ceh-13(sw1)III*; *mulS35* [MEC-7::GFP; *lin-15(+)*]V  
*ceh-13(sw1)III*; *mulS35* [MEC-7::GFP; *lin-15(+)*]V  
*ceh-13(ok737)III*; *mulS35* [MEC-7::GFP; *lin-15(+)*]V  
*ceh-13(sw1)III*; *jcls1* [JAM-1::GFP; *unc-29(+)*; *rol-6(su1006)*]  
*ceh-13(sw1)III*; *mab-5(e1751gf)III*; *jcls1* [JAM-1::GFP; *unc-29(+)*; *rol-6(su1006)*]  
*ceh-13(sw1)III*; *zhls1* [LIN-39::GFP; *unc-119(+)*]  
*ceh-13(sw1)III*; *mulS16*[*dpy-20(+)*; MAB-5::GFP]  
*ceh-13(sw1)III*; [TAX-4::GFP; *dpy-20(+)*]  
*lin-15(767)X*; *dpl-1(n2994)II*  
*lin-38(n751)II*; *lin-36(n766)III*  
*lin-38(n751)II*; *dpl-1(n3643)II*  
*lin-8(n111)II*; *lin-35(n745)I*  
*lin-8(n111)II*; *lin-36(n766)III*  
*lin-38(n751)II*; *tra-1(e1099)III*  
*lin-8(n111)II*; *tra-1(e1099)III*

### 3.2. Törzsfenntartás és keresztezés

A *C. elegans* törzseket laboratóriumi körülmények között 15 és 25°C között, termosztátokban, műanyag Petri lemezekbe öntött NGM agaron, *Escherichia coli* (OP50-es auxotróf törzs) baktériumpázsiton (a továbbiakban NGM lemezen) tartottam fenn (Brenner, 1974). Az állatokat egyedileg platina tű segítségével raktam át egyik NGM lemezről a másikra. Nagyobb mennyiségű állat mozgatását spatula segítségével végeztem megfelelő méretű agardarab kivágásával és áthelyezésével. Az általam használt homozigóta mutáns és transzgenikus törzseket 1-2 havonta szükséges friss lemezre áthelyezni.

A *C. elegans* törzsek keresztezése során egy 5 cm átmérőjű NGM lemezből eltávolítottam az agar 4/5 részét úgy, hogy a maradék agart baktériumpázsit fedje. Az így kapott területre kb. 30 darab fiatal felnőtt hím egyed (az egyik törzs) és 6-8 darab késői L4 lárvastádiumban lévő vagy fiatal felnőtt hermafroditát (másik törzs) helyeztem. Az állatokat 24 órán keresztül 20°C-on tartottam, majd ezt követően a hermafroditákat egyesével külön lemezekre tettem át (a termoszenzitiv allélok esetében a keresztezést permisszív hőmérsékleten, 15°C-on végeztem). Sikeres keresztezés esetén az utódok 50 %-a hím lett. Az F1 nemzedékből a hermafroditákat L3-L4 lárvá állapotban egyesével külön lemezekre raktam szét (meggátolva a hímeikkel történő keresztezést), majd az F2 nemzedéket szelektáltam a mutáns fenotípusra.

### 3.3. Mikroszkópos vizsgálatok

A fénymikroszkópos vizsgálatokat Olympus BX-51 felső megvilágítású mikroszkópon végeztem. A mikroszkópos képekről F-WU II kamera segítségével készítettek fotókat. A minták készítése során a vizsgálandó állatokat agarpadra (4%) helyeztem és 0,5 M-os levamizol segítségével bénítottam meg őket.

#### 3.3.1. A Q leszármazott idegsejtek pozíciójának meghatározása

Az AVM (QR.paa) és PVM (QL.paa) érzőneuronok végső pozícióját vizsgáltam L4 lárvastádiumú és fiatal felnőtt állatokban (hermafroditákban). A sejtek vizualizálásához egy MEC-7::GFP riporter-konstrukciót (neuronmarker) használtam (Hamelin és mtsi., 1992). A sejtek relatív helyzetét a férgek hosszához képest határoztam meg. Referenciaként / viszonyítási

pontként jól használható a garat, vulva, továbbá a MEC-7::GFP által jelölt ALM és PLM neuronok.

A neuron migrációs és axonnövekedési defektusok vizsgálatához egy TAX-4::GFP marker riporterkonstrukciót használtam (Komatsu és mtsi., 1996).

### **3.3.2. Pn.p epidermális sejtek sorsának vizsgálata**

A hipodermisszel az L1 lárvastádium végén nem fuzionáló Pn.p sejtek számának és mintázatának meghatározását L2 / korai L3 lárvákban végeztem. A fuzionálatlan sejteket az epidermális sejtek apikális membránját jelölő JAM-1::GFP riporter rendszer segítségével határoztam meg (Mohler és mtsi., 1998).

### **3.4. Fenotípus elemzés, mutáns menekítési vizsgálatok**

A fenotípus elemzések, RNSi és mutáns menekítési vizsgálatok során (embrionális-lárvális letalítás - túlélés tesztelése) az elemzéshez a vad típusnál három, a vizsgált mutáns törzsek esetében 15 darab L4 lárvastádiumban lévő hermafroditát raktam szét egyesével külön lemezekre és az utódaikat számoltam. A vizsgálatokat 20 és 25°C-on végeztem. A megfigyeléseket minimum három független párhuzamos ismétléssel végeztem, valamint a kísérlet sorokat időbeli eltolással is ismételttem.

### **3.5. Transzgénikus törzsek létrehozása**

#### **NOB-1::GFP**

A *nob-1* gén csaknem teljes kódoló régióját (az utolsó kodon kivételével) és egy 10 kb *upstream* szabályozó promoterrégiót tartalmazó 15 kb hosszú genomi fragmentet PCR segítségével felszokszoroztam. A PCR-hez használt primerek a következők voltak: *forward* 5'-aac tga gaa cca atg cat tgg ctc cta cgg ggt tct gg-3', illetve *reverse* 5'-cgg gat ccc ggt tga tca atc gct cga tgc-3'. A kapott fragmenteket PstI és BamHI restriktációs enzimekkel való emésztést követően pPD95.75 expressziós vektorba klónoztam. A konstrukció mikroinjektálásával transzgénikus törzset hoztam létre. A transzformáláshoz a rol-6(su1006) ko-transzformációs vektort használtam. Az extrakromoszomális transzgént UV besugárzás segítségével integráltam (random integrációt

eredményez), majd a kapott integráns transzgenikus törzset vad típusal 8-szor visszakeresztetem (izogenizálás).

### **PHP-3::GFP**

A *php-3* gént kódoló régiót genomi PCR segítségével sokszoroztam fel. A PCR-hez használt primerek: *forward* 5'-tgt ttc tca aaa acg gat gg-3', illetve *reverse* 5'-cgg gat ccc gcg tag gca gtt gtg cag ctc ttg tc-3'. A kapott PCR fragmenteket MluI és BamHI enzimekkel való emésztés után a NOB-1::GFP-t hordozó vektorba klónoztam (a *nob-1* és a *php-3* gének egymás mellett helyezkednek el a kromoszómán és a transzkripcionális szabályozásuk azonos promoterrégióval történik). A konstrukció transzformálása és a transzgenikus törzs létrehozása a NOB-1::GFP-t hordozó törzsnél leírtakhoz hasonlóan történt.

### **3.6. RNS interferencia**

A csendesíteni kívánt gének mRNS-éről 800-1000 bázispár méretű, más *C. elegans* gének szekvenciáival homológiát nem mutató cDNS szakaszokat sokszoroztam fel reverz transzkriptáz-alapú PCR (RT-PCR) segítségével. A primerek tervezéséhez az Primer3 ([http://fokker.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www\\_slow.cgi](http://fokker.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www_slow.cgi)) internetes portálon elérhető ingyenes programot használtam. A kapott cDNS szakaszokat T-vektorba (Promega), majd RNSi vektorba (pPD129.36) klónoztam (Timmons és Fire, 1998). Az ampicillin rezisztenciagént hordozó RNSi vektort egy speciális tetraciklin rezisztens HT115 nevű *E. coli* törzsbe transzformáltam. A baktériumokat  $OD_{600}=0,4-0,6$ -ig növesztettem, majd induktív (IPTG-t, Amp-t és Tetr.-t tartalmazó) RNSi lemezekre cseppenttem és szobahőmérsékleten egy napig növesztettem (Kamath és mtsi., 2001; Timmons és mtsi., 2001). A baktérium sejtek az IPTG hatására átírják a célgénekre specifikus duplaszálú (ds) RNS szakaszokat, amelyek a férgekbe kerülve ('etetéses' RNSi) a megfelelő endogén mRNS-k degradációját, illetve translációjuk gátlását eredményezik. A vizsgálathoz 3-10 darab (a vizsgálat törzs fenotípusától és az állatok túlélési képességétől / a túlélési valószínűsétől függően) L3 lárvát helyeztem az RNSi lemezekre és az F1/F2 generációkat vizsgáltam. Az RNSi vizsgálatokat 25°C-on végeztem. A kísérletek során mindig teszteltem vad típusú (N2) törzssel mind az RNSi vektort nem hordozó vs hordozó törzseket, továbbá adott specifikus kontrollokat is használtam. A vizsgálatokat minimum három független párhuzamos ismétléssel végeztem el, valamint a kísérletsorozatokat időbeli eltolással is ismételttem.

Az RNSi konstrukciók készítéséhez (RT-PCR) használt primerek:

*ceh-13(RNSi)*:

*Forward*: 5'-tga gct cca ctg aat gtt atg g-3'

*Reverse*: 5'-atg acg atg tcg gtg agt tg-3'

*lin-39(RNSi)*:

*Forward*: 5'-cat caa cat cac cgt cat cc-3'

*Reverse*: 5'-cat cat cgg agg tgt cat tg-3'

*ceh-13 ok737 allél szekvenáló / genomi PCR-hez / 'single worm' PCR-hez használt primerek:*

*Forward*: 5'-tga gct cca ctg aat gtt atg g-3'

*Reverse*: 5'-tat gac gaa cgg gtc ttt cc-3'

*tra-1(RNSi)*:

*Forward*: 5'-cta gct agc tag aca atc cgg agc atc tca ag-3'

*Reverse*: 5'-ggg gta ccc ctg atg atg ttg agc cag agc-3'

*fem-3(RNSi)*:

*Forward*: 5'-tcc ggg ttc aga tga tg tag-3'

*Reverse*: 5'-tca acc ggc gaa att tgt aac-3'

### **3.7. Statisztikai módszerek**

#### **3.7.1. A Q leszármazott sejtek pozíció-változásainak vizsgálata**

A vizsgált Q leszármazott neuronok helyzetének az elemzéséhez és a kapott statisztikai eloszlás grafikus ábrázolásához a MatLab software-t használtam.

#### **3.7.2. Vulva fenotípusok elemzése**

A vulva fenotípusok statisztikus analízisét és összehasonlítását (független t-teszt) az SPSS 14.0 software segítségével végeztem. Az adatok gyűjtése során fiatal felnőtt hermafroditákban (a 4.5. fejezetben leírt kísérleteknél interszex állatokban és XX/X0 hímekben is) számoltam a vulvák, illetve a (vulva prekursor sejtek aberráns osztódásának és differenciálódásának következményeként létrejövő) vulva-eredetű képződmények számát.

### 3.8. Filogenetikai elemzés

A *C. elegans* HOX fehérjék (aminosav szekvenciák: SwissProt) hasonlóságának a vizsgálatához a ClustalW software-t használtam (EBI: European Bioinformatics Institute honlapjáról ingyenesen letölhető és használható programcsomag).

A nukleotid szekvenciák illesztése és a rokonsági / leszármazási viszonyokat ábrázoló filogram készítése (filogenetikai távolságok kiszámolása és megjelenítése) az ún. Bayes filogenetikai módszer alapján, a MrBayes v3.1.2. software segítségével történt. (AC kódok: ceh-13: NM\_066254; lin-39: L19248; mab-5: AF277990; egl-5: L19247; nob-1: AF172090; php-3: AF172092)

## 4. Eredmények

### 4.1. A *C. elegans Hox* mutáns fenotípusok és *Hox* expressziós mintázatok összehasonlító elemzése

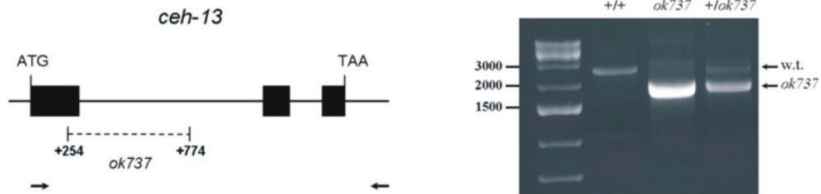
A *ceh-13* gén az anterior *Hox* ortológok képviselője *C. elegans*-ban. *Drosophila* ortológja a *labial*, legközelebbi emlős ortológja a *HoxB1* (Schaller és mtsi., 1990; Wittmann és mtsi., 1997; Brunschwig és mtsi., 1999), amelyek a kolinearitás szabályának megfelelően anterior testrészekben expresszálódnak és funkcionálnak; ezen a géneknek a funkcióvesztéses mutációi jellemzően az anterior testtájakon okoznak fejlődési rendellenességeket (McGinnis és Krumlauf, 1992; Iimura és Pourquie, 2007).

A fonálféreg *C. elegans*-ban a *ceh-13* működésének hiánya nem csupán az anterior testtájak fejlődési rendellenességét idézi elő, hanem magas penetrációjú (97%) életképtelenséget eredményez: a mutánsok közel fele embrióként, másik fele L1 lárvaként pusztul el (Brunschwig és mtsi., 1999). Érdekes módon a populációban előfordulnak túlélő, ún. *escaper* egyedek, amelyek az embriogenezis és életképesség szempontjából esszenciális *ceh-13* aktivitás hiányában is képesek fertilis felnőtt egyedekké kifejlődni. Ismert továbbá, hogy a *ceh-13* expressziója embrionálisan – a kolinearitás szabályától eltérően – a test csaknem teljes hosszára kiterjed és átfed a szomszédos *Hox* paralógok expressziós doménjával (Brunschwig és mtsi., 1999). Mindezek a megfigyelések felvetik annak a lehetőségét, hogy genetikai kölcsönhatás állhat fenn a *ceh-13* és a *C. elegans Hox* kluszter más tagjai között. A *ceh-13* más *Hox* paralógokkal való kapcsolatának vizsgálata céljából elemzést végeztem a *C. elegans Hox* mutáns fenotípusok, valamint a *Hox* expressziós mintázatok összehasonlítására.

#### 4.1.1. A *ceh-13 ok737* alléljának jellemzése

A *ceh-13* egyedfejlődési funkciójának tanulmányozásához két funkcióvesztéses allélt használtam. Munkám kezdetekor az *sw1* allélt hordozó *ceh-13* mutáns törzs állt csak a rendelkezésemre. Az *sw1*-ről kimutatták, hogy funkcionálisan egy genetikai null allélnak tekinthető (Brunschwig és mtsi., 1999). Később a *ceh-13*-nak egy másik – a *C. elegans Gene Knockout Consortium* által előállított - mutáns allélját (*ok737*) balanszált rendszerben hordozó

törzset (VC509) is sikerült beszerezniünk. Ebből a rendszerből izoláltam a homozigóta *ceh-13(ok737)* mutáns törzset. Mivel az *ok737* mutációnak a gén működését befolyásoló hatásáról semmiféle információ nem állt rendelkezésre, vizsgálatokat végeztem a mutáció molekuláris természetének a meghatározására. A mutáns allél megszekvenálásával kimutattam, hogy az *ok737* egy deléciós allél, amelyből hiányzik a *ceh-13* gén első exonjának és első intronjának nagy része (**16. ábra**). Ez a delécia a leolvasási keret eltolódását eredményezi (*frame-shift*), ami 26 bázispárral a deléciós töréspont után egy korai stop kodon kialakulásához vezet. Brunswick és munkatársai korábban az *sw1* allél esetében igazolták, hogy a *ceh-13* első exonja önmagában nem elégséges a géntermék létrehozásához: Southern-blot analízissel nem tudtak átíródott *ceh-13* mRNS-t kimutatni (Brunswick és mtsi., 1999). Ezen információ alapján azt feltételeztem, hogy az *ok737* szintén egy genetikai null allélnak tekinthető.



**16. ábra.** A *ceh-13(ok737)* allél molekuláris szerkezete. A bal oldali panelen a sötét négyzetek az exonokat, a közöttük lévő vonalak pedig az intronokat jelölik. A szaggatott vonal az *ok737* delécia kiterjedését mutatja. A számok a delécia kezdeti és végpontját adják meg bázispárookban az ATG translációs startkodonhoz helyzetéhez képest. A nyilak a PCR-hez használt primerek helyét jelölik. A jobb oldali panelen egy vad típusú (+/+), egy *ceh-13* heterozigóta (+/*ok737*) és egy homozigóta *ceh-13(ok737/ok737)* mutáns freg genomjából PRC segítségével felszaporított *ceh-13* gént kódoló DNS-szekvenciaregiónak látható, 1%-os agaróz gélen megfuttatva és etídiumbromiddal megfestve (UV megvilágítás alatt).

Az *ok737* mutáció fenotípusos elemzését is elvégeztem. E során azt tapasztaltam, hogy a homozigóta *ceh-13(ok737)* mutáns állatok súlyos fejlődési és morfológiai rendellenességeket mutatnak, ami embrionális és korai lárvális életképtelenséggel párosul. A mutánsok 96%-a embrióként, illetve korai lárvastádiumokban (L1-L2) megrekedve pusztult el (**1. táblázat**).



Genotípus	N <sup>a</sup>	Embriionális életképtelenség	Lárvális életképtelenség <sup>b</sup>	Kifejlett egyedek (escaperek)
vad típus	763	0%	0%	100%
<i>ceh-13(ok737)</i>	647	38%	58%	4%
<i>ceh-13(sw1)</i>	534	40%	57%	3%
<i>ceh-13(sw1)*</i>	x <sup>c</sup>	42%	55%	3%

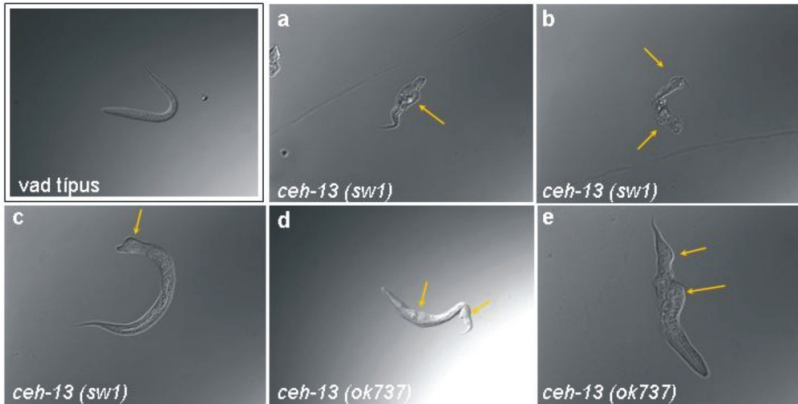
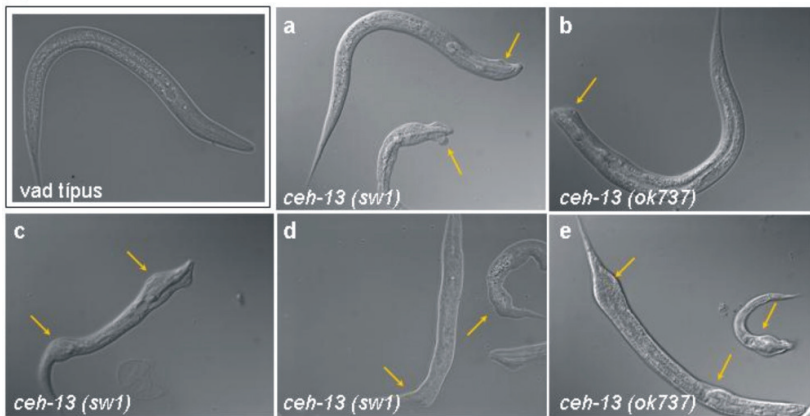
**1. táblázat. *ceh-13(-)* mutánsok életképessége.** A táblázat a *ceh-13(-)* mutánsok túlélési százalékos túlélését mutatja embrionális és korai lárvális egyedfejlődési stádiumokban. Kontrollként a vad típus túlélése látható. Egyedszám (N<sup>a</sup>): vad típusnál 3 db, *ceh-13(-)* törzseknél 15 mama utódai. Lárvális életképtelenség<sup>b</sup>: a lárvák túlnyomórészt L1-L2 lárvastádiumokban rekednek meg, kevés egyed éri el az L3-L4 egyedfejlődési stádiumot. A „\*“-gal jelölt adatok a *ceh-13(sw1)* mutáns törzs eredeti leírásából származnak (Brunschwig és mtsi., 1999). „c”:<sup>c</sup> 9 hermafroditának az utódai, pontos egyedszám nem közölt az eredeti cikkben. Az elemzés 25°C-on készült.

Az elpusztult embriók és lárvák súlyos abnormális morfológiával rendelkeztek. A túlélő (kifejlődő) felnőtt mutánsok kevésbé súlyos morfológiai deformításokat mutattak, - a vad típushoz képest fertilitásuk csökkent, testméretük kisebb, mozgásuk lassabb volt, mint a normál állatoké, valamint hosszabb kifejlődési idő jellemezte őket. A *ceh-13(ok737)* mutánsokon megfigyelhető egyedfejlődési és morfológiai rendellenességek csaknem teljesen megegyeztek a *ceh-13(sw1)* mutánsok által mutatott fenotípusos jegyekkel (Brunschwig és mtsi., 1999). Ez szintén azt a feltételezést támasztja alá, hogy az *ok737* a *ceh-13* egy genetikai null mutációjának tekinthető.

#### 4.1.2. A pleiotróp *Ceh-13(-)* fenotípus elemzése és összevetése más *C. elegans Hox* mutáns fenotípusokkal

A *ceh-13(-)* mutánsok fenotípusos elemzése során azt tapasztaltam, hogy a vizsgált egyedekben a test elülső régiójának morfológiai deformitása mellett a középső és hátsó testtájakon is megfigyelhetők fejlődési rendellenességek. A fejlődésben megrekedt *ceh-13(-)* embriók és korai L1 lárvák 70-80%-a súlyos, a poszterior testtáját is érintő morfológiai rendellenességeket mutattak, amely emlékeztetett a poszterior *Hox* paralóg, *nob-1* inaktiválása által okozott mutáns fenotípusra (17. ábra, 2. táblázat). A túlélő és felnőtté kifejlődő *ceh-13(-)* escaperek 7%-a szintén morfológiai deformításokat mutatott a test hátsó régiójában (17. ábra). Ezekben a

mutáns állatokban – bár kis penetranciával - a középső testtájon is előfordultak fejlődési rendellenességek. A *ceh-13(-)* mutáns hermafroditákban különböző vulva fenotípusokat figyeltem meg: a vulva hiányos (Vul), kiforduló vulva (Pvl) és több vulva (Muv) fenotípusokat. A *ceh-13(-)* mutánsokra szintén jellemző volt az embrió lerakás képtelenség (*egg laying defective*, Egl): ezt a fenotípust feltehetően a vulvaszövet felépítésének az abnormalitása, vagy alternatívaként a vulva izomzatának rendellenes beidegzése okozhatta. Ezek a mutáns fenotípusok hasonlítanak a *lin-39* középső homológ és *egl-5* poszterior homológ *Hox* gének mutációi által okozott fenotípusos jegyekre: a *lin-39(-)* null mutánsoknak nincs vulvájuk (Vul), míg a hipomorf allélok esetében kis penetranciával Muv fenotípus is megjelenhet, az *egl-5* gén mutációja pedig 100%-os penetranciájú Egl fenotípust eredményez (Ferreira és mtsi., 1999; Takács-Vellai és mtsi., 2007). A *ceh-13(-)* mutáns hímek esetében megfigyelhető volt a hím pároszerv működésének a rendellenessége is, ami emlékeztet a *mab-5* mutációs inaktiválása által okozott Mab fenotípusra (Chow és Emmons, 1994; Stoyanov és mtsi., 2003). A megfigyelt mutáns fenotípus azonban feltehetően eltérő fejlődési rendellenességekre vezethető vissza a *ceh-13(-)*, mint a *mab(-)* deficiens hímek esetében (**2. táblázat**).

**A****B**

**17. ábra. A pleiotróp *Ceh-13*<sup>-</sup> fenotípus.** (A) Az L1 lárvastádiumban megrekedő *ceh-13*<sup>-</sup> mutánsok abnormalis morfológiája (a-b). Az L2 lárvastádiumba továbbfejlődő lárvák az elülső testrészekben mutatnak morfológiai rendellenességeket (c-e panelek), de esetenként a középső és hátsó testtájakon is előfordulnak deformitások (d-e). (B) Az L3-L4 stádiumú lárvákon, illetve kifejlett állatokon megfigyelhető fejlődési rendellenességek a test feji (a-e) és farki régiójában (c-e). A morfológiai defektusok sárga nyilakkal jelölve a képeken. A fotók Nomarski optikával készültek.

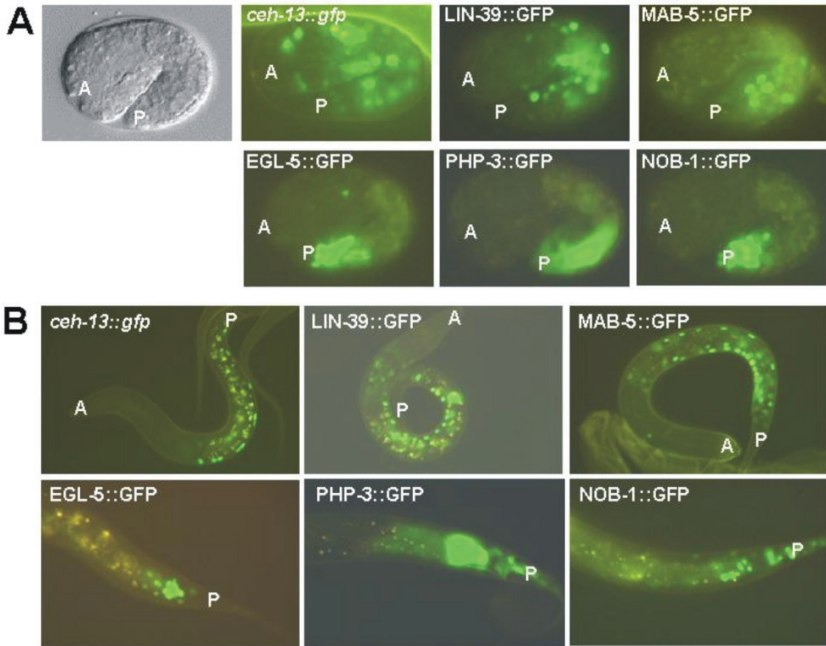
Genotípus	Fenotípus	Penetrancia	Genotípus	Fenotípus	Penetrancia
<i>ceh-13(-)</i>	Embrionális életképtelenség	~97%	<i>nob-1(-)</i>	Embrionális életképtelenség	~97%
	Anterior testtájak morfológiai defektusai	~99%		<i>nob-1(-)</i>	Poszterior testtájak morfológiai defektusai
	Poszterior testtájak morfológiai defektusai ( <i>escaperek</i> ) <sup>a</sup>	7%	<i>lin-39(-)</i>		Nincs vulva
	Nincs vulva	0,8%		<i>lin-39(-)</i>	Több vulva
	Kiforduló ( <i>protruded</i> ) vulva	8%	<i>egl-5(-)</i>		Embrió lerakás képtelen
	Több vulva	0,2%	<i>mab-5(-)</i>	Hím páرزószerv abnormalitása	100%
	Embrió lerakás képtelen	14%			
	Hím páرزószerv abnormalitása	megfigyelt*			

**2. táblázat. A pleiotróp *Ceh-13(-)* fenotípus különböző aspektusainak összetevése más *C. elegans Hox(-)* mutáns fenotípusokkal.** A táblázat bal oldalán a *ceh-13(-)* mutánsok fenotípusos jegyei vannak felsorolva. N=400. <sup>a</sup>: a táblázatban megadott adat a poszterior morfológiai defektusokat mutató túlélő, felnőtt egyedek (*escaperek*) arányát adja meg. Embrióként vagy korai lárvastádiumban elpusztuló mutánsok nagy részénél a test egészének a morfológiája (mind az anterior, mind a poszterior régió) abnormális. <sup>\*\*</sup>: ref.: Stoyanov és mtsi., 2003. A táblázat jobb oldalán a *C. elegans Hox* kluszter azon tagjai vannak feltüntetve, amelyek mutációs inaktiválása a *Ceh-13(-)* fenotípus különböző aspektusaival megegyező mutáns fenotípust eredményez. <sup>\*\*\*</sup>: *lin-39(-)* hipomorf allélok esetében megfigyelt Muv fenotípus; ref.: Takács-Vellai és mtsi., 2007.

#### 4.1.3. A *C. elegans Hox* gének embrionális és lárvális expressziójának összehasonlítása

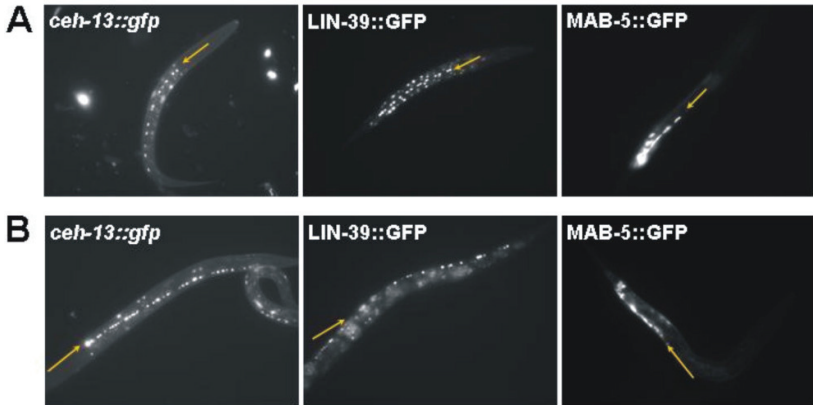
A *C. elegans Hox* gének expressziójának tanulmányozásához és összehasonlításához, az egyes *Hox* génekre specifikus translációs fúziós (funkcionális) GFP riportergén-konstrukciókat használtam. A *ceh-13::gfp*, *LIN-39::GFP*, *MAB-5::GFP* és *EGL-5::GFP* konstrukciókat hordozó transzgenikus törzsek egy részéhez Dr Vellai Tibor, Prof. Alex Hajnal, Prof. Cynthia Kenyon és Henrique B. Ferreira segítségével jutottam hozzá. A poszterior *Hox* paralóg *nob-1* és *php-3* gének esetében magam készítettem translációs fúziós GFP konstrukciókat. Korai egyedfejlődési stádiumokban (ún. *comma stage* embrió és L1 stádiumú lárva) vizsgáltam az egyes *Hox* gének expressziós mintázatát.

*comma* állapotú embriókban és L1 stádiumú lárvákban jól látszik, hogy a *C. elegans Hox* kluszter tagjai a genomi pozíciójuknak megfelelő sorrendben, egymást követő doménokban expresszálódnak a test hossz tengelye mentén (**18. ábra**). A *lin-39* gén a középső testtájon expresszálódik, doménja mind embrionális, mind korai (L1-L2) lárvastádiumokban széles kiterjedést mutat. Az állatok testének középső-poszterior részén *mab-5* expresszió figyelhető meg, amely részleges átfedést mutat a szomszédos *lin-39* doménjának poszterior régiójával. Az *egl-5*, *nob-1* és *php-3* gének a poszterior testtájon, főleg a farkokban expresszálódnak (**18. ábra**). Az anterior homológ *ceh-13* gén expressziója – a kluszter többi tagjától eltérő módon – a test csaknem teljes hosszára kiterjed. *comma* állapotú embriókban a *ceh-13* expressziója átfed a kluszter összes többi tagjának - beleértve az *egl-5*, *nob-1* és *php-3* poszterior *Hox* paralógokat is – az expressziós doménjával (**18.A ábra**). Jóllehet ez az expresszió erőteljesebb (több sejtben) a test anterior és középső régiójában. Korai (L1-L2) lárvastádiumokban az expressziós mintázatokban való átfedés legjellemzőbben a *ceh-13* és a középső homológ *Hox* paralógok (*lin-39* és *mab-5*) viszonylatában figyelhető meg (**18.B ábra**). A kluszter többi tagjánál az egymást követő expressziós doménok poszterior-anterior határainál tapasztalható részleges - kis mértékű – átfedés.



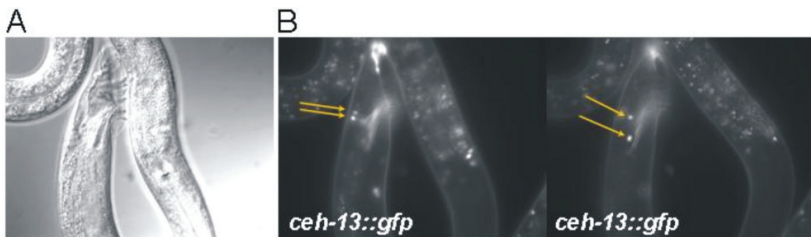
18. ábra. A *C. elegans* *Hox* gének expressziós mintázata. HOX::GFP riporter-konstrukciók expressziós mintázata embrionális (A) és L1 lárvastádiumokban (B). A: anterior, P: poszterior; a sárga pöttyök a bél autofluorescens granulumait jelölik.

A *ceh-13*, *lin-39* és *mab-5* expressziós domének sorrendje, illetve egymással való átfedése jól megfigyelhető olyan sejtípusokban, amelyek az állatok testének az egész hosszában megtalálhatóak. Ilyenek például a V sejtek és a belőlük leszármazó epidermális varrat- (*seam*) sejtek láncolata, valamint a P ektodermális prekurzor sejtek és leszármazottaik (a Pn.p epidermális és Pn.a neuronális sejtvonalak prekurzorai). A Pn.a neuroblasztok leszármazottai alkotják a hasdúclánc (*ventral nerve cord*) neuronjait a kifejlett egyedekben. A hasdúclánc idegsejtjeiben mind a *ceh-13*, mind a *lin-39* expresszálódik. A farokhoz közel található poszterior neuronokban pedig *MAB-5::GFP* expresszió figyelhető meg (19. ábra). Ez az expresszió kifejlett korban is hosszú ideig megmarad, nem korlátozódik kizárólag korai egyedfejlődési stádiumokra.



19. ábra. A *ceh-13*, *lin-39* és *mab-5* expressziója L1 és L2 stádiumú lárvákban. Egyes, az állatok testének az egész hosszában előforduló bizonyos sejtípusokban a *ceh-13*, *lin-39* és *mab-5* gének részben egymást követő, részben egymással átfedő doménokban expresszálódnak. Ilyen sejtípusok (A) a P ektodermális prekursor sejtek a korai L1 stádiumú lárvákban (a bal oldali és középső paneleken a sárga nyílal mutatott közepén látható egyenes sejtsor, a jobb oldali panelen a sárga nyíl által mutatott ventrálisan elhelyezkedő sejtek) vagy (B) a Pn.a neuronális prekursor sejtek és az ezekből leszármazó, a hasdúc láncot alkotó idegsejtek későbbi egyedfejlődési stádiumokban (a sárga nyilakkal jelölt egyenes sejtsorok). A három gén közötti összehasonlításban jól látszik, hogy a *ceh-13* és a *lin-39* expressziója nagy mértékű átfedést mutat e sejtípusokban és kevésbé fednek át a *mab-5* doménjával.

A hasdúc lánc neuronjainak a példája jól mutatja, hogy a *ceh-13* expressziója nem korlátozódik az anterior testtájra. *ceh-13::gfp* expresszió még a fejlődő és kifejlett hím egyedek farki neuronjaiban is megfigyelhető (20. ábra) (Stoyanov és mtsi., 2003).



20. ábra. *ceh-13::gfp* expresszió a poszterior testtáján. (A) Egy kifejlett, vad típusú háttérben *ceh-13::gfp* riporter-konstrukciót hordozó transzgénikus hím egyed farki régiójának Nomarski optikával készült fotója. (B) UV megvilágítás alatt *ceh-13::gfp* pozitív idegsejtek (sárga nyilakkal jelölve) figyelhetők meg ebben az állatban.

Az expressziós analízis eredménye azt igazolta, hogy térben és időben leginkább a középső *Hox* paralóg csoportba tartozó *lin-39* és *mab-5* géneknek expressziós doménja (a *mab-5*-é kisebb részben) fed át a *ceh-13* doménjával. További munkám során e három génre (*C. elegans Hox* kluszter első három tagjára) összpontosítottam.

## 4.2. A *ceh-13*, *lin-39* és *mab-5* gének genetikai kölcsönhatásainak a tanulmányozása

### 4.2.1. A *ceh-13(-)lin-39(-)* és *ceh-13(-)lin-39(-)* kettős mutánsok szintetikus fenotípusa

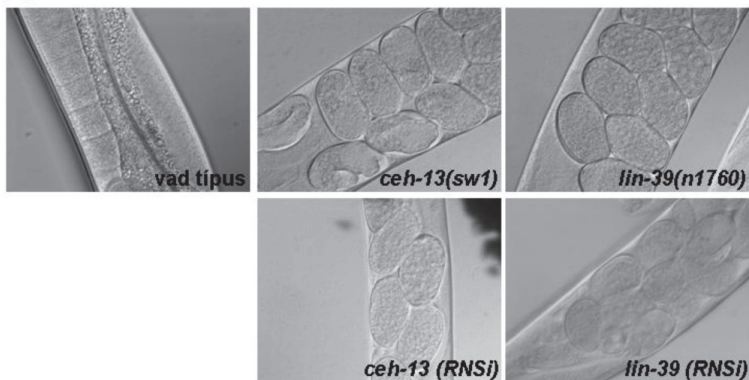
A *ceh-13* funkcióvesztéses mutációk súlyos egyedfejlődési és morfológiai rendellenességeket okoznak. A *lin-39(n1760)* és a *mab-5(e1239)* mutáns állatok azonban fertilis felnőtté fejlődnek. E gének inaktiválása a mutáns egyedek túlélését, növekedésének ütemét és szaporodóképességét nem befolyásolja, ellenben a párzószervek abnormális működését eredményezi. A felsorolt mutáns fenotípusok miatt viszonylag nehéz volt a vizsgált mutáns törzsek keresztezése. Ezért *RNSi* konstrukciókat terveztem a *ceh-13* és *lin-39* gének funkciójának a csökkentésére. Az általam előállított *Hox RNSi*-k működését vad típusú állatokkal teszteltem. A kontroll kísérletekben a *ceh-13*, illetve *lin-39 RNSi*-vel kezelt hermafroditák F1 utódai *ceh-13*-, illetve *lin-39*-specifikus mutáns fenotípust mutattak. A fenokópiák kis penetranciával [az F1 generáció 9% [*ceh-13(RNSi)*], illetve 17%-ban [*lin-13(RNSi)*] nyilvánultak meg (a *Hox* mutáns és *Hox RNSi* kezelés által okozott fenotípusokat a **3. táblázat** foglalja össze). *lin-39(n1760)* genetikai null mutáns állatokban a *ceh-13 RNSi* kezelés drasztikus morfológiai elváltozásokat és 100%-os embrionális életképtelenséget eredményezett a kezelt állatok F1 utódnemzedékében (**3. táblázat, 21. ábra**). Hasonló hatást váltott ki a *lin-39 (RNSi)* kezelés *ceh-13(sw1)* mutáns állatokban (**3. táblázat, 21. ábra**). A *ceh-13(RNSi)*-vel kezelt *mab-5(e1239)* mutánsok F1 utódai között szintén nagymértékű (94%-os) embrionális életképtelenséget tapasztaltam (**3. táblázat**).



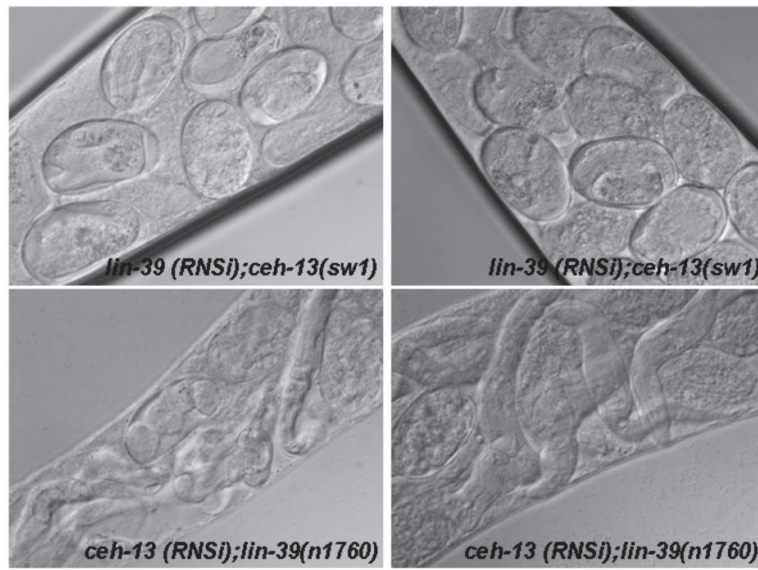
Genotípus	Fenotípus	Penetrancia
<i>ceh-13 (sw1)</i>	Embrionális életképtelenség;	97%
	kifejlődő egyedek ( <i>escaperek</i> ): elülső testtájak fejlődési rendellenességei	3%
<i>ceh-13 (RNSi)</i>	Embrionális életképtelenség	9%
<i>lin-39 (n1760)</i>	Nincs vulva	100%
<i>lin-39 (RNSi)</i>	Nincs vulva	17%
<i>mab-5 (e1239)</i>	Hím párzószerv abnormalitása	100%
<i>ceh-13 (RNSi); lin-39 (n1760)</i>	Embrionális életképtelenség	100%
<i>lin-39 (RNSi); ceh-13 (sw1)</i>	Embrionális életképtelenség	100%
<i>ceh-13 (RNSi); mab-5 (e1239)</i>	Embrionális életképtelenség	94%

**3. táblázat. *Hox* deficiens és *Hox RNSi* kezelés hatására létrejövő szintetikus fenotípusok.** A *ceh-13(sw1)* mutáció 97%-os embrionális vagy korai lárvális életképtelenséget okoz. A túlélő és kifejlődő *ceh-13(-)* mutáns egyedeken főleg az anterior (ritkán poszterior) testtájakon morfológiai rendellenességek figyelhetők meg. A *lin-39* és *mab-5* gének inaktiválása jellemzően 100%-os penetrációjú ivar-specifikus egyedfejlődési defektusokat eredményez. *ceh-13(RNSi)* és *lin-39(RNSi)* állapotban kis penetrációjú fenokópia tapasztalható. A *ceh-13* inaktiválása (*RNSi*) *lin-39(-)* vagy *mab-5(-)* mutáns állapotban, illetve a *lin-39* inaktiválása (*RNSi*) *ceh-13(-)* mutánsokban teljes penetrációjú embrionális életképtelenséget okoz. Vizsgált egyedszám: *Hox* mutánsok  $N \geq 200$ ; *RNSi*: egy *RNSi* kezelés esetében 15 db hermafrodita F1 utódait vizsgáltam, a kísérleteket több független ismétléssel végeztem.

A



B



21. ábra. A *ceh-13* és *lin-39* együttes inaktiválása által okozott szintetikus fenotípusok. (A) A bal felső panelen egy vad típusú hermafrodita csírvavonalának egy része látható. A megtermékenyített petesejteket a mama lerakja. *ceh-13(sw1)* és *lin-39(n1760)* mutánsok, valamint *ceh-13(RNSi)* és *lin-39(RNSi)* állatokban az embriók felhalmozódnak a mama testében, de nagyrészt normális morfológiát mutatnak. A *ceh-13* és *lin-39* egyidejű inaktiválása [*lin-39(RNSi);ceh-13(sw1)* és *ceh-13(RNSi);lin-39(n1760)* állatok] az F1 utódnemzedék teljes életképtelenségét eredményezi; a hermafroditák testében látható embriókon és L1 stádiumú lárvákon drasztikus morfológiai elváltozások, egyedfejlődési rendellenességek figyelhetők meg.

#### 4.2.2. A *ceh-13* mutánsok életképtelensége és morfológiai abnormalitása szupresszáható hiperaktív *lin-39* és *mab-5* funkciókkal

A 4.1.3. fejezetben használt funkcionális LIN-39::GFP, illetve MAB-5::GFP konstrukciókat hordozó transzgenikus törzseket kereszteztem össze *ceh-13(sw1)* mutáns állatokkal. Az így létrehozott törzsek a *lin-39*, illetve a *mab-5* gének extra kópiáit hordozzák *ceh-13(-)* mutáns háttérben. Rendelkezésemre állt továbbá egy *mab-5* - a gén spontán megkettőződésével keletkezett - funkciónyeréses mutációt (*e1751gf*) hordozó homozigóta mutáns törzs (Alper és Kenyon, 1992). Az *e1751gf* mutációról Kenyon és munkatársai kimutatták, hogy a *mab-5* természetes úton történő 'overexpresszióját' és a róla képződő MAB-5 fehérje mennyiségének a megnövekedését idézi elő. Az *e1751gf* allélt hordozó mutánsokat szintén kereszteztem össze *ceh-13(sw1)* mutáns állatokkal, így létrehozva egy *mab-5(e1751gf);ceh-13(sw1)* kettős mutáns törzset. Az említett törzsekben vizsgáltam az állatok túlélését az egyedfejlődés különböző stádiumaiban. 25°C-on azt tapasztaltam, hogy a *mab-5(e1751gf)* mutáció jelentősen megnövelte a túlélő és felnőtté kifejlődő *ceh-13(sw1)* mutáns egyedek számát és csökkentette az embrionális és lárvális életképtelenséget (**4. táblázat**). A LIN-39::GFP konstrukció jelenléte az embrionális életképtelenséget növelte, míg a lárvális letalitást csökkentette *ceh-13(-)* mutánsokban (**4. táblázat**). A funkcionális MAB-5::GFP konstrukció nem változtatta meg jelentősen a *ceh-13(sw1)* mutáns állatok túlélését (ezért nem tüntettem fel a táblázatokban). 20°C-on azonos tendenciát tapasztaltam az életképesség és túlélés változásában a vizsgált törzsek összehasonlítása során (mindössze az alacsonyabb hőmérséklet eredményeként a túlélési arányok nagyobbak voltak) (**4. táblázat**).

## A

Genotípus	N <sup>a</sup>	Embriionális életképtelenség	Lárvális életképtelenség <sup>b</sup>	Kifejlett egyedek
vad típus	15/1132	0%	0%	100%
<i>ceh-13(sw1)</i> <sup>*</sup>	9/x <sup>c</sup>	42%	55%	3%
<i>ceh-13(ok737)</i>	15/546	38%	58%	4%
<i>mab-5(e1751gf)</i>	15/713	1%	0%	99%
LIN-39::GFP	15/988	13%	0,2%	86%
<i>ceh-13(sw1); mab-5(e1751gf)</i>	15/675	3%	30%	37%
<i>ceh-13(sw1); LIN-39::GFP</i>	15/603	56%	22%	22%

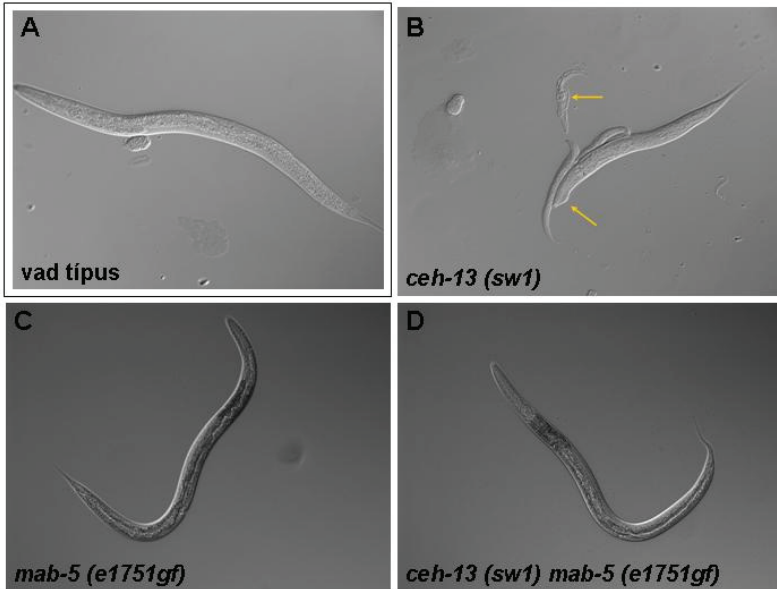
## B

Genotípus	N <sup>a</sup>	Embriionális életképtelenség	Lárvális életképtelenség <sup>b</sup>	Kifejlett egyedek
vad típus	15/1169	0%	0%	100%
<i>ceh-13(sw1)</i>	15/525	34%	51%	15%
<i>ceh-13(ok737)</i>	15/575	26%	56%	18%
<i>mab-5(e1751gf)</i>	15/789	1%	0%	99%
LIN-39::GFP	15/1087	9%	0,2%	90%
<i>ceh-13(sw1); mab-5(e1751gf)</i>	15/712	24%	33%	43%
<i>ceh-13(sw1); LIN-39::GFP</i>	15/943	42%	17%	41%

4. táblázat. A *mab-5(e1751gf)* mutáció és a LIN-39::GFP transzgén hatása a *ceh-13* null mutáns állatok túlélésére. *ceh-13(sw1)* mutánsok mindössze 3-4%-a fejlődik ki, az állatok nagy része embrióként vagy korai lárvaként elpusztul. A *mab-5(e1751gf)* mutáció, illetve LIN-39::GFP transzgén megnövelte a túlélő *ceh-13(-)* mutáns egyedek számát, és csökkentette az embriionális és lárvális életképtelenséget. Ez a tendencia 25°C-on (A panel) és 20°C-on (B panel) egyaránt megfigyelhető. Érdekes módon, a *ceh-13(sw1);LIN-39::GFP* genotípusú törzs esetében az embriionális életképtelenség növekedett. Egyedszám (N<sup>b</sup>): mama/utód; az elemzéshez vad típusnál 3, *ceh-13(-)* mutáns törzsek esetében 15 L4 lárvastádiumban lévő hermafroditát raktam szét egyesével külön lemezre és az utódaikat számoltam. A kifejlett hermafroditák által lerakott tojások száma nagy szórást mutatott (14-113 db). Lárvális életképtelenség<sup>b</sup>: a lárvák túlnyomórészt L1-L2 lárvastádiumokban rekedtek meg, kevés egyed érte el az L3-L4 egyedfejlődési stádiumot. A „<sup>87</sup>”-gal jelölt adatok a *ceh-13(sw1)* mutáns törzs eredeti

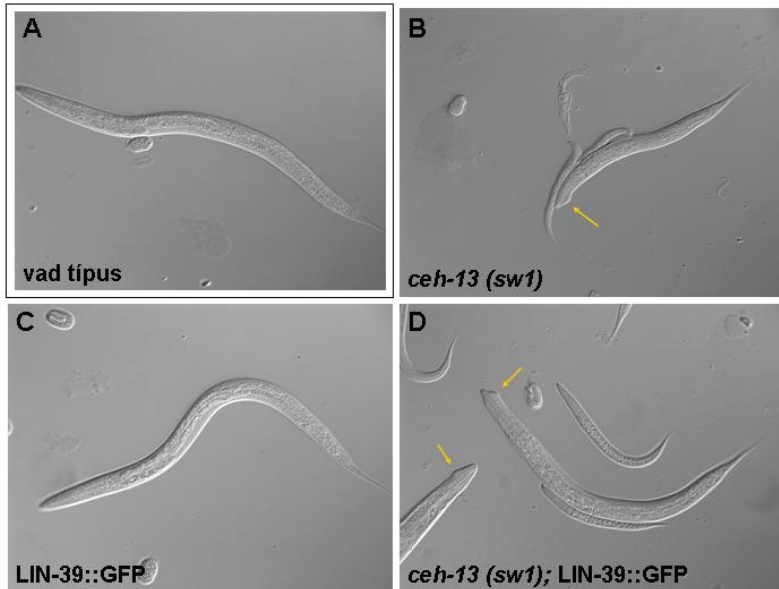
leírásából származnak (Brunschiwíg és mtsi., 1999). „c”: 9 hermafrodita utódai, pontos egyedszám nem közölt az eredeti cikkben.

*ceh-13(-)* mutánsokban főleg az anterior, ritkábban a poszterior testtájakon figyeltem meg morfológiai elváltozásokat. Ilyen defektusok a *mab-5(e1751gf);ceh-13(sw1)* kettős mutánsokban csak mindössze 10%-ban jelentek meg és kizárólag csak az anterior testrészekben. A *mab-5(e1751gf);ceh-13(sw1)* kettős mutáns állatok fenotípusa sokkal jobban hasonlított a *mab-5gf* egyszeres mutánsokéhoz, mint a *ceh-13(-)* egyszeres mutánsokéhoz (ez közel vad típusú, ezért is nevezhetjük szuppresszióknak a jelenséget) (22. ábra). A kettős mutánsok növekedésének a sebessége is megegyezett a *mab-5(e1751gf)* egyszeres mutánsokéval. Ezzel ellentétben a *ceh-13(-)* mutánsok körülbelül hatszor annyi idő alatt fejlődtek ki, mint a vad típusú állatok.



22. ábra. A *mab-5(e1751gf)* mutáció szuppresszálja (menekíti) a *ceh-13(sw1)* mutáns állatok morfológiai defektusait. A kifejlődő *ceh-13(-)* mutánsokban gyakran figyelhetők meg morfológiai deformítások az elülső, ritkábban a középső és hátsó testtájakon (sárga nyilakkal jelölve). *ceh-13(sw1)mab-5(e1751gf)* kettős mutánsokban jelentősen csökkent a morfológiai abnormalitások penetranciája.

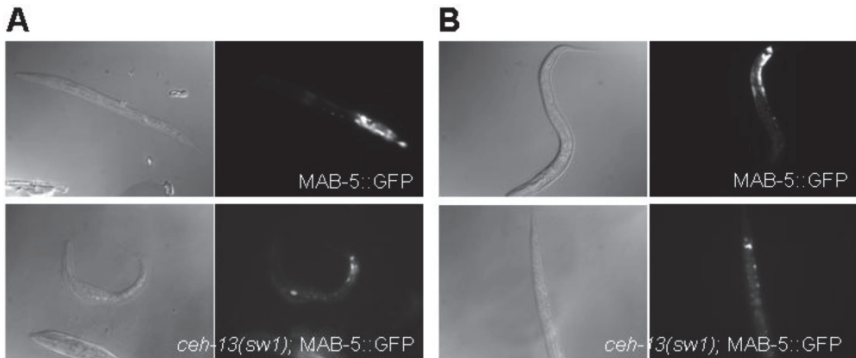
A *ceh-13(sw1); LIN-39::GFP* genotípusú állatokban a *lin-39* gén extra kópiája képes volt menekíteni a *ceh-13(sw1)* mutáns állatok ún. Dpy (*dumpy* – zömök testalkat) fenotípusát. Ezen állatokban elülső és középső testtájakon fordultak elő morfológiai deformitások (**22. ábra**). Különösen a fej abnormalis fejlődése gyakori (kinövések) volt gyakori, valamint a középső testtájon a *ceh-13(-)* mutánsokra jellemző Pvl fenotípus is számottevő volt (**23. ábra**). A poszterior testtájakon nem tapasztaltam morfológiai elváltozásokat a vizsgált egyedekben.



**23. ábra.** A *lin-39(+)* transzgén szuppresszálja a *ceh-13(sw1)* mutáns lárvák életképtelenségét. A LIN-39::GFP konstrukciót hordozó *ceh-13(sw1)* mutáns állatokban a *lin-39* gén extra kópiája menekíti a *ceh-13(sw1)* egyedek által mutatott Dpy (zömök testalkat) fenotípust, az elülső testtájak morfológiai abnormalitásait azonban nem szuppresszálja (sárga nyilakkal jelölve a B és D paneleken).

A LIN-39::GFP-t, illetve a MAB-5::GFP-t hordozó transzgénikus *ceh-13(sw1)* mutáns törzsekben megvizsgáltam, hogy tapasztalható-e eltérés a GFP expresszióban a vad típusú háttérhez képest. A LIN-39::GFP expresszió nem változott számottevően a *ceh-13* aktivitás hiányában. A MAB-5::GFP expresszió azonban jelentősen lecsökkent a *ceh-13(sw1)* mutáns lárvák poszterior régiójában, míg ektopikusan expresszáldott a mutáns lárvák feji-nyaki részein (**24. ábra**). Ez a megfigyelés felveti annak a lehetőségét, hogy a *ceh-13* direkt vagy indirekt módon szerepet játszik a *mab-5* expressziójának a szabályozásában bizonyos sejtípusokban. A

*C. elegans* *Hox* kluszter más tagjai esetében előfordul hasonló jelenség: például a *mab-5* és *egl-5* gének között *cross-regulatory interactions*-t írtak le (Ferreira és mtsi., 1999). A *Hox* gének egymás által történő transzkripció szabályozása nem ismeretlen más organizmusok esetében sem. Egereknél bonyolult hierarchikus szabályozási rend figyelhető meg a *Hox* kluszterek egészét, a klusztereken belüli kisebb egységek, valamint az egyes *Hox* paralógok transzkripcióját illetően. A gének expressziója függ mind a klusztteren belül elfoglalt pozíciójuktól, mind a kluszter többi tagjának a működésétől (Kmita és mtsi., 2000; Imura és Pourquie, 2007). Mivel azonban munkám fő célkitűzése nem a transzkripcionális szabályozás mechanizmusának a tanulmányozására irányult, nem folytattam további részletekbe menő vizsgálatokat ebben az irányban.



**24. ábra.** *mab-5* expresszió vad típusú vs. *cheh-13(-)* mutáns genetikai háttérben. L1 (A) és L2 lárvastádiumú (B) vad típusú lárvákban intenzív MAB-5::GFP expresszió figyelhető meg a test posterior részén a varratsejtekben, a P ektodermális prekursor sejtekben és azok leszármazottaiban (Pn.a neuronális sejtvonalak – hasdúcálc poszterior része), valamint a farokban található idegsejtek egy részében. *cheh-13(sw1)* mutáns állatokban a GFP expresszió intenzitása csökken, valamint kevesebb sejtben detektálható, mint vad típusban.

### 4.3. A *cheh-13* szerepe *lin-39* és *mab-5* által szabályozott posztembrionális egyedfejlődési folyamatokban

A *cheh-13* egyedfejlődési folyamatokban játszott konkrét szerepe szinte egyáltalán nem ismert. A *cheh-13* funkciójának, illetve a *lin-39* és *mab-5* génekkel való kölcsönhatásainak a tanulmányozása céljából vizsgáltam a *cheh-13* funkcióját olyan egyedfejlődési folyamatokban, amelyek a *lin-39* és *mab-5* gének által is szabályozottak. E folyamatok során számos esetben

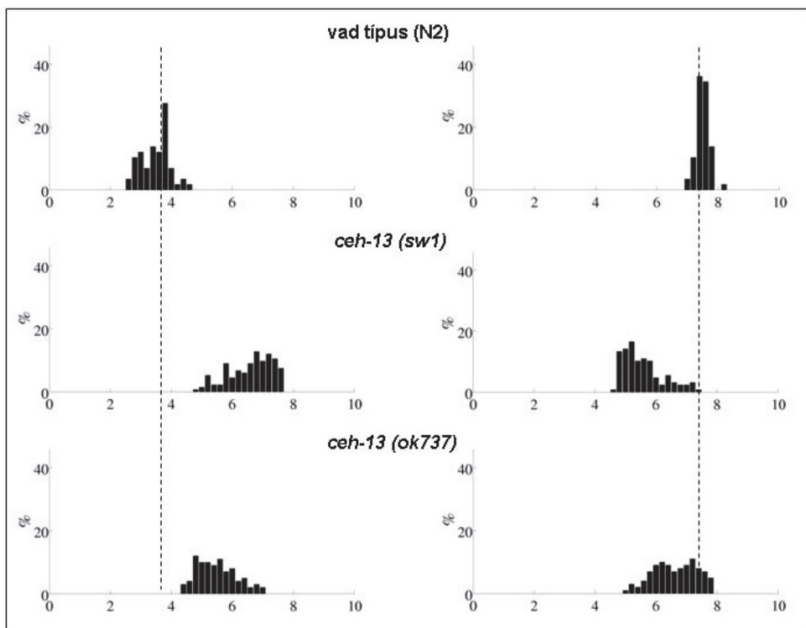
leírt, hogy a *Hox* kofaktor gének inaktíválása részben a *lin-39(-)* és *mab-5(-)* mutánsokétól eltérő fenotípust okoz. Ez felveti annak a lehetőségét, hogy az említett géneken kívül más *Hox* paralógok működése – így például a *ceh-13-é* – is hatással lehet a vizsgált folyamatok szabályozására.

#### 4.3.1. A Q leszármazott idegsejtek pozíciója *ceh-13(-)* mutánsokban

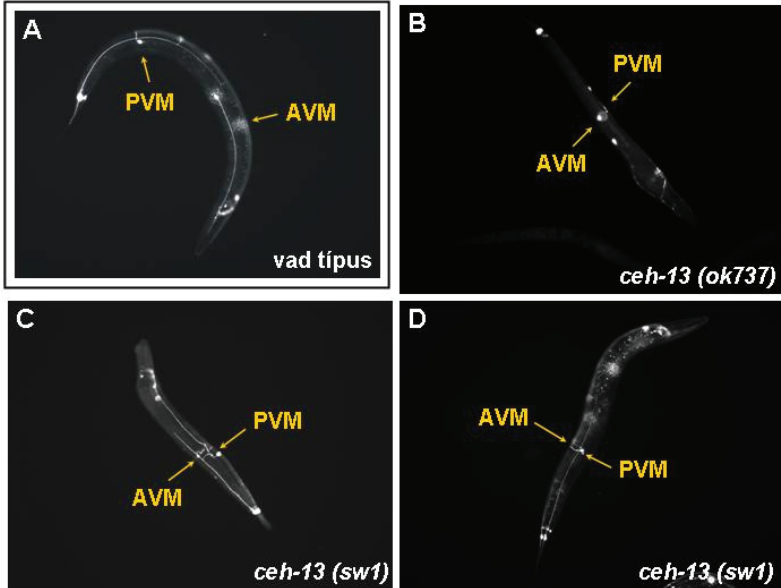
A *ceh-13* sejtváندorlásra gyakorolt potenciális hatásának vizsgálatára a Q neuronális sejt vonal modellrendszerrel választottam ki, amelyben jól ismert a középső paralóg csoportba tartozó *Hox* gének szabályozó szerepe (Clark és mtsi., 1993; Wang és mtsi., 1993). A Q leszármazott idegsejtek pozícióját határoztam meg és hasonlítottam össze vad típusú vs. *ceh-13(-)* mutáns háttérben. A sejtek vizualizálásához egy neuronális sejt sors-markert, a MEC-7::GFP-t, használtam, ami egy anterior (QR.paa) és egy posterior sejtet (QL.paa) jelöl a kifejlett állatokban megtalálható 6 db Q leszármazott idegsejt közül (Hamelin és mtsi., 1992).

Vad típusú genetikai háttérben a QR.paa sejt a kifejlett állat testének elülső részén található. *ceh-13* mutánsokban a QR.paa idegsejt a vizsgált egyedek mindegyikében a középső testtájon volt látható (**25-26. ábrák**). Ez a sejt tehát a vad típusban tapasztalható képest poszteriorabb pozíciót foglalt el (**25-26. ábrák**). A QL.paa sejt vad típusú állatokban poszterior a testrészen található. A *ceh-13* működésének hiánya a vizsgált mutánsok 22%-ban a QL.paa sejt pozíciójának anterior irányba való eltolódását eredményezte (**25-26. ábrák**). Ezekben az állatokban az eredetileg anterior helyzetű QR.paa és az eredetileg poszterior helyzetű QL.paa sejtek hasonlóan a test középső részén, csaknem egymás mellett helyezkedtek el (**25-26. ábrák**). Az *sw1* és *ok737* *ceh-13* mutációk tehát azonos módon befolyásolták ezen idegsejtek pozícióját.



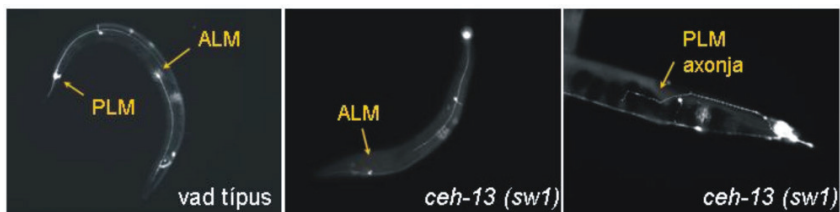


25. ábra. A QR.paa és QL.paa idegsejtek relatív pozíciója vad típusú vs. *ceh-13* mutáns állatokban. *ceh-13(sw1)* és *ceh-13(ok737)* homoizógóta mutánsokban az anterior QR.paa sejt a vad típusú pozícióhoz képest poszteriorabb pozícióban található. A poszterior QL.paa sejt pozíciója ezzel ellentétben anterior irányba tolódik el. Az eltérés mindkét esetben szignifikáns. Az 'X' tengely a vizsgált sejteknek az állatok hosszához viszonyított relatív helyzetét ábrázolja: a „0” az állat testének az anterior, a „10” szám a poszterior végét jelöli. Az 'Y' tengelyen a vizsgált sejtek százalékos aránya van megadva. A szaggatott vonal a QR.paa és QL.paa sejteknek vad típusú háttérben a legnagyobb valószínűséggel elfoglalt helyét jelöli.



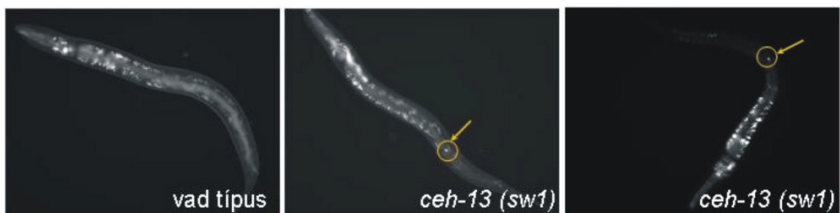
26. ábra. A QR.paa (AVM) és QL.paa (PVM) idegsejtek pozíciója vad típusú vs. *cheh-13* mutáns fiatal felnőtt állatokban. (A) Egy vad típusú állatban a QR.paa (AVM) sejt a test elülső, a QL.paa (PVM) sejt a test hátulsó részén helyezkedik el (az AVM és PVM sejtek sárga nyilakkal és felirattal jelölve). (B-D) *cheh-13* null mutáns háttérben mindkét sejt az eredeti vad típusú pozíciótól eltérő helyen, a test középső részén látható.

A *cheh-13* gén működése nemcsak a Q sejtvonalba tartozó idegsejtek vándorlását befolyásolja, hanem más neuronális sejtvonalakba tartozó sejtek helyzetének a meghatározására is hatással van. A MEC-7::GFP által jelölt ALM és PLM érzőneuronok helyzetében és fejlődésében szintén változást tapasztaltam *cheh-13* mutáns háttérben a vad típushoz képest. Vad típusú állatokban az ALM idegsejtek a test elülső-középső részén helyezkednek el és hosszú, egyenes lefutású axonnal rendelkeznek. A *cheh-13(sw1)* mutánsok 9%-ban (N=230) az ALM sejtek pozíciója anterior irányba tololódott el. A sejtek egészen a fej közelében helyezkedtek el, valamint axonjuk megrövidült. A vad típusban poszterior helyzetű PLM neuronok helyzetében nem tapasztaltam változást *cheh-13* deficiens állatokban, azonban a vizsgált mutáns egyedek 3%-ban (N=175) ezek a sejtek axonnövekedési defektusokat mutattak (27. ábra).



27. ábra. A *ceh-13* szabályozza az ALM és PLM idegsejtek pozícióját és axonnövekedését. Vad típusú állatokban az ALM neuron a test elülső-középső, a PLM neuron a test farki régiójában helyezkedik el és hosszú, egyenes lefutású axonnal rendelkezik (bal oldali panel). *ceh-13(-)* mutáns állatok 9%-ban az ALM neuronok a vad típusú pozíciójukhoz képest előrébb, a fej közelében található és axonja megrövidült (középső panel). *ceh-13(-)* mutánsokban a PLM neuronok esetében is megfigyelhetők axonnövekedési rendellenességek (jobb oldali panel). (Az ALM és PLM sejtek sárga nyilakkal és felirattal jelölve.)

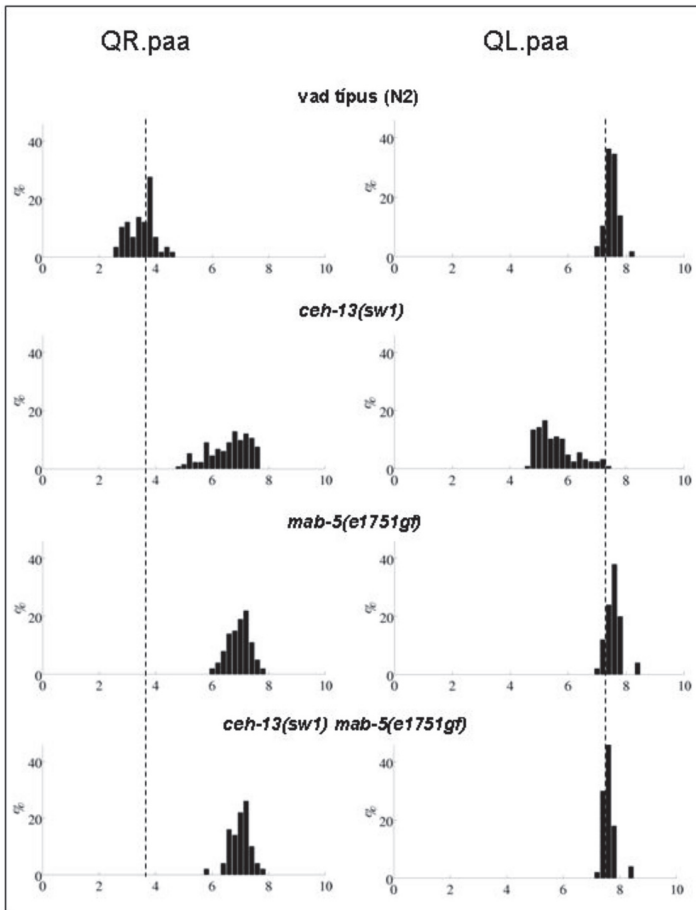
A TAX-4::GFP neuronális marker főként feji neuronokat, valamint egy farkban található poszterior idegsejtet jelöl vad típusú állatokban (nagyon gyenge expresszió detektálható a hasdúc-lánc poszterior idegsejteiben is) (Komatsu és mts., 1996). A vizsgált *ceh-13(-)* mutánsok 11%-ban (N=183) TAX-4::GFP-pozitív sejteket figyeltem meg a test olyan pontjain, ahol vad típusban egyébként nem láthatóak (28. ábra).



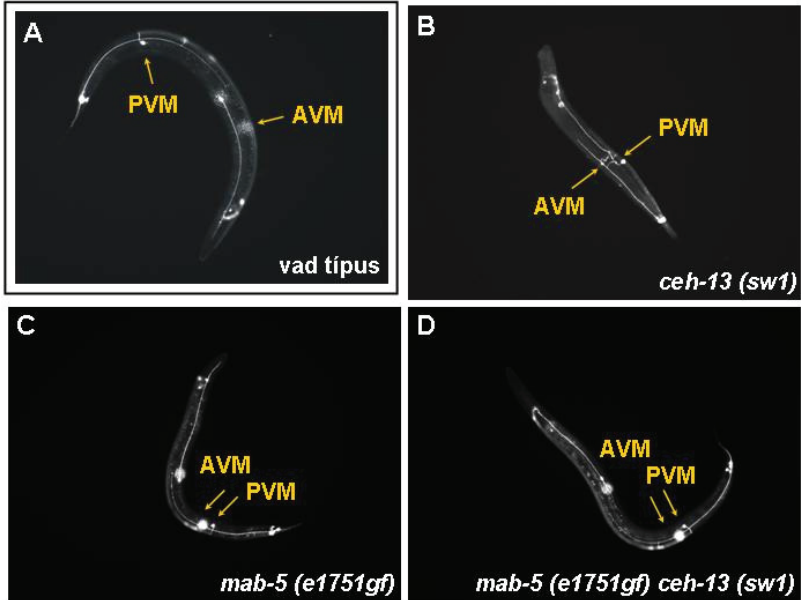
28. ábra. TAX-4::GFP által jelölt idegsejtek pozíciója vad típusú és *ceh-13(-)* mutáns genetikai háttérben. Egy TAX-4::GFP neuronális marker vad típusú állatokban a garat környéki régióban található neuronokat, illetve 1 darab farki idegsejtet jelöl (bal oldali panel). A *ceh-13* aktivitásának hiányában ektopikus TAX-4::GFP expresszió figyelhető meg (sárga nyíllal jelölve és bekarikázva a középső és jobb oldali paneleken).

A *ceh-13* és a *mab-5* gének lehetséges redundáns működésének a tanulmányozása során azt is megvizsgáltam, hogy a *mab-5* funkcionyeréses mutációja befolyásolja-e *ceh-13(-)* mutánsokban a Q leszármazott idegsejtek esetében megfigyelhető sejt-vándorlási defektusokat. Vad típusú állatokban a *mab-5* gén a test poszterior részén található QL sejtben és leszármazottaiban expresszálódik és azok vándorlását szabályozza (Salser és Kenyon, 1993). A

*mab-5* aktivitás hiányában ezek a sejtek poszterior helyett anterior testtájuk felé vándorolnak. *mab-5(e1751gf)* mutáns állatokban a QL leszármazott neuronok helyzete nem változik, ellenben a QR leszármazott neuronok anterior helyett poszterior irányba vándorolnak. *ceh-13(sw1)mab-5(e1751gf)* kettős mutánsokban a QL.paa sejtek pozíciója normális (vad típusú) volt, tehát a *ceh-13(-)* egyszeres mutánsokkal szemben, a kettős mutáns állatokban nem tapasztaltam poszterior sejt migrációs defektust. A QR.paa neuronok középső vagy hátulsó testrészekben helyezkedtek el, közel a QL.paa sejtekhez. A megfigyelt fenotípus a *mab-5gf* egyszeres mutánsok által mutatott fenotípushoz hasonlított (**29-30. ábrák**).



29. ábra. A *mab-5* funkciónyeréssel *e1751gf* mutációjának hatása QR.paa és QL.paa idegsejtek pozíciójára vad típusú és *ceh-13(sw1)* mutáns állatokban. A *mab-5(e1751gf)* mutációja a QL.paa sejt helyzetét nem befolyásolja, ellenben a normálisan anterior helyzetű QR.paa sejt a poszterior testtájon található. *ceh-13(sw1)* mutáns állatokban a QR.paa idegsejt pozíciója poszterior (100%), a QL.paa sejté pedig anterior irányba (22%) tolódott el a vad típusú helyzetükhöz képest. *ceh-13(sw1)mab-5(e1751gf)* kettős mutánsokban a QL.paa sejt helyzete nem változik, a QR.paa sejt pedig az állatok testének középső vagy hátsó (poszterior) részén helyezkedik el. A változás minden esetben szignifikáns. Az 'X' tengely a vizsgált sejteknek az állatok hosszához viszonyított relatív helyzetét ábrázolja: a „0” az állat testének az anterior, a „10” szám a poszterior végét jelöli. Az 'Y' tengelyen a vizsgált sejtek százalékos aránya van megadva. A szaggatott vonal a QR.paa és QL.paa sejteknek vad típusú háttérben a legnagyobb valószínűséggel elfoglalt helyét jelöli.

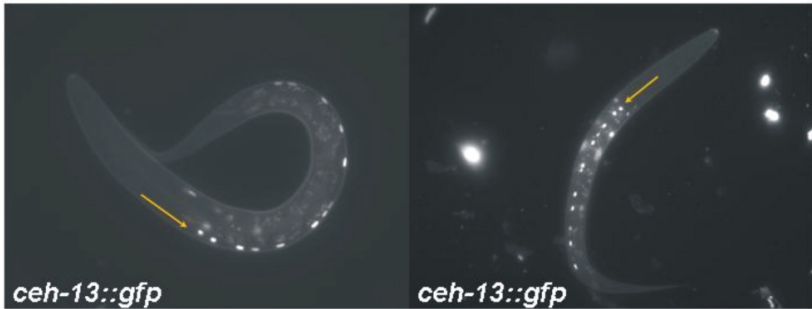


30. ábra. A QR.paa (AVM) és QL.paa (PVM) idegsejtek pozíciója vad típusú, *ceh-13(sw1)* mutáns és *mab-5(e1751gf)* mutáns állatokban. (A) Vad típusú felnőtt hermafroditákban a QR.paa sejt a test elülső, a QL.paa sejt a test hátsó részén található. (B) *ceh-13(sw1)* mutáns felnőttekben mindkét sejt a vad típus pozíciójától eltérő helyen, a középső testtájon helyezkedik el. (C) A *mab-5 e1751gf* mutációja a QL.paa neuron helyzetét nem befolyásolja, a QR.paa sejt pozíciója azonban poszterior irányba tolódik el. (D) *ceh-13(sw1)mab-5(e1751gf)* kettős mutánsokban az AVM és PVM neuronok az állatok testének poszterior részén láthatóak, hasonló pozícióban, mint a *mab-5(e1751gf)* egyszeres mutánsokban.

#### 4.3.2. A Pn.p epidermális sejtek fúziós mintázata *ceh-13(-)* mutánsokban

A *ceh-13* posztzembrionális egyedfejlődésre gyakorolt hatásának a további tanulmányozása céljából vizsgáltam a *ceh-13* szerepét a Pn.p epidermális sejtek sorsának meghatározása során. A Pn.p sejtek hipodermisszel való fúzióját az L1 lárvastádium végén a *lin-39* és *mab-5 Hox* gének kontrollálják (Clark és mtsi., 1993; Wang és mtsi., 1993). Ebben a paradigmában néztem meg a Pn.p sejtek számának és mintázatának alakulását vad típusú vs. *ceh-13(-)* genetikai null mutáns háttérben. A korai L1 stádiumú lárvák (az embrióburokból való kikelés után) ventrális

testfelszínét 12 darab páros sorba rendeződő ektodermális prekursor (P1-12) sejt alkotja. E sejtekben *ceh-13::gfp* expressziót figyeltem meg (31. ábra).

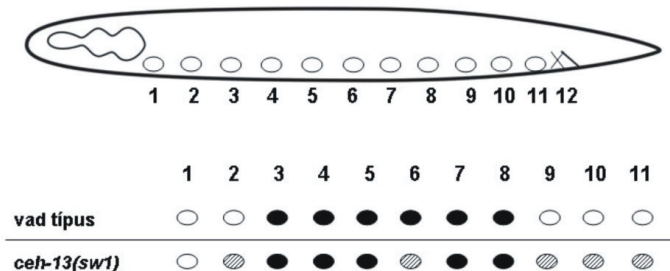


31. ábra. *ceh-13* expresszió P ektodermális prekursor sejtekben. Vad típusú háttérben a korai L1 stádiumú lárvákban *ceh-13::gfp* expresszió figyelhető meg az állatok ventrális oldalán sorban elhelyezkedő P ektodermális prekursor sejtekben (a sárga nyíllal jelölt sejt sor).

Az L1 lárvastádium végén a P blasztsejtek osztódnak, amely egy Pn.a neuronális prekursor és egy Pn.p epidermális sejt létrejöttét eredményezi (Sulston és Horvitz, 1977). A születésük után rövid idővel a Pn.p sejtek egy része fuzionál a hipodermális szyncyciummal (*hyp7*). A megmaradó Pn.p sejtek száma és mintázata eltérő a két nemben. A Pn.p sejtek sorsának alakulása egy, a fuzionálatlan sejteket jelölő *JAM-1::GFP* marker segítségével jól nyomon követhető (Mohler és mtsi., 1998).

Vad típusú hermafroditákban az L1 lárvastádium végén lejátszódó sejtfúziós esemény után a középső helyzetű P(3-8).p sejtek maradnak fuzionálatlan állapotban, a többi Pn.p sejt fuzionál a hipodermisszel. *ceh-13(sw1)* mutáns genetikai háttérben változást tapasztaltam a fuzionálatlan sejtek számában. A vad típusban megfigyelhető 6 darab sejt mellett jellemzően további anterior [P(2).p], illetve poszterior [P(9-10).p] sejtek éltek túl a fúziós eseményt (32. ábra, 5. táblázat). Ezek a sejtek a *JAM-1::GFP* sejtadhézió jelölő marker segítségével jól detektálhatóak voltak a későbbi egyedfejlődési stádiumokban (L2-L4) is. Néhány mutáns egyedben az előbbi megfigyeléssel ellentétben 6 helyett csak 5 darab Pn.p sejt volt látható (33. ábra).

## Hermafrodita

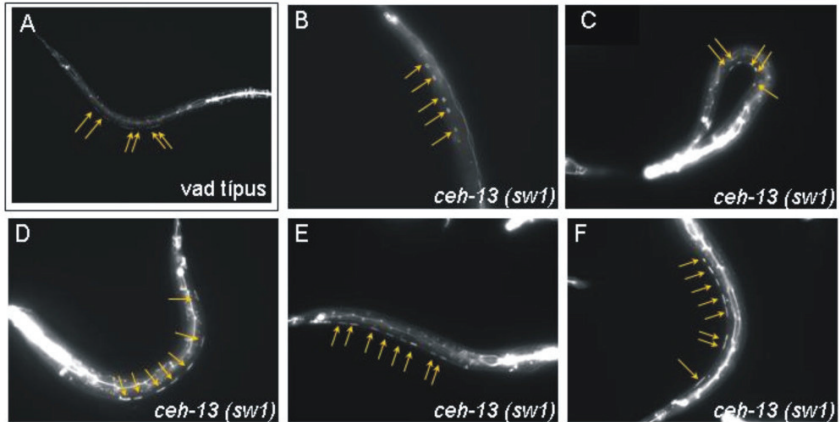


32. ábra. A Pn.p sejtek fúziós mintázata vad típusú és *ceh-13(-)* mutáns genetikai háttérben az L1 lárvastádium végén. Vad típusú hermafroditákban az L1 lárvastádium végén a Pn.p epidermális sejtek egy része [P(1-2),p, P(8-11),p] fuzionál a hipodermális szyncyciummal. *ceh-13(sw1)* mutáns állatokban ezeknek a sejteknek egy része nem fuzionál a hipodermisszel. Az üres körök a fuzionáló sejteket jelölik. A szürkével bevonalazott sejtek csak a megfigyelt egyedek bizonyos százalékában fuzionálnak. A számok a sorban elhelyezkedő Pn.p sejteket jelölik.

Genotípus	Pn.p sejtek										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<b>vad típus</b>	0	0	100	100	100	100	100	100	0	0	0
<b><i>ceh-13(sw1)</i></b>	0	8	100	100	100	95	100	100	5	23	19

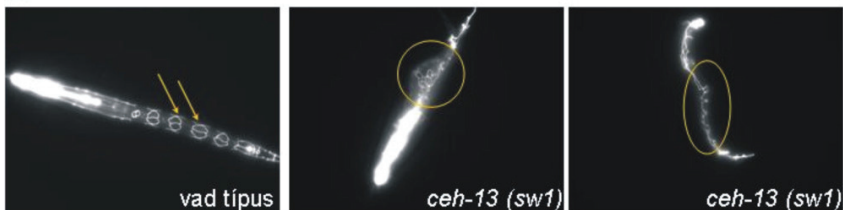
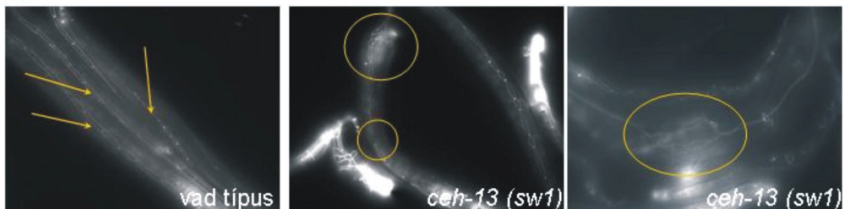
5. táblázat. A nem fuzionáló Pn.p sejtek %-os aránya az L1 lárvastádium végén vad típusú vs. *ceh-13(sw1)* mutáns genetikai háttérben. Vad típusú hermafroditákban a P(3-8),p sejtek kivételével a Pn.p utódsejtek fuzionálnak a hipodermisszel. *ceh-13(sw1)* mutáns hermafroditákban további anterior, illetve poszterior sejtek maradnak fuzionálatlan állapotban. N=200





33. ábra. A fuzionálatlan Pn.p sejtek száma és mintázata vad típusú és *ceh-13(sw1)* mutáns hermafroditákban. (A) Vad típusú állatokban 6 darab Pn.p sejt marad meg az L1 végén lejátszódó fúzió esemény után (sárga nyilakkal jelölve). Ezek a sejtek az állatok testének középső részén találhatóak. (B-F) *ceh-13* mutáns háttérben további fuzionálatlan sejtek figyelhetők meg anterior, illetve poszterior testtájakon. (B-C) Néhány egyedben ezzel ellentétben 6 darabnál kevesebb sejt látható. A fuzionálatlan Pn.p sejtek egy JAM-1::GFP marker segítségével vizualizáltak. A fotókon a nem fuzionált sejtek sárga nyilakkal vannak jelölve.

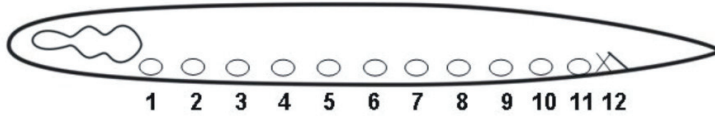
A *ceh-13* nemcsak a Pn.p epidermális sejtek sorsát befolyásolja. *ceh-13(-)* mutáns állatokban a P ektodermális prekurzor sejtek (Pn.p sejtek ősei) esetében is megfigyelhetők sejtfúziós defektusok, valamint a V sejtvonalba tartozó sejt típusoknál (pl. varratsejtek) szintén tapasztalhatók ilyen jellegű rendellenességek. A P és V blaszt sejtek az L1 stádiumú lárvákban rendezett páros sorokban szabályos mintázatot alkotva helyezkednek el az állatok ventrális, illetve dorzális oldalán. *ceh-13(-)* mutáns háttérben az abnormális morfológiát mutató L1 stádiumban megrekedt lárvákban mindkét sejt típusba tartozó sejtek szabálytalan alakúak és kuszán összenőtt hálózatot alkotnak (34. ábra). Kifejlett vad típusú állatokban a varratsejtek egymással láncszerűen összekapcsolódnak, és így hosszú, egyenes lefutású sávot alkotnak a test két oldalán. A felnőtt kort elérő *ceh-13(-) escaper* egyedekben megszakítások, mintázat- és alakbeli változások voltak megfigyelhetők a varratsejtek láncolatában (33. ábra).

**A****B**

**34. ábra.** *ceh-13(sw1)* mutánsokban megfigyelhető sejtfúziós és sejtdhéziós rendellenességek. (A) Bal oldali panel: egy vad típusú állatban szabályos alakú, rendezetten elhelyezkedő és egymáshoz kapcsolódó P ektodermális prekurzor sejtek láthatók. Középső és jobb oldali panelek: *ceh-13(sw1)* mutánsokban ezek a sejtek szabálytalan, kusza hálózatot alkotnak. (B) Bal oldali panel: a V sejtvonalból leszármazó varratsejtek vad típusú felnőtt egyedben egymással kapcsolódó, egyenes lefutású láncolatot alkotnak. Középső és jobb oldali panelek: *ceh-13(sw1)* mutánsokban megszakítások vagy éppen beékelődő szabálytalan alakú sejtek láthatók. A P blaszt és a varratsejteket az epidermális sejtek apikális membránját jelölő JAM-1::GFP segítségével vizualizáltam. A sejthatárokat sárga nyilak (bal oldali panelek), a *ceh-13(-)* mutáns genetikai háttérben megfigyelhető defektusokat sárga karika jelöli (középső és jobb oldali panelek).

A *mab-5* középső paralóg csoportba tartozó *Hox* gén a középső-hátsó testtájakon található Pn.p epidermális sejtekben expresszálódik (Salser és Kenyon, 1993). Vad típusú hím egyedekben a *mab-5* részt vesz a Pn.p sejtek hipodermisszel való fúziójának szabályozásában. A *lin-39* középső *Hox* paralóg funkcionális doménjával átfedő régióban a LIN-39 és MAB-5 fehérjék együttes aktivitása és kölcsönhatása határozza meg a Pn.p sejtek fúziós mintázatát (Clark és mtsi., 1993; Wang és mtsi., 1993). Hermafroditákban a *mab-5* aktivitása nem befolyásolja a Pn.p sejtek fúzióját. *ceh-13(-)* mutánsokban a P(3-8).p sejten kívül további anterior, illetve poszterior Pn.p sejtek maradtak fuzionálatlan állapotban (lásd feljebb). *ceh-13(sw1)mab-5(e1751gf)* kettős mutáns hermafroditákban a vad típusra jellemző Pn.p fúziós mintázat volt jellemző (**35-36. ábrák, 6. táblázat**).

## Hermafrodita

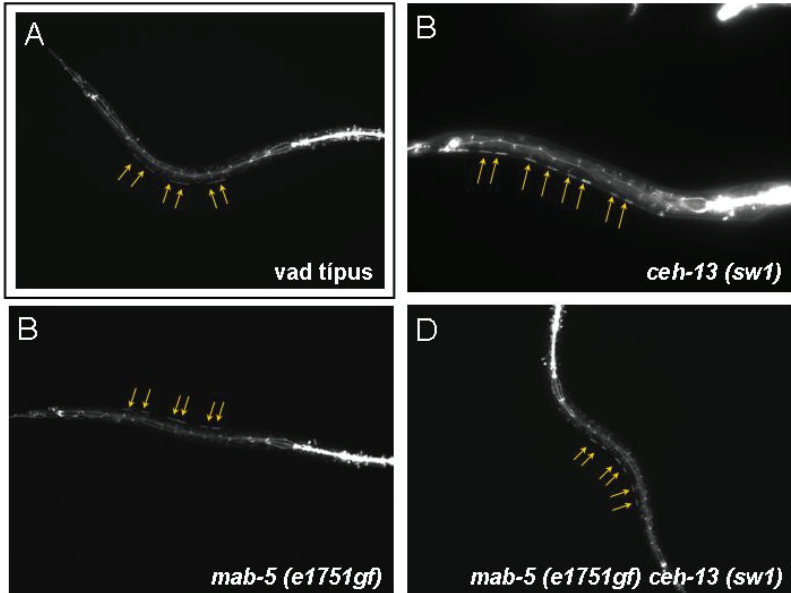


	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<b>vad típus</b>	○	○	●	●	●	●	●	●	○	○	○
<b><i>ceh-13(sw1)</i></b>	○	◐	●	●	●	◐	●	●	◐	◐	◐
<b><i>mab-5(e1751gf)</i></b>	○	○	●	●	●	●	●	●	○	○	○
<b><i>ceh-13(sw1)</i> <i>mab-5(e1751gf)</i></b>	○	○	●	●	●	●	●	●	○	○	○

35. ábra. Az L1 lárvastádium végén lejátszódó fúziós esemény után megmaradó Pn.p sejtek számának és mintázatának változása *ceh-13(sw1)* és *mab-5(e1751gf)* mutáns genetikai háttérben. Vad típusú hermafroditákban a 6 darab középső helyzetű Pn.p sejt [P(3-8).p] nem fuzionál a hipodermisszel (fekete körök), míg a többi Pn.p sejt fuzionál a hipodermális szyncyciummal (üres körök). *ceh-13(sw1)* mutáns háttérben további anterior, illetve poszterior Pn.p sejtek maradnak fuzionálatlan állapotban. A *mab-5(e1751gf)* mutánsok a vad típusú állatokkal megegyező fúziós mintázatot mutatnak. *ceh-13(sw1);mab-5(e1751gf)* kettős mutánsokban szintén vad típusú mintázat figyelhető meg. A szűrővel bevonalazott sejtek a megfigyelt egyedek bizonyos százalékában fuzionálnak. A számok a sorban elhelyezkedő Pn.p sejteket jelölik.

Genotípus	Pn.p sejtek										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<b>vad típus</b>	0	0	100	100	100	100	100	100	0	0	0
<b><i>ceh-13(sw1)</i></b>	0	8	100	100	100	95	100	100	5	23	19
<b><i>mab-5(e1751gf)</i></b>	0	0	100	100	100	100	100	100	0	0	0
<b><i>ceh-13(sw1)</i> <i>mab-5(e1751gf)</i></b>	0	0	100	100	100	100	100	100	0	0	0

6. táblázat. A nem fuzionáló Pn.p sejtek %-os aránya az L1 lárvastádium végén vad típusú vs. *ceh-13(sw1)* és *mab-5(e1751gf)* egyszeres és kettős mutáns genetikai háttérben. A táblázatban szereplő adatok alapján vad típusú hermafroditákban a középső 6 Pn.p sejt marad fuzionálatlan állapotban. *ceh-13(sw1)* mutánsokban további Pn.p sejtek maradnak fuzionálatlan állapotban. A *mab-5(e1751gf)* mutáció ezt az ektopikus sejt-fúziós defektust képes szuppresszálni *ceh-13* deficiens genetikai háttérben. A táblázatban az egyes Pn.p sejtek százalékos. A Pn.p sejteket számok jelölik. N=200.

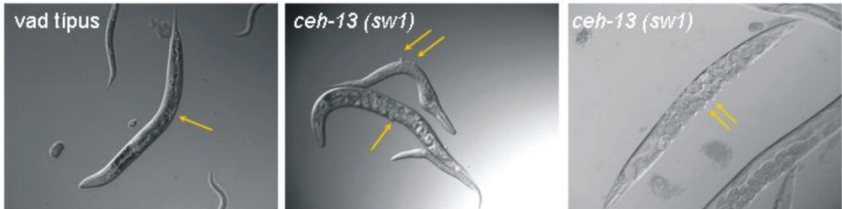


36. ábra. A Pn.p sejtek fúziós mintázata vad típusú, *ceh-13(sw1)* és *mab-5(e1751gf)* egyszeres mutáns, valamint *ceh-13(sw1)mab-5(e1751gf)* kettős mutáns lárvákban. (A) Vad típusú hermafroditákban 6 darab Pn.p sejt [P(3-8).p] marad fuzionálatlan állapotban az L1 lárvastádium végén. (B) A *ceh-13* aktivitásának hiánya növeli a fuzionálatlan Pn.p sejtek számát. (C) *mab-5(e1751gf)* egyszeres, valamint (D) *ceh-13(sw1)mab-5(e1751gf)* kettős mutánsokban a vad típusúval megegyező fúziós mintázat látható. A fuzionálatlan Pn.p sejteket egy JAM-1::GFP marker jelöli (sárga nyilak).

#### 4.3.3. *ceh-13(-)* mutánsokban megfigyelhető vulvafejlődési rendellenességek

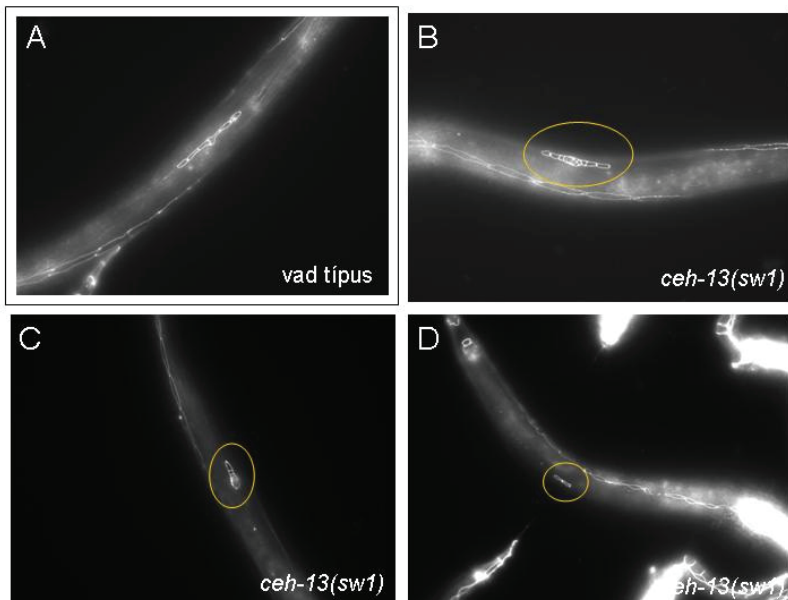
A vad típusú *C. elegans* hermafroditák pároszórzerve (vulva) a test középső régiójában található. A posztembrionális fejlődés során a vulvaszövet differenciálódását alapvetően a *lin-39 Hox* gén és ko-faktoraik szabályozzák (Clandinin és mtsi., 1997). Érdekes módon a *ceh-20* és *unc-62 Hox* ko-faktorok inaktiválása részben a *lin-39(-)* mutánsokéhoz hasonló, részben azoktól eltérő mutáns fenotípust eredményez (Yang és mtsi., 2005; Takács-Vellai és mtsi., 2007). Ez felveti annak a lehetőségét, hogy (egy) más(ik) *Hox* paralog(ok) működése is befolyásolja a vulvaszövet fejlődését.

*ceh-13(-)* mutánsok fenotípusos elemzése során azt tapasztaltam, hogy a *ceh-13(sw1)* és *ceh-13(ok737)* mutánsokban a vulva száma, alakja, szerkezete és működése – alacsony penetranciával – eltérhet a normálistól (**37. ábra**). A *ceh-13(-)* mutánsok vulva fenotípusainak részletesebb leírását lásd a **4.2.1. fejezetben**.



**37. ábra.** *ceh-13(sw1)* mutánsok vulva fenotípusai. Kifejlett vad típusú hermafroditákban a vulva a test belseje felé nyíló szerv, amelynek a széle minimálisan emelkedik ki az epidermisz síkjából (sárga nyíl). *ceh-13(sw1)* mutáns állatok egy részében abnormális vulva fenotípusok (Puv, Muv) figyelhetők meg (középső és jobb oldali paneleken sárga nyilakkal jelölve). Ezek a vulva struktúrák általában a test síkjából kifelé türemkednek.

Egy JAM-1::GFP riporter segítségével jól nyomon követhető a vulvát létrehozó és felépítő sejtek osztódása, vándorlása és a vulva szerkezetének kialakulása a szövet differenciálódása során. *ceh-13(-)* mutánsokban a vulvát kialakító sejtek száma és a vulvaszövet mintázata eltérhet a normálistól (**38. ábra**).



**38. ábra. Vulva fejlődési rendellenességek *ceH-13(sw1)* mutáns állatokban.** (A) Egy vad típusú állatban a normálisan fejlődő (szimmetrikus) vulva látható. (B-C) *ceH-13(sw1)* mutánsokban a vulvát kialakító sejtek abnormális, aszimmetrikus mintázatot mutatnak (sárga karikával jelölve). (D) Egy *ceH-13(sw1)* mutáns egyed, amelyben nem fejlődik vulva (sárgával bekarikázva). A vulvaszövetet felépítő sejteket egy JAM-1::GFP riportter rendszer segítségével vizualizáltam.

A vulvafejlődés kezdeti szakaszában (vulvaindukció) a vulva prekursor sejtek sorsának a meghatározását különböző jelátviteli útvonalak bonyolult interakciója biztosítja. A szignalizációban bekövetkező zavarok különböző vulva-defektív fenotípusok (Vul, Muv) kialakulásához vezethetnek. A vulvaindukció szabályozásában szerepet játszó útvonalak jeleit a *lin-39 Hox* gén integrálja és koordinálja. A *lin-39* inaktiválása Vul fenotípus kialakulását eredményezi (Chen és Han, 2001). Ezzel ellentétben a CEH-20 HOX-kofaktor működésének a hiánya Muv fenotípus kialakulásához vezet, amely még *lin-39(-)* null mutáns háttérben is megfigyelhető (Yang és mtsi., 2005). Hasonló fenotípus alacsony penetranciával *lin-39(-)* hipomorf mutánsokban is megfigyelhető (Takács-Vellai és mtsi., 2007).

Az úgynevezett *synthetic Multivulva (synMuv)* gének gátolják a vulva indukcióját. E gének három egymással redundánsan működő (*synMuv A, B* és *C*) osztályba sorolhatók. Különkülön a *synMuv* gének funkcióvesztése nem hat a vulvafejlődésre (vad típusú vulva), míg

bármely két *synMuv* osztályba tartozó gén együttes funkcióvesztése *Muv* fenotípust eredményez. Ezek a kettős mutáns állatok jellemzően 3-5 darab jól elkülöníthető (abnormális alakú és szerkezetű) vulvával rendelkeznek. A *ceh-13(sw1)* és *ceh-13(ok737)* mutációk a vulvaszám csökkenését eredményezték *synMuvAB* mutáns genetikai háttérben (7. táblázat).

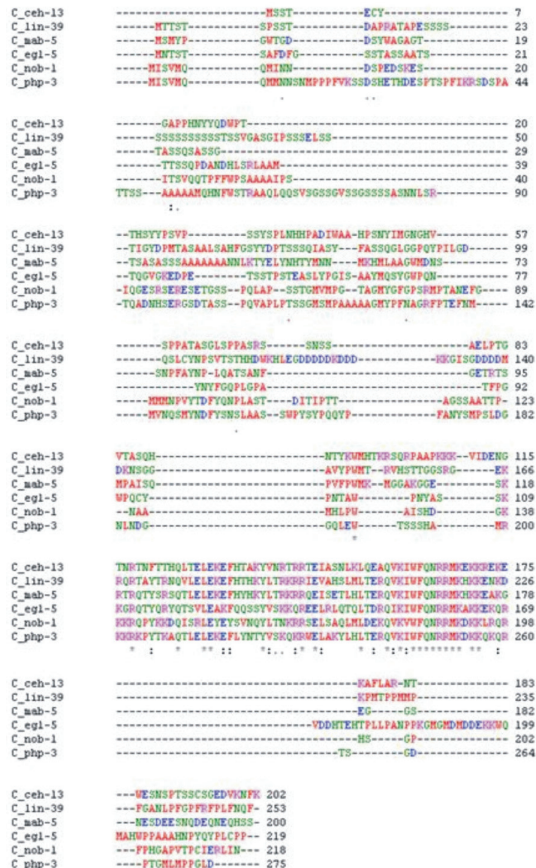
Genotípus	N	Átlagos vulvaszám (± szórás)	p
<b><i>lin-8(n111);lin-15B(n765ts)</i></b>	<b>327</b>	<b>3,89±0,362</b>	<b>&gt;0,0001</b>
<b><i>lin-53(n833);lin-15A(n765ts)</i></b>	<b>165</b>	<b>3,67±0,375</b>	<b>&gt;0,0001</b>
<b><i>ceh-13(sw1);lin-8(n111);lin-15B(n765ts)</i></b>	<b>344</b>	<b>2,29±1,116</b>	<b>&gt;0,0001</b>
<b><i>ceh-13(ok737);lin-8(n111);lin-15B(n765ts)</i></b>	<b>70</b>	<b>3,04±0,984</b>	<b>&gt;0,0001</b>
<b><i>ceh-13(sw1);lin-53(n833);lin-15A(n765ts)</i></b>	<b>162</b>	<b>2,81±1,022</b>	<b>&gt;0,0001</b>

7. táblázat. A *ceh-13* funkcióvesztéses mutációk csökkentik a vulvaszámot *synMuvA(-);synMuvB(-)* kettős mutáns felnőtt állatokban. A *ceh-13(sw1)* és *ceh-13(ok737)* mutációk az átlagos vulvaszám csökkenését eredményezik különböző *synMuvA(-);synMuvB(-)* kettős mutáns genetikai háttérben. A kísérletekben használt gének *synMuv* osztályokba való besorolása: *lin-8: synMuvA*; *lin-15: synMuvA/synMuvB*; *lin-53: synMuvB*. A változás minden esetben szignifikáns, ts: termoszenzitív mutációk, amelyek 25°C-on (permisszív hőmérséklet) nyilvánulnak meg, ezért a kísérleteket 25°C-on végeztem (termoszenzitív allélok használatára a hármas mutáns törzsek létrehozásához volt szükség).

A vulvasövet differenciálódása során megvizsgáltam a *ceh-13* expresszióját. A használt *ceh-13::gfp* konstrukció nem expresszálódott a vad típusú és *synMuv* mutáns állatok vulvaszövetében. Ezért feltételezhető, hogy a *ceh-13* nem direkt módon játszik szerepet a vulvaszövet differenciálódásának szabályozásában. Hatása valószínűleg inkább sejtvonal specifikus gének „down-regulációján” vagy például a vulvaindukciót kontrolláló extracelluláris szignálok szabályozásán keresztül nyilvánul meg. Alternatív módon a *ceh-13* aktív lehet a hipodermiszben, amelyből a *synMuv* gének vulvaszövetet befolyásoló hatása is érkezik.

#### 4.4. A *C. elegans Hox* gének szekvenciális hasonlóságának tanulmányozása bioinformatikai módszerekkel

A *C. elegans Hox* gének szekvenciális hasonlóságát – rokonságát - bioinformatikai módszerekkel vizsgáltam. Ehhez a HOX fehérjék aminosav szekvenciáját hasonlítottam össze (39. ábra). A szekvencia-illesztéshez az Európai Bioinformatikai Intézet (EBI: European Bioinformatics Institute) honlapjáról ingyen letölthető és használható nukleotid-, illetve proteinszekvenciák összehasonlítására szolgáló (multiple sequence alignment) ClustalW programot használtam (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).



39. ábra. *C. elegans* HOX fehérjék aminosav szekvencia hasonlósága. A *C. elegans* HOX fehérjék aminosav- szekvenciáit a ClustalW program segítségével illeszttem. Az ábra 6. sorában a folytonos, hiatusok nélküli szekvenciárész a proteinek homeodómén részét ábrázolja.

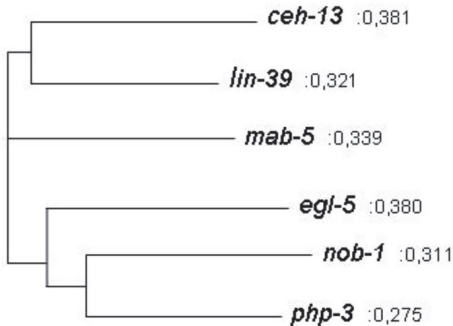


A páros illesztés során kapott értékek azt mutatják, hogy a *ceh-13*, *lin-39* és *mab-5*, valamint az *egl-5*, *nob-1* és *php-3* gének nagyobb hasonlóságot mutatnak egymással, mint a két csoport tagjai az egymás közötti összehasonlításban (8. táblázat).

Illesztett szekvencia 1			Illesztett szekvencia 2			Hasonl. értékek
Szekv. száma	Szekv. neve	Szekv. hossza*	Szekv. száma	Szekv. neve	Szekv. hossza*	
1	C_cek-13	335	2	C_lin-39	335	29
1	C_cek-13	335	3	C_mab-5	335	25
1	C_cek-13	335	4	C_egl-5	335	18
1	C_cek-13	335	5	C_nob-1	335	18
1	C_cek-13	335	6	C_php-3	335	26
2	C_lin-39	335	3	C_mab-5	335	33
2	C_lin-39	335	4	C_egl-5	335	25
2	C_lin-39	335	5	C_nob-1	335	24
2	C_lin-39	335	6	C_php-3	335	24
3	C_mab-5	335	4	C_egl-5	335	25
3	C_mab-5	335	5	C_nob-1	335	22
3	C_mab-5	335	6	C_php-3	335	28
4	C_egl-5	335	5	C_nob-1	335	24
4	C_egl-5	335	6	C_php-3	335	25
5	C_nob-1	335	6	C_php-3	335	41

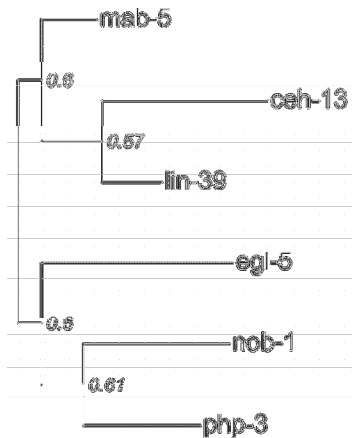
**8. táblázat.** A *C. elegans* HOX fehérjék aminosav szekvenciájának páros illesztése során kapott hasonlósági értékek. A táblázatot a ClustalW program generálta. A bevitt adatok a *C. elegans* HOX fehérjék teljes aminosav szekvenciáját tartalmazták. Szekvenciák hossza\*: illesztett szekvenciák (a gap-ek okozta problémák elkerülése végett).

A nukleotid- és aminosavszekvenciák hasonlósága alapján készített filogenetikai fák azt mutatják, hogy a *C. elegans* Hox kluszer tagjai közül a középső homológ csoportba tartozó *lin-39* és *mab-5* feltehetően közelebbi rokonságban állnak az anterior homológ *cek-13*-mal, mint a *C. elegans* poszterior Hox homológ csoportokat képviselő *egl-5*, *nob-1* és *php-3* génekkel (40-41. ábrák).



40. ábra. A *C. elegans* HOX proteinek filogenetikai fája. Teljes aminosav-szekvenciák alapján, a ClustalW program segítségével generált fa.

A nukleotid-szekvencia alapú (teljes cDNS, illetve csak a homeodómt kódoló szekvenciaprészekletek felhasználásával – ez utóbbi adatok alapján készült filogram látható a 40. ábrán) 'Bayes módszerrel' (MrBayes v3.1.2 software (Huelsenbeck and Ronquist, 2001)) generált filogenetikai fa hasonló mintázatot mutat az aminosav alapú ClustalW fához (41. ábra).



41. ábra. A *C. elegans* Hox gének homeodómt kódoló nukleotid szekvenciaprészekleteinek illesztésével, 'Bayes módszer' alapján generált filogenetikai fa. (Az ábrát Ari Eszter készítette, ref.: Tihanyi és mtsi., 2010)

#### 4.5. A *tra-1* csökkent, illetve fokozott aktivitása befolyásolja az átlagos vulvaszámot *synMuv* mutáns genetikai háttérben

A hermafrodita párzószerv, vulva fejlődését szabályozó jelátviteli útvonalak jeleit a *lin-39* középső homológ *Hox* gén integrálja és koordinálja. A vulvaszövet differenciálódásának az irányításában részt vesz a szomatikus szex – így az adott nemnek megfelelő szex-specifikus párzószervek kifejlődéséért is – kialakításáért felelős szex-determinációs géncaszkád terminális regulátora, a *tra-1* gén is. A laborunkban dolgozó Szabó Emese és munkatársai kimutatták, hogy a *lin-39* expressziójának szabályozásán keresztül a *tra-1* szerepet játszik a vulva sejtorsók meghatározásában (Szabó és mtsi., 2009). A szomatikus szöveti differenciáció irányításában a *tra-1* alternatív módon működik az azonos géncsaládba tartozó *tra-4* génnel, amelyet a *synMuv B* típusú géneként azonosítottak (Grote és Conradt, 2006). Mivel a különböző *synMuv* gének részt vesznek a vulvaejlődés szabályozásában, kísérleteim során arra kérdésre kerestem a választ, hogy tapasztalható-e genetikai interakció a *tra-1* és a *synMuv A*, illetve *synMuv B* osztályokba sorolt gének között a vulvaejlődés szabályozása során.

A *synMuv* gének gátolják a vulva indukcióját (az induktív Ras útvonallal antagonizálnak) (Solaris és mtsi., 2000; Ceol és mtsi., 2006). E gének három egymással redundánsan működő (*synMuv A*, *B* és *C*) osztályba sorolhatók. Egyszeres *synMuv* mutánsokban normális vulva fejlődik. Bármely két *synMuv* osztályba tartozó gén együttes funkcióvesztése azonban *Muv* fenotípust eredményez. Kettős és hármas mutánsok létrehozásával, illetve RNSi kísérletek segítségével megvizsgáltam, hogy a *tra-1* működésének csökkentése, illetve fokozása befolyásolja-e az átlagos vulvaszámot különböző *synMuv AB* kettős mutáns genetikai háttérben. A *tra-1* inaktivációjának hatását a *tra-1(e1099)* mutáns törzs segítségével tanulmányoztam, valamint *tra-1* specifikus RNSi konstrukciót készítettem a *tra-1* gén csendesítésére. A *tra-1 e1099* null mutációja az XX – ivari és autoszómás kromoszómák aránya alapján hermafrodita – karyotípusú állatokat szomatikusan hímekké transzformálja. A *tra-1* RNSi gyengébb hatású a null mutánsnál, így egy hipomorf fenotípust (pontosabban fenokópiát), az ún. intersex fenotípust eredményezett. A *tra-1* hiperaktivitása által okozott lehetséges változások vizsgálatához a *fem-3* gén funkcióvesztéses *e2006* allélját hordozó mutáns törzset használtam, illetve *fem-3(RNSi)* kezelést alkalmaztam. A *fem-3* a szex-determinációs géncaszkádban a *tra-1*-től „up-stream” helyezkedik el és aktivitása gátolja annak működését (lásd: bevezetés 15. ábrája). A *fem-3* funkcióvesztése a *tra-1* hiperaktivitását eredményezi.

A *fem-3* működésének a hiánya csökkentette az átlagos vulvaszámot *synMuv AB* kettős mutáns háttérben. Ezzel szemben a *tra-1* inaktiválása *tra-1* „csendesítése” RNSi segítségével megnövelte a vulvaeredetű struktúrák számát a *synMuv AB* kettős mutáns hermafroditákban (**9. táblázat**).

Genotípus	N	Átlagos vulvaszám	P
<i>tra-1(RNSi)</i>	378	0,4	-
<i>fem-3(e2006)</i>	200	1,0	-
<i>fem-3(RNSi)</i>	670	1,0	-
<i>lin-15(n767);dpl-1(n2994)</i> [synMuv AB]	100	4,2	-
<i>fem-3(e2006);lin-15(n767);dpl-1(n2994)</i>	100	3,6	<0,0001
<i>lin-38(n751);lin-36(n766)</i> [synMuv AB]	100	3,3	-
<i>tra-1(RNSi);lin-38(n751);lin-36(n766)</i>	170	3,9	<0,001
<i>fem-3(RNSi);lin-38(n751);lin-36(n766)</i>	100	3,0	<0,0001
<i>lin-8(n111);lin-35(n745)</i> [synMuv AB]	100	3,3	-
<i>tra-1(RNSi);lin-8(n111);lin-35(n745)</i>	48	4,0	0,004
<i>fem-3(RNSi);lin-8(n111);lin-35(n745)</i>	35	2,7	<0,0001
<i>lin-38(n751);dpl-1(n3643)</i> [synMuv AB]	105	3,3	-
<i>tra-1(RNSi);lin-38(n751);dpl-1(n3643)</i>	36	3,7	0,025
<i>fem-3(RNSi);lin-38(n751);dpl-1(n3643)</i>	100	2,9	<0,001
<i>lin-8(n111);lin-36(n766)</i> [synMuv AB]	100	3,5	-
<i>tra-1(RNSi);lin-8(n111);lin-36(n766)</i>	100	4,5	<0,0001
<i>fem-3(RNSi);lin-8(n111);lin-36(n766)</i>	100	2,8	<0,0001

**9. táblázat.** A *tra-1* aktivitás hatása a vulvaindukcóra *synMuv AB* kettős mutáns genetikai háttérben. A különböző *synMuv* osztályokba tartozó gének együttes funkcióvesztése a kettős mutánsokban Muv fenotípust eredményez. *tra-1* RNSi kezelés hatására az átlagos vulvaszám növekedett *synMuvA(-);synMuvB(-)* kettős mutáns állatokban. A *fem-3* csendesítése ugyanakkor szignifikánsan csökkentette az átlagos vulvaszámot *synMuvA(-);synMuvB(-)* kettős mutáns háttérben.

A *tra-1(e1099);snyMuv A(-); synMuv B(-)* hármas mutánsok döntő többsége, a *snyMuv A(-); synMuv B(-)* kettős mutáns hímekhez hasonlóan non-Muv fenotípusú volt. A vizsgált *tra-1(e1099); snyMuv A(-); synMuv B(-)* hármas mutánsok 32,7%-ban százalékában azonban kitüremkedű, Pvl fenotípushoz hasonló vulva-eredetű képződményeket figyeltem meg (**10. táblázat**).

Következő lépésben megvizsgáltam, hogy a *tra-1* inaktiválása által okozott változás különbözik-e *synMuv A*, illetve *synMuv B* mutáns genetikai háttérben. *synMuv A* mutációt hordozó *lin-38(n751)* és *lin-8(n111)* állatokban a *tra-1* RNSi kezelés 14,3%, illetve 2,1% penetranciával Muv fenotípus megjelenését eredményezte (**11. táblázat**). Ezzel szemben

*synMuv B* mutáns háttérben [*lin-35(n745)* és *lin-36(n766)* egyszeres mutánsok] a *tra-1* RNSi kezelés nem okozott változást a vulvaszámban (**11. táblázat**). Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a *tra-1* feltehetően egy *synMuv B* gén.

Genotípus	Karyotípus	Ivari fenotípus	Átlagos vulvaszám	N	P
vad típus	XX	H	1	56	-
vad típus	XO	M	0	100	-
<i>lin-8(n111);lin-35(n745)</i>	XX	H	3,75	100	-
<i>lin-8(n111);lin-35(n745)</i>	XO	M	0,65	144	-
<i>tra-1(n1099);lin-8(n111);lin-35(n745)</i>	XX	M	1,21	100	<0,0001

**10. táblázat. A *tra-1 n1099* mutációja serkenti a vulvaindukción *synMuv AB* kettős mutáns pseudohímekben.** *tra-1(n1099);lin-8(n111);lin-35(n745)* hármas mutánsokban magasabb volt az átlagos vulvaszám, mint a *lin-8(n111);lin-35(n745)* kettős mutáns hímekben. A „H” a hermafrodita, az „M” a hím, az „I” az interszex állatokat jelöli.

Genotípus	Ivari fenotípus	N	%Muv	P
vad típus	H	500	0	-
vad típus	M	500	0	-
<i>lin-38(n751)</i> [synMuv A]	H	326	0	-
<i>lin-8(n111)</i> [synMuv A]	H	850	0	-
<i>lin-35(n745)</i> [synMuv B]	H	150	0	-
<i>lin-36(n766)</i> [synMuv B]	H	197	0	-
<i>tra-1(e1099)</i>	M	210	0	-
<i>tra-1(RNSi)</i>	I/M	230	0	-
<i>lin-38(n751);tra-1(e1099)<sup>a</sup></i>	M	2190	0,02	<0,01
<i>lin-8(n111);tra-1(e1099)<sup>d</sup></i>	M	2950	0,015	<0,01
<i>lin-38(n751);tra-1(RNSi)</i>	I/M	320	14,3	<0,0001
<i>lin-8(n111);tra-1(RNSi)</i>	I/M	320	2,1	<0,001
<i>lin-35(n745);tra-1(RNSi)</i>	I	889	0	-
<i>lin-36(n766);tra-1(RNSi)</i>	I	2322	0	-

**11. táblázat. A *tra-1* inaktivációja szintetikus Muv fenotípust eredményez *synMuv A* mutáns genetikai háttérben.** Vad típusú hermafroditák 1 darab vulvával rendelkeznek, míg a hímekben ilyen párzószerv nem fejlődik. „H” a hermafrodita, az „M” a hím, az „I” az interszex állat. *synMuv A(-)* [*lin-38(n751)* és *lin-8(n111)*], illetve *synMuv B(-)* [*lin-35(n745)* és *lin-36(n766)*] egyszeres mutánsok] egyszeres mutáns hermafrodita állatok szintén 1 vulvával rendelkeznek (vad típusú vulva). A *tra-1* RNSi vagy mutáció által történő inaktiválása kis penetranciájú Muv fenotípust eredményez. „a”: *lin-38(n751);tra-1(e1099)* és *lin-8(n111);tra-1(e1099)* kettős mutánsokban a Muv fenotípus kis penetranciával nyilvánul meg, ami feltehetően a szóma erős maszkulinizációjának a következménye [a *tra-1(e1099)* null mutáció hatása].

## 5. Következtetések

A *Hox* kluszterek működésének egyik általános jellemzője, hogy a klusztterben található gének a genomi pozíciójuknak megfelelő sorrendben, egymást követő doménokban expresszálódnak és funkcionálnak a fejlődő embrió hossz tengelye mentén (kolinearitás) (McGinnis és Krumlauf, 1992; Iimura és Pourquie, 2007). *Drosophila*-ban és gerinces rendszerekben az anterior *Hox* paralóg csoportok tagjai az elülső testtájak morfogenezisét az irányítják (Studer és mtsi., 1996; van der Akker és mtsi., 2010). A *C. elegans* anterior homológ *Hox* gén *ceh-13* számos tulajdonságában eltér az ortológjaitól: fizikai pozíciója egy inverzió következtében felcserélődött a klusztterben öt követő *lin-39* pozíciójával a kromoszómán. A *ceh-13* szükséges az embriogenezis végbemenetéhez; aktivitásának hiánya embrionális életképtelenséget eredményez. Ennek ellenére a *ceh-13(-)* mutánsok 3-4%-a szaporodóképes felnőtt állatokká képes fejlődni. A *ceh-13* továbbá a test csaknem teljes hosszára kiterjedő embrionális expressziót mutat, amely átfed a klusztterben öt követő *Hox* paralógok expressziós doménjával (Brunschwig és mtsi., 1999). Egyedisége és az egyedfejlődésben játszott esszenciális szerepe ellenére a *ceh-13* a *C. elegans* *Hox* klusztter legkevesebbet tanulmányozott tagja. Konkrét egyedfejlődési funkciója, valamint a klusztter többi tagjával való genetikai kapcsolata alig ismert.

Kísérleteim során azt vizsgáltam, hogy a *ceh-13* milyen genetikai kölcsönhatást mutat a *C. elegans* *Hox* klusztter többi tagjával. Továbbá tanulmányoztam a *ceh-13* funkcióját különböző egyedfejlődési folyamatok szabályozásában.

### 5.1. A *Ceh-13(-)* fenotípus és *ceh-13* expresszió jellemzése

#### 5.1.1. A *ceh-13* a középső és hátulsó testtájak morfogenezisét egyaránt befolyásolja

A *ceh-13(sw1)* és *ceh-13(ok737)* mutánsok fenotípusos elemzése során azt tapasztaltam, hogy az embrióként és L1 lárvaként elpusztuló állatok 70-80%-a a test posztterior régiójában is megnyilvánuló morfológiai abnormálisokat mutatnak. A *ceh-13(-)* mutáns *escaper* (túlélő és felnőtté kifejlődő) egyedek ~7%-ban szintén nemcsak az elülső, hanem a középső és hátulsó testrészekben is megfigyelhetők morfológiai és egyedfejlődési rendellenességek. Ezek a

defektusok arra utalnak, hogy a *ceh-13* funkciója a középső és hátsó testtájak morfogenezisére is hatással van. Az embriogenezis abnormalitása, valamint a túlélő mutáns állatokban megfigyelhető szervfejlődési rendellenességek emlékeztetnek a *C. elegans Hox* kluszter más tagjainak inaktiválása által okozott defektusokra. Ez arra enged következtetni, hogy genetikai kölcsönhatás áll fenn a *ceh-13* és a többi *Hox* paralóg között.

### **5.1.2. A *ceh-13* expressziós doménja átfed a *lin-39* és *mab-5* expressziós doménjával**

A *C. elegans Hox* gének expressziójának tanulmányozása és összehasonlítása céljából, az egyes *Hox* génekre specifikus GFP riportergén-konstrukciók segítségével expressziós elemzést végeztem. Az analízis eredménye azt mutatta, hogy a *ceh-13* expressziós doménja nagymértékben átfed a középső testtájakon expresszálandó és funkcionáló *lin-39 Hox* gén expressziós doménjával. Ez az átfedés embrionális és lárvális korban egyaránt tapasztalható. A *ceh-13* és a *lin-39* expressziós doménok átfednek a poszterior testrészekben expresszálandó *mab-5* doménnal is. L1 és L2 stádiumú lárvákban a test hossz tengelye mentén végigfutó sejt típusok esetében (P és V ektodermális prekursor sejtek, varratsejtek, Pn.a leszármazott idegsejtek) jól megfigyelhetőek a három *Hox* gén egymást követő és egymással átfedő expressziós doménjai. A *ceh-13* tehát nemcsak anterior testtájakon megnyilvánuló, hanem a test csaknem teljes hosszára (középső és részben hátsó részekre is) kiterjedő expressziót mutat az egyedfejlődés során. Ez az expresszió nem korlátozódik a korai egyedfejlődési stádiumokra, hanem - például a hasdúc-lánc idegsejtjeiben - az állat egész élete során megmarad. A *ceh-13* expressziós mintázata megerősíti azt a mutánsok fenotípus elemzése nyomán felvetődött lehetőséget, amely szerint a *ceh-13* funkciója nemcsak az elülső, hanem a középső és hátsó testtájakon is hatással van a sejt sors meghatározására. A *ceh-13* tehát egy speciális kivételt képez a kolinearitási szabály alól.

### **5.2. A *ceh-13* interakciója a *lin-39* és *mab-5* génekkel**

A *ceh-13(-)* mutánsok 3-4 %-a képes szaporodóképes felnőttékké fejlődik. Ezek az *escaperek* kevésbé súlyos morfológiai elváltozásokat mutatnak, mint az embrióként vagy lárvaként elpusztuló egyedek. A *ceh-13(-)* mutáns felnőtt állatok jelenléte felveti annak a lehetőségét, hogy ezekben az állatokban más HOX fehérjék látják el a hiányzó CEH-13 funkciót. A HOX fehérjéről ismert, hogy szekvenciális és strukturális hasonlóságuk eredményeként a HOX

fehérjék csaknem azonos affinitással kötődnek konszenzus DNS-kötő szekvenciákhoz, amelyek a genomban viszonylag gyakran fordulnak elő (Ekker és mtsi, 1994; Hoey és Levine, 1988; Mann, 1995). Feltételezhető tehát, hogy más HOX fehérjék képesek bizonyos egyedfejlődési funkciókban a CEH-13 fehérjét helyettesíteni. A *ceh-13*-mal ellentétben a *lin-39* és *mab-5* gének működésének hiánya önmagában nem befolyásolja az állat túlélését: a *lin-39(-)* és *mab-5(-)* egyszeres mutánsok életképesek (Wrishnik és Kenyon, 1997). Megfelelő kettős mutánsok előállításával ezért megvizsgáltam, hogy kimutatható-e genetikai interakció a *ceh-13* és a középső *Hox* paralógok között az életképesség szabályozásában. Tanulmányoztam továbbá azt is, hogy a *lin-39* vagy a *mab-5* gének fokozott működése (géndózis növelése) szuppresszálja-e a *ceh-13* mutánsok életképtelenségét és morfológiai defektusait.

### **5.2.1. A *ceh-13*, *lin-39* és *mab-5* *Hox* gének redundáns szerepe az embrionális fejlődés során**

A *ceh-13* és a középső paralóg csoportba tartozó *Hox* gének kölcsönhatásainak a tanulmányozásához *ceh-13(-)lin-39(-)* és *ceh-13(-)mab-5(-)* kettős mutánsokat, illetve RNSi-kezelt állatokat hoztam létre. A kettős mutánsok szintetikus mutáns fenotípust mutattak: az állatok pusztulásának penetranciája közel 100%-os volt és a pusztulás az embrionális fejlődés során következett be. A *Hox* gének RNSi-közvetített csendesítése gyenge hipomorf fenokópiát eredményez. A *ceh-13(RNSi)* és *lin-39(RNSi)* állatok csak 9 és 17%-ában figyelhető meg valamilyen elváltozás. Azonban a *Hox(-)* mutánsok kezelése egy másik *Hox* paralóg duplaszálú RNS-ével viszonylag erős, az adott *Hox* mutáns fenotípusánál erősebb hatást eredményez. *ceh-13(-)lin-39(RNSi)*, *lin-39(-)ceh-13(RNSi)* és *mab-5(-)ceh-13(RNSi)* kettős kombinációkban 100%-os a morfológiai abnormalitások penetranciája. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a *ceh-13* mellett a középső homológ *Hox* paralógok is – bár kisebb mértékben – hozzájárulnak a normális embrionális fejlődés biztosításához. A vizsgált gének feltételezhetően kölcsönhatásban állnak egymással az embrionális fejlődés szabályozásában: funkcionális redundancia figyelhető meg a *ceh-13* és *lin-39*, valamint a *ceh-13* és a *mab-5* gének között. Ez magyarázhatja, miért nem esszenciálisak a középső *Hox* paralógok egyszeres mutáns kombinációkban.



### 5.2.2. A LIN-39 és MAB-5 HOX fehérjék képesek helyettesíteni a CEH-13 funkcióját az életképesség és a morfogenezis szabályozásában

Megvizsgáltam azt is, hogy a *lin-39* megnövekedett dózisa (egy transzlációs fúziós LIN-39::GFP transzgén bevitelével), illetve a *mab-5* gén egy funkciónyeréses mutációja képes-e menekíteni a *ceh-13(-)* mutánsok életképtelenségét és egyedfejlődési rendellenességeit. *ceh-13(sw1)mab-5(e1751gf)* kettős mutáns, illetve LIN-39::GFP konstrukciót hordozó *ceh-13(sw1)* mutánsokban azt tapasztaltam, hogy jelentősen megnő a túlélő egyedek (*escaperek*) aránya a *ceh-13(-)* egyszeres mutánsokéhoz képest. *ceh-13(sw1)mab-5(e1751gf)* kettős mutánsokban mind az embrionális, mind a lárvális életképtelenség jelentős csökkenése figyelhető meg. A *ceh-13(sw1);LIN-39::GFP* genotípusú törzsben a lárvális letalitás csökken, míg az embrionális életképtelenség nő. Ezt okozhatja egyrészt az endogén *lin-39* és a LIN-39::GFP konstrukció transzkripcionális szabályozásának eltérése (a fúziós LIN-39::GFP konstrukció random integrálódott a genomban), vagy a transzgén által okozott ko-szuppressziós hatás, amely az endogén *lin-39* gén csendesítéséhez vezet. Az utóbbi esetben a megnövekedett embrionális letalitás utalhat a *ceh-13* és *lin-39* gének genetikai interakciójára.

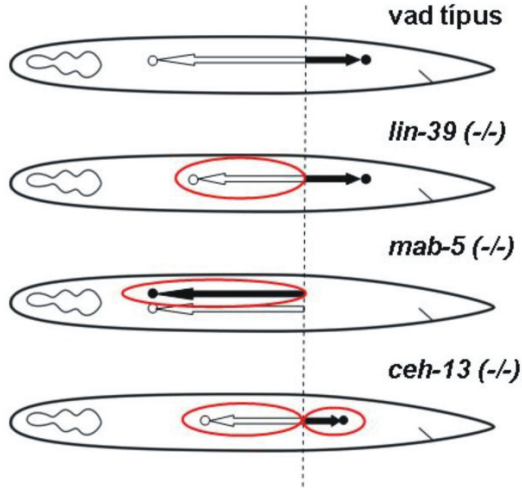
A túlélő *ceh-13(-)* mutáns állatok fenotípusának elemzése során azt tapasztaltam, hogy a *mab-5* funkciónyeréses mutációja 90%-ban menekíti a *ceh-13* aktivitás hiánya által okozott morfológiai defektusokat a túlélő és kifejlődő *ceh-13(sw1)mab-5(e1751gf)* kettős mutánsokban. Továbbá a kettős mutánsok növekedési üteme és mozgáskoordinációja is a *mab-5(gf)* egyszeres mutánsokéhoz hasonlít. A kettős mutánsok a *ceh-13(-)* null mutánsoknál gyorsabban fejlődnek és a mozgásuk normális. A *ceh-13(sw1);LIN-39::GFP* transzgenikus állatok szintén gyorsabban fejlődnek a transzgénnel nem rendelkező *ceh-13(-)* mutánsoknál, azonban az *sw1* és *ok737* mutációk által okozott morfológiai deformítások továbbra is megfigyelhetők a test anterior régiójában. A *mab-5gf* mutáció a morfológiai deformítások szuppresszáálásában is hatékonyabban működik, mint a LIN-39::GFP transzgén. Ezért a továbbiakban, a sejt migráció és a sejt fúzió szabályozásában a *mab-5(e1751gf)* mutáció hatását vizsgáltam. Összeségében eredményeim azt mutatják, hogy a középső *Hox* paralógok dózisének a növekedése képes hatékonyan szuppresszáálni a pleiotróp *Ceh-13(-)* fenotípus számos aspektusát (életképtelenség, morfológiai abnormalitások és lassult egyedfejlődési rátát). Mindez szintén arra utal, hogy a *C. elegans* anterior és középső homológ *Hox* paralógok részben redundáns funkciókat látnak el az egyedfejlődési folyamatok szabályozásában. Ez magyarázhatja a *ceh-13(-)* *escaper* állatok jelenlétét.

### 5.3. A *ceh-13* funkciója a posztembrionális egyedfejlődésben

#### 5.3.1. A *ceh-13* szabályozza a Q leszármazott idegsejtek migrációját

A *C. elegans* anterior (*ceh-13*) és a középső *Hox* paralóg csoportba tartozó (*lin-39* és *mab-5*) gének kapcsolatának tanulmányozása céljából megvizsgáltam a *ceh-13* funkcióját olyan posztembrionális egyedfejlődési folyamatokban, amelyek szabályozásában a *lin-39* és *mab-5* gének (is) részt vesznek. Egyik ilyen modellrendszer a Q neuronális sejtvonalba tartozó sejtek vándorlása és pozíciójának a meghatározása. A QR neuroblaszt és leszármazottai születési helyüktől anterior irányba vándorolnak. Ezt a sejt migrációs folyamatot a *lin-39* szabályozza. A *mab-5* a születési helyüktől poszterior irányba vándorló OL sejtnek és leszármazottainak a mozgását irányítja. A *lin-39* és *mab-5* gének egymást követő funkcionális doménjukon belül fejtik ki hatásukat a sejt migráció szabályozásában. Az általam kapott eredmények azt mutatják, hogy a vizsgált anterior homológ *Hox* gén *ceh-13* funkcióvesztése meglepő módon mind a QR (anterior), mind a QL (poszterior) leszármazott sejtek migrációját befolyásolta (**42. ábra**). *ceh-13(-)* mutánsokban nemcsak az anterior QR leszármazott neuronok helyzetében tapasztalható változás, hanem a QL leszármazott idegsejtek pozíciója is eltért a vad típustól. Mindazonáltal az anterior testtájon a *ceh-13* hatása erősebb, mint a test poszterior régiójában (anterior sejtek esetében: 100%-os diszpozíció, poszterior neuronok esetében: 22%). A megfigyelt jelenségből arra lehet következtetni, hogy a *ceh-13* funkciója (expressziójához hasonlóan) nem korlátozódik az állat testének elülső régiójára, hanem a középső és hátulsó testtájakra is kiterjed és átfed a *lin-39* és *mab-5* középső *Hox* paralógok működési doménjával.

- → QR + leszármazott sejtek vándorlása
- → QL + leszármazott sejtek vándorlása



42. ábra. Anterior és középső paralóg *Hox* gének hatása a QR/QL sejtek vándorlására. A QR (fehér pötty) és QL (fekete pötty) neuronális prekursor sejtek a féreg testének középső-poszterior régiójában születnek (a függőleges szaggatott vonal a QR/QL neuroblasztok születési helyét jelzi). A lárvális fejlődés során a QR és leszármazottai anterior, a QL sejt és leszármazottai pedig poszterior irányba vándorolnak. *lin-39(-)* mutánsokban az anterior sejtigrációk megrövidülnek. A *mab-5* funkcióvesztése a poszterior migrációk defektusát eredményezi. A *ceh-13* aktivitás hiánya mind az elülső-középső, mind a hátulsó testrészeken befolyásolja a QR/QL leszármazott sejtek pozícióját. Az egyes *Hox* gének mutációs inaktiválásának hatására megváltozó sejtigrációk pirossal vannak bekarikázva az ábrán.

A *ceh-13(-)* mutánsokban megfigyelt sejtigrációs defektusok emlékeztetnek a *lin-39(-)*/*ceh-20(-)* és *lin-39(-);unc-62(-)*, illetve *mab-5(-);ceh-20(-)* és *mab-5(-);unc-62(-)* kettős mutánsokban leírt sejtigrációs rendellenességekre (Yang és mtsi., 2005). Yang és munkatársai kimutatták, hogy az említett *Hox(-);Hox-ko-faktor(-)* kettős mutánsok fenotípusa eltér a *lin-39(-)* és *mab-5(-)*, illetve a *ceh-20(-)* és *unc-62(-)* egyszeres mutánsok fenotípusától. Az általam kapott eredmények ismeretében elképzelhető, hogy a *ceh-20* és *unc-62* géneknek a sejt-vándorlás szabályozására gyakorolt *lin-39*- és *mab-5*-független hatását az is magyarázhatja/okozhatja, hogy e géneknek az inaktiválása a *ceh-13* normális funkcióját megváltoztatja.

A *lin-39* és *mab-5* *Hox* gének expresszálódnak a vándorló sejtekben (a *lin-39* a QR és QL, a *mab-5* csak a QL neuronális prekursor sejtben) és sejt-autonóm módon fejtik ki a

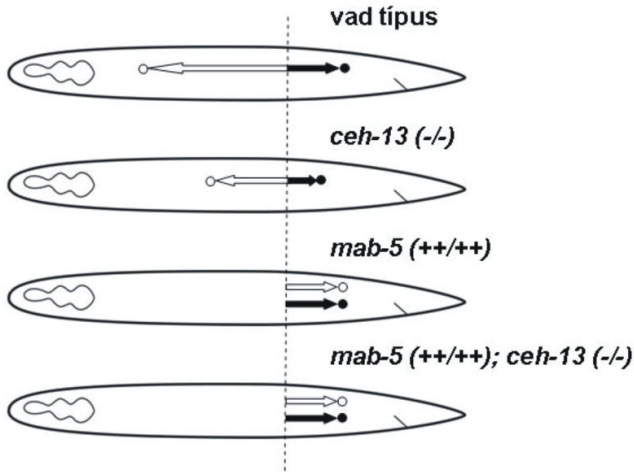
hatásukat a sejtvándorlás folyamatában (Salser és Kenyon, 1993). A *ceh-13* vizsgálata során nem tapasztaltam expressziót a QR/QL sejtekben, illetve leszármazottaikban. Ismert azonban, hogy gyenge *ceh-13* expresszió megfigyelhető a V5/Q ösben (Wittmann és mtsi., 1997). Ezért lehetséges, hogy a *ceh-13* az adott sejtvonalon belül fejt ki a hatását és így működése a leszármazott utódsejtek sorsát befolyásolja. Alternatív módon elképzelhető, hogy a *ceh-13* más módon játszik szerepet a sejt migráció szabályozásában: például a sejtmozgásokat irányító extracelluláris szignálok mennyiségének és/vagy összetételének a megváltoztatásán vagy a receptoraikat kódoló gének transzkripcionális szabályozásán keresztül.

Vizsgálataim során azt tapasztaltam, hogy a *ceh-13* nemcsak a Q leszármazott neuronok pozícióját befolyásolja, hanem számos más, vad típusú állatban anterior testtájakon elhelyezkedő idegsejt pozícióját is. Ilyen sejtek pl. az ALM érzőneuronok vagy a TAX-4::GFP neuronális marker által jelölt anterior helyzetű idegsejtek. Az ALM és PLM neuronok esetében axonnövekedési defektusokat is megfigyeltem *ceh-13* deficiens állatokban. Ezek a defektusok nemcsak anterior, hanem poszterior testtájon is megfigyelhetőek voltak. *ceh-13(sw1)* mutánsokban továbbá számos esetben találtam TAX-4::GFP-pozitív sejteket a középső testtájon (vad típusú állatokban a *tax-4* középső testtájon nem expresszálódik). Ezt okozhatja az adott sejtek diszpozíciója (migrációs defektje), vagy lehet sejt sors-specifikáció hibájának az eredménye (ez a jelenség előfordulhat a *Hox* gének működésének zavara esetében).

A Q sejt vonalba tartozó idegsejtek vándorlásában megvizsgáltam, hogy a *ceh-13(-)* mutánsokban megfigyelhető sejt migrációs defektusok szuppresszálhatók-e *mab-5(e1751gf)* mutációval. A *mab-5* a QL leszármazottak poszterior testtájon történő vándorlását szabályozza (Salser és Kenyon, 1993). Működésének hiányában a QL és leszármazottai a poszterior helyett anterior irányba vándorolnak. A *mab-5(gf)* mutációja ellentétes hatást vált ki: az anterior helyzetű QR leszármazott neuronok a test poszterior része felé vándorolnak. *ceh-13(-)* mutáns genetikai háttérben mind az anterior mind a poszterior sejt vándorlások megrövidülése figyelhető meg. *ceh-13(sw1)mab-5(e1751gf)* kettős mutánsokban, a QR.paa és QL.paa sejtek végleges helyzete megegyezik a *mab-5(e1751gf)* mutáns háttérben megfigyelt pozíciójukkal. Ez azt jelenti, hogy a *mab-5 gf* mutációja szuppresszálja a QL.paa sejt *ceh-13(-)* mutánsokban megfigyelhető migrációs defektusát, míg a QR.paa - eredetileg anterior - pozíciója még poszteriorabb irányba toódik el (additív hatás) (**43. ábra**). Ezek az adatok arra utalnak, hogy a *mab-5* gén fokozott működése a Q leszármazott idegsejtek pozíciójának meghatározása során részlegesen szuppresszálja a *ceh-13* aktivitás hiánya által okozott rendellenességeket.

○ → QR + leszármazott sejtek vándorlása

● → QL + leszármazott sejtek vándorlása

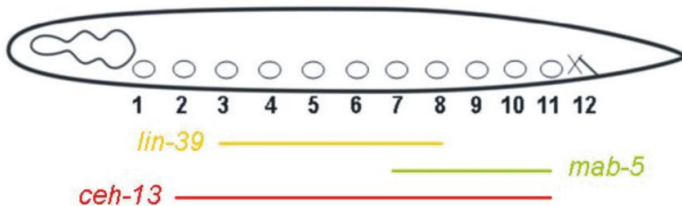


43. ábra. Egy funkciónyeréses *mab-5* mutáció szuppresszálja a *cheh-13* genetikai null mutánsokban megfigyelhető anterior sejtmigrációs defektusokat. A QR (fehér pötty) / QL (fekete pötty) neuronális prekursor sejtek a féreg testének középső-poszterior régiójában születnek (a függőleges szaggatott vonal a QR/QL neuroblasztok körülbelüli születési helyét jelzi). A lárvális fejlődés során a QR és leszármazottai anterior (fehér nyíl), a QL sejt és leszármazottai pedig poszterior irányba (fekete nyíl) vándorolnak. *cheh-13(-/-)* mutáns háttérben mind az anterior, mind a poszterior sejtmigrációk megrövidülése figyelhető meg. A *mab-5* funkciónyeréses mutációja az anterior sejtvándorlások irányát poszteriorra változtatja. A *cheh-13(sw1)mab-5(e1751gf)* kettős mutánsokban a migráció defektus megegyezik a *mab-5(e1751gf)* egyszeres mutánsokban tapasztaltakkal.

### 5.3.2. A *cheh-13* szabályozza a Pn.p epidermális sejtek fúzióját

A Pn.p epidermális sejtek sorsának meghatározása szintén egy olyan esemény a *C. elegans* posztembrionális egyedfejlődése során, amelyet a *lin-39* és *mab-5 Hox* gének szabályoznak. Az L1 lárvastádium végén, az állatok hasi oldalán elhelyezkedő 11 darab Pn.p epidermális sejt egy része fuzionál a hipodermális szyncyciummal (*hyp7*). Vad típusú állatokban a LIN-39 és MAB-5 fehérjék határozzák meg, hogy az egyes Pn.p sejtek milyen sejtorsot differenciáljanak (Clark és mtsi., 1993; Wang és mtsi., 1993). A P(1-2).p anterior sejtek sorsát a *lin-39* és *mab-5* gének nem befolyásolják, mert ezek a sejtek kívül esnek funkcionális doménjaik határán. A *lin-39* és

*mab-5* gének egymást követő, részben egymással átfedő doménokban expresszálódnak a Pn.p sejtekben és sejt-autonóm módon szabályozzák ezen sejtek fúzióját. A *ceh-13(-)* mutánsok sejt-fúziós mintázatának a vizsgálata során azt találtam, hogy a *ceh-13* aktivitás hiánya szintén befolyásolja a fuzionáló vs nem-fuzionáló Pn.p sejtek számát és mintázatát. *ceh-13(sw1)* mutáns hermafroditákban a P(3-8).p sejteken kívül további anterior és poszterior Pn.p sejtek maradnak fuzionálatlan állapotban. A *ceh-13* hatása a Pn.p sejtek fúziójára nemcsak az anterior testrészen figyelhető meg, hanem az állatok testének közel teljes hosszára kiterjed: a P(2-11).p sejtek mutatnak sejt-fúziós defektusokat *ceh-13(-)* mutáns állatokban. A *ceh-13* sejt-fúzió kontroljában mutatott funkciója átfed a *lin-39* és *mab-5* gének funkcionális doménjával (44. ábra).



**44. ábra.** A *ceh-13*, *lin-39* és *mab-5* gének funkcionális doménja a Pn.p sejtek fúziójának szabályozásában. A *Hox* gének funkciója jellemzően meghatározott testrégiókban figyelhető meg. A *lin-39* a P(3-8).p sejtek, a *mab-5* pedig a P(7-11).p sejtek fúzióját szabályozza. A *ceh-13* sejt-fúzió szabályozására gyakorolt hatása a P(2-11).p sejtek kiterjedésében kimutatható. A *ceh-13* funkcionális doménja tehát átfed a középső *Hox* paralógok funkcionális doménjával. A számok a Pn.p sejteket (üres karikák az állat ventrális részén) jelölik.

A Q leszármazott neuronok pozíciójának meghatározása során kapott eredményekhez hasonlóan a *ceh-13(-)* mutánsokban a Pn.p sejtek esetében megfigyelt sejt-sors-adoptációs defektusok is emlékeztettek a *lin-39(-);ceh-20(-)* és *lin-39(-);unc-62(-)*, valamint *mab-5(-);ceh-20(-)* és *mab-5(-);unc-62(-)* kettős mutánsokban leírt rendellenességekre (Yang és mtsi., 2005). Elképzelhető, hogy a *Hox(-);Hox kofaktor(-)* kettős mutánsokban tapasztalt, az egyszeres *Hox(-)*, illetve *Hox ko-faktor(-)* mutáns állatokétól eltérő fenotípus kialakulásához hozzájárul az is, hogy a HOX ko-faktorok inaktíválása a *ceh-13* aktivitására is hatással van.

A *lin-39* és *mab-5* génekkel ellentétben a *ceh-13* nem expresszálódik a Pn.p epidermális sejtekben. Korai L1 stádiumú lárvákban azonban a P ektodermális prekursor sejtekben (a Pn.p sejtek közvetlen őseiben) erős *ceh-13::gfp* expresszió detektálható. Ennek az információnak az ismeretében elképzelhető, hogy a *ceh-13* Pn.p sejtek sorsának meghatározására gyakorolt hatása sejtvonal-autonóm módon megy végbe.

Az epidermális sejtek apikális membránját jelölő JAM-1::GFP marker vizsgálata alapján a *ceh-13* aktivitása nem kizárólag a Pn.p sejtekben, hanem más sejt típusokban (pl. P ektodermális prekursor sejtekben, V-sejtekben és varratsejtekben) lejátszódó sejt fúziós eseményekre is hatással van. A P, V és varratsejtek esetében sejtadhéziós abnormalitások is előfordulnak *ceh-13(-)* mutánsokban. Ezek a defektusok nem korlátozódnak az anterior testrészeire, hanem az állatok testének középső és hátsó régióiban is megfigyelhetők.

A Pn.p epidermális sejtek fúziós sorsának meghatározása során szintén megvizsgáltam, hogy a *mab-5* gén *e1751gf* mutációja befolyásolja-e a *ceh-13(-)* mutánsokban megfigyelhető sejt fúziós defektusok kialakulását. *mab-5(e1751gf)* mutáns állatok Pn.p sejt fúziós mintázata megegyezik a vad típussal. A *ceh-13(sw1)mab-5(e1751gf)* kettős mutánsok esetében azt tapasztaltam, hogy a *mab-5* funkciónyeréssel mutációja 100%-ban szuppresszálja a *ceh-13(-)* mutáns háttérben megfigyelhető sejt fúziós defektusokat. A sejt migráció szabályozásánál tapasztaltakhoz hasonlóan a *mab-5* fokozott működése a Pn.p sejtek fúziójának kontrollálása során is ellensúlyozni tudja a *ceh-13* aktivitás hiányát.

### 5.3.3. A *ceh-13* befolyásolja a vulva fejlődését

A hermafrodita állat testének középső részén a ventrális oldalon található a páros szerv. A *C. elegans* vulvaszövet kifejlődése intenzíven tanulmányozott és viszonylag részletesen ismert egyedfejlődési folyamat és közkedvelt szervfejlődési modell. A vulva differenciálódásában a *lin-39 Hox* gén játszik központi szerepet: promóterén integrálódnak a vulva fejlődését szabályozó jelátviteli útvonalak (Ras, Notch, Wnt, synMuv, szex-determinációs génkaszkád) hatásai (Clandinin és mtsi., 1997). A *ceh-13* az anterior *Hox* homológ csoport képviselője *C. elegans*-ban. Az anterior *Hox* gének más taxonokban elsődlegesen az anterior testtájak mintázatának meghatározásában játszanak szerepet (kolinearitási elv). A *ceh-13* azonban a középső és hátulsó testtájakon is hat a morfogenezisre. *ceh-13* deficiens hermafroditákban például különböző vulva fenotípusok is megfigyelhetők. A *ceh-13* vulvafejlődésre gyakorolt hatásának a tanulmányozása céljából *ceh-13(sw1)* és *ceh-13(ok737)* mutáns állatokat kereszteztem vulva fejlődését szabályozó synMuv útvonal deficiens mutáns állatokkal. A *ceh-13* inaktíválása szignifikánsan csökkentette az átlagos vulvaszámot különböző *synMuv AB* kettős mutáns genetikai háttérben.

A fejlődő vulvaszövetben nem detektáltam *ceh-13* expressziót sem vad típusú állatokban, sem *synMuv AB* kettős mutánsokban. A *ceh-13* ezért nem direkt, hanem indirekt

módon befolyásolhatja a vulva fejlődését. A *ceh-13* vulvafejlődést szabályozó hatása például érkezhethet a hipodermiszéből, amelyben CEH-13 akkumuláció figyelhető meg. A *ceh-13* vulvafejlődésre gyakorolt hatása a középső testtájon, a *lin-39 Hox* gén funkcionális doménjával átfedve nyilvánul meg.

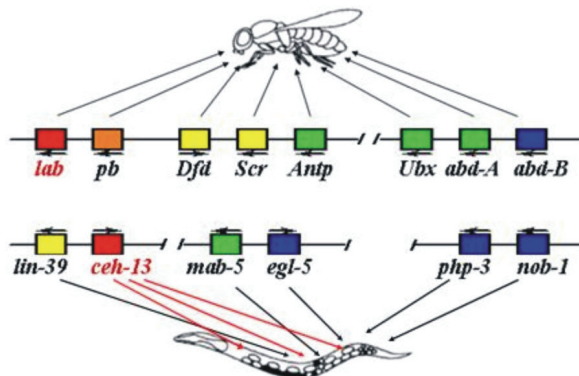
#### **5.4. A *ceh-13* legközelebbi paralógjai a *lin-39* és a *mab-5***

A *C. elegans Hox* gének hasonlóságának, ezáltal egymáshoz képest való rokonságának, leszármazási viszonyainak vizsgálatára összehasonlítottam a *C. elegans Hox* kluszter tagjainak aminosav-szekvenciáját. A szekvencia-illesztés során kapott adatokból az látszik, hogy a *ceh-13*-mal a kluszter tagjai közül a szomszédos *lin-39* és *mab-5* középső homológ csoportba tartozó *Hox* paralógok mutatják a legnagyobb fokú hasonlóságot. Ez az eredmény arra enged következtetni, hogy a *C. elegans Hox* kluszteren belül leszármazás tekintetében az említett három gén közelebbi rokonságban áll egymással, mint a kluszter többi tagjával. A 4.4. fejezetben látható filogenetikai fák (40-41. ábrák) mintázata arra utal, hogy a kluszter evolúciójának egy korábbi fázisában történhetett az anterior és poszterior csoportok őseinek a szétválása, és később további tandem duplikációk vezettek el a filogramokon elkülönülő anterior-középső, illetve poszterior homológ géncsoportok létrejöttéhez.

#### **5.5. A *C. elegans Hox* kluszter korai evolúciója**

Doktori munkámban sikerült kimutatnom, hogy a *ceh-13* funkciója nemcsak az embrionális fejlődés során nyilvánul meg, hanem különböző posztembrionális egyedfejlődési folyamatokban (sejtmigráció, sejtfúzió, vulvafejlődés) is kimutatható a hatása. A *ceh-13* aktivitása továbbá nem korlátozódik az állat testének elülső régiójára, hanem a test csaknem teljes hosszára kiterjed és átfed a *Hox* kluszterben öt követő – középső paralóg csoportba tartozó – *lin-39* és *mab-5* gének expressziós doménjával (45. ábra).

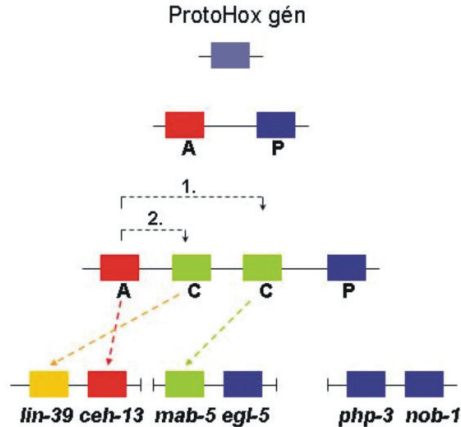




45. ábra. A *C. elegans* *Hox* gének funkcionális doménjei a test hossz tengelye mentén. A *Hox* gének – a kolinearitási elvnek megfelelően – egymást követő funkcionális doménokban működnek a genomi pozíciójuknak megfelelő sorrendben. *C. elegans*-ban az anterior ortológ *ceH-13* kivételt képez a kolinearitási szabály alól. A *ceH-13* működése nemcsak az elülső, hanem a középső és hátulsó testtájakon végbemenő egyedfejlődési folyamatok szabályozására is hatással van. Az ábra felső részén a *Drosophila*, alsó részén a *C. elegans* *Hox* kluszter látható. A gyümölcslégy és féreg *Hox* ortológok azonos színekkel vannak jelölve. A fekete és piros nyilak az adott *Hox* paralógok a funkcionális doménját mutatják a gyümölcslégy, illetve a féreg testének különböző részein.

A kétoldali szimmetriával rendelkező állattörzsek prototipikus *Hox* kluszterének evolúcióját illetően különböző elméletek léteznek (Garcia-Fernandez, 2005). Abban a kérdésben azonban megegyeznek a különböző álláspontok, hogy a kluszter evolúciójának korai fázisában egy ősi „*ProtoHox* gén” duplikációja hozta létre az anterior, illetve poszterior *Hox* paralóg csoportok őseit. A középső paralóg csoportok származása azonban továbbra is kérdéses. A fonálférgek törzsén belüli összehasonlító elemzések eredményei arra utalnak, hogy a Nematoda ős rendelkezhetett az összajúk 9 kanonikus homológ csoportot tartalmazó *Hox* kluszterével (Aboobaker és Blaxter, 2003). A *C. elegans* *Hox* klusztere mindössze 6 génből áll: feltehetően a *Caenorhabditis* nemzetség későbbi evolúció során veszítette el a hiányzó homológ csoportok képviselőit. Mindazonáltal, a *C. elegans* *Hox* kluszter tagjai között megtalálhatók anterior, középső és poszterior paralógok egyaránt (Kenyon, 1986; Schaller és mtsi., 1990; Bürglin és Ruvkun, 1993; Clark és mtsi., 1993; Wang és mtsi., 1993; Wittmann és mtsi., 1997; Brunswick és mtsi., 1999; Van Auken és mtsi., 2000). Szekvencia hasonlóság alapján a középső paralóg csoport(ok)ba sorolható *lin-39* és *mab-5* gének az anterior ortológ *ceH-13*-mal mutatnak közelebbi rokonságot. Az általam végzett vizsgálatok eredményei arra engednek következtetni, hogy ez a rokonság funkcionális szinten is megfigyelhető az említett három gén között. A *ceH-*

13, *lin-39* és *mab-5* gének részben redundáns funkciót látnak el egyes egyedfejlődési folyamatok szabályozása során (sejtmigráció és sejtfúzió szabályozása, vulvafejlődés). Kísérleteim során sikerült igazolnom, hogy a *ceh-13*, *lin-39* és *mab-5* génekről képződő fehérjék – szekvenciális és strukturális hasonlóságuknak megfelelően – képesek részben helyettesíteni egymás egyedfejlődési funkcióját. Ezek a megfigyelések azt a feltételezést támasztják alá, hogy a középső paralóg csoport mai tagjai (*lin-39* és *mab-5*) az anterior őstől származtak a *Hox* kluszter evolúciója során (46. ábra).



46. ábra. A *C. elegans* *Hox* kluszter korai evolúciójának modellje. A *Hox* kluszter evolúciójának korai szakaszában egy „ProtoHox” gén duplikációja hozhatta létre az anterior (A) és poszterior (P) *Hox* paralóg csoportok őst. A középső paralóg csoportok (C) az anterior őst további tandem duplikációja során keletkeztek. A *C. elegans* *Hox* gének szekvencia hasonlóságából arra lehet következtetni, hogy a *mab-5* gén az anterior őstől korábbi, a *lin-39* egy későbbi duplikációja során jött létre (lásd 41-42. ábrák a 4.4. fejezetben).

Eredményeim hozzájárulhatnak a *C. elegans* *Hox* gének működésének, és ezáltal a főleg egyedfejlődését szabályozó genetikai mechanizmusok jobb megismeréséhez, valamint a Nematoda *Hox* kluszter korai evolúciójának pontosabb megértéséhez. Kísérleteim arra is bizonyosságot szolgálnak, hogy a *C. elegans*, mint viszonylag egyszerű testfelépítésű modellszervezet, kiválóan alkalmas evolúciós vizsgálatokra, valamint a redundáns génműködés és a funkcionális diverzifikáció tanulmányozására. A *Hox* működés pontosabb megismerése az orvostudomány számára is fontos lehet, a *Hox* gének funkcióvesztése által okozott fejlődési rendellenességek gyógyítása szempontjából.

## 5.6. A *tra-1* gén feltehetően egy *synMuv B* gén

A *C. elegans* egyedfejlődése során a szomatikus szex kialakulása - így az adott nemnek megfelelő párzószervek kifejlődése is - az ún. szex-determinációs útvonal által szabályozott, amelynek terminális effektora a *tra-1* gén (Ceol és Horvitz, 2004; Harrison és mtsi., 2007; Fay és Yochem, 2007; Cui és Han, 2007). A *tra-1* a *lin-39 Hox* gén expressziójának szabályozásán keresztül szerepet játszik a hermafrodita párzószerv fejlődésének szabályozásában (Szabó és mtsi, 2009). A szomatikus szöveti differenciáció irányításában a *tra-1* alternatív módon funkcionál a *synMuv B* típusú géncsalád tagjaként azonosított *tra-4* génnel (Grote és Conradt, 2006). A *synMuv B* génekről ismert, hogy funkciójuk befolyásolja a vulva sejtorsók meghatározását a vulvafejlődés korai szakaszában. Különböző *synMuv* osztályokba tartozó - redundáns működést mutató - gének együttes funkcióvesztése *Muv* fenotípust okoz. Kísérleteim során kimutattam, hogy a *tra-1* csökkent, illetve fokozott működése befolyásolja az átlagos vulvaszám alakulását *synMuv AB* kettős mutáns háttérben. Eredményeim továbbá azt igazolják, hogy a *tra-1* genetikai kölcsönhatást mutat a *synMuv A* osztályba tartozó génekkel a vulvafejlődés szabályozása során. A vizsgált *synMuv B* gének viszonylatában nem tapasztaltam hasonló interakciót. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a *tra-1* egy *synMuv B* gén.

## 6. Összefoglalás

A *Hox* gének evolúciósan konzervált transzkripciós faktorokat kódolnak, amelyek az anteroposterior testmintázat kialakításában játszanak szerepet a korai egyedfejlődés során. A *Hox* gének hibás működése súlyos fejlődési rendellenességek kialakulásához vezethet. Doktori munkám során az anterior és középső *Hox* homológ csoportokba tartozó géneknek a sejtvándorlás és sejtfüzió szabályozásában betöltött szerepét, valamint egymással való kölcsönhatásukat tanulmányoztam, a főként *Caenorhabditis elegans*-ban.

A *C. elegans Hox(-)* mutánsok fenotípusos elemzése során kimutattam, hogy az anterior ortológ *ceh-13* funkcióvesztése nemcsak a test elülső, hanem középső és hátsó régiójában is okoz morfológiai és egyedfejlődési rendellenességeket okoz, amelyek részben megegyeznek más *Hox* paralógok inaktiválása által okozott elváltozásokkal. A *Hox* kluszter tagjaira specifikus HOX::GFP riporter gének konstrukciók segítségével végzett expressziós elemzés eredményeként igazoltam, hogy a *ceh-13* expressziós doménja átfed a középső homológ csoportba tartozó *lin-39* és *mab-5* gének expressziós doménjával. A *ceh-13*, *lin-39* és *mab-5 Hox* gének genetikai interakcióinak tanulmányozása során bizonyítottam, hogy a vizsgált gének kölcsönhatnak egymással az embrionális fejlődés során. A *lin-39* extra kópiája, illetve a *mab-5* funkciónyeréses mutációja képes szuppresszálni a *ceh-13* működés hiánya által okozott fejlődési rendellenességeket, ami a gének közötti redundáns működésre utal.

A posztembrionális egyedfejlődés során vizsgáltam a *ceh-13* funkcióját olyan folyamatokban, amelyek a *lin-39* és *mab-5* gének által is szabályozottak. Kimutattam, hogy a *ceh-13* működése befolyásolja a Q leszármazott idegsejtek pozícióját, valamint a Pn.p epidermális sejtek sorsának meghatározását és ennek következményeként a hermafrodita pároszerv fejlődését is. Hatása nemcsak az elülső, hanem a középső és hátsó testtájakon is kimutatható volt, ahol átfedést mutat a *lin-39* és *mab-5* gének funkcionális doménjával.

A bioinformatikai módszerek segítségével megerősítettem, hogy a *ceh-13* legközelebbi paralógjai a *C. elegans Hox* kluszterben belül a *lin-39* és a *mab-5*.

A kétoldali szimmetriával rendelkező állattörzsek *Hox* klusztere feltételezhetően egy ősi „ProtoHox” gén sorozatos tandem duplikációinak eredményeként jött létre. A *ceh-13*, *lin-39* és *mab-5* gének között megfigyelhető szekvenciális hasonlóság és részleges funkcionális redundancia arra utal, hogy a középső *Hox* homológ géncsoport(ok) feltehetően az anterior őstől származtathatók az anterior és poszterior homológ ősök szétválása után a *Hox* kluszter korai evolúciója során. Eredményeim hozzájárulhatnak a *C. elegans Hox* kluszter működésének és evolúciójának, valamint a genetikai redundancia jelenségének a pontosabb megértéséhez.

## 7. Summary

*Hox* genes encode evolutionary conserved transcriptional factors which control cell fates along the anteroposterior axis during animal development. Malfunctioning of *Hox* genes can result in serious morphological abnormalities and early lethality. I have studied the role of the anterior and central paralog *Hox* genes in cell migration and cell fusion as well as their interactions with each other in controlling these developmental processes in the nematode *Caenorhabditis elegans*.

By phenotypic analysis, I showed that the inactivation of the anterior ortholog, *ceh-13* causes morphological abnormalities not only at the anterior but also at the middle and posterior body parts of the mutant animals. These defects resemble to those observed in other *Hox(-)* mutants. I constructed specific translational fusion HOX::GFP reporter constructs to compare the expression patterns of *C. elegans Hox* paralogs. My data demonstrate that the expression domain of *ceh-13* overlaps with that of *lin-39* and *mab-5*. I also showed that these genes genetically interact with each other in controlling embryonic development. Furthermore, extra copies of *lin-39* and a gain of function mutation of *mab-5* are able to suppress the developmental defects caused by *ceh-13* deficiency. These results suggest a partial functional redundancy between these *Hox* genes.

I also studied the role of *ceh-13* in postembryonic developmental processes which are known to be controlled by *lin-39* and *mab-5*. I found that *ceh-13* influences the migration of Q descendants neurons and the fusion of Pn.p epidermal cells with the hypodermis. *ceh-13* also affected the hermafrodite vulva development was also affected by *ceh-13*. The effect of *ceh-13* on cell fate specification is obvious in both anterior and mid-posterior body regions where its functional domain overlaps with that of *lin-39* and *mab-5*.

Data from multiple sequence alignment (using bioinformatic tools) revealed that the closest paralogs of *ceh-13* within the *C. elegans Hox* cluster are *lin-39* and *mab-5*.

The *Hox* clusters of bilaterians arose by the sequential tandem duplications of an ancient „*ProtoHox*” ancestor. An early gene duplication event of this „*ProtoHox*” gene might have given rise to the ancestors of the anterior and posterior paralogous groups. The sequence similarity and partial functional redundancy among *ceh-13*, *lin-39* and *mab-5* support our hypothesis that the medial paralog *Hox* genes evolved from an anterior ancestor during the evolution of the *Hox* clusters. Together, our findings may help to understand better how the *C. elegans Hox* genes function during development and how they may have emerged during evolution.

## 8. Irodalomjegyzék

- Aboobaker AA, Blaxter ML. (2003) Hox Gene Loss during Dynamic Evolution of the Nematode Cluster. *Curr. Biol.* **13**, 37-40.
- Abu-Shaar M, Ryoo HD, Mann RS. (1999) Control of the nuclear localization of Extradenticle by competing nuclear import and export signals. *Genes Dev.* **13**, 935-945.
- Akam, M. (1987) The molecular basis for metameric pattern in the *Drosophila* embryo. *Development* **101**, 1-22.
- Arata Y, Kouike H, Zhang Y, Herman MA, Okano H, Sawa H. (2006) Wnt signaling and a Hox protein cooperatively regulate *psa-3/Meis* to determine daughter cell fate after asymmetric cell division in *C. elegans*. *Dev. Cell.* **11**, 105-115.
- Berthelsen J, Kilstrup-Nielsen C, Blasi F, Mavilio F, Zappavigna V. (1999) The subcellular localization of PBX1 and EXD proteins depends on nuclear import and export signals and is modulated by association with PREP1 and HTH. *Genes Dev.* **13**, 946-953.
- Berthelsen J, Zappavigna V, Ferretti E, Mavilio F, Blasi F. (1998) The novel homeoprotein Prep1 modulates Pbx-Hox protein cooperativity. *EMBO J.* **17**, 1434-1445.
- Bienz M, Hart K. (1996) A test for cell autonomy, based on di-cistronic messenger translation. *Development* **122**, 747-751.
- Biggin MD, McGinnis W. (1997) Regulation of segmentation and segmental identity by *Drosophila* homeoproteins: the role of DNA binding in functional activity and selectivity. *Development* **124**, 4425-4433.
- Botas J. (1993) Control of morphogenesis by HOM/Hox genes. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**, 1015-1022.
- Brenner S. (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics.* **77**, 71-94.
- Brunschwig K, Wittmann C, Schnabel R, Bürglin TR, Tobler H, Müller F. (1999) Anterior organization of the *Caenorhabditis elegans* embryo by the *labial*-like Hox gene, *ceh-13*. *Development* **126**, 1537-1546.
- Burke AC, Nelson CE, Morgan BA, Tabin C. (1995) Hox genes and the evolution of vertebrate axial morphology. *Development* **121**, 333-346.
- Bürglin TR. (1992) New motif in PBX genes. *Nature Genet.* **1**, 319-320.
- Bürglin TR, Finney M, Coulson A, Ruvkun G. (1989) *Caenorhabditis elegans* has scores of homeobox-containing genes. *Nature* **341**, 239-243.

- Bürglin TR, Ruvkun G, Coulson A, Hawkins NC, McGhee JD, Schaller D, Wittmann C, Müller F, Waterston RH. (1991) Nematode homeobox cluster. *Nature* **351**, 703.
- Bürglin TR, Ruvkun G. (1993) The *Caenorhabditis elegans* homeobox gene cluster. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **3**, 615-620.
- Bürglin TR. (1997) Analysis of TALE superclass of homeobox genes (MEIS, PBC, KNOX, Iroquois, TGIF) reveals a novel domain conserved between plants and animals. *Nucleic Acids Res.* **25**, 4173-4180.
- Bürglin TR. (1998) The PBC domain contains a MEINOX domain: Coevolution of Hox and TALE homeobox genes? *Dev. Genes Evol.* **208**, 113-116.
- Cameron, RA, Rowen, L, Nesbitt, R, Bloom, S, Rast, JP, Berney, K, Arenas-Mena, C, Martinez, P, Lucas, S, Richardson, PM, Davidson, EH, Peterson, KJ, Hood, L. (2006) Unusual gene order and organization of the sea urchin hox cluster. *J Exp Zool B Mol Dev Evol.* **306**, 45-58.
- Carroll SB. (1995) Homeotic genes and the evolution of arthropods and chordates. *Nature* **376**, 479-485.
- Carroll SB, Grenier JK, Weatherbee SD. (2001) From DNA to diversity. **Blackwell Science**, London
- Castelli-Gair J, Akam M. (1995) How the Hox gene Ultrabithorax specifies two different segments: the significance of spatial and temporal regulation within metameres. *Development* **121**, 2973-2982.
- Castelli-Gair J, Greig S, Micklem G, Akam M. (1994) Dissecting the temporal requirements for homeotic gene function. *Development* **120**, 1983-1995.
- Ceol, CJ, Horvitz,HR. (2004) A new class of *C. elegans* synMuv genes implicates a Tip60/NuA4-like HAT complex as a negative regulator of Ras signalling. *Dev. Cell* **6**, 563-576.
- Ceol, CJ, Stegmeier, F, Harrison, MM, Horvitz, HR. (2006) identification and classification of genes that act antagonistically to let-60 Ras signaling in *Caenorhabditis elegans* vulval development. *Genetics* **173**, 709-726.
- Chan S, Jaffe L, Capovilla M, Botas J, Mann R. (1994) The DNA binding specificity of ultrabithorax is modulated by cooperative interactions with extradenticle, another homeoprotein. *Cell* **78**, 603-615.
- Chen, Z, Han, M. (2001) *C. elegans* Rb, NuRD, and Ras regulate *lin-39*-mediated cell fusion during vulval fate specification. *Curr. Biol.* **11**, 1874-1879.

- Chow, KL, Emmons Sw. (1994) HOM-C/Hox genes and four interacting lci determine the morphogenetic properties of single cells in the nematode male tail. *Development* **120**, 2579-2592.
- Clandinin, TR, Katz, WS, Sternberg, PW. (1997) *Caenorhabditis elegans* HOM-C genes regulate the response of vulval precursor cell to inductive signal. *Dev. Biol.* **182**, 150-161.
- Clark, SG, Chisholm, AD, and Horvitz, HR. (1993) Control of cell fates in the central body region of *C. elegans* by the homeobox gene *lin-39*. *Cell* **74**, 43-55.
- Conte D Jr, Mello CC. (2003) RNS interference in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Protoc Mol Biol.* **26**, 26-33.
- Cowing D, Kenyon C. (1996) Correct Hox gene expression established independently of position in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **382**, 353-356.
- Cui, M, Han, M. (2007) Roles of chromatin factors in *C. elegans* development. Wormbook, ed. The *C. elegans* Research Community, doi/10.1895/wormbook.1.139.1
- de Rosa, R, Grenier, JK, Andreeva, T, Cook, CE, Adoutte, A, Akam, M, Carroll, SB and Balavoine, G. (1999) Hox genes in brachiopods and priapulids and protostome evolution. *Nature* **399**, 772-776.
- Deschamps, J, van Nes, J. (2006) Developmental regulation of the Hox genes during axial morphogenesis in the mouse. *Development* **132**, 2931-2942.
- Duboule D. (1994) Temporal collinearity and the phylotypic progression: Bauplan and the evolution of morphologies through heterochrony. *Development Suppl.* 135-142.
- Duboule D, Morata G. (1994) Colinearity and functional hierarchy among genes of the homeotic complexes. *Trends Genet.* **10**, 358-364.
- Duboule, D, Dolle, P. (1989) The structural and functional organization of the murine HOX gene family resembles that of *Drosophila* Hox genes. *EMBO J.* **8**, 1497-1505.
- Duncan, I. (1996) How do single homeotic genes control multiple segment identities. *BioEssays* **18**, 91-94.
- Ebner A, Cabernard C, Affolter M, Merabet S. (2005) Recognition of distinct target sites by a unique Labial/Extradenticle/Homothorax complex. *Development* **132**, 1591-1600.
- Ekker SC, Jackson DG, von Kessler DP, Sun BI, Young KE, Beachy PA. (1994) The degree of variation in DNA sequence recognition among four *Drosophila* homeotic proteins. *EMBO J.* **13**, 3551-3560.



- Fay, DS, Yochem, J. (2007) The SynMuv genes of *Caenorhabditis elegans* in vulval development and beyond. *Dev Biol.* **306**, 1-9.
- Ferreira, HB, Zhang, Y, Zhao, C, Emmons SW. (1999) Patterning of *Caenorhabditis elegans* posterior structures by the Abdominal-B homolog, *egl-5*. *Dev Biol.* **207**, 215-228.
- Ferretti E, Marshall H, Popperl H, Maconochie M, Krumlauf R, Blasi F. (2000) Segmental expression of Hoxb2 in r4 requires two separate sites that integrate cooperative interactions between Prep1, Pbx and Hox proteins. *Development* **127**, 155-166.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNS in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **19**, 744-745.
- Garcia-Bellido AG. (1975) Genetic control of wing disk development in Drosophila. In *Cell Patterning. Ciba Found. Symp.* **29**, 161-178.
- Garcia-Fernandez, J. (2005) The genesis and evolution of the homeobox gene cluster. *Nat Rev Genet.* **6**, 881-92.
- Gaunt SJ. (1994) Conservation in the Hox code during morphological evolution. *Int. J. Dev. Biol.* **38**, 549-552.
- Graham, A, Papalopulu, N, and Krumlauf, R. (1989) The murine and Drosophila homeobox gene complexes have common features of organization and expression. *Cell* **67**, 367-378.
- Grote, P, Conradt, B. (2006) The PLFZ-like protein TRA-4 cooperates with the Gli-like transcription factor TRA-1 to promote female development in *C. elegans*. *Dev. Cell* **11**, 561-573.
- Guerry F, Marti, CO, Zhang, Y, Moroni, PS, Jacquery, E, Muller, F. (2007) The Mi-2 nucleosome remodeling protein LET-418 is targeted via LIN-1/ETS to the promoter of *lin-39/Hox* during vulval development of *C. elegans*. *Dev. Biol.* **306**, 469-479.
- Hamelin, M, Scott, IM, Way, JC, and Culotti, JG. (1992) The *mec-7*  $\beta$ -tubulin gene of *Caenorhabditis elegans* is expressed primarily in the touch receptor neurons. *EMBO J.* **11**, 2885-2893.
- Harrison, MM, Ceol, CJ, Lu, X, and Horvitz, HR. (2006) Some *C. elegans* class B synthetic multivulva proteins encode a conserved LIN-35 Rb-containing complex distinct from a NuRD-like complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 16782-16787.
- Harrison, MM, Lu, X, Horvitz, HR. (2007) LIN-61, one of two *Caenorhabditis elegans* malignant-brain-tumor-repeat-containing proteins, acts with the DRM and NuRD-like

- protein complexes in vulval development but not in certain other biological processes. *Genetics* **176**, 255-271.
- Hodgkin, J. (1987) Sex determination and dosage compensation in *Caenorhabditis elegans*. *Annu. Rev. Genet.* **21**, 133-154.
- Hoey T, Levine M. (1988) Divergent homeo box proteins recognize similar DNA sequences in *Drosophila*. *Nature* **332**, 858-861.
- Holland, PWM. (2001) Beyond the Hox: how widespread is homeobox gene clustering? *J. Anat.* **199**, 13-23.
- Hughes, CL, Kaufman, TC. (2002) Exploring the myriapod body plan: expression patterns of the ten Hox genes in a centipede. *Development* **129**, 1225-1238.
- Hurley, I, Hale, ME, Prince, VE. (2005) Duplication events and the evolution of segmental identity. *Evol Dev.* **7**, 556-567.
- Imura T, Pourquie O. (2007) Hox genes in time and space during vertebrate body formation. *Develop. Growth Differ.* **49**, 265-275.
- Ikuta, T, Yoshida, N, Satoh, N, Saiga, H. (2004) *Ciona intestinalis* Hox gene cluster: Its dispersed structure and residual colinear expression in development. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 15118-15123.
- Izpisua-Belmonte JC, Falkenstein H, Dolle P, Renucci A, Duboule D. (1991) Murine genes related to *Drosophila Abd-B* homeotic genes are sequentially expressed during development of the posterior part of the body. *EMBO J.* **10**, 2279-2289.
- Jacobs Y, Schnabel CA, Cleary ML. (1999) Trimeric association of Hox and TALE homeodomain proteins mediates HoxB2 hindbrain enhancer activity. *Mol Cell Biol.* **7**, 5134-5142.
- Jiang Y, Liu J. (2009) Two Hox cofactors, the Meis/Hth homolog UNC-62 and the Pbx/Exd homolog CEH-20, function together during *C. elegans* postembryonic mesodermal development. *Dev. Biol.* **334**, 535-546.
- Johnsen RC, and Baillie DL. (1988) Formaldehyde mutagenesis of the *eT1* balanced region in *Caenorhabditis elegans*: dose-response curve and the analysis of mutational events. *Mutat. Res* **201**, 137-147.
- Johnsen RC, and Baillie DL. (1997) Mutation. *C. elegans* II book (edited Donald L. Riddle Thomas Blumenthal Barbara J. Meyer James R. Priess) **Cold Spring Harbor Laboratory Press** Ebook

- Johnston SA, Salmeron JM, Dincher SS. (1987) Interactions of positive and negative regulatory proteins in the galactose regulation of yeast. *Cell* **50**, 143-146.
- Kenyon C. (1994) If Birds Can Fly, Why Can't We? Homeotic Genes and Evolution. *Cell*, **78**, 175-180.
- Kenyon CJ, Austin J, Costa M, Cowing DW, Harris JM, Honigberg L, Hunter CP, Maloof JN, Muller-Immergluck MM, Salser SJ, *et al.* (1997) The dance of Hox genes: Patterning the anteroposterior body axis of *Caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **62**, 293-305.
- Kenyon, C. (1986) A gene involved in the development of the posterior body region of *C. elegans*. *Cell* **46**, 477-487.
- Kessel M, Gruss P. (1991) Homeotic transformations of murine vertebrae and concomitant alteration of Hox codes induced by retinoic acid. *Cell* **67**, 89-104.
- Kmita M, Duboule D. (2003) Organizing axes in time and space: 25 years of collinear tinkering. *Science* **301**, 331-333.
- Kmita, M, van der Hoeven, F, Zákány, J, Krumlauf, R, Duboule, D. (2000) Mechanisms of Hox gene colinearity: transposition of the anterior Hoxb1 gene into the posterior HoxD complex. *Genes Dev.* **14**, 198-211.
- Koh K, Peyrot SM, Wood CG, Wagmaister JA, Maduro MF, Eisenmann DM, Rothman JH. (2002) Cell fates and fusion in the *C. elegans* vulval primordium are regulated by the EGL-18 and ELT-6 GATA factors – apparent direct targets of the LIN-39 Hox protein. *Development* **129**, 5171-5180.
- Komatsu, H, Mori, I, Rhee, JS, Norio, A, and Ohshima Z. (1996) Mutations in a Cyclic Nucleotide-Gated Channel Lead to Abnormal Thermosensation and Chemosensation in *C. elegans*. *Neuron* **17**, 707-718.
- Laney JD, Biggin MD. (1997) *zeste* mediated activation by an enhancer is independent of cooperative DNA binding in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 3602-3604.
- Lawrence P. (1992) *The Making of a Fly*. Oxford, England: **Blackwell Scientific Publications**.
- Lawrence, PA and Morata, G. (1994) Hox genes in vertebrate development. *Cell* **78**
- Lemons D, McGinnis W. (2006) Genomic evolution of Hox Gene Clusters. *Science* **313**, 1918-1922.
- Levine M, Hoey T. (1988) Homeobox proteins as sequence-specific transcription factors. *Cell* **55**, 537-540.

- Lewis EB. (1978) A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* **276**, 565-570.
- Liu H, Strauss TJ, Potts MB, Cameron S. (2006) Direct regulation of *egl-1* and of programmed cell death by the Hox protein MAB-5 and by CEH-20, a *C. elegans* homolog of Pbx1. *Development* **133**, 641-650.
- Liu J, Fire A. (2000) Overlapping roles of two Hox genes and the *Exd* ortholog *ceh-20* in diversification of the *C. elegans* postembryonic mesoderm. *Development* **127**, 5179-5190.
- Maloof, NJ, Kenyon, C. (1998) The Hox gene *lin-39* is required during *C. elegans* vulval induction to select the outcome of Ras signaling. *Development* **125**, 181-190.
- Manak J, Scott M. (1994) A class act: conservation of homeodomain protein functions. *Development Suppl.*, 61-71.
- Mann RS, Affolter M. (1998) Hox proteins meet more partners. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**, 423-429.
- Mann RS, Chan SK. (1996) Extra specificity from *extradenticle*: the partnership between HOX and PBX/EXD homeodomain proteins. *Trends. Genet.* **12**, 258-262.
- Mann RS. (1995) The specificity of homeotic gene function. *BioEssays* **17**, 855-863.
- McGinnis W, Krumlauf R. (1992) Homeobox genes and axial patterning. *Cell* **68**, 283-302.
- Meyer, BJ. (2000) Sex in the worm counting and compensating X-chromosome dose. *Trends Genet.* **16**, 247-253.
- Mohler, Wa, Simske, Sj, Williams-Masson, EM, Hardin, JD, White, JG. (1998) Dynamics and ultrastructure of developmental cell fusions in the *Caenorhabditis elegans* hypodermis. *Curr Biol.* **8**, 1087-1090.
- Molkentin J, Black BL, Martin JF, Olson EN. (1995) Cooperative activation of muscle gene expression by MEF2 and myogenic bHLH proteins. *Cell* **83**, 1125-1136.
- Nardelli-Haeffliger D, Bruce AEE, Shankland M. (1994) An axial domain of *Hox/Hox* gene expression is formed by morphogenetic alignment of independently specified cell lineages in leech *Helobdella*. *Development*
- Pai C-Y, Kuo T-S, Jaw TJ, Kurant E, Chen C-T, Bessarab DA, Salzberg A, Sun YH. (1997) The Homothorax homeoprotein activates the nuclear localization of another homeoprotein, Extradenticle, and suppresses eye development in *Drosophila*. *Genes Dev.* **12**, 435-446.
- Perrimon, N. (1994) The genetic basis of patterned baldness in *Drosophila*. *Cell* **76**, 781-784.

- Postlethwait JH. (1978) Clonal analysis of *Drosophila* cuticular patterns. in *The Genetics and Biology of Drosophila*. (ed. M. Ashburner and T. R. F. Wright). Vol. 2c, pp. 359-441. London, UK: Academic Press.
- Potts MB, Wang DP, Cameron S. (2009) Trithorax, Hox, and TALE-class homeodomain proteins ensure cell survival through repression of the BH3-only gene *egl-1*. *Dev. Biol.* **329**, 374-385.
- Pöpperl H, Bienz M, Studer M, Chan S, Aparicio S, Brenner S, Mann RS, Krumlauf R. (1995) Segmental expression of *Hoxb-1* is controlled by a highly conserved autoregulatory loop dependent upon *exd/pbx*. *Cell* **81**, 1031-1042.
- Raff RA. (1996) *The Shape of Life: Genes, Development and the Evolution of Animal Form*. Chicago, USA: **The University of Chicago Press**.
- Riddle, DL., *C. elegans II*. Cold Spring Harbor monograph series., 1997, Plainview, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. xvii, 1222 p.
- Rieckhof G, Casares F, Ryoo HD, Abu-Shaar M, Mann RS. (1997) Nuclear translocation of Extradenticle requires *homothorax*, which encodes an Extradenticle-related homeodomain protein. *Cell* **91**, 171-183.
- Ruvkun G, Hobert O. (1998) The taxonomy of developmental control in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **282**, 2033-2041.
- Ryoo HD, Marty T, Casares F, Affolter M, Mann RS. (1999) Regulation of Hox target genes by a DNA bound Homothorax/Hox/Extradenticle complex. *Development* **126**, 5137-5148.
- Salser, SJ, and Kenyon, C. (1992) Activation of a *C. elegans* Antennapedia homologue in migrating cells controls their direction of migration. *Nature* **335**, 255-8.
- Salser, SJ, Loer, CM, and Kenyon, C. (1993) Multiple HOM-C gene interactions specify cell fates in the nematode central nervous system. *Genes Dev.* **7**, 1714-24.
- Schaller, D, Wittmann, C, Spicher, A, Muller, F, Tobler, H. (1990) Cloning and analysis of three new homeobox genes from the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Nucleic Acids Res.* **18**, 2033-2036.
- Scott MP, Tamkun JW, and Hartzell GW, III (1989) The structure and function of the homeodomain. *Biochim. Biophys. Acta* **989**, 25-48.
- Scott, FG. (2000) *Developmental biology*. **Sinauer Associates, Inc.**, Publishers, Sunderland, USA

- Seo, HC, Edvardsen, RB, Maeland, AD, Bjordal, M, Jensen, MF, Hansen, A, Flaas, M, Weissenbach, J, Lehrach, H, Wincker, P, Reinhardt, R, Chourrout, D. (2004) Hox cluster disintegration with persistent anteroposterior order of expression in *Oikopleura dioica*. *Nature* **431**, 67-71.
- Shen WF, Montgomery JC, Rozenfeld S, Moskow JJ, Lawrence HJ, Buchberg AM, Largmann C. (1997a) AbdB-like Hox proteins stabilize DNA binding by the Meis1 homeodomain proteins. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 6448-6458.
- Shen WF, Rozenfeld S, Lawrence HJ, Largmann C. (1997b) The Abd-B-like Hox homeodomain proteins can be subdivided by the ability to form complexes with Pbx1a on a novel DNA target. *J. Biol. Chem.* **272**, 8198-8206.
- Slack JM, Holland PWH, Graham CF. (1993) The zootype and the phylotypic stage. *Nature* **361**, 490-492.
- Solari, F, Ahringer, J. (2000) NURD-complex genes antagonize Ras-induced vulval development in *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Biol.* **24**, 223-226.
- Sorger PK. (1990) Yeast heat shock factors contains stable transient and sustained response transcriptional activators. *Cell* **62**, 793-805.
- Sternberg, PW. (2005) Vulval development, *Wormbook*, ed. The *C. elegans* Research Community, Wormbook, doi/10.1895/wormbook.1.6.1.
- Stoyanov CN, Fleischmann M, Suzuki Y, Tapparel N, Gautron F, Streit A, Wood WB, Müller F. (2003) Expression of the *C. elegans* labial orthologue *ceh-13* during male tail morphogenesis. *Dev. Biol.* **259**, 137-149.
- Streit A, Kohler R, Marty T, Belfiore M, Takács-Vellai K, Vigano MA, Schnabel R, Affolter M, Müller F. (2002) Conserved regulation of the *Caenorhabditis elegans* labial/Hox1 gene *ceh-13*. *Dev. Biol.* **242**, 96-108.
- Studer, M, Lumsden, A, Ariza-McNaughton, L, Bradley, A, Krumlauf, R. (1996) Altered segmental identity and abnormal migration of motor neurons in mice lacking HoxB1. *Nature* **384**, 630-634.
- Sulston JE, and Horvitz, HR. (1997) Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* **56**, 110-156.
- Sulston JE, Horvitz HR. (1977) Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* **56**(1), 110-56.
- Sym, M, Robinson, N, and Kenyon, C. (1999) MÍG-13 positions migrating cells along the anteroposterior body axis of *C. elegans*. *Cell* **98**, 25-36.

- Szabó, E, Hargitai, B, Regős, Á, Tihanyi, B, Barna, J, Borsos, É, Takács-Vellai, K, and Vellai, T. (2009) TRA-1/GLI controls the expression of the *Hox* gene *lin-39* during *C. elegans* vulval development. *Dev. Biol.* **330**, 339-348.
- Takács-Vellai K, Vellai T, Chen EB, Zhang Y, Guerry F, Stern MJ, Müller. (2007) Transcriptional control of Notch signalling by a HOX and a PBX/EXD protein during vulval development in *C. elegans*. *Dev. Biol.* **302**, 661-669.
- Timmons L, Fire A. (1998) Specific interference by ingested dsRNS. *Nature* **395**, 854.
- Van Auken K, Weaver D, Robertson B, Sundaram M, Saldi T, Edgar L, Elling U, Lee M, Boese Q, Wood WB. (2002) Roles of the Homothorax/Meis/Prep homolog UNC-62 and the Exd/Pbx homologs CEH-20 and CEH-40 in *C. elegans* embryogenesis. *Development* **129**, 5255-5268.
- Van Auken K, Weaver DC, Edgar LC, Wood WB. (2000) *Caenorhabditis elegans* embryonic axial patterning requires two recently discovered posterior-group Hox genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 4499-4503.
- van den Akker, WM, Durston, AJ, Spaink, HP. (2010) Identification of *hoxb1* downstream genes: *hoxb1* as a regulatory factor controlling transcriptional networks and cell movement during zebrafish gastrulation. *Int. J. Dev. Biol.* **54**, 55-62.
- van Dijk M, Murre C. (1994) Extradenticle raises the DNA binding specificity of homeotic selector gene products. *Cell* **78**, 617-624.
- Veraksa A, Del Campo M, McGinnis W. (2000) Developmental Patterning Genes and Their Conserved Functions: From Model Organisms to Humans. *Mol. Gen. and Metabolism* **69**, 85-100.
- Veraksa, A, Del Campo, M, and McGinnis, W. (2000) Developmental patterning genes and their conserved functions: from model organisms to humans. *Mol. Genet. Metab.* **69**, 85-100.
- Wagmaister, JA, Gleason, JE, Eisenmann DM. (2006) Transcriptional upregulation of the *C. elegans* *Hox* gene *lin-39* during vulval cell fate specification. *Mech. Dev.* **123**, 135-150.
- Wang BB, Müller-Immergluck M, Austin J, Robinson NT, Chisholm A, Kenyon C. (1993) A homeotic gene cluster patterns the anterioposterior body axis of *C. elegans*. *Cell* **74**, 29-42.
- Wang, BB, Muller-Immergluck, MM, Austin, J, Robinson, NT, Chisholm, A, and Kenyon, C. (1993) A homeotic gene cluster patterns the anterioposterior body axis of *C. elegans*. *Cell* **74**, 29-42.

- Wilson DS, Desplan C. (1995) Cooperating to be different. *Curr. Biol.* **5**, 32-34.
- Wittmann C, Bossinger O, Goldstein B, Fleischmann M, Kohler R, Brunschwig K, Tobler H, Müller F. (1997) The expression of the *C. elegans labial*-like Hox gene, *ceh-13* during early embryogenesis relies on cell fate and on anteroposterior cell polarity. *Development* **124**, 4193-4200.
- Wrishnik, L. A and Kenyon, C. (1997) The role of *lin-22*, a hairy/enhancer of split homolog, in patterning the peripheral nervous system of *C. elegans*. *Development* **124**, 2875-2888.
- Yang L, Sym M, Kenyon C. (2005) The roles of two *C. elegans* HOX co-factor orthologs in cell migration and vulva development. *Development* **132**, 1413-1428.
- Zákány J, Duboule D. (1999) Hox genes in digit development and evolution. *Cell Tissue Res.* **296**, 19-25.
- Zarkower, D, Hodgkin, J. (1992) Molecular analysis of the *C. elegans* sex-determining gene *tra-1*: a gene encoding two zinc finger proteins. *Cell* **70**, 237-249.
- Zarkower, D. (2006) Somatic sex determination. Wormbook, ed. The *C. elegans* Research Community, doi/10.1895/wormbook.1.84.1



## 9. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr Vellai Tibornak a lehetőséget, hogy inspiráló környezetben, a kutatócsoportjában dolgozhattam, továbbá lankadatlan figyelmét és támogatását, amellyel a munkámat végigkísérte.

Szeretnék köszönetet mondani a Vellai labor minden tagjának az évek során tőlük kapott rengeteg segítségért, különösen Dr. Vellai-Takács Krisztinának a munkám során nyújtott gyakorlati és elméleti tanácsaiért, támogatásáért, továbbá Tóth Mártonnak, Sigmond Tímeának, Aladzsity Istvánnak, Hargitai Baláznak, Barna Jánosnak, Simon Rezsónének és Pénzes Tündének.

Köszönöm Prof. Orosz Lászlónak, az ELTE TTK Biológia Doktori Iskola Klasszikus és molekuláris genetika program vezetőjének, hogy lehetőséget kaptam a doktori tanulmányok folytatására és a fokozatszerzésre.

Végül szeretném megköszönni Szüleimnek és Testvéremnek az elmúlt években nyújtott támogatásukat, türelmüket és biztatásukat, amivel a tanulmányaimat és kutatómunkámat lehetővé tették és segítették.