

**A potroh és az ivarsejtek kialakításában szerepet játszó gének  
azonosítása *Drosophila melanogaster*ben**

Ph.D. értekezés tézisei

Készítette: Jankovics Ferenc

Témavezető Dr. Erdélyi Miklós

MTA Szegedi Biológia Központ, Genetika Intézet, 2002



## **Általános bevezetés és célkitűzés**

A génműködés poszttranszkripciós szabályozásának egyik fontos szintjét képviseli a szubcelluláris mRNS lokalizáció, ami rendkívül hatásos módja a génaktivitás korlátozásának a sejt egy adott régiójába. A génaktivitás mRNS lokalizálással történő irányítása egy sejtrészbe az egész élővilágban általánosan elterjedt jelenség, hiszen az egysejtű élesztőben és a fejlett növényi és állati szövetek legkülönbözőbb sejtjeiben egyaránt előfordul. Az mRNS-ek szubcelluláris lokalizálása számos előnnyel jár a sejt szempontjából, hiszen a lokalizált mRNS transzlálása gazdaságosan biztosíthat magas fehérjekoncentrációt egy adott sejtrészben. Az mRNS lokalizáció szerepét már számos élőlényben, a legkülönbözőbb biológiai jelenségek szabályozásában kimutatták.

Az utóbbi évtizedben a lokalizált mRNS-ek felfedezése után a figyelem azoknak a folyamatoknak a feltárására összpontosult,

amelyek az mRNS-ek lokalizációját irányítják. Bebizonyosodott, hogy az mRNS-ek szállítását a felhasználási helyükre a sejtvázszer rendszer végzi. Mivel az élő sejtben a különböző sejtalkotók és biológiai folyamatok összetett kölcsönhatásban állnak egymással, a sejtvázs befolyásolásával számos egyéb folyamat hat közvetetten az mRNS-ek lokalizálására. Ilyen folyamat többek között a különböző szignáltranszdukciós utak működése, vagy a lokalizált mRNS-ek translációját szabályozó összetett represszor, derepresszor és aktivátor rendszer jelenléte. A különböző sejtekben megvalósuló mRNS lokalizáció vizsgálatával ezért a speciális fejlődésbiológiai események feltárásán túl, alapvető sejtbiológiai jelenségek megismerésére is lehetőség nyílik.

Az mRNS lokalizáció vizsgálatára legalkalmasabb és leggyakrabban használt rendszer a *Drosophila melanogaster* (ecetmuslica) petesejtje és korai embriója. Ez egyrészt annak köszönhető, hogy számos hatékony eszköz és módszer van a birtokunkban, melyekkel az mRNS lokalizáció folyamata megismerhető. Másrészt, a *Drosophila* petesejtjét és embrióját

viszonylag nagy mérete és könnyű kezelhetősége is különösen alkalmassá teszi az mRNS lokalizáció vizsgálatára.

A *Drosophila* zigótájának létrehozásához a hím és a női ivarsejtek nem egyforma mértékben járulnak hozzá. A petesejt citoplazmája örökíti azokat a tápanyagokat és információs faktorokat is, amelyek nélkülözhetetlenek az embrió normális korai egyedfejlődéséhez. Ezt a jelenséget anyai hatásnak nevezzük. A pete citoplazmájában lokalizált aszimmetrikus elhelyezkedésű morfogén molekulák határozzák meg az embrió testtengelyeinek pozícióját, és szabályozzák az ivarsejt-testisejt elkülönülést. A morfogén fehérjék embrión belüli helyhez kötött működése a fehérjéket kódoló mRNS-ek lokalizációjával és helyspecifikus transzlációjával is megvalósulhat. Mivel a zigóta citoplazmája lényegében a petesejttől származik, az embrió polaritását a petesejt aszimmetriája határozza meg. A peteérés során a petesejtben aszimmetrikusan elhelyezkedő morfogén mRNS-ek szabják meg tehát az embrió anterior-poszterior és dorzális-ventrális

testtengelyeinek pozícióját és szabályozzák az ivarsejt-testisejt elkülönülést.

Az általunk tanulmányozott morfogén, az *oskar* (*osk*) mRNS és OSK fehérje a petesejt poszterior pólusán lokalizálódik, és ott egy rendkívül speciális citoplazmarészt, a poláris plazmát alakít ki. A poláris plazmában vannak jelen azok az mRNS-ek és fehérjék, melyek a megtermékenyítés után az embrió poszterior pólusán a potroh és az ivarsejtek kialakítását irányítják. Munkánk célja olyan gének azonosítása volt, melyek a poláris plazma kialakulását és működését szabályozzák, és ezáltal a *Drosophila* potrohának és ivarsejtjeinek kialakításában játszanak szerepet. Mivel ennek a folyamatnak központi lépése az *osk* mRNS lokalizációja a petesejt poszterior pólusára, így a potroh és az ivarsejtek kialakulását befolyásoló gének azonosításával lehetőségünk nyílik az mRNS lokalizációt irányító tényezők megismerésére is. Mivel az mRNS lokalizáció nem kizárólag a *Drosophila* sajátossága, hanem az egész élővilágban elterjedt biológiai jelenség, az *osk* mRNS

lokalizációjára ható gének tanulmányozásával általános érvényű ismereteket nyerhetünk mRNS lokalizáció szabályozását illetően.

### **Alkalmazott módszerek**

- Drosophila mutánsok izolálása (domináns genetikai interakción alapuló mutánsizolálás, géncsapda P-elemmel végrehajtott mutánsizolálás)
- mutációk térképezése genetikai és molekuláris módszerekkel (rekombinációs és deléciós térképezés, P-elem inszerciók határoló szekvenciáinak meghatározása)
- mutációk genetikai analízise (homozigóta fenotípus megállapítása, komplementáció)
- mRNS in situ hibridizáció, immunfestés,  $\beta$ -Gal festés petefészkeken
- in vivo GFP detektálás petekamrákon
- molekuláris DNS-technikák (genomikus DNS izolálás, inverz PCR, RT-PCR)

- Western analízis

## **Eredmények és következtetések**

1. *TropomyosinII (TmII)* és *osk* gének alléljainak felhasználásával létrehoztunk egy domináns genetikai interáción alapuló mutánsizolálási rendszert, amit sikeresen alkalmaztunk a potroh és az ivarsejtek kialakulását befolyásoló gének azonosítására. Az autoszómákon újonnan létrehozott EMS-indukált mutációk között olyan mutációkat kerestünk, melyek dominánsan megemelik az érzékenyített genetikai háttér okozta fenotípus penetranciáját ( $E(To)$  mutációk). Kísérletünkben sikerült már ismert, a potroh és az ivarsejtek kialakulását befolyásoló gének új alléljait azonosítani, ami módszerünk használhatóságát bizonyítja. A már ismerteken kívül sikerült a potroh és az ivarsejtek kialakulását befolyásoló gének csoportját (poszterior csoport) tíz további génnel kibővítenünk.



2. Az *E(To)* mutációkat rekombinációsán térképeztük, megállapítottuk homozigóta fenotípusukat.
3. Elvégeztük az egyik, genetikai interakció alapján azonosított gén, a *Drosophila Rab11*, részletes komplementációs és fenotípusos analízisét. Bemutattuk, hogy a *Rab11* mutáns petesejtekben az *osk* mRNS hibásan lokalizálódik, míg más morfogén molekulák lokalizációja illetve a petesejt és a follikuláris sejtek közötti kommunikáció ép marad. *In vivo* vizsgálattal megmutattuk, hogy a *Rab11* mutánsokban a petesejt mikrotubulusváza nem normális. Az eredmények alapján a *Rab11*-nek a potroh és az ivarsejtek kialakításában játszott szerepére modellt dolgoztunk ki, melynek lényege, hogy a *Rab11* szükséges az *osk* mRNS-t szállító polarizált mikrotubulusváz helyes működéséhez.
4. Géncsapda elven működő P-elemmel az X kromoszómán mutagenézist hajtottunk végre, mellyel ivarsejthiányos fenotípusa alapján izoláltuk a *Drosophila moesin (Dmoe)* gén egy allélját. Komplementációs analízissel a *Dmoe* gén további,

különböző erősségű mutáns alléljeit azonosítottunk, melyeket felhasználva leírtuk a *Dmoe* mutáns fenotípust és részletesen feltártuk a *Dmoe* petefejlődésben játszott szerepét.

5. Bizonyítottuk, hogy a *Dmoe* mutációi a petekamrákban nem járnak sem hibás mikrotubulus-szerveződéssel, sem sejtadhéziós hibákkal, a petesejtek aktinváza azonban abnormális. Igazoltuk, hogy a *Dmoe* mutánsokban az aktinváz elválik a sejthártyától, mellyel bizonyítottuk, hogy a *Drosophila* petesejtjében a *Dmoe* a szubkortikális aktinváz és a sejthártya összekapcsolását végzi.
6. *In situ* hibridizációs és immunolokalizációs kísérletekkel bemutattuk, hogy a *Dmoe* mutánsok ivarsejthiányos fenotípusának oka a helytelen *osk* mRNS és OSK fehérje lokalizáció. A *Dmoe* hatása az *osk* mRNS és OSK fehérje lokalizációjára ivarsejtvonal-függő, és független a petesejtfolikuláris sejt kommunikációtól. Megmutattuk, hogy a *Dmoe* a mikrotubulusoktól függetlenül, az aktinváz befolyásolásával hat az *osk* géntermékek lokalizációjára.

7. Megmutattuk, hogy a *Dmoe* mutánsokban *osk* mRNS és OSK fehérje poszterior pólusra történő szállítása normális, az *osk* géntermékek azonban nem rögzülnek a poszterior póluson.
8. Bebizonyítottuk, hogy az *osk* mRNS és fehérje rögzítését a poszterior póluson az aktinváz végzi. A *Dmoe* potroh és az ivarsejtek kialakításában játszott szerepére modellt dolgoztunk ki, melynek lényege, hogy a *Dmoe* az aktin-sejtmembrán kapcsolat stabilizálásával lehetővé teszi az *osk* mRNS-t és OSK fehérjét a poszterior póluson rögzítő komplex helyes működését. A *Dmoe* mutánsban az *osk* mRNS és az OSK fehérje rögzítésének hibáját a poszterior póluson az aktinváz abnormalitása eredményezi.
9. *Dmoe* mutáns petesejtek felhasználásával leírtunk az *osk* géntermékeknek egy új típusú delokalizációs fenotípusát, ahol az *osk* mRNS és az OSK fehérje a petesejt laterális kérgi részén lokalizálódott. Ez a megfigyelésünk arra utal, hogy az *osk* géntermékek lokalizációjának a helyét a poszterior póluson nem az aktinváz, hanem a polarizált a mikrotubulusváz határozza

meg, azáltal, hogy az *osk* mRNS-t a petesejt meghatározott helyére szállítja. A helyspecifikus transzláció után a poszterior póluson a keletkező OSK fehérje rögzül a közeli aktinvázon.

10. Megmutattuk, hogy a *Dmoe* mutáns petekamrákban további aktinfüggő folyamatok - a bordersejtek mozgása és a gyűrűcsatornák kapcsolódása a sejtmembránhoz - zavart szenved.

## SUMMARY

The anterior-posterior and dorsal-ventral axes of the *Drosophila* embryo originate from the inherent asymmetry of the egg chamber and depend on the localisation of specific mRNAs within the developing oocyte. Abdomen and germ cell development of *Drosophila melanogaster* embryo requires proper localisation of *oskar* (*osk*) mRNA to the posterior pole of the developing oocyte. *osk* mRNA localisation depends on complex cell biological events like cell-cell communication, dynamic rearrangement of the microtubule network, and function of the actin cytoskeleton of the oocyte. Transport of the *osk* mRNA is mediated by microtubules, while anchoring of the *osk* gene products at the posterior pole of the oocyte has been suggested to be microfilament dependent. To investigate the cellular mechanisms involved, we performed two mutagenic screens: an interaction type and a loss-of-function type of screen. In my thesis I describe the mutagenic screens and the detailed analysis of two

new members - *Rab11* and *Dmoesin* - of the group of genes involved *osk* mRNA localisation (posterior group).

## KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

JANKOVICS, F., SINKA R. and ERDÉLYI M.; 2001 An interaction type of genetic screen reveals a role of the *Rab11* gene in *osk* mRNA localization in the developing *Drosophila melanogaster* oocyte. **Genetics** **158**: 1177-1188

SINKA, R., JANKOVICS F., SOMOGYI K., SZLANKA T., LUKÁCSOVICH T. and ERDÉLYI M., 2002 *piorot*, a new regulatory gene of the *Drosophila oskar* act at the level of the short Oskar isoform. **Development** **129** (14) közlésre elfogadva

JANKOVICS F., SINKA R., LUKÁCSOVICH T., ERDÉLYI M., 2002 Dmoesin crosslinks actin and cell membrane in *Drosophila* oocyte and is required for OSKAR anchoring. **Current Biology** közlésre benyújtva