

A "Miért kezdődik el az embriogenezis" című, OTKA NI69180 jelű kutatási program szakmai beszámolója

Készítette: Szabad János
Szegeden, 2013. júliusában

Célkitűzés

A kutatási program keretében a *Drosophila* három olyan génjének - *Ketel*, *αTub67C* valamint *lodestar* - molekuláris szintű szerepét terveztük megérteni, amelyek funkciója szükséges az embriogenezis elkezdődéséhez. A géneket olyan, ún. domináns negatív nőstény-steril (*Fs*) mutációkkal azonosítottuk (rendre *Ketel^D*, *Kavar^D* és *Horka^D*), amelyek bár lehetővé teszik küllemre ép peték képződését, megtermékenyülését, ám a petékben nem kezdődik el az embriogenezis. Alighanem azért nem, mert a fenti *Fs* mutációk domináns negatív természetűek, és az általuk azonosított ép géneknek szerepük lehet az embriogenezis elkezdődésében. Az *Fs* mutációkból kiindulva klónoztuk az ép géneket, hogy aztán megismerjük molekuláris funkcióikat.

A megközelítés: a genetika, a molekuláris és a sejtbiológia ötvözte

Munkánk kezdetén az - egyebek között - embriogenezis elkezdődéséhez szükséges géneket azonosítandó *Fs* mutációkat indukáltunk, izoláltunk és jellemeztünk *Drosophilában* (Erdélyi and Szabad 1998; Szabad et al. 1998). Közülük válogattuk ki azokat, amelyek megengedik látszólag ép peték képződését és megtermékenyülését, ám a petékben vagy el sem kezdődik az embriogenezis, vagy néhány torz kezdeti lépés után leáll. Feltételeztük, hogy az *Fs* mutáció domináns negatív természetű (az ún. funkciónyereses típusú mutációk egyik típusába sorolható), vagyis az *Fs* allél által kódolt mutáns géntermék úgy akadályozza meg az embriogenezis elkezdődését, hogy eliminálja az ép gén termékének funkcióját, jelezve, hogy az *Fs* és az ép (+) gén terméke ugyanabban a folyamatban játszik szerepet. Az *Fs* mutációból kiindulva megklónoozható az ép gén, megismerhető molekuláris funkciója. Az *Fs* mutációknak három fontos haszna van.

1. Az *Fs* mutáció mutáns fenotípusa alapján következtetni lehet az ép gén funkciójára.
2. A funkciónyereses *Fs* allél második mutagenézis során ún. funkcióvesztéses (recesszív) alléllá alakítható. A revertáns allélok alapján megállapítható a funkcióvesztéses mutáns fenotípus, az ép gén valószínű szerepe.
3. Ha a második mutagenézis P-elem inszerciójával történik (a muslica egyfajta transzpozonjával), az *Fs* alléllal azonosított gén az inverz-PCR technikával megklónoozható (lásd pl. Szalontai et al. 2009).

Munkaprogramunk - a fenti elv alapján - három gén molekuláris szintű funkciójának a megismerésére irányult: *Ketel* (Importin-β), *αTub67C* (α4-tubulin), valamint *lodestar* (Lodestar). Eredményeinket génenként mutatom be.

Eredmények

Importin-β

Az importin-β-t (imp-β) kódoló *Ketel* gént a *Ketel^D* mutációk azonosítják (Lippai et al. 2000; Tirián et al. 2000). A *Ketel^D* kódolt mutáns P446L-imp-β vizsgálata során döbrentünk rá arra, hogy az imp-β nem csak a sejtmagi fehérje import egyik eleme, hanem funkciójára szükség van a sejtmaghártya összeszerelődés során is (Timinszky et al. 2002). Munkánk eredményeként közzöltük azt a modellt, amely leírja a sejtmaghártya képződés mechanizmusát (Tirián et al. 2003). Jeleztük, hogy az imp-β funkciójára a magorsó kialakulásához is szükség van (Tirián et al. 2000). Az OTKANI69180 pályázat keretében azt reméltük megérteni, hogy

(1) miként szabályozott a *Ketel* gén expressziója.

A *Ketel* gén csonkolt, valamint mutációt hordozó promóterének és riporter transzgének expressziós mintázata alapján lokalizáltuk azokat a kötőhelyeket a DNS-ben, amelyekhez transzkripciós faktorok kapcsolódhatnak, és szabályozzák a *Ketel* gén szövet specifikus expresszióját, illetve az expresszió szintjét (Villányi et al. 2008a).

Megállapítottuk, hogy

- a *Drosophila* embriók életük kezdetén az anyai eredetű imp-β-ra hagyatkoznak.
- *In silico* analízissel meghatároztuk a *Ketel* gén promóterének azon lehetséges szakaszait, amelyekhez transzkripciós faktorok kötődhetnek, és szabályozhatják a gén expresszióját.
- Gél-retardációs és „band-shift” kísérletekkel megmutattuk, hogy a *Ketel* gén expressziójának szabályozásában a DREF és a CFDD transzkripciós faktorok szerepe alapvető.
- *LacZ* riporter transzgének alapján kiderítettük, hogy a zigóta *Ketel* génje a blasztoderma minden sejtben expresszálódik, majd miközben a politén lárvális sejtekben megszűnik a *Ketel* gén expressziója, a diploid imaginális sejtekben folyamatosan kifejeződik a gén.
- A *Ketel* gén szövet-specifikus expressziója a DRE motívumon, a DREF, a CFDD, a CF2-II és a BEAF transzkripciós faktoroktól függ.

(2) Hogyan élhetnek a *Drosophila* lárvák saját *Ketel* gén nélkül három napot?

Eredményeinket egy olyan *UAS-Ketel* transzgén alapján gyűjtöttük, amelyet különféle szövet-specifikus *Gal-4* transzgénekkel expresszáltattunk *ketel^{mut}/-* hemizigóta mutáns háttéren, valamint egy olyan *UAS-Ketel-RNSi* transzgénnel, amelyet az előbbi *Gal-4* transzgénekkel expresszáltattunk. Használtunk egy olyan *ketel^{GFP}* mutáns allélt is, amely imp-β-GFP képződését kódolja. A Villányi et al. (2008b) dolgozatban megmutattuk, hogy

- Az anyai eredetű imp-β molekulák segítik őket az embriogenezis, valamint lárvális életük kezdetén.
 - Az imp-β funkciójára minden sejtben szükség van.
 - Az imp-β alighanem a leghosszabb élettartamú fehérje féleség a sejtekben. Az anyai eredetű imp-β molekulák akár hat napot is élhetnek.
- A fenti dolgozatok alapján készítette el, és védte meg Ph.D. értekezését Villányi Zoltán 2008-ban.

- (3) Mely gének funkciója és miként okoz halált importin-β hiányában? Miért pusztulnak el azok a muslica lárvák, amelyekből hiányzik az Imp-β-t kódoló *Ketel* gén? Amint megmutattuk (Villányi et al. 2011) azért, mert
- nem képződnek bennük mitokondriumok. Vagyis az Imp-β-nak szerepe van a mitokondriumok biogenezisében is.
 - A hogyan kérdést megválaszolando *ketel^{mut}/-* (amelyekben nincs *Ketel* gén) és *ketel^{mut}/+* (ép) lárvákból készült cDNS-eket hasonlítottunk össze (DNS-csipekkel). Megtudtuk, hogy a kétféle lárv mindössze 30 gén expresszió-mintázatában különbözik. A 30 gén közül - amint azt RNSi kísérleteink bizonyították - a peroxiredoxin-6500 gén funkciója szükséges a mitokondriumok biogeneziséhez.
- (4) A fent említett *ketel^{GFP}* allél Imp-β-GFP molekulák képződését kódolja. Az Imp-β-GFP molekulák kivilágítják a sejtmagpórus-komplexeket (Szikora et al. 2013). Miközben a citoplazma áramlást tanulmányoztuk a muslica petesejtekben, arra lettünk figyelmesek, hogy
- a folliculáris sejtek magjai izegnek-mozognak. (Amint azt a kivilágított sejtmagpórus-komplexek helyzetváltoztatása megmutatta.)
 - Izgásuk-mozgásuk közben a sejtmagok a sejt hossz tengelye mentén mintegy 5 μm-t tesznek meg egy nap alatt, míg nem elfoglalják jellegzetes helyüket.
 - Az izgás-mozgás alapja az, hogy a növekvő mikrotubulusok a sejtmaghártába ütköznek, és miközben a sejtmagra mintegy 5-40 pN erővel hatnak, azt kissé elfordítják, és egy keveset tolnak is rajta.
 - Az izgó-mozgó sejtmagokból kiindulva a sejtmag pozicionálás eddig ismeretlen módját írtuk le (Szikora et al. 2013).
- Munkák eredményeit Szikora Szilárd Ph.D. értekezése (2012) összesíti.

α4-tubulin

Az ún. anyai eredetű α4-tubulin - ami az egyik α-tubulin izoforma - képződését kódoló *αTub67C* gént a *Kavar^D* és a *Tomaj^D* mutációk azonosítják (Máthé et al. 1998; Venkei and Szabad 2005). Korábban megmutattuk, hogy az α4-tubulin az interpoláris mikrotubulusok (MT-ok) gyors növekedéséhez szükséges. Miközben ezek a MT-ok növekednek, az átelleni pólusokba tolják a leánycentroszómakat a sejtmaghártáya felszínén, hogy aztán a centroszómak megszervezzék a magorsó kialakulását (Venkei et al. 2006). Mindeközben az interpoláris mikrotubulusok intim kapcsolatban vannak a sejtmaghártáival, követik annak görbületét. Az OTKA NI69180 jelű kutatási program keretében, a *Kavar^{21g}* mutáció, illetve az általa kódolt mutáns E426K-α4-tubulin vizsgálata nyomán arra derítettünk fényt, hogy

- a Glu⁴²⁶ a MT-ok felszínén annak a pontnak felel meg, amelyhez a kinezinnek a leginstabilabb, ADP-kötött formájukban kötődnek. A Glu⁴²⁶→Lys aminosav-csere nyomán a MT-ok E426K-α4-tubulin helyein a kinezinnek leesnek a MT-okról, miáltal csökken a transzport sebessége, elpusztulnak az embriók, a *Kavar^D*-t hordozó nőtények sterilek (Gáspár and Szabad 2009a).
- Munkánk során új módszert dolgoztunk ki a MT-ok mentén történő transzport vizsgálatára: a konfokális reflexiós mikroszkópiát, illetve a lipid cseppecskék szállításának követését a *Drosophila* fejlődő petesejtjeiben (Gáspár and Szabad 2009b).

A témával kapcsolatos dolgozataink alapján készítette el és védte meg Ph.D. értekezését Gáspár Imre 2008-ban.

Lodestar

Horka^D, az *Fs* mutációk egyike (Erdélyi and Szabad 1989). Ám korábban arra is fény derült, hogy *Horka^D* (i) a hímekben a spermatogenezis során nagy gyakorisággal okoz nondiszjunkciót, és (ii) úgy teszi instabilakká a kromoszómákat, hogy azok elveszhetnek az utódokban, azok embriogenezisének kezdetén (Szabad et al. 1995). Az instabil kromoszómák vesztese nyomán ún. haplo-mozaikok képződésnek köztük az XX//X0, nőtény//hím mozaikok, gynanderek. Az OTKANI69180 kutatási program keretében azt reméltük megérteni, hogy

- (1) mely gént azonosítja *Horka^D* és a belőle készített funkcióvesztéses (*horka^{rP}*) mutáns allélok.
- (2) Mi az ép gén szerepe a kromoszómák stabilitásában.
- (3) Milyen mechanizmus alapján okoz a *Horka^D* mutáció abnormális kromoszóma szegregációt, valamint a kromoszómák instabilitását.

A *horka^{rP}* mutáns allélok tanulmányozása alapján bizonyítottuk, hogy

- *Horka^D* és a *horka^{rP}* mutáns allélok a *lodestar* gént azonosítják, a helikáz-szerű géncsalád egyikét (Szalontai et al. 2009).

- A szakirodalomban megjelent dolgozatok „úgy tudják”, hogy a Lodestar fehérje a transzkripciós terminációs faktor 2. Ez a vélekedés bizonyosan téves. Közlésre előkészített munkánkban (Gáspár et al. 2013) azt mutatjuk meg, hogy a Lodestar fehérje ahhoz szükséges, hogy a Cohesin komplexek a kromoszómákhoz kapcsolódjanak. Lodestar fehérje hiányában gyakoriak a rendellenes kromoszóma szegregációk, képződnek aneuploid sejtek.

- Kiderítettük, hogy *Horka^D* egyetlen bázispár-csere típusú mutáció eredménye, valamint azt is, hogy a *Horka^D*-kódolt A777T-Lodestar mutáns molekulák ragadósak, és rendellenes kromoszóma szegregációt okoznak (Szalontai et al. 2009).

A *Horka^D*-vel kapcsolatos eredmények alapján készített el Ph.D. értekezését és védte meg Szalontai Tamás 2008-ban.

A *Horka^D*-vel kapcsolatos kromoszóma/genom instabilitás volt az egyik mozgató rugója annak a munkánknak, amelyben környezeti és genetikai „ágensek” kromoszóma vesztést okozó képességét (i) vizsgáljuk és (ii) „mérjük” (Szabad et al. 2012). A módszer lényege a következő: az *mwh⁺* transzgént egy *Y* kromoszómába ékeltük. Az *mwh⁺* transzgén jelenlétében nem nyilvánulhat meg az *mwh* (multiple wing hars) marker mutáció fenotípusa. (Az *mwh/mwh* homozigóta szárnysejtek mindegyike 2-5 szőröcskét fejleszt a szokásos sejtenkénti egyetlen helyett.) Miközben a szárnykezdemény sejtek osztódnak, egyikükből-másikukból elveszhet az *mwh⁺Y* kromoszóma. Minthogy az *Y* kromoszóma vesztése nem befolyásolja a sejtek életképességét, az *mwh⁺Y* kromoszóma nélküli sejtek tovább osztódhatnak, utósejtjeik együtt maradnak, és a képződő szárnyon *mwh* mozaik foltot képeznek. (Természetesen csak *mwh/mwh* genetikai háttérben.) A mozaik foltok gyakorisága és mérete alapján kimutatható és megmérhető bármely környezeti, vagy genetikai hatás kromoszóma-veszejtő képessége (Szabad et al. 2012). Az itt dióhéjban bemutatott módszer alapján világosan kiderült, hogy

- *Horka^D* nagy gyakorisággal indukál kromoszóma vesztést a *Drosophila* szárnykezdemény sejtekben.
- Lodestar fehérje hiányában (*horka^{RP}/horka^{RP}* szárnykezdemény sejtekben) gyakran elvész az *mwh⁺Y* kromoszóma.
- A benzol nagy, a parkett lakk és egy hígító kis gyakorisággal indukálja az *mwh⁺Y* kromoszóma vesztését (Soós and Szabad 2013).

Az utóbbi pontra vonatkozó eredmények alapján készítette el Ph.D. értekezését Soós István 2013-ban.

Irodalom

Erdélyi M and Szabad J, Isolation and characterization of dominant female sterile mutations of *Drosophila melanogaster*. I. Mutations on the third chromosome. *Genetics* **122**, 111-127, 1989.

Gáspár I and Szabad J, *In vivo* analysis of MT-based vesicle transport by confocal reflection microscopy. *Cell Motility and the Cytoskeleton* **66**, 68-79, 2009a.

Gáspár I and Szabad J, Glu⁴¹⁵ in the α -tubulins plays a key role in stabilizing the microtubule-ADP-kinesin complexes. *Journal of Cell Science* **122**, 2857-2865, 2009b.

Gáspár I, Szalontai T, Szikora S and Szabad J, Lodestar lodes the cohesin complexes onto the chromosomes in *Drosophila*. In preparation.

Lippai M, Tirián L, Boros I, Mihály J, Erdélyi M, Belez I, Máthé E, Pósfai J, Nagy A, Udvardy A, Paraskeva E, Görlich D and Szabad J, The *Ketel* gene encodes a *Drosophila* homologue of Importin- β . *Genetics* **156**, 1889-1900, 2000.

Máthé E, Boros I, Jósavay K, Li K, Kaufman TC and Szabad J, The Tomaj mutant alleles of α -tubulin67C reveal a requirement of the encoded maternal specific tubulin isoform in the sperm aster, the cleavage spindle apparatus and neurogenesis during embryonic development in *Drosophila*. *Journal of Cell Science* **111**, 887-896, 1998.

Soós I and Szabad J, Assaying benzene, a parquet varnish, and a synthetic thinner for inducing *in vivo* chromosome loss in *Drosophila* wing primordia cells.

Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis; Submitted for publication

Szabad J, Erdélyi M, Hoffmann G, Szidonya J and Wright TRF, Isolation and characterization of dominant female sterile mutations of *Drosophila melanogaster*. II. Mutations on the second chromosome. *Genetics* **122**, 823-835, 1989.

Szabad J, Máthé E and Puro J, *Horka*, a dominant mutation of *Drosophila*, induces nondisjunction and, through paternal effect, chromosome loss and genetic mosaics. *Genetics* **139**, 1585-1599, 1995.

Szabad J, Bellen HJ and Venken KJT, An assay to detect *in vivo* Y chromosome loss in *Drosophila* wing disc cells G3: *Genes, Genomes, Genetics* **2**, 1095-1102, 2012.

Szalontai T, Gáspár I, Belez I, Kerekes I, Erdélyi M, Boros I and Szabad J, *Horka^D*, a chromosome instability-causing mutation in *Drosophila*, is a dominant-negative allele of *lodestar*. *Genetics* **181**, 367-377, 2009.

Szikora S, Gáspár I and Szabad J, Poking microtubules bring about nuclear wriggling to position nuclei. *Journal of Cell Science* **126**, 254-262, 2013.

Timinszky G, Tirián L, Nagy FT, Tóth G, Perczel A, Kiss-László Z, Boros I, Clarke PR and Szabad J, The importin- β P446L dominant negative mutant protein loses RanGTP binding ability and blocks the formation of intact nuclear envelope. *Journal of Cell Science* **115**, 1675-1687, 2002.

Tirián L, Puro J, Erdélyi M, Boros I, Papp B, Lippai M and Szabad J, The *Ketel^D* dominant-negative mutations identify maternal function of the *Drosophila* Importin- β gene required for cleavage nuclei formation. *Genetics* **156**, 1901-1912, 2000.

Tirián L, Timinszky G and Szabad J, P446L-importin- β inhibits nuclear envelope assembly by sequestering nuclear envelope assembly factors to the microtubules. *European Journal of Cell Science* **82**, 351-359, 2003.

Venkei Z and Szabad J, The *Kavar^D* dominant female-sterile mutations of *Drosophila* reveal role of the maternally provided α -tubulin⁴ isoform in cleavage spindle maintenance and elongation. *Molecular Genetics and Genomics* **273**, 283-289, 2005.

Venkei Z, Gáspár I, Tóth G and Szabad J, α -tubulin⁴ is essential for rapid formation of lengthy interpolar microtubules to push apart the daughter centrosomes along the nuclear perimeter during early *Drosophila* embryogenesis. *Journal of Cell Science* **119**, 3238-3248, 2006.

Villányi Z, Papp B, Szikora S, Boros I and Szabad J, The DRE motif is a key component in the expression regulation of the importin- β encoding *Ketel* gene in *Drosophila*. *Mechanisms of Development* **125**, 822-831, 2008a.

Villányi Z, Debec A, Timinszky G, Tirián L and Szabad J, Long persistence of importin- β explains extended survival of cells and zygotes that lack the encoding gene. *Mechanisms of Development* **125**, 196–206, 2008b.

Villányi Z, Gáspár I, Szikora S, Puskás LG and Szabad J, Importin- β and peroxiredoxin-6005 are involved in mitochondrial biogenesis. *Mechanisms of Development* **128**, 191-199, 2011.

Ph.D. értekezések

Zoltán Villányi, How is expression of the importin- β encoding *Ketel* gene of *Drosophila* regulated?
Ph.D. Dissertation. University of Szeged, 2008.

Imre Gáspár, The need for speed[™]; the role of α 4-tubulin in adapting the spindle apparatus to the needs of early *Drosophila* embryogenesis
Ph.D. Dissertation. University of Szeged, 2008.

Tamás Szalontai, *Horka^D*, a chromosome instability causing mutation in *Drosophila*, identifies the *lodestar* gene and indicates involvement of the LDS protein in metaphase chromatin surveillance.
Ph.D. Dissertation. University of Szeged, 2008.

Szilárd Szikora, Poking microtubules bring about nuclear wriggling to position nuclei.
Ph.D. Dissertation. University of Szeged, Faculty of Medicine, Department of Biology, Szeged, 2012.

István Soós, Vapors of benzene, a parquet varnish and a synthetic thinner induce chromosome loss in cells of the *Drosophila* wing primordia.
Ph.D. Dissertation. University of Szeged, 2013.