

Ph.D. disszertáció tézisei

**EGY ÚJ *DROSOPHILA* FORMIN SZÖVETSPECIFIKUS FUNKCIÓINAK GENETIKAI,  
SEJTBIOLÓGIAI, ÉS BIOKÉMIAI VIZSGÁLATA**

**Matusek Tamás**

**Témavezető: Dr. Mihály József**

Magyar Tudományos Akadémia  
Szegedi Biológiai Központ  
Genetikai Intézet

Biológus Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem  
Természettudományi és Informatikai Kar, Genetikai Tanszék

Szeged, 2009.

## Bevezetés

A sejtekben a sejtvázcitoszkeleton szerepe nélkülözhetetlen számos élettani folyamatban. A sejtek plaszticitása, a sejtosztódás, vagy az organelláris transzport mind mind intenzív citoszkeletonális átrendeződéseket igényelnek. A sejtváz fő alkotóelemei a mikrotubulusok (makrofilamentumok), az intermedier filamentumok, és a mikrofilamentumok (aktin citoszkeleton). Az aktin citoszkeleton a sejtváz dinamikus alkalmazkodóképességét biztosítja a sejtek környezeti jelekre adott válaszaiban. Építőkövei a G-aktin monomerek, melyek helikális szerkezetű filamentumokba rendeződnek. Az új aktinfilamentumok képződése során először egy három aktinmonomerből álló ún. nukleációs mag jön létre, melyen azután mindkét irányban megindulhat az aktinmonomerek beépülése. A monomerek beépülése és leszakadása a filamentum két végén eltérő dinamikával zajlik, a beépülés elsődlegesen az ún. „barbed end”-en, a filamentumok gyorsan növekvő végén történik meg. Az aktin nukleáció energiaigényes folyamat, az élő sejtben rendkívül ritkán zajlik le spontán módon, a sejtben az új nukleációs magok kialakítását kifejezetten erre a feladatra specializálódott fehérjék végzik. Ilyen faktorok a formin fehérjecsalád tagjai, melyek nemelágazó láncú aktinfilamentumok képződését segítik elő. A forminok multidomén fehérjék, melyek dimerként működnek. A dimerizáció az FH2 (formin homológia 2) doméneken keresztül történik meg, majd a nukleációt követően a formin dimer folyamatosan asszociált marad a filamentum gyorsan növekvő végével elősegítve az új aktinmonomerek beépülését, és ezzel egyidejűleg megakadályozva a szabad filamentumvéget lefedő fehérjék kapcsolódását. Az FH2 domén aminosav szekvenciájának evolúciós konzerváltsága alapján a metazoa forminokat hét nagy alcsaládba sorolták be: DIA, FMN, FHOD, delfilin, INF, FRL, és DAAM. Ezek közül a legintenzívebben tanulmányozott a DRF forminok csoportja, melybe a DIA, az FRL, és a DAAM forminok tartoznak. A DRF forminok alapállapotban egy intramolekuláris autoinhibíciós mechanizmus révén inaktívak a sejtben. A gátlás a formin kitüntetett C-, és N-terminális doménjeinek összekapcsolódásával jön létre. A DRF forminok C-terminális részén három szerkezeti és funkcionális elemet különíthetünk el: a Profilin-kötő FH1 domént, a katalitikus FH2 domént, és a

Diaphanous autoregulációs domént (DAD), mely az autoinhibíciós mechanizmus egyik résztvevője. Az N-terminálison található a Diaphanous inhibíciós domén (DID), mely a DAD doménnel kapcsolódva biztosítja a formin inaktív állapotának fenntartását, egy dimerizációs (DD), illetve egy coiled-coil (CC) domén, valamint egy GTP-áz kötő domén (GBD), melyhez aktivált, Rho családba tartozó kis GTP-ázok kapcsolódhatnak. A kis GTP-áz kötődésével az intramolekuláris autoinhibíció megszűnik, és a formin aktív állapotba kerül.

A DAAM formin alcsalád első tagját (Daam1) élesztő kettőshibrid kísérletben azonosították, amelyben a Dishevelled (Dsh/Dvl) Wnt jelátviteli fehérje PDZ doménjével kölcsönható partnereket kerestek. A kutatások egy új modell kidolgozásához vezettek, mely szerint a Daam1 RhoGEF fehérjéken keresztül Rho kis GTP-ázt aktiválhat a síkbeli sejtpolaritást szabályozó PCP (planar cell polarity) jelátviteli útban, illetve az autoinhibíciós mechanizmus feloldásához elsődlegesen nem RhoGTP-re, hanem a C-terminálison kötődő Dvl fehérjére van szükség. Ugyanakkor más kísérleti eredmények szerint a Daam1 a konvencionális formin aktivációs modell szerint működik, és aktivált Rho kötődésével kerülhet először aktív állapotba.

## **Célkitűzések**

A Daam1 működési modelljét jórészt sejtenyészeten elvégzett, illetve *in vitro* biokémiai vizsgálatok alapján állították fel, de valódi funkcióvesztéses genetikai analízisből származó *in vivo* adatok a DAAM alcsalád tagjaira nem álltak rendelkezésre. Modellorganizmusunk, a *Drosophila melanogaster* kiválóan alkalmas részletes genetikai vizsgálatok elvégzésére. Genomja egyetlen DAAM gént tartalmaz, laborunkban ezért célul tűztük ki, hogy elvégezzük a *Drosophila* DAAM ortológ (*dDAAM*) genetikai és funkcionális analízisét.

## Felhasznált módszerek

- P-elem kiugrasztás
- komplementációs analízis
- domináns genetikai interakciós analízis
- episztázis analízis
- PCR
- Southern-blot
- Western-blot
- Immunoprecipitáció
- Sejtkultúrák: S2 és P19 (immunhisztokémia)
- Immunhisztokémia embriókon
  - „lassú” fixálás
  - metanolos fixálás
- Immunhisztokémia lárvális tracheákon
- RNS *in situ* hibridizáció

## Eredmények

-munkánk során funkcióvesztéses *dDAAM* alléleket izoláltunk, és megvizsgáltuk a *dDAAM* mRNS, és a *dDAAM* fehérje kifejeződési mintázatát az egyedfejlődés során

-transzkripcionálisan inaktív embriókban *dDAAM* mRNS felhalmozódást figyeltünk meg, ami arra utalt, hogy a *dDAAM* anyai hatású gén

-kimutattuk, hogy a *dDAAM* vagy egyáltalán nem része a PCP jelátviteli rendszernek *Drosophila*-ban, vagy a funkciója redundáns ebben a rendszerben

-kísérleteinkben fényt derítettünk arra, hogy a vad típusú tracheasejtekben egy speciális aktin sejtváza található, a sejtek apikális felszíne alatt vastag aktingyűrűk alakulnak ki az embrionális fejlődés folyamán

-eredményeink arra utalnak, hogy az aktinkábelek szerepe a légcsőrendszerben az, hogy meghatározzák a kutikulaszekréció helyét a fejlődő embrionális trachearendszerben, a *dDAAM* szerepe pedig az aktinkábelek létrehozása, és párhuzamos lefutású kötegekbe rendezése

-megmutattuk, hogy a *dDAAM* katalitikus aktivitásának kifejtéséhez az FH1 és FH2 domének jelenléte szükséges és elégséges feltétel *in vivo*

-kísérleteink alapján a trachea sejteiben a *dDAAM* a klasszikus formin szabályozási modell szerint működik, a *RhoA* alatt helyezkedik el a gének hierarchiájában, míg az *Src42* és a *Tec29* a *dDAAM*-tól lentebb, vagy vele párhuzamosan ható elemek

-*dDAAM<sup>mat/zyg</sup>* anyailag és zigótikusan gyengített embriókban súlyos nyúlványnövekedési defektusokat figyeltünk meg a KIR-ben, és adatokat nyertünk arra nézve, hogy a *dDAAM* mutánsokban az idegsejt nyúlványok nem utólag degenerálódnak, vagy sejthiány miatt tűnnek el, hanem a *dDAAM* specifikus szereppel bír a KIR nyúlványnövekedésének szabályozásában

-primer idegsejt kultúrákon elvégzett kísérleteink arra utalnak, hogy a *dDAAM* szabályozó szereppel bír a filopódiumok számát és hosszát illetően az idegsejt nyúlványok végein differenciálódó növekedési kúpokban

-a konstitutívan aktív C-DAAM fehérje idegrendszer specifikus túltermelése súlyos faszikulációs defektusokat okozott, és embrionális letalitáshoz vezetett, az embriók nagy többségében megvastagodott keresztkötegeket, és ektopikus helyeken kilépő extra nyúlványokat láttunk

-a DADm-DAAM::EGFP konstitutívan aktív *dDAAM* forma által a nem-idegsejt típusú S2 sejtekben megfigyelt karakterisztikus sejtalakváltozások, és primer idegsejt kultúrában megfigyelt filopódiumszám növekedés, valamint a C-DAAM fehérje túltermelése által okozott nyúlványnövekedési fenotípusok arra utalnak, hogy a *dDAAM* funkciója a funkcióvesztéses kísérletekkel összhangban a növekedési kúpok filopódiumszámának, és az idegsejtek morfológiájának szabályozása

-immunoprecipitációs kísérletekben kimutattuk, hogy az aktivált *dDAAM* egy komplexben található mind az Ena-val, mind a Profilin-nel *in vivo*

-P19 sejtvonalon és *Drosophila* rendszerben nyert eredményeink alapján a DAAM fehérjék szerepe az idegsejt nyúlványok növekedésének szabályozásában evolúciósan konzervált funkció lehet

## **Az értekezés alapjául szolgáló publikációk**

Matusek T., Djiane A., Jankovics F., Brunner D., Mlodzik M., Mihály J.: The Drosophila formin DAAM regulates the tracheal cuticle pattern through organizing the actin cytoskeleton, Development 2006 Mar; 133(5):957-66. **IF=7.603**

Matusek T., Gombos R., Szécsényi A., Sánchez-Soriano N., Czibula Á., Pataki Cs., Gedai A., Prokop A., Raskó I., Mihály J.: Formin proteins of the DAAM subfamily play a role during axon growth, J Neurosci. 2008 Dec; 28(49):13310-9. **IF=7.506**

## **Egyéb publikációk**

Mihály J., Matusek T., Pataki Cs.: Diego and friends play again: old planar cell polarity players in new positions, FEBS J. 2005 Jul; 272(13):3241-52. **IF=3.579**