

Ph.D disszertáció tézisei

**Új szöveti polaritási gének azonosítása *Drosophilában*
és a *Rab23* genetikai jellemzése**

Pataki Andreea Csilla

Témavezető: Dr. Mihály József

Genetikai Intézet

Szegedi Biológiai Központ

Magyar Tudományos Akadémia

Szegedi Tudományegyetem

2010

Bevezetés és célkitűzések

Az egyedfejlődés folyamán az epitéliális sejtek gyakran a szövetek síkjában is polarizálódnak. Ezt a jelenséget síkbeli, vagy szöveti polaritásnak (SZP) nevezzük. A SZP jelensége számos gerinces állat szöveteiben is megfigyelhető. Ilyenek például a halak pikkelyeinek, vagy a madarak tollainak elrendeződése, az emlősök szőrmintázata, a légcső illetve a petevezeték csillói valamint a belső fül érzékhámjában a Corti-féle szerv sztereocíliumainak elrendeződése. Habár az utóbbi időben kimutatták, hogy a polaritás kialakulása egy, az egész állatvilágban konzervált szabályozási folyamat eredménye, e jelenséget mindeztáig az ecetmuslicában (*Drosophila melanogaster*) tanulmányozták legbővebben. Az ecetmuslicában a SZP a szárnyon a legfeltűnőbb, mivel minden egyes szárnysejtből egy apró szőr (ún. trichóma) nő ki és ezek mindegyike disztális irányba mutat, de nyilvánvaló az epidermiszen is, amelyet egységesen hátrafelé mutató érzékszőrök borítanak, illetve az összetett szemben, amelyet tükörszimmetrikusan elhelyezkedő elemi szemek alkotnak.

Az ecetmuslicán végzett genetikai és molekuláris biológiai kísérletek elvezettek a SZP-t meghatározó gének azonosításához, ezeket polaritási géneknek nevezték el. Ezen gének egy részének mutációja hibás szárnyiszőr mintázatot eredményez anélkül, hogy befolyásolná a szöveti fejlődés egyéb aspektusait. A sejtes fenotípusuk alapján ezeket a géneket négy csoportba sorolták. Az első csoport génjeinek mutációi, a *ft* (*fat*), *ds* (*dachsous*) és *ff* (*four-jointed*) avagy a Ft/Ds csoport, fordított polaritású szőrmintázatot mutatnak, a szőrkezdemények a sejtek szélén alakulnak ki (Adler és mtsai., 1998; Strutt és Strutt, 2002). A második csoport tartalmazza a *fz* (*frizzled*), *dsh* (*dishevelled*), *fmi* (*flamingo*), *stbm* (*strabismus*), *pk* (*prickle*) és *dgo* (*diego*) (core csoport) géneket, amelyek mutációja megváltoztatja a tüskék kinövési irányát, sokszor örvényes fenotípust eredményez, ritkán kettős szőrkinövések is előfordulnak és a tüskék a sejtek közepéből nőnek ki (Wong és Adler, 1993). A harmadik csoport (In csoport) tartalmazza az *in* (*inturned*), *fy* (*fuzzy*) és *ftrt* (*fritz*) géneket. Ezek mutációja többes, elsősorban kettős szőrkinövéseket eredményez, amelyek egyforma hosszúságúak, orientációs hibákat mutatnak és az iniciáció nem a sejtek disztális csúcsából, hanem az apikális sejtmembrán mentén random pozícióból történik. Végül a negyedik csoport tartalmazza az *mwh* (*multiple wing hairs*) gént, amelynek mutánsaira jellemző, hogy sejtenként négy vagy több egyforma tüskét növesztenek. Kettős mutáns elemzések kimutatták, hogy ezek a fenotípus csoportok episztatikusak egymáshoz képest, mégpedig az Mwh csoport episztatikus az összes többi felett, az In csoport a Ft/Ds csoporthoz

és a core csoporthoz, míg a core csoport a Ft/Ds csoporthoz képest. Ezek az adatok azt sugallták, hogy ezek a gének egy lineáris hierarchikus szabályozás elemei, ahol a Ft/Ds csoport helyezkedik el legfelül és ezt követik a core, In és Mwh csoportok. Habár egy ilyen lineáris hierarchia létezése még vitatott (Casal és mtsai., 2006; Lawrence és mtsai., 2007), az világos, hogy a SZP gének szabályozzák a (1) szárnyáször orientációját, (2) a kinövés helyét és (3) a sejtenkénti szőrök számát.

Habár még nem ismert az a molekuláris mechanizmus, amely meghatározza az aktin tüske kinövési helyét, kimutatták, hogy a core fehérjék aszimmetrikus sejten belüli mintázatot mutatnak az aktin tüske kialakulásakor. Ez a lokalizáció kritikusan tűnik a szőrkinövés helyének meghatározásában (Mihály és mtsai., 2005; Seifert és Mlodzik, 2007). A core fehérjék előbb kihorgonyozódnak a sejtek apikális felszínén majd polarizált komplexekben halmozódnak fel a szőriniciáció előtt. A a Fz, Dsh és Dgo fehérjék jellegzetesen a disztális oldalon halmozódnak fel (Axelrod, 2001; Strutt, 2001; Das és mtsai., 2004), a Pk és a Stbm a proximális oldalon dúsul fel (Tree és mtsai., 2002; Bastock és mtsai., 2003), míg a Fmi a proximális és a disztális oldalon is egyaránt kimutatható (Usui és mtsai., 1999; Shimada és mtsai., 2001). Későbbi munkákból kiderült, hogy az In fehérje is aszimmetrikus mintát mutat ebben a fejlődési stádiumban, és a proximális oldalon halmozódik fel (Adler és mtsai., 2004). Megfigyelték, hogy bármely core fehérje hiánya befolyásolja a többi core elem és az In fehérje aszimmetrikus lokalizációját, és az episztázis analízisnek megfelelően a core fehérjék aszimmetrikus lokalizációja nem függ az *in* funkciójától (Adler és mtsai., 2004). A legfrissebb adatok alapján a Fy és Frtz fehérjék ugyancsak proximálisan halmozódnak fel és az In-del együtt aktiválják az ugyancsak proximálisan feldúsuló Mwh-t (Yan és mtsai., 2008; Strutt és Warrington, 2008).

Ismert, hogy a bebábozódás utáni (BU) 24 óráig a fent említett fehérjék szimmetrikus komplexeket alkotnak, majd relokalizálódnak és aszimmetrikusan halmozódnak fel a membrán megfelelő oldalán, amíg a szőrkinövés elkezdődik (30-32 óra BU). Később, a bebábozódás után 35 órával, újra felbomlik ez az aszimmetrikus mintázat.

Mindmáig nem tisztázott, hogy a fenti elemek pontosan hogyan befolyásolják a megfelelő szöveti polaritás kialakulását. Egy modell vagy munkahipotézis, ami megfelel a kísérleti megfigyelések nagy részének, a következő. Előbb egy, a Fj, Ds és Ft fehérjék által meghatározott irányadó jel kijelöli a polarizáció irányát. Ez valamilyen módon elindítja a core fehérjék aszimmetrikus relokalizációját, amit egy közöttük lévő visszacsatolós mechanizmus erősít. Ez egy magasabb Fz aktivitást eredményez a sejtek disztális oldalán, ami

aktiválja a disztális oldalon lévő végrehajtó fehérjéket (amelyek még ismeretlenek) és ezáltal elindítja a szőrkinövést ezen az oldalon. Elterjedt továbbá az a nézet is, miszerint az In komplex szerepe, hogy megakadályozza a szőrkinövést a sejtek proximális oldalán. Annak ellenére, hogy ez a modell számos megfigyelést megmagyaráz számos kérdés tisztázatlan maradt. Nem ismeretesek azok a mechanizmusok, amelyek a fehérjék lokalizációjáért felelősek, és ismeretlen a Fz jelátvitel és a fehérjék aszimmetrikus felhalmozódása közti kapcsolat is. Nem tudjuk továbbá azt sem, hogy a felső elemek hogyan befolyásolják a core fehérjék aszimmetrikus felhalmozódását, valamint nem ismeretes az összes szövetspecifikus végrehajtó elem és azok hatásmechanizmusa sem.

Ezen munka célkitűzése az volt, hogy olyan új, a SZP kialakításában résztvevő elemeket azonosítsunk és tanulmányozzunk, amelyekkel választ adhatnánk a fenti kérdések egy részére.

Anyagok és módszerek

- *Drosophila* genetika

- mutagenézis kísérlet (EMS, ENU)
- P-elem ugrasztás
- letálfázis analízis
- fenotípus jellemzések: szárny, notum, szem, abdomen, láb
- transzgénikus vonalak létrehozása

- DNS- technikák:

- PCR
- RT-PCR
- klónozás

- Biokémia:

- Rab23 ellenanyag előállítás
- Western- blot
- immunoprecipitáció

- Mikroszkópia:

- Nomarski felvételek: Zeiss Axiocam MOT2
- konfokális felvételek: Olympus FV1000 LSM

- Immunhisztokémia:

- boncolások

- immunfestések
- Statisztikai analízis

Eredmények és megvitatás

Céljaink megvalósításának érdekében egy nagyléptékű mutagenézis kísérletet hajtottunk végre, amelyben az FRT/Flp mozaik rendszert használtuk arra, hogy az Ubx-Flp segítségével nagyméretű mutáns klónokat hozzunk létre a muslicák szárnyán és notumán. Kémiai mutagenézisnek vetettük alá a második kromoszóma jobb és bal karját, valamint a harmadik kromoszóma jobb karját. Ily módon 33 új SZP mutánst azonosítottunk. Ezek közül 3 a második kromoszóma bal karjára, 3 a jobbra és 27 a harmadik kromoszóma jobb karjára térképeződött. A kapott jelöltek komplementációs analízise és genetikai térképezése kimutatta, hogy öt közülük, amelyek SZP fenotípussal rendelkeztek a notumon, szárnyon és szemben, egy komplementációs csoportot alkotnak és a *Kul* (*Kuzbanian-like*) gén pontmutánsai. Ezek az allélek a *Kul* fehérje metalloproteáz doménjében hordozzák az aminosav cserét, négyben a C481-es, egyben a V603-as aminosav érintett. Ezen allélek behatóbb jellemzése, csoportunk jövőbeni tervei közé tartozik.

Egy másik új, a harmadik kromoszóma jobb karjára térképeződő mutáns genetikai jellemzése azt mutatta, hogy ez az allél egy pontmutációt hordoz a *Drosophila Rab23* gén GTPáz doménjének első kapcsoló régiójában. A 69-es pozícióban található mutáció, a kis GTPázok családjában nagymértékben konzervált Threonin aminosavat érintette (*Rab23^{T69A}*). Ez a pontmutáns (amelyet *Rab23^{T69A}*-nak neveztünk el) szemletális és közepes erősségű többes szőrkinövéses fenotípust, illetve gyenge szőr orientációs hibákat mutat.

Mivel ezen a pontmutánson kívül nem állt rendelkezésünkre más *Rab23* allél, a további vizsgálatokhoz P-elem ugrasztás segítségével független alléleket hoztunk létre. Az ily módon létrehozott egyik deléciós mutáns, a *Rab23⁵¹* homozigóta életképes és erős többes szőrkinövéses fenotípust mutat. A *Rab23^{T69A}* és *Rab23⁵¹* mutánsok megőrzik fenotípusukat a gént kitakaró deléció fölött is, funkcióvesztéses vagy funkcionálisan null mutánsként viselkednek. A teljes hosszúságú vad típusú *Rab23* gén egy példányát tartalmazó konstrukció segítségével sikerült teljes mértékben menekítenünk a mutáns fenotípust. A *Rab23* funkció csendesítése RNS interferenciával különböző szövetspecifikus és általános Gal4 driverek felhasználásával moderált többes szőrkinövéses fenotípust okozott a szárnyon, de más szövetet és az életképességet nem érintette. A *Rab23* mutánsok a szárnyfenotípuson túlmenően az abdomen kutikulát és a lábat érintő többes trichómakinövéseket is mutatnak

anélkül, hogy az érzékszőrök polaritását befolyásolnák. Összefoglalva, ezek az eredmények azt sugallják, hogy a *Rab23* egy olyan egyedi SZP gén, melynek szerepe van a trichómák sejtenkénti számának és orientációjának a meghatározásában anélkül, hogy befolyásolná a többsejtű képződmények, például az érzékszőrök és az elemi szemek polaritását.

Korábbi kísérletekben kimutatták, hogy a *Rab23* egér ortológ a Shh (Sonic hedgehog) jelátviteli út negatív szabályozója az embrionális idegrendszer fejlődése során (Eggenchwiller és mtsai., 2001). Ezért mi is megvizsgáltuk a Shh jelátviteli út aktivitását homozigóta mutáns *Rab23*⁵¹ embriókban és felnőtt szövetekben. Munkánk során nem találtunk arra bizonyítékot, hogy ecetmuslicában a *Rab23* ezen útvonalon keresztül hat. A *Rab23* fehérje nincs jelen a *Drosophila* embrionális idegrendszerben és nem észleltünk idegrendszeri hibákat a mutáns embriókban sem. Tehát valószínűleg a *Rab23* nem játszik szerepet a *Drosophila* embrionális idegrendszerének fejlődésében, utalva arra, hogy a *Rab23* gén szerepe az Shh jelátvitelben a gerincesekre korlátozódik. Ezzel összhangban, a *Rab23* mutánsok abdomen fenotípusa sem hordozza jelét annak, hogy a *Rab23* szerepelne a Hh jelátviteli útban, muslicában.

Azért, hogy betekintést nyerjünk a *Rab23* sejtszinten játszott szerepébe, megfigyeltük a szőr iniciációt *Rab23*⁵¹ homozigóta mutáns, illetve *Rab23*^{T69A} mutáns klónokat hordozó szárnyakon. Azt láttuk, hogy *Rab23* hiányában az apikális aktin felhalmozódás nem korlátozódik a sejtek disztális csúcsára, hanem az apikális régióban mindenhol kimutatható egy diffúz aktin hálózat, és később nagy számban jelennek meg többes szőrök a sejtek perifériáján. Ezen túl, a szőrkinövés időpontja késett a vad típushoz képest, de a többes szőrkinövések mindig a mutáns szövetre korlátozódtak, ami arra utal, hogy a *Rab23* sejtautonóm módon hat.

Korábbi megfigyelések szerint a szárnysejtek rendezetlen alakúak a lárva stádiumban és a bábfejlődés elején, de többségük a szőriniciáció előtt hatszögűvé válik (Classem és mtsai., 2005). Megfigyeltük, hogy 30-32 órával BU a *Rab23* mutáns sejtek egy része nem veszi fel a hatszögű alakot. Ezt a hatást számszerűsítettük és kiderült, hogy a *Rab23*^{T69A} pontmutánsban szignifikánsan nagyobb a nem megfelelően csomagolódtott sejtek száma a vad típushoz képest. Összehasonlításuképpen megvizsgáltuk a szárnysejtek csomagolódását *stbm*^Δ és *dsh*¹ mutánsokban is. Mivel a *Rab23* mutáció okozta csomagolódtási hibák összehasonlíthatóak a core mutációk hatásával, ezen eredmények azt sugallják, hogy a *Rab23*-nak meghatározó szerepe van a fejlődés során a szárnyszövet csomagolódtásában.

Kíváncsiak voltunk arra, hogy van-e összefüggés a sejtek alakja és a *Rab23* mutáns

orientációs hibákat és többes szőrkinövéseket mutató fenotípusa között. Azt találtuk, hogy a *Rab23* függetlenül befolyásolja a sejtek csomagolódását, illetve a többes szőrkinövést és szőr orientációt. Azért, hogy kiszélesítsük megfigyeléseinket, megvizsgáltuk a sejtalakot más, többes szőrkinövést mutató mutánsokban (*in*, *frtz*, *mwh*) és habár ezek valamivel gyengébb csomagolódási fenotípust mutattak, itt sem találtunk összefüggést a sejtenkénti szőrszám és a sejtek alakja között. Ezen eredmények azt mutatják, hogy a szárnyszövet csomagolódásának nincs közvetlen hatása a szőriniciációs helyek számának meghatározására a szárnyszövetben. A szőr orientáció és sejtalak közti összefüggést illetően, megfigyeléseink alátámasztják Classen és mtsai., (2005) core génekre vonatkozó eredményeit, és ellentmondanak a *fat* mutáns klónokban tapasztalt megfigyeléseknek (Ma és mtsai, 2008).

Nemrég kimutatták, hogy a szárnysejtek a szőr iniciációt megelőzőleg válnak hatszögűvé és ez a folyamat befolyásolja a core SZP fehérjék aszimmetrikus elrendeződését. Mivel a mi mutánsainkban a hexagonális csomagolódás hibás volt, kíváncsiak voltunk arra, hogy a *Rab23*-nak van-e valamilyen szerepe a core SZP fehérjék lokalizációjára a fejlődés különböző szakaszaiban, de a Fmi fehérje eloszlása a bábfejlődés kezdetén (6 órával BU) a *Rab23* mutáns szárnyakban normális volt. A következőkben megvizsgáltuk a fehérjék lokalizációját későbbi fejlődési stádiumokban (24-32 órával BU) *Rab23⁵¹* homozigóta és *Rab23^{T69A}* klónos szárnyakon. Azt találtuk, hogy ebben a fejlődési szakaszban a core és In fehérjék lokalizációs hibát mutatnak a *Rab23* mutáns szövetben, habár az apiko-laterális zónában történő feldúsulásuk nem sérül. Ezen kísérletekből levonhatjuk azt a következtetést, hogy a *Rab23* csak a késői SZP fehérje lokalizációban játszik szerepet.

Azért, hogy megértsük azt a mechanizmust mely segítségével a *Rab23* hozzájárul a core fehérjék lokalizációjához, megvizsgáltuk az UAS-YFP::*Rab23* transzgént hordozó legyek szárnyát. Azt láttuk, hogy 24-30 órával BU a *Rab23* az apiko-laterális membrándoménben dúsul fel, de a membrán minden területén megtalálható. Ez a mintázat megfigyelhető volt a korábbi és későbbi fejlődési stádiumokban is tehát a *Rab23* nem mutat polarizált felhalmozódást a bábfejlődés folyamán. Ezen eredményeket alátámasztották a YFP::*Rab23* flip-out klónokon végzett kísérletek, illetve a *Rab23^{CA}* (konstitutívan aktív forma) mintázata.

Mivel a *Rab23* bábszárny mintázata átfedést mutatna a core fehérjék lokalizációjával, nem lett volna informatív a fehérjék lokalizációjának átfedését ebben a rendszerben vizsgálni. Ezért ahhoz, hogy megnézzük, mely SZP fehérjéket szabályozhatja a *Rab23*, összehasonlítottuk a különböző core fehérjék (Fz, Dsh, Dgo, Stbm, Pk) lokalizációját S2

sejtekben Rab23 jelenlétében és hiányában. Azt láttuk, hogy a Pk és a Stbm részleges átfedést mutatott a Rab23-al. Mivel a Pk vagy a Stbm nem mutatott membrán lokalizációt, nem volt lehetséges annak tesztelése, hogy a Rab23 befolyásolja-e a Pk vagy Stbm endocitózisát. Ezek az eredmények azt mutatták, hogy a Rab23 a Pk és/vagy a Stbm fehérjén keresztül befolyásolhatja a core fehérjék eloszlását. Ezt a feltevésünket az is alátámasztotta, hogy azokban a sejtekben, amelyek a Rab23T69A fehérjét termelték, sokkal alacsonyabb volt az átfedés a mutáns Rab23 és a Pk között. Sajnos hasonló kísérletek elvégzése nem volt lehetséges a szárnyon a gyenge minőségű Rab23 ellenanyag miatt, de a Rab23 és a Pk fehérjék koimmunoprecipitálhatók voltak bábszárnyakból készített fehérje kivonatokból, míg *Rab23⁵¹* mutáns bábokból készült lizátumból nem, ami arra utal, hogy egy fehérje komplexben találhatók.

Ha a *Rab23* egyetlen szerepe az volna, hogy szabályozza a Pk lokalizációt és ezáltal más core fehérjékét, azt várnánk, hogy a *Rab23* mutánsok fenotípusa a *pk* mutánsok fenotípusához vagy a core gének mutáns fenotípusához hasonlítson. De a *Rab23* erős többes szőrkinövéses fenotípusa eltér a core mutációk okozta orientációs hibáktól. Tehát feltehetően a *Rab23*-nak két különböző, de nem feltétlenül független szerepe van az SZP kialakításában, a szárnyban. Az első a fehérjék polarizált elosztása, a második az aktin felhalmozódás és ezáltal a szőrkinövés helyének meghatározása. A másodiknak említett szerepével egybeesik az a megfigyelésünk, hogy a *Rab23* dominánsan erősíti a core gének gyenge többes szőrkinövéses fenotípusát, de nincs erős hatása a szőrök orientációjára, míg a *Rab23* homozigóta mutáns fenotípusa érzékeny az In csoport génjeire, amelyek szerepet játszanak a sejtenkénti szőrszám meghatározásában.

A következőkben kettős mutáns analízist végeztünk, hogy meghatározzuk a *Rab23* helyét a polaritási jelátviteli útban. Ennek érdekében elvégeztük a *Rab23* kettős mutáns elemzését a *fz²¹*, *dsh¹*, *pk^{pk30}*, *stbm⁶*, *in¹*, *frtz¹* és *mwh¹* allélekkel. Eredményeink azt mutatták, hogy a szőrorientáció szabályozása szempontjából, a *Rab23*-nak kevés szerepe van ebben a folyamatban, ami megfelel a *Rab23* egyes mutáns fenotípusának. A szőriniciáció helyének meghatározása szempontjából az In csoport és az *mwh* downstream/ vagy később hat a Rab23-hoz képest. Ezzel ellentétben, a core fehérjék és a Rab23 párhuzamos útvonalban hatnak a szőrkinövés helyének meghatározásakor.

Összegezve, a *Rab23* mutáns többes szőrkinövéses fenotípusát a SZP fehérjék lokalizációjára kifejtett hatását, a domináns genetikai interakciók és a kettős mutáns analízis eredményeit, azt mondhatjuk, hogy a szárnysejtekben a *Rab23* összeköti a fehérjék kortikális

lokalizációját az ektopikus szőrkinövések megakadályozásával. Egy nagyon egyszerűsített modellben a Rab23 szerepet játszhat a Pk proximális felhalmozódásában és összekötheti az In aktivációt a proximális sejt doménnel.

Közlemények jegyzéke

1. Mihály, J., Matusek, T., **Pataki, C.** (2005). Diego and friends play again. *FEBS Lett* 272, 3241-3252. **IF= 3,3**
2. Rus, F., Kurucz, É., Márkus, R., Sinenko, S. A., Laurinyecz, B., **Pataki, C.**, Gausz, J., Hegedüs, Z., Udvardy, A., Hultmark, D., Andó, I. (2006). Expression pattern of Filamin-240 in Drosophila blood cells. *Gene Expr. Patterns* 6, 928-934. **IF= 2,1**
3. **Pataki, C.** (2006). Isolation of new planar polarity genes in Drosophila melanogaster. *Acta Biol Szegediensis* 50, 3-4.
4. Weber, U., **Pataki, C.**, Mihály, J., Mlodzik, M. (2008). Combinatorial signaling by the Frizzled/PCP and Egfr pathways during planar cell polarity establishment in the Drosophila eye. *Dev Biol* 316, 110-123. **IF= 5,234**
5. Matusek, T., Gombos, R., Szécsényi, A., Sanchez-Soriano, N., Czibula, Á., **Pataki, C.**, Gedai, A., Prokop, A., Raskó, I., Mihály, J. (2008). Formin proteins of the DAAM subfamily play a role during axon growth. *J Neurosci* 28, 13310-13319. **IF= 7,5**
6. **Pataki, C.**, **Matusek, T.**, Kurucz, É., Andó, I., Jenny, A., Mihály, J.. Drosophila Rab23 is involved in the regulation of the number and planar polarization of the adult cuticular hairs. Published ahead of print on February 1. 2010 in *Genetics* **IF= 4**