**A *DROSOPHILA* SPEKTRAPLAKIN SZEREPE
HÁMZÁRÓDÁSI FOLYAMATOKBAN**

Ph.D. értekezés

Készítette: Takács Zsanett

Témavezető: Dr. Jankovics Ferenc

Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Genetikai Intézet

Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Biológia Doktori Iskola
Szeged
2020

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	2
I. BEVEZETÉS.....	4
II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	5
1. A <i>Drosophila</i> embrió háti záródása.....	5
2. A sejtíváz és szerepe a háti záródásban.....	9
2.1. A sejtíváz általános jellemzői	9
2.2. A sejtíváz működése a háti záródás alatt	13
3. A Spektraplakin fehérjék.....	18
3.1. A Spektraplakin fehérjék jelentősége	18
3.2. A Spektraplakin fehérjék szerkezete.....	20
III. CÉLKITŰZÉSEK.....	23
IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	24
1. <i>Drosophila melanogaster</i> törzsek	24
2. <i>Shot</i> ^{ΔEGC} mutáns allél létrehozása CRISPR/Cas9 módszerrel.....	26
3. Géncsendesítés <i>Drosophila</i> embriókban.....	30
4. <i>In vivo</i> mikroszkópia	32
5. Immunhisztokémia.....	33
6. Hámzáródási esszék	34
7. FRAP (Fluorescent recovery after photobleaching)	35
V. EREDMÉNYEK.....	36
1. RNS interferencián alapuló funkcióvesztéses szűrés.....	36
2. <i>Shot</i> ^{ΔEGC} mutáns allél létrehozása CRISPR/Cas9 módszerrel.....	40
3. A Shot fehérje aktin-MT keresztkötő aktivitásával szabályozza a cipzározódást ..	43
4. A Shot fehérje a hámsejtek MT-vázának elrendeződését szabályozza	45
5. A Shot fehérje a MT-okat stabilizálja	47

6. A Shot fehérje aktin-MT keresztkötő aktivitása szükséges a MT-ok stabilizálásához.....	51
7. A Shot fehérje elősegíti a filopódium képződést a vezető élben	59
VI. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA	61
VII. TARTALMI ÖSSZEFOGLALÓ.....	65
VIII. SUMMARY.....	69
IX. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	72
X. IRODALOMJEGYZÉK	73
XI. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA	82

I. BEVEZETÉS

Az egyszerű szövetes élőlényektől az emberig a szigorúan rendezett szöveti struktúra fenntartása létfontosságú a túléléshez. Ennek a struktúrának a kialakulása egy komplex, evolúciósan konzervált jelátviteli hálózatok által szabályozott folyamat, mely során lezajló molekuláris, illetve sejt-és szövetszintű változások megegyeznek, függetlenül attól, hogy ez éppen a környezet hatásaival szembeni ellenállást (pl. sebzáródás) vagy a fejlődéshez szükséges változásokat jelenti [1].

Az ember egyedfejlődése során a sejtek csoportos vándorlása majd összekapcsolódása alapjául szolgál olyan, a fejlődés szempontjából kritikus folyamatoknak, mint az agy, a gerincvelő, a koponyaüregek vagy az ivarszervek kialakulása. Az egyedfejlődés során számos esetben, például a szájpadrás vagy az állkapocs kialakulása alatt, a test két oldalán létrejött szövetek a középvonal felé mozognak, és ott látható nyom nélkül olvadnak össze. Ezekben a szigorúan szabályozott folyamatokban bekövetkezett hibák olyan fejlődési rendellenességekhez vezethetnek, mint a nyitott gerinc vagy a farkastorok [2]. Az embrionális fejlődés során történő szövetösszenövésekhez hasonló folyamatok mennek végbe a természetes módon vagy sebzés hatására létrejött háthiányosságok bezárásakor is [3, 4]. A hámozódási folyamatok alapvető mechanizmusainak mélyebb megértése, a benne részt vevő molekulák felderítése és vizsgálata éppen ezért hosszú távon felgyorsíthatják a sebgyógyulást elősegítő újszerű eljárások kifejlesztését. Kutatásainkkal végső soron azokat a stratégiákat szeretnénk megismerni és megérteni, amiket az élőlények alkalmaznak a hámozódások bezárásához. Az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) embriójának háti záródása alkalmas modellt kínál e jelenségek genetikai és sejtbiológiai vizsgálatához, ugyanis az ecetmuslica egyedfejlődése során az embrió hátán egy nyílás alakul ki, amit a két oldalsó hámlemez a háti középvonal mentén bezár. A háti záródást kísérő molekuláris, illetve sejt-és szövetszintű változások evolúciósan konzerváltak, megegyeznek és közösek az egész állatvilágban.

A *Drosophila* genetika kiforrott eszköztára, a nagyszámú mutáns allél, a transzgének elérhetősége és az *in vivo* videomikroszkópia egyszerű és gyors kutatómunkát tesz lehetővé a bonyolultabb és költségesebb gerinces modellállatokhoz képest. A háti záródás genetikai hátterének vizsgálata azonban túlmutat a háti záródás alapjelenségének megismerésén, hiszen ezen összetett folyamat vizsgálata hozzásegíthet olyan általános fejlődésbiológiai jelenségek pontosabb megértéséhez, mint pl. a sejthalak megváltozásához szükséges sejtvezérlés átrendeződés.

II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1. A *Drosophila* embrió háti záródása

A *Drosophila* embrió háti záródása az embrionális fejlődés 12-16. stádiuma között, a pete lerakásától számított 10-12. órában zajlik. A háti záródás az embriófejlődés utolsó morfogenetikai mozgása, melynek során két egyrétegű hámlemez mozog egymás felé, majd találkoznak és összeolvadnak, ezáltal bezárva egy nyílást a háti középvonal mentén. A háti záródás négy egymást részben átfedő folyamat sorozatából áll (1. ábra). A záródás első fázisa az iniciáció, ami az embrió megrövidülésének (germ band retraction) befejezését megelőzően kezdődik, amikor a csírasáv visszahúzódik a fejlődő embrió poszterior részére, így az embrió hátán egy ellipszis alakú lyuk jön létre (1. ábra A). A háti nyílást egy átmeneti, extraembrionális szövet, az amnioszeróza (AS) védi a két oldalsó egyrétegű hámlemez között. A második fázis a hám kiterjedése (1. ábra B). Az AS és a hám határán elhelyezkedő hámsejtek (DME, dorsal most epithelial) egy sorba rendeződnek és kialakul egy vezető él. A DME sejtek kiemelt fontosságúak a háti záródás szempontjából. Az iniciáció során ezek a sejtek reagálnak a záródást elindító jelemolekulákra, majd hajtják végre a záródást és végül közöttük alakulnak ki a háti nyílást bezáró sejtkapcsolatok. A DME sejtek aktint és miozint halmoznak fel az AS felé eső oldalukon, ezáltal kialakul egy szupracelluláris aktomiozin gyűrű, ami a háti lyukat körülveszi. A záródás második fázisában a hámlemezek egymás felé közelítenek. Ekkor a DME sejtek, majd a DME sejtektől ventrális irányban elhelyezkedő hámsejtek megnyúlnak a dorzoventrális tengely mentén. Amikor a hámsejtek a háti nyílás két végén összeérnek, elkezdődik a harmadik fázis („cipzározódás”), amely során az ellenkező irányból érkező hámlemezek összekapcsolódnak (1. ábra C). Ekkor a DME sejtek dorzális felszínén aktinalapú sejtnyúlványok– filopódiumok és lamellipódiumok– jelennek meg, amelyek az új sejtkapcsolatok szegment specifikus kialakulását biztosítják a szemben lévő hámsejtek között. Mikor a hámsejtek elég közel vannak egymáshoz, a sejtek tetőcserépszerűen átlapolódnak. Az átlapolódások a cipzározódás végére megrövidülnek és a hámsejtekre jellemző sejt-sejt interakciós felületekké alakulnak át. Az utolsó, terminációs fázisban az összekapcsolódó hámlemezek mozgása megszűnik, az aktin alapú szerkezetek is szétszerelődnek a sejtek között pedig stabil kapcsolatok alakulnak ki (1. ábra D) [5-10].

1. ábra. A *Drosophila* embrió háti záródása. (A-D) Konfokális fluoreszcens felvételek a háti záródás folyamatáról. Az embrió balról jobbra anterior poszterior irányban látható [11].

A háti záródást kísérő morfogenetikai változásokat mechanikai erők vezérlik, melyek összehangolt kölcsönhatása nélkülözhetetlen a háti záródás különböző szakaszaiban (2. ábra A). Az AS sejtek pulzáló összehúzódása egymásfelé húzza a hám két szélét, ezáltal elősegíti a hámlemezek előremozdulását [12]. A záródás végére ezek a sejtek a hám alá kerülnek és apoptózissal elpusztulnak. További húzóerő van jelen a vezető él mentén, melyet a háti nyílás körül kialakuló supracellularis aktomiozin gyűrű generál [12, 13]. Az aktomiozin gyűrű hatására kiegyenesedik a háti záródás mozgási frontja és a hámlemezek cipzárként olvadnak össze az embrió háti középvonala mentén. További, ellentétes irányú erőt biztosítanak a laterális hámlemezekben jelentkező feszültség és az AS sejtek intracelluláris nyomása, melyek ellenállnak a záródást segítő többi erőnek, hogy fenntartsák az egyensúlyt a sejtalakváltozások és a szövetek mozgása között (2. ábra A) [14, 15].

Az egyes erőhatások hozzájárulása a háti záródáshoz nem azonos. Hutson és munkatársai áttörő tanulmányukban lézer indukálta sérülések sorozatát végezték el a háti záródás különböző stádiumaiban, hogy felmérjék ezen erőhatások szerepét a folyamatban [13]. Ez lehetővé tette egy olyan matematikai modell kifejlesztését, mely a háti záródás alakváltozását írja le és alkalmas a vad típusú, de a mechanikailag sérült vagy genetikailag mutáns embriók háti záródásának számszerűsítésére egyaránt.

2. ábra. A háti záródásra ható erők és a záródás matematikai modellje *Drosophilában*. (A) A zöld nyilak a háti záródást segítő erőket, míg a piros nyilak a záródás ellen ható erőket jelölik. A bal alsó kék négyzet az AS kontraktilitást (világos zöld nyilak), AS intracelluláris nyomását (rózsaszín nyilak), az oldalsó hámlemezek húzóerejét (piros nyilak), valamint az aktomiozin gyűrű által generált húzóerőt (sötét zöld nyilak) mutatja. A jobb alsó narancssárga négyzet a sejtnyúlványok aktivitását mutatja a cipzározódás alatt. (B) A háti záródás leírásához használt geometriai paraméterek: W , a cipzározódó végek távolsága; H az egymás felé elmozduló hámrétegek távolsága; θ_A és θ_B , a háti középvonal és a vezető él között bezárt szög; R , görbületi sugár. A modell a vezető éleket két egymást metsző körívnek tekinti és így a háti záródás alakváltozása két egyenlettel írható le: (B') A háti záródás sebességét (dH/dt) a záródást elősegítő aktomiozin gyűrű által generált erő (T/R) és az AS összehúzódása (σ_{AS}), valamint a záródás ellen ható oldalsó hámlemezek húzóereje (σ_{LE}) közti egyensúly határozza meg, (b) súrlódási együttható. (B'') A cipzározódás sebessége (dW/dt) egy empirikusan származtatott zipzározódási sebességi állandó (k_z) valamint a háti középvonal és a vezető él között bezárt szög (θ_A és θ_B) függvénye (Hayes és munkatársai nyomán módosítva) [15].

Első lépésként kiszámítható a záródó hám háti középvonal irányába történő elmozdulásának sebessége. A háti záródást *in vivo* videomikroszkópiával nyomonkövetve belátható, hogy a háti záródás sebessége állandó ($12 \pm 1,5$ nm/sec, $N=5$), tehát a háti záródást hajtó erők: az aktomiozin gyűrűből eredő feszültség (T/R), az AS szövet összehúzódása (σ_{AS}), és a hámlemezek által generált feszültség (σ_{LE}) egyensúlyban vannak és az erők összege állandó (2. ábra B') [13].

A modell a vezető éleket két egymást metsző körívnek tekinti (2. ábra B), és a háti záródás geometriai paramétereinek változását időfüggő módon empirikus sebességi egyenlet alkalmazásával írja le (2. ábra B''). Az egyenletben a H a háti nyílás teljes hosszúsága, k_z egy sebességi állandó, W a cipzározódó végek távolsága, dW/dt pedig kizárólag a háti középvonal és a vezető él között bezárt szög függvénye (θ_A és θ_B). Minnél élesebb ez a szög, a dW/dt értéke annál nagyobb, gyorsabb a záródás. Az egyenlet segítségével meghatározható a cipzározódási sebességi állandó (k_z). A modell szerint a háti nyílás alakváltozása a cipzározódásból származó (f_z) és az aktomiozin gyűrűn ható erő (f_c) együttes hozzájárulásának köszönhető. A cipzározódás hozzájárulása a háti záródás sebességéhez $f_z = k_z/4V$, míg a záródás fennmaradó része a kontrakcióknak (f_c) tulajdonítható ($f_c = 1 - f_z$). Az empirikus sebességi egyenlet alkalmazásával kiszámítható, hogy a záródás sebessége milyen mértékben függ a cipzározódástól. Vad típusú záródásnál az f_z értéke $\sim 1/3$ az f_c értéke pedig $\sim 2/3$ [13].

2. A sejtvázs szerepe a háti záródásban

2.1. A sejtváz általános jellemzői

A sejtek jellegzetes szerkezeti eleme a sejtváz (citoszkeleton), mely számos folyamatban fontos szerepet tölt be. A sejtváz egy dinamikusan szerveződött rendszer, amely állandóan változik, lehetővé téve a morfogenezist, a sejtmozgásokat, a sejthalak fenntartását, az intracelluláris transzportfolyamatokat és a sejtosztódást is. *Drosophilában* a citoplazmatikus sejtváz két fő komponensből épül fel: mikrotubulusokból (MT) és az aktin fimamentumokból.

A MT-ok kb. 25 nm átmérőjű polimer molekulák, melyeket globuláris szerkezetű α - és β -tubulin alegységekből álló heterodimerek építenek fel. A heterodimerek fej-farok orientációban összekapcsolódnak és fonalszerű struktúrákba, ún. protofilamentumokba szerveződnek (3. ábra A). A MT-ok jellegzetes hengeres formájának kialakulásához 13 protofilamentum laterálisan, egymáshoz képest 0,9 nm-rel elcsúsztatva illeszkedik egymáshoz (3. ábra B). A MT-ok meghatározott polaritással rendelkeznek. Megkülönböztethetünk gyorsan növekvő („+”) és lassan növekvő („-”) véget. A mínusz vég általában a mikrotubulus-organizáló központhoz (MTOC) kapcsolódik. A MT-ok „-” végei az itt található, γ -tubulinból álló gyűrűkhöz kapcsolódnak. Egy-egy ilyen gyűrű 13 alegységből áll és polimerizációs magként működik, melyre az α - és β -tubulinból álló heterodimerek fokozatosan ráépülnek [16].

A MT-ok „+” végei dinamikus instabilitást mutatnak, mely során az egyedi mikrotubulusok lassú növekedési fázisból hirtelen rövidülésbe váltanak („katasztrófa”), majd újra növekedni kezdenek („menekülés”). A mikrotubulusok a növekedési fázis után meg is állhatnak („szünet”), miután újra növekedésbe vagy rövidülésbe kapcsolnak (3. ábra C). *In vitro* rendszerekben az instabilitás oka a tubulin polimerizációhoz kapcsolt GTP-áz aktivitás. A tubulin monomerek GTP vagy GDP molekulát kötnek. A polimerizáció során az α -tubulinhoz kötött GTP GDP-re és foszfátra bomlik, míg a β -tubulinhoz kötött GTP változatlan marad. A GTP tartalmú heterodimerek beépülése a mikrotubulusba egyenes, míg a GDP tartalmú dimerek beépülése görbült protofilamentumok kialakulását eredményezi. A MT-ok növekedése akkor figyelhető meg, ha a GTP-tartalmú dimerek beépülése gyorsabb, mint az ezt követő GTP-hidrolízis. Ilyenkor a MT végeken GTP-tartalmú dimerekből álló „sapka” alakul ki, ami stabilizálja a MT-okat. A növekedés lelassulhat a GTP-tartalmú dimerek koncentrációjának csökkenése miatt és a „sapka” eltűnhet. A hidrolízis következtében GDP-tartalmú dimerek jelennek meg, és ez a MT azonnali szétesését eredményezi, aminek következtében nő a szabad

tubulin heterodimer koncentráció, amit GDP/GTP kicserélődés követ és újra polimerizáció indulhat el [17].

3. ábra. A mikrotubulusok szerkezete és dinamikus instabilitása. (A) A mikrotubulusokat α - és β -tubulin alegységekből álló heterodimerek építik fel, melyek fej-farok orientációban összekapcsolódnak és protofilamentumokba szerveződnek. (B) A MT-ok jellegzetes formájának kialakulásához 13 protofilamentum laterálisan illeszkedik egymáshoz, melyek 0,9 nm-rel el vannak csúszva egymáshoz képest. (C) A MT-ok dinamikus tulajdonságai: 1. Mikrotubulusok növekedése – polimerizáció, 2. Köztes állapotú mikrotubulusok – szünet, miután a MT újra növekedni fog vagy a (3.) depolimerizációs fázisba kapcsol - Mikrotubulusok rövidülése. A polimerizációs-depolimerizációs ciklus a GDP/GTP cseréjével fejeződik be (Akhmanova és munkatársai nyomán) [16].

A dinamikus instabilitás következtében a MT-ok hossza több mikron tartományban változhat, ami a MT-ok és végső soron a sejtek működése szempontjából nagyon fontos MT hálózatok átszerveződését biztosítja. Ha valamilyen vegyülettel megakadályozzuk a dinamikus instabilitást, megakadályozzuk a MT-hoz kapcsolt sejtfunkciók elvégzését is, ami a sejtek elpusztulásához vezet. Az egyik legrégebben ismert ilyen molekula a kolcimid, mely a tubulin heterodimerekhez szorosan kapcsolódva megakadályozza azok polimerizációját és nagy koncentrációban a MT-ok gyors lebomlását okozza [18].

A mikrotubulusok viselkedését jelentősen befolyásolják a mikrotubulusokhoz asszociált fehérjék (microtubule associated protein, MAP). A MAP-ok szerepe sokrétű: elősegítik a MT-ok növekedését, lebomlását, stabilizálják és kötegekbe rendezik a MT-okat. A MAP-ok egy heterogén csoportját alkotják a „+” vég kötő fehérjék (plus-end-tracking protein, +TIP), melyek befolyásolják a MT-ok dinamikus instabilitását. Ilyenek a vég kötő EB1 (end binding 1) fehérjék, melyek evolúciósan konzerváltak és általában a MT-ok növekvő plusz végein találhatóak meg [19]. Az EB1 fehérjék dimereket alkotnak. Szerkezetüket tekintve tartalmazznak egy N-terminális kalponin homológia (CH) domént, ami szükséges és egyben elégséges is a MT növekvő „+” vég felismeréséhez, valamint az EB1 MT-hoz való kötődéséhez [20-22]. A CH domént egy összekötő régió követi. A C-terminálison pedig a dimerizációért felelős coiled coil szerkezetű régió található, mely részleges átfedést mutat egy egyedi szekvencia motívummal, melyet EBH (end binding homology) doménnek is nevezünk, ami az EB1 fehérje kötőpartnereivel való kölcsönhatásért felelős [16, 23]. Az EB1 fehérjék más fehérjékkel kétféle képpen léphetnek kölcsönhatásba. Egyrészt a fehérjéken megtalálható Eb1-kötő SxIP motívumon keresztül, ami például az APC, MACF (MT-actin crosslinking factor), CLASPs (CLIP associating proteins) fehérjékre jellemző. A másik lehetőség, a fehérjékre jellemző Cap-Gly (cytoskeleton-associated protein-glycine-rich) domén és az EB1 C-terminálisán található EEY motívumon keresztül valósulhat meg, pl. a CLIP fehérjék vagy a dynactin komplex tagjai kapcsolódnak így [16]. Az EB1 fehérjék befolyásolják a MT-ok „+” vég dinamikáját *in vivo* és *in vitro* egyaránt [24, 25].

A másik fő sejtvázas komponens *Drosophilában* az aktin filamentumok alkotják, melyek 7-9 nm átmérőjű helikális szerkezetű aktin polimerek. Az aktin polimereket globuláris G-aktin monomerek építenek fel. Akárcsak a MT-oknak, az aktin polimereknek is határozott polaritásuk van: egy gyorsan növekvő „+” véggel és egy lassan növekvő „-” véggel rendelkeznek. A MT-okkal ellentétben azonban az aktin filamentumok nem mutatnak drámai dinamikus instabilitást, hanem taposómalom módjára viselkednek (treadmilling): folyamatosan lépnek be monomerek a plusz végen és lépnek ki a mínusz végen, és eközben a filamentum hossza nem változik [26].

A változatos szerkezetű aktinláncok speciális szabályozó fehérjék segítségével alakulnak ki (4. ábra). Ilyenek a szabad filamentumvégeket lefedő fehérjék, melyek megakadályozzák a további polimerizációt vagy éppen a depolimerizációt. A depolimerizációt vagy a filamentum elhasítását elősegítő fehérjék, illetve az új aktinláncok inicializációját elősegítő nukleáló/polimerizációs faktorok is ismertek.

4. ábra. Az aktinfilamentumok dinamikája. Az aktin filamentumok polaritással rendelkeznek. A végek növekedési dinamikája alapján megkülönböztetünk lassan, illetve gyorsan növekvő véget. A változatos szerkezetű aktinláncok speciális szabályozó fehérjék segítségével alakulnak ki [27].

Az aktin filamentumok a járulékos fehérjék segítségével nagyon változatos struktúrákat alakítanak ki, amelyek egyaránt lehetnek stabil vagy instabil képződmények. Stabil képződmény például a sejtkéreg, ami plazmamembrán közelében koncentrálódó aktin hálózat. A dinamikus struktúrákban azonban az aktin filamentumok perces-másodperces időskálán is képesek átépülni. Ilyen dinamikus aktin alapú képződmények a lamellipódiumok és a filopódiumok, melyek folyamatosan alakulnak ki és húzódnak vissza a vezető élen. A lamellipódiumok nagy felületű, lapos kitüremkedések, melyekben az összekapcsolódó aktinfilamentumok sűrű hálózatot alkotnak. A filopódiumok ezzel szemben ujjszerű sejtnyúlványok, melyekben az aktinszálak nem ágaznak el, hanem hosszú, párhuzamos kötegekbe rendeződnek [27].

Az aktin sejtváz működésében fontos szerepet játszanak a miozin fehérjék, melyek az egysejtű eukariótáktól a gerincesekig mindenütt megtalálható molekuláris motor fehérjék. A nem-izom miozin II (Miozin II) az állati sejtek egyik legfontosabb alkotója, az aktin citoszkeleton átrendeződésében kulcsszerepet játszó, a sejtek minden életszakaszában

meghatározó jelentőséggel bíró motorfehérje. *Drosophilában* a *zipper* (*zip*) gén kódolja a Miozin II nehéz láncát, ami a háti záródás alatt kialakuló aktomiozin gyűrű fontos komponense.

2.2. A sejtvezeték működése a háti záródás alatt

Felmerül a kérdés, hogy a háti záródásra ható erők hogyan alakulnak ki és az egyes sejtek hogyan szabályozzák azokat molekuláris szinten. Különböző genetikai, biokémiai és sejtbiológiai vizsgálatok segítségével fény derült azokra a szerkezeti és jelátviteli molekulákra, melyek fontos szerepet játszanak a háti záródásban [14]. A háti záródást akadályozó mutációk tipikus ún. „nyitott hát” fenotípust eredményeznek. Az ilyen mutánsokban a háti záródás nem történik meg és az embrió nyitott háttal elpusztul. A háti záródás alatt több jelátviteli útvonal válik aktívvá, melyeknek a fent leírt morfogenetikus sejtmozgások, valamint a sejtalakváltozások szabályozásában van szerepük. A nyitott hát fenotípust okozó gének 3 csoportját különíthetjük el [28].

A háti záródás szabályozásában a DJNK (*Drosophila* Jun N-terminális Kináz) szignál útvonalnak van központi szerepe. JNK útvonalat elindító szignál még nem ismert, de tudjuk, hogy a háti záródás kezdeti fázisában a DME sejtekben hat, ahol a sejtvezeték elemek felhalmozódását indukálja. A JNK útvonal bármelyik komponensét (a *misshapen* (*msn*), *hemipterous* (*hep*), *basket* (*bsk*), *Jun-related antigen* (*Jra*), *kayak* (*kay*), *anterior open* (*aop*) és *puckered* (*puc*) gének) érintő mutáció esetén ez a felhalmozódás sérül [6, 29-31]. A JNK útvonal egy többlépcsős foszforilációs kaszkád, ami a transzkripció faktoraként működő Jun fehérje aktiválódását eredményezi, ami végül dimert alkot a Kayak (Kay) fehérjével, létrehozva így az AP-1 transzkripció faktor (5. ábra). Az AP-1 transzkripció faktor további célgének expresszióját aktiválja a sejtmagban. Az egyik ilyen célgén a *decapentaplegic* (*dpp*), a transzformáló növekedési faktor- β (TGF- β) szupercsalád citokinje [31-34].

A háti záródás alatt a JNK jelátvitel emelkedett Dpp szintet tart fenn a DME sejtekben, ami újabb jelátviteli eseményeket aktivál. A Dpp közvetített jelátviteli útvonal komponensei közé tartoznak a Thickveins (Tkv) és Punt (Put) receptorok, valamint a Mothers against dpp (Mad) és a Schnurri (*shn*) transzkripció fehérjék. A dpp útvonal komponenseinek vagy targetjeinek mutációi a JNK mutánsokhoz hasonló háti záródás hibákat eredményeznek. A Dpp a TGF- β útvonalat aktiválja és a JNK útvonal aktivitásán keresztül tartós Dpp szintet tart fenn a DME sejtekben. A Dpp ligandot a DME sejtek az amnioszerózába és a laterális hámba is

szekretálják, ahol sejtalakváltozásokat indukál. A Dpp továbbá szükséges a megfelelő aktin sejtváza átrendeződéséhez a sejtnyúlványok kialakulása során [35-37].

5. ábra. A JNK és Dpp jelátvitel egyszerűsített sematikus ábrája. A JNK útvonal aktiválódása az AP-1 transzkripciós faktor összeszerelődéséhez vezet, ami különböző célgéneket aktivál a sejtmagban, melyek közül legfontosabb a dpp. Miután a Dpp kötődik a receptoraihoz, egy Mad, Smad, Medea fehérje komplex jön létre, amely bejut a sejtmagba és a Dad és Brk transzkripciós represszor fehérjék kifejeződését aktiválja. A dpp sejtalakváltozásokat indukál a DME sejtekben. MSN: Misshapen. Slpr: Slipper. Hep: Hemipterous. Bsk: Basket. Jra: Jun-related antigen. Kay: Kayak. Puc: Puckered Dpp: Decapentaplegic, Tkv: Thickvein. Put: Punt. Mad: Mothers Against Dpp, Brk: Brinker, Dad: Daughters against Dpp.

A Dpp további target fehérjéi a záródás mechanikai effektorait (sejtváz, sejtadhéziós komplexeket, struktúrfehérjéket) kódoló géneket szabályoznak. Ezek a fehérjék lehetővé teszik a háti záródás során létrejövő sejtváz-átrendeződéseket és sejtalak-változásokat. Ilyen például a zipper (zip) gén. A zip gén kódolja a Miozin II nehéz láncát, ami a háti záródás alatt kialakuló aktomiozin gyűrű fontos komponense. Az aktomiozin gyűrű biztosítja a háti záródás alatt a DME sejtek megnyúlását és az AS sejtek ritmikus kontrakcióját a vezető él sejtjeiben. Miozin II null mutánsok nyitott hát fenotípust mutatnak. A miozin II a hámban, de az AS-ban is fontos szerepet kap, ugyanis mindkét szövetben miozin II transzgént kifejeztetve menekíthető a mutáns fenotípus. A géneknek ebbe a csoportjába tartoznak még a coracle (cora), a canoe (cno) és a myospheroid (mys) gének is, melyek membránasszociált szerkezeti fehérjéket kódolnak és mutációik szintén nyitott hát fenotípust okoznak [38].

Bár a háti záródást irányító jelátviteli útvonalak számos elemét azonosították már, a pontos sejtbiológiai események, melyekre ezek hatnak, kevésbé ismertek. Tudjuk, hogy a háti záródás során a hámsejtekben a sejtvézelemek dinamikusan átrendeződnek, ami a háti záródás elején a hámsejtek polarizálódásával kezdődik. Ez molekuláris szinten a sejtvézelemek és a jelátviteli molekulák egyenetlen eloszlásában jelentkezik [39]. Az aktin sejtvázat érintő eseményekért a Rho (Ras homologous) családba tartozó kis molekulású GTP-ázok felelősek [14]. *Drosophilában* a Rho fehérjecs család mindhárom tagja – Rho, Rac, Cdc42 – részt vesz a háti záródásban, melyeknek a működése fokozott aktin polimerizációhoz vezet.

A háti záródás előtt a hámsejtek aktinváza a sejtkeg minden pontján egyenletes eloszlású. A záródás során azonban a DME sejtek amnioszerózával határos (dorzális) felszínén aktint és miozint halmoznak fel, ezáltal kialakul egy szupracelluláris aktomiozin gyűrű, ami a háti nyílást körülveszi. A gyűrű kialakulása a RhoA kis GTP-áz működéséhez köthető, ami a hatását több effektor fehérjéjén keresztül fejtik ki. Ezek közül a legfontosabb a Rho kináz (ROCK). A ROCK képes fokozni a Miozin II könnyű lánc foszforilációs szintjét, ami a Miozin II fokozott aktivitását eredményezi, így kialakul az aktomiozin gyűrű és a vezető él megmerevedik [40]. A RhoA hiányában, az embriók, akár funkcióvesztéses mutációt hordoznak, akár a RhoA domináns negatív formáját expresszálják, „nyitott hát” fenotípust mutatnak [41, 42]. Az aktomiozin gyűrű hatására a háti záródás frontja „kiegyenesedik”, ami elősegíti a cipzározódást. Ezen kívül a gyűrű semlegesíti a hámiban kialakuló feszültséget, hogy megelőzze a sebek, szakadások keletkezését [43]. Ha az aktin felhalmozódás vegyszeres kezelés hatására vagy az aktinregulátorok hibás működése miatt zavart szenved, akkor a hámlemezek mozgása lelassul és a vezető él sejtjeinek szerkezete is károsodik. Az aktomiozin gyűrű hiányában a dorzoventrális sejtmegegyesülés nem jön létre és az anterior/poszterior tengely is véletlenszerű lesz. Habár az aktomiozin gyűrű hiánya jelentősen befolyásolja a záródás sebességét, az embriók mégis képesek bezárni a háti nyílást, ugyanis az amnioszeróza által generált húzóerő működése önmagában elég ehhez a folyamathoz [41].

A „cipzározódás” fázisában a DME sejtek dorzális felszínén aktinalapú sejtnyúlványok – filopódiumok és lamellipódiumok – jelennek meg, melyek tubulint, miozint és aktint tartalmaznak [5, 7, 8].

A lamellipódiumok kialakulásában a Rac 1 kis GTP-áz játszik szerepet, hatására a sejtek elkezdenek vékony lemezszerű kitüremkedéseket, lamellipódiumokat képezni. Mindhárom *rac* génre (*Rac1*, *Rac2* and *Mtl*) mutáns embriókban az aktin nem halmozódik fel a vezető élben, továbbá filopódiumok és lamellipódiumok sem alakulnak ki [44]. A Rac1 domináns negatív

formájának expressziója a vezető élre jellemző sejtvázelrendeződés felbomlásához vezet, a tipikus sejtmgnyúlás a hámban eltűnik és a háti záródás sem megy végbe [45].

A Cdc42 a filopodiumok képzésében játszik szerepet. Cdc42 mutáns embriók a Rac és Rho mutánsoktól eltérő, ún. “bunched” szegmens háti záródás fenotípust mutatnak, ami a TGF β útvonal komponenseit érintő mutációkra jellemző. Az aktin felhalmozódás a vezető élben nem sérül, viszont a filopódiumok nem alakulnak ki. A filopódiumoknak a környezetüket érzékelő, letapogató szerepük van. Amikor a hámsejtek elég közel vannak egymáshoz a filopódiumok találkozhatnak és ha ezek megfelelő embrionális szegmentből érkeznek, akkor egyesülnek. Filopódiumok hiányában a szemben lévő hámsejtek nem ismerik fel egymást és nem a megfelelő sejt-sejt kapcsolatok alakulnak ki [41].

Bár az aktinváz szerepe a háti záródásban részletesen ismert, a sejtvááz másik komponensének, mikrotubulusváznak az elrendeződéséről és működéséről keveset tudunk. Ismert, hogy a záródást megelőzően a hámsejtekben a mikrotubulusok rendezetlenül, helyezkednek el. A háti záródás elején ez a rendezetlen mikrotubulusváz felbomlik és a MT-ok a sejt hossz tengelyével párhuzamosan stabil kötegekbe rendeződnek el. A MT-ok átrendeződése elsőként a DME sejtekben indul meg (6. ábra A) és később a laterálisabban elhelyezkedő hámsejtekre is kiterjed (6. ábra B). A MT kötegek stabilak, de az őket felépítő egyedi MT-ok dinamikus lebomlanak és újra polimerizálódnak. A dinamikus mikrotubulusok a sejtek dorzális felszínén belenőnek a lamellipódiumokba és a filopódiumokba (6. ábra C, D, E), ami arra utal, hogy a sejtnek ezeken a részein a két sejtvázelem szorosan együttműködik. A záródás befejeztével a rendezett MT kötegek lebomlanak és a hámsejtekben ismét rendezetlen MT eloszlás alakul ki.

6. ábra. A MT-váz szerkezete a háti záródás alatt. (A, B) élő embriókról készült felvételek mutatják a MT kötegek kialakulását tubulin-GFP-t kifejező hámban. (A) A háti záródás elején, a MT-ok először a DME sejtekben rendeződnek át. (B) 1 órával később a MT-ok a fennmaradó hámban is párhuzamos kötegekbe rendeződnek. (C) aktin-ECFP-t és (D) tubulin-GFP-t kifejező DME sejtek élő embriókban a háti záródás vége felé. (E) A MT-ok belenőnek a sejtnyúlványokba (szaggatott vonallal körbe rajzolt területen). Mérték 5 μ m [7].

A MT-ok működése különösen fontos a hámsejtekben és kritikus a háti záródás utolsó, cipzározódási lépéséhez. A MT-ok eltávolítása kolhicin kezelés hatására abnormalis háti záródáshoz vezet (7. ábra A), ahol a DME sejtek sejtnyúlványai csökevényesek (7. ábra B). A MT váz felépítésének és szerepének megértésében elért előrelépések ellenére számos kérdés vár még megválaszolásra. Nem ismerjük sem a mikrotubulusváz átrendeződését szabályozó molekulákat, sem azokat a mechanizmusokat, amikkel a mikrotubulusváz a sejtnyúlványok kialakulására hat.

7. ábra. A MT-ok működése a háti záródás alatt. (A) A MT-ok eltávolítása kolhicin kezelés hatására abnormalis dinamikájú háti záródáshoz vezet. (B) kolhicin kezelés hatására a DME sejtek sejtnyúlványai csökevényesek [7].

3. A Spektraplakin fehérjék

A sejtvázas dinamikus átrendeződése az élő szervezetek olyan alapjelensége, amely gyakorlatilag minden sejtre jellemző életének, differenciációjának valamely szakaszában. Hosszú időn keresztül az az elképzelés uralkodott, hogy a sejtvázas különböző összetevői egymástól függetlenül, de mégis együtt működve fejtik ki hatásukat. Ma már azt is tudjuk, hogy a sejtvázas komponensei fizikailag szoros kölcsönhatásokat, keresztkötéseket is kialakíthatnak egymással a sejt aktuális igényeitől, fejlődési állapotától függően. Ezeket a kölcsönhatásokat olyan fehérjék szabályozzák, amelyek egyidejűleg akár többféle sejtvázelemhez képesek kapcsolódni. Erre a feladatra specializálódott például a Spektraplakin fehérjék családja. A Spektraplakinok óriási, evolúciósan konzervált, multidomén szerkezetű fehérjék. A Spektraplakin fehérjék számos feladatot látnak el különböző típusú differenciált sejtekben, amit a moduláris fehérje domén-szerkezetük tesz lehetővé. Többek között részt vesznek a sejt polaritás kialakulásában, morfogenetikus és jelátviteli események, valamint a differenciálódás, migráció folyamatában is. Az OMIM-adatbázis (Online Mendelian Inheritance in Man) alapján mutációjuk szerepet játszik az epidermolysis bullosa simplex öröklődő betegség, valamint az örökletes szenzoros és autonóm neuropátiák kialakulásában. A spektraplakin mutációt hordozó élőlények számos fenotípust mutatnak és gyakran az egyedfejlődés korai szakaszában elpusztulnak [46-48].

3.1. A Spektraplakin fehérjék jelentősége

A Spektraplakin fehérjék kulcsfontosságúak minden olyan fejlődésbiológiai folyamatban, ahol a sejtvázas szabályozott átrendeződésére, stabilizálására vagy sejt polarizáció kialakulására van szükség. A spektraplakin fehérjék különböző típusú differenciált sejtekben más-más szerepet töltenek be, amit a moduláris protein domén szerkezetük tesz lehetővé. A spektraplakinok valamennyi sejtvázelemmel képesek kölcsönhatásba lépni, keresztkötni azokat vagy adhézions komplexekhez is kapcsolódhatnak [47, 49, 50]. A spektraplakin fehérjéket kódoló génekről nagyszámú, különböző, akár hét funkcionális doménnel rendelkező fehérje is képződhet, melyek a plakin, spektrin és Gas2-szerű fehérjecsaládok tulajdonságait ötvözik [51, 52]. (1) A plakinok (pl. plectin, desmoplakin, envoplakin, periplakin, epiplakin) olyan vázfehérjék, melyek a sejtvázas különböző komponenseit a sejtmembránhoz kapcsolják, valamint fontosak a mechanikai stressznek kitett szövetekben, mint a bőr vagy a szív [53]. (2) A spektrin

fehérjék (pl. α -/ β -spectrin, α -actinin, dystrophin és utrophin) evolúciósan konzervált aktin kötő vázfehérjék, melyek elsősorban a sejtkeregben találhatók meg, ahol citoplazmatikus fehérjéket kapcsolnak a sejtmembránhoz [54, 55]. (3) A Gas2-szerű fehérjék (Gas2, Gas2-like 1–3) kapcsolatot alakíthatnak ki a MT, vég-kötő fehérje és az F-aktin között is, hozzájárulva így a sejtvezeték dinamikus működéséhez, a sejtosztódáshoz vagy az egyedfejlődéshez [56-58].

Emlősökben két spektraplakin gén található: a Bpag1/Dystonin (bullous pemphigoid antigene1) és az MACF1 (microtubule-actin crosslinking factor1), melyet ACF7-nek (Actin Crosslinking Family 7) is nevezünk. Az *ecetmuslica* genomjában egyetlen spektraplakin gén, a *short stop* (*shot*) található, *Caenorhabditis elegans* genomjában pedig a *vab10* gén kódol Spektraplakin fehérjét [59].

A BPAG1e/dystonin a bőrben található meg. Fontos komponense a hemidesmoszómáknak a bazális hámrétegben, ahol mutációja a hám integritásának sérülését okozza, végső soron szakadásokat és hólyagosodást okoz a bőrben. Emberben ezek a tünetek az epidermolysis bullosa simplex öröklődő betegséghez köthetők [60]. A hosszabb izoforma (BPAG1b) funkcionális hiánya emberben és egérben egyaránt neuronális degenerációhoz vezethet [61-63]. A BPAG1b mutáns egerek dystonia musculorumban szenvednek, hirtelen rángatózó mozgásokat és rendellenes testtartást mutatnak [64, 65]. Megfigyelhető továbbá a MT hálózat felbomlása az axonokban [66]. A BPAG1b mutációja sejt szinten abban nyilvánul meg, hogy a MT-ok nem a polarizált aktin kötegek mentén nőnek és nem reagálnak a polarizált sejtek külső jelzéseire sem [67]. Az MACF1/ACF7 gén mutációja jelenleg nem köthető semmilyen megbetegedéshez, de a mutációt hordozó egerek az egyedfejlődés korai szakaszában, a gasztruláció alatt elpusztulnak. Számos korai fejlődésbiológiai folyamatban is részt vesznek a spektraplakin fehérjék. Többek között a fibroblasztok vagy a bőr őssejtek vándorlásában, de a szív és az agy fejlődésében is szerepük van [68-70].

Drosophilában a *shot* gén működése kulcsfontosságú a hám épségének megőrzéséhez, az ísejtek megfelelő tapadásához az izomsejtekhez, de az axonok és dendritek növekedéséhez is esszenciális [71]. Szubcelluláris szinten a Spektraplakin fehérjéknek szerepük van a megfelelő sejt polarizáció kialakításában, a MT-ok stabilizálásában, az aktin polimerizációban és azok kötegekbe szerveződésében [47, 67, 72]. A *shot* mutációt hordozó *muslica* embriók különböző fenotípusokat mutatnak. Megfigyelhető a szárny hólyagosodása, az ísejtek szakadása, a hám integritásának általános sérülése, a tracheaágak fúziójának zavara. A MT hálózat szerveződése sérül a petefészkekben, ezen kívül axon növekedési hibákat, a dendritek hosszának csökkenését és a sejtadhéziós molekulák hibás lokalizációját is leírták *shot* mutáns axonokban [49, 71, 73-75].

3.2. A Spektraplakin fehérjék szerkezete

A legtöbb Spektraplakin fehérje N-terminális végén megtalálható egy konzervált szekvencia motívum, mely lehetővé teszi számukra, hogy közvetlenül kapcsolódjanak az aktin vázhoz (8. ábra A). Az F-aktin-kötő domén (ABD) két kalponin homológ, CH1 és CH2 régióból áll. A CH1 régió önmagában is képes megkötni az F-aktint, viszont CH2 régió jelenlétében az ABD F-aktin kötő affinitása megnő [47, 49].

Valamennyi Spektraplakin izoforma tartalmaz egy plakin domént, mely fehérje-fehérje kölcsönhatásokat biztosít, illetve a sejtváz különböző komponenseit a plazmamembránhoz kapcsolja (8. ábra A) [76]. A BPAG1e esetén például a plakin domén juttatja a fehérjét a hemideszmoszómákhoz, ahol az membrán kapcsolt fehérjékhez (például a $\beta 4$ integrinhez) kötődik [77]. A plakin domén egy sorozat spectrin ismétlődést tartalmaz, mely közé egy SH3 domén is beékelődhet [46, 78].

A nagyobb Spektraplakin izoformák középső régiójában található az α -hélikális spectrin ismétlődésekből álló (spectrin/ dystrophin repeat rod) domén, mely biztosítja a fehérjék rugalmasságát a mechanikai erőkkel szemben és dimerizáció kialakításában is részt vehet (8. ábra A), továbbá elválasztja az N- és C-terminálison lévő funkcionális doméneket. A spectrin ismétlődések hossza az optimális fehérje funkció szempontjából kritikus, mivel pl. a disztrofínból már néhány ismétlődés törlése is az izomsorvadás enyhe formáját eredményezi [46, 52, 79].

A C-terminálison három funkcionális domén található (8. ábra A), melyek közül az első a kalcium-függő, két EF-hand motívumot tartalmazó domén [80]. Az EF-hand motívum a leggyakoribb ismert Ca^{2+} kötő elem, ennek ellenére viszonylag keveset tudunk az EF-hand funkciójáról a Spektraplakin fehérjékben [81]. Az első megfigyelés az MACF1 fehérjéhez köthető, ugyanis ezek a fehérjék Ca^{2+} stimulus hatására megváltoztatják a sejten belüli eloszlásukat [47].

Közvetlenül az EF-hand domén után található a mikrotubulus-kötő Gas2 (growth arrest-specific 2) /GAR domén, mely eszenciális a mikrotubulusok stabilizálásához. Transzfektált sejtekben a BPAG1, MACF, GAS2, GAR22 és Shot fehérjékből származó izolált GAR domének kolokalizálnak a mikrotubulusokkal [49, 50, 82]. Azok az izoformák, melyek nem tartalmazzák a Gas2/GAR domént általában nem lépnek kölcsönhatásba MT-okkal [46]. Az MACF1 fehérjében jelen van egy másik MT-kötő és -stabilizáló domén is, egy glicin-szerin-arginin gazdag (GSR) domén, amely a Gas2-vel közösen képes a MT-ok kötegekbe rendeződését indukálni [50].

A Spektraplakin fehérjék C-terminálisán található a CTD (C-terminális domén), mellyel a mikrotubulusok növekvő, „+” végeihez kapcsolódnak egy EB1-kötő SxIP szekvencia-motívumon keresztül (8. ábra A) [83].

A változatos protein domének alternatív splicing és szövet specifikus promóter használat során szabadon kombinálódhatnak egymással, így változatos hosszúságú és funkciójú fehérjék képződhetnek. *Drosophilában* a fehérjék változékonyságát 43 kódoló exon alternatív splicingja, illetve négy alternatív transzkripció starthely (P1-4) biztosítja. Ezek a starthelyek négy különböző N-terminálissal rendelkező fehérjének a szövetspecifikus kifejeződését biztosítják, melyeket gyakran Shot-LA,-LB,-LC,-LD-nek is nevezünk (8. ábra B) [84].

8. ábra. A Shot fehérje homológjai, funkcionális doménjei és legjelentősebb izoformái. (A) A plakin, spektrin és Gas2-szerű fehérjecsaládok tipikus tagjai összehasonlítva a Spektraplakin fehérjék legjelentősebb izoformáival: az egér BPAG1 legrövidebb (e) és leghosszabb (b) izoformái, a humán MACF1 leghosszabb (b) izoformája és a leghosszabb Shot-RE és Shot-RH izoformák. (B) A Shot gén szerkezete. Balról jobbra: Két kalponin homológia domén (CH1 és CH2) alkotja az aktin kötő domént (ABD). A plakin domén, α -hélikális spektrin ismétlődésekből álló (spektrin/ dystrophin repeat rod) domén, EF-hand motívum, Gas2 (growth arrest-specific 2) /GAR domén, CTD (C-terminális domén) mely egy EBI-kötő: SxIP szekvencia-motívumot tartalmaz. FlyBase adatbázis alapján a shot locus 78 kb nagyságú (genomi régió: 13,864,237–13,942,110), 50C6-11 2R kromoszómális hely. A különböző Shot izoformák (Shot-R/P A-Z, ahol R a transzkriptumokat, P a proteineket jelöli) négy különböző transzkripciós starthelyről íródhatnak át (P1-4), ami négy N-terminális izoforma képződését teszi lehetővé (lásd balra Shot-LA-D). Splicing következtében pedig további 39 különböző exon és 4 nem kódoló exon képződhet [84].

III. CÉLKITŰZÉSEK

Elsődleges célunk a háti záródásban résztvevő, MT-kötő gének azonosítása *in vivo* video mikroszkópiával kombinált RNS interferencián (RNSi) alapuló funkcióvesztéses szűrés segítségével.

RNSi-án alapuló módszer alkalmazásával a *Drosophila* számos, MT-okhoz kapcsolódó fehérjét egyenként kiiktatjuk és az így kialakult fenotípusos változásokat három hierarchikus szerveződési szinten vizsgáljuk: nagyfelbontású *in vivo* konfokális mikroszkópia segítségével leírjuk az egyedi MT-ok növekedési és lebomlási dinamikájában bekövetkezett változásokat, élő embriók filmezésével megvizsgáljuk a MT-váz átrendeződését és a MT-kötegek elhelyezkedését, nagysebességű automatizált mikroszkóp alkalmazásával tanulmányozzuk a háti nyílás záródását.

Végző célunk, hogy egy ígéretes jelölt gén részletes sejtbiológiai vizsgálatán keresztül megmutassuk, hogy egy alapvető fejlődési folyamathoz hogyan járul hozzá a sejtvázelemek együttműködése.

IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

1. *Drosophila melanogaster* törzsek

A kísérletekben használt *Drosophila* törzseket szabványos, kukorica-élesztő alapú táptalajon tartottuk. A keresztezéseket 25 °C-on végeztük el. Vad típusként Oregon R törzset használtunk. A háti záródás körvonalát az EGFP-t kifejező ZASP52^{ZCL423} protein-csapda vonal segítségével tettük láthatóvá [31, 85]. *Pnr-GAL4* (bloomingtoni törzsközpont (BT) # 25758) és *en-GAL4* (BT # 30564) driverek segítségével indukáltuk a kiválasztott transzgének expresszióját. Az aktint UAS-actin-EGFP [86], vagy UAS-mCherry-Moesin [9] segítségével, a MT végeket pedig az UASP-Eb1-EGFP [7] felhasználásával tettük láthatóvá. A FRAP kísérletekhez az Ubi-β-Tubulin-EGFP [87] törzset használtuk fel.

A menekítési kísérleteket a következő *shot* transzgenikus törzsekkel végeztük el (9. ábra): teljes hosszúságú fehérje (UAS-Shot-L(A)-GFP), UAS-Shot-L(A)ΔEFhand-GFP (ΔEFhand-GFP, hiányzik a Ca²⁺ ionokat kötő EF-hand motívum), UAS-Shot-L(A)ΔGas2-GFP (ΔGas2-GFP, hiányzik a Gas2 MT-kötő domén), UAS-Shot-L(C)-GFP (ΔCH1-GFP, hiányzik a CH1 aktin kötő domén). Ezek a konstrukciók a FlyBase adatbázis alapján nyilvántartott *shot-RE* mRNS izoformából készültek [49]. További Shot-L(A)-GFP-ből levezetett transzgének: UAS-Shot-L(C)ΔGas2-GFP (ΔCH1ΔGas2-GFP, hiányoznak a CH1 aktinkötő és Gas2 MT-kötő domének) [49], UAS-Shot-L(A)-ΔCtail-GFP (ΔC-tail-GFP, hiányzik az EB1 kötő motívum), UAS-Shot-C-tail-GFP (C-tail-GFP csak a C-tail domént tartalmazza), Shot-L(A)-3MtLS*-GFP (három célzott mutációt tartalmaz, mely a fehérje EB1-Shot interakcióért felelős motívumait érinti) [88], UAS-Shot-EFhand-Gas2-Ctail-GFP (EGC-GFP, MT kölcsönhatásért felelős – Ef-hand, Gas2 és C-tail – doméneket tartalmazza) [89].

A fenotípusok jellemzéséhez a *shot*^{sf20} null allélt (kyotoi törzsközpont # 101311), a *shot*^{kakP1} (BT # 10522) és *shot*^{ΔEGC} izoformaspecifikus mutáns allélokat, valamint a *shot* gént érintő *Df(2R)BSC383* (BT # 24407) deléciót használtuk fel. A *shot*^{kakP1} allél egy P-elem inszerciót tartalmaz az első két alternatív transzkripció start hely után, de a 3. és a 4. start helyek előtt, így olyan fehérjék termelődnek, melyeknek hiányzik a CH1 aktin kötő doménjük, ezért nem képesek aktint kötni (9. ábra). A *shot*^{ΔEGC} allélt újjonnan hoztuk létre a laboratóriumunkban (lásd 2. fejezet).

Mutáns allélok

Név	Típus	Izoforma	Sematikus ábra	Referencia
Shot ^{KakP1}	P-elem inszerció	Shot-RC		1
Shot ^{AEGC}	CRISPR/Cas9	Shot-RE		2

Transzgenikus konstrukciók

UAS konstruktt	Hossz [deletált régió]	Izoforma	Sematikus ábra	Referencia
UAS-Shot-L(A)-GFP	5201 aa [n.a.]	shot-RE		3
UAS-Shot-ΔCH1-GFP	5160 aa [n.a.]	shot-RC		3
UAS-Shot-L(A)-ΔEF-hand-GFP	5063 aa [4711-4849]	shot-RE		3
UAS-Shot-L(A)-ΔC-tail-GFP	4918 aa [4919-5201]	shot-RE		6
UAS-Shot-L(A)-ΔGas2-GFP	5155 aa [4859-4905]	shot-RE		3
UAS-Shot-ΔCH1-ΔGas2-GFP	4859-4905 aa [n.a.]	shot-RC		4
UAS-Shot-L(A)-3MtLS*-GFP	5201 aa [4966-9,5077, 5141-4 cseréje AAAA-ra]	shot-RE		6
UAS-C-tail-GFP	4918-5201 aa [n.a.]	shot-RE		6
UAS-EGC-GFP	4780-5201 aa [n.a.]	shot-RE		7

9. ábra. A kísérletekhez felhasznált izoforma specifikus shot mutáns allélok és GFP-vel jelölt csonkolt doménszerkezetű UAS transzgenikus konstrukciók. A sematikus ábrák a 8. ábra nyomán készültek. A csillag a mutáns szekvenciát jelöli. Referenciák: 1- [74], 2- [90], 3- [49], 4- [91], 5- [92], 6- [88], 7- [89].

2. *Shot*^{ΔEGC} mutáns allél létrehozása CRISPR/Cas9 módszerrel

Kiméra (chimeric, Chi) RNS-ek klónozása pU6-BbsI-chiRNA vektorba

A *shot* gén EF-hand, Gas2, C-terminális (CT) doménjeit kódoló genomi szakaszra szekvencia-specifikus, 20 nukleotid hosszúságú oligonukleotidokat terveztünk a Crispr Optimal Target Finder programmal (10. ábra). A kiválasztott szakaszok specificitását a BLAST analízissel ellenőriztük.

Az oligonukleotidokat foszforiláltuk: 2 µl 10 µM-os oligó, 2 µl 10 mM-os ATP, 2 µl 10x T4 PNK pufferA, 1 µl 10 U/µl T4 polinukleotid kináz, 13 µl UP (ultra pure) víztartalmú reakcióelegyet 1 órán át 37 °C-os vízfürdőben tartottuk. Majd a kináz enzimet hőinaktiváltuk úgy, hogy a reakcióelegyet 10 percig 75°C-os vízfürdőbe raktuk.

Az oligonukleotidok szensz és antiszensz szálát hibridizáltuk: 10-10 µl 10 µM-os oligonukleotidot 80 µl annealing pufferben (10 mM Tris pH 7.5, 0,1 mM NaCl, 1 mM EDTA) hibridizáltuk úgy, hogy a reakcióelegyet 95 °C-ra melegítettük, majd lassan 25 °C-ra hűtöttük vissza.

A hibridizált oligonukleotidokat pU6-BbsI-chiRNA expressziós vektorba klónoztuk: A pU6-BbsI-chiRNA plazmidot BbsI restrikciós enzimmel emésztettük, majd Fast AP (alkalikus foszfatáz) enzimmel defoszforiláltuk. A hibridizált oligonukleotidokat emésztett, defoszforilált pU6-BbsI-chiRNA plazmidba ligáltuk. A ligálást 2 órán keresztül 18 °C-on végeztük. A ligálási reakcióelegyet 6 µl 0,1 µM-os oligót, 2 µl 10x-es T4 DNS ligáz puffert, 1 µl 20 ng/µl pU6-BbsI chiRNA plazmid DNS-t, 1 µl 5 U/µl T4-DNS-ligáz enzimet és 10-µl UP vizet tartalmazott. A hibridizált oligonukleotidokat tartalmazó pU6 plazmidokat 2T1 *E. Coli* kompetens sejtekbe transzformáltuk. A transzformáláshoz 20 µl ligátumot adtunk 200-µl sejthez. A sejteket 30 percig jégen inkubáltuk, majd 42 °C-os vízfürdőben 1 perc 15 másodperces hősokkot alkalmaztunk. A hősokk után a kompetens sejteket 2 percre jégre raktuk. A sejtekhez 800 µl LB tápoldatot adtunk, majd 1 órán át 37 °C-on inkubáltuk azokat. A sejteket 100 µg/ml koncentrációjú ampicillint tartalmazó LB lemezekre szélesztettük, és 16 órán át 37 °C-on növesztettük.

— ccaagatacttgttttaaatcccc — CTTTAAGGGATCTCGTGACCAGGGACTCAATGCCCGC
 AAGGGAAG — TCGTATCACGCCCACACGTGACACGCCCAGAGAGATCGCCTGCCGCACTATGGCC
 CCCGATTCTCGCCAAG — CACCTCGGGACCGGAAGTGAATTCCGTTCCGCCACGCGCGAAGCTTCT
 GTGGACCAAGTGGCGCGATGTCTGGATGCTCTCATGGGAGCGCCAGCGGCTGCTTAACGATCATCTTC
 TGTATCTGAAGGATGTGGAGCGTGCCCGCAACTTCAGCTGGGACGATTGGCGCAAGCGC — TTCTT
 CAAGTACATGAACCACAAGAAGTCGCGCTTGACGGATCTGTTCCGGAAAATGGATAAGGATAACAATG
 GCATGATTCCGCGCGATGTCTTCATCGATGGCATACTCAATACGA — AATTCGATACATCTGGCTT
 GGAAATGAAGGCTGTAGCCGATTTGTTTCGATCGCAATGGCGAAGGCCTCATCGACTGGCAAGAGTTCA
 TTGCTGCCCTTCGTCCCGATTGGCAAGAGCGTAAGCCAGCCAATGATTTCGACAAAATACACGATGAG
 GTCAAACGTCTGGTCATGCTGTGTACCTGCCGACAGAAGTTCCGTGTGTTCCAAGTTGGCGAGGGCAA
 GTACAGA — TTTGGAGACTCCAGAAAAGTGCCTCGTTCGTATCCTTCGCAGCACTGTTATGGTG
 CGCGTGGGTGGCGGTTGGGTTGCCCTGGATGAATTCCTGCAGAAGAACGATCCTTGTTCGCG — ccc
 agatactgtgcatcggtttgc — CCAAAGGACGCACTAACATAGAGCTACGCGAGCAATTCATATTG
 GCCGATGGCGTCTCGCAGAGCATGGCCGCATTCACGCCCAGACGTTCCACGCCAAATGCGGCCGCCAC
 TGCTCTCTCTCACCCTATGCCACAATGGCGGCAGCTCCAAGTTGCCCCCATATATGAGTGGACAGG
 GTCCCATCATCAAG — GTACGCGAGCGCTCCGTCCGCTCGATTCCCATGTTCACGACCGTCGCGCTC
 CTCACCTTTTCGGCCAGCACTCCCGACTCCCTGAGCGACAACGAGGGTAGCCATGGAGGACCTTCCGGCC
 GGTACACACCACGCAAGGTACCTACACGAGCACGCGCACGGGTCTCACGCCAGGAGGCTCTCGTGCC
 GGCTCCAAGCCCAACTCGCGCCCGCTCAGCAGACAGGGATCAAAGCCGCCATCGCGACATGGCTCCAC
 GCTGTCGCTAGATAGCACGG — ACGATCACACGCCCTCACGCATTCCGCAACGCAAGCCTTCAACG
 GGCAGCACAGCCAGCGGTACCACTCCGCGTCCGGCGCGACTTTTCGGTGACCACCACCAGCACTCCCGG
 CAGTCGTCTCAATGGCACCAGCACCATTACCCGCAAAACCGCCTCCGGATCGGCTAGTCCGGCGCCCA
 CAAG — CAACGGAGGCATGAGTAGATCATCCAGTATACCAGCACTAACAGGCTTCGGCTTCAAACC
 AATTAG — GCGAAACATCAGCGGTAGCTCAACGCCCTCCGGGATGCAAACGCCGCGAAAGAGCTCA
 GCGGAGCCACATTCAGCTCCACAATGAGACGCACTTCGCGGGGAACACACCGACGAGAGAAGCGTGA
 GCCATTCCGGCTATAG

1. ccaagatacttgttttaaatcccc

szensz: CTTTCGGGGATTTAAACAAGTATCT

antiszensz: AAACAGATACTTGTTTAAATCCCC

2. cccagatactgtgcatcggtttgc

szensz: CTTTCGAAACGATGCACAGTATCT

antiszensz: AAACAGATACTGTGCATCGTTTGC

10. ábra. A shot gén EF-hand (zöld), Gas2 (kék), CT (barna) doménjeit kódoló genomi szakasz. ChiRNS-ek szekvenciái (piros), szensz szál, amiben benne van a PAM szekvencia 3' végén (türkisz), antiszensz szál, amiben a PAM szekvencia reverz komplementere van az 5' végén (kék), A nyílak a hasítás helyét mutatják. A szekvenciát megszakító fekete vonalak további nukleotidokat jelölnek.

Plazmid DNS tisztítás

A telepeket egyenként, 0,1 mg/ml koncentrációjú ampicillint tartalmú folyékony LB tápoldatba oltottuk és 37 °C-on inkubáltuk egy éjszakán keresztül. A plazmid DNS-eket QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) felhasználásával tisztítottunk. A sejteket centrifugálással ülepítettük, majd felszuszpenzáltuk 250 µl P1 pufferben (reszuszpénziós puffer) és 250 µl P2 pufferrel (lízis puffer) lizáltuk. A lizált sejtekből a fehérjéket 350 µl N3 pufferrel (neutralizáló puffer) csaptuk ki, amit 10 perces centrifugálással ülepítettünk. A felülúszót egy perces centrifugálással DNS-kötő oszlopon folyattuk át. Az oszlopot PE pufferrel (mosó puffer) mostuk át, majd a maradék mosópuffert egy perces centrifugálással

távolítottuk el. A plazmid DNS-t az oszlopról 65 °C-os, 50- μ l EB pufferrel (eluáló puffer) oldottuk le. A mintákból 1-1 μ l-t megfuttattunk 1%-os agaróz gélen, majd a plazmid DNS-ek szekvenciáját T7 primerek felhasználásával határoztuk meg a Microsynth Austria GmbH szekvenáló labor közreműködésével.

A transzgenikus muslicák előállításához a megfelelő szekvenciájú DNS-t tartalmazó telepeket 3 ml 0,1 mg/ml koncentrációjú ampicillint tartalmú folyékony LB tápoldatba oltottuk le és 37 °C-on inkubáltuk 8 órán keresztül. A felnőtt baktérium kultúrából 100 μ l-t átmértünk 9 ml 0,1 mg/ml koncentrációjú ampicillint tartalmú folyékony LB tápoldatba és 37 °C-on inkubáltuk egy éjszakán keresztül. A plazmid DNS-t QIAGEN Plasmid Mini Kit felhasználásával tisztítottuk. A sejteket centrifugálással üleptítettük, majd felszuszpenzáltuk 400 μ l P1 pufferben (reszuszenziós puffer) majd 400 μ l P2 pufferben (lízis puffer) 5 percig lizáltuk. A lizált sejtekből a fehérjét 400 μ l N3 pufferrel (neutralizáló puffer) csaptuk ki. A kicsapódott fehérjét 4 °C-on 15 perces centrifugálással üleptítettük. A QIAGEN oszlopot 1 ml QBT pufferrel ekvilibráltuk, majd a felülúszót ráértük az oszlopra. Az oszlopot 2 x 2 ml QC oldattal mostuk át. A plazmid DNS-t 800 μ l QF oldattal eluáltuk, majd 56 μ l izopropanollal kicsaptuk. A kicsapott DNS-t 4 °C-on 30 perces centrifugálással üleptítettük, majd 1 ml 70%-os etanollal mostuk. A csapadékot 3 percig centrifugáltuk, majd 96%-os etanollal mostuk. A leüleptített csapadékot vákuumban szárítottuk, majd 10 μ l injektáló pufferben (5 mM KCl, 0,1 mM foszfát puffer pH:6,8) oldottuk fel.

A chiRNS-eket hordozó pU6 plazmid injektálása

W¹¹¹⁸, *vasa*-Cas9 genotípusú *Drosophila* törzset 30 percig petéztettük, majd összegyűjtöttük a lerakott petéket és 1 percig 50%-os hipóval dekorionizáltuk azokat. A petéket ragasztóval (heptánban oldott kétoldalú ragasztószalag, 3M) bevont fedőlemezen a háti oldallal lefelé fordítva egyenként sorba rendeztünk és Halocarbon7S (VWR) olajjal lefedtük. Injektáló pufferben (5 mM KCl, 0,1 mM Na₃PO₄, pH: 6,8) oldott 250 μ g/ μ l koncentrációjú kiméra RNS-eket tartalmazó oldatot Transjector 5246 (Eppendorf) injektort használva üvegapillárisal az embrió poszterior részébe injektáltuk. Egy-egy oldattal átlagosan 100 embriót injektáltunk.

A chiRNS-ek tesztelése egy embrió PCR-rel

Az injektált embriókat heptánnal lemostuk egy petricsészébe majd egyenként eppendorf csőbe raktuk át azokat. Az embriókat 20 μ l proteináz K-t tartalmazó oldatban szétnyomtuk (900 u/ μ l proteináz K, 10 mM Tris pH 8,2; 1 mM EDTA, 25 mM NaCl) és 37 °C-os vízfürdőben 40 percig inkubáltuk. A proteináz K hatását 5 percig 95 °C-os vízfürdőben inaktiváltuk. PCR

reakciót 15 µl térfogatban végeztük (+ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ puffer, 2,5 mM MgCl_2 , 1 mM dNTP mix, 28 ng/µl DNS, 0,01 U/µl Taq DNS polimeráz) a következő programmal: 95 °C 2 p, 34 x (95 °C 30 mp, 58 °C 1 perc 30 mp, 72 °C 1 p), 72°C 4 percig. A keletkezett termékek méretét 1 %-os agaróz gélen ellenőriztük. A felhasznált primerek szekvenciái: forward: aacgtcttgcacacctatctct, reverz: gagtagatggtacaacccttgg.

Deléciót hordozó *shot* mutáns törzs létrehozása

A sikeres injektálás után a deléció izolálásához a *shot* lókuszt lefedő, nagyméretű *Df(2R)BC383* deficiencia felhasználásával komplementációs analízist végeztünk el (10. ábra).

11. ábra. *Shot^{AEGC}* mutáns allél izolálása. A komplementációs analízis keresztezési sémája. A +* a mutagenizált 2. kromoszómát jelöli.

3. Gécscsendesítés *Drosophila* embriókban

Gécscsendesítő kettős szálú RNS-ek előállítása

A csendesítésre kiválasztott génekre (1. táblázat) homológ kettős szálú (ds) RNS-eket terveztünk. A gének szekvenciáit a FlyBase adatbázisból (<http://flybase.org>) töltöttük le. Az esetleges off-target hatást a dsCheck online szoftverrel ellenőriztük. A kiválasztott szekvenciákhoz pontosan illeszkedő, komplementer primereket terveztünk a Primer3 program segítségével. A primereket PCR reakcióban használtuk fel. A PCR során szigorúan ügyeltünk a megfelelő paraméterek optimalizálására. 18-20 nukleotid hosszúságú primereket terveztünk, melyek GC:AT arányát 50-60 % közé állítottuk be. Olvadási hőmérsékletnek optimálisan 58 °C-ot állítottunk be. Továbbá feltételként szabtuk meg, hogy egymás után maximum 3 egyforma nukleotid következzen. A termékek hossza 400-700 nukleotid közé esett. A primerek 5' vége elé T7 promóter szekvenciát (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') illesztettünk.

A PCR reakciót 100 µl térfogatban végeztük (+ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ puffer, 2,5 mM MgCl_2 , 1 mM dNTP mix, 28 ng/µl DNS, 0,01 U/µl Taq DNS polimeráz) a következő programmal: 94 °C-on 1 p, 24 x (55-60 °C-on 1 p, 72 °C 1 p). A PCR reakciók termékeit „QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN)” segítségével tisztítottuk meg, a fragmentek méretét 1%-os agaróz gélen ellenőriztük, koncentrációjukat Nanodrop műszerrel mértük.

Az *in vitro* transzkripcióval az amplifikált DNS szakaszokról RNS-t készítettünk Promega T7 RiboMAX™ készlet segítségével. 2 x puffert (RiboMAX Express T7), 1 µg PCR termékeket és T7 enzim mixet mértünk össze és 1 óráig 37 °C-on inkubáltuk. 1 óra után a mintákhoz mértünk 1 µl DNáz oldatot és tovább inkubáltuk 37 °C-on 30 percig.

Az RNS molekulák kinyeréséhez RNS kicsapást végeztünk. 0,1 tf 3M Na-acetát oldatot és 1 tf izopropanolt adtunk a mintákhoz és 10 percig jégen hagytuk. 4 °C-on 13000 rpm-el 15 percig centrifugáltuk, a felülúszót óvatosan leszívtuk, majd -20 °C-os 70%-os etanolban mostuk, majd újra 4°C-on 13000 rpm-el 10 percig centrifugáltuk és a felülúszót leszívtuk. A termékeket vákuumban beszárítottuk (1 perc) és az RNS molekulákat RNáz mentes vízben oldottuk fel. Az RNS-ek méretét 1,5%-os agaróz gélen ellenőriztük, koncentrációjukat Nanodrop műszerrel mértük. Az 1 µg/µl koncentrációra hígított dsRNS oldatokat -20°C-on tároltuk felhasználásig.

Végül az RNS-eket duplaszálú RNS-ké (dsRNS) hibridizáltuk össze úgy, hogy a PCR készülékben 60 °C-ra melegítettük a mintákat és fokozatosan hűtöttük le. 1 %-os agaróz gélben elválasztva TAE puffer felhasználásával ellenőriztük a dsRNS-ek jelenlétét és lemértük a koncentrációjukat.

	gének	primerek 5'-3' irányban		ds RNS koncentráció µg/µl
		forward	reverz	
1.	Msp	ACGGAACGCGAAATAACC	AACGGTTGTCGTGGTCAG	4,2
2.	clip190	GGGTGTTGTCCTTGACGA	GGGTGTTGTCCTTGACGA	3,9
3.	Eb1	GATCGCCACGTGATTAAATAG	ACGAGTCTGTGAACCTTTCAA	2,9
4.	Apc	TTTCGTCGTGGAGATTGG	ATGCAGAAGCGGAAGTCA	2,9
5.	Apc2	AGAGACGATCCGCTCAGAC	TCCCTTCTCGGAGATTGAG	4,1
6.	shot	AACCCACAGCTCCCAGAT	TGGCAACAAAGCTGATCC	5,42
7.	Glued	TTGCCCAACATCTTCTGG	GTGGACGTGTTGCCTGAT	4,03
8.	Dhc64C	CAAGTTGCGACACCTTCTG	GTGGCTTGGATTACCGAAC	3,74
9.	Klp10A	GGAATCGACTGGCTTTCC	GGGCAAGTGCATCACAGT	3,91
10.	Klp59C	GAATGCTGACCACATCCTG	TGCGTGGTAAGGAACTGC	2,69
11.	CG13366	ATCCAGCACTTCGCTCAG	ACTTGCAAACCCAGCTGAC	3,49
12.	katanin60	CTCGTTGGTGTTCGATGTG	CAAGGCCATTGAGAGAACC	3,09
13.	Lis-1	TCTGGGCTCAAATGGCTA	TCGTTATGCTGGCACGAT	2,60
14.	Patronin	ATTTCCGGGAGATTTGACAC	GATAGGTGAGATTGCCGCT	4,36
15.	Spastin	TCCTCTGTGCACAAACAGAAC	CATTCAACCGTTGGAGA	6,03
16.	chb	TCCACGCTAAGGACATGG	CTGCGGCTGAGTGTGATAG	4,10
17.	ssp2	TGAACGGATGAACAACTCG	TCCGCTGTAGTAGCACTCG	3,49

1. táblázat A kiválasztott génszakaszokra specifikus primerek szekvenciái és a dsRNS oldatok koncentrációja.

Drosophila embriók injektálása

A *ZASP52^{ZCL0432}* genotípusú *Drosophila* törzset szén és agar tartalmú táptalajon petéztettük 30 percig. A 0-30 perces embriókat összegyűjtöttük és 1 percig 50%-os hipóval (NaOCl) dekontamináltuk azokat. Az embriókat a háti oldallal lefelé fordítva egyenként sorba rendeztünk és ragasztóval (heptánban oldott kétoldalú ragasztószalag, 3 M) bevont tárgylemezre rögzítettük, majd Halocarbon7S (VWR) olajjal lefedtük. A dsRNS-eket injektáló pufferben (5 mM KCl, 0,1 mM Na₃PO₄, pH: 6,8) oldottuk fel. 1 µg/µl töménységű kettős szálú RNS-oldatot a Transjector 5246 (Eppendorf) injektort használva üvegapillárisal a szinciciális blasztoderma stádiumú embriók laterális részébe injektáltuk. A kapillárisokat Flaming/Brown P-97 (Sutter Instrument Co.) micropipetta-húzóval állítottuk elő. A kísérlet végrehajtásához speciális tárgylemeztartót terveztünk és gyártattunk le, mely alkalmas volt 14 tárgylemez egyidejű tárolására.

4. *In vivo* mikroszkópia

A dsRNS-sel injektált embriókat 7 óráig 25 °C-on tartottuk, majd a háti záródásról automatizált *in vivo* fluoreszcens video mikroszkópiával 12 órás filmeket készítettünk egy programozható Olympus CellR spinning disc kvázi-konfokális fluoreszcens mikroszkóppal. A filmezéshez 10X objektívet és F-View II kamerát (Soft Imaging System, Münster) használtunk. A mikroszkóp és a kamera beállításait a nagyszámú embrió egyidejű filmezéséhez optimalizáltuk. Az egyes embriók pozícióját kézzel állítottuk be. A filmeket tiff formátumban tároltuk és a felvételeket az Image J szoftver segítségével jelenítettük meg. A dsRNS-sel kezelt embriók publikációs minőségű képeit Leica TCS SP5 konfokális vagy VisiScope spinning disc konfokális mikroszkóppal készítettük el.

A mutáns háti záródás számszerűsítéséhez az EGFP-t kifejező *ZASP52^{ZCL0432}* protein-csapda vonalat használtuk *shot^{sf20}/shot^{sf20}*, *shot^{kakP1}/Df(2R)BSC383*, *shot^{ΔEGC}/Df(2R)BSC383* és *shot^{kakP1}/shot^{ΔEGC}* genotípusú embriókban.

A háti záródás fenotípus menekítéséhez különböző Shot fehérje változatokat fejeztettünk ki *shot^{sf20}*, UAS-mCherry–Moesin/ Df(2R)BSC33; *pnr*-Gal4/+ mutáns háttéren. A filmeket Leica TCS SP5 konfokális fluoreszcens mikroszkóppal rögzítettük. A háti nyílás hosszúságát és szélességét az Image J programmal. A statisztikai tesztek a GraphPad Prism szoftverrel végeztük.

A sejtnyúlványok megjelenítéséhez *en-Gal4/ aktin-EGFP* és *en-Gal4, Df(2R)BSC383/ shot^{sf20}*, UAS-aktin-EGFP és *en-Gal4, Df(2R)BSC383/ shot^{kakP1}*, UAS-aktin-EGFP valamint *en-Gal4, Df(2R)BSC383/ shot^{ΔEGC}*, UAS-aktin-EGFP genotípusú embriókat használtunk. A felvételeket VisiScope spinning disc konfokális mikroszkóppal készítettük el.

A MT-ok növekedési ütemének és növekedés irányának mérésére *en-Gal4/ EB1-EGFP* és *en-Gal4, Df(2R)BSC383/ shot^{sf20}*, UAS-EB1-EGFP genotípusú embriókat használtunk fel és a felvételeket Olympus CellR mikroszkóppal készítettük el. A kvantitatív paramétereket az ImageJ szoftver segítségével mértük, az adatokat a GraphPad Prism programmal ábráztuk.

5. Immunhisztokémia

Az embriókat 50%-os hipóval dekorionizáltuk, majd 4%-os formaldehidet tartalmazó PBS (137 mM NaCl; 2,68 mM KCl; 10,14 mM Na₂HPO₄; 1,76 mM KH₂PO₄) heptán 1:1 arányú elegyében 30 percig fixáltuk. Ezután az embriókat egy sötét színű selyem anyagra pipettáztuk ki és 2 oldalú ragasztóra szedtük fel, aminek a másik oldalát egy petricsészébe ragasztottuk, majd az embriókat PBS-sel fedtük le. Egy tű segítségével mikroszkóp alatt megsértettük az embriót borító vitellin membránt. Az eljárás során a kézzel devitellinizált embriók kiúsztak a PBS-be. Az embriókat az összegyűjtést követően 3-szor 20 percig mostuk PBT-vel (PBS, 0,1% Triton-X), majd minimum 1 órán át PBT-N-nel (2% BSA-t, 5% FCS-t tartalmazó PBT oldat) blokkoltuk, majd 4°C-on egy éjszakán át elsődleges ellenanyaggal inkubáltuk. A nem kötődött elsődleges ellenanyagot PBT-ben történő háromszori mosással távolítottuk el (3 x 20 perc). A megfelelő, fluoreszcensen jelölt másodlagos ellenanyagokkal (Invitrogene, 1: 600, PBT-N-ben) és egyéb festékekkel egy órán át inkubáluk a mintákat. Az embriókat ismét PBT-ben mostuk háromszor, végül Fluoromount-G mounting mediumban fedtük le.

Elsődleges ellenanyag <i>hígítás, forrás</i>	Másodlagos ellenanyag <i>(hígítás: 1:600)</i>	Egyéb festék <i>(hígítás: 1:20)</i>
<i>anti-Tubulin (egér)</i> <i>1:10, DSHB</i>	<i>anti-egér Alexa 647 (számár)</i>	Rodaminnal jelölt falloidin Alexa 594
<i>anti-EGFP (nyúl)</i> <i>1:500, Life Technologies</i>	<i>anti-nyúl Alexa 488 (csirke)</i>	
<i>anti-Acetilált-tubulin (egér)</i> <i>1:1000, Sigma</i>	<i>anti-egér Alexa 647 (számár)</i>	
<i>anti-Fasciclin III (egér)</i> <i>1:20, DSHB</i>	<i>anti-egér Alexa 647 (számár)</i>	
<i>anti-Shot-spectrin-repeatek</i> <i>(tengeri malac)</i> <i>1:1000, ajándék</i>	<i>anti-tengeri malac Alexa 546</i> <i>(számár)</i>	

2. táblázat. Immunhisztokémiai jelöléshez használt elsődleges, másodlagos ellenanyagok és egyéb festékek listája.

6. Hámzáródási esszék

Torzáródási esszé

A *shot* génre specifikus dsRNS-t (UAS-RNSi) a háti közép vonalra specifikus *pnr*-GAL4 meghajtó elem felhasználásával fejeztettük ki vad és *shot^{sf20} null* mutáns torban.

Sebzáródási esszé

SGMCA-t (Moesin aktinkötő fehérjével fúzionált GFP) kifejező vad és *shot^{sf20} null* mutáns törzseket szén és agar tartalmú táptalajon petéztettük 30 percig, majd hagytuk az embriókat, hogy a 16. stádiumig fejlődjenek. Az embriókat összegyűjtöttük és háti oldallal felfelé fordítva egyenként sorba rendeztünk és ragasztóval (heptánban oldott kétoldalú ragasztószalag, 3M) bevont tárgylemezre rögzítettük azokat, majd Halocarbon7S (VWR) olajjal lefedtük. A sebzés körülményeit az intézetünkben elérhető XYclone Laser rendszerrel állítottuk be. A rendszer 300 mW teljesítményű, 1480 nm-es infravörös lézerfényt bocsát ki, amivel az embriókon 30 µm sugarú sebeket ejtettünk. A sebzáródást in vivo videomikroszkópiával követtük nyomon.

7. FRAP (Fluorescent recovery after photobleaching)

A FRAP kísérleteket FRAP programmal ellátott Leica SP5 konfokális mikroszkóppal hajtottuk végre. EGFP-jelölt β -tubulint fejeztettünk ki vad és *shot* mutáns hámokban. A DME sejtek vezető éléhez közel, 2 μm széles területet jelöltünk ki. Annak érdekében, hogy meghatározzuk a kezdeti fluoreszcens intenzitást a hámsejtekben 2 másodpercenként 3 felvételt készítettünk. Ezt követően nagy intenzitású 488nm-es lézersugárral világítottuk meg a kijelölt területet 10 másodpercig. Ezután sorozatfelvételt készítettünk 2 másodpercenként 5 percen keresztül. Meghatároztuk a vizsgált terület átlagintenzitásának változását, majd az adatokat normalizáltuk a fotokioltság előtti kezdeti intenzitásra, illetve a sorozatfelvétel közben bekövetkező enyhe mértékű fakulásra. Az így nyert adatokra easyFRAP program segítségével exponenciális egyenletet illesztettünk, és meghatároztuk a fluoreszcencia visszatérés kinetikai paramétereit. A grafikonokat GraphPad Prism program segítségével ábrázoltuk.

V. EREDMÉNYEK

1. RNS interferencián alapuló funkcióvesztéses szűrés

Tizenhét gént választottunk ki, melyek irodalmi adatok alapján a sejtvézelemek működését befolyásolják (Anyagok és módszerek, 1. táblázat). A géneket RNS interferencián alapuló funkcióvesztéses vizsgálatnak vetettük alá. A kiválasztott génekre specifikus dsRNS-eket szintetizáltunk *in vitro* transzkripcióval, majd a dsRNS-eket a szinciciális blasztoderma stádiumban lévő embriókba mikroinjektáltuk. A géneket egyedileg, szekvencia-specifikusan csendesítettünk és *in vivo* fluoreszcens videó mikroszkópiával követtük a háti záródás folyamatát. A géncsökkentés hatásának vizsgálatához a záródó hám első sejt sorában/ a DME sejtekben EGFP-t kifejező ZASP52^{ZCL0432} protein-csapda vonalat használtuk. A GFP-vel jelölt Zasp52 fehérje a DME sejtek AS felé eső felszínén halmozódik fel, így a háti nyílás körvonala kirajzolódik és alakjának időbeli változása könnyen nyomon követhető. Vad típusú embriókban, miközben a hámlemezek még egymás felé közelednek, a nyílás mindkét végén már zajlik a hámlemezek összekapcsolódása, a „cipzározódás”. A záródás alatt a háti nyílás így mindvégig megtartja jellegzetes lencse alakját (12. ábra A). A tizenhét vizsgált gén közül csupán egynek, a *Drosophila* Spektraplakint kódoló *short stop* (*shot*)-nak a csendesítése okozott abnormalis háti záródást. A csendesített embriókban a háti nyílás bezáródott, azonban a záródás menete abnormalis volt: a háti nyílás alakja a vad típusra jellemző lencse alak helyett rendellenesen keskeny lett (12. ábra B). A *shot*^{sf20} null embriókban a *shot* gén csendesítésével megegyező abnormalis háti záródást tapasztaltunk (12. ábra C).

12. ábra. A háti záródás folyamata (A) vad, (B) *shot* csendesített és (C) *shot*^{sf20} mutáns *Drosophila* embriókban. A háti nyílás körvonalát a DME sejtekben EGFP-t kifejező ZASP52^{ZCL0432} protein-csapda vonal segítségével tettük láthatóvá. Mérték: 50 μ m.

A háti nyílás alakjának kvantitatív leírásához a háti nyílás szélesség (W)/ hosszúság (H) arányát használtuk fel. Mivel a mutáns fenotípus a záródás félidejénél volt a legszembetűnőbb, a vizsgálathoz a nyílás 30 μm -es hosszúságnak megfelelő záródási állapotot választottuk ki. A záródásnak ebben a szakaszában a W/H arány a *shot* dsRNS-sel kezelt és a *shot*^{sf20} mutáns embriókban is jelentősen megnőtt, ami arra utal, hogy a *shot* gén funkciója szükséges a háti nyílás normális dinamikájú bezárásához (13. ábra A). Az abnormalis dinamikájú záródás kvantitatív elemzésére a háti záródás matematikai modelljét használtuk fel (bővebben Irodalmi áttekintés)[13]. Meghatároztuk a háti nyílás szélességének (W) és hosszúságának (H) változását a háti záródás folyamán, majd kiszámoltuk a záródó háms háti középvonal irányába történő elmozdulásának sebességét (v). Az így nyert adatok alapján az empirikus modellt felhasználva meghatároztuk, hogy a záródás sebessége milyen mértékben függ a cipzározódástól (f_z).

13. ábra. A háti nyílás alakjának kvantitatív leírása. (A) A cipzározódás hatékonysága vad, *shot* RNSi és *shot*^{sf20} mutáns *Drosophila* embriókban. A grafikonon a háti nyílás W/H aránya látható 30 μm -es hosszúságnak megfelelő záródási állapotban. (B, C) A háti záródás kinetikája egy-egy reprezentatív vad (piros), homozigóta *shot* mutáns (zöld) és RNSi-val csendesített *shot* (kék) embriónál. (B) „Hosszúság” az egymás felé elmozduló hámrétegek távolságát (kettős nyíl jelöli) jelöli. (C) „Szélesség” a cipzározódó végek távolságát (kettős nyíl jelöli). (D) A szemben lévő hámlamezek egymás felé közeledésének sebességét mutatja. (E) A cipzározódás hozzájárulását mutatja a záródáshoz vad és *shot* mutáns embriókban. (F) A teljes hosszúságú Shot fehérje menekíti a *shot* mutáns cipzározódási hibát. Átlag±szórás, t-próba, *** $p < 0.001$.

A *shot* gén mutációja nem befolyásolja a záródás sebességét, ugyanis a *shot* csendesített és mutáns embriókban a szemben lévő hámlemezek a vad típusú embriókéhoz hasonló sebességgel közeledtek a háti középvonal felé (13. ábra B, D). Vad típusú embriókban $v=11,63\pm1,7$ nm/sec sebességgel közeledtek a hámlemezek egymás felé, míg a *shot* mutánsban $12,6\pm1$ nm/sec-os sebességet határoztunk meg (13. ábra D). A cipzározás hozzájárulása a záródáshoz a vad típusban az irodalmi adatoknak megfelelő ($f_z=25,85\pm8,2$ %) értékeknek adódott. *Shot* mutánsokban a cipzározódás viszont lelassult ($f_z=9,06\pm4,92$ %), ami arra utal, hogy a *shot* gén a hámlemezek összekapcsolódásában játszik szerepet (13. ábra E).

Menekítési kísérlettel igazoltuk, hogy ez a fenotípus valóban a *shot* gén működésének hiányához köthető. Teljes hosszúságú fehérjét (Shot-L(A)–GFP) fejeztettünk ki *shot^{sf20}* null mutáns háttérén a hám-specifikus *pnr*-Gal4 driver segítségével. Ez a fehérjeváltozat képes volt menekíteni a cipzározódási hibát (13. ábra F).

Következő lépésként a *shot* gén funkcionális konzerváltságát vizsgáltuk meg különböző hámzáródási folyamatok között. Ehhez a vizsgálathoz az embrionális háti záródással analóg, a normális egyedfejlődés részeként előforduló záródási folyamatban, a felnőtt tor záródása során csendesítettük a *shot* gént. A *shot* génre specifikus dsRNS-t a háti középvonalra specifikus *pnr*-GAL4 meghajtó elem felhasználásával fejeztettük ki [93]. A torzáródás a báb metamorfózisa alatt zajlik, melynek során a két imaginális szárnydiszkusz egymás felé mozog és a hát középvonalán összenöve hozza létre a tor egységes kutikuláját [94]. A *shot* gén szövetspecifikus csendesítése megakadályozta a szárnydiszkuszok fúzióját, ami a felnőtt állatok torán egy jellegzetes bemélyedés kialakulását eredményezte a középvonal mentén (14. ábra A). A *shot* gén szerepét a mesterségesen létrejött hámhiányok gyógyulásakor sebzáródási esszében vizsgáltuk tovább. Ehhez sikeresen optimalizáltuk a sebzés körülményeit az intézetünkben elérhető XYclone Laser rendszerrel vad típusú embriókon. A kísérlet során Moesin aktinkötő fehérjével fuzionált GFP-t (SGMCA) fejeztettünk ki vad és *shot^{sf20}* null mutáns embriókban és 30 μ m sugarú sebeket ejtettünk a hámon, majd *in vivo* videomikroszkópiával követtük nyomon a sebzáródást. A *shot^{sf20}* mutáns embriókban a seb bezáródott, azonban jelentősen lassabban a vad típushoz képest (14. ábra B).

14. ábra. A shot gén funkcionális konzerváltsága különböző hámozódási folyamatok között. (A) A shot gén szövetspecifikus csendesítése torzáródási hibát mutat összehasonlítva egy vad típusú, tökéletesen záródott torral. (B) Shot^{sf20} null mutáns hámon ejtett 30 μm sugarú sebek jelentősen lassabban záródnak be a vad típushoz képest. Mérték 10 μm.

2. *Shot*^{ΔEGC} mutáns allél létrehozása CRISPR/Cas9 módszerrel

Mivel a *shot*^{sf20} null mutánsok háti záródásának hibái a MT-depolimerizáló droggal kezelt embriók abnormalis záródására emlékeztetnek, ezért azt valószínűsítettük, hogy a Shot fehérje a MT-váz szabályozásán keresztül hat ebben a folyamatban. Ennek vizsgálatára olyan funkcióvesztéses *shot* mutáns allél előállítását terveztük CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) genomszerkesztési módszer segítségével, amelyből deletáljuk a *shot* gén MT-kötésért felelős doménjeit.

A CRISPR-Cas9 rendszer fő komponense a Cas9 endonukleáz, amely komplexet képez az ún. egyszálú irányító (single guide, sg) vagy kiméra (chimeric, chi) RNS-molekulával. A kiméra RNS két elemből tevődik össze: egy kb. 20 nukleotid nagyságú, a cél DNS-szakasszal komplementer crRNS-molekulából (CRISPR-RNS), illetve az azzal kölcsönható váz transzaktiváló crRNS-molekulából (tracrRNS), ami elősegíti a Cas9 fehérje célba juttatását és a DNS szálak hasítását [95]. A célszekvencia felismerése és hasítása szekvencia komplementaritást igényel a crRNS és a DNS között, és egy PAM (protospacer-adjacent motif) motívumot a célszekvencia 3' végén [96].

Számos CRISPR/Cas9 alapú genomszerkesztési módszer közül mi azt választottuk, amelyben a Cas9 ivarvonal-specifikus kifejeződését egy genomba inszertált transzgenen a *vasa* gén promotere hajtja meg [97]. A rendszer másik elemét, a chiRNS-eket pedig a *shot* génnel komplementer specifikusan terveztük meg. A *shot* gén Gas2 és EF-hand doménjeit körülvevő genomi régióra két szekvenciaspecifikus, 20 nukleotid hosszúságú oligonukleotidot terveztünk (lásd Anyagok és módszerek). A megszintetizált oligonukleotidokat expressziós vektorba klónoztuk, amit baktériumból tisztítottk, és szekvenálással ellenőriztük a chiRNS-t kódoló oligonukleotidok sikeres beépülését a vektorba.

A delécia előállításához két különböző chiRNS-t kifejező plazmidot injektáltunk *vasa*-Cas9 embriókba. Mivel ilyen esetben a Cas9 két helyen hoz létre a DNS-en kettős szálú törést, a két hasítási hely közötti nagyobb DNS szakasz deletálódik (15. ábra). A kikelt hímeket (G0) w⁺; SM6b/Sco nőstényekkel kereszteztük, majd a hímekben egylegyes PCR-rel vizsgáltuk a delécia létrejöttét. Hét tesztelt G0 hím közül három esetben sikerült kimutatni, hogy hordozzák a várt méretű deléciós allélt. Ezek a G0 hímek azonban mozaikosak, testüknek csak azok a sejtjei hordozzák a mutáns allélt, amelyek elődeiben a delécia kialakult. Továbbörökökíthető deléciós allél izolálásához arra van szükség, hogy a delécia az ivarvonal sejtjeiben jöjjön létre. A három pozitív hím utódaival ezért komplementációs analízist hajtottunk végre a *shot* lókuszt

lefedő, nagyméretű *Df(2R)BC383* deficiencia felhasználásával. Ez a 184 kbp-os deficiencia teljesen eltávolítja a *shot* gént, így nem komplementálja a *shot* null mutáns allélek okozta letális fenotípust. Feltételeztük, hogy a *Df(2R)BC383* deficiencia felett a *shot* gén MT-kötő aktivitásának elvesztése szintén letális. A három G0 hím 230 utódját komplementációs tesztben megvizsgálva három esetben nem tapasztaltuk a letális fenotípus komplementációját. Ezeket a legyeket felhasználva törzseket alapítottunk, és az újonnan izolált *shot* allélt *shot^{ΔEGC}*-nek neveztük el. Az újonnan létrehozott, stabilan balanszírozott *shot* mutáns törzsekben nem jelentek meg homozigóta mutáns állatok, ami azt bizonyítja, hogy a *shot* MT-kötő aktivitása esszenciális a muslica életképessége szempontjából. A kapott deléció mérete az elvárt 1895 bázispár volt, amit szekvenálással is igazoltunk. A deléció magába foglalta a Gas2 és az EF-hand doméneket kódoló genomi szakaszt (15. ábra). A deléció 6 exont (758 nukleotid) távolított el és a következő négy aminosav után egy frame-shift mutációt okozott a *shot* gén transzkriptumában.

A *shot* gén és környezete

2R:13,843,609..13,950,338

A Shot-RE transzkriptum

A *Shot^{ΔEGC}*

15. ábra. A *shot^{ΔEGC}* allél létrehozásának vázlatos ábrája. A teljes hosszúságú Shot fehérje és a MT-kötésért felelős EF-hand GAS2 doméneket kódoló exonok kinagyítva a fekete téglalapban. Piros függőleges vonallal az oligonukleotidok elhelyezkedése a génen. Zöld színnel az EF-hand kódoló rész, kékkkel a Gas2 kódoló rész látható.

A csonkolt fehérje kifejeződését immunfestéssel igazoltuk a *shot^{ΔEGC}* mutáns embriókban a spectrin repeat-ek ellen termelt poliklonális ellenanyaggal (16. ábra D).

16. ábra. Az endogén *Shot* fehérje expressziója különböző mutáns DME sejtekben. (A-D) DME sejtek immunfluoreszcens jelölése vad (A), *shot^{sf20}* (B), *shot^{kakP1}* (C) és *shot^{ΔEGC}* (D) mutáns embriókban. A spectrin repeat-ek ellen termelt *Shot* ellenanyag felismeri a különböző *Shot* izoformákat *shot^{ΔEGC}* és *shot^{kakP1}* mutáns hámban (zöld). A *Shot* fehérje nem mutatható ki *shot^{sf20}* null mutáns hámban. A *FasciclinIII* festés kijelöli a hámsejtek körvonalát (piros). Mérték 10μm.

3. A Shot fehérje aktin-MT keresztkötő aktivitása révén szabályozza a cipzározódást

A Shot fehérje MT-kötő aktivitásának szerepét a háti záródásban a laborunkban létrehozott *shot*^{ΔEGC} mutáns allél, valamint egy sor csonkolt doménszerkezetű transzgén segítségével tártuk fel. A *shot*^{ΔEGC} embriókban a *shot* null mutáns embriókhoz hasonlóan a cipzározódás lassú volt, ami arra utal, hogy a shot MT-kötő aktivitása szükséges a normális dinamikájú cipzározódáshoz (17. ábra A, B). A Shot fehérje MT-kötő aktivitását három funkcionális doménje, az EF-hand, a Gas2 és a CTD biztosítja. Ezen funkcionális domének szerepének pontosabb megértéséhez olyan transzsgéneket fejeztettünk ki *shot* mutáns hámban, melyekből 1-1 funkcionális domén hiányzott. A ShotΔEF-hand-GFP és a ShotΔC-tail-GFP transzgenikus konstrukciók kifejeztetése menekíti a cipzározódási hibát, a ShotΔGas2-GFP transzgén kifejeztetése viszont nem menekítette a mutáns fenotípust (17. ábra C). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a Gas2 MT-kötő domén szükséges a normális dinamikájú háti záródáshoz.

A *shot*^{kakP1} mutáns allél és a ShotΔCH1-GFP transzgén felhasználásával vizsgáltuk meg, hogy szükség van-e a Shot fehérje aktin-kötő aktivitására a háti záródás alatt. A *shot*^{kakP1} allérről aktin kötésre képtelen fehérjék képződnek és a *shot*^{kakP1} mutáns embriókban a null mutáns embriókhoz hasonlóan a cipzározódás lassú volt (17. ábra A, B). Ezzel összhangban, az aktinkötő domént nem tartalmazó ShotΔCH1-GFP transzgén nem volt képes menekíteni a cipzározódási hibát (17. ábra C). Ezek az eredmények azt bizonyítják, hogy a *shot* aktinkötő képessége is nélkülözhetetlen a cipzározódáshoz.

A mutánsanalízis és a menekítési kísérletek együttesen azt jelzik, hogy a *Drosophila* Shot fehérje kölcsönhatása a Gas2 doménnel keresztül a MT-vázsal, valamint kötődése az aktin hálózathoz egyaránt esszenciális a cipzározódáshoz. Ezzel az eredménnyel összhangban van a ShotΔCH1ΔGas2-GFP fehérjével végrehajtott menekítési kísérlet. Ez a csonkolt fehérjeváltozat sem aktinkötő, sem MT-kötő képességgel nem rendelkezik és nem volt képes menekíteni a *shot* gén hiányát.

A vad dinamikájú cipzározódáshoz a CH1 és a Gas2 domének kölcsönhatása az aktinnal és MT-okkal történhet egymástól függetlenül. Elképzelhető azonban, hogy a Shot molekula aktin- és MT-kötő doménjeivel egyidejűleg kapcsolódik mindkét sejtvézelemhez, és keresztköti őket. Ezért megvizsgáltuk a *shot*^{ΔEGC}/*shot*^{kakP1} heteroallélikus kombinációt hordozó embriók háti záródását. Ezekben az embriókban a Shot fehérje vagy a CH1 aktinkötő domént vagy a C-

terminális régiót tartalmazza, de sohasem képződik olyan fehérje, amelynek egyidejűleg lenne aktinkötő és MT-kötő aktivitása is. A *shot^{ΔECG}/shot^{kakP1}* genotípusú embriók a null mutánszal megegyező cipzározódási hibát mutatnak, ami azt jelzi, hogy a Shot aktinkötő CH1, és a MT-kötő Gas2 doménjére egy fehérjemolekulán belül van szükség a normális dinamikájú háti záródáshoz (17. ábra A, B).

Összefoglalva, eredményeink arra utalnak, hogy a Shot fehérje az aktin- és a MT-váz keresztkötésével irányítja a háti záródás cipzározódási fázisát.

17. ábra. A Shot MT-kötő és aktinkötő aktivitása együttesen szükséges a cipzározódáshoz. (A) Cipzározódási fenotípus $shot^{\Delta 120}$, $shot^{kakP1}$, $shot^{\Delta ECG}$ és $shot^{\Delta ECG}/shot^{kakP1}$ mutáns embriókban 30 μ m-es szélességnek megfelelő záródási állapotban. Mérték 50 μ m. (B) A háti nyílás W/H aránya különböző *shot* mutánsokban. (C) A háti nyílás W/H aránya különböző transzgénekkel végzett menekítési kísérletek során. A csonkolt doménszerkezetű Shot fehérjeváltozatokat $shot^{\Delta 120}$ nul mutáns háttéren, *pnr-Gal4* driver segítségével fejeztettük ki. Átlag $\pm$ szórás, ANOVA teszt, *** $p < 0.001$. (A felvételek megtekinthetők: <http://movie.biologists.com/video/10.1242/jcs.193003/video-1>)

4. A Shot fehérje a hámsejtek MT-vázának elrendeződését szabályozza

A *shot*^{sf20} mutáns záródási fenotípusa megegyezik a MT-ok teljes hiányakor jelentkező fenotípussal, ami arra utal, hogy a *shot* gén funkciója szükséges a hámsejtek MT-ainak működéséhez. A *shot* mutáns hámsejtek MT-vázának elrendeződését immunfestéssel vizsgáltuk meg. A háti záródás alatt a mutáns embriók MT-ai a hámsejtekben a vad típushoz hasonlóan párhuzamos kötegekbe rendeződnek, a DME sejtek sejtnyúlványaiba benövő dinamikus MT-ok azonban abnormálisak voltak. A vad típusra jellemző rövid, egyenes MT-ok helyett a mutáns hámsejtek sejtnyúlványaiban rendkívül hosszú, meghajlott MT-ok jelentek meg (18. ábra A, B).

18. ábra. Rendellenes MT-ok a *shot*^{sf20} mutáns DME sejtekben. (A, B) Vad típusú és *shot*^{sf20} mutáns embriók immunfluoreszcens jelölése a háti záródás alatt. A tubulin festés a MT-okat mutatja (piros), az aktint phalloidinnel tettük láthatóvá (zöld). A fehér nyilak a rendellenesen hosszú és meghajlott MT-okat jelölik a vezető élben. Mérték 10 μm. (C) A túlnyúló MT-ok kvantitatív elemzése vad és *shot*^{sf20} mutáns Tubulin–EGFP-t kifejező DME sejtekben. Átlag±szórás, t-próba, *** $p < 0.001$.

A részletesebb elemzés érdekében, Tubulin–EGFP-t kifejező hámsejteket filmeztünk le, így közvetlenül nyomon tudtuk követni a MT-váz felépítését. A DME sejtek sejttestjében a MT-ok párhuzamos kötegekben helyezkedtek el, azonban a *shot* mutánsban a kötegek gyakran hirtelen meghajlottak. (19. ábra B, B'). A *shot* mutáns DME sejtek vezető élében találtunk sejtnyúlványokba belépő rendellenes, meghajlott MT-okat, továbbá a vad típustól eltérően, a *shot* mutáns DME sejtek laterális felszínéről kinyúló abnormális MT-okat is megfigyeltünk. (19. ábra C, C'). A túlnyúló MT fenotípus kvantitatív elemzése kimutatta, hogy a mutáns DME sejtek nyúlványaiban a MT-ok hosszabbra nőnek (6.8 ± 3.5 μm, $n = 109$), mint a vad típusú sejtekben (3.8 ± 1.1 μm, $n = 108$) (19. ábra C). Ezek a megfigyelések összefoglalva arra utalnak, hogy a Shot fehérje a MT-váz szabályozásán keresztül hat a háti záródásra.

19. ábra. Abnormális MT-ok $shot^{sf20}$ mutáns DME sejtekben. (A, B, C) Tubulin-EGFP-t kifejező DME sejtek vad típusú és $shot^{sf20}$ mutáns embriókban. A fehér nyilak a sejtnyúlványokba belenövő MT-okat mutatják. A bekeretezett régiók (sárga) kinagyítva mutatják a meggömbült MT-okat a sejttestben (B') és a hámsejtek laterális felszínéről kinyúló MT-okat (C'). Mérték 5 μ m. (A felvételek megtekinthetők: <http://movie.biologists.com/video/10.1242/jcs.193003/video-2>)

5. A Shot fehérje a MT-okat stabilizálja

A mutáns hámsejtekben megfigyelhető MT-túlnöveses fenotípus hátterében a MT-ok megváltozott dinamikája állhat. Gyorsabb polimerizációs sebesség vagy az alacsonyabb katasztrófa frekvencia is olyan MT-okhoz vezethet, melyek miután elérték a sejtkérget tovább nőnek és túlnyúlnak a sejtkérgen vagy visszahajlanak. A MT stabilitását az α -tubulin C-terminális acetilációját megjelenítve tanulmányoztuk, mely főleg a hosszú életidejű, stabil MT-on található meg. A korábbi megfigyelésekkel összhangban az acetilált tubulin a stabil, párhuzamos kötegekbe rendeződött MT-okon jelenik meg a vad DME sejtek sejtestjeiben és ugyanezt a mintázatot figyeltük meg *shot^{sf20}* mutánsban is (20. ábra). A rendellenes MT-okat viszont nem tudtuk kimutatni anti-acetil-tubulin ellenanyaggal, vagyis a Shot fehérje a dinamikus MT-okat szabályozza.

20. ábra. Vad típusú és *shot^{sf20}* mutáns embriók immun-fluoreszcens jelölése a háti záródás alatt. Az acetil-tubulin ellenanyaggal a stabilizált MT-okat jelöltük meg (piros), az aktint phalloidinnel tettük láthatóvá (zöld). A *shot^{sf20}* mutánsban a rendellenes MT-okat nem tudtuk kimutatni anti acetil-tubulin ellenanyaggal, vagyis a Shot fehérje a dinamikus MT-okat szabályozza. Mérték: 10 μ m.

A MT-ok dinamikus tulajdonságait FRAP analízissel vizsgáltuk tovább. Tubulin–EGFP-t fejeztettünk ki vad és *shot* mutáns hámiban, majd a vezető élhez közel, 2 μ m széles területet nagy intenzitású 488 nm-es lézersugárral világítottunk meg, így kifakítottuk a területen belül található EGFP- β -tubulin molekulák fluoreszcenciáját. Ezt követően sorozatfelvételt készítettünk a kifakított területről (21. ábra A). A fakított EGFP- β -Tubulin molekulákat tartalmazó MT-ok lebomlanak, míg a nem fakított EGFP- β -Tubulin molekulák új MT-okba épülnek be, amik benőnek a fakított területre, így a vizsgált területen ismét fluoreszcensen jelölt MT-ok figyelhetők meg. A mérés információt ad a fluoreszcens jel visszatérésének sebességéről ($t_{1/2}$), melyet a kívülről érkező nem fakított tubulin molekulák beépülése eredményez a MT-okba, ezeknek a molekuláknak a hányadáról (mobilis frakció) (21. ábra B–D), valamint a

kijelölt területen stabilan megtalálható molekulákról (immobilis frakció). A vad és a mutáns sejtekben a fluoreszcens jel visszatérése nem volt teljes mértékű, nem érte el a kezdeti fluoreszcencia jel intenzitását, ami a fakított területen belül stabilan megtalálható immobilis molekulák okoztak. A vad és *shot* mutáns hámiban viszont hasonló mobilis frakciót mértünk (21. ábra C). Ez alátámasztja eddigi eredményeinket, miszerint a Shot fehérje nem befolyásolja a már stabilizált MT-okat, ellenben a dinamikus MT-okra van hatással. A mutáns sejtekben a fluoreszcens jel visszatérésének félideje ($t_{1/2}$) $17,6 \pm 3,4$ másodpercre csökkent összehasonlítva a vad sejtekkel, ahol $40,5 \pm 12,1$ másodpercet határoztunk meg. Eredményeink megerősítik a feltételezésünket, miszerint a mutáns sejtekben az EGFP-tubulin gyorsabban cserélődik ki a MT-ok és a citoszol között (21. ábra D). A *shot* mutáns sejtekben a MT-ok tehát dinamikusabbak, ami arra utal, hogy a Shot fehérje a MT-ok dinamikus tulajdonságainak szabályozásán keresztül hat a DME sejtek MT- vázának elrendeződésére.

21. ábra. A Shot fehérje a dinamikus MT-okat szabályozza a DME sejtekben. (A) Sorozatfelvétel a tubulin-EGFP-t kifejező hámsejtek fluoreszcenciájának kioltása előtt és utána. A körülhatárolt területet (fehér keret) nagy intenzitású 488nm-es lézersugárral világítottunk meg. Mérték 5 μ m. (B) A tubulin-EGFP fluoreszcencia jel visszatérésének görbéje vad (zöld, $n=9$) és *shot*^{sf20} mutáns (fekete, $n=7$) DME sejtekben. (C, D) Grafikonok a fluoreszcencia jel visszatérésének sebességét ($t_{1/2}$), és a Tubulin–EGFP molekulák mobilis hányadát (mobilis frakció) mutatják vad és *shot*^{sf20} mutáns sejtekben. Shot^{sf20} mutáns sejtekben a $t_{1/2}$ lecsökkent, míg a Tubulin–EGFP mobilis frakciója jelentős különbséget nem mutatott.

A Tubulin-EGFP FRAP kísérletben tapasztalt gyorsabb kicserélődését okozhatja a mikrotubulusok megváltozott “+” vég dinamikája, például a polimerizáció sebessége vagy annak időtartama. Megvizsgáltuk a Shot fehérje funkcióját a MT-ok növekedésének szabályozásában úgy, hogy fluoreszcensen megjelölt EB1-GFP markerfehérjét követtünk nyomon *in vivo* filmezéssel. Az EB1 fehérje a MT-ok növekvő “+” végéhez kötődik és így lehetővé válik a MT-ok növekedésének közvetlen mérése.

22. ábra. A Shot fehérje a dinamikus MT-okat szabályozza a DME sejtekben. (A, B) Grafikonok a MT növekedési sebességét és a MT-ok növekedésének időtartamát mutatják vad és shot^{sf20} mutáns sejtekben. A mutáns hámsejtekben a MT növekedési sebessége jelentősen megnőtt ($24,8 \pm 4,6 \mu\text{m/min}$, $n=55$) a vadhoz képest ($17,9 \pm 3,5 \mu\text{m/min}$, $n=56$), a MT-ok növekedésének időtartama változatlan. Átlag $\pm$ szórás, *t*-próba, *** $p < 0.001$, ns – nem szignifikáns a különbség. (C) EB1-GFP-t kifejező vad és shot^{sf20} mutáns hámsejteken 10 egymást követő kép egyesítve mutatja az egyedi MT-ok útját (11 sec). (D) Kördiagram a MT-ok növekedési irányáról EB1-GFP-t kifejező vad ($n=181$, 4 sejt, 2 embrió) és shot^{sf20} mutáns DME sejtekben ($n=269$, 4 sejt, 2 embrió). (A felvételek megtekinthetők: <http://movie.biologists.com/video/10.1242/jcs.193003/video-4>)

A mutáns hámsejtekben a MT-ok növekedési sebessége jelentősen megnőtt ($24,8 \pm 4,6$ $\mu\text{m}/\text{min}$) a vad sejtekhez képest ($17,9 \pm 3,5$ $\mu\text{m}/\text{min}$). Ez az eredmény szintén azt támasztja alá, hogy a Shot fehérje a MT-ok dinamikáját szabályozza és azon keresztül hat a háti záródásra (22. ábra A). A MT-ok növekedésének időtartama a mutáns és a vad sejtekben nem mutatott jelentős különbséget, ami viszont arra utal, hogy a MT-ok katasztrófa frekvenciájára már nincs hatással a Shot fehérje (22. ábra B). Korábbi tanulmányok már kimutatták, hogy az ACF7 képes a MT-ok növekvő „+” végeit az aktin kötegek mentén vezetni és ezáltal meghatározni az egyedi MT-ok növekedési irányát [67]. Az EB1–GFP markerfehérjét *in vivo* filmezéssel nyomon követve a MT-ok növekedési iránya is jól jellemezhető. A vad és *shot* mutáns sejtek sejtestjeiben a legtöbb MT párhuzamos kötegekbe rendeződött (22. ábra C), és a MT-ok növekedési irányában sem találtunk szignifikáns különbséget (22. ábra D). Ezek az eredmények azt jelzik, hogy a Shot fehérje nem szükséges a MT-ok növekedési irányának szabályozásához az aktin kötegek mentén a háti záródás alatt. Megfigyelések összefoglalva arra utalnak, hogy a Shot fehérje a DME sejtekben lévő dinamikus MT-ok stabilizálásán keresztül hat a MT váz kialakulására a háti záródás során.

6. A Shot fehérje aktin-MT keresztkötő aktivitása szükséges a MT-ok stabilizálásához

Annak érdekében, hogy jobban megértsük a Shot fehérje miként stabilizálja a MT-okat a háti záródás alatt, részletes szerkezet-funkció analízist végeztünk el. Immunfestéssel vizsgáltuk meg a MT váz elrendeződését izoforma-specifikus *shot* mutáns hámsejtekben, az eredményeket pedig a teljes hosszúságú, illetve csunkolt doménszerkezetű GFP jelölt fehérjékkel elvégzett menekítési kísérletekkel egészítettük ki. A menekítési kísérleteket minden esetben *shot*^{sf20} null mutáns háttéren *en*-Gal4 driver segítségével végeztük el. Mivel az *en*-Gal4 a hámiban négy sejt szélességű sávokban fejezte ki a Shot fehérje különböző változatait, ez a kísérleti elrendezés lehetővé tette, hogy a mutáns és a menekített fenotípusú sejteket ugyanabban az embrióban hasonlítsuk össze (23. ábra).

23. ábra. GFP-jelölt *Shot* fehérjeváltozatokat kifejező *shot*^{sf20} mutáns embriók immunhisztokémiai jelölése. (A) Menekítő, (B) nem menekítő fehérjeváltozat kifejeződése négy sejt szélességű sávokban (zöld) az *en*-Gal4 driver segítségével. A tubulin festés a MT-okat mutatja (piros), az aktint phalloidinnal tettük láthatóvá (szürke). Fehér nyilak a rendellenes MT-okat mutatják.

A Shot fehérje MT-kötő aktivitása

MT-kötő funkció hiányában, azaz a *shot^{ΔEGC}* mutánsokban, nem meglepő módon, túlnyúló MT-fenotípust figyeltük meg (24. ábra B). A DME sejtek sejtnyúlványaiba benövő dinamikus MT-ok abnormálisak voltak. A vad típusra jellemző rövid, egyenes MT-ok helyett a *shot^{ΔEGC}* mutáns hámsejtek sejtnyúlványaiban hosszú, meghajlott MT-ok jelentek meg. Ez a megfigyelésünk arra utal, hogy a Shot MT kötő aktivitása szükséges a normális MT váz kialakulásához a DME sejtekben. Megvizsgáltuk, hogy a MT-kötésben szerepet játszó domének közül pontosan melyik doménjén keresztül fejti ki a Shot fehérje ezt a hatását. Különböző csonkolt izoformákkal végeztünk menekítési kísérleteket és azoknak a szubcelluláris lokalizációját is részletesen jellemeztük.

24. ábra. Rendellenes MT-ok a vezető élben vad és *shot* mutáns embrióban. (A) vad (B) *shot^{ΔEGC}* mutáns embriók immunhisztokémiai jelölése a háti záródás alatt. A tubulin festés a MT vázat (piros), a phalloidin pedig az aktint (zöld) jelöli. A fehér nyilak a rendellenesen hosszú és meghajlott MT-okat mutatják a mutáns DME sejtekben. Mérték 10 μ m.

A teljes hosszúságú Shot izoforma (Shot-L(A)–GFP) főként az aktinnal mutat kolokalizációt: a sejtkéregben és a sejtnyúlványokban, valamint a vezető élben halmozódik fel. Helyenként a sejtestben a MT-okhoz is kötődik (25. ábra A). EB1–mCherry fehérjével elvégzett koexpressziós kísérletből kiderült, hogy a teljes hosszúságú Shot izoforma nem halmozódik fel a MT-ok növekvő „+” végeinél (25. ábra A’). A teljes hosszúságú fehérje túltermeltetése a vártan megfelelően menekíti a *shot* mutáns MT-fenotípusát (26. ábra B, I). Az a fehérje változat, melyből hiányzik a MT „+” vég kötésért felelős domén (Shot Δ C-tail–GFP) diffúzan található meg a DME sejtekben. Kisebb mértékben a kortikális aktinon és a sejtnyúlványokban is előfordul (25. ábra B). A Shot Δ C-tail–GFP izoforma menekíti a mutáns MT fenotípust, ami arra utal, hogy a Shot fehérje kölcsönhatása az EB1 fehérjével, valamint

felhalmozódása a MT-ok „+” növekvő végeinél nem nélkülözhetetlen a MT-ok stabilizálásában (26. ábra C, I). Ezt a következtetést a Shot-L(A)-3MtLS*-GFP transzgénnel elvégzett menekítési kísérlet is alátámasztotta. Ez a transzgén három célzott mutációt hordoz, ami a Shot-EB1 interakcióért felelős mindhárom SxIP motívumot érinti. A Shot-L(A)-3MtLS*-GFP menekíti a *shot* mutáns MT fenotípust és a teljes hosszúságú fehérjéhez hasonló lokalizációt mutat (25. ábra C, 26. ábra D, I). Ezekkel az eredményekkel összhangban, a Shot-C-tail-GFP, mely egyedül a fehérje MT „+” végkötő doménjét tartalmazza a MT „+” végekhez lokalizálódik (25. ábra D), de ez önmagában nem elég a vad típusú MT-váz helyreállításához (26. ábra E, I). Ez azt jelzi, hogy a Shot fehérje MT „+” vég szabályozásán kívül további funkciójára is szükség van a normális MT-váz kialakulásához a háti záródás alatt.

Tovább vizsgálva a Shot fehérje MT-kötésért felelős funkcionális doménjeit, a Gas2 domén nélküli (Shot Δ Gas2-GFP) fehérjét fejeztettünk ki *shot* mutáns hámsejtekben. A Gas2 domén eltávolítása drámai következményeket okozott a fehérje szubcelluláris lokalizációjában, ugyanis az elvesztette a képességét, hogy a MT-ok mentén kötődjön, ehelyett a MT-ok “+” végeinél és a sejtkeregben lokalizálódik (25. ábra E). Ezt az eredményt figyelembe véve feltételezhetjük, hogy a Gas2 MT kötő domén gátolja a Shot fehérje MT-végekhez történő kötődését a C-tail doménen keresztül. A Shot Δ Gas2-GFP-vel végzett menekítési kísérletben azt tapasztaltuk, hogy a Shot Δ Gas2 fehérje menekíti a *shot* mutáns MT fenotípust. Ez az eredmény arra utal, hogy a Gas2 domén sem nélkülözhetetlen a MT-ok stabilizálásához (26. ábra F, I).

Az a Shot fehérjeváltozat, melyből az EF-hand domén hiányzik (Shot Δ EF-hand-GFP), hasonló lokalizációt mutat a teljes hosszúságú fehérjével (25. ábra F) és szintén menekíti az abnormális MT fenotípust (26. ábra G, I). Az EF-hand, Gas2 és C-tail doménekből álló Shot fehérje változat (EGC-GFP) a MT-ok mentén lokalizálódik (25. ábra G), de a mutáns MT fenotípust nem képes menekíteni (26. ábra H, I).

Mindezeket a menekítési kísérleteket figyelembe véve úgy tűnik, hogy egyik C-terminális domén sem elég önmagában a MT-ok stabilizálásához, ami látszólag ellentmond a *shot*^{EGC} mutáns embriókban leírt megfigyeléseknek. Elképzelhető viszont, hogy a DME sejtek vezető élében a Gas2 és C-tail domének redundáns funkcióval bírnak és képesek kölcsönösen helyettesíteni egymást. Összességében arra a következtetésre jutottunk, hogy a Shot fehérje MT kötő aktivitása szükséges, de nem elégséges a MT-ok stabilizálásához.

25. ábra. Különböző Shot izoformák szubcellulális lokalizációja a DME sejtekben I. Élő embriókról készített felvételek. A hámsejtek négy sejt széles sávban fejezik ki a GFP jelölt Shot fehérjét és mCherry:Moesint. A nyilak a Shot fehérje lokalizációját jelölik a sejtnyúlványokban. (A) Shot-L(A)-GFP-t, (A') Shot-L(A)-GFP-t és EB1-mCherry-t koexpresszáló hámsejtek., (B) Shot-ΔC-tail-GFP-t, (C) Shot-L(A)-3MtLS*-GFP-t, (D) Shot-C-tail-GFP-t, (E) Shot-ΔGas2-GFP-t, (F) Shot-ΔEF-hand-GFP-t, (G) Shot-EGC-GFP-t és mCherry-Moesint koexpresszáló hámsejtek. Mérték 5 μ m. (A felvételek megtekinthetők: <http://movie.biologists.com/video/10.1242/jcs.193003/video-5,-6,-7,-8,-9,-10,-11,-12.>)

26. ábra. MT fenotípus menekítése. (A-H) En-Gal4 négy sejt szélességű sávokban GFP-jelölt Shot fehérjeváltozatokat kifejező *shot^{st20}* mutáns embriók immunhisztokémiai jelölése. A tubulin festés a MT hálózatot jelöli (piros), az aktint phalloidin jelöli (kék), a GFP a Shot fehérjeváltozatokat jelöli (zöld). A sárga szaggatott vonal a tubulin festésen jelzi az en-Gal4 négy sejt szélességű sávjait. Mérték 5 μ m. A menekítést a Shot fehérjéket kifejező hámsejtekből kiemelkedő, hosszú meghajlott MT-ok hiánya jelzi (fehér nyilak). (I) Az en-Gal4 sávokban megfigyelt abnormalis MT-ok száma a DME sejtek élvonalában. Átlag $\pm$ szórás, t-próba, *** $p < 0.001$.

A Shot fehérje aktinkötő aktivitása

A következő lépésben a Shot aktinkötő képességét teszteltük, hogy meghatározzuk, részt vesz-e a MT-ok stabilizálásában. Az aktin kötésre képtelen *shot^{kakP1}* mutáns DME sejtekben a *shot^{sf20}* és *shot^{ΔEGC}* mutánsokhoz hasonlóan abnormálisan hosszú és meggyűrűsödött MT-okat találtunk a DME sejtekben, ami arra utal, hogy a Shot aktinkötő képessége csakugyan szükséges a MT-ok stabilizálásához (27. ábra B). Ezt az eredményt a ShotΔCH1–GFP transzgénnel elvégzett menekítési kísérlettel támasztottuk alá. Ebből a fehérje változatból hiányzik a CH1 aktinkötő domén, ezáltal az aktinkötő képességét is elvesztette. Ezért ez a fehérjeváltozat nem köt a sejtkereghez, ellenben nagyon erős lokalizációt mutat a MT-ok mentén a sejttestben (28. ábra B). Ez a CH1 domén gátló hatásával magyarázható, amit a Shot fehérje MT-kötő képességére gyakorol. Ezek a MT-ok rendellenesen összezsavarodtak és meghajlottak voltak. Érdekes módon viszont a ShotΔCH1–GFP képes volt menekíteni a mutáns túlnyúló MT fenotípust (29. ábra C, E), ami látszólag ellentmond a korábbi megfigyeléseinknek, miszerint a *shot^{kakP1}* mutánsban abnormális MT-okat írtunk le. Ez az eredmény felveti a ShotΔCH1–GFP fehérjeváltozat túltermelésének domináns negatív hatását. A Shot fehérjének ezt a hatását már korábban is leírtak, pl. a Shot fehérje túltermeltetése neuronokban vagy C-terminális csonkolása a MT hálózat szerveződésének hibáit eredményezi [98, 99]. Feltételezésünk szerint a ShotΔCH1–GFP túltermelése a DME sejtekben megakadályozza a MT-ok túlnyúlását, de nem állítja helyre a vad MT eloszlást.

Összefoglalva, a *shot^{kakP1}* mutáns fenotípusa alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a Shot aktinkötő képessége, csakúgy, mint a MT-kötő képessége szükséges a MT-ok stabilizálásához. További bizonyítékot ad erre a ShotΔCH1ΔGas2–GFP fehérje változat túltermeltetése, amelyből mindkét funkcionális domén (MT-kötő és aktin-kötő) egyidejűleg hiányzik. A ShotΔCH1ΔGas2–GFP fehérje a MT-ok mentén lokalizálódik (28. ábra C), ennek ellenére nem volt képes menekíteni a *shot* gén hiányát és az abnormális MT-ok megjelentek a DME sejtekben (29. ábra D, E).

Az is kiderült, hogy a Shot fehérje MT-kötő és az aktinkötő aktivitására egy fehérje molekulán belül van szükség a normális MT váz kialakításához, ugyanis a *shot^{ΔEGC}/shot^{kakP1}* heteroallélikus kombinációt hordozó embriókban is rendellenes MT-okat találtunk (27. ábra C). Ezekben az embriókban sohasem képződik olyan fehérje, amelynek egyidejűleg lenne aktinkötő és MT-kötő aktivitása. Eredményeink arra utalnak, hogy a Shot fehérje az aktin/MT keresztkötésével biztosítja a helyes MT-váz működést a háti záródás cipzározódási fázisában.

27. ábra. Rendellenes MT-ok a vezető élben vad és különböző *shot* mutáns embriókban. (A) vad (B) *shot*^{kakP1} és (C) *shot*^{kakP1}/*shot*^{ΔEGC} mutáns embriók immunhisztokémiai jelölése a háti záródás alatt. A tubulin festés a MT vázat (piros), a phalloidin pedig az aktint (zöld) jelöli. A fehér nyilak a rendellenesen hosszú és meghajlott MT-okat mutatják a mutáns DME sejtekben. Mérték 10μm.

28. ábra. Különböző *Shot* izoformák szubcelluláris lokalizációja a DME sejtekben II. (A) *Shot-L(A)*-GFP-t, (B) *Shot*ΔCH1-GFP-t, (C) *Shot*ΔCH1ΔGas2 GFP-t és mCherry:Moesint koexpresszáló DME sejtek. A nyilak a *Shot* fehérje változatok lokalizációját jelölik a sejtnyúlványokban. Mérték 5 μm (A felvételek megtekinthetők: <http://movie.biologists.com/video/10.1242/jcs.193003/video-5>, - 13, -14).

29. ábra. A Shot fehérje MT-kötő és az aktinkötő aktivitása egyidejűleg szükséges a normális MT váz kialakításához a DME sejtekben. (A-D) En-Gal4 négy sejt szélességű sávokban GFP-jelölt Shot fehérjeváltozatokat kifejező *shot^{sf20}* mutáns embriók immunhisztokémiai jelölése. A tubulin festés a MT hálózatot jelöli (piros), az aktint phalloidin jelöli (kék), a GFP a Shot fehérjeváltozatokat jelöli (zöld). A sárga szaggatott vonal a tubulin festésen jelzi az en-Gal4 négy sejt szélességű sávjait. Mérték 5 μ m. A menekítést a Shot fehérjéket kifejező hámsejtekből kiemelkedő, hosszú meghajlott MT-ok hiánya jelzi (fehér nyilak). (E) Az en-Gal4 sávokban megfigyelt abnormalis MT-ok száma a DME sejtek élvonalában. Átlag $\pm$ szórás, t-próba, *** $p < 0.001$.

7. A Shot fehérje elősegíti a filopódium képződést a vezető élben

Az eddigi eredmények alapján elmondható, hogy a Shot fehérje aktin és MT szabályozó funkciójára egyidejűleg van szükség a DME sejtekben a helyes MT váz kialakulásához és így a normális háti záródáshoz. A menekítési kísérletekből viszont kiderült, hogy a MT-váz helyreállítása nem elegendő a normális dinamikájú háti záródáshoz, tehát a Shot fehérje további funkcióira is szükség van. Ilyen funkció lehet a Shot fehérje aktinváz működésében játszott szerepe. Megvizsgáltuk az aktin felhalmozódást és a filopódiumok kialakulását a vezető élben. En-Gal4 driver segítségével aktin-EGFP-t fejeztettünk ki vad és különböző *shot* mutáns hámokban, így *in vivo* videomikroszkópiával könnyen nyomon tudtuk követni az összes aktin alapú struktúrát (30. ábra A). A vad és a különböző *shot* mutáns hámokban az aktin felhalmozódás a DME sejtek vezető éljében nem sérült és a dinamikus aktin alapú sejtnyúlványok, a filopódiumok is megjelentek (30. ábra B). Közelebbről megvizsgálva a vezető élt viszont azt találtuk, hogy a *shot^{sf20}* mutánsban, annak ellenére, hogy a filopódiumok a vad típushoz hasonlítottak, néha rendkívül hosszú (10 μ m) nyúlványok alakultak ki, melyek nagyon halványan jelölődtek aktin-EGFP-vel. Elképzelhető, hogy ezekbe a nyúlványokba nőnek bele az abnormális MT-ok. A *shot^{sf20}* null mutáns embriók DME sejtjeiben a filopódiumok száma jelentősen lecsökkent a vad típushoz képest, ami arra utal, hogy a Shot fehérje részt vesz a filopódiumok kialakulásában (30. ábra C). A filopódiumok számának csökkenése a Shot fehérje aktin-MT keresztkötési aktivitás elvesztésének eredménye, ugyanis *shot^{kakP1}* és a *shot^{ΔEGC}* mutáns embriókban is jelentős filopódiumszám-csökkenést tudtunk megfigyelni (30. ábra C). A Shot fehérje keresztkötő aktivitásának szükségességét bizonyítja az a megfigyelésünk is, hogy a MT- és aktinkötő doméneknek egy molekulán belül kell lenniük, amit a filopódiumok csökkent száma jelez a *shot^{ΔEGC}/shot^{kakP1}* transzheterozigóta embriókban (30. ábra C). Megfigyeléseink arra utalnak, hogy a Shot fehérje részt vesz a filopódiumok kialakulásának szabályozásában és ezen keresztül hat a háti záródásra.

30. ábra. (A) Aktin-EGFP-t kifejező hámsejtek sejtnyúlványainak dinamikája vad és shot mutáns embriókban. A fehér nyilak a hosszú sejtnyúlványokat jelölik. Mérték 10 μm . (B, C) A filopódiumok dinamikájának kvantitatív elemzése. (B) A diagram a filopódiumok hosszát, (C) és a 15 perc alatt kialakuló filopódiumok számát mutatja a DME sejtekben. Shot mutánsban kevesebb filopódium alakul ki a vad típushoz képest, de a filopódiumok hosszában nincs jelentős különbség. Átlag $\pm$ szórás, t-próba, * $p < 0.001$, ns – nem szignifikáns a különbség (A felvételek megtekinthetők: <http://movie.biologists.com/video/10.1242/jcs.193003/video-15>).**

VI. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

Kísérleteink célja a hámzáródási folyamatok során lejátszódó sejtvázátrendeződések alapmechanizmusainak megismerése volt a háti záródás vizsgálatán keresztül. A háti záródásban szerepet játszó új gének azonosításához egy funkcióvesztéses genetikai szűrést végeztünk RNSi felhasználásával. A funkcióvesztéses fenotípust *in vivo* videó-mikroszkópiával nyomon követve olyan géneket is lehet azonosítani, melyek a háti záródás dinamikáját szabályozzák. A MT-okkal együttműködő fehérjéket kódoló gének tipikusan ilyenek lehetnek, hiszen a MT-ok teljes hiánya is csupán a cipzározódási hibákat eredményez, ami csak élő embrió filmezésével vizsgálható. 17 MT-vázhoz kapcsolódó fehérjét kódoló gént csendesítve azonosítottuk a spektraplakint kódoló *shot* gént, melynek hiánya abnormalis dinamikájú háti záródást okozott. Bebizonyítottuk, hogy a fenotípus valóban a *shot* gén hiányából adódik. Az embrionális háti záródás folyamatán kívül a *Drosophila* Shot fehérje egyéb fejlődési folyamatok szabályozásában is részt vesz (torzáródás, sebzáródás), ami a hámzáródási folyamatokban betöltött általános szerepére utal.

A Shot fehérje a sejtváz egyik kulcsfontosságú szerkezeti eleme. A sejtalkak megváltozásához szükséges sejtváz-átrendeződéseket irányító folyamatokban vesz részt. Mivel a génről nagyszámú, különböző doménnel rendelkező fehérje képződhet, a *shot* gén szerepének magyarázatára a háti záródásban számos, egymást ki nem záró lehetőség kínálkozik. Minket elsősorban az érdekelt, hogy a *shot* gén milyen módon járul hozzá a mikrotubulusváz szerkezeti átalakulásához és a mikrotubulusváz által kiváltott, a hámzáródáshoz szükséges sejtszintű változásokhoz. Kísérleteink során két különböző fenotípusos elváltozást követtünk nyomon: a háti nyílás záródásának dinamikáját és a sejtvázelemek szerkezeti és működési hibáit.

A Shot fehérje a MT-váz helyes kialakulását szabályozza a háti záródás alatt

A hámiban megfigyelhető MT-okat eltérő eloszlásuk és stabilitásuk alapján három különböző csoportba sorolhatjuk. Az első csoportba azok a MT-ok tartoznak, melyek az α -tubulin speciális poszttranszlációs módosítását, acetilációját hordozzák, melyek elsősorban a hosszú életidejű, stabil MT-on találhatók meg [100-105]. Ezek a MT-ok a FRAP kísérletben kimutatott immobilis tubulin frakciót képviselik a DME sejtekben. Az alacsony immobilis frakció alapján a stabilizált MT-ok igen kis hányadát alkotják a MT-oknak (20 %). Az acetilált MT-ok túlnyomórészt a sejtek apikális felszínén figyelhetők meg ahol párhuzamos kötegekbe

rendeződnek. Ez a MT elrendeződés specifikus a háti záródásra és úgy tűnik, hogy független a spektraplakin aktivitástól, amit alátámaszt a *shot* mutánsban megfigyelhető normális acetilált MT eloszlás is.

A második csoportot a sejttestben megtalálható dinamikus MT-ok alkotják, melyek ellentétes lefutású stabil kötegekbe rendeződnek és a DME sejtek dorzális vagy ventrális felszíne felé nőnek. A Shot fehérje szerepe lehet a MT-ok növekedésének irányítása a már kialakult aktin filamentumok mentén. *In vitro* kísérleti eredmények alapján a Shot fehérje képes az aktin kötegek mentén irányítani a MT-ok növekedését, ami a MT-ok párhuzamos kötegekbe történő összerendeződését eredményezi [106]. Ehhez az aktivitáshoz a Shot fehérje a MT-ok “+” végével lép kölcsönhatásba a C-tail doménen keresztül [88, 106]. Eredményeink szerint a C-tail domén működése nem szükséges a helyes MT váz kialakulásához a háti záródás alatt. EB1-GFP markerfehérjével az egyedi MT-okat nyomon követve kimutattuk, hogy a Shot nem játszik szerepet a MT-ok növekedés irányának meghatározásában a háti záródás alatt. Mindezek alapján azt feltételezzük, hogy a dinamikus MT-ok párhuzamos kötegekbe rendeződéséért nem a Shot által közvetített MT-aktin kölcsönhatáson alapuló MT-vezetés a felelős. A DME sejtek MT-ainak elrendezésében valószínűleg eddig ismeretlen, motorfehérjék által hajtott irányító mechanizmusok vehetnek részt [107-110]. A Shot fehérje gátolja a MT-ok polimerizációját, amit a mutáns DME sejtekben megfigyelt magasabb MT növekedési sebesség és a FRAP kísérlettel kimutatott gyorsabb tubulin kicserélődés jelez. A Shot fehérje hasonló szerepét a MT növekedés sebességének szabályozásában már korábban is leírták *Drosophila* neuron és humán U2OS sejt kultúrákban is [88, 111]. A gyorsan növekvő MT-ok miután elérték a sejt kérget tovább nőnek és túlnyúlnak azon vagy visszahajlanak, ami a rendezetlen MT váz kialakulását eredményezi a mutáns sejtekben. Így módon, a MT-ok + vég dinamikájának Shot függő szabályozása hozzájárul a teljes MT hálózat szerveződéséhez a sejttestben.

A DME sejtek MT-ainak harmadik csoportjába azok a dinamikus MT-ok tartoznak, amelyek elérik a vezető élt a növekvő “+” végeikkel és belenőnek a sejt nyúlványokba. Ezeket a MT-okat erősen befolyásolják a *shot* mutációk: a MT-ok abnormálisan hosszúak és hajlottak lesznek. Hasonló MT-okat figyeltek meg *shot* vagy ACF7 hiányában számos más sejt típusnál is, mint például az emlős keratinociták, endotél sejtek, *Drosophila* S2 sejtek vagy neuronok esetén [67, 112-114].

A Shot fehérjének a MT-okkal és aktin filamentumokkal egyidejűleg kell kölcsönhatásba lépnie ahhoz, hogy befolyásolni tudja a MT-ok működését. Ez a megfigyelés összhangban van azzal a hipotézissel, miszerint az abnormális MT-ok akkor alakulnak ki a sejtek perifériáján, ha nem kapcsolódnak hozzá a kortikális aktin hálózathoz [112, 115, 116].

Eredményeinkkel sikerült bizonyítani, hogy a Shot az N-terminális aktinkötő doménje és a C-terminális MT-kötő doménjei segítségével a sejtnyúlványokban az aktinfilamentumok és a MT-ok keresztkötését végzi és a dinamikus MT-ok stabilizálásán keresztül hat a MT váz kialakulására a háti záródás során.

A Shot fehérje a filopódiumok kialakulásán keresztül segíti elő a cipzározódást

A spektraplakin fehérjék a sejt váz különböző összetevőinek összehangolt működését szabályozzák. A különböző izoformák doménszerkezetüktől függően a MT-okat és az aktin filamentumokat egymástól függetlenül irányítják, vagy ezek között keresztkötéseket kialakítva látják el funkciójukat. Mivel a háti záródásban mindkét sejt vázelem aktívan részt vesz, ezért a Shot fehérje is több ponton szabályozhatja a folyamatot. A háti záródás kezdeti fázisában a hámlemezek mozgását a *shot* mutációja nem befolyásolja és a Shot fehérje nem szükséges az aktin alapú folyamatok szabályozásához, ellenben a háti záródás utolsó lépéséhez, a normális dinamikájú cipzározódáshoz nélkülözhetetlen. A cipzározódást két sejtszintű mechanizmus segíti elő. Egyrészt a filopódiumok működése az új sejt kapcsolatok szegment specifikus kialakulását biztosítja, másrészt pedig a szemben lévő hámlemezek lamelláinak átfedése is a cipzározódást segíti [10]. Eredményeink azt sugallják, hogy a Shot a sejtnyúlványok kialakulásán keresztül és nem a lamellák átlapolódásának feloldásán keresztül hat a cipzározódásra. A lamellák átlapolódása és feloldása egy MT-függő folyamat [10]. Habár nem tudjuk kizárni a Shot MT-szabályozó funkciójának közvetlen szerepét ebben a folyamatban, menekítési kísérleteink egyértelműen igazolják, hogy a Shot MT-szabályozó funkciója mellett aktin-kötő aktivitása is szükséges a cipzározódáshoz. Nyilvánvalóan a MT-ok stabilizálása önmagában nem elegendő a normális dinamikájú háti záródáshoz.

A DME sejtekben a sejtnyúlványok helyes működéséhez a Shot fehérje aktin és MT-kötő aktivitásának összehangolt működése szükséges. Az is biztos, hogy a Shot aktin és MT-kötő doménjének egy molekulán belül kell lenniük, ami arra utal, hogy a Shot fehérje MT/aktin keresztkötő funkciója érvényesül ebben a folyamatban.

A DME sejtekben a MT-ok és aktin filamentumok kolokalizációját kizárólag a filopódiumokban tudtuk kimutatni, vagyis a Shot fehérje a keresztkötő aktivitását a sejtnyúlványokban fejt ki. Ezt a következtetést támasztja alá a filopódiumok csökkent száma a *shot* mutánsban. Feltételezzük, hogy a *shot* mutánsban a Shot aktin/MT keresztkötő aktivitásának hiánya okozza a sejtnyúlványok csökkent számát, ami végsősoron ahhoz vezet, hogy a cipzározódás lelassul.

A Shot fehérjék moduláris doménszerkezetüknek köszönhetően sejttípus-függő módon szabályozzák a sejtnyúlványok dinamikáját. Az idegsejtek növekedési kúpjában a Shot fehérje az EF-hand Ca^{2+} kötő doménjén keresztül kölcsönhatásba lép a Kra (más néven eIF5C) fehérjével és ez esszenciális a filopódiumok kialakulásához [113]. A DME sejtekben azonban az EF-hand domén nem szükséges a háti záródáshoz, ellenben az aktinkötő és a MT kötő funkció esszenciális a filopódiumok helyes működéséhez és ezen keresztül a cipzározódáshoz. Emlős sejtkultúrákban az ACF7 kölcsönhatása az ELMO komplexel (más néven DOCK180) segíti elő a filopódiumok kialakulását a MT-ok stabilizálásán és a Rac GTP-ázok aktivitásán keresztül [117]. Lehetséges, hogy egy hasonló mechanizmus működik a DME sejtekben is. A Shot fehérje kölcsönhatása az ELMO komplexel (*Drosophilában* Mbc) stabilizálja a MT-okat azáltal, hogy keresztköti azokat az aktin filamentumokkal és Rac-aktivációt indukál a vezető élben. Ezt a feltételezést támasztja alá az is, hogy a Rac aktiváció szükséges a sejtnyúlványok kialakulásához és a hatékony cipzározódáshoz [44, 118].

A *shot* teljes hiánya nem akadályozza meg a háti záródást, csupán egy enyhe fenotípust, cipzározódási hibát okoz a háti záródás alatt. A *shot* null mutánsokra jellemző enyhe záródási fenotípus két, egymást nem kizáró hipotézissel magyarázható. Előfordulhat, hogy további keresztkötő fehérjék vagy keresztkötő mechanizmusok hathatnak párhuzamosan a Shot fehérjével. Egy ilyen potenciális redundáns szereppel bíró keresztkötő fehérje lehet a Pigs, amelyről kimutatták hogy CH1, Gas2 és C-tail doméneket is tartalmaz, melyekkel valamennyi sejtvázelemhez kötődni tud [119]. A másik magyarázat szerint elképzelhető, hogy a Shot szerepe a DME sejtekben csupán a sejtnyúlványok kialakulására korlátozódik. A sejtnyúlványok számának csökkenése a *shot* mutánsban így nem teszi lehetetlenné a cipzározódást, de jelentősen lecsökkenti a hatékonyságát [7, 10].

VII. TARTALMI ÖSSZEFOGLALÓ

Az ember embrionális fejlődése során számos olyan lépés történik, például a szájpadrás vagy az állkapocs kialakulása során, amikor a test két oldalán létrejött szövetek a középvonal felé mozognak, és ott összeolvadva kialakítják a megfelelő szerveket. Ezekben a szigorúan szabályozott folyamatokban bekövetkezett hibák olyan fejlődési rendellenességekhez vezethetnek, mint a nyitott gerinc vagy a farkastorok. Az embrionális fejlődés során történő szövetösszenövésekhez hasonló folyamatok mennek végbe a természetes módon vagy sebzés hatására létrejött hámhiányosságok bezárásakor is. A hámzáródási folyamatok alapvető mechanizmusainak mélyebb megértése, a benne részt vevő molekulák felderítése és vizsgálata éppen ezért, hosszú távon felgyorsíthatják a sebgyógyulást elősegítő újszerű eljárások kifejlesztését. Kutatásainkkal azokat a stratégiákat szeretnénk megismerni és megérteni, amiket az élőlények alkalmaznak a hámnyílások bezárásához. Az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) fejlődő embriója kitűnően alkalmas modellt kínál a középvonali összenövések és a sebzáródási folyamatok során lezajló molekuláris, illetve sejt- és szövetszintű változások *in vivo* vizsgálatához. Az ecetmuslica közismerten hatékony kísérleti rendszer a különböző fejlődési folyamatok genetikai boncolásához. Több évtizedes kutatás eredményeként a genetikai eszközök olyan tárháza áll rendelkezésre, mely a muslicát egyedülállóvá teszi a modellorganizmusok között. A muslica egyedfejlődése során számos olyan folyamat zajlik le, mint például az embrió háti záródása, amelyek során a sejtek a mesterségesen okozott seb záródásakor tapasztalt módon viselkednek. A háti záródás az embriogenezis utolsó morfogenetikai mozgása, melynek során két egyrétegű hámlemez mozog egymás felé, majd találkoznak és összeolvadnak, ezáltal bezárva egy nyílást a háti középvonal mentén. A sebzáródásban és a háti záródásban egyaránt fontos szerepet kap a sejtváz– az aktin és a mikrotubulus (MT) hálózat dinamikus átrendeződése. A háti záródás során a hám legdorzálisabb sejtjei (DME) egy sorba rendeződnek és kialakul egy vezető él. A DME sejtek aktint és miozint halmoznak fel, ezáltal kialakul egy szupracelluláris aktomiozin gyűrű, ami a háti lyukat körülveszi. Később a DME sejtek dorzális felszínén aktinalapú sejtnyúlványok– filopódiumok és lamellipódiumok– jelennek meg. Ezek a sejtnyúlványok az új sejtkapcsolatok szegment specifikus kialakulását biztosítják a szemben lévő hámsejtek között.

A háti záródást végrehajtó sejtvázelemek közül eddig főként az aktinvázat vizsgálták, a mikrotubulusváz szerepéről azonban nagyon keveset tudunk. Ismert, hogy a záródást megelőzően a hámsejtekben a mikrotubulusok rendezetlenül, helyezkednek el. A háti záródás

elején ez a rendezetlen mikrotubulusváz felbomlik és a MT-ok a sejt hossz tengelyével párhuzamosan stabil kötegekbe rendeződnek el. A MT-ok átrendeződése elsőként a DME sejtekben indul meg és később a laterálisabban elhelyezkedő hámsejtekre is kiterjed. A MT kötegek stabilak, de az őket felépítő egyedi MT-ok dinamikus lebomlanak és újra polimerizálódnak. A dinamikus mikrotubulusok a sejtek dorzális felszínén belenőnek a lamellipódiumokba és a filopódiumokba, ami arra utal, hogy a sejtek ezen a részén a két sejtvézelem szorosan együttműködik. A záródás befejeztével a rendezett MT kötegek lebomlanak és a hámsejtekben ismét rendezetlen MT eloszlás alakul ki.

Elsődleges célunk a MT hálózat szerveződése és működése szempontjából fontos, a háti záródásban résztvevő gének azonosítása és jellemzése volt. Összességében arra akartunk választ kapni, hogy a mikrotubulusok miként járulnak hozzá az összehangolt változások sorozatához, melyek ahhoz vezetnek, hogy az embriók hátán keletkezett nyílás látható jel nélkül tűnik el. Végző célunk a hámzáródás során a MT-váz működését is irányító *shot* gén funkcionális jellemzése volt és ezen keresztül megmutatni, hogy egy alapvető fejlődési folyamathoz hogyan járul hozzá a sejtvézelemek együttműködése.

Előzetesen, a háti záródásban résztvevő, MT-kötő gének azonosítására irányuló, RNS interferencián (RNSi) alapuló *in vivo* video mikroszkópiával kombinált funkcióvesztéses szűrésből azonosítottuk a *Drosophila* spektraplakint kódoló *short stop* (*shot*) gént. A *shot* gén csendesítése hibás dinamikájú záródást eredményezett. A csendesített embriókban a háti nyílás bezáródott, azonban a záródás menete abnormális volt: a háti nyílás alakja a vad típusra jellemző lencse alak helyett rendellenesen keskeny lett. A *shot* mutáns fenotípusának kvantitatív elemzésével kimutattuk, hogy a *shot* gén, a MT-okhoz hasonló módon, a háti hám cipzározódásához szükséges. A teljes hosszúságú fehérje *shot*^{s20} null mutáns háttéren elvégzett menekítési kísérlet bizonyította, hogy a fenotípus valóban a *shot* gén funkciójának hiányához köthető. Az embrionális háti záródás folyamatán kívül a *Drosophila* Shot fehérje egyéb fejlődési folyamatok szabályozásában is részt vesz (torzáródás, sebzáródás), ami a hámzáródási folyamatokban betöltött általános szerepére utal.

A magasabbrendű állatokéhoz hasonlóan az *ecetmuslica* *shot* génje is számos protein domént tartalmaz, melyek alternatív splicinggal és szövet specifikus promóter használatával szabadon kombinálódhatnak egymással, így változatos hosszúságú és funkciójú fehérjék képződnek. A különböző fehérjedomének szerepének pontosabb megértéséhez, izoforma-specifikus mutáns allélok fenotípusát vizsgáltuk meg az eredményeket pedig transzgenikus menekítési kísérletekkel támasztottuk alá. A mutánsanalízis és a menekítési kísérletek

együttesen azt jelzik, hogy a Shot fehérje az aktin- és a MT-váz keresztkötésével irányítja a háti záródás utolsó fázisát, a cipzározódást.

A *shot* mutáns záródási fenotípusa megegyezik a MT-ok teljes hiányakor jelentkező fenotípussal, ami arra utal, hogy a *shot* gén funkciója szükséges a hámsejtek MT-ainak működéséhez. A *shot* mutáns hámsejtek MT-vázának elrendeződését immunfestéssel vizsgáltuk meg. A részletesebb elemzés érdekében, Tubulin-EGFP-t kifejező hámsejteket filmeztünk le, így közvetlenül nyomon tudtuk követni a MT-váz felépítését. A DME sejtek sejttestjében a MT-ok párhuzamos kötegekben helyezkedtek el, azonban a *shot* mutánsban a kötegek gyakran hirtelen meghajlottak. A *shot* mutáns DME sejtek vezető élében sejtnyúlványokba belépő rendellenes, meghajlott MT-okat figyeltünk meg. A vad típustól eltérően, a *shot* mutáns DME sejtek laterális felszínéről kinyúló abnormális MT-okat is megfigyeltünk. A túlnyúló MT fenotípus kvantitatív elemzése kimutatta, hogy a mutáns DME sejtek nyúlványaiban a MT-ok hosszabbra nőnek, mint a vad típusú sejtekben. A mutáns hámsejtekben megfigyelhető MT-túlnöveses fenotípus háttérében a MT-ok megváltozott dinamikája áll. A MT-ok dinamikus tulajdonságait FRAP analízissel vizsgáltuk meg, amiből kiderül, hogy a *shot* mutáns sejtekben a MT-ok dinamikusabbak voltak, ami arra utal, hogy a *shot* a DME sejtekben lévő dinamikus MT-ok stabilizálásán keresztül hat a MT váz kialakulására a háti záródás során. Tovább vizsgáltuk a Shot fehérje funkcióját a MT-ok növekedésének szabályozásában úgy, hogy fluoreszcensen megjelölt EB1-GFP markerfehérjét követtünk nyomon *in vivo* filmezéssel. Az EB1 fehérje a MT-ok növekvő “+” végéhez kötődik és így lehetővé vált a MT-ok növekedésének közvetlen mérése. A mutáns hámsejtekben a MT-ok növekedési sebessége jelentősen megnőtt a vad sejtekhez képest. A vad és *shot* mutáns sejtek sejttestjeiben a legtöbb MT párhuzamos kötegekbe rendeződött, ami azt jelzi, hogy a Shot fehérje nem szükséges a MT-ok növekedési irányának szabályozásához az aktin kötegek mentén a háti záródás alatt.

Annak érdekében, hogy jobban megértsük a Shot fehérje miként stabilizálja a MT-okat a háti záródás alatt, részletes szerkezet-funkció analízist végeztünk el. Immunfestéssel vizsgáltuk meg a MT váz elrendeződését izoforma-specifikus *shot* mutáns hámsejtekben, az eredményeket pedig a teljes hosszúságú, illetve csonkolt doménszerkezetű GFP jelölt fehérjékkel elvégzett menekítési kísérletekkel egészítettük ki. A menekítési kísérleteket minden esetben *shot*^{sf20} null mutáns háttéren *en*-Gal4 driver segítségével hajtottuk végre. Mivel az *en*-Gal4 a hámiban négy sejt szélességű sávokban fejezte ki a Shot fehérje különböző változatait, ez a kísérleti elrendezés lehetővé tette, hogy a mutáns és a menekített fenotípusú sejteket ugyanabban az embrióban hasonlítsuk össze. Összességében arra a következtetésre jutottunk,

hogy a Shot fehérje aktin és MT szabályozó funkciójára egyidejűleg van szükség a DME sejtekben a helyes MT váz kialakulásához. Kimutattuk, hogy a Shot fehérje részt vesz a filopódiumok kialakulásának szabályozásában is és ezen keresztül hat a háti záródásra. A DME sejtek vezető élében a Shot fehérje aktin- MT keresztkötő aktivitása révén járul hozzá a filopódiumok kialakításához

A Shot fehérje a sejtvázelemek együttműködését, keresztkötését koordinálja, melyen keresztül biztosítja a hámzáródáshoz szükséges sejtszintű változásokat.

VIII. SUMMARY

Several naturally occurring morphogenetic events involve tissue movements similar to those required for wound healing. In these developmental processes, two tissues move towards each other until they meet and fuse. These closure events happen mostly during embryogenesis at the midline of the developing body. Defects of these closure events result in dramatic consequences, such as cleft lip or palate or neural tube defects. Our goal is to understand the strategies animals apply to epithelial openings. In the long term, our results may be of wider societal benefit as they may accelerate the development of novel therapies for the enhancement of wound healing. *Drosophila melanogaster* has in the past provided a powerful experimental system for the genetic dissection of developmental processes. It is particularly amenable to *in vivo* analysis of mechanisms that allow a multi-cellular organism to close epithelial openings caused by wounding or arising as part of the developmental program.

Several developmental processes, such as dorsal closure of the embryo, involve a coordinated series of cellular activities that are very similar to those required for wound healing. Dorsal closure represents the last major morphogenetic movement during embryogenesis, when two opposed epithelial sheets converge toward the midline where they meet, sealing a hole at the dorsal surface of the embryo. Efficient dorsal closure requires the dynamic rearrangement of the cytoskeleton in epithelial cells. DME cells form a leading edge facing towards the dorsal opening, where they accumulate an actomyosin cable. In addition, DME cells extend actin-rich cellular protrusions, such as filopodia and lamellipodia, mediating initial contacting of the opposing DME cells.

At the onset of closure, DME cells display an irregularly distributed network of MTs. During closure, MTs reorganize to form acentrosomal bundles that are aligned along the dorsal-ventral cell axis. Although the bundles are stable, individual MTs remain highly dynamic, and at the leading edge they grow into cell protrusions.

Genetic screening, biochemical and cell biological approaches have uncovered a large number of structural and signalling molecules required for these closure events. Several studies have highlighted the importance of reorganization of actin-based structures, such as filopodia and lamellipodia, but the function of the microtubule (MT) network is very poorly understood. Our primary goal was the identification of genes required for MT network structure and function during dorsal closure and the *in vivo* analysis of these genes by determining their exact role in epithelial closure.

To uncover novel components required for microtubule reorganization and function, we have applied an RNAi-based screening method combined with automated *in vivo* video microscopy and we identified the *short stop* (*shot*) to be essential for the zippering of the dorsal hole. The silencing of *shot* results in abnormal dorsal closure. In embryos with reduced *shot* function, the opening is closed completely, but the dynamics of the closure is abnormal. In the *shot*RNAi embryos, the dorsal opening was abnormally narrow, not the typical wild-type teardrop-shaped dorsal hole. Quantification of closure dynamics revealed that *shot* function is essential for efficient zippering. Targeted expression of the Shot protein rescued the zippering defect indicating that the phenotype loss of the function of the *shot* gene. Shot belongs to the conserved family of the spectraplakins, gigantic structural proteins with functional domains binding to actin filaments, microtubules and cell adhesion complexes. These proteins exhibit a characteristic multidomain protein structure, and their transcripts are alternatively spliced to generate a wide diversity of isoforms. In order to understand the role of the individual protein domains of Shot in dorsal closure, we investigated the mutant phenotypes of various *shot* mutant alleles abolishing distinct Shot activities. In addition, we carried out a detailed structure-function analysis of Shot using a series of *shot* transgenes in rescue experiments. Using isoform-specific mutant alleles and genetic rescue experiments with truncated Shot variants, we demonstrate that Shot functions as an actin-microtubule cross-linker in mediating zippering. To study the involvement of *shot* in MT network organization, we examined MT distribution in *shot* mutant epithelial cells via immunohistochemical labelling, and performed live imaging of DME cells expressing Tubulin-EGFP. In the cell body of *shot*^{sf20} null mutants, the overall morphology of the MT network appeared slightly disorganized. Very often, sudden bending of MTs was detected. Moreover, MTs frequently protruded at the lateral surface of the epithelial cells. At the leading edge of the mutant DME cells, long and bent MTs protruded from the cell body over the amnioserosa cells, indicating that *shot* regulates the proper organization of MTs in the cell body and at the leading edge. Time-lapse analysis revealed that the maximum length of the protruding MTs increased, indicating a role played by Shot in regulating MT stability. FRAP assays were applied to analyze the turnover of tubulin, which reflects the dynamic properties of the MTs. MTs in *shot* mutants are more dynamic, suggesting that Shot affects the MT organization of DME cells by regulating the dynamic properties of MTs. To test Shot's function in MT growth regulation, EB1-EGFP was expressed in *shot*^{sf20} null mutant epithelial cells. EB1 binds to polymerizing MT plus ends, which enables direct measurement of the dynamic instability parameters by *in vivo* imaging. In mutant cells, the growth rate of MTs reflected by the speed of EB1 comets increased significantly, supporting the finding that Shot

regulates MT dynamics. In both wild-type and *shot^{sf20}* null mutant embryos, most of the MTs polymerized parallel to the long axis of DME cells, indicating that Shot is not required for the regulation of MT growth direction along the actin filaments.

In order to better understand the role of Shot in MT regulation, we investigated the MT network of epithelial cells in isoform-specific shot mutants, in addition we expressed various truncated versions of Shot in *shot^{sf20}* null mutant embryos using the en-Gal4 driver which drives the expression of the transgenes in only four-cell-wide stripes of the dorsally migrating epithelial sheets. This experimental design enabled us to compare shot-deficient cells with rescued cells in the same embryo. In summary, we conclude that the MT- binding activity of Shot is required but is not sufficient for MT stabilization and the actin-binding activity of Shot is also required for MT stabilization.

In the leading edge of epithelial cells, Shot regulates protrusion dynamics by promoting filopodia formation. Shot mediated interactions between microtubules and actin filaments facilitate formation of filopodia which promote zippering by initiating contacting of opposing epithelial cells during zipping.

Our work provides insights how mechanisms integrating individual cytoskeletal elements into complex, highly shaped functional patterns contribute to a developmental process at the organism level.

IX. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni Dr. Jankovics Ferenc témavezetőmnek, hogy támogatott a dolgozat megírásában, bevezetett a tudományos módszerek, a tudományos gondolkodás világába. Köszönöm szakmai irányítását, hasznos tanácsait és a dolgozatom alapos és kritikus átnézését.

Köszönettel tartozom Dr. Erdélyi Miklósnak, a Genetikai Intézet igazgatójának, aki lehetővé tette számomra, hogy a Biológus PhD program hallgatója legyek. Ösztönző támogatásával, tanácsaival, építő kritikáival és türelmével segítette a munkámat.

Külön köszönöm Ugrainé Szathmári Margit aszisztensünknek a segítségét, akinek munkája elképzelhetetlenül sok időt és energiát spórolt meg számomra.

Köszönet illeti továbbá a csoport egykori és jelenlegi tagjait és a szegedi *Drosophila* közösség valamennyi dolgozóját, hogy a rám bízott feladatokat családi, baráti és nem utolsó sorban jó szakmai légkörben végezhettem.

Végül szeretném megköszönni családomnak, elsősorban férjemnek, Takács Tibornak a támogatását és türelmét.

A PhD dolgozat alapját képező kutatómunka a GINOP-2.3.2.-15-2016-00001 pályázat támogatásával valósult meg.

X. IRODALOMJEGYZÉK

1. Martin, P. and S.M. Parkhurst, *Parallels between tissue repair and embryo morphogenesis*. Development, 2004. 131(13): p. 3021-34.
2. Mitchell, L.E., et al., *Spina bifida*. Lancet, 2004. 364(9448): p. 1885-95.
3. Grose, R. and P. Martin, *Parallels between wound repair and morphogenesis in the embryo*. Semin Cell Dev Biol, 1999. 10(4): p. 395-404.
4. Wood, W., et al., *Wound healing recapitulates morphogenesis in Drosophila embryos*. Nat Cell Biol, 2002. 4(11): p. 907-12.
5. Jacinto, A., et al., *Dynamic actin-based epithelial adhesion and cell matching during Drosophila dorsal closure*. Curr Biol, 2000. 10(22): p. 1420-6.
6. Jacinto, A., S. Woolner, and P. Martin, *Dynamic analysis of dorsal closure in Drosophila: from genetics to cell biology*. Dev Cell, 2002. 3(1): p. 9-19.
7. Jankovics, F. and D. Brunner, *Transiently reorganized microtubules are essential for zippering during dorsal closure in Drosophila melanogaster*. Dev Cell, 2006. 11(3): p. 375-85.
8. Gates, J., et al., *Enabled plays key roles in embryonic epithelial morphogenesis in Drosophila*. Development, 2007. 134(11): p. 2027-39.
9. Millard, T.H. and P. Martin, *Dynamic analysis of filopodial interactions during the zippering phase of Drosophila dorsal closure*. Development, 2008. 135(4): p. 621-6.
10. Eltsov, M., et al., *Quantitative analysis of cytoskeletal reorganization during epithelial tissue sealing by large-volume electron tomography*. Nat Cell Biol, 2015. 17(5): p. 605-14.
11. Chen, X., *Bidirectional communication between tissues regulating morphogenesis in a Drosophila model of wound healing*, in *Department of Molecular Biology and Biochemistry Faculty of Science*. 2014.
12. Kiehart, D.P., et al., *Multiple forces contribute to cell sheet morphogenesis for dorsal closure in Drosophila*. J Cell Biol, 2000. 149(2): p. 471-90.
13. Hutson, M.S., et al., *Forces for morphogenesis investigated with laser microsurgery and quantitative modeling*. Science, 2003. 300(5616): p. 145-9.
14. Harden, N., *Signaling pathways directing the movement and fusion of epithelial sheets: lessons from dorsal closure in Drosophila*. Differentiation, 2002. 70(4-5): p. 181-203.

15. Hayes, P. and J. Solon, *Drosophila dorsal closure: An orchestra of forces to zip shut the embryo*. Mech Dev, 2017. 144(Pt A): p. 2-10.
16. Akhmanova, A. and M.O. Steinmetz, *Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. 9(4): p. 309-22.
17. B., A., J. A, and L. J, *The Self-Assembly and Dynamic Structure of Cytoskeletal Filaments*. Molecular Biology of the Cell 2002.
18. Lodish H, B.A., Zipursky SL, et al. , *Molecular Cell Biology*. 4th edition. New York: W. H. Freeman; 2000. Section 19.2, *Microtubule Dynamics and Associated Proteins*. 2000.
19. Schuyler, S.C. and D. Pellman, *Microtubule "plus-end-tracking proteins": The end is just the beginning*. Cell, 2001. 105(4): p. 421-4.
20. Hayashi, I. and M. Ikura, *Crystal structure of the amino-terminal microtubule-binding domain of end-binding protein 1 (EB1)*. J Biol Chem, 2003. 278(38): p. 36430-4.
21. Komarova, Y., et al., *Mammalian end binding proteins control persistent microtubule growth*. J Cell Biol, 2009. 184(5): p. 691-706.
22. Skube, S.B., J.M. Chaverri, and H.V. Goodson, *Effect of GFP tags on the localization of EB1 and EB1 fragments in vivo*. Cytoskeleton (Hoboken), 2010. 67(1): p. 1-12.
23. Su, L.K. and Y. Qi, *Characterization of human MAPRE genes and their proteins*. Genomics, 2001. 71(2): p. 142-9.
24. Rogers, S.L., et al., *Drosophila EB1 is important for proper assembly, dynamics, and positioning of the mitotic spindle*. J Cell Biol, 2002. 158(5): p. 873-84.
25. Tirnauer, J.S., et al., *Yeast Bim1p promotes the G1-specific dynamics of microtubules*. J Cell Biol, 1999. 145(5): p. 993-1007.
26. Dominguez, R. and K.C. Holmes, *Actin structure and function*. Annu Rev Biophys, 2011. 40: p. 169-86.
27. Revenu, C., et al., *The co-workers of actin filaments: from cell structures to signals*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. 5(8): p. 635-46.
28. Byars, C.L., K.L. Bates, and A. Letsou, *The dorsal-open group gene raw is required for restricted DJNK signaling during closure*. Development, 1999. 126(21): p. 4913-23.
29. Hou, X.S., E.S. Goldstein, and N. Perrimon, *Drosophila Jun relays the Jun amino-terminal kinase signal transduction pathway to the Decapentaplegic signal transduction pathway in regulating epithelial cell sheet movement*. Genes Dev, 1997. 11(13): p. 1728-37.
30. Rios-Barrera, L.D. and J.R. Riesgo-Escovar, *Regulating cell morphogenesis: the Drosophila Jun N-terminal kinase pathway*. Genesis, 2013. 51(3): p. 147-62.

31. Stronach, B. and N. Perrimon, *Activation of the JNK pathway during dorsal closure in Drosophila requires the mixed lineage kinase, slipper*. Genes Dev, 2002. 16(3): p. 377-87.
32. Ciapponi, L. and D. Bohmann, *An essential function of AP-1 heterodimers in Drosophila development*. Mech Dev, 2002. 115(1-2): p. 35-40.
33. Stronach, B., *Dissecting JNK signaling, one KKKinase at a time*. Dev Dyn, 2005. 232(3): p. 575-84.
34. Zahedi, B., et al., *Leading edge-secreted Dpp cooperates with ACK-dependent signaling from the amnioserosa to regulate myosin levels during dorsal closure*. Dev Dyn, 2008. 237(10): p. 2936-46.
35. Fernandez, B.G., A.M. Arias, and A. Jacinto, *Dpp signalling orchestrates dorsal closure by regulating cell shape changes both in the amnioserosa and in the epidermis*. Mech Dev, 2007. 124(11-12): p. 884-97.
36. Noselli, S. and F. Agnes, *Roles of the JNK signaling pathway in Drosophila morphogenesis*. Curr Opin Genet Dev, 1999. 9(4): p. 466-72.
37. Shimmi, O. and S.J. Newfeld, *New insights into extracellular and post-translational regulation of TGF-beta family signalling pathways*. J Biochem, 2013. 154(1): p. 11-9.
38. Franke, J.D., R.A. Montague, and D.P. Kiehart, *Nonmuscle myosin II generates forces that transmit tension and drive contraction in multiple tissues during dorsal closure*. Curr Biol, 2005. 15(24): p. 2208-21.
39. Pickering, K., et al., *Par3/Bazooka and phosphoinositides regulate actin protrusion formation during Drosophila dorsal closure and wound healing*. Development, 2013. 140(4): p. 800-9.
40. Ridley, A.J., *Rho GTPases and cell migration*. J Cell Sci, 2001. 114(Pt 15): p. 2713-22.
41. Harden, N., et al., *Participation of small GTPases in dorsal closure of the Drosophila embryo: distinct roles for Rho subfamily proteins in epithelial morphogenesis*. J Cell Sci, 1999. 112 (Pt 3): p. 273-84.
42. Magie, C.R., et al., *Mutations in the Rho1 small GTPase disrupt morphogenesis and segmentation during early Drosophila development*. Development, 1999. 126(23): p. 5353-64.
43. Ducuing, A. and S. Vincent, *The actin cable is dispensable in directing dorsal closure dynamics but neutralizes mechanical stress to prevent scarring in the Drosophila embryo*. Nat Cell Biol, 2016. 18(11): p. 1149-1160.

44. Hakeda-Suzuki, S., et al., *Rac function and regulation during Drosophila development*. Nature, 2002. 416(6879): p. 438-42.
45. Harden, N., et al., *A dominant inhibitory version of the small GTP-binding protein Rac disrupts cytoskeletal structures and inhibits developmental cell shape changes in Drosophila*. Development, 1995. 121(3): p. 903-14.
46. Jefferson, J.J., C.L. Leung, and R.K. Liem, *Plakins: goliaths that link cell junctions and the cytoskeleton*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. 5(7): p. 542-53.
47. Karakesisoglou, I., Y. Yang, and E. Fuchs, *An epidermal plakin that integrates actin and microtubule networks at cellular junctions*. J Cell Biol, 2000. 149(1): p. 195-208.
48. Lee, S., et al., *short stop is allelic to kakapo, and encodes rod-like cytoskeletal-associated proteins required for axon extension*. J Neurosci, 2000. 20(3): p. 1096-108.
49. Lee, S. and P.A. Kolodziej, *Short Stop provides an essential link between F-actin and microtubules during axon extension*. Development, 2002. 129(5): p. 1195-204.
50. Sun, D., C.L. Leung, and R.K. Liem, *Characterization of the microtubule binding domain of microtubule actin crosslinking factor (MACF): identification of a novel group of microtubule associated proteins*. J Cell Sci, 2001. 114(Pt 1): p. 161-172.
51. Brown, N.H., *Spectraplakins: the cytoskeleton's Swiss army knife*. Cell, 2008. 135(1): p. 16-8.
52. Roper, K., S.L. Gregory, and N.H. Brown, *The 'spectraplakins': cytoskeletal giants with characteristics of both spectrin and plakin families*. J Cell Sci, 2002. 115(Pt 22): p. 4215-25.
53. Sonnenberg, A. and R.K. Liem, *Plakins in development and disease*. Exp Cell Res, 2007. 313(10): p. 2189-203.
54. Broderick, M.J. and S.J. Winder, *Spectrin, alpha-actinin, and dystrophin*. Adv Protein Chem, 2005. 70: p. 203-46.
55. Machnicka, B., et al., *Spectrins: a structural platform for stabilization and activation of membrane channels, receptors and transporters*. Biochim Biophys Acta, 2014. 1838(2): p. 620-34.
56. Sharaby, Y., et al., *Gas2l3 is essential for brain morphogenesis and development*. Dev Biol, 2014. 394(2): p. 305-13.
57. Stroud, M.J., et al., *GAS2-like proteins mediate communication between microtubules and actin through interactions with end-binding proteins*. J Cell Sci, 2014. 127(Pt 12): p. 2672-82.

58. Wolter, P., et al., *GAS2L3, a target gene of the DREAM complex, is required for proper cytokinesis and genomic stability*. J Cell Sci, 2012. 125(Pt 10): p. 2393-406.
59. Huelsmann, S. and N.H. Brown, *Spectraplakins*. Curr Biol, 2014. 24(8): p. R307-8.
60. Aumailley, M., et al., *Molecular basis of inherited skin-blistering disorders, and therapeutic implications*. Expert Rev Mol Med, 2006. 8(24): p. 1-21.
61. Edvardson, S., et al., *Hereditary sensory autonomic neuropathy caused by a mutation in dystonin*. Ann Neurol, 2012. 71(4): p. 569-72.
62. Ferrier, A., J.G. Boyer, and R. Kothary, *Cellular and molecular biology of neuronal dystonin*. Int Rev Cell Mol Biol, 2013. 300: p. 85-120.
63. Young, K.G. and R. Kothary, *Dystonin/Bpag1--a link to what?* Cell Motil Cytoskeleton, 2007. 64(12): p. 897-905.
64. Bernier, G., et al., *Dystonin expression in the developing nervous system predominates in the neurons that degenerate in dystonia musculorum mutant mice*. Mol Cell Neurosci, 1995. 6(6): p. 509-20.
65. Brown, A., et al., *The mouse dystonia musculorum gene is a neural isoform of bullous pemphigoid antigen 1*. Nat Genet, 1995. 10(3): p. 301-6.
66. Liu, J.J., et al., *BPAG1n4 is essential for retrograde axonal transport in sensory neurons*. J Cell Biol, 2003. 163(2): p. 223-9.
67. Kodama, A., et al., *ACF7: an essential integrator of microtubule dynamics*. Cell, 2003. 115(3): p. 343-54.
68. Fassett, J.T., et al., *Microtubule Actin Cross-linking Factor 1 regulates cardiomyocyte microtubule distribution and adaptation to hemodynamic overload*. PLoS One, 2013. 8(9): p. e73887.
69. Goryunov, D., et al., *Nervous-tissue-specific elimination of microtubule-actin crosslinking factor 1a results in multiple developmental defects in the mouse brain*. Mol Cell Neurosci, 2010. 44(1): p. 1-14.
70. Wu, X., et al., *Skin stem cells orchestrate directional migration by regulating microtubule-ACF7 connections through GSK3beta*. Cell, 2011. 144(3): p. 341-52.
71. Prokop, A., et al., *The kakapo mutation affects terminal arborization and central dendritic sprouting of Drosophila motoneurons*. J Cell Biol, 1998. 143(5): p. 1283-94.
72. Reuter, J.E., et al., *A mosaic genetic screen for genes necessary for Drosophila mushroom body neuronal morphogenesis*. Development, 2003. 130(6): p. 1203-13.
73. Prout, M., et al., *Autosomal mutations affecting adhesion between wing surfaces in Drosophila melanogaster*. Genetics, 1997. 146(1): p. 275-85.

74. Roper, K. and N.H. Brown, *Maintaining epithelial integrity: a function for gigantic spectraplakins isoforms in adherens junctions*. J Cell Biol, 2003. 162(7): p. 1305-15.
75. Walsh, E.P. and N.H. Brown, *A screen to identify Drosophila genes required for integrin-mediated adhesion*. Genetics, 1998. 150(2): p. 791-805.
76. Young, K.G., M. Pool, and R. Kothary, *Bpag1 localization to actin filaments and to the nucleus is regulated by its N-terminus*. J Cell Sci, 2003. 116(Pt 22): p. 4543-55.
77. Hopkinson, S.B. and J.C. Jones, *The N terminus of the transmembrane protein BP180 interacts with the N-terminal domain of BP230, thereby mediating keratin cytoskeleton anchorage to the cell surface at the site of the hemidesmosome*. Mol Biol Cell, 2000. 11(1): p. 277-86.
78. Letunic, I., et al., *Recent improvements to the SMART domain-based sequence annotation resource*. Nucleic Acids Res, 2002. 30(1): p. 242-4.
79. Leung, C.L., K.J. Green, and R.K. Liem, *Plakins: a family of versatile cytolinker proteins*. Trends Cell Biol, 2002. 12(1): p. 37-45.
80. Suozzi, K.C., X. Wu, and E. Fuchs, *Spectraplakins: master orchestrators of cytoskeletal dynamics*. J Cell Biol, 2012. 197(4): p. 465-75.
81. Burgoyne, R.D., et al., *Neuronal Ca²⁺-sensor proteins: multitasking regulators of neuronal function*. Trends Neurosci, 2004. 27(4): p. 203-9.
82. Goriounov, D., C.L. Leung, and R.K. Liem, *Protein products of human Gas2-related genes on chromosomes 17 and 22 (hGAR17 and hGAR22) associate with both microfilaments and microtubules*. J Cell Sci, 2003. 116(Pt 6): p. 1045-58.
83. Slep, K.C., et al., *Structural determinants for EBI-mediated recruitment of APC and spectraplakins to the microtubule plus end*. J Cell Biol, 2005. 168(4): p. 587-98.
84. Hahn, I., et al., *Functional and Genetic Analysis of Spectraplakins in Drosophila*. Methods Enzymol, 2016. 569: p. 373-405.
85. Morin, X., et al., *A protein trap strategy to detect GFP-tagged proteins expressed from their endogenous loci in Drosophila*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(26): p. 15050-5.
86. Fulga, T.A. and P. Rorth, *Invasive cell migration is initiated by guided growth of long cellular extensions*. Nat Cell Biol, 2002. 4(9): p. 715-9.
87. Inoue, Y.H., et al., *Mutations in orbit/mast reveal that the central spindle is comprised of two microtubule populations, those that initiate cleavage and those that propagate furrow ingression*. J Cell Biol, 2004. 166(1): p. 49-60.

88. Alves-Silva, J., et al., *Spectraplakins promote microtubule-mediated axonal growth by functioning as structural microtubule-associated proteins and EB1-dependent +TIPs (tip interacting proteins)*. J Neurosci, 2012. 32(27): p. 9143-58.
89. Subramanian, A., et al., *Shortstop recruits EB1/APC1 and promotes microtubule assembly at the muscle-tendon junction*. Curr Biol, 2003. 13(13): p. 1086-95.
90. Takacs, Z., et al., *The spectraplakins Short stop is an essential microtubule regulator involved in epithelial closure in Drosophila*. J Cell Sci, 2017. 130(4): p. 712-724.
91. Bottenberg, W., *Neuronal differentiation and epithelial integrity: The role of Drosophila Short Stop*. Mainz: Johannes Gutenberg University., 2006.
92. Bottenberg, W., et al., *Context-specific requirements of functional domains of the Spectraplakins Short stop in vivo*. Mech Dev, 2009. 126(7): p. 489-502.
93. Jankovics, F., et al., *A functional genomic screen combined with time-lapse microscopy uncovers a novel set of genes involved in dorsal closure of Drosophila embryos*. PLoS One, 2011. 6(7): p. e22229.
94. Zeitlinger, J. and D. Bohmann, *Thorax closure in Drosophila: involvement of Fos and the JNK pathway*. Development, 1999. 126(17): p. 3947-56.
95. Ren, X., et al., *Genome editing in Drosophila melanogaster: from basic genome engineering to the multipurpose CRISPR-Cas9 system*. Sci China Life Sci, 2017. 60(5): p. 476-489.
96. Mali, P., et al., *RNA-guided human genome engineering via Cas9*. Science, 2013. 339(6121): p. 823-6.
97. Bassett, A.R. and J.L. Liu, *CRISPR/Cas9 and genome editing in Drosophila*. J Genet Genomics, 2014. 41(1): p. 7-19.
98. Lee, J., et al., *shot regulates the microtubule reorganization required for localization of axis-determining mRNAs during oogenesis*. FEBS Lett, 2016. 590(4): p. 431-44.
99. Sanchez-Soriano, N., et al., *Drosophila growth cones: a genetically tractable platform for the analysis of axonal growth dynamics*. Dev Neurobiol, 2010. 70(1): p. 58-71.
100. Asthana, J., et al., *Inhibition of HDAC6 deacetylase activity increases its binding with microtubules and suppresses microtubule dynamic instability in MCF-7 cells*. J Biol Chem, 2013. 288(31): p. 22516-26.
101. Matov, A., et al., *Analysis of microtubule dynamic instability using a plus-end growth marker*. Nat Methods, 2010. 7(9): p. 761-8.

102. Matsuyama, A., et al., *In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation*. *Embo j*, 2002. 21(24): p. 6820-31.
103. Tran, A.D., et al., *HDAC6 deacetylation of tubulin modulates dynamics of cellular adhesions*. *J Cell Sci*, 2007. 120(Pt 8): p. 1469-79.
104. Webster, D.R. and G.G. Borisy, *Microtubules are acetylated in domains that turn over slowly*. *J Cell Sci*, 1989. 92 (Pt 1): p. 57-65.
105. Zilberman, Y., et al., *Regulation of microtubule dynamics by inhibition of the tubulin deacetylase HDAC6*. *J Cell Sci*, 2009. 122(Pt 19): p. 3531-41.
106. Preciado Lopez, M., et al., *Actin-microtubule coordination at growing microtubule ends*. *Nat Commun*, 2014. 5: p. 4778.
107. Akhmanova, A. and M.O. Steinmetz, *Control of microtubule organization and dynamics: two ends in the limelight*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2015. 16(12): p. 711-26.
108. Chen, Y., M.M. Rolls, and W.O. Hancock, *An EBI-kinesin complex is sufficient to steer microtubule growth in vitro*. *Curr Biol*, 2014. 24(3): p. 316-21.
109. Doodhi, H., et al., *Mechanical and geometrical constraints control kinesin-based microtubule guidance*. *Curr Biol*, 2014. 24(3): p. 322-8.
110. Mattie, F.J., et al., *Directed microtubule growth, +TIPs, and kinesin-2 are required for uniform microtubule polarity in dendrites*. *Curr Biol*, 2010. 20(24): p. 2169-77.
111. Nishimura, Y., et al., *Automated screening of microtubule growth dynamics identifies MARK2 as a regulator of leading edge microtubules downstream of Rac1 in migrating cells*. *PLoS One*, 2012. 7(7): p. e41413.
112. Applewhite, D.A., et al., *The spectraplakins Short stop is an actin-microtubule cross-linker that contributes to organization of the microtubule network*. *Mol Biol Cell*, 2010. 21(10): p. 1714-24.
113. Sanchez-Soriano, N., et al., *Mouse ACF7 and drosophila short stop modulate filopodia formation and microtubule organisation during neuronal growth*. *J Cell Sci*, 2009. 122(Pt 14): p. 2534-42.
114. Wu, X., A. Kodama, and E. Fuchs, *ACF7 regulates cytoskeletal-focal adhesion dynamics and migration and has ATPase activity*. *Cell*, 2008. 135(1): p. 137-48.
115. Applewhite, D.A., et al., *The actin-microtubule cross-linking activity of Drosophila Short stop is regulated by intramolecular inhibition*. *Mol Biol Cell*, 2013. 24(18): p. 2885-93.

116. Gierke, S. and T. Wittmann, *EB1-recruited microtubule +TIP complexes coordinate protrusion dynamics during 3D epithelial remodeling*. Curr Biol, 2012. 22(9): p. 753-62.
117. Margaron, Y., N. Fradet, and J.F. Cote, *ELMO recruits actin cross-linking family 7 (ACF7) at the cell membrane for microtubule capture and stabilization of cellular protrusions*. J Biol Chem, 2013. 288(2): p. 1184-99.
118. Woolner, S., A. Jacinto, and P. Martin, *The small GTPase Rac plays multiple roles in epithelial sheet fusion--dynamic studies of Drosophila dorsal closure*. Dev Biol, 2005. 282(1): p. 163-73.
119. Girdler, G.C., et al., *The Gas2 family protein Pigs is a microtubule +TIP that affects cytoskeleton organisation*. J Cell Sci, 2016. 129(1): p. 121-34.

XI. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

MTMT azonosító: 10069249

Összesített IF: 10,164

1. A doktori eljárás alapját képező 2 db közlemény

The Spectraplakín Short stop is an essential microtubule regulator involved in epithelial closure in *Drosophila*.

J Cell Sci, 2017. 130 (4): p. 712-724.

Zsanett Takács, Ferenc Jankovics, Péter Vilmos, Péter Lénárt, Katja Röper, Miklós Erdélyi

Drosophila small ovary gene is required for transposon silencing and heterochromatin organization, and ensures germline stem cell maintenance and differentiation.

Development, 2018 Dec 4;145(23).

Ferenc Jankovics, Melinda Bence, Rita Sinka, Anikó Faragó, László Bodai, Aladár Pettkó-Szandtner, Karam Ibrahim, **Zsanett Takács**, Alexandra Brigitta Szarka-Kovács, Miklós Erdélyi

2. Referált folyóiratban megjelent közlemények

The Spectraplakín Short stop is an essential microtubule regulator involved in epithelial closure in *Drosophila*.

J Cell Sci, 2017. 130 (4): p. 712-724.

Zsanett Takács, Ferenc Jankovics, Péter Vilmos, Péter Lénárt, Katja Röper, Miklós Erdélyi

IF: 4.401

Drosophila small ovary gene is required for transposon silencing and heterochromatin organization, and ensures germline stem cell maintenance and differentiation.

Development, 2018 Dec 4;145(23).

Ferenc Jankovics, Melinda Bence, Rita Sinka, Anikó Faragó, László Bodai, Aladár Pettkó-Szandtner, Karam Ibrahim, **Zsanett Takács**, Alexandra Brigitta Szarka-Kovács, Miklós Erdélyi

IF: 5.763

3. Egyéb szakmai anyagok

Angol nyelvű konferencia előadás:

Analysis of the *Drosophila* Spectraplakin function during epithelial closure processes

Zsanett Lakatos, Ferenc Jankovics, Miklós Erdélyi

Conference for doctoral students in biology, Szeged 2016

Acta Biol Szeged, Vol:60, issue 1

Magyar nyelvű konferencia előadás:

A háti záródásban szerepet játszó mikrotubulus regulátorok azonosítása és in vivo vizsgálata ecetmuslicában

Lakatos Zsanett, Jankovics Ferenc, Erdélyi Miklós

Tavaszi Szél konferencia, Debrecen, 2014

Poszter előadás:

Identification and in vivo analysis of genes required for microtubule function in epithelial closure processes

Zsanett Lakatos, Ferenc Jankovics, Miklós Erdélyi

Hungarian Molecular Life Sciences, Siófok, 2013

Identification and characterisation of genes involved in embryonic dorsal closure in *Drosophila melanogaster*

Zsanett Lakatos, Ferenc Jankovics, Miklós Erdélyi

Straub Days, Szeged, 2013

The short stop (shot) gene is required for efficient epithelial closure in *Drosophila melanogaster*

Zsanett Lakatos, Ferenc Jankovics, Miklós Erdélyi

Hungarian Molecular Life Sciences, Eger, 2015