

**Genotípus – fenotípus kapcsolata Drosophila IV-es
típusú kollagén mutánsokban**

Ph.D. Tézis füzet



Kiss András Attila

Orvosi Biológiai Intézet

Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola

Általános Orvostudományi Kar

Szegedi Tudományegyetem

Témavezetők:

Dr. Mink Mátyás és Prof. Dr. Boldogkői Zsolt

Szeged

2020

A dolgozat témájához közvetlenül kapcsolódó publikációk

- I. Drosophila basement membrane collagen col4a1 mutations cause severe myopathy**
 Kelemen-Valkony I^a, Kiss M^a, Csiha J^a, **Kiss A^a**,
 Bircher U^a, Szidonya J^a, Maróy P^a, Juhász G^c,
 Komonyi O^a, Csiszár K^b, Mink M^a, *
Matrix Biology (2012)
<https://doi.org/10.1016/j.matbio.2011.09.004>
 MTMT azonosító: 2104514
IF: 3.19 (Q2)
- II. Drosophila type IV collagen mutation associates with immune system activation and intestinal dysfunction**
 Márton Kiss^a, **András A. Kiss^a**, Monika Radics^a,
 Nikoletta Popovics^a, Edit Hermeszb^b, Katalin Csiszár^c
 and Mátyás Mink^a
Matrix Biology (2016)
<https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.09.002>
 MTMT azonosító: 2962945
IF:7.4 (Q1)
- III. Altered stress fibres and integrin expression in the Malpighian epithelium of Drosophila type IV collagen mutants**
András A. Kiss^a, NikolettaPopovics^a, GáborSzabó^a,
 Katalin Csiszár^b, Mátyás Mink^a, *
Data in Brief (2016)
<https://doi.org/10.1016/j.dib.2016.03.059>
 MTMT azonosító: 3056130
IF: 0 (Q2)

- IV. 4-Hydroxy-2-nonenal Alkylated and Peroxynitrite Nitrated Proteins Localize to the Fused Mitochondria in Malpighian Epithelial Cells of Type IV Collagen *Drosophila* Mutants**
András A. Kiss¹, Nikoletta Popovics¹, Zsolt Boldogkői¹, Katalin Csiszár² and Mátyás Mink¹
BioMed Research International (2018)
<https://doi.org/10.1155/2018/3502401>
MTMT azonosító: 3326500
IF: 2.197 (Q2)
- V. Novel Phenotypic Elements of Type IV Collagenopathy Revealed by the *Drosophila* Model**
András A. Kiss¹, Nikoletta Somlyai-Popovics¹, Vilmos Tubak², Zsolt Boldogkői¹, Katalin Csiszár³ and Mátyás Mink^{1*}
Applied Sciences (2019)
<https://doi.org/10.3390/app9102083>
MTMT azonosító: 30686350
IF: 2.217 (Q2)
- VI. Type IV Collagen Is Essential for Proper Function of Integrin-Mediated Adhesion in *Drosophila* Muscle Fibers**
András A. Kiss¹, Nikoletta Somlyai-Popovics¹, Márton Kiss¹, Zsolt Boldogkői¹, Katalin Csiszár² and Mátyás Mink¹
International Journal of Molecular Sciences (2019)
<https://doi.org/10.3390/ijms20205124>
MTMT azonosító: 30881918
IF: 4.183 (Q2)

A dolgozat témájához közvetetten kapcsolódó publikációk

VII. Muscle dystrophy is triggered by type IVcollagen alleles affecting integrin binding sites directly or indirectly in *Drosophila*

Márton Kiss¹, Ildikó Kelemen-Valkony¹, **András Kiss¹**,
Brigitta Kiss², Katalin Csiszár³, Mátyás Mink¹

XXIIIed FECTS and ISMB Joint Meeting, August
25th–29th, 2012, Katowice, Poland

http://www.actabp.pl/pdf/Sup11_12/s3.pdf

MTMT azonosító: 3240354

IF: 1.185

Összesített impact factor: 20.372

Bevezetés

A kollagének szerepe

A többsejtű állatok sokféleségének kulcsa a sejtek azon képességében rejlik, hogy össze tudnak kapcsolódni és ily módon alakítják ki a szerveket és szöveteket. Ehhez a folyamathoz szupramolekuláris kapcsolat szükséges, hogy együtt tartsák őket. Ezek a molekuláris "összetartók" a kollagének. Az alapmembránt alkotó kollagénfehérjék triplahelikálisak és képesek egymáshoz kapcsolódni ¹. A meghatározott módon történő összekapcsolódás eredményeként létrejön egy szabályos hálózati struktúra. Ennek a hálónak az elsődleges funkciója egy tartószerkezet létrehozása, valamint jelentős rugalmasság és ellenálló képesség biztosítása a szervek és szövetek részére. Rendkívül fontos szerepet játszanak a sejtek migrációjában, a sejtek adhéziójában, a regenerációban és a jelátvitelben. A kollagén szupercsalád egy nagyon összetett család, 9 fő ² családba tartozik a 28 ismert kollagén és kollagén-szerű protein. Az összes kollagénfehérje közös szerkezeti jellemzővel rendelkezik,

de legalább triplahélix doménnel rendelkezik. A kollagén az egész testünkben megtalálható. Különböző típusú szervekben és szövetekben találhatjuk meg a jellegzetes kollagénhálózatokat. Ezek alkotják a porcot, a szem üveges testét, megtalálhatóak az érrendszer falában, a tüdőben, a vesében és az alapmembránban ³. A disszertációmban részletesebben foglalkozom a IV-es típusú kollagénnel.

A kollagének

Az emlősök három pár IV-es típusú kollagén gént hordoznak fej-fej elrendezésben, míg *Drosophilaban* csak egy pár van és a *col4a1* és *col4a2* lókusztok ugyanabban a genomi szerveződésben ⁴. A *COL4A3*, *COL4A4* és *COL4A5* gének mutációi az Alport-szindrómával ^{5,6} társulnak. Úgy tűnik, hogy a *COL4A5* és a *COL4A6* génekben lévő deléciók diffúz leiomyomatózist is okoznak ⁷. A $[COL4A1]_2COL4A2$ összetételű heterotrimerjei az emlősök alapmembránjainak legnagyobb arányban előforduló összetevői. A *Col4a1* vagy a *Col4a2* egér mutánsok reprezentálják a legöszetettebb szisztémás fenotípusokat, amelyek befolyásolják a központi

idegrendszer, szem, vese, pulmonális, érrendszeri, reprodukív és izomrendszereket ⁸⁻¹⁰, az embereknél is megjelennek ezek a tünetek ¹¹. A *COL4A1* mutációval szenvedő betegekben súlyos izomfenotípusokat mutattak ki, melyek többszervrendszeri rendellenességgel együtt (örökletes angiopathiával, nephropathival, aneurizmákkal és izomgörcsökkel) HANAC szindrómának neveznek ^{12,13}.

A *Drosophila col4a1* mutánsokban kondicionális, hőmérséklet-érzékeny allél sorozatot azonosítottak. A *col4a1*^{-/-} homozigóták embrionálisan letálisak, míg a *col4a1*^{+/-} heterozigóták életképes és termékenyek 20° C permisszív hőmérsékleten, de restriktív 29° C-os körülmények között elpusztulnak. Ezekben a mutánsokban súlyos myopathiát ⁴, szabálytalan és megvastagodott BM-t, a bél hám- és zsigeri izomsejtjeinek leválását a BM ¹⁴-ről, az antimikrobiális peptidek túlzott expresszióját, hidrogén-peroxidot és peroxinitrit túlterhelést mutattuk ki ¹². Kimutattuk továbbá a membrán lipidperoxidációját ¹⁵, az aktin stressz filamentumokat és a szabálytalan integrin expressziót a malpighi tubulus epiteliális sejtjeiben ¹⁶.

Eredményeink azt sugallják, hogy a *Drosophila col4a1* mutánsaiban ¹⁷ is felléphet az izomdisztrófia.

Az izomfenotípus jellemzésére a *col4a1* mutáns allél sorozaton immunhisztokémiai kísérleteket végeztünk. A rendellenes szarkomereket, a megváltozott integrin expressziót és a lokalizációt, a Z-korong diszorganizációját, streamingjét és atrófiáját a közös petevezeték harántcsíktolt izomzatára összpontosítva detektáltuk. Az eredményeink együttesen azt mutatják, hogy a mutánsok disztrófikus izomfenotípusa a kóros integrin a rendellenes COL4A1-el kialakított kölcsönhatásokból származik, ami alátámasztja az integrin-közvetített izomsejt-adhézió részeként a IV-es típusú kollagén meghatározó szerepét.

Célok

Kutatásomban kíváncsi voltam arra, hogy a *col4a1* mutációi hogyan befolyásolják a kiválasztott szervek működését. Ehhez a munkához a *Drosophila melanogaster*t választottam, mivel csak két *col4a* gént hordoz. Korábbi munkánk eredményeként kondicionális

col4a1 mutánsok álltak rendelkezésünkre, amelyekben képesek voltunk leírni annak hatásait a harántcsíkos izmok fejlődésére is.

Dolgozatomban összefoglalom megfigyeléseimet, amelyek célja annak megvizsgálása volt, hogyan változtak a *col4a1* mutációk eredményeként:

- A mutáns állatokban a COL4A1 protein mennyiségének változásai, hogy átfogóbb képet kapjunk a fejlődés két különböző fázisáról, különböző hőmérsékleteken.
- A *Drosophila melanogaster* közönséges petevezetékének immunfluoreszcens képei, amelyek a szarkomer szerkezetének változásait mutatják a *col4a1* mutáció következtében.
- A COL4A1 fehérjéhez kapcsolódó extracelluláris fehérjék vizsgálata a középbelben a fejlődés különböző szakaszaiban.

- A mutáció káros szisztémás természetének igazolására megvizsgáljuk a Malpighi tubulusok citoskeletális-extracelluláris tengelyében levő fehérjék változásait.
- Végezetül érdekelt, hogyan változik a mitokondriumok morfológiája a Malpighi tubulusokban a mutációk eredményeként.

Módszerek

Nyolc domináns hőmérséklet-érzékeny (DTS) mutáns *Drosophila melanogaster* törzssel rendelkezik a laboratóriumunk. A mutációk a 2. kromoszómán vannak, és mindegyikük pontmutáció, amely glicin aminosav cserét eredményez. A törzseket balancer kromoszómával (2. kromoszóma) tartottam fenn. A vad típusú Oregon legyek és a *col4a1* mutáns állományokat 20° C és 29° C hőmérsékleten tartottam, élesztő-kukoricadara-szacharóz-agar táptalajon, melyek nipagint tartalmaztak a gombás fertőzés megelőzésére. A malpighiális tubulusokat, a bél és a petefészket szén-dioxid altatás során távolítottam el az állatokból, akiket mind a restriktív, mind a permisszív

hőmérsékleten inkubáltam. Az immunfestést ezután különféle antitestekkel hajtottuk végre. A malpighi tubulusok, a középbél és a közös petevezeték mikroszkópos felvételeit konfokális lézeres pásztázó fluoreszcens mikroszkóppal készítettem. A statisztikai számításokat a Microsoft Office Excel és az ingyenes R-3.5.2 és RStudio-1.1.463 eszközökkel végeztem el. A Western blot-kísérletekhez egész legyekből készítettem a mintákat.

Eredmények és következtetések

A közös petevezeték és a larva testfalának mutáns fenotípusa ⁴ az összes vizsgált allélban mutatja a miopáthiás, vagy disztrófikus állapotokra jellemző tulajdonságokat. Az aktin kóros szerveződését és lerakódását, továbbá a szarkomer szerkezet szabálytalan és széteső megjelenését, a Z-korongok streamingjével ¹⁸.

Hipotézisünk szerint a COL4A1 fehérje expressziója alacsonyabb a mutáns legyekben, ezért Western blotot kísérletet végeztük. Véleményem szerint a pontmutációt hordozó gén hátrányosan befolyásolja az expressziót permisszív hőmérsékleten. Nem találtunk

különbséget felnőtt vad típusú és mutáns állatok között 20° C-on. A mutáns felnőtt állatokban azonban a COL4A1 fehérje mennyisége láthatóan csökkent a restriktív hőmérsékleten (29° C). Csoportunk korábbi eredményei azt mutatják, hogy a *col4a1* mRNS transzkripciós szintje nem csökkent. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a mutánsokban a COL4A1 fehérje szintjének 29° C-on csökkenő szintjét a nem megfelelő fehérje összeszerelődés és beépülés okozza.

Ezeket az eredményeket immunhisztokémiai módszerrel is kívántuk validálni és megjeleníteni, azt is érdekelt, hogy a COL4A1-vel kapcsolatba lépő citoszkeletális-extracelluláris tengely kialakításában részt vevő más fehérjék hasonló fenotípust mutatnak. A kiválasztott fehérjék a COL4A1, a PS I és PS II integrin alfa-alegységei és a Laminin gamma 1 volt. Megállapítottuk, hogy az integrin festése és a mutáns L3 lárvák közepbelében csökkenést mutatott permisszív hőmérsékleten. Ez a jelenség fokozódik restriktív hőmérsékleteken, az integrin eloszlása szabálytalan és felnőtt állatokban is megfigyelhető. A laminin expresszió

szintén csökkent a restriktív hőmérsékleten a mutáns L3 lárvák középbelében. A COL4A1 fehérje felhalmozódik a mutáns állatok középbelében és restriktív hőmérsékleteken további csökkenést, eloszlása diffúz és egyenetlen.

A közös petefészek és a középbel után egy másik szervet, a malpighi tubulust is bevontam a vizsgálatba, amely analóg az emlősök veseivel. Immunhisztokémiai festést végeztem különböző korú (3 és 18 napos) és különböző hőmérsékleten inkubált felnőtt állatok szervein. A vizsgált fehérjék az aktin, a COL4A1 és az integrin alfa PS I és PSII alegységek voltak. Felvételeink egyértelműen kimutatták, hogy a *col4a1* mutánsok a restriktív hőmérséklet következtében növelik az aktin stressz fibrillumok számát, csökkentik a COL4A1 fehérje szintjét, és az egyenetlen integrin eloszlást.

A stresszválasz részeként a *Drosophila col4a1* mutánsok fiziológiai koncentráció felett szintetizálják a peroxinitritet. A peroxinitrit túlzott termelése súlyos fehérje tirozin-nitrációt és fehérje alkilezést eredményez, amely hátrányosan befolyásolja ezek működését, valamint

membrán lipidperoxidációt és mitokondriális fúziót indukál. A vad típusú kontroll állatok nem mutatták ezeket a transzláció utáni módosításokat fiziológiai körülmények között, mivel a peroxinitrit eltávolításához a nitrozoperoxikarbonát utat használták. Megállapításunk szerint a *col4a1* *Drosophila* mutáns modellben a poszttranszlációs fehérjemódosítások a *col4a1*-hez kapcsolódó pathológia szerves részét képezik, és olyan mechanikus poszttranszlációsfehérje módosításokat képviselnek, amelyeket COL4A1 mutációval rendelkező emberekben, vagy egerekben még nem mutattak ki.

Irodalomjegyzék

1. Fidler, A. L. *et al.* Collagen IV and basement membrane at the evolutionary dawn of metazoan tissues. *Elife* **6**, (2017).
2. Ricard-Blum, S. & Ruggiero, F. The collagen superfamily: From the extracellular matrix to the cell membrane. *Pathol. Biol.* (2005) doi:10.1016/j.patbio.2004.12.024.
3. Myllyharju, J. *et al.* Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet.* (2004) doi:10.1016/j.tig.2003.11.004.
4. Kelemen-Valkony, I. *et al.* Drosophila basement membrane collagen col4a1 mutations cause severe myopathy. *Matrix Biol.* **31**, 29–37 (2012).
5. Alport, A. C. HEREDITARY FAMILIAL CONGENITAL HAEMORRHAGIC NEPHRITIS. *Br. Med. J.* **1**, 504–6 (1927).
6. Hudson, B. G., Tryggvason, K., Sundaramoorthy, M. & Neilson, E. G. Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome, and type IV collagen. *New England Journal of Medicine* (2003) doi:10.1056/NEJMra022296.
7. Zhou, J. *et al.* Deletion of the paired $\alpha 5(IV)$ and $\alpha 6(IV)$ collagen genes in inherited smooth muscle tumors. *Science* (80-.). (1993) doi:10.1126/science.8356449.
8. Gould, D. B. *et al.* Mutations in Col4a1 Cause Perinatal Cerebral Hemorrhage and Porencephaly. *Science* (80-.). **308**, 1167–1171 (2005).

9. Van Agtmael, T. *et al.* Dominant mutations of Col4a1 result in basement membrane defects which lead to anterior segment dysgenesis and glomerulopathy. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 3161–8 (2005).
10. Favor, J. *et al.* Type IV procollagen missense mutations associated with defects of the eye, vascular stability, the brain, kidney function and embryonic or postnatal viability in the mouse, *Mus musculus*: An extension of the Col4a1 allelic series and the identification of . *Genetics* (2007) doi:10.1534/genetics.106.064733.
11. Kuo, D. S., Labelle-Dumais, C. & Gould, D. B. Col4a1 and col4a2 mutations and disease: Insights into pathogenic mechanisms and potential therapeutic targets. *Hum. Mol. Genet.* (2012) doi:10.1093/hmg/dd346.
12. Kiss, M. *et al.* Drosophila type IV collagen mutation associates with immune system activation and intestinal dysfunction. *Matrix Biol.* **49**, 120–131 (2016).
13. Alamowitch, S. *et al.* Cerebrovascular disease related to COL4A1 mutations in HANAC syndrome. *Neurology* (2009) doi:10.1212/WNL.0b013e3181c3fd12.
14. Kelemen-Valkony, I., Kiss, M., Csiszár, K. & Mink, M. Inherited myopathies. in *Myopathies: New Research* (2013).
15. Kiss, A. A., Popovics, N., Boldogki, Z., Csiszár, K. & Mink, M. 4-Hydroxy-2-nonenal Alkylated and Peroxynitrite Nitrated Proteins Localize to the Fused Mitochondria in Malpighian Epithelial Cells of Type IV Collagen Drosophila Mutants. *Biomed Res. Int.* **2018**, (2018).

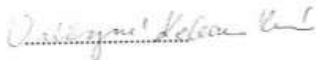
16. Kiss, A. A., Popovics, N., Szabó, G., Csiszár, K. & Mink, M. Altered stress fibers and integrin expression in the Malpighian epithelium of *Drosophila* type IV collagen mutants. *Data Br.* **7**, 868–72 (2016).
17. Kiss, A. A. *et al.* Type IV collagen is essential for proper function of integrin-mediated adhesion in *Drosophila* muscle fibers. *bioRxiv* 318337 (2018) doi:10.1101/318337.
18. Rahimov, F. & Kunkel, L. M. Cellular and molecular mechanisms underlying muscular dystrophy. *J. Cell Biol.* (2013) doi:10.1083/jcb.201212142.

Társszerzői lemondó nyilatkozat

Alulírott Valkonyné-Kelemen Ildikó (felelős társszerző) kijelentem, hogy Kiss András Attila (pályázó) PhD értekezésének tézispontjaiban bemutatott - közösen publikált - tudományos eredmények elérésében a pályázónak meghatározó szerepe volt, ezért ezeket a téziseket más a PhD fokozat megszerzését célzó minősítési eljárásban nem használta fel, illetve nem kívánja felhasználni.

2020.02.26.

dátum



szerző

A pályázó tézispontjaiban érintett, közösen publikált közlemények:

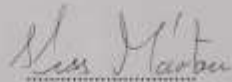
- I. **Drosophila basement membrane collagen col4a1 mutations cause severe myopathy**
Kelemen-Valkony I¹, Kiss M, Csiha J, **Kiss A**, Bircher U, Szidonya J, Maróy P, Juhász G, Komonyi O, Csiszár K, Mink M.
Matrix Biology (2012)
<https://doi.org/10.1016/j.matbio.2011.09.004>
MTMT azonosító: 2104514
- II. **Muscle dystrophy is triggered by type IV collagen alleles affecting integrin binding sites directly or indirectly in Drosophila**
Márton Kiss¹, Ildikó Kelemen-Valkony¹, **András Kiss¹**, Brigitta Kiss², Katalin Csiszár³, Mátyás Mink¹
XXIIIrd FECTS and ISMB Joint Meeting, August 25th–29th, 2012, Katowice, Poland
http://www.actabp.pl/pdf/Supl1_12/s3.pdf
MTMT azonosító: 3240354

Társszerzői lemondó nyilatkozat

Alulírott Kiss Márton (felelős társszerző) kijelentem, hogy Kiss András Attila (pályázó) PhD értekezésének tézispontjaiban bemutatott - közösen publikált - tudományos eredmények elérésében a pályázónak meghatározó szerepe volt, ezért ezeket a téziseket más a PhD fokozat megszerzését célzó minősítési eljárásban nem használta fel, illetve nem kívánja felhasználni.

2020.02.26.

dátum



szerző

A pályázó tézispontjaiban érintett, közösen publikált közlemények:

- I. ***Drosophila* type IV collagen mutation associates with immune system activation and intestinal dysfunction**
 Márton Kiss^a, **András A. Kiss^a**, Monika Radics^a, Nikoletta Popovics^a, Edit Hernesz^b, Katalin Csizsár^c and Mátys Mink^a
Matrix Biology (2016)
<https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.09.002>
 MTMT azonosító: 2962945

- II. ***Drosophila* basement membrane collagen col4a1 mutations cause severe myopathy**
 Kelemen-Valkony I¹, Kiss M, Csiba J, **Kiss A**, Bircher U, Szidonya J, Maróy P, Juhász G, Komonyi O, Csizsár K, Mink M.
Matrix Biology (2012)
<https://doi.org/10.1016/j.matbio.2011.09.004>
 MTMT azonosító: 2104514

III. **Type IV Collagen Is Essential for Proper Function of Integrin-Mediated Adhesion in *Drosophila* Muscle Fibers**

András A. Kiss¹, Nikolettta Somlyai-Popovics¹, Márton Kiss¹, Zoltán Boldogkői¹, Katalin Csizsár² and Mátyás Mink¹

International Journal of Molecular Sciences (2019)

<https://doi.org/10.3390/ijms20205124>

MTMT azonosító: 30881918

IV. **Muscle dystrophy is triggered by type IV collagen alleles affecting integrin binding sites directly or indirectly in *Drosophila***

Márton Kiss¹, Ildefikó Kelemen-Valkony¹, **András Kiss¹**, Brigitta Kiss², Katalin Csizsár², Mátyás Mink¹

XXIIIrd FECTS and ISMB Joint Meeting, August 25th–29th, 2012, Katowice, Poland

http://www.actabp.pl/pdf/Supl1_12/s3.pdf

MTMT azonosító: 3240354