

Sejtmag forgolódás és pozicionálás bökögető mikrotubulusokkal

Ph.D. értekezés tézisei

Szikora Szilárd

Biokémia, Biofizika és Sejtbiológia doktori
program

Szegedi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Orvosi Biológiai Intézet

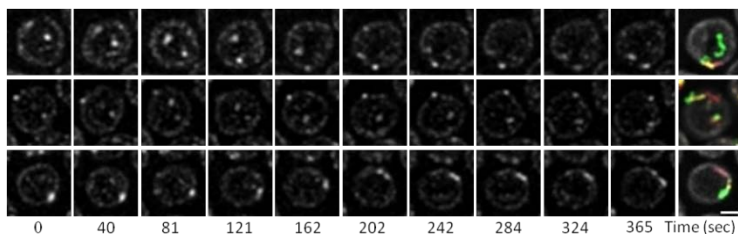
Szakvezető: Prof. Dr. Szabad János

Szeged, 2012.

BEVEZETÉS

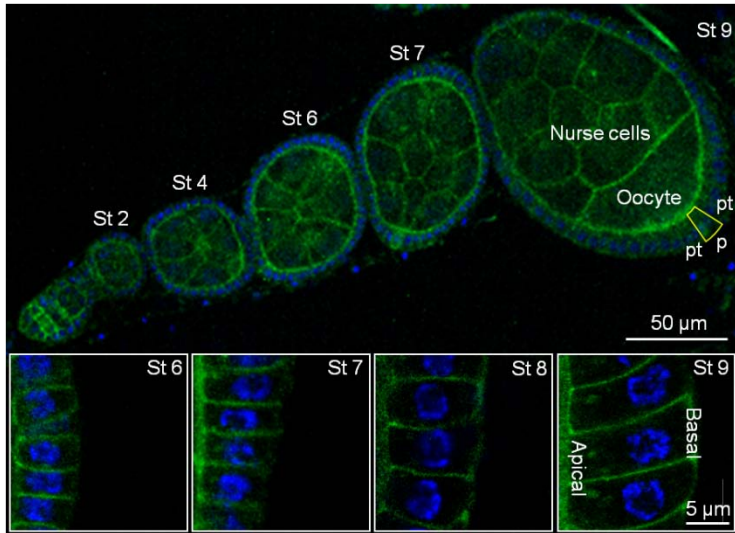
Közismert, hogy a magasabbrendű élőlények legtöbb sejtjében egyetlen sejtmag van, benne a kromoszómák, azokban pedig a DNS, amely a sejtek funkcióit irányítja. A sejtmag többnyire egy meghatározott pozícióban van a sejten belül (Morris, 2000). Hogyan kerül oda? Mi, és hogyan mozgatja a sejtmagot? Mi annak a jelentősége, hogy a sejtmag jól meghatározott helyen van? Mi történik, ha a sejtmag nem kerül a helyére? Munkánk során ezekre a kérdésekre kerestük a választ.

Miközben a citoplazma áramlás mechanizmusát tanulmányoztuk élő muslica petekezdeményekben (Gáspár and Szabad, 2009), arra lettünk figyelmesek, hogy a folliculáris sejtek magjai forgolódnak (1. ábra). A sejtmagok különös viselkedése azért tűnhetett fel, mert a sejtmaghártyába illeszkedő sejtmagpórus-komplexek zölden voltak kivilágítva, mocorgásuk feltűnő volt a felgyorsított sorozatfelvételeken (1. ábra).



1. ábra. Sejtmag forgolódás a muslica petekezdeményének folliculáris sejtjeiben. Folliculáris sejtek magjainak Importin- β -GFP mintázata 7. stádiumú petekezdeményekben. Az összevont képeken (utolsó oszlop) egyetlen pont mozgásának útvonalát jelöltük. A zöld az útvonal kezdetét, a piros az út végét jelöli. A GFP mintázat, egy adott sejtmag esetében perceként keresztül változatlan. A skála hossza: 2 μ m.

Miközben forgolódnak a sejtmagok, a sejt egyik végéből (apikális) a másik vég (bazális) közelébe jutnak, majd miután megérkeztek rendeltetési helyükre, megszűnik a mozgásuk (2. ábra). Úgy tűnt, mintha a sejtmagok forgolódása egy olyan mechanizmus megnyilvánulása lenne, amely a sejtmagokat a sejt megfelelő pontjába juttatja (a sejtmag pozicionálódásról bővebben lásd: Dupin and Etienne-Manneville, 2011). Alighanem azért, hogy a sejt funkcióit a legkedvezőbb helyről irányítsák.



2. ábra. Egy *Drosophila* petecső öt petekezdeménnyel, fejlődésük különböző stádiumában (St). A folliculáris sejtek egyetlen rétegben fedik a petesejtet, valamint a testvér dajkasejteket. A betét-képek 6-9. stádiumú petekezdemények folliculáris sejtjeit ábrázolják. Amíg a 6. stádiumban a sejtmagok az apikális membrán közelében vannak, addig a kilencedik stádiumra a bazális membrán közelébe kerülnek. A sejtmembránt Spider-GFP, a DNS-t Hoechst 33342 jelöli az élő petekezdemények optikai metszetein.

CÉLKITŰZÉSEK

Munkám céljai, pontokba szedve, a következők voltak:

1. Annak megállapítása, hogy a sejtmagpórus-komplexek elmozdulása csak a sejtmaghártya, vagy a teljes sejtmag elmozdulását reprezentálja.
2. A sejtmagok szokatlan mozgásának jellemzése, különös tekintettel az irány és a sebesség változásaira.
3. A sejtmagok mozgatásában résztvevő molekuláris faktorok azonosítása: a sejtváz mely elemei, és miként vesznek részt a sejtmag mozgásában?
4. Milyen szerepet játszanak a molekuláris motorok a sejtmag mozgatásában?
5. A petekezdemények fejlődésének mely szakaszára jellemző a follikuláris sejtek magjainak forgolódása?
6. Mi a jelentősége a sejtmagok forgolódásának, milyen fiziológiai folyamathoz köthető a megfigyelt jelenség?
7. Miért és hogyan áll meg a sejtmagok mozgása?

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

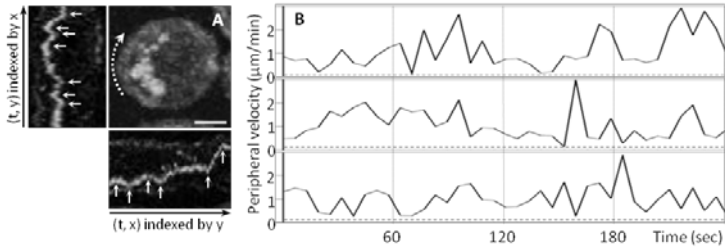
Kísérletes munkám pillére a muslica (*Drosophila melanogaster*) volt, nagyszerűen kidolgozott genetikájával, sejt- és fejlődésbiológiájával. Az alkalmazott molekuláris biológia technikák is a megszokottak voltak. A sejtbiológiai munkánk nélkülözhetetlen eszköze volt a konfokális mikroszkóp. Eredményeim a genetika, a molekuláris-, a sejt és a fejlődésbiológia eszköztárának felhasználásával születtek.

EREDMÉNYEK

Munkám legfontosabb eredményei, pontokba szedve, a következők (Szikora et al., 2012).

1. A különféle fluoreszcensen jelölt sejtalkotók optikai metszeteiből készült filmek alapján kimutattuk, hogy a sejtmagpórus-komplexek elmozdulása a sejtmagok egészének elmozdulását követik.
2. A sejtmagok mozgása a szomszédos follikuláris sejtekben egymástól független.

3. A sejtmagforgolódás a petefejlődés második stádiumától a kilencedikig tart.

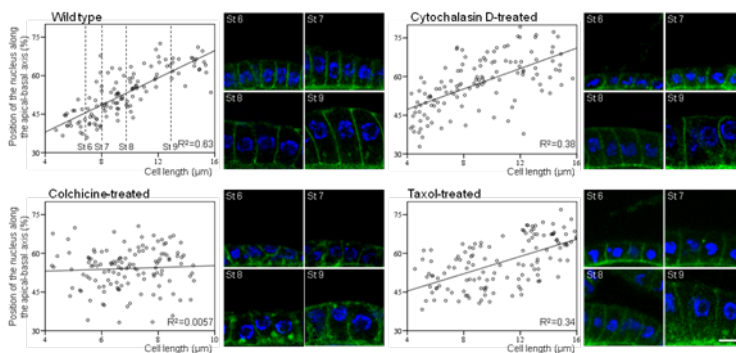


3. ábra. A sejtmagforgolódás jellemzése. (A) A mozgást leíró görbe (kimográf) egyetlen Importin- β -GFP foltot követ öt percen keresztül. A nyilak a mozgás irányváltásait jelölik. (B) Három példa a kerületi sebesség változásának bemutatására hetedik stádiumú petekezdeményekben.

4. A sejtmagok forgolódása szakaszos elfordulások sorozatából tevődik össze. Hirtelen irány és sebességváltások jellemzik. Semmilyen forgási tengelynek nincs nyoma (3. ábra).
5. A hatodik stádiumot követően a folliculáris sejtek megnyúlnak, bennük a sejtmagvak a bazális membrán irányába mozdulnak el (4. ábra).
6. Az aktin sejtváz elroncsolása a sejtmagvak forgolódását felgyorsítja. Ugyanakkor a sejtmagok

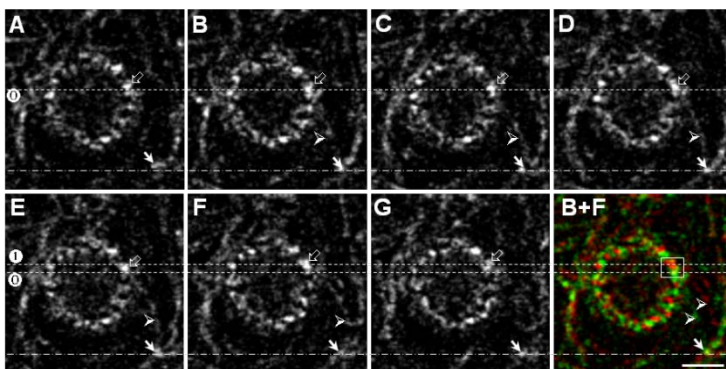
némelyike szokatlanul közel kerül a bazális membránhoz (4. ábra).

7. A sejtmagok forgolódása a dinamikus mikrotubulusoktól függ, azonban nem függ a mikrotubulus asszociált motorfehérjéktől. Nyomnyi kolhicin, valamint taxol kezelés hatására abbamarad a sejtmagforgolódás, a sejtmagvak pozícionálódása szabálytalanná válik (4. ábra).



4. ábra. A cytochalasin D, a kolhicin és a taxol hatása a sejtmag apikális-bazális tengely mentén történő pozícionálódására, a hatodiktól a kilencedik stádiumig. Minden pont egy sejtmagnak felel meg. A sejtmembránt Spider-GFP, a DNS-t Hoechst 33342 jelöli az élő petekezdemények optikai metszetein. A skála hossza: 5 μm.

8. A folliculáris sejtekben a mikrotubulusok az apikális-bazális tengely mentén szerveződnek. Negatív végük a sejtmembrán, pozitív (növekvő) végük a sejt belseje felé néz.
9. A növekvő mikrotubulusok beleütköznek a sejtmagba. Polimerizációjuk olyan nyomóerőt fejt ki, aminek hatására a sejtmag egy kicsit elfordul (5. ábra).



5. ábra. A sejtmagforgolódást a mikrotubulusok polimerizálódásának ereje hajtja. Az egymást követő optikai metszetek 17 másodpercen keresztül követik, ahogyan egy kortikális pontból eredő mikrotubulus a sejtmagba ütközik. A mikrotubulus meggörbülése az erőkifejtés egyértelmű jele. A mikrotubulus görbülését a sejtmag apró elfordulása követi. A B és F képek összevonásával láthatóvá válik a sejtmag elmozdulása és a mikrotubulus meggörbülése. A skála hossza: 2 μm .

10. A mikrotubulusok az 5-40 pikonewton (pN) erőt a sejtmagpórus-komplexeken át fejtik ki a sejtmagokra.

KÖVETKEZTETÉSEK

A sejtmag forgolódás egy eddig ismeretlen sejtmag pozícionálódási mechanizmus megnyilvánulása. A muslica petekezdemények follikuláris sejtjeiben a mikrotubulusok az apikális-bazális tengely mentén szerveződnek és nem a centroszóma a fő mikrotubulus organizáló központ, hasonlóan más epiteliális sejtekhez. A follikuláris sejtekben a dinamikus (növekvő és széteső) mikrotubulusok a sejtmagnak ütköznek. A növekvő mikrotubulusok nyomóerőt fejtenek ki az útjukba kerülő akadályra (Dogterom et al., 2005), ez esetben a sejtmagra. A sejtmagba ütköző mikrotubulusok a viszkózus citoplazmában elforgatják a sejtmagot. A véletlenszerű ütközések következtében a sejtmag forgolódása is véletlenszerű. A follikuláris sejtek polarizáltak, bennük az apikális és bazális membrán irányából növekvő mikrotubulusok száma eltér. Az eltérés következtében a bazális membrán felől több mikrotubulus ütközik a

sejtmagba, aminek eredményeként a sejtmag elsodródik az apikális membrán irányába, a hengerszerű folliculáris sejtekben. Végeredményben a sejtmag aszimmetrikusan pozícionálódik a polarizált folliculáris sejtekben. A sejtmagot a végleges pozíciójában az aktin filamentumok rögzítik a bazális membrán közelében, a sejtmaghártyába ékelődő „híd-fehérjék” (SUN és KASH fehérjék) közvetítésével (Yu et al., 2006).

AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

Ph.D. értekezésem eredményei a következő pontokban foglalhatók össze.

1. Megismertünk, és jellemeztünk egy korábban nem értett sejtmagmozgást, a sejtmagvak forgolódását.
2. Kimutattuk, hogy a sejtmagforgolódás, a dinamikus mikrotubulusoktól függő folyamat.
3. A növekvő mikrotubulusok képesek nyomóerőt kifejteni az 5-40 pN tartományban.
4. A folliculáris sejtekben a mikrotubulusok az apikális-bazális tengely mentén szerveződnek.

5. A sejtmagot az apikális-bazális irányból érkező „toló” mikrotubulusok pozícionálják a follikuláris sejten belül. A sejtmagvak forgolódása és sodródása a sejtmagvaknak a sejten belüli pozícionálásának eleddig ismeretlen mechanizmusára derített fényt.
6. A sejtmagot az aktin filamentumok rögzítik a bazális membrán közelében.

IRODALOM

Gaspar, I. and Szabad, J. (2009). In vivo analysis of MT-based vesicle transport by confocal reflection microscopy. *Cell Motil. Cytoskeleton* 66, 68-79.

Dogterom, M., Kerssemakers, J. W., Romet-Lemonne, G. and Janson, M. E. (2005). Force generation by dynamic microtubules. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17, 67-74.

Dupin, I. and Etienne-Manneville, S. (2011). Nuclear positioning: Mechanisms and functions. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 43, 1698-1707.

Morris, N. R. (2000). Nuclear migration. from fungi to the mammalian brain. *J. Cell Biol.* 148, 1097-1101.

Yu, J., Starr, D. A., Wu, X., Parkhurst, S. M., Zhuang, Y., Xu, T., Xu, R. and Han, M. (2006). The KASH domain

protein MSP-300 plays an essential role in nuclear anchoring during drosophila oogenesis. *Dev. Biol.* 289, 336-345.

AZ ÉRTEKEZÉS PILLÉREKÉNT SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

Tudományos dolgozat

Szilard Szikora, Imre Gaspar and Janos Szabad, Poking microtubules bring about nuclear wriggling to position nuclei

Journal of Cell Science 114355; Advance Online Publication October 17, 2012. IF: 6.110

Tudományos népszerűsítő dolgozat

Szikora Szilárd, Gáspár Imre és Szabad János, Hogyan kerülnek helyükre a sejtmagok?

Természet Világa **141**, 303-306, 2010.

A doktori munkámhoz kapcsolódó dolgozatok:

Villányi, Z., Papp, B., **Szikora, S.**, Boros, I. and Szabad, J., The DRE motif is a key component in the expression regulation of the importin-b encoding Ketel gene in Drosophila. *Mechanisms of Development* **125**, 822–831, 2008. IF: 3.160

Zoltán Villányi, Imre Gáspár, **Szilárd Szikora**, László G. Puskás and János Szabad, Importin- β and peroxiredoxin-6005 are involved in mitochondrial biogenesis.

Mechanisms of Development **128**, 191-199, 2011. IF:
3.160

Tudományos konferenciákon elhangzott előadások

(Az előadást az első szerző tartotta.)

Szikora Szilárd, Gáspár Imre és Szabad János, Forgolódó sejtmagvak?!

”Genetikai Műhelyek Magyarországon” VII. Minikonferencia Szeged, 2008. szeptember 9.

Szikora Szilárd, Gáspár Imre és Szabad János, Forgolódó sejtmagvak.

VIII. Magyar Genetikai Kongresszus, XV. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok Nyíregyháza, 2009. április 17-19.

Szilard Szikora, Imre Gáspár and János Szabad, Wiggling nuclei reveal a novel nuclear positioning mechanism.

International PhD Conference Szeged, 2010 May 17-18

János Szabad, Szilard Szikora and Imre Gáspár, Nuclear Positioning. Systems Biology of Development.

EMBO Workshop. Ascona, Switzerland, August 16–20, 2010.

Szikora Szilárd, Gáspár Imre és Szabad János, Egy új sejtmag pozícionálódási mechanizmus.

”Genetikai Műhelyek Magyarországon” IX. Minikonferencia, Szeged, 2010. szeptember 3.

Szikora Szilárd, Gáspár Imre és Szabad János, Sejtmag pozícionálás bökődő mikrotubulusokkal. IX. Magyar Genetikai Kongresszus és XVI. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Siófok, 2011. március 25-27.

Posztterek

Szilárd Szikora, Imre Gáspár and János Szabad, Wiggling nuclei reveal novel nuclear positioning mechanism.

EMBO Conference Series (1st) on Microtubules: structure, regulation and functions, Heidelberg, Germany, June 2-5, 2010.

Szilárd Szikora, Imre Gáspár and János Szabad, Wiggling nuclei reveal novel nuclear positioning mechanism.

42. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2012. május 15-18.

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki témavezetőmnek, Szabad Jánosnak, szakmai útmutatásáért, segítőkész munkájáért. Természetesen azok az eredmények, amelyek a Ph.D. dolgozatom alapját adják, csoportmunka gyümölcsei. Különösen hálás vagyok Gáspár Imrének a mindennapos beszélgetésekért, a közösen folytatott kísérletekért. Továbbá köszönet illeti a Szabad műhely munkatársait, Villányi Zoltánt, Venkei Zsoltot, Kerényi Farkast és Szalontai Tamást, akikkel kellemes éveket töltöttünk együtt, akiktől sokat tanultam.

A „Sejtmag forgolódás” projekt a következő forrásokra támaszkodott: OTKA pályázat (OTKA NI-69180), valamint a Szegedi Tudományegyetem Ph.D. programja.