

Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem

PhD értekezés

**A forminok átfogó jellemzése a *Drosophila* embrionális háti
záródás során**

Tóth Krisztina



Témavezető:

Dr. Mihály József

Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Genetikai Intézet

Szeged

2022

RÖVIDÍTÉSEK

Arm	Armadillo
AS	amnioszeróza
Capu	Cappuccino
Cas9	CRISPR-associated protein 9
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CyO	Curly of Oster
DAAM	Dishevelled associated activator of morphogenesis
Dia	Diaphanous
DNA	Deoxyribonucleic Acid
Dpp	Decapentaplegic
EGFP	Green fluorescent protein
en	engrailed
F-actin	Filamentous actin
Fhos	Formin homology 2 domain-containing
FL	full length
Form3	Formin3
Frl	formin-related proteins in leukocytes
GFSTF	EGFP-FIAsH-StrepII-TEV-3xFlag
GTP	guanosine triphosphate
HRP	Horseradish peroxidase
JNK	Jun N-terminal kinase
LE	leading edge
LSM	laser point scanning confocal microscope
Moe	Moesin
ns	nem szignifikáns
PCR	Polymerase chain reaction
Rho	Ras homologous
RNS	Ribonukleinsav
TM3	Third Multiple 3
twi	twist
UAS	Upstream Activation Sequence
ZASP52	Z band alternatively spliced PDZ-motif protein 52

KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

1. Az értekezéshez kapcsolódó közlemények listája

- I. Krisztina Tóth**, István Földi, József Mihály. A Comparative Study of the Role of Formins in *Drosophila* Embryonic Dorsal Closure. CELLS 11 : 9 Paper: 1539 , 18 p. (2022)

IF: 6.6 (Q1)

- II.** Szilárd Szikora, István Földi, **Krisztina Tóth**, Ede Migh, Andrea Vig, Beáta Bugyi, József Maléth, Péter Hegyi, Péter Kaltenecker, Natalia Sanchez-Soriano, József Mihály. The formin DAAM is required for coordination of the actin and microtubule cytoskeleton in axonal growth cones. JOURNAL OF CELL SCIENCE 130 : 15 pp. 2506-2519. , 14 p. (2017)

IF: 4.401 (Q1)

A tézishez kapcsolódó publikációk kumulatív impakt faktora: 10,001

1. Nem közvetlenül az értekezéshez kapcsolódó közlemények listája

- I.** István Földi*, **Krisztina Tóth***, Rita Gombos, Péter Gaszler, Péter Görög, Ioannis Zygouras, Beáta Bugyi, József Mihály. Molecular Dissection of DAAM Function during Axon Growth in *Drosophila* Embryonic Neurons. CELLS 11 : 9 Paper: 1487 , 20 p. (2022)

IF: 6.6 (Q1)

*: megosztott elsőszerező

BEVEZETÉS

A *Drosophila* embrionális háti záródás egy kitűnő modellrendszer a sejtalakváltozások és a sejtvezérendeződések vizsgálatára. Ezen késői morfogenetikai folyamat során egy extraembrionális szövet, az amnioszeróza (AS), által borított háti nyílás az oldalsó epidermális sejtrétegek megnyúlásával bezáródik. Kezdőpontjának közvetlen a csíraszalag visszahúzódnása utáni időpillanatot, az embrionális fejlődés 12. stádiumát tekintjük, a végpont pedig a fejlődési folyamat 15. stádiumáig tart. Eközött a két stádium között az epitél sejtek háti nyíláshoz legközelebb eső sora, ún. vezető él (leading edge, LE) sejtek, dorzoventrálisan megnyúlik és egy aktin kábelt hoz létre a háti nyílás körül, az AS sejtek elkezdnek összehúzódnani és filopódiumok és lamellipódiumok nyúlnak ki a LE sejtekből, melyek végül a középvonal irányában összehúzzák a szemközti epitél rétegeket egy hegmentes kapcsolatot kialakítva közöttük.

A háti záródás egy igen összetett folyamat, mely sikerességéhez legalább három különböző erő együttes jelenléte szükséges: az AS sejtek összehúzódnása, az aktin kábel feszítő hatása a LE sejtekben és a két hámréteg összecipzározódása. Ezen erők egyik legfőbb szabályozója az F-aktinból és nem-izom Miozin II-ből álló aktomiozin hálózat, mely az AS sejtekben a medioapikális régióban található, emellett egy gyűrűt alakít ki az AS-AS adherens kapcsolatoknál, továbbá a LE sejtek anterior részén és az epidermális valamint AS sejtek kapcsolódási pontjain helyezkedik el. Az aktomiozin hálózat által létrehozott legjelentősebb erő, az AS sejtek pulzáló apikális összehúzódnása, mely a környező epidermist dorzális irányba húzza. Ezen összehúzódnások során átmenetileg egy F-aktin/nem-izom Miozin II fókusz jelenik meg a medioapikális régióban, továbbá a sejt-sejt kapcsolatoknál lévő miozin szint is változik.

A másik jelentős erőképző a LE sejtek által termelt sejt-kívüli aktomiozin kábel a háti nyílás körül. Az aktomiozinon kívül egy további esszenciális építőeleme ennek a kábelnek a ZASP52 (Z band alternatively spliced PDZ-motif protein) fehérje, továbbá megállapították, hogy a nem-izom Miozin II nehéz és könnyű lánc is nélkülözhetetlen építőeleme ezen struktúrának. Az aktomiozin kábel fő szerepe a LE sejtek frontjának kifeszítése, emellett a sejtek közötti interakciókat is stabilizálja és elősegíti a hám hegesedés nélküli záródását. A másik jelentős eleme a háti záródásnak a LE filopódiumaiban elhelyezkedő aktin és mikrotubulus kötegek, melyek a hám összecipzározásáért felelnek. A folyamat során az azonos paraszegmentális információval rendelkező LE sejtek felismerik egymást és adhéziós

kapcsolatot alakítanak ki a másikkal, miközben az összegyűrődő AS szövetet lenyomják az embrió belsejébe.

Az elmúlt néhány évtizedben végzett kutatások rengeteg olyan fehérjét azonosítottak, amelyek az aktomiozin rendszerek kialakulásához és szabályozásához járulnak hozzá a háti záródás során. Ilyenek például a JNK és Dpp szignalizációs útvonalak, melyek a sejten kívüli aktomiozin kábel kialakulását segítik, aminek az összehúzódását pedig a Rho GTPázok szabályozzák. Emellett a Rho effektorok egy másik osztályát képviselő aktin összeszerelő faktorok, a Diaphanous-szerű forminok két tagjáról is kimutatták, hogy szerepet játszanak a háti záródás folyamatában.

A formin fehérje család a legnagyobb sejtvázsabályozók közé tartozik tekintve *de novo* aktin nukleációs képességét és a nem elágazódó aktin filamentumok elongációjának segítségét. Az aktin szabályzás mellett néhány forminról kimutatták, hogy képesek kölcsönhatásba lépni a mikrotubulusokkal is és szerepet játszanak az aktin-mikrotubulus sejtvázak keresztkötésében is. Míg a gerinces genom 15 formin gént kódol összesen, addig a *Drosophila*-ban csupán 6 formin gén található: Diaphanous (Dia), formin-related proteins in leukocytes (Frl), Dishevelled associated activator of morphogenesis (DAAM), Formin homology 2 domain-containing (Fhos), Cappuccino (Capu) és Formin3 (Form3). Ezek közül a citokinézis során nélkülözhetetlennek tartott Dia a háti záródás számos aspektusában részt vesz, mint például az adherens kapcsolatok stabilizálása, a nem-izom Miozin II szabályozása a záródási folyamat során és hatással van a filopodiumok képződésére mind a LE mind az AS sejtekben. Az Frl, a másik háti záródáshoz köthető formin pedig az AS sejtek medioapikális aktin alpopulációjának kialakulását szabályozza.

CÉLKITŰZÉSEK

A *Drosophila* embrionális háti záródás egy igen összetett folyamat, mely kialakításában számos szövet és erő vesz részt. Utóbbi a dinamikus sejtalak változások és sejtváz átrendeződések segítségével irányítja a záródást. A folyamat jobb megértése érdekében szükséges felfedni a különböző sejtvázelemek szabályozásának módját. A folyamat egyik fő sejtvázalkotó eleme az aktin, mely számos fehérje által szabályozott. Az egyik ilyen fehérje a már jól jellemzett formin fehérje család, melynek két tagja a Dia és az Frl már bizonyítottan részt vesz a háti záródás szabályzásában. A Dia az adherens sejt-sejt kapcsolatok stabilizálásában vesz részt mind a LE, mind az AS sejtekben, továbbá a filopódiumok és lamellipódiumok kialakításáért felelős szintén ezekben a sejtekben. Az Frl pedig egy specifikus aktin alpopuláció összeszerelődését irányítja az AS sejtekben. Érdekes módon ezen forminok funkcióvesztéses vizsgálata alapján megállapítható, hogy hiányukban is végbemegy a háti záródás, tehát nem esszenciális résztvevői a folyamatnak, inkább a záródás sejtes dinamikájáért felelősek. Ezen eredmények rávilágítanak a folyamat robusztusságára és valószínűsítik, hogy az eltérő aktin alpopulációk szabályzásában különböző fehérjék vesznek részt. Így feltételezhető, hogy más formin típusú aktin szabályozók is szerepet játszanak a háti záródásban, amelyek valószínűsíthetően a Dia és az Frl forminok által szabályozott aktin hálózattól eltérő populációt szabályoznak. Annak érdekében, hogy megválaszolhassuk ezt a kérdést, a *Drosophilában* jelenlévő 6 formin háti záródás folyamatában betöltött szerepének átfogó elemzését tűztük ki célul, melyhez a *form3* génre specifikusan egy új formin null mutáns törzset kellett létrehoznunk, és egy új módszert kellett kifejlesztenünk, mellyel képesek vagyunk megmérni a kívánt dinamikai paramétereket.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

1. *Drosophila* törzsek és genetika

A legyeket 25°C-on standard körülmények között tartottuk fenn. A kísérletekhez a következő törzseket használtuk fel: *w¹¹¹⁸* (BL #3605), *Form3-GFSTF* (BL #65385), *Capu-GFSTF* (BL #66507), *Arm::GFP* (BL #8556) and *69B-Gal4* (BL #1774) melyeket a Bloomington *Drosophila* Stock Center biztosított, *dDAAM^{Ex4}* (Gombos és mtsai., 2015), *en-Gal4,UAS-Moe::mCherry* (Jankovics és mtsai., 2011), *frl⁵⁹* (Dehapoit et al 2020); *dia¹/CyO* (Castrillon és mtsai., 1993) és *form3¹* (lásd lentebb). A zigotikus mutánsokat *CyO*, *twi-Gal4*, *UAS-EGFP* vagy *TM3*, *twi-Gal4*, *UAS-EGFP* balanszer kromoszómák segítségével válogattuk ki; a fehérje és mRNS expressziós adatokat pedig a FlyBase-ből nyertük. Az *UAS-FL-Form3* és az *UAS-FL-Form3 I450A* transzgenikus vonalakat standard klónozási technikával hoztuk létre pTWF-attB vektor segítségével.

A *form3¹* mutáns törzset CRISPR/Cas9 technikával hoztuk létre. A *form3* első intronjára és az utolsó kódoló exonra homológ, két 20 bp hosszú gRNS szekvenciát (TCGCCACCTGTCCTCCGGA és TGGGTCGCATGAAGCTGCT) terveztünk és klónoztunk pCFD4 vektorba. A várt deléciós mutánsok könnyebb detektálása érdekében egy a *form3* génbe inszertálódott GFP markert tartalmazó törzset (BL #23411) használtunk az injektálás során. A guide RNS-t expresszáló plazmid és a Cas9 együttes injektálását követően a lárvális utódokban a GFP marker hiányára szelektáltunk, majd a jelölteket PCR szekvenálással validáltuk. A szekvenálás adatai alapján megállapítottuk, hogy a várt 13.559 bp deléción jelen van a mutáns törzs genomjában. Tekintve, hogy ebben a törzsben csak 37 bp nukleotid maradt vissza a kódoló régióból, a *form3¹* allélt fehérje null allélnak tekintjük, mely homozigóta életképes és fertilis, bár a vad típushoz képest csökkent életképességet és fertilitást mutat.

2. Ellenanyag készítés

Az Frl antitestet patkányban állítottuk elő az Frl 687-1183 aminosavait tartalmazó tisztított rekombináns fehérjével végzett immunizálás során. A szérumot standard módszerekkel gyűjtöttük össze, majd az antitest specificitását Western boltal igazoltuk.

3. Immunhisztokémia

A *Drosophila* embriók fixálását és immunfestését a Jankovics és Brunner (Jankovics és Brunner, 2008) által leírt protokollt követve végeztük. Felhasznált antitestek: nyúl anti-Zipper (Chougule és mtsai., 2016) 1:100, nyúl anti-Dia (ajándék S. Wassermantól, University of California, San Diego, La Jolla, CA) 1:200, patkány anti-Frl (lásd lentebb) 1:500, nyúl anti-DAAM-R4 (Gombos és mtsai., 2014) 1:500, patkány anti-FHOS (Schwartz és mtsai.,

2016) 1:200, csirke anti-GFP (Abcam) 1:1000, egér anti-Flag (Sigma) 1:500, egér 2A12 (Developmental Studies Hybridoma Bank) 1:40. Másodlagos antitestek: Alexa-488 vagy Alexa-546 (ThermoFisher Scientific) 1:600. Az aktint Alexa-488, Alexa-546 vagy Alexa-647 konjugált phalloidinnel festettük (ThermoFisher Scientific) 1:80. Az embriókat ProLong Gold (Life Technologies) fakulás gátló reagensbe ágyasztuk be.

A képképzés egy Airyscan detektorral rendelkező Zeiss LSM880 konfokális mikroszkóp segítségével történt, 40x/NA 1.3 olajos vagy 63x/NA 1.4 olajos objektíveket használva. Az elkészült képeken az utómunkálatokat a Huygens Professional (Scientific Volume Imaging) és a Fiji (Schindelin és mtsai., 2012) szoftverek segítségével végeztük.

4. Western blot analízis

A Western blottok standard protokoll alapján készültek. Patkány anti-aktin (1:10.000, MAC 237, Abcam), nyúl anti-Dia (1:2000, ajándék S. Wassermantól, University of California, San Diego, La Jolla, CA), patkány anti-Frl (1:1000, lásd lentebb), nyúl anti-DAAM-R4 (1:5000, Gombos és mtsai., 2015) és egér anti-Flag (1:1000, M2, Sigma-Aldrich) antitesteket használtunk elsődleges ellenanyagként. Másodlagos ellenanyagként anti-nyúl-HRP (1:10.000; Jackson) és anti-egér IgG-HRP (1:5000, Dako) antitesteket használtunk. A fehérjéket kemilumineszcens Millipore Immobilon kit segítségével detektáltuk.

5. *In vivo* videómikroszkópia és képanalízis

Az embriókat 50%-os hipóval történő dekontaminálás után vízbe ágyazva egy üveg aljú petri csészébe (MatTek) sorakoztattuk fel, majd Zeiss LSM880 konfokális lézer scanning mikroszkóp segítségével 40x/NA 1.3 olajos vagy 20x/NA 0.8 száraz objektíveket használva videófelvételeket készítettünk róluk. Valamennyi felvétel 25 °C-on készült. A háti záródás analíziséhez (20x objektív) a Z tengely mentén 4 perces időközönként 14 optikai metszetet vettünk fel, melyek 1,2 µm távolságban helyezkedtek el egymástól. Az AS dinamikai paramétereinek vizsgálatához (40x objektív) a Z tengely mentén 30 másodperces időközönként 11 optikai metszetet vettünk fel, melyek 0,9 µm távolságban helyezkedtek el egymástól.

A képfeldolgozás és adatelemzés a Fiji szoftver (Schindelin és mtsai., 2012) és a Microsoft Excel 2016 programmal történt.

6. Trachea analízis

A trachea analízise során elemeztük milyen mértékben szakadozott a hátoldali fő légvezeték. Ehhez számszerűsítettük azt, hogy milyen mértékben folytonos a kilenc szegmenthatár.

7. AS sejt dinamika

Az AS sejtek összehúzódásának mérése érdekében a Z tengely mentén elkészült optikai metszeteket egyesítettük, majd a Fiji Tissue Analyzer plugin segítségével szegmentáltuk. Amennyiben szükség volt rá, kézzel korrigáltuk az elkészült képeket. A háti nyílás 50 μm -es szélességénél 15 perces időablakban mértük le a hat legközpontibb elhelyezkedésű AS sejt felszínének területét. Ez az időablak nagyjából a záródási folyamat közepén helyezkedik el, és kiváló mind a mérés standardizálására, mind a magas minőségű felvételek készítésére. A relatív apikális terület változások normalizálása Pasakarnis és munkatársai (Pasakarnis és mtsai., 2016) által leírtak szerint történt meg. Felhasználva ezen normalizált értékeket az Excel „HA” és az „ÉS” függvényeivel kiszámítottuk az egyes amplitúdók magasságát és gyakoriságát.

8. AS sejt alak

Az AS sejt alak meghatározás elvégzéséhez a háti nyílás 50 μm szélességétől számítva 15 percen keresztül méréseket végeztünk, mely során megmértük az éppen aktuális sejt területét ($AS_{area}(t_x)$) és a kapott értéket elosztottuk a területre illesztett konvex sokszög területével ($Ch_{area}(t_x)$). Ily módon egy olyan arányszámot kaptunk, mely megfeleltethető a szegmentált sejtalak konvolúciós szintjének: $N(t_x) = AS_{area}(t_x)/Ch_{area}(t_x)$

A vizsgált AS sejtek azonosak voltak azokkal, amelyeket az AS sejt összehúzódások során mértünk meg.

9. AS sejt terület

A háti nyílás 50 μm -es szélességénél a Fiji „wand” eszközét használva mértük meg a szegmentált képeken az AS sejtek területét. A vizsgált AS sejtek azonosak voltak azokkal, amelyeket az AS sejt alak meghatározások során mértünk meg.

10. Filopódium szám és hossz

A filopódium darabszámok és hosszuk meghatározásához a Fiji „line” eszközét használtuk. Segítségével hat *en-Gal4* pozitív szegmenst vizsgáltunk meg embriónként, amikor a két epidermális réteg 30-50 μm távolságban volt egymástól.

11. A háti záródás paraméterei

A háti nyílás magasságával és szélességével kapcsolatos méréseket egyesített optikai szeleteken végeztük a Fiji „line” kijelölő eszközét használva. Méréseink kezdőpontjaként a csíraszalag visszahúzódását követően, a fej kialakulásának kezdetét határoztuk meg. A vezető élek középvonalhoz tartó záródásának sebességét a Pasakarnis és munkatársai (Pasakarnis és mtsai., 2016) által leírtak szerint mértük meg. A cipzározódás sebességét az alábbi egyenlet szerint számítottuk ki: $v(t_x) = ((length(t_x) - length(t_{x+1}))/\Delta t)$, ahol a $v(t_x)$ a cipzározódás

sebességét, a $length(t_x)$ a háti nyílás hosszát jelöli egy adott képkockán, míg a $length(t_{x+1})$ a háti nyílás hosszának feleltethető meg a következő képkockán. A Δt jelöli az eltelt időt az egyes képkockák között.

12. Statisztika és ábrák

A statisztikai analízist a Prism 8 (GraphPad Software Inc.) szoftver segítségével végeztük el. A normalitási vizsgálatokhoz D'Agostino-Pearson omnibus tesztet alkalmaztunk. Szignifikancia szintek: ns $p > 0.05$, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$. Minimum három független kísérlettel dolgoztunk a statisztikai analízis során. Az ábrák és rajzok Illustrator CS6 (Adobe) szoftver felhasználásával készültek.

EREDMÉNYEK

A Dia, Frl, DAAM és Form3 az AS és az epidermális sejtekhez lokalizálódik a háti záródás során

Összhangban a korábbi adatokkal, az immunfestési eredményeink alapján a Dia mind az epidermális mind az AS sejtek kortikális régiójában, illetve a LE sejtek apikális kapcsolódási pontjainál megtalálható. Az Frl főként az AS citoplazmájában van jelen, bár gyenge festődést mutat az AS és epidermális sejtek kortikális régióiban is. Emellett az AS sejtek sejtmagjában és a LE aktin kábele mentén is detektálható Frl jel. Flores-Benitez és Knust (Flores-Benitez és Knust, 2015) által leírtaknak megfelelően jelentős DAAM feldúsulást észleltünk az epidermális sejtek kortikális régiójában, emellett az AS sejtek azonos területein is detektálható volt a fehérje jele. A Formin3 a DAAM-hoz hasonló festődést mutatott, habár a fehérje jele erősebb volt az AS sejtek citoplazmájában. A Fhos és a Capu esetében csak háttérfestődést észleltünk. Így a *Drosophila* forminok embrionális fehérje kifejeződési mintázata alapján elmondható, hogy a hatból négy formin fehérje jelen van a háti záródás folyamatában részt vevő szövetekben, míg a négy formin különböző térbeli eloszlása arra enged következtetni, hogy különböző szerepet tölthetnek be a záródás során.

A tanulmányok során használt funkcióvesztéses formin mutánsok

Ahhoz, hogy megvizsgáljuk ennek a négy forminnak a háti záródásban betöltött szerepét, funkcióvesztéses mutánsokat alkalmaztunk, ezáltal csökkentve a formin fehérjeszinteket. Mivel nem rendelkezünk olyan *form3* alléllal, amely null mutánsként alkalmazható lenne, a CRISPR/Cas9 rendszert használva készítettünk egy új null allélt, melyet *form3¹*-nek neveztünk el (Módszerek). Ez a mutáns egy 13,5 kb-os deléciót tartalmaz a *form3* génben, ezzel a kódoló régió 99%-át eltávolítva, mely magába foglalja a két funkcionálisan

nélkülözhetetlen formin homológia domént (FH1 és FH2). Irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy a *form3* pontmutáns alléljai a trachea fő légvezetékeinek fúzióját befolyásolják. Annak érdekében, hogy hitelesítsük az új allélunkat, megvizsgáltuk a trachearendszert a *form3¹* homozigóta embriókban, és azt találtuk, hogy ezen genotípus esetén szignifikáns mértékben megnő a tracheák szakadozottsága. A menekítési kísérletek tovább erősítették, hogy valóban a *form3* hiánya okozta ezt a fenotípust. A továbbiakban egy aktin processzáló mutáns transzgen, az UAS-Form3 I450A *form3¹* háttéren történő túltermeltetésével sikerült megállapítani, hogy ellentétben a vad típusú menekítéssel, ez a konstrukt nem képes visszaállítani a trachea fő légvezetékeinek folytonosságát. Ebből a megfigyelésből arra következtetünk, hogy a Form3 az aktin sejtvázas szabályozásán keresztül hat az embrionális tracheafejlődésre.

A forminok befolyásolják a háti záródás folyamatát

A háti záródás morfológiai elemzése alapján megállapítható, hogy mind a négy formin hatással van a háti nyílás fenotípusára. A *dia* és a *form3* hatása nagyban hasonlítanak egymáshoz, míg az *frl* és a *DAAM* ezektől eltérő fenotípusokat hoznak létre. A különböző, háti nyílást érintő morfológiai elváltozások ellenére az embriók többségében sikeresen végbemegy a záródás folyamata, ezért a továbbiakban megvizsgáltuk a háti záródás hosszát is. Megnövekedett záródási időtartamot fedeztünk fel már a *DAAM* és az *frl* mutáns embriókban is, amely aztán a *form3* és *dia* mutánsokban tovább növekedett. Következő lépésként a két szemközti epiteliális réteg egymáshoz való közeledését mértük meg. A háti nyílás szélességének csökkenése szigmoid görbét mutatott az összes mutánsnál, kivéve az *frl* mutánsokat, ahol ez a görbe inkább egy lineáris lefutást vett fel és emellett a maximum záródási sebesség is erősen lecsökkent ezen embriókban. Ez utóbbi jelenség magyarázat lehet a közel lineáris lefutású háti nyílás záródására. Összességében ezen megfigyelések alapján elmondható, hogy a *DAAM*-nak van a leggyengébb hatása a záródás hosszára és a háti nyílás szélességének csökkenésére. Hasonlóan a morfológiai fenotípusokhoz, a Form3 és Dia forminoknak nagyon hasonló hatásuk van a mért dinamikai paraméterekre, míg az Frl által kifejtett hatások valószínűsíthetően időben eltérőek.

A Form3, DAAM és az Frl szabályozzák a hámlemezek cipzározódását

A rendellenesen keskeny háti nyílás és a megváltozott cipzározódási sebesség az *frl* mutáns embriók esetében azt sugallja, hogy ezen fehérje szerepet játszik a cipzározódás folyamatában. Ez a sebessége a másik három formin mutánsnál is lecsökkent, amely arra utal, hogy mind a négy formin részt vesz ennek a folyamatnak a szabályozásában. A filopodium szám és hossz

számszerűsítése felfedte, hogy a Dia fehérjén kívül ezek a forminok nem a filopódiumok szabályzásán keresztül hatnak a cipzározódásra, hanem feltételezhetően egy, a filopódiumokban megtalálható aktin alpopulációtól független alpopulációt szabályoznak.

A forminok eltérően szabályozzák az AS sejtek alakját

Az AS sejtek alakjának kvantifikálása céljából létrehoztunk egy olyan módszert, amellyel képesek voltunk meghatározni mennyire szabályos a sejtek membránja. Az eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy az *frl* mutáns kivéve, az AS sejtek membránja sokkal egyenesebb, kevésbé hullámos a kontroll embriókhoz viszonyítva. Mivel ismeretes, hogy az AS autonóm módon képes szabályozni a háti záródást, így a sejtalak változások fontos szerepet játszhatnak a folyamat irányításában.

A forminok nélkülözhetetlenek az AS sejtek megfelelő összehúzódásához

Az AS sejtösszehúzódások mérése során a vizsgált formin mutáns embriók AS sejtjei jelentős amplitúdó csökkenést mutattak. Tekintve, hogy az AS sejtek összehúzódása jelentősen megváltozott az össze formin mutánsban, de a sejtalakváltozás csak az *frl* mutáns érintette, arra lehet következtetni, hogy az egyes forminok különbözőképpen járulnak hozzá az AS sejt dinamikájához és hogy a sejtalak magában nem határozza meg a sejtösszehúzódások mértékét.

ÖSSZEFOGLALÁS

A forminok jól jellemzett fehérjék, melyek különböző szövetekben vesznek részt az aktin nukleációban és elongációban. Két formin, a Dia és az Frl például bizonyítottan részt vesznek az aktin sejtvázas szabályzásában a háti záródás folyamata során is. A forminok jelenléte ebben a folyamatban nem meglepő, hiszen a háti záródás főként F-aktinon, az aktomiozin rendszeren illetve mikrotubulus sejtvázas átrendeződésen alapul. Míg az elágazódó aktin hálózatot nem kapcsolják a háti záródás folyamatához, addig az AS sejtek pulzáló összehúzódnásához, illetve a LE sejtek aktomiozin kábelének és nyúlványainak kialakításához a nem elágazódó aktin hálózatra van szükség. Figyelembe véve, hogy a nem elágazódó aktin filamentumok létrejöttében a formin fehérjéknek igen nagy szerepük van, feltételezhető, hogy a Dia és Frl fehérjéken kívül más forminok is részt vesznek a háti záródás folyamatának irányításában. Sejtes szinten a Dia a LE és AS sejtek filopódiumainak kialakításához szükséges, míg az Frl egy perzisztens medioapikális aktin alpopuláció létrejöttéért felel az AS sejtekben, ezáltal elősegítve a nem-izom Miozin II által kiváltott kontraktilis erők kialakulását. Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy a Dia és az Frl forminra két külön sejttypusban van szükség és így feltehetőleg két külön aktin alpopulációt szabályoznak.

Annak tisztázása érdekében, hogy egyéb forminok is részt vehetnek-e a háti záródás szabályzásában, egy átfogó elemzést hajtottunk végre mind a hat *Drosophila* forminról. Ezen tanulmányok alapján megállapítható, hogy a Dia és az Frl fehérjéken kívül a Form3 és a DAAM forminok is kifejeződnek a LE és az AS sejtekben a háti záródás során. A különböző sejtes lokalizációjuk alapján feltételezhető, hogy eltérő módon szabályozzák a záródási folyamatot.

Funkcióvesztéses kísérletek alapján megállapítható, hogy forminok hiányában különböző fenotípusos hibák alakulnak ki a háti záródás során, beleértve a morfológiai és a dinamikai paraméterek megváltozását is. Az eredményeink alapján úgy tűnik, hogy tekintettel a morfológiai fenotípusokra és a háti záródás dinamikájára a *form3*, *dia* és *DAAM* hatásai hasonlóak egymáshoz, míg az *frl* hatása mindkét tekintetben különbözik tőlük. Ezek a különbségek a forminok két osztályának eltérő időbeli és feltételezhetően térbeli működésével magyarázhatóak a legjobban. Mindezekből az következik, hogy az Frl fehérjére már a háti záródás korai szakaszától szükség van, míg a Form3, Dia és DAAM fehérjék csak a záródás vége felé töltenek be fontos szerepet a folyamatban. Érdekes módon azonban azt tapasztaltuk, hogy habár a cipzározódás sebessége minden formin mutánsban lelassul, beleértve az *frl*-t is, az AS sejtek dinamikáját nem csak az *frl*, hanem a másik három formin is befolyásolja. Ami a

cipzározódást illeti, ellentétben a *Dia* fehérjével, a *Form3*, *DAAM* és *Frl* fehérjékre nincsen szükség a filopódiumok kialakulásához, és hacsak nem a filopódiumok dinamikáját szabályozzák, azt kell feltételeznünk, hogy egy nem filopódiális aktin alpopuláció szabályozásával járulnak hozzá a cipzározódás folyamatának irányításához. Az AS sejtek működését tekintve eredményeink alapján elmondható, hogy az általunk vizsgált forminok közül mindre szükség van a hatékony sejtösszehúzódáshoz. Mindazonáltal, míg a *DAAM* és az *frl* csökkenti, a *form3* és a *dia* kismértékben növeli az AS sejtek pulzálásának gyakoriságát, amely egy eltérő szabályzási módra utal közöttük. Összeségében a formin null mutánsok háti záródás folyamatának vizsgálatából kiderítettük, hogy mind a négy formin szerepet játszik a cipzározódás folyamatában és az AS sejtek összehúzózásáért is felelősek.

Összegezve eredményeinket megállapítható, hogy a négy, háti záródás folyamatához köthető formin különböző módon szabályozza az embrionális háti záródás dinamikáját. Annak ellenére, hogy mindegyikük jelentős szerepet játszik, a forminok egyike sem nélkülözhetetlen a folyamat sikeréhez, ami tovább erősíti, hogy ez a kulcsfontosságú morfogenetikai esemény különösen robosztus, és különféle sejtvezetési mechanizmusok által biztosított. A formin fehérje család már ismert molekuláris funkciója azt sugallja, hogy a *Dia*, *Form3*, *DAAM* és *Frl* különböző F-aktin alpopulációk létrehozásáért felelősek, melyek a LE és AS sejtek megfelelő erő kifejtéséhez elengedhetetlenek a háti záródás során. Eddig csak egy ilyen *Frl* függő aktin alpopulációt azonosítottak az AS sejtekben, és bár ismert, hogy a LE filopódium képződés *Dia* függő, az egyéb forminok által szabályozott aktin struktúrák azonosításához még további kutatások szükségesek.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, **Dr. Mihály Józsefnek**, amiért már az egyetemi tanulmányaim elején lehetőséget biztosított bekapcsolódnom a csoport szakmai életébe, ezáltal már kezdetektől fogva megismerkedhettem a csoportban folyó színvonalas kutatás alapjaival. Hálás vagyok szakmai iránymutatásáért, tanácsaiért és építő kritikáiért. Emberségével és magas szintű szakmai tudásával, széles látókörével nem csupán követendő példát mutat, hanem igazán inspiráló közeget teremt, mely valamennyiünket fejlődésre ösztönöz.

Szerencsésnek mondhatom magam, hogy **Dr. Szikora Szilárd** iránymutatásával ismerkedhettem meg a tudományos módszerek, a tudományos gondolkodás világával. Személye fontos szerepet játszott a tudományos pályám kialakulásában. Kiváló példát mutatott a tudomány, kutatás iránti elkötelezettségre és alázatra, a kudarcokon való felülemelkedésre és arra, hogyan tudjuk segíteni kutatótársainkat már a megszerzett tudásunkkal. Nem lehetek eléggé hálás az éveken át tartó ösztönző támogatásáért, szakmai segítségéért és türelméért, amelyre a rengeteg kérdésem megválaszolásához bizonyára szüksége lehetett.

Szeretném megköszönni továbbá **Dr. Földi Istvánnak** a kutatómunkám során nyújtott segítségét és tanácsait valamint hálával tartozom csoportom valamennyi tagjának: **Kaltenecker Péter, Gázsó-Gerhát Gabriella, Dr. Gombos Rita, Farkas Dávid, Görög Péter, Dr. Vedelek Balázs.**

Külön köszönöm **Berente Anikónak** a barátságát valamint a laboratóriumi munkában nyújtott segítségét és útmutatását.

Hálás vagyok a Genetikai Intézet minden tagjának a támogatásukért és a barátságos munkakörnyezet megteremtéséért tanulmányaim során.

Végül hálás vagyok családomnak és vőlegényemnek szeretetükért, ösztönzésükért és támogatásukért.

PÉNZÜGYI TÁMOGATÁS

A tézisben bemutatott kutatás az alábbi pályázatok támogatásával készült el:

- Országos Tudományos Kutatási Alapprogram (OTKA) (K132782 Mihály József részére)
- Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Hivatal (NKFIH-871-3/2020 Mihály József részére)
- ÚNKP-21-4-SZTE-118 Új Nemzeti Kiválósági Program; Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból finanszírozott szakmai támogatás (Tóth Krisztina részére)
- EFOP 3.6.3-VEKOP-16-2017-00009 (Tóth Krisztina részére)

TÁRSSZERZŐI LEMONDÓ NYILATKOZAT

Co-author certification

Alulírott Szikora Szilárd kijelentem, hogy Tóth Krisztina 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.

Szeged, 2022.06.01.



szerező

A pályázó tézispontjaiban érintett, közösen publikált közlemények:

Szilárd Szikora, István Földi, **Krisztina Tóth**, Ede Mígh, Andrea Vig, Beáta Bugyi, József Maléth, Péter Hegyi, Péter Kaltenecker, Natalia Sanchez-Soriano, József Mihály. The formin DAAM is required for coordination of the actin and microtubule cytoskeleton in axonal growth cones. JOURNAL OF CELL SCIENCE 130 : 15 pp. 2506-2519. , 14 p. (2017)