

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

A Ph.D. értekezés tézisei

Takács Zsanett

Témavezető: Dr. Jankovics Ferenc, Tudományos főmunkatárs

Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Genetikai Intézet

Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Biológia Doktori Iskola

Szeged

2020

Bevezetés

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. Kutatásainkkal azokat a stratégiákat szeretnénk megismerni és megérteni, amiket az élőlények alkalmaznak a hámnyílások bezárásához. Az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) fejlődő embriója alkalmas modellt kínál a középvonali összenövések és a sebzáródási folyamatok során lezajló molekuláris, illetve sejt- és szövetszintű változások *in vivo* vizsgálatához. Az ecetmuslica egyedfejlődése során ugyanis az embrió hátán egy nyílás alakul ki, amelyet a két oldalsó egyrétegű hámlemez a háti középvonal mentén bezár. Hasonló mechanizmussal megy végbe a sebzáródás is.

A sebzáródásban és a háti záródásban egyaránt fontos szerepet kap a sejtvázas – 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 MT-váz szerepéről azonban nagyon keveset tudunk. Ismert, hogy a záródást megelőzően a hámsejtekben a MT-ok rendezetlenül helyezkednek el. A háti záródás elején ez a rendezetlen MT-váz 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 sejtvázelem szorosan együttműködik. A záródás befejeztével a rendezett MT kötegek lebomlanak és a hámsejtekben ismét rendezetlen MT eloszlás alakul ki.

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 muslica 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.

Alkalmazott módszerek

- RNS interferencián alapuló *in vivo* video mikroszkópiával kombinált funkcióvesztéses szűrés
 - A kiválasztott génekre specifikus, kettős szálú RNS-eket terveztünk és szintetizáltunk *in vitro* transzkripció módszerével.
 - A géneket a kettős szálú RNS-ek korai *Drosophila* embriókba történő injektálásával csendesítettük.
 - A csendesítés hatását *in vivo* fluoreszcens videó mikroszkópiával követtük nyomon.
- Új funkcióvesztéses *shot* mutáns allél (*shot^{ΔEGC}*) létrehozása CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) genomszerkesztési módszer segítségével
 - A *shot* génre specifikus chiRNS-eket terveztünk és expressziós vektorba klónoztuk.
 - A deléción előállításához két különböző chiRNS-t kifejező plazmidot injektáltunk korai *Drosophila* embriókba.
 - A deléción izolálásához a *shot* lokuszt lefedő, nagyméretű deficiencia felhasználásával komplementációs analízist végeztünk el.
 - A deléción jelenlétét DNS-szekvencia meghatározással igazoltuk.
- Immunhisztokémiai módszerrel vizsgáltuk meg a vad típusú és különböző *shot* mutáns hámsejtek MT-vázának felépítését.
- FRAP (fluorescent recovery after photobleaching) analízissel tanulmányoztuk a MT-ok dinamikus tulajdonságait.
- A MT-ok “+” vég dinamikáját, valamint a Shot fehérje aktinváz működésében játszott szerepét *in vivo* videomikroszkópiával követtük nyomon.
- A *shot* gén részletes szerkezet-funkció analízisét szövetspecifikus menekítési kísérletek végrehajtásával végeztük el.

Eredmények

1. háti záródásban résztvevő, MT-kötő gének azonosítására irányuló, RNS interferencián (RNSi) alapuló *in vivo* video mikroszkópiával kombinált funkcióvesztéses szűrésből azonosítottuk a *short stop (shot) shot* gént. A *shot* gén csendesítése abnormális dinamikájú háti záródást okozott. A *shot* mutáns fenotípusának kvantitatív elemzésével kimutattuk, hogy a *shot* gén funkciója esszenciális a háti hám cipzározódásához.
2. Az embrionális háti záródás folyamatán kívül a *Drosophila* Shot fehérje egyéb fejlődési folyamatok, mint az embrionális sebzáródás vagy a felnőtt tor záródása a metamorfózis alatt szabályozásában is részt vesz, ami a hámzáródási folyamatokban betöltött általános szerepét bizonyítja.
3. CRISPR/Cas9 genomszerkesztési módszer segítségével előállítottunk egy új izoformaspecifikus *shot* mutáns allélt, amelyből deletáltuk a *shot* gén MT-kötésért felelős doménjeit. Az újonnan izolált *shot* allélt *shot*^{ΔEGC}-nek neveztük el. A Shot^{ΔEGC} fehérjéből hiányoznak a MT-kötésért felelős: EF-hand, Gas2 és CTD funkcionális domének.
4. A *shot* gén szerepének magyarázatára a háti záródásban 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 aktinkötő CH1, és a MT-kötő Gas2 doménjére egy fehérjemolekulán belül van szükség a normális dinamikájú háti záródáshoz és a Shot fehérje az aktin- és a MT-váz keresztkötésével irányítja a háti záródás cipzározódási fázisát.
5. A MT-ok dinamikus tulajdonságait FRAP analízissel vizsgáltuk meg, amiből kiderül, hogy a Shot fehérje a dinamikus MT-okra van hatással, hiányában fokozódik a MT-ok növekedésének sebessége, de a növekedés iránya nem változik. A *Shot* fehérje a DME sejtekben lévő dinamikus MT-ok stabilizálásán keresztül hat a MT váz kialakulására a háti záródás során.
6. 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.

Eredményeink szerint a Shot fehérje MT kötő aktivitása szükséges, de nem elégséges a MT-ok stabilizálásához és a Shot aktin kötő képességére is szükség van ebben a folyamatban. A Shot fehérje MT-kötő és az aktinkötő aktivitására egy fehérje molekulán belül van szükség a normális MT váz kialakításához. Eredményeink arra utalnak, hogy a Shot fehérje az aktin/MT keresztkötésével biztosítja a helyes MT-váz működést a háti záródás cipzározódási fázisában.

7. 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, ezért megvizsgáltuk az aktin felhalmozódást és a filopódiumok kialakulását a vezető élben. Eredményeink azt igazolják, hogy a Shot fehérje részt vesz a filopódiumok kialakulásának szabályozásában és ezen keresztül hat a háti záródásra.

Összefoglalás

Kísérleteink célja a hámzáródási folyamatok során lejátszódó sejtváztrendeződések alapmechanizmusainak megismerése volt az evolúciósan konzervált Spektrakin fehérjék családjába tartozó *shot* gén funkcionális jellemzésén keresztül. A Shot fehérje a sejtváz egyik kulcsfontosságú szerkezeti eleme. A sejtalak megváltozásához szükséges sejtváztrendeződéseket irányító folyamatokban vesz részt. 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.

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 Prof. 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: Bence Melindát, Szarka-Kovács Alexandra Brigittát, Henn Lászlót 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.

Közlemények listája

MTMT azonosító: 10069249

Összesített IF: 10,164

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

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