

Ph.D. disszertáció tézisei

**A DROSOPHILA DAAM AXONNÖVEKEDÉSBEN BETÖLTÖTT  
SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA**

**Gombos Rita**

**Témavezető: Dr. Mihály József**

Magyar Tudományos Akadémia  
Szegedi Biológiai Központ  
Genetikai Intézet

Biológia Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem  
Természettudományi és Informatikai Kar, Genetikai Tanszék

Szeged, 2012.



## **Bevezetés és célkitűzés**

A komplex idegi működés alapja a megfelelő idegsejtek közötti kapcsolatok kialakulása. Ennek feltétele, hogy az idegsejtek nyúlványai megfelelő minta szerint projektáljanak, megtalálva a célsejtjüket. A növekvő axonok a környezeti jelek alapján választják ki növekedésük irányát, amiben döntő szerepet játszanak az axonok végén differenciálódó növekedési kúpok (growth cone). A nyúlvány növekedés során a növekedési kúp perifériális részén található ujjszerű (filopodiumok) és lemezszerű membránkitüremkedések (lamellipodiumok), illetve az ezeken elhelyezkedő receptorok játsszák a főszerepet a jelmolekulák érzékelésében. Attól függően, hogy vonzó vagy taszító jellegű faktorról érintkeznek, változik a növekedési kúp aktuális alakja és növekszik az axon egy meghatározott irányba. A növekvő axonvég jellegzetes sejtváz elemekkel rendelkezik, amelyek a sejtváz két fő alkotóeleméből, mikrotubulusokból és aktin filamentumokból állnak. A fonalas szerkezetű aktin a filopodiumokban kötegekbe rendeződik, míg a lamellipodiumokban laza, sugaras hálózatot alkot. Mivel az axonális növekedés folyamata dinamikus aktin sejtváz átrendeződéseken alapul, prediktálható volt, hogy az aktin nukleáló és polimerizáló faktoroknak kitüntetett szerepük van az idegsejt nyúlványok kialakításában.

Munkánk kezdetén még nem írtak le olyan aktin nukleáló és polimerizáló aktivitással rendelkező fehérjét, mely fontos szerepet játszik a növekedési kúp

nem elágazó aktin filamentumainak kialakításában, és így a nyúlványnövekedésben. Mivel előzetes vizsgálatok alapján úgy találtuk, hogy a formin típusú aktin összeszerelő faktort kódoló *dDAAM* génről átíródó mRNS, és *dDAAM* fehérje is feldúsulást mutat az embrionális központi idegrendszer területén, érdekesnek találtuk megvizsgálni vajon a *dDAAM* szerepet játszik-e az idegsejt nyúlványok növekedésében.

### **Anyagok és módszerek**

-szövetek preparálása:

- embriók preparálása:

- metanolos fixálás

- „lassú” fixálás

- agyak preparálása

- hasi idegköteg-kultúra készítése

- immunhisztokémia

- Western blot

### **Eredmények és diszkusszió**

A *dDAAM* idegrendszeri szerepének vizsgálatára irányuló első kísérleteinket az embrionális központi idegrendszer területén végeztük el. A *dDAAM*<sup>Ex68</sup>

zigótikusan null mutáns embriók csak gyenge központi idegrendszeri eltéréseket mutattak. Ez azonban magyarázható azzal, hogy az anyai hatás miatt ezek az állatok tartalmaztak vad típusú génterméket. Továbbiakban az anyai hatás gyengítése mellett transzheterozigóta mutáns embriókat ( $dDAAM^{mat/zip}$ ) hoztunk létre. Ezek az állatok már viszonylag magas százalékban mutattak erősebb nyúlvány-növekedési hibákat, melyek nem párosultak idegsejt hiányokkal. Ezek az eredmények arra utaltak, hogy a  $dDAAM$  szerepe a nyúlványok növekedésében van. Azt, hogy ez a fenotípus valóban a  $dDAAM$  dózisának csökkenéséhez köthető, a teljes hosszúságú fehérje túltermelésével elvégzett menekítési kísérlet bizonyította.

A  $dDAAM$  nyúlvány-növekedésben játszott szerepét erősítették meg az *in vitro* nyúlvány regenerációs tesztek is, amelyek során a  $dDAAM$  konstitutívan aktív formájának túltermelése elősegítette a hasi idegkötegből kilépő motoneuronok regenerációját, és növekedést. Az *in vivo* elvégzett funkcionyeréses kísérletek során a konstitutívan aktív  $dDAAM$  elrontja az embrionális nyúlványkötegek szabályozott mintáját. A  $CDAAM$  és a  $DADDAAM$  aktivált formák által okozott fenotípusok összehasonlítása alapján azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a  $dDAAM$  aktin összeszerelő aktivitásának és a sejten belüli lokalizációjának a szabályozásában fontos szerepe van a fehérje N-terminális régiójának, ami összhangban van az egyéb DRF típusú forminokra vonatkozó ismeretekkel.

A *dDAAM* nyúlványnövekedésben betöltött funkciójának pontosabb megértése érdekében primer idegsejt kultúrákon végeztünk kísérleteket, mely során a vad típusú, *dDAAM<sup>mat/zig</sup>* és a konstitutívan aktív formát (DADm-DAAM) túltermelő embriókból származó idegsejteket hasonlítottuk össze. A kísérletek alapján elmondhatjuk, hogy a *dDAAM* mutáns idegsejtek axon növekedése ugyan normális volt, azonban a növekedési kúpok területén megjelenő filopódiumok száma és hossza lecsökkent. Ezzel szemben a konstitutívan aktív formát túltermelő sejtek nyúlványai sokkal több filopódiummal rendelkeztek. Ezek alapján az eredmények alapján úgy tűnik, hogy a *dDAAM* szerepe a nyúlványok növekedése során a növekedési kúp filopódiumainak kialakítása.

Miután bebizonyosodott, hogy a *dDAAM*-nak fontos szerepe van az embrionális idegsejtek nyúlványainak növekedésében, kíváncsiak voltunk arra, hogy ez a nyúlványnövekedésben betöltött funkció mennyire általános, megfigyelhető-e a fejlődés későbbi stádiumaiban a központi idegrendszer más területein. A lárvális, báb és felnőtt állapotokat tanulmányozva megállapítottuk, hogy a *dDAAM* ezekben a stádiumokban is pán-neurálisnak nevezhető kifejeződési mintát mutat. Mivel a fehérje nagy mennyiségben jelen van a fejlődő gombatest területén, továbbiakban ezt az agyi struktúrát használtuk modell-rendszerül. A vizsgálatok során azt találtuk, hogy a *dDAAM* csökkent mennyisége mellett a gombatest nyúlványok növekedési és navigációs hibákat mutattak, mely alapján elmondhatjuk, hogy a *dDAAM* nem csak az embrionális,

hanem a későbbi fejlődési stádiumokban is elengedhetetlen eleme az idegsejt nyúlványok növekedésének. Az embrionális idegrendszerben és a gombatest vizsgálatával kapott eredményeink együttesen azt jelzik, hogy ez a DAAM alcsaládba tartozó formin a nyúlványnövekedés egyik általános faktora.

A *dDAAM* idegrendszeri szerepének kimutatása után szeretnénk volna tisztázni, hogy a dDAAM-e az egyetlen formin melynek fontos szerepe van a nyúlványok növekedésében. Ezt úgy próbáltuk kideríteni, hogy idegrendszer-specifikusan RNSi-val lecsökkentettük a különböző forminok szintjét. A gombatesteket megvizsgálva azt találtuk, hogy a hat *Drosophila* formin gén közül csak a *dDAAM* és a *dia* mutat idegrendszeri fenotípust. A Dia fehérjéről kimutattuk, hogy a dDAAM-hoz hasonlóan, feldúsulást mutat a gombatest aktuálisan növekvő nyúlványaiban. Ennek ellenére a *dDAAM* és a *dia* mutánsok fenotípusa lényegesen különbözik egymástól. A *dDAAM*-mal ellentétben, a *dia* esetében a nyúlványok növekedésére gyakorolt pozitív hatást nem tudtunk kimutatni, helyette azt tapasztaltuk, hogy hiányában a Kenyon sejtek citokinézise sérül, és többmagvú sejtek jelennek meg, így az osztódásból nem származnak funkcionális neuronok, melyek nyúlványmintázata vizsgálható lenne. Egyetlen a Dia nyúlványnövekedésben betöltött szerepére irányuló megfigyelésünk az volt, hogy posztmitotikus sejtekben aktív gombatest specifikus driverrel lecsökkentve a Dia mennyiségét, a  $\beta$  lebenyek esetében nem történik meg a terminálódás, az axonok átnyúltak az ellenkező oldali hemiszférába. Ez a megfigyelés viszont arra utal, hogy amennyiben a Dia-nak

szerepe van a nyúlványok növekedésében, az valamilyen módon inkább a növekedésre gyakorolt negatív hatás lehet. Ezzel egybevág az a megfigyelésünk is, hogy a kisGTPázokkal elvégzett vizsgálataink alapján a Dia aktivátora a gombatest területén a RhoA lehet, amelynek a domináns negatív formája hasonló osztódási fenotípus okozott, mint a *dia* hiánya, és amelyről korábban leírták hogy az axon növekedés negatív regulátora. Összegésében vizsgálataink azt a konklúziót sugallják, hogy a forminok közül *Drosophila*-ban a dDAAM az egyetlen kitüntetett szerepű aktin összeszerelő faktor az axon növekedés során.

Mint a DRF forminok családjába tartozó fehérje, a dDAAM is speciális módon aktiválódik, mégpedig az aktin polimerizációra képes aktív konformáció eléréséhez egy aktivált Rho típusú kisGTPáz bekötődése szükséges. Mivel a *Drosophila* genom több ilyen típusú fehérjét is kódol, ezért kíváncsiak voltunk arra, hogy melyik GTPáz lehet felelős a dDAAM aktiválódásáért a központi idegrendszerben, kimutatható-e egyáltalán specificitás ebben a vonatkozásban. Öt Rho típusú GTPáz saját idegrendszeri fenotípusát vizsgálva, illetve genetikai kölcsönhatáson alapuló vizsgálatok útján beláttuk, hogy mind az embrionális, mind a későbbi stádiumokban az idegrendszer területén a dDAAM aktivátorai a Rac alcsaládba tartozó kisGTPázok.

Genetikai interakciókkal további interakciós partnereket is azonosítottunk, mint a Profilin, és az Ena, melyek mind az embrionális, mind a későbbi stádiumokban együttműködnek a dDAAM-mal a nyúlványok növekedése során. Ezt a együttműködést co-immunoprecipitációs vizsgálatok is alátámasztották,



illetve összhangban van az immunhisztokémiai vizsgálatokkal, mely alapján a dDAAM fehérje részleges kolokalizációt mutat ezzel a két fehérjével a növekedési kúp területén, különös tekintettel a filopódiumokra.

A gombatest nyúlványok növekedése során fontos szerepük van az úgynevezett core PCP fehérjéknek. A genetikai interakciós vizsgálatok alapján a dDAAM ezekkel a fehérjékkel együttműködve szabályozza a nyúlványok növekedését, és megfelelő projekcióját. Az általunk felállított modell szerint a dDAAM a Wnt5 jelátviteli útvonalba illik bele, mégpedig a Wnt5 kötődése a Fz receptorhoz a Stbm/Pk/Fmi fehérjékkel együttműködve vezet a Dsh aktiválódásához. A Dsh viszont a dDAAM aktiválására képes a DAD doménjéhez való kötődése által, ami az aktin polimerizáló lokális aktiválódását eredményezi. Az irányított aktin összeszerelődés filopódiumok képződését segíti elő, ami végső soron a jelmolekula irányába történő nyúlványnövekedést eredményez. Az egyelőre nem világos, hogy a dDAAM aktivitását kizárólag a Wnt5 jel szabályozza-e vagy egyéb navigációs faktorok is képesek erre, és ha képesek akkor milyen jelátviteli komponenseken keresztül teszik azt, ezeknek a kérdéseknek a vizsgálata még folyamatban van.

Kísérleteinkkel egy olyan teljesnek nevezhető, a navigációs jeltől a sejtváz átrendeződésekig tartó jelátviteli rendszert tártunk fel, ami fontos új információkat szolgáltatott az axon növekedés folyamatáról és a DAAM típusú forminok működéséről is.

**Az értékezés alapjául szolgáló publikáció:**

Matusek T, Gombos R, Szecsenyi A, Sanchez-Soriano N, Czibula A, Pataki C, Gedai A, Prokop A, Rasko I, Mihaly J (2008) Formin Proteins of the DAAM Subfamily Play a Role during Axon Growth. *J Neurosci.* 28:(49) pp. 13310-13319. **IF: 7.452**

**Egyéb publikációk:**

Barkó, Sz., Bugyi, B., Carlier, M.F., Gombos, R., Matusek, T., Mihály, J., and M. Nyitrai. (2010) Characterization of the Biochemical Properties and Biological Function of the Formin Homology Domains of *Drosophila* DAAM. *J. Biol. Chem.*, 285(17), 13154–13169. **IF: 5.329**

Goncalves-Pimentel C, Gombos R, Mihaly J, Sanchez-Soriano N, Prokop A. (2011) Dissecting Regulatory Networks of Filopodia Formation in a Drosophila Growth Cone Model., *PLoS One* 6(3), pp. 18340-18348 **IF: 4.411**