



Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

***A *Drosophila melanogaster* kalpainok
és a sejtváándorlás***

Páldy Ferencz Sándor

Témavezetők: Prof.Dr. Gausz János
Dr. Ádám Géza

Biológia Doktori Iskola
SZTE-TTIK
2013

1. Előzmények

Az élővilágban a proteolitikus (fehérjebontó) enzimeknek kulcsszerepük van számos léfontosságú folyamatban, mint pl. a táplálékban található fehérjék lebontásában, a fehérjék szintézis utáni módosításában, a sejtciklus szabályozásában, a metasztázis kialakulásában stb.

A proteázok kétféle módon fejthetik ki hatásukat: korlátozottan (főleg szabályozó proteázok) ill. korlátlanul (lebontó proteázok). Nagyfokú heterogenitásuk miatt az osztályozásuk több szempont alapján történik. A katalízis kémiai mechanizmusa szerint megkülönböztethetjük a szerin -, cisztein -, treonin -, aszpartát -, aszparagin - és metalloproteázokat. A katalízis lokalizációja szerint vannak exo-, endo- és omegapeptidázok.

Rendellenes működésük súlyos betegségekkel van asszociálva. A mátrix metalloproteázok részt vesznek úgy a rákos daganatok kialakulásában, mint azok gátlásában is (pl. MMP9, MMP12, MMP26). A cisztein proteázok szerepet játszanak a heveny hasnyálmirigy-gyulladásban, maláriában. A szerin proteázok befolyásolják a trombózis, 2-es típusú cukorbetegség kialakulását.

A kalpainok neutrális pH optimumon (pH 7,1-7,3), a citoszólban működő és Ca^{2+} által aktivált cisztein proteázok. Valamennyi eukariótában, egyes baktériumokban és

növényekben is jelen vannak. *Drosophilában* 4 kalpain gén (*CalpA*, *CalpB*, *CalpC*, *CalpD*) található, amelyek közül csak 2 kódol egyszerre tipikus és működőképes fehérjét (*CalpA* és *CalpB*). Mivel a *Drosophila*-ból hiányzik az emlős kalpainoknál jelen levő kis regulátor alegység, feltehetően monomerként működnek. A tipikus kalpainokon 4 domént (DI, DII, DIII, DIV) különböztethetünk meg, amelyek közül a DII tartalmazza a funkcióért felelős katalitikus aminosav triádot (Cys, His, Asn). Az aktivációhoz szükséges Ca^{2+} -ot elsősorban a DIV köti meg.

A kalpainok és a sejt vándorlás kapcsolatára már '90-es években fény derült. Kínai hörcsög - (CHO) és egér embrionális fibroblaszt sejt vonalakon kísérletezve kimutatták, hogy a kalpainok inhibíciója a sejtek vándorlását akadályozza.

2. Célkitűzések

- a *Drosophila* kalpainok összehasonlítása az emlős kalpainokkal
- a két tipikus és működőképes *Drosophila* kalpain (*CalpA*, *CalpB*) szerepének vizsgálata

- a *CalpA* és *CalpB* közötti feltételezhető funkcionális redundancia tanulmányozása
- *in vivo* tanulmányozni a kalpainok hatását a sejtvéándorlásra
- lehetséges genetikai interakciós partnerek azonosítása
- a kalpainok hatásmechanizmusának részletesebb feltárása

3. Alkalmazott módszerek

- Ováriumok boncolása és festése
- Klónozás
- PCR
- RT-PCR
- SDS-PAGE és Western blot
- Immunprecipitáció
- Talin *in vitro* emésztése
- Általános kalpain aktivitás mérés

4. Eredmények

a. A *Drosophila* kalpainok nem esszenciálisak.

A *CalpA* génből a $p\{SUPor-P\}KG^{05080}$, míg a *CalpB* génből a $p\{EPgy2\}EY^{08042}$ transzpozont remobilizáltuk. Mindkét esetben a P-elemek pontatlan kivágódásával deléciós vonalakat hoztunk létre.

A *CalpA*⁸⁰⁸ mutánsban egy 2.490 bp méretű deléciót képeztünk, amely a P-elemtől mindkét irányba terjedt. Így nem csak a *CalpA* génből hiányzott egy szakasz, hanem a szomszédos *hts* génből is. A *CalpA-hts* kettős mutánsok nőtényei sterilek voltak, de a *hts* gén részleges pótlása menekítette a fenotípust. A *CalpA* mutánsról nem képződött mRNS (RT-PCR) ill. fehérje átíródása sem volt detektálható (SDS-PAGE és Western blot).

A *CalpB*-nél több deléciós vonalat (*CalpB*⁵⁰⁵, *CalpB*⁵⁰², *CalpB*³⁹², *CalpB*³⁸⁹, *CalpB*³⁶¹) izoláltunk, mint a *CalpA* esetében. Ezek közül a *CalpB*⁵⁰⁵ vonal egy 1.047 bp deléciót, míg a *CalpB*³⁶¹ egy 922 bp deléciót hordozott. A *CalpB* mutánsokról képződtek csonka mRNS-ek, de ezekről semmilyen transzláció nem volt megfigyelhető.

Úgy a *CalpA*, mint a *CalpB* deléciója életképességgel és fertilitással járt, ezért kijelenthetjük, hogy a gének nem esszenciálisak.

b. A *CalpB* deléciója következtében lecsökken az általános kalpain aktivitás.

A *Dabcyl*-TPLKSPPPSPRE-EDANS mesterségesen előállított általános kalpain szubsztrát hasítása az EDANS által kibocsátott fluoreszcens szignál növekedésével jár. Ez azért lehetséges, mivel az érintetlen szubsztrátmolekulákban a *Dabcyl* elnyeli az EDANS által kibocsátott energiát (FRET). Ennek a szubsztrátumnak a felhasználásával két különböző *CalpB* mutánsban is (*CalpB*⁵⁰⁵, *CalpB*⁵⁰²) kimutattuk, hogy a kalpain aktivitás az eredeti érték felére csökkent. Ez a reziduális aktivitás vagy a CalpA fehérjének vagy/és a mutánsokban jelen levő funkcionális CalpD-nek tulajdonítható.

c. A *CalpB* részt vesz a határsejtek vándorlásának szabályozásában.

Annak ellenére, hogy a *CalpA* és a *CalpB* deléciója nem okozott látható fenotípust, nem zárható ki, hogy valamilyen strukturális ill. funkcionális változás mégis bekövetkezett. Sejtvonalakon végzett kísérletekből már ismert volt a kalpainok hatása a sejt vándorlásra, ezért megvizsgáltuk, hogy a kalpain deléziós mutánsainkban történik-e valamilyen rendellenesség a határsejtek vándorlásában. Míg a *CalpA*⁸⁰⁸ esetében nem tapasztaltunk semmilyen rendellenességet, a *CalpB*⁵⁰⁵ és *CalpB*³⁶¹ mutánsokban a határsejtek már jelentős

mértékben késtek. A megvizsgált petekamrák 30-40%-ban volt különböző mértékű késés tapasztalható. A legnagyobb arányban azok a mutánsok voltak képviselve, amelyekben a határsejtek az út 75%-át teljesítették, míg a legkisebb arányban azok, amelyekben egyáltalán nem történt vándorlás. A megvizsgált *CalpA-CalpB* kettős mutánsokban a késést mutató petekamrák aránya ugyancsak 30-40% volt, ami csak a *CalpB* deléciójának köszönhető. Ez a fenotípus menekíthető volt, ha a szervezetbe visszajuttattuk a vad *CalpB* gént. A határsejtekben kifejeztetett (driver törzs *slbo-Gal4*) *CalpA* és *CalpB* RNS_i (RNS interferencia) konstrukciók reprodukálták a deléciók által okozott fenotípust.

d. *A CalpA és CalpB* gének funkcionálisan nem redundánsak.

A redundancia hiányát több eredmény is alátámasztja:

- a *CalpA-CalpB* kettős mutánsok az egyes mutánsokkal összhangban, életképesek és fertilisek voltak
- a *CalpA-CalpB* kettős mutánsokban, csak a *CalpB* deléciójára jellemző 30-40%-os határsejt vándorlási késés volt tapasztalható

e. A *CalpB* a fokális adhézió egyes komponenseinek interakciós partnere.

A genetikai interakciót vizsgáló kísérleteinket 3 fokális adhézió komponensre terjesztettük ki: a β -PS-integrint kódoló *mysospheroid* (*mys*) génre, az α -PS2 integrint kódoló *inflated* (*if*) génre és a talint kódoló *rhea* génre. Mindhárom esetben a genetikai kölcsönhatás létrejött, amelynek következtében a *CalpB* deléciójára jellemző 30-40%-os arányú határsejt vándorlási késés 58-75%-ra emelkedett. A megemelkedett penetrancia mellett az expresszivitás is megnövekedett.

f. A *CalpB* hasítja a talint és ezáltal integrin szabadul fel.

Mivel a talin a *CalpB* szubsztrátja megvizsgáltuk, hogy az általunk alkalmazott rendszerben a két fehérje fizikai kölcsönhatásba lép-e egymással. Immunprecipitációval sikerült kimutatnunk, hogy a talin kölcsönhatásba lép a *CalpB*-vel és azt is sikerült bizonyítanunk (SDS Page, Western blot), hogy a *CalpB* hasítja a talint.

Vad típusú legyekben, a vándorló határsejtek csoportja mögött integrin foltok figyelhetők meg. A fokális adhéziókban, a talin köti össze az integrin fehérjék egyik végét a sejtek aktin sejtvázával. Az integrinek másik vége azzal a felülettel érintkezik, amelyen a sejtek vándorolnak. Ahhoz, hogy az integrin a

vándorlás során felszabaduljon, a talinnak valószínűleg hasadnia kell. Ez biztosíthatja a vándorlási felület és a sejtek közötti kapcsolat fellazulását. A *CalpB* deléciós mutánsokban ezeknek az integrin foltoknak a képződése elmaradt. Ez talán annak tulajdonítható, hogy a hiányzó kalpain aktivitás miatt a talin nem hasad, aminek következtében az integrin nem tud felszabadulni. Ennek következtében a kapcsolat a sejtek és a vándorlási felület között stabilizálódik, ami a vándorló sejtek lemaradó végének a lassabb visszahúzódsához vezet. Ez pedig végeredményben a határsejtek vándorlásának a lelassulásával jár. Ha a mutánsokba visszajuttatuk a talin fehérje feji részét, az menekítette a fenotípust és a normális szintű integrin felszabadulás helyreállt.

Munkánk során azonosítottuk a sejt vándorlás egy újabb regulátorát és ezzel eredményeink hozzájárulnak ennek a rendkívül fontos eseménynek a megismeréséhez.

Közlemények

1. Kókai E., Páldy^{*†} F. S., Somogyi K., Chougule A., Pál M., Kerekes É., Deák P., Friedrich P., Dombrádi V., Ádám G. CalpB modulates border cell migration in *Drosophila* egg chambers. *BMC Dev Biol* **12**, 20 (2012).

IF 2.79

2. Lovdok L., Bentele K., Vladimirov N., Müller A., Pop F. S., Liebidz D., Kollmann M., Sourjik V. Role of translational coupling in robustness of bacterial chemotaxis pathway. *PLoS Biol* **7** (2009).

IF 12.91

* - névváltoztatás (Páldy, szül. Pop)

† - osztott elsőszereplőség

Posztterek

1. Kókai Endre, Pappné Sinka Rozália, Ádám Géza, Pop Ferencz, Gausz János, Dombrádi Viktor: A *Drosophila* CG9238 gén terméke kölcsönhat a protein foszfatáz 1 enzimmal, VI. Magyar Genetikai Kongresszus és XIII. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok (2005. április 10-12), Eger

Előadások

1. Ferencz Pop, János Gausz, Viktor Dombrádi, Péter Friedrich, Géza Ádám: Genetic and molecular characterization of CalpA and CalpB genes in *Drosophila*, 12th Regional Drosophila Meeting (24-25.11.2006), Vienna, Austria
2. Pop Ferencz, Molnár Imre, Kókai Endre, Dombrádi Viktor, Farkas Attila, Friedrich Péter, Gausz János, Ádám Géza: A *Drosophila* CalpA és CalpB gének genetikai és molekuláris jellemzése, VII. Magyar Genetikai Kongresszus és XIV. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok (2007. április 15-17), Balatonfüred, Magyarország
3. Pop Ferencz, Somogyi Kálmán, Kókai Endre, Dombrádi Viktor, Farkas Attila, Friedrich Péter, Gausz János, Ádám Géza: *Drosophila* kalpainok es a sejtvmendorlas, VII. Genetikai Műhelyek Magyarországon, Minikonferencia (2008.09.07), Szeged, Magyarország