

A DAAM formin alcsalád szerepe az izomfejlődésben

A Ph.D. értekezés tézisei

Molnár Imre

Témavezető: Dr. Mihály József

SZTE Biológia Doktori Iskola

Magyar Tudományos Akadémia, Szegedi Biológiai Kutatóközpont,

Genetikai Intézet

SZTE TTIK

Szeged, 2014

BEVEZETÉS

Az izom differenciációt érintő fontos kérdés, hogy a harántcsíkolt izomsejt hogyan képes egy szabályosan ismétlődő, szigorúan rendezett szarkomerekből álló szerkezetet létrehozni a miofibrillogenezis során, más szóval, hogyan zajlik a szarkomer összeszerelődés?

A miofibrillogenezis egy sok lépésből álló, bonyolult folyamat, és ennek a folyamatnak egy kitüntetett része a miozin és aktin filamentumok összeszerelődése. Annak ellenére, hogy a szarkomerikus komplexek szerkezeti felépítését sikerült tisztázni, az előbb említett filamentum rendszerek *in vivo* összeszerelődéséről keveset tudunk. Különösen arra nem sikerült ez idáig még fényt deríteni, hogy hogyan zajlik a vékony filamentumok kezdeti összeszerelődése, milyen módon megy végbe az aktin dinamika szabályozása, és hogyan szerveződnek a filamentumok a miofibrillogenezis illetve a miofibrillumok fenntartása során.

Habár az aktin nukleációs faktorok működését a különböző modellrendszerekben már régóta tanulmányozzák, az a fehérje, amely a fejlődő izmokban lehetővé tenné a nukleációt, még nem ismeretes. A nukleáción kívül az aktin dinamika fontos összetevői a filamentumok elongációja és a hosszúságuk szabályozása. Mivel a forminok a nem-elágazó, hosszú aktin filamentumok összeszerelődését katalizálják, és a harántcsíkolt izomsejtek egyik fő alkotóeleme éppen az ilyen típusú filamentum, mindenképpen elképzelhető volt, hogy egy formin családba tartozó fehérje kulcsszerepet játszik a vékony filamentumok összeszerelődésében.

Tekintve, hogy a szarkomerikus aktin filamentumok kialakulásának mikéntje munkánk kezdetén jórészt ismeretlen volt, előzetes eredményeink alapján úgy gondoltuk érdemes részletesen is megvizsgálni milyen szerepet tölthet be a *Drosophila* DAAM fehérje a miofibrillogenezis során.

CÉLKITŰZÉSEK

A legfontosabb célkitűzésünk az volt, hogy fényt derítsünk a dDAAM mint formin molekula szarkomeren belül játszott szerepére. Ennek érdekében a következő kísérleteket terveztük végrehajtani:

- első lépésként a dDAAM fehérje lokalizációját kívántuk még alaposabban vizsgálni a muslica indirekt repülőizmának szarkomereiben
- szándékunkban állt a lokalizációs kísérleteket, a vad típuson kívül, kiterjeszteni a fehérje funkcióvesztéses mutánsaira, valamint fehérje túltermeléses mutánsokra is
- funkcióvesztéses mutánsok és RNS csendesítő konstrukciók segítségével terveztük vizsgálni, hogy van-e szerepe a *dDAAM*-nak az aktin filamentumok kialakulásában és a szarkomerek összeszerelésében
- további tervünk volt a dDAAM molekuláris funkciójának vizsgálata, és a dDAAM-mal együttműködő izomfehérjék azonosítása, genetikai interakciós kísérletek, illetve biokémiai-biofizikai kísérletek során

ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

- *Drosophila* genetika:

- transzgénikus vonalak létrehozása

- Rekombináns DNS - technikák:

- PCR
- klónozás

- *Drosophila* embriók preparálása:

- metanolos fixálás
- „lassú” fixálás

- Immunhisztokémia:

- *Drosophila* indirekt repülőizom, lárvális testfal izom, szívcső preparálás
- egér izomszövetek preparálása

- Western- blot

- Fluoreszcens és konfokális mikroszkópia

- Atomerő-mikroszkópia

- Elektronmikroszkópia

- F-aktin végillesztő aktivitási vizsgálat

EREDMÉNYEK

- a dDAAM fehérje lokalizációját vizsgálva megállapítottuk, hogy a dDAAM fehérje az indirekt repülőizom (IFM) szarkomerein belül a vékony filamentumok mindkét végén, a Z-korongok és az M-vonal környékén is lokalizálódik
- a különböző *dDAAM* mutánsok esetében, az IFM-ben levő dDAAM fehérje szint csökkentésével arányosan nőtt a röpképtelen legyek aránya. A legmarkásabb fenotípust úgy értük el, hogy a részlegesen dDAAM hiányos *dDAAM^{Ex1}*-es legyekben csendesítettük a *dDAAM* gént (*dDAAM^{Ex1}*, *UDT*)
- Western blot analízis segítségével igazoltuk, hogy a röpképtelen fenotípus erőssége megegyezett a dDAAM fehérje szintjének az IFM-ben tapasztalt csökkenésével mind a *dDAAM^{Ex1}*-es mind pedig az *dDAAM^{Ex1}*, *UDT* genotípusú állatok esetében
- a teljes hosszúságú fehérje túltermelésével elvégzett menekítési kísérlettel bizonyítottuk, hogy ezek a fenotípusok valóban a dDAAM szintjének csökkenéséhez köthetőek
- a legnagyobb dDAAM hiánnyal rendelkező *dDAAM^{Ex1}*, *UDT* legyek esetében a legsúlyosabb IFM fenotípust figyelhetjük meg. Ez az izomrostok egy részének az elsorvadását jelentette, a megmaradó miofibrillumok pedig vékonyabbak voltak a vad típusnál és a szerveztségüket is elvesztették. A szarkomer hossz rövidülés ezekben a miofibrillumokban elérte a 38%-ot
- a bábállapot kialakulásától számított 48 órás *dDAAM^{Ex1}*, *UDT* mutánsok IFM-jében már megfigyelhetőek ugyanazok a fenotípusos elváltozások, amelyeket a fiatal felnőtt állatok esetében tapasztaltunk
- a *dDAAM^{Ex1}*, *UDT* mutánsok elektronmikroszkópiás analízisével igazoltuk és kiegészítettük a konfokális mikroszkópia által nyert eredményeket

- atomerő mikroszkópiás elemzéseket is végeztünk, amelyek során sikerült kimutatnunk, hogy mind a $dDAAM^{Ex1}$ mind a $dDAAM^{Ex1}$, UDT mutánsok miofibrillumainak haránt irányú rugalmassága szignifikánsan alacsonyabb a vad típusénál
- a DAAM fehérje lokalizációs megfigyeléseket kiterjesztettük más izmokra is. A fehérjét sikerült detektálni a fejlődő és az adult szívcsőben, és a lárvális testfal izmokban is
- embrionális és adult korú egér izommetszetek immunfestése után azt tapasztaltuk, hogy az mDaam1 a *Drosophila* izmokban tapasztalt lokalizációs mintázathoz hasonló képet ad egér izmokban is, ami evolúciós konzerváltságra utal
- az egér sejt kultúrákban végzett kísérleteink azt mutatták, hogy az mDaam1 a szarkomer kezdeményekben ugyanolyan korán jelenik meg, mint az aktin keresztkötő α -aktinin, ami azt jelenti, hogy ennek a formának korai szerepe van a miofibrillogenezis során
- a legnagyobb $dDAAM^{Ex68}$ deficiencia allélt hordozó 100 órás mutáns lárvákban a VL3-as izom hossza a mutáns lárvákban 53%-al, a szélessége pedig 38%-al csökkent a vad típushoz képest
- a 100 órás $dDAAM^{Ex68}$ mutáns lárvák csökkent testméretével összhangban a szívcsővük átmérője ~ 40%-al kisebb a vad típushoz képest
- a $dDAAM$ és az IFM specifikus $Act88F^{KM88}$ és $Tm2^3$ allélok között erős genetikai kölcsönhatást találtunk, nem-izom sejt típusú izoformákkal pedig nem volt interakció ami azt bizonyította, hogy a $dDAAM$ fehérje funkciója az izomfejlődés során a szarkomerikus aktin filamentumok kialakításához kötődik
- genetikai interakciós kísérleteket végeztünk két bizonyítottan (-) vég szabályozó fehérje mutáns alléljaival, a $SALS$ -al és a $Tmod$ -al. A $sals^{f07849} / +$ a $dDAAM^{Ex1}$ –es mutáns háttéren nem okozott fenotípusbeli változást. Ezzel szemben a

- tmod*⁰⁰⁸⁴⁸ mutáció teljes mértékben szupresszálta a *dDAAM*^{Ex1} mutáns gyenge röpképtelen fenotípusát, visszaállítva a vad típushoz közeli értéket
- kimutattuk, hogy az alacsonyabb dDAAM fehérje szint szupresszálja a vékony filamentumok „túlnövekedési” fenotípusát, amelyet a *tmod*^{RNSi} muslicák indirekt repülőizmában láttunk
 - egy *in vitro* F-aktin végillesztő aktivitási vizsgálatot is végeztünk, melyben a dDAAM (+) vég kötő FH1-FH2 doménjeit használtuk. Azt találtuk, hogy az FH1-FH2 domén 100nM-os koncentrációban nem gátolta az aktin filamentumok végeinek az összeolvadását. A tropomiozin (TM) viszont elősegítette az aktin filamentumok vég-a-véghez illesztését, a TM és dDAAM együttes hatása pedig kissé még erősebb is volt, mint a TM-é egyedül
 - az *mhc* és a *dDAAM* között az életképességet és az izomszerkezetet érintő domináns genetikai kölcsönhatás találtunk, ami arra utal, hogy a dDAAM az MHC fehérjével összehangoltan működik az izomfejlődés során

A KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

A disszertáció alapjául szolgáló publikáció:

Molnár I, Migh E, Szikora S, Kalmár T, Végh AG, Deák F, Barkó S, Bugyi B, Orfanos Z, Kovács J, Juhász G, Váró G, Nyitrai M, Sparrow J, Mihály J.
DAAM is required for thin filament formation and sarcomerogenesis during muscle development in *Drosophila*.
PLoS Genetics 2014 Feb 27;10(2):e1004166. IF: 8.10

Egyéb közlemények:

Nelson KS, Khan Z, Molnár I, Mihály J, Kaschube M, Beitel GJ.
Drosophila Src regulates anisotropic apical surface growth to control epithelial tube size.
Nature Cell Biology 14:(5) pp. 518-510. (2012) IF: 19.488

Prokop A, Sanchez-Soriano N, Goncalves-Pimentel C, Molnár I, Kalmár T, Mihály J.
DAAM family members leading a novel path into formin research.
Communicative & Integrative Biology 4:(5) pp. 538-542. (2011)