

**A határsejtvándorlás szabályozásában
résztevő gének azonosítása és jellemzése
ecetmuslicában**

Ph.D értekezés

Szegedi Tudományegyetem
MTA Szegedi Biológiai Központ

2004

Készítette: Somogyi Kálmán
Témavezető: Dr. Kiss István

Bevezetés

A többsejtű állatok fejlődésének jellegzetessége bizonyos sejteknek, illetve sejtcsoportoknak a szervezetben belüli helyváltoztatása, vándorlása. Több olyan szövetet ismerünk, melynek őssejtjei végül helyüketől távolabb alakulnak ki, és csak hosszabb-rövidebb mozgás után jutnak el végleges helyükre, ahol az adott szövetféleség kialakítását elkezdhetik (primordiális ivarsejtek, a perifériás idegrendszer alapítósejtjei, mioblasztok, stb.).

A felnőtt állatokban is találunk aktív vándorlásra képes sejteket, bár ezek gyakorisága lényegesen alacsonyabb, mint a fejlődő szervezetekben. Ilyen, a kifejlett egyedekben aktív mozgásra képes sejtek pl. az immunvédekezés kulcs-szereplői, a fehérvérsejtek, vagy a sebzáródásban nélkülözhetetlen fibro-blasztok.

Ezen túl, a daganatos betegségek egyik döntő és rendkívül veszélyes szakasza a rákos sejtek metasztázisos átalakulása, amely ezeket a sejteket

Ezek a felsorolt példák szemléltetik, hogy a sejtváándorlási folyamatok tanulmányozása, részletes megértése a bio-lógiai kutatások fontos területe.

Funkciónyeréses genetikai szírés

A sejtváándorlás tanulmányozására az acetmuslica (*Drosophila melanogaster*) ivarsejtképzése során megfigyelhetCE hatarsejtváándorlási folyamatot választottuk. A hatarsejtek csoportja 6-8 sejt bCEl áll. Ezek a sejtek az acetmuslica peteérési folyamata során jellegzetes váándorlást hajtanak végre. A 9. fejlCEdési fázis elején kiválnak az ivarsejteket körülvevCE egyrétegi, szomatikus eredetű epiteliális sejtrétegbCEl és a dajkasejtek között poszteriorális irányban váándorol-

azzal a képességgel ruházza föl, hogy eredeti helyüket aktív mozgással elhagyják, a szervezet más pontjain található szövetekben, szervekben új daganatokat hoznak létre. Ezzel alaposan megnehezítik a gyógyítási erCEfeszítéseket.

Kutatásaink első lépéseként nagyléptéki genetikai szűrést hajtottunk végre, melyben 1510 harmadik kromoszómás EP transzpozonos beépülés átvizsgálását végeztük el, olyan gének után kutatva, melyek szerepet játszhatnak a határ-sejtvándorlásban. 50 olyan inszerciót azonosítottunk, amelyek valamilyen gén közelébe kerültek be. Ezek a gének változatos funkciójú fehérjéket kódoltak. Találtunk közöttük aktin-kötő fehérjéket, transzkripciós faktorokat, kinázokat, háztartási fehérjéket, stb.

nak, és végül eléri a petesejtet. Ezt a vándorlást két redundánsan működő vezetési rendszer irányítja. Ennek kulcsszerepei a vándorlás irányát jelző extracelluláris fehér-jemolekulákat érzékelő két tirozinkináz receptor, az EGFR és a PVR. A kemotaktikus jel érzékelésének mechanizmusa ismeretében fontos további kérdés, hogy a receptorokon keletkezett jel miként járul hozzá a sejten belüli, a vándorláshoz szükséges folyamatok szabályozásához.

szerint szerepet játszhatnak az aktin hálózat átépítésében. Három ilyen gén alaposabb jellemzését végeztük el.

Az aktinsejtváz átrendezése a sejtvándorlás lényeges feltétele. A vándorló sejtek nyúlványokat bocsájtanak ki. Ezek segítségével veszik föl a kapcsolatot a környezetükkel és biztosítják a mozgáshoz szükséges fizikai erők jelentős részét. A sejtnyúlványok képzésében az aktin polimerizáció és az aktin-szálak hálózatának kiépülése lényeges elem. Az aktinváz szabályozott átépülése nélkül nem lehetséges sejtvándorlás.

Annak érdekében, hogy megérthessük az aktin sejtváz átrendezésének szabályozását a határsejtvándorlás során, a genetikai szűrésből olyan géneket választottunk további vizsgálataink céljára, amelyek feltételezésünk

gén mutánsai mutatnak. Az aktivált Src42 fehérje által okozott fenotípust a cortactin mutációja szuppresszálja, ami arra utal, hogy a Cortactin szerepet

cortactin

A Cortactin fehérjét kódoló gént emlősökben mint onkogént azonosították. Fölismerték fontosságát az aktin sejtvázas átrendeződésének szabályozásában. A Cortactin köti és aktiválja az Arp2/3 fehérjekomplexet, ezáltal serkenti az aktin polimerizációt. Túlermelkedése a sejtek metastázisos transzformációját és megnövekedett mozgási hajlandóságát eredményezi.

Imprecíz EP-elem kivágódások segítségével a *cortactin* gén négy új deléciós mutációját azonosítottuk. Az egyik deléció (M7) eltávolítja a teljes *cortactin* gént. A mutáns legyek életképesek és termékenyek. A petekezésvizsgálata során kimutattuk a Cortactin fehérje különböző aktinfüggő folyamatokban való részvételét.

A homozigóta mutáns legyek gyűrűsatornái kisebbek a vad típusnál. Ez a fenotípus hasonló ahhoz, amit a *Src64*

vállal a Src fehérjék és az aktin sejtváza közötti jelátvitelben.

A *cortactin* mutánsokban határsejtek vándorlásában károsítást találtunk. Megállapítottuk, hogy a Cortactin fehérje túlermelése intenzív F-aktin felhalmozódást és sejtnyúlványképzést okoz. Az aktivált PVR által okozott fenotípust a *cortactin* homozigóta mutáció szuppresszálta, ami arra utal, hogy a *cortactin* vélhetően a határsejtek vándorlásának irányításában kulcsszerepet játszó tirozinkináz receptor, a PVR alatti jelátviteli út részeként működik.

A *cortactin* gén mutációja viszonylag csekély hatásokat okoz. Ez azt jelzi, hogy a gén működése redundáns más génekkel. További vizsgálatok dönthetik el, melyek ezek a gének és mi az a mechanizmus, amely az egyes között kölcsönhatást szabályozza.

myoblast city

A *myoblast city* (*mbc*) a humán DOCK180 Drosophila-homológja, a Rac kis GTP-áz aktivátoraként az aktinváz átrendeződésben játszik szabályozó szerepet.

Kimutattuk, hogy az *mbc* mutációja a határsejtek súlyos vándorlási zavarait okozza. Ez a fenotípus hasonló ahhoz, amit a domináns negatív Rac fehérje okoz. Az *mbc* mutációja jelentősen mérsékelte a szuppresszálta az aktivált PVR által okozott fenotípust. Ez igazolja, hogy az MBC fehérje a PVR receptortól az aktinvázig haladó, valószínűleg a Rac fehérjét is magába foglaló jelátviteli út fontos eleme.

Megvizsgáltuk a *mbc* legközelebbi muslica-homológja, a *sponge* (*spg*) szerepét is. A *spg* nem okoz károsítást a határsejtvándorlásban, de a *mbc*, *spg* kettős homoizógóta mutánsok vándorlási fenotípusa súlyosabb annál, mint amit az *mbc* mutáns mutat. Ez igazolta, hogy a két gén hasonló funkciót tölt be ebben a folyamatban.

Ezek az eredmények új adatokat szolgáltatottak a Myoblast city és Sponge fehérjéknek az ecetmuslica határsejt-vándorlási folyamataiban játszott szerepéről. Továbbra sem tisztázott azonban, hogy az ecetmuslica genomjában található további két, a *myoblast city*vel rokon gén milyen funkciót gyakorol és az milyen

mértékben hasonló a *myoblast city* és a sponge szerepével.

mal-d

A genetikai szűrés során egy eddig ismeretlen *Drosophila* gént (*mal-d*) azonosítottunk. A MAL-D fehérje az emberi MAL muslica-homológja, a transzkripciósfaktorként működő SRF fehérje kofaktora.

Imprecíz transzpozon-kivágódás és EMS mutagenézis segítségével *mal-d* mutánsokat (köztük 3 null allélt) izoláltunk. A mutációk elemzése kimutatta, hogy a *mal-d* gén fontos a sejtek aktinvázának

kialakításában. Mutánsain a határsejt-vándorlás jelentős késése, ill.

jellegzetes F-aktinhiányos fenotípus mutatható ki (a nagyméretű szőrök torzulása, follikuláris sejtek aktinvázának vékonyodása). A vad típusú fehérje, vagy a konstitutívan aktivált MAL-D túlermelletése ellenkező hatású: a sejtek nagy mennyiségű polimerizált aktin halmoznak föl a sejtkegében. A MAL-D nem gyakorol kimutatható hatást a sejtek általános aktinszintjére. Az aktin sejtváza valószínűleg inkább egyes, az aktin sejtváza

átépítésében szerepet játszó géneknek a transzkripció szabályozásán keresztül lehet részük.

A MAL-d fehérje által transzkripciószabályozott gének egyelőre nem ismertek, további vizsgálatok szükségesek ez irányban. Nem tisztázott továbbá, milyen szerepe van a MAL-D-nek az *acetabularia* egyedfejlésében. A mutáns embriók fenotípusának elemzése választ adhat erre a kérdésre.