

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

Ph.D értekezés

Szegedi Tudományegyetem
MTA Szegedi Biológiai Központ

2004

Készítette: Somogyi Kálmán
Témavezető: Dr. Kiss István

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK.....	2
1. BEVEZETÉS.....	7
1.1. A sejtváándorlás biológiai jelentésége.....	7
1.2. A sejtváándorlás főbb lépései.....	8
1.3. Az aktinváz átépülésének molekuláris szabályozása..	10
1.4. A sejtváándorlás irányának meghatározása: kemotaxis..	12
1.5. Sejtváándorlás az ecetmuslicában.....	13
1.6. Az ecetmuslica peteképzése.....	14
1.7. Az ecetmuslica határsejtváándorlásának szabályozása..	18
1.7.1. A határsejt csoport kialakulása.....	18
1.7.2. A határsejtek mozgásához szükséges egyes elemek..	19
1.7.3. A határsejtváándorlás váándorlás irányának meghatározása.....	20
1.8. A határsejtváándorlás folyamatát vizsgáló genetikai szírések.....	21
1.9. Célkitízés.....	23
2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	24
2.1. Muslica tartási körülmények.....	24
2.2. Az EP inszerciós mutáns gyíjtemény vizsgálata.....	24
2.3. Szomatikus mozaik klónok elállítása.....	25
2.4. Fehérje-túlermelés klónok elállítása.....	27
2.5. Transzgenikus legyek elállítása.....	27
2.6. EMS mutagenézis.....	28
2.7. β -galaktozidáz festés.....	28
2.8. Ellenanyagfestés.....	28
2.9. A gyíricsatornák átmérésének mérése.....	29
2.10. A petehosszúság mérése.....	29
2.11. Genomikus DNS izolálása.....	30
2.12. Az EP-elem indukálta mutánsok plazmidmenekítése....	30

2.13. DSN szekvencia meghatározás.....	30
2.14. Southern hibridizáció.....	31
2.15. Random primer jelölés.....	31
2.16. DNS-hibridizáció.....	31
2.17. Az UAS-cortactin és tubulin-cortactin DNS-konstrukciók klónozása.....	31
2.18. DNS-izolálás egyedi legyekből PCR reakcióhoz.....	32
2.19. PCR.....	33
2.20. Western analízis.....	33
3. EREDMÉNYEK.....	35
3.1. Funkcionyeréses genetikai szűrés EPg-elem alkalmazásával.....	35
3.1.1. Slbo-szupressziós genetikai szűrés.....	35
3.1.2. Southern hibridizáció.....	37
3.1.3. Az EPg-beépülés által eltalált gének.....	38
3.2. Cortactin.....	42
3.2.1. A <i>cortactin</i> gén a slbo fenotípus szupresszora.....	42
3.2.2. Áttekintés: a Cortactin szerkezete és működése....	42
3.2.3. A Cortactin fehérje kimutatható a petekamra sejtjeiben.....	47
3.2.4. A Cortactin fehérje túltermeltetésének hatásai....	47
3.2.5. <i>cortactin</i> mutációk elállítása és térképezése.....	49
3.2.6. A specifikus Cortactin festés nem mutatható ki a <i>cort^{M7}/cort^{M7}</i> mutáns petekamrákban.....	51
3.2.7. <i>cortactin</i> mutáció ivarsejtképzésben mutatott fenotípusai.....	53
3.2.7.1. A folliculáris sejtréteg szakadásai.....	53
3.2.7.2. Zavarok a dajkasejtek és a petesejt közötti anyagszállításban.....	54
3.2.7.3. Késés a hatarsejtek vándorlásában.....	56
3.2.8. A Cortactin fehérje részt vesz a PVR tirozinkináz aktin sejtvázhhoz vezet receptortól az	

jelátvitelben.....	60	
3.2.8.1. A Cortactin fehérje mennyisége növekszik a PVR-aktivált sejtek membránjánál.....	60	
3.2.8.2. A Cortactin fehérje hiánya szuppresszálja a folytonosan aktivált PVR-receptor hatásait.....	61	
3.2.9. A Cortactin fehérje eleme a Src és az aktin sejtvíz jelátviteli útnak.....	64	közötti
3.3. Myoblast city és sponge.....	66	
3.3.1. A <i>myoblast city</i> a slbo fenotípus szuppresszora.....	66	
3.3.2. Áttekintés: az MBC fehérje szerkezete és működése.....	66	
3.3.3. Az MBC fehérje kimutatható a petekamra sejtjeiben.....	68	
3.3.4. Az MBC túltermeltetésének nincs hatása a petekamrákban.....	69	
3.3.5. A Myoblast city fehérje hiánya késést okoz a határsejtvándorlásban.....	70	
3.3.6. A Myoblast city fehérje részt vesz a PVR-tCEI induló jelátvitelben.....	71	
3.3.7. A Sponge részt vesz a határsejtvándorlási folyamatban és a PVR-tCEI induló jelátvitelben.....	72	
3.4. A <i>myoblast city</i>, a <i>sponge</i> és a <i>cortactin</i> gének hasonló funkciójának vizsgálata.....	74	
3.4.1. A <i>cort-mbc-spg</i> hármas mutáns határsejtek vándorlása korán elakad.....	74	nagyon
3.4.2. A <i>cort-mbc-spg</i> hármas mutáns kombináció PVR-szuppresszáló hatásának vizsgálata.....	76	λ-
3.5. A <i>mal-d</i>.....	77	
3.5.1. Az EPg37532 inszerció torzult szCEfenotípust okoz.....	77	
3.5.2. Az EPg37532 elem a <i>mal-d</i> gén elsCE intronjában található.....	78	
3.5.3. Áttekintés: a MAL fehérjék működése és szerkezete.	78	

3.5.4. A <i>mal-d</i> gén deléciós mutánsainak létrehozása	81
3.5.5. A <i>mal-d</i> ^{Δ7} homozigóta mutáns legyek fenotípusa.....	82
3.5.6. A MAL-D fehérje nem mutatható ki a <i>mal-d</i> ^{Δ7} homozigóta mutáns legyek petefészkeiben..	83
3.5.7. A MAL-D fehérje kimutatható a határsejtekben a alatt.....	84
3.5.8. A <i>mal-d</i> ^{Δ7} mutáns mozaikos petekamrák elemzése.....	84
3.5.9. A <i>blistered</i> gén mutációja a <i>mal-d</i> -hez részben hasonló fenotípusokat okoz.....	86
3.5.10. Pontmutációk létrehozása a <i>mal-d</i> génben.....	86
3.5.11. Az EMS-allélek fenotípusának elemzése.....	88
3.5.12. A <i>mal-d</i> fokozott működésének hatásai.....	89
3.5.13. A <i>mal-d</i> mutációja nem befolyásolja a sejtek G-aktin-szintjét.....	93
4. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA.....	95
4.1. A <i>slbo</i>¹³¹⁰/<i>slbo</i>¹³¹⁰ mutáció fenotípusát szuppresszálo gének azonosítása.....	95
4.2. A Cortactin.....	97
4.2.1. A <i>cortactin</i> gén szerepe a határsejtvándorlásban...	97
4.2.2. A Cortactin és a Src fehérjék kapcsolata.....	99
4.2.3. A Cortactin fehérje áthelyezése a citoplazmából a sejtmembránokhoz	100
4.2.4. 4.2.4. A <i>cortactin</i> a tirozinkináz receptorok egyik jelátvivője	101

4.2.5. A <i>cortactin</i> nem életfontosságó gén.....	103	
4.3. A Myoblast city és a Sponge.....	104	
4.3.1. A Myoblast city a határsejtvándorlás szabályozásának kulcsszereplője.....	104	
4.3.2. A Myoblast city fehérje aktiválása	105	
4.3.3. A Sponge és a Myoblast city fehérjék funkciója hasonló.....	106	
4.4. A Cortactin, a Myoblast city és a Sponge fehérjék hasonló funkciót látnak el.....	106	
4.5. A MAL-D.....	107	
4.5.1. A <i>Drosophila mal-d</i> génjének azonosítása fenotípusai.....	107	és mutáns
4.5.2. A MAL-D aktivitásának szabályozása.....	109	
4.5.3. A MAL-D szerepe a transzkripciós szabályozásban és egyedfejlődésben.....	111	az
5. ÖSSZEFOGLALÁS.....	112	
6. SUMMARY.....	117	
7. IRODALOMJEGYZÉK.....	122	
8. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK.....	138	
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	139	

1. BEVEZETÉS

1.1. A sejt vándorlás biológiai jelentősége

Az állati élet tanulmányozása során szerezhetsz egyik legmélyebb benyomást a mozgó sejtek látványa okozza. A sejtek mozgását, vándorlását a legkülönbözőbb szervezési és fejlődési szinteken megfigyelhetjük.

Számos aktív mozgásra képes egysejtet ismerünk, ezek közül a *Dictyostelium discoideum* amiből a szabályozott sejt vándorlás kutatóinak egyik modellszervezetévé vált, mivel kiderült, hogy kemotaktikus mozgását a magasabbrendűekéhez rendkívül hasonló jelátviteli folyamat irányítja (Parent és Devreotes, 1999; Chung és mtsai, 2001). Ez jelzi a sejt vándorlást szabályozó rendszerek nagymértékű evolúciós hasonlóságát.

A többsejtű állatokban megfigyelhetők sejtmozgások nagyrésze az embrionális fejlődés alatt játszódik le. Elég, ha csak a gasztrulációra, vagy az idegrendszer kialakulására utalunk. A teljes szövetrendszerek összehangolt mozgását igénylő folyamatokkal szemben megfigyelhetők az egyénileg, vagy kis csoportokban végrehajtott sejt vándorlások is. Ennek több modellszervezetben tanulmányozott példája a primordiális ivarsejtek vándorlása (áttekintve: Forbes és Lehmann, 1999; Ribeiro és mtsai, 2003). Az embriogenezis korai szakaszában specializálódott csírasejtek arra helyre vándorolnak, ahol más eredeti szövetekkel együtt a jövőbeli ivarszerveket fogják képezni.

Több más szövet sejtjei is nagyobb távolságokról vándorolnak végleges helyükre, hogy kialakítsák a megfelelő szöveteket, szerveket. A perifériális idegrendszer egyes alapítósejtjei például nagy távolságokat tesznek meg az egyedfejlődés során, hogy a szervezet legkülönbözőbb helyein differenciálódva idegsejtté, melanocitává, porccá, vagy fejcsonttá alakuljanak (LaBonne és Bronner-Fraser, 1999). A vázizomzatot kialakító sejtjei is a szervezet minden szükséges pontjára eljutva indítják el a törzs és a végtagok izomzatának kialakulását (Buckingham, 2001).

Itt kell megemlítenünk az axonnövekedés folyamatát is. Ugyan a sejt maga nem változtatja helyét az idegsejtek axonjainak megnyúlása és célsejtjeinek megtalálása esetén, de az axon növekedési csúcsában lezajló sejtszintű folyamatok és a vándorlási

útvonal követése feltűnően hasonlítanak a mozgó sejtek vezető oldalán tapasztalt eseményekre és e sejtek kemotaxisára (áttekintve: Goldberg, 2003).

A kifejlett állati szervezetben kevesebb példa van a sejtek vándorlására. Az immunrendszer mozgó elemei, a fehérvérsejtek a szervezet szinte bármely pontjára képesek eljutni, hogy fölvegyék a harcot a fertőző ágensekkel. A sebek gyógyulásának kulcslépése a fibroblasztsejteknek a sérülés helyére történő vándorlása, ahol gyors szaporodásukkal és a sejtközöti állomány egyes elemeinek intenzív termelésével elősegítik a nyitott felület mielőbbi záródását.

A sejt vándorlás a szervezetek károsításához is hozzájárulhat. A daganatok rosszindulatúvá válásának a szabályozatlan sejtosztódás mellett a vándorlási képesség megjelenése is jellemzője lehet. Az ily módon megváltozott, metasztázisos sejtek kiléphetnek a környező szövetből, elhagyhatják kialakulási helyüket és távoli helyekre vándorolva megtelepedhetnek más szervekben is, jelentős mértékben nehezítve a sikeres gyógykezelést.

1.2. A sejt vándorlás főbb lépései

A sejtek mozgására két alapvető stratégiát figyelhetünk meg: az úszást és a csúszómozgást. Az előbbi elsősorban a baktériumokra jellemző, de megtalálhatjuk fejlettebb szervezetekben is (pl. spermiumok mozgása). A csúszómozgás a soksejtű élőlényekben leginkább megfigyelhető mozgási forma. Ennek során a sejtek valamely felületen (többsejtű szervezetekben leggyakrabban más sejtek felszínén) mozognak. Ennek a mozgásformának legfőbb jellemzői (1. ábra):

1. A sejtek először *nyúlványokat* bocsátanak ki, melyek segítségével föltérképezik, letapogatják környezetüket.

2. A nyúlványok némelyike *letapad* a vándorlási felülethez, és azzal szorosabb kapcsolatot (fokális adhézio) létesít.

3. A letapadt sejt nyúlványok biztosítják az alapot az egész sejt *áthelyezésére*, elmozdulására.

4. A mozgással ellentétes oldalon levő sejt kapcsolatok megszűnnek, az itt található sejt részek követik a sejt elmozdulását, *előrehúzódnak*.

A sejt vándorlás folyamatos, egyenletes, a felsorolt lépések egyidejűleg zajlanak le (Mitchison és Kramer, 1996).

1. ábra A sejtándorlás folyamatának vázlata. (Alberts és mtsai, 1994 alapján)

A sejtadhéziós kapcsolatok dinamikus szabályozása nélkül lehetetlen lenne a szabályos sejtándorlás. A letapadó nyúlványokon keletkező úgynevezett fokális adhéziók kulcsszereplői a transzmembránfehérjék, amelyek kívülről sejten kívüli fehérjékhez (kollagén, fibronektin, laminin), belülről egy nagyobb fehérjekomplex segítségével az aktin sejtvázhoz kapcsolódnak. Jellegzetes ilyen transzmembránfehérje a kettős egységekbe rendeződő integrin. A cadherineknél hasonló szerepet töltenek be, de elsősorban a szomszédos sejtek cadherinjeihez való kötéssel képesek a sejt letapadását közvetíteni.

A sejtnyúlványok kialakítása két alapvető, alaktanilag és molekuláris szinten is jól megkülönböztethető képződményt hozhat létre. Az úgynevezett filopódiumok (állábak) vékony, hosszú struktúrák, melyek vázát hosszanti irányban elnyújtott aktinszálak építik föl. Ezek a nyúlványok nagy távolságokra képesek kinyúlni és elsősorban érzékelni a környezetüket kitapogató szerepük lehet. A lamellipódiumok aktinszállai egymással keresztben összekötött, hálózatosan fölépülő szerkezetiek, ennek megfelelően ezek a sejtnyúlványok szélesek, laposak. A lamellipódiumok a sejtek mozgásához szükséges fizikai erő elsődleges forrásai.

1.3. Az aktinváz átépülésének molekuláris szabályozása

A sejtnyúlványok képzésében fontos szerepe van az intenzív aktin polimerizációnak. A növekedő aktinszálak biztosítják a nyúlványok membránjának kifestítését, a vándorlás irányába történő kiterjesztését.

Az aktinszálak (filament-aktin, vagy F-aktin) bipoláris szerkezetű polimerek. A monomerek, globuláris aktin (G-aktin) molekulái képesek egymáshoz kötődve F-aktinláncot alkotni. Az aktinszál pozitív végén ez az összeszerelés lényegesen hatékonyabb, mint a negatív végén, így a szálak a pozitív végüknél növekednek.

Ez a növekedés sokféleképpen szabályozott. A profilin aktinkötő fehérje az általa megkötött G-aktint a pozitív végekhez szállítja, így serkenti a polimerizációt. A cofilin fehérje a negatív végnél a szálak lebontását segíti, egyúttal új G-aktin molekulákat szabadít föl a szálak növekedéséhez. Más aktinkötő molekulák, így például a timozin fehérje erős kötésben tartják az aktin monomereket, eképpen lassítják az aktinváz fölépülését.

Az Arp2/3 fehérjekomplex az egyik legfontosabb aktin polimerizáló tényező, szerepét a közelmúltban ismerték föl (May, 2001). Ez a hét, rendkívül konzervált szerkezetű fehérjéből álló együttes új, növekedésre kész elágazásokat hoz létre. A megsemmisítő és növekvő aktinváz ennek segítségével képes maga előtt tolni a sejtmembránt, ami elengedhetetlen része a sejtnyúlványok kialakításának és kiterjedésének.

Az Arp2/3 komplex legfontosabb aktivátorai a WASP és SCAR családba tartozó fehérjék (áttekintve: Pollard és Borisy, 2003). Ezek közvetlenül az egyes receptorokhoz kötődő adaptermolekuláktól (pl.: Grb2, Nck) kaphatnak jeleket, így fontos tényező a külső jeleket vevő receptoroktól az aktin sejtinváz szabályozásáig tartó, lokálisan működő jelátvitelnek.

Az aktin polimerizáció kulcs szereplői a Rho családba tartozó kis GTP-ázok: Rho, Rac, Cdc42 (Hall, 1998). Ezek aktív, GTP-kötött állapotukban képesek más, úgynevezett végrehajtó molekulákhoz kapcsolódni és azokat aktiválni. Ezek az aktivált fehérjéken keresztül a Rho GTP-ázok a sejtben zajló folyamatok rendkívül széles skáláján fejthetnek ki szabályozó szerepet. Ezek közül a szerepek közül az egyik az aktin sejtinváz átépülésének irányítása.

A Rho GTP-ázoknak saját, bár viszonylag gyenge GTP-hidrolizáló enzimaktivitásuk van. Ennek révén, de ennél sokkal jelentősebb mértékben a GTP-áz aktiváló fehérjék (GAP) közreműködésével GDP-kötött, inaktív állapotba kerülhetnek,

és így már nem képesek más molekulák aktiválására. A nukleotid-cserélő faktorok (GEF) pedig katalizálni tudják egy foszfátcsoport GDP-hez való kötődését, és így visszaállítják a kis GTP-öt GTP-kötött, aktív formájára. Ez a két ellentétes enzimreakció teszi a Rho család fehérjéit könnyen szabályozható molekuláris kapcsolóelemekké.

Több, a kis GTP-ázok által szabályozott és az aktinváz fölépülésében szerepet játszó molekula ismert. Például a Cdc42 aktiválhatja az N-WASP molekulát, mely az Arp2/3 komplexen keresztül aktin polimerizációt serkent (Miki és mtsai, 1998). Hasonló hatású a Rac fehérjének a WAVE2 fehérjéhez történő kötődése (Miki és mtsai, 2000). A Rho egyik fontos végreható molekulája, a p140Dia (a *Drosophila* Diaphanous homológja), mely az aktiválás hatására a profilin működését, vagyis az aktin polimerizációt serkenti (Pollard és Borisy, 2003).

A kis GTP-ázoknak saját GEF és GAP molekuláik vannak, és különböző végrehajtó molekulákat serkentenek. Így ezen egyszerű kapcsolók segítségével a sejtekben változatos lehetőség adódik az aktin polimerizáció helyének, módjának és idejének a szabályozására.

1.4. A sejt vándorlás irányának meghatározása: kemotaxis

A sejtek vándorlása többnyire célirányosan történik. Az irány meghatározásának egyik legfontosabb módja a kemotaxis. Ennek során valamilyen oldott vegyület által képzett koncentráció gradiens mentén történik a sejtek elmozdulása. Attól függően, hogy ez az anyag vonzó, vagy éppen taszító hatással van-e a sejtre, beszélhetünk kemoattraktánsról, vagy kemorepellensről.

A *Dictyocellium discoideum* amebafaj képes érzékelni a sejtmembránján jelentkező 2%-nyi cAMP-koncentráció-különbséget és a megfelelő irányban, a cAMP-forrás felé elmozdulni. A magasabb rendű szervezetek leukocitái hasonló választ adnak a baktériumok által kibocsájtott, csakis azokra jellemző vegyületekre.

A kemotaxis által kiváltott sejtszintű változások első lépése a sejtek polarizálódása. Ennek során kiválasztódik a vándorlási irány, és az azon az oldalon létrejövő, úgynevezett vezető él. Itt játszódnak le a sejtnyúlványképző folyamatok, és az új sejtkapcsolatok kiépülése, míg a pólus másik oldalán, a hátsó élen a sejtek felszámolják kapcsolataikat és maguk után húzzák membránjukat.

Érdekes kérdés, hogy a sejtek miként tudnak ilyen drámai alaktani változásokkal reagálni egészen alacsony koncentráció-különbségekre. A *Dictyostelium* és a

leukociták jól megfigyelt esetében a grádienseket észlelő receptorok egyenletesen oszlanak el a sejtmembránon. Így egyedül ezek külső ingerület által kiváltott aktivitáskülönbsége nem tűnik elégséges magyarázatnak. Sokkal inkább elfogadott az a modell, miszerint receptorokon fölépő ingerület a magasabb aktivitású helyeken a membrán menti citoplazmatikus faktorok közreműködésével megsokszorozódik, míg a membrán egyéb területein egy általánosan jelenlévő inhibitor molekula megakadályozza a kisebb külső ingerre fölépő receptoraktivitást, illetve az aktív területekre az inger továbbterjedését (Chung és mtsai, 2001). Az így lokalizált, de megfelelően erős aktivitás képes kiváltani a sejt polarizáltságát kialakító és fenntartó sejtszinti folyamatokat.

1.5. Sejtvándorlás az ecetmuslicában

Az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) tanulmányozásában eltöltött egy évszázad bőséges mennyiségű fejlődésbiológiai, genetikai, sejtbiológiai ismeretet eredményezett, melyek alapján az újonnan fölmerülő biológiai kérdésekre hatékonyan kereshetjük a válaszokat. Ehhez a genetikai eszközök széles skálája is rendelkezésünkre áll, ezek segítségével módosíthatjuk az egyes gének működését funkcióvesztéses, vagy funkciónyeréses irányban, idegen géneket építhetünk be, stb.

Az ecetmuslica a sejtvándorlás tanulmányozásában is hasznos segédeszköz lehet, lévén többféle példáját szolgáltatja ennek a folyamatnak. A már korábban említett példák mellett (primordiális ivarsejtek, hemociták, idegrendszeri alapítósejtek) mellett sajátos, a biológiai kutatásokban általában alkalmazott modellszervezetek közül egyedül a *Drosophilában* megfigyelhető sejtvándorlási folyamatokat is találhatunk (Ribeiro és mtsai, 2003).

A rovarok légzése a szervezetet behálózó tracheák segítségével zajlik. A levegőt szállító bonyolult, elágazó szerkezetű rendszert a szervezet belsejébe vándorló sejtcsoportok alakítják ki. A tracheális sejtvándorlás során az embriogenezis középső szakaszában szelvényenként egy-egy ponton ektodermasejtek egy csoportja benyomul az embrió belsejébe és ott zsákszerű képződményt, a későbbi légcsövet hozza létre. Bizonyos idő után hat kisebb sejtcsoport különböző irányokban továbbvándorol, így alakítják ki a légcsövek végső, finom elágazásait (Manning és Krasnow, 1993).

Egy másik sajátos mozgási forma és egyben ezen dolgozat központi kísérleti rendszere az úgynevezett határsejtek vándorlása a muslica peteképzése során.

1.6. Az ecetmuslica peteképzése

A *Drosophila melanogaster* peteképzésének helyszíne a potrohban található páros szerv, a petefészek, vagy ovárium (King, 1970; Spradling, 1993). A petefészek petecsövekből áll, melyek anteriorális-poszteriorális irányban növekvő érettségi állapotú petekamrákat tartalmaznak. Minden petekamrában egy-egy pete kialakulása és érése zajlik le (2. ábra).

2. ábra A *Drosophila melanogaster* peteképzése. Az acetabulum (A) potrohában található páros szerv a petefészek (B). A petefészek petecsövekből (C) épül föl. A petecsövekben anteriorális-poszteriorális irányban helyezkednek el a növekvő érési állapotú petekamrák. A kilences fejlődési fázisú petekamrában (D) megfigyelhetők a dajkasejtek (d) között anteriorális-poszteriorális irányban (nyíl) vándorló határsejtcsoport (kapocs), ami a 10. stádiumra eléri a follikuláris sejtréteg (f) által egy rétegben beburkolt óriási petesejtet (p). A dajkasejteket ekkor a lapított alakú, úgynevezett "nyújtott sejtek" (ny) burkolják be.

A follikuláris sejtek közül az anteriorálisan elhelyezkedő 1-2 sejt sort a centripetális follikuláris sejtek (cf) alkotják. A határsejtcsoport közepén és a petekamrák poszteriorális végén két-két poláris sejt (ps) helyezkedik el. A petecsövek anteriorális végében található a germárium (g).

A petecsövek anteriorális csúcsán egy-egy germáriumot találunk, ahol a szomatikus, illetve csíravonal eredetű sejtek osztódása, és utódsejteikből a petekamrák összerendezése megy végbe. A csíravonal sejtjei nem teljes osztódásokon mennek keresztül, a négy osztódási ciklus után keletkezett 16 utódsejt nincs egymástól teljesen elválasztva, citoplazmaik az úgynevezett gyűrűsatornákon keresztül közvetlen kapcsolatban maradnak egymással. A két, egyaránt négy gyűrűsatornával rendelkező csíravonalsejt közül az egyik poszteriorális elhelyezkedésű petesejtté alakul, meiózison megy keresztül, míg a többi 15 a transzkripcionálisan szinte teljesen inaktív petesejtet tápláló, a petefejlődéshez nélkülözhetetlen anyagokkal (RNS-ekkel, fehérjékkel) ellátó poltén dajkasejtté alakul.

A germáriumban összerendeződött petekamrák fejlődésük második szakaszában a vitelláriumba kerülnek, a petesejt érése itt folytatódik egészen az utolsó, 14. szakaszig.

Az ivarsejtek csoportjait körülvéshi és egymástól elválasztja egy egyrétegű, összefüggő follikuláris sejtréteg, melynek egyenlő halmazából elkülönül a petekamra anteriorális illetve poszteriorális csúcsain található két-két, egymással

szorosan kapcsolódó poláris sejt: ezek morfológiája és fejlődése lényegesen különbözik a többi szomatikus petekamrasejtétől (Margolis és Spradling, 1995).

A folliculáris sejtek a csírvonal növekedésével párhuzamosan osztódnak, egészen az oogenezis 6. fejlődési stádiumáig, amikor is számuk 800-1000-re tehető. Ezek háromféle szerepe a peteképzés során: tápanyagokat közvetítenek a hemolimfából a csírvonalnak; a pete egyes részeinek képzéséhez biztosítanak külső jeleket; és a peteképzés utolsó szakaszában az érett petét körülvevő peteburkot képezik (összefoglalva: Montell, 2003).

A fejlődés során a poláris sejtek radiális irányban molekuláris jeleket bocsátanak ki, melyek képesek irányítani a folliculáris sejtek különböző csoportokba történő differenciálódását (Gonzalez-Reyes és St.Johnston, 1998). Az anteriorális csúcson a poláris sejteket körülvevő 6-8 sejt *külső határsejtté* alakul. Ezek körül differenciálódnak a néhány tízre tehető *nyújtott sejtek*, majd a centripetális folliculáris sejtek.

A peteképzés 9-dik szakaszában drámai változások figyelhetők meg: a folliculáris sejtek csoportjának nagyobbik, poszteriorális oldali részének alakja oszlopossá változik, egyre inkább ráhúzódik a petesejtre, a *nyújtott sejtek* szélesen ellapulva befedik a dajkasejtek csoportját, míg a külső határsejtek, körülfogva és magukkal szállítva az anteriorális poláris sejteket, behatolnak a dajkasejtek közé és egységes sejtcsoportot (*határsejtcsoport*) alkotva a petesejt irányában vándorolnak (2. ábra). A határsejtek anteriorális-poszteriorális irányú mozgása mintegy 5-6 órát vesz igénybe.

A 10. fejlődési szakasz elejére a határsejtek megérkeznek a petesejthez és egy rövid, dorzális irányú vándorlás után elfoglalják helyüket a petesejt és a dajkasejtek közötti határon, innen a „határsejt” elnevezés. A sejtcsoport szerepe kettős: a pete mikropilusának képzése, illetve részvétel a petesejt torso-like fehérje-mintázatának alakításában. A mikropilus biztosítja a sperma belépéséhez a nyílást. A határsejtek hiánya, vagy nem teljes vándorlása esetén nem alakul ki és a pete megtermékenyíthetetlen, steril marad (Montell és mtsai, 1992). Emellett a határsejtek, a pete másik végében található folliculáris sejtekkel együtt termelik és kiválasztják a torso-like (*tsl*) fehérjét, amely képes aktiválni a petesejt membránjában található torso tirozinkináz receptort (Stevens és mtsai, 1990; Savant-Bhonsale és

Montell, 1993; Martin és mtsai, 1994). Ez az aktivitás szükséges a petébél kifejlődő embrió feji és farki testtájainak kialakításához.

A 10. fejlődési stádiumban a centripetális folliculáris sejtek körkörösен behatolnak a petesejt és a szomszédos dajkasejtek közé, hogy végül a határsejtekkel érintkezve anteriorlárisan is körülvegyék a petesejtet, amely ekkorra már a petekamra térfogatának körülbelül felét elfoglalja.

A peteképzés további szakaszaiban a dajkasejtek a gyűrűsatornákon keresztül a petesejtbe juttatják citoplazmájukat (Robinson és Cooley, 1997), majd elpusztulnak. A nagy méretre növekedett petét körülveszi a folliculáris sejtek képezte peteburok, antero-dorzális részén pedig függelékek képződnek. Ebben az állapotban rakja le a nőtény a petét.

1.7. Az ecetmuslica határsejtvándorlásának szabályozása

A határsejtek vándorlását több, egymástól jól elkülöníthető lépésre bonthatjuk.

1. Először a vándorló sejtcsoport *kijelölésének* kell megtörténnie.

2. A határsejtté átalakult sejteknek a megfelelő időben a dajkasejtek közé behatolva el kell *kezdeniük* a vándorlást.

3. A határsejteknek a dajkasejtek felszínén a petesejt irányában kell *mozogniuk*, majd a petesejthez érve egy rövid, dorzális irányú vándorlást kell megtenniük.

4. A határsejtek céljukhoz elérkezve *meg kell állniuk* és újra fölvenniük az epiteliális sejtekre jellemző alakot.

1.7.1. A határsejtcsoport kialakulása

Az alaktanilag egyneműnek tűnő folliculáris sejtrétegből egy, a poláris sejtek által kibocsájtott jel indítja el a határsejtcsoport kijelölését. A *hedgehog* gén ektopikus expresszióval létrehozott poláris sejtek képesek maguk körül határsejtek differenciálódását kiváltani (Forbes és mtsai, 1996). A kulcsfontosságú jel az Unpaired (Upd) - a peteképzés során a poláris sejtek által kiválasztott jelfehérje -, amely a folliculáris sejtek felszínén található Domeless (Dome) receptorhoz kapcsolódva képes a JAK/STAT jelátviteli úton keresztül egyes gének átíródását befolyásolni, s rajtuk keresztül a sejtek sorsát meghatározni (Harrison és mtsai, 1998). Ennek a jelátviteli útnak a szabályozott aktivitása közvetlen hatással van a határsejtek determinációjára: ha az Upd, a Dome, a Hopscotch (Drosophila-JAK), vagy a Stat92

(Drosophila-STAT) fehérjék valamelyikét eltávolítjuk a rendszerből, a normálisnál kevesebb számú, vagy akár egyetlen egy határsejtet sem találunk a petekamrában (Silver és Montell, 2001; Becari és mtsai, 2002). Ha a jelátviteli útból résztvevő egyes fehérjéket túlermeltségük, a határsejtek száma jelentős mértékben megnövekszik.

1.7.2. A határsejtek mozgásához szükséges egyes elemek

A határsejtek vándorlásában az eddigi vizsgálatok legalább három transzkripciós faktor elengedhetetlen szerepét igazolták. A *slow border cells (slbo)* gén a C/EBP emlősefehérje *Drosophila* homológját kódolja (Montell és mtsai, 1992). Kifejeződését a JAK/STAT jelátviteli út ellenőrzés, hiányában a határsejtek képtelenek elmozdulni az anteriorális pólusról. A Slbo egyik ismert célgénje a *jing*, amely szintén transzkripciós faktort kódol (Liu és Montell, 2001). A *jing* mutáns határsejtek nem vándorolnak. A *taiman (tai)* gén által kódolt transzkripciós faktor az ecdizon hormonreceptor koaktivátora. Mutánsainak elemzése (Bai és mtsai, 2000) kimutatta, hogy terméke létfontosságú a határsejtvándorlásban. Szerepe feltételezések szerint az ecdizon által kiváltott, a vándorlás megkezdésére jelet adó inger közvetítésében van.

A *shotgun (shg)* gén által kódolt *Drosophila* E-cadherin fehérje jelenléte mind a határsejtekben, mind a dajkasejtekben szükséges ahhoz, hogy a határsejtek a helyükre elmozduljanak (Niewiadomska és mtsai, 1999). A *shotgun* homozigóta mutánsokban a határsejteknek a vándorlása kezdetén jelentkező és azok megindulásukhoz kulcsfontosságú sejtnyúlványok képzése sem figyelhető meg (Fulga és Rørth, 2002).

A megfelelően kiépült sejtközötti kapcsolatok teremtik meg a lehetőséget a sejtek elmozdulására. Az ehhez szükséges összehúzó erőt az aktin sejtvázon kívül a miozin fehérje biztosítja. A *Drosophila* miozin II. könnyű láncfehérjéjét kódoló *spagetti squash* gén homozigóta mutáns fenotípusa a határsejtek súlyos vándorlási késését okozza (Edwards és Kiehart, 1996).

Az aktin sejtváz szerkezeti átépülésének kialakulása nélkül sem megy végbe a határsejtek vándorlása. Az Arp2/3 fehérjekomplex és egyik szabályozófehérjéjének, a SCAR-nak a homozigóta mutánsai is jelentős vándorlási késést okoznak (saját megfigyelés), hasonló mértékű hibákat találunk egy, az elbbitől függetlenül működő aktin polimerizációs faktor, a Diaphanous hiánya esetén (S. Beccari, személyes közlés). A dolgozatomban további, itt föl nem sorolt példákat is bemutatok

aktin sejtvezeték átépülését szabályozó génekre, melyek mutációja határsejtvándorlási hibákat okoz.

1.7.3. A határsejtvándorlás irányának meghatározása

A határsejtek szigorúan meghatározott útvonalon, a petekamrák anteriorális csúcsától poszteriorális irányban a petesejtig mozognak, ahol dorzális irányban elmozdulva foglalják el végső helyüket. Nemrégiben tisztázódott a sejtek vándorlását vezető rendszer fölépítése és kemotaxisra alapozott mivolta. A megfelelő irány érzékeléséért egy kettős ligandum-receptor rendszer a felelős (Duchek és Rørth, 2000; Duchek és mtsai, 2001).

A határsejtek sejtfelszínén megtalálható tirozinkináz-receptorok (PDGF-, VEGF-szerű receptor, PVR; illetve EGF receptor, EGFR, vagy DER) ligandumjaikhoz (PVF1, illetve Gurken) kötődnek, a kötés következtében aktiválódnak, és az így létrejött aktivitást a sejtek belsejébe közvetítik. A PVF1 és a Gurken a petesejtben termelődik, így ezek a molekulák létrehozhatnak egy, a petesejttől távolodva csökkenő koncentrációjú grádiens. Útjelző funkciójukat az a kísérleti eredmény támasztja alá, hogy a PVF1, vagy a Gurken egyenletes termelődése a csírvonal sejtjeiben késéseket okoz a vándorlásban, minden bizonnyal a grádiens megszűnése miatt. A receptorok domináns negatív változatait (DN-PVR, vagy DN-DER) a határsejtekben kifejezve ugyancsak késést tapasztalhatunk. Egyik esetben sem állnak le azonban teljesen a határsejtek, ami azt mutatja, akár a PVR-, akár a DER-alapú vezetés szűnik meg, a határsejtek nem veszítik el teljesen képességüket a helyes útvonal megtalálására. Ez csak akkor következik be, ha mindkét jelzőrendszert egyszerre iktatjuk ki, a két domináns negatív receptor (DN-PVR és DN-DER) együttes kifejeztetésével, vagy valamelyik domináns negatív receptor és a másik jelzőrendszer ligandumjának túlermelődésével (Duchek és mtsai, 2001). A PVR-alapú rendszer vezetési képességét nemrégiben a határsejtek rossz helyre történő irányításával is igazolták (McDonald és mtsai, 2003). A határsejtek végső, dorzális irányú elmozdulásáért kizárólag a DER-alapú jelátvitel a felelős (Duchek és Rørth, 2000).

A *Drosophila* határsejtvándorlásában talált redundánsan működő kettős vezetési rendszer fölismerése ellenére kevés ismeretünk van arról, hogy a lokálisan kialakult receptoraktivitás miként váltja ki a sejtvezeték lebonyolításához szükséges sejtszintű folyamatokat.

1.8. A határsejtvándorlás folyamatát vizsgáló genetikai szirések

A *Drosophila melanogaster* modellorganizmusban genetikai sziréseket hajthatunk végre, amelyek azonosíthatnak a határsejtvándorlásban szerepet játszó géneket. Ebben a kísérleti rendszerben korábban két nagy, szisztematikusan végrehajtott genetikai szirést végeztek el.

Egy szirés során mitotikus rekombináció segítségével EMS indukálta mutációkat hordozó határsejtklónokat hoztak létre az egyéb szöveteit tekintve vad típusú legyekben (Liu és Montell, 1999). Vándorlási rendellenességeket okozó mutációkat keresve sikerrel azonosítottak több kulcsfontosságú gént: *taiman* (Bai és mtsai, 2000), *jing* (Liu és Montell, 2001), *Stat92* (Silver és Montell, 2001).

Egy másik szirés a funkciónyeréses elven alapult (Rørth, 1996). Egy módosított P-elem (EP-elem) segítségével a véletlenszerűen eltalált gének aktivitását fokozták *slbo*¹³¹⁰/*slbo*¹³¹⁰ mutáns, vándorlásra képtelen határsejtekben (Rørth és mtsai, 1998). Olyan inszerciókat kerestek, amelyek szuppresszálják a *slbo* mutáns fenotípust. Az EP-elemre épülő genetikai szirés fölhasználásával több, a határsejtek vándorlásának szabályozásában szerepet játszó gént sikerült azonosítani, például: *abelson* (Rørth és mtsai, 1998), *tribbles* (Mata és mtsai, 1999), *sprint* (Szabó és mtsai, 2000), *Stat92* (Beccari és mtsai, 2002).

1.9. Céltizés

A sejtvtándorlás, mint az élvilágban széles körben megfigyelhet és sok esetben létfontosságú folyamat megismerése a biológiai kutatások egyik nagy kihívása. A *Drosophila melanogaster* határsejtvtándorlása olyan modellrendszer, mely kiválóan alkalmas a fölmerül kérdések egy részének részletes elemzésére.

Munkánk kezdetekor viszonylag kevés ismeret állt rendelkezésre arról, hogy melyek azok a faktorok, amelyek speciális szerepet töltenek be a *Drosophila* határsejtvtándorlási folyamatában. Els céltizésünk ezért az volt, hogy egy nagyléptéki funkciónyeréses genetikai szírest hajtunk végre, olyan gének izolálása céljából, amelyek részt vesznek a sejtvtándorlás irányításában.

A genetikai szírest az EP-elemes funkciónyeréses genetikai szíres elvére építettük (Rørth, 1996). Ennek során az EP-elem segítségével fokoztuk a beépülés által eltalált gének működését és megvizsgáltuk, közülük melyek képesek szuppresszálni a *slbo*¹³¹⁰/*slbo*¹³¹⁰ homozigóta mutáns legyenek határsejtvtándorlási fenotípusát. (A *slbo* transzkripciós faktor hiányában a határsejtek képtelenek a vándorlásra). Elvárásaink szerint a szuppresszálo hatású gének pozitív, serkent szerepet tölhetnek be a határsejtek vándorlásában.

Az aktin sejtvtáz megfelelően szabályozott átépülése elengedhetetlen föltétele a sejtvtándorlásnak. Hogy ezt a folyamatot részletesen tanulmányozhassuk, a genetikai szíresből azokat a géneket választottuk ki további vizsgálataink céljára, amelyekről föltételeztük, hogy részt vehetnek a sejtek aktinvázát átrendez folyamatok szabályozásában. Több olyan gént érint mutációt találtunk, amelyek ilyen funkcióval rendelkezhetnek. Ezek közül a *cortactin*, a *myoblast city*, és a *mal-d* géneken végeztünk részletes elemzéseket. Ezeknek a vizsgálatainknak az eredményét ismertetjük ebben a dolgozatban.

2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

2.1. Muslica tartási körülmények

A legyeket kukoricamelasz alapú táptalajon neveltük [összetétel: literenként 12 g agar, 18 g porélesztő, 10 g szójaliszt, 22 g répaszirup, 80 g malátakivonat, 80 g kukoricaliszt, 6,25 g ml propionsav, 2,4 g metil 4-hidroxibenzoát (Nipagin)].

A muslicákat 25 °C hőmérsékleten tartottuk. A peteképzés optimalizálása érdekében a nőtényeket hímekkel együtt granulált élesztővel kezelt friss táptalajra helyeztük egy nappal a boncolás előtt.

A hőkezeléseket vízfürdőben hajtottuk végre, mitotikus klónok előállításánál reggel és délután egy-egy óráig, fehérje-túltermelés klónok esetén egyszer fél óráig. A kezelt legyeket folyamatosan friss táptalajon tartva igyekeztünk biztosítani az ideális körülményeket a peteképzéshez.

A lerakott peték kelési arányának megállapításához és a peték méretének meghatározásához a muslicákat almaleves táptalajon petéztettük (összetétel: literenként 750 ml víz, 250 ml 100%-os almalé, 225 g agar, 250 g cukor, 15 g Nipagin), melyre kis adag nedves élesztőt helyeztünk. A kikelési arányokat 24 órával a peterakás befejezése után állapítottuk meg. A vizsgált nőtények megtermékenyítésére vad típusú legyeket használtunk.

2.2. Az EP inszerciós mutánsgyűjtemény vizsgálata

A Gal4/UAS rendszer (Brand és Perrimon, 1993) és a P-elemes mutagenézis elveit ötvözi az EP-elemes funkcionyeréses genetikai szírés (Rørth, 1996). A módszer lelke egy módosított P-elem, mely a hagyományos P-transzpozon tulajdonságait (ugraszthatóság a genomban, domináns *miniwhite* szemszínjelzőgén, plazmidmenekítési lehetőség) megőrzi, de tartalmaz egy, úgynevezett "enhanszer-promóter" (EP) szakaszt, mely 7 darab UAS-szekvenciából és egy promóterből áll. Az EP elem képes arra, hogy Gal4 fehérje jelenlétében kiváltsa a beépüléshez közeli gén Gal4-függő aktiválását (3. ábra).

3. ábra Az EP elem fölépítése. Az enhanszer-promóter szekvenciák segítségével GAL4 fehérje jelenlétében az elem 3' oldalán található gén átíródását kiválthatjuk. További magyarázatot ld. a szövegben. RI: EcoRI restrikciós vágóhely. (Rørth és mtsai, 1998 alapján).

Ezzel az elemmel nagy számú beépülést hozhatunk létre a muslicagenomban (a P-elemek tulajdonságának megfelelően nagy gyakorisággal a gének 5' végén) és a véletlenszerűen eltalált gének expresszióját a kiválasztott Gal4-forrással (meghajtóval) tetszőleges helyen és időben kiválthatjuk. Az így létrehozott funkcionyeréses fenotípusok elemzése segíthet új gének azonosításában, illetve működésük megértésében (Rørth és mtsai, 1998).

2.3. Szomatikus mozaik klónok előállítása

A letális gének működésének elemzését megnehezíti, hogy a homozigóta mutáns állatok korai fejlődési életszakaszban elpusztulnak, lehetetlenné téve a mutáció hatásainak vizsgálatát felnőtt állatok szerveiben. Ennek a hátránynak a kiküszöbölésére alakították ki a FLP-FRT rendszert (Xu és Harrison, 1994), melynek segítségével mozaikos állatokat hozhatunk létre (4. ábra). Ezek mutáns sejtcsoportokat (klónokat) is tartalmaznak az egyébként heterozigóta, vagyis életképes, a felnőttkort elérni képes állatban.

4. ábra A FLP-FRT rendszer működési elve. Az osztódást megelőző G_2 -es sejtciklus fázisban (G_2) a FLP rekombináz (FLP) mitotikus rekombinációt hoz létre a homológ kromoszómák FRT szekvenciái között. A heterozigóta állatban a homológ kromoszómák egyike a vizsgált gén mutációját hordozza (csillag), a másik pedig egy domináns markert (pl. GFP: zöld négyzet). A mitózist (M) követően a FLP rekombináz által generált rekombináció következtében létrejöhetnek olyan utódsejtek, amelyek homozigóta mutánsok, illetve olyanok, amelyek vad típusúak az adott génre nézve. További sejtosztódások ezen két sejttípus nagyobb csoportjait (klónjait) hozhatják létre. A domináns marker hiánya vagy jelenléte megkülönbözteti ezt a két sejtcsoportot. A FLP rekombináz termelésének szabályozásával dönthetjük el, hogy ez a mitotikus rekombináció mely szövetekben és az egyedfejlődés melyik szakaszában jöjjön létre. (az ábra St Johnston, 2002 alapján készült).

A mitotikus klónok előállításához a lárva-héscsokkot ($37\text{ }^\circ\text{C}$, két alkalommal egy-egy óra) 2-4 nappal a pete rakás után hajtottuk végre a lárva populáción. Az ezekben előlított *hsFLP; FRTxx-UbiGFP/FRTxx-mutáns* genotípusú héscsontányeket boncoltuk ki. A felnőtt korban héscsokkolt ($37\text{ }^\circ\text{C}$, két alkalommal egy-egy óra) *hsFLP; FRTxx-UbiGFP/FRTxx-mutáns* genotípusú héscsontányek petefészkeit 3-5 nappal a kezelés után boncoltuk ki.

2.4. Fehérje-túltermelés klónok előállítása

A FLP-FRT rendszer nemcsak funkcióvesztéses, de funkciónyeréses klónok előállítására is alkalmazható. A módszer lényege, hogy a Gal4 gén elé konstitutív működésű enhanszert (pl. actin5C) klónoznak, a kettő közé valamilyen - FRT-szekvenciák közé illesztett - kódoló szekvenciát (úgynevezett *FLIPOUT*-kazettát) helyeznek, ez megakadályozza az enhanszer működését a Gal4 génen, amely így inaktív [(Actin-Flipout-Gal4 (AFG) rendszer)]. Ha ilyen sejtekben (a már ismertetett módon) FLP rekombináz fehérjét termeltetünk, az képes cisz-rekombinációt generálni az FRT-helyek között, így módon a folyamatos enhanszer Gal4-géne kifejtett hatását akadályozó kazettát kiugrasztani. Ezekben a sejtekben (és utódaikban) a Gal4 fehérje folyamatosan termelődik és az UAS-szekvenciák szomszédos génjeit (UAS-transzgén, vagy EPg-gén) aktiválja. Így létrehoztunk egy olyan sejtcsoportot, amelyben a vizsgálandó gén magas szinten kifejeződik.

A túltermelés klónok előállításához keresztezésekkel a

hsFLP / actin5C-FLIPOUT-Gal4 ; FRTxx-UbiGFP / FRTxx-mutáns
genotípusú muslicákat hoztuk létre.

A nCestények petefészkeit a hCesokkolás (37 °C, egy alkalommal 30 perc) után 2-4 nappal boncoltuk ki.

2.5. Transzgenikus legyek elCállítása

A standard módszerek alapján (Voie és Cohen, 1998) szinciciális blasztoderma stádiumban levC *w¹¹⁸* embriókba injektáltuk a transzformálóelegyet, amely a következCeképpen készült: 6 µg transzgént hordozó pUASp-vektor, vagy pCASPER-vektor DNS-t és 1 µg Δ2-3 helper plazmid DNS-t oldottunk föl 20 µl injektálópufferben [5 mM KCl, 0,1 mM poszfátpuffer (0,05 mM K₂PO₄ és 0,05 mM KH₂PO₄, pH: 6,8)]. Az injektálásokat Ann Mari Voie végezte.

2.6. EMS mutagenézis

MegelCezC eleg nyolc órán keresztül éheztetett, *w;; FRT80/FRT80*, illetve *w¹¹⁸* genotípusú legyeket egy éjszakán keresztül 1%-os cukoroldatba kevert 0,025 M-os EMS-oldattal tápláltunk. A legyeket a következC napon a szokásos táptalajon tartottuk, majd a harmadik napon kereszteztük *EPg37532/TM3* genotípusú sziz nCestényekhez.

2.7. β-galaktozidáz festés

A petefészkeket PBS-ben (140mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10,1 mM NaH₂PO₄, 1,8 mM KH₂PO₄ pH7,4) boncoltuk ki és 10-15 percig fixálóoldatba (0,5% glutáraldehid PBS-ben) helyeztük. Rövid PBX-es (PBS + 0,1% Triton-X-100) mosás után 3-4 órás 37 °C-on történt festés következett [0,2% X-gal festCepufferben: 10 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (pH:7,2), 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 3.1 mM K₄[Fe^{II}(CN)₆], 3.1 mM K₃[Fe^{III}(CN)₆], 0.3% Triton X-100]. Az ezt követC újabb PBX-es mosás (10 perc, szobahCmérséklet) után a minták a tárolóoldatba (80% glicerol PBS-ben) kerültek.

A határsejtvándorlás Zeiss sztereomikroszkóppal vizsgáltuk.

2.8. Ellenanyagfestés

A PBS-ben kiboncolt petefészkeket PBS-ben föloldott 4%-os parafomaldehid-oldattal fixáltuk 15 percig. 2-3 PBX-es mosás után a petefészkeket többször átppipetáztuk 200 µl-es pipettahegyen, hogy a petekamrák elváljanak egymástól. A mintákat PBX-ben föloldott 5%-os újszülött kecske-szérummal (PBX-NGS) mostuk 30 percig, majd elvégeztük az elsődleges ellenanyag-kezelést 4 °C-on folyamatos keverés mellett, éjszakán át. Ezt követte egy 2 órás kezelés PBX-ben föloldott 5%-os szarvasmarha szérum albuminnal (PBX-BSA). Az újabb 30 perces PBX-NGS-mosás után jött a másodlagos ellenanyag-festés (0,5% ellenanyag PBX-NGS-ben, 2-4 óra, szobahőmérsékleten), mellyel egyidőben történt a petekamrák DAPI-val (1 µg/ml) és rodamin-falloidinnal (1:500) való festése a sejtmagok (DNS), illetve az F-aktin láthatóvá tétele érdekében. A mintákat ezután néhányszor átmostuk PBX-szel, majd néhányszor PBS-sel és a vizsgálatokig tárolóoldatba (80% glicerol PBS-ben) helyeztük.

A fölhasznált elsődleges ellenanyagok:

- nyúl anti-cortactin (Katsube és mtsai, 1998)
- nyúl anti-myoblast city (Ericson és mtsai, 1997)
- patkány anti-PVR (Duchek és mtsai, 2001)
- egér anti-moesin (Edwards és mtsai, 1997)
- patkány anti-mal-d (P. Rørth, nincs közölve)
- egér anti-aktin (SIGMA).

A fölhasznált másodlagos ellenanyagok: floureszcein- (DTAF), rodamin- (TRITC), vagy Cy5-kötött számarellenanyag (Jackson ImmunoResearch).

A konfokális mikroszkópos képeket UV-lézerrel kiegészített Leica TCS SP típusú mikroszkóppal készítettük.

2.9. A gyűrűsatornák átmérőinek mérése

A 10. fejlődési fázisú petekamrákban rodamin-falloidin festéssel tettük láthatóvá a gyűrűsatornákat. A petesejtnél található gyűrűsatornákról konfokális mikroszkópos felvételeket készítettünk, majd a kinyomtatott fényképeken lemértük a gyűrű keresztmetszeti átmérőjét, a kapott értékeket átszámoltuk a valós, mikrométerben kifejezett értékekre.

2.10. A petehosszúság mérése

A peterakás utáni 6-8 óra múlva PBS-ben gyjtött petéket kétszeresen hígított Chlorax hypo-oldatban dekontamináltuk. A PBS-ben megmosott petéket n-heptán-PBS-formaldehid 10:7:3 arányú oldatában erCEs rázás mellett 30 percig fixáltuk, majd PBS-ben mostuk. A tárgylemezre helyezett petepopulációról Zeiss sztereomikroszkóp alatt fényképfelvételeket készítettünk, majd a kinyomtatott képeken lemértük a peték hosszát és ezekbCEl kiszámoltuk a tényleges méretüket.

2.11. Genomikus DNS izolálása

Körülbelül 50 legyet 800 µl DNS-kivonó pufferben [0,1 M NaCl, 0,1 M Tris (pH 9,1), 0,1 M EDTA, 0,5% SDS, 0,2 M sucrose] homogenizáltuk, majd 30 percig 65 °C-on inkubáltuk. 120 µl 8M-os kálium-acetát hozzáadása után jégen inkubáltuk újabb 30 percig. 10 perces centrifugálás után (14000 min⁻¹) az elkülönített felülúszót azonos mennyiségi etanollal elkeverve szobahCEmérsékleten tartottuk 5 percig, ezután ismét centrifugáltuk. Az üledéket 70%-os etanol-oldattal mostuk, majd föloldottuk 400 µl TE-ben. Kétszeres fenolos kivonás után a DNS-t üleptítettük, mostuk és 50 µl TE-ben föloldva tároltuk.

2.12. Az EP-elem indukálta mutánsok plazmidmenekítése

30 µg genomikus DNS-t 100 µl térfogatban éjszakán át 20 U EcoRI enzimmel emésztettük. A DNS-t fenollal kivontuk, ammónium-acetát és etanol segítségével jégen kicsaptuk és 10 µl TE-ben föloldottuk. 4 µl DNS-oldatot 200 µl ligálóelegybe vittük és éjszakán át 16 °C-on ligáltuk. A következCE napon az oldatból kitisztított DNS-t 10 µl vízben föloldottuk, melybCEl 1 µl-t használtunk föl elektroporációs E.coli-transzformációra (GenePulser készülék, Biorad gyártmány). A transzformált baktérium-elegyet 50 µg/ml kanamycint tartalmazó táptalajra kentük ki. A kikelt telepekbCEl indított folyadékkultúrákból készítettük a DNS-preparátumokat (QIAGEN miniprep kit) a szekvenálás céljára.

2.13. DNS szekvencia meghatározás

A EPg-szírés plazmidmenekített DNS-ének szekvenciáit, illetve a mal-d pontmutánsok DNS-bCEl nyert PCR termékeket az EMBL saját szekvenálószoigálata, az egyéb szekvenciákat a GATC szekvenálószoigálata végezte.

A szekvenciáknak a *Drosophila* genomban elfoglalt helyét a FlyBase adatbázisa (<http://flybase.net/blast>) segítségével azonosítottuk.

2.14. Southern hibridizáció

50 µg genomikus DNS-t éjszakán át emésztettük EcoRI enzimmal. Az emésztett elegyeket 0,8%-os agarózgélben 35 V-on éjszakán át futtattuk. A DNS-t 0,25 N HCl-dal depurináltuk, 2-szer 30 percnyi 0,4 N NaOH oldatos mosással denaturáltuk és 0,4 N NaOH-dal éjszakán át blottoltuk GeneScreen nylon membránra. A következő napon a membránt 10 percig kétszeres SSC-ben mostuk, szárítottuk, keresztkötöttük UV-sugárzással, majd sütöttük (2 óra 80 °C-on).

2.15. Random primer jelölés

A jelölésre fölhasználható DNS-darabot (a kanamycin gén kb. 500 bp-nyi DNS-szakasza) rádióaktív jelöléssel láttuk el (α -³²P dCTP-jelölés a GibcoRL *RTS RadPrime DNA Labelling System* készletével).

2.16. DNS-hibridizáció

A membránt Church & Gilbert pufferben (100ml vizes oldatban 50 ml 1M NaHPO₄, 35 ml 20% SDS, 0,2 ml 0,5M EDTA, 3,3 ml 30%-os szarvasmarha szérum albumin) elhibridizáltuk 2 óráig 65 °C-on, majd hozzáadtuk a denaturált rádióaktívan jelölt próbát. Az éjszakán át 65 °C-on történt hibridizáció után a membránt 2-szer 20 percig SB1 (1000ml vizes oldatban 40 ml 1M NaHPO₄, 250 ml 20% SDS, 2 ml 0,5M EDTA, 33 ml 30%-os szarvasmarha szérum albumin), majd 2-szer 10 percig SB2 (1000ml vizes oldatban: 40 ml 1M NaHPO₄, 50 ml 20% SDS, 2 ml 0,5M EDTA) mosóoldattal mostuk, ezután készítettünk fölvételt Kodak X-OMAT filmre -80 °C-on.

2.17. Az UAS-cortactin és tubulin-cortactin DNS- konstrukciók klónozása

A cortactint kódoló cDNS-szakaszt (LD29964) a hordozó pOT2 vektorból EcoRI-XhoI emésztéssel vágtuk ki (a pOT2-LD29964 vektort a Genomic Research cDNS gyűjteményéből kaptuk). Mivel az LD29964 cDNS maga is tartalmazott egy XhoI vágóhelyet, részleges emésztést alkalmaztunk, melynek során a rövid (8 perces) inkubáció után az emésztésegyleget agarózgélben választottuk el. A jellemző méretű (2,4 kb), a cortactin cDNS-nek megfelelő fragmentumot vágtuk és tisztítottuk ki a

QIAGEN cég DNS-tisztító készletét fölhasználva. Ezt ligáltuk be az EcoRI-XhoI-emésztett Bluescript-SK vektorba. Az így nyert pBS-LD29964 vektorból EcoRI-Asp718 emésztéssel és ligálással tettük át a cortactin kódoló cDNS-t a pUASp2 (Rørth, 1996) vektorba (UAS-cortactin). A Bluescript vektorból XbaI-XhoI, ugyancsak részleges emésztéssel vágtuk ki az LD29964 cDNS-t és a tubulin promótert tartalmazó pCASPER vektorba helyeztük át (tubulin-cortactin). A plazmid-DNS-sel történő transzformációhoz a GibcoBRL *Subcloning efficiency DH5 α* kompetens sejtjeit használtuk.

A mal-d DNS-konstrukciókat P. Rørth készítette.

2.18. DNS izolálás egyedi legyekből PCR reakcióhoz

A vizsgálandó vonalból, vagy genotípusból kiválogatott legyeket 50 μ l-nyi feltáróoldatot [10 mM Tris-Cl (pH:8,2), 1 mM EDTA, 25 mM NaCl, 400 μ g/ml proteináz-K] tartalmazó 200 μ l-es pipettaheggyel homogenizáltuk a folyadék kinyomása nélkül, majd a hegyben maradt oldatot az eredményre juttattuk. 30 perces, 37 °C-os inkubálás után a proteináz-K-t 2 perces 95 °C-os kezeléssel inaktívtuk. Az így kapott DNS-oldat 1 μ l-jét használtuk a 20 μ l-es PCR-elegyen.

2.19. PCR

A DNS szakaszokat 20 μ l-es reakcióelegyen sokszoroztuk föl, melyben a következő összetevőket mértük: 0,2 mM dNTP keveréket, 2-2 pmol/ μ l primert, 2,5 U AmpliTaq polimerázt (Applied Biosystems) és ugyanezen gyártó PCR pufferét.

A PCR reakciókat MJ Research PTC 200 típusú PCR készülékkel végeztük a következő program alapján:

Lépés	hőmérséklet (°C)	idő (perc:másodperc)
1.	94	02:00
2.	94	00:30
3.	58	00:30
4.	72	00:30

5.	72	10:00
6.	04	"végtelen"

ismétlés: 2-4. ciklus 35-ször

A PCR reakciókat a következő primerekkel végeztük:

- a cortactin deléciók térképezéséhez:

primer neve	szekvencia (5'- 3')
F1	CTGCTTCTTCTTGTCCAGATC
F5	GGGAACTAACTGAACTAAAT
F6	CTCCAGATAGTCGGCCAAAT
F7	CACCATGAATCATGTCAGTAGCT
F9	GCGGTAGCCCCTATTTATTAATAA
F11	GCGAGAGAGCGCGAGTATAA
R2	TTCGATTTTCAACGTACAAGTC
R4	GAGACATTCATGATATTTCCGT
R8	CCGCTTCTCATTCCCTACGTAAA
R10	GCATCGTAATCTGGCAAAGTAGA

- a mal-d deléciók térképezéséhez:

primer neve	szekvencia (5'- 3')
F1	AAATCTCAAATCTGTTTTCCACACT
F5	TAATCCCAGTCATTTTCAACTTACC

A PCR-termékeket agarózgélben választottuk el és a QIAGEN cég tisztítókészlete segítségével nyertük ki. A fölszaporított DNS-szakaszokat a TOPO TA klónozó készlet (Invitrogen) segítségével illesztettük be a TOPO hordozóvektorba.

2.20. Western analízis

Az SDS-pufferben homogenizált petefészekből nyert fehérjemintákat 8%-os akrilamidgélben futattuk 60V feszültségnél két órán keresztül. A gélben elválasztott mintákat Hoefer SemiPhor félszáraz rendszerű transzferkészülékben vittük át Protran nitrocellulóz membránra 200A áramerősséggel, egy óra alatt. A membránon 10 perces Ponceau-festést (2g Ponceau (Sigma P7767), 30g triklór-ecetsav, 30g szulfoszalicil-sav 100 ml vízben) követően 5%-os ecetsavas mosással tettük láthatóvá a fölvitt mintákat. Ez a festés lehetőséget adott a fölvitt mennyiségek azonosságának ellenőrzésére. A membránt egy órán át blokkoltuk (5%-os tejporos oldat 0,1% Triton PBT-ben) majd éjszakán át a tejporos oldatban 1:10000 arányban föloldott elsődleges ellenanyaggal jelöltük. Ezt követően a membránt egy órán keresztül gyakori cserével mostuk (0,1%-os Triton PBT-ben). Azután egy órás jelölés

következett a másodlagos ellenanyaggal (1:200 HRP-kötött ellenanyag tejporos oldatban), majd megismételtük a mosási lépést. Ezután PerkinElmer fluoreszkáló elhívó oldattal kezeltük a membránt két percig, majd elkészítettük a felvételt Kodak X-Omat filmre.

3. EREDMÉNYEK

3.1. Funkciónyeréses genetikai szírés EPg elem alkalmazá-sával

3.1.1. Slbo-szupressziós genetikai szírés

Az EMBL négy munkacsoportja (Cohen, Ephrussi, Mlodzik, Rørth) nagyléptéki funkciónyeréses genetikai szírést hajtott végre. Közösen körülbelül 9000 egyedi EPg-elem-beépülést hoztunk létre a teljes muslica genomban. A mutánsokból törzseket létesítettünk, melyeket ki-ki a saját érdeklÉdésének megfelelÉ Gal4-meghajtóhoz keresztezett ki (5. ábra).

5. ábra Az EP elemre alapozott funkciónyeréses genetikai szírés vázlata. A véletlenszeri EPg beépülést a genomjukban hordozó EP vonalakat a kiválasztott Gal4-meghajtóval rendelkező transzgenikus Gal4 vonalhoz kereszteztük, majd az utódgeneráció fenotípusát elemeztük (Rørth, 1996 alapján).

E szírés részeként a Pernille Rørth vezette munkacsoportban *slbo* fenotípust szupresszázó 3. kromoszómás mutáns vonalakat kerestünk. A *slbo* transzkripciósfaktort kódoló gén megfelelÉ működése szükséges a normális határsejtvándorláshoz, a *slbo*³¹⁰ homozigóta nÉstényekben a határsejtek vándorlása súlyos rendellenességeket mutat: a mutáns legyek 10-es fejlÉdési stádiumú petekamráinak mintegy 90-98 százalékában semmilyen fokú elmozdulás nem tapasztalható (6.A ábra). A *slbo*³¹⁰ allél egy P-elem beépülés által okozott *slbo* mutáció. Ez a P-elem egyben olyan lacZ-enhanszercsapda, amely a határsejtekben festÉdést ad. Eképpen

lehetővé válik a vándorlás megfigyelése β -galaktozidáz-festés segítségével (5.A-E ábra).

A szuppressziós szírés során *slbo*¹³¹⁰/*slbo*¹³¹⁰ genetikai háttéren növeltük meg a véletlenszerű EPG-inszerciók által érintett gének kifejezési szintjét a határsejtekben. Ezért a *slbo-Gal4* meghajtót használtuk, amely a határsejtekben a korai 9-es stádiumtól kezdve (mielőtt a vándorlás megkezdődik) termeli a *Gal4* fehérjét (6.G.ábra). A szírés során a *slbo*¹³¹⁰/*slbo*¹³¹⁰, *slbo-Gal4*; *EPG-X*/+ genotípusú nEstények petefészkeit kiboncoltuk és megvizsgáltuk a határsejtek esetleges elmozdulását a 10-es fejlődési stádiumú petekamrákban (6.B-F ábrák).

Azokat az EPG-vonalakat választottuk ki, ahol a határsejt-késési fenotípus lényeges mértékben enyhébb volt a vizsgálati, mint a kontroll (*slbo*¹³¹⁰/*slbo*¹³¹⁰, *slbo-Gal4*) esetben. Hogy eldönthessük, a tapasztalt fenotípus-szuppresszió a *Gal4* kiváltotta génaktiválás, vagy a transzpozon beépülése által okozott mutáció következménye-e, további kontrollként a *slbo*¹³¹⁰/*slbo*¹³¹⁰; *EPG-X*/+ genotípusú legyeket is megvizsgáltuk, vagyis ahol a *Gal4* fehérje jelenléte híján csak a beépülés saját (valószínűleg funkcióvesztéses) hatásával számolhatunk.

A mutációkat arra szelektáltuk, hogy segítségével azonosíthatunk olyan géneket, amelyek termékei a *slbo* transzkripciós faktor hiányában nem, vagy csak korlátozott mennyiségben termelődnek és csökkent mennyiségük gátolja a vándorlási folyamatot, így fokozott mértékű kifejeztetésük, visszajuttatásuk a rendszerbe javíthat a fenotípuson. Olyan géneket is azonosíthatunk, melyeknek a határsejtvándorlási folyamatban pozitív, serkentő szerepük van és fokozott mértékű kifejeztetésük részlegesen elmozdítja a sejtcsoport mozgását még ebben a súlyosan defektusos helyzetben is.

6. ábra A *slbo*-szuppresszor mutánsok azonosításának elve. A *slbo*¹³¹⁰/*slbo*¹³¹⁰ mutáns legyek (genotípus : A') határsejtjei nem vándorolnak (A). Ezen a genetikai háttéren növeltük meg a véletlenszerű EPg beépüléseket 3' irányban található géneket a *slbo*Gal4 konstrukció segítségével (genotípus : B'), és a vándorlási fenotípus esetleges szuppresszióját (B-E) elemeztük a petefejlés 10. szakaszában. A *slbo*-Gal4 transzgen a vándorlást közvetlenül megelőző időszakban kezd működni, először a határsejtben, a tizedes stádiumtól kezdve a folliculáris sejtek egy részében is (festés a 2.G ábrán az UAS-lacZ riporterkonstrukció segítségével). A határsejtek elhelyezkedését az ábrakon nyílhegyek jelzik. (Rørth, 1996 alapján).

1510 EPg-vonalat vizsgáltunk meg, amiből 72 bizonyult pozitívnak az elsődleges szírás során. Ezekkel folytattuk a részletesebb vizsgálatokat.

3.1.2. Southern hibridizáció

A kiválasztott 72 vonalat megvizsgáltuk, hogy valójában hány EPg elem található a genomjukban, hiszen a mutagenézis során létrejöhetnek többszörös beépülések is. Az egyes vonalokból nyert genomikus DNS-t Southern-hibridizációnak vetettük alá, próbaként EPg-elem-specifikus DNS-t felhasználva. 13 esetben többszörös (2, esetleg 3) pozitívan jelölt DNS-fragmentumot (vagyis 2-3 EPg-beépülést) találtunk, ezeket a vonalakat a továbbiakban nem vizsgáltuk. Csak az egyszeres EPg elemet hordozó törzseket tartottuk meg.

3.1.3. Az EPg-beépülés által eltalált gének

A Southern-hibridizációs vizsgálat után fennmaradt 59 EPg-vonal genomikus DNS-éből plazmidmenekítést hajtottunk végre. A plazmidmenekítés szekvencia adatai pontosan megmutatják, hogy a megszekvenált *Drosophila* genom mely pontjára épült be a vizsgált EPg elem. Ezeknek az adatoknak az alapján azonosíthatók azok a gének, melyek az EPg-elem közelében találhatóak (1. táblázat). Ezen géneknek az EPg-elem által kiváltott fokozott expressziós aktivitása lehet a felelős a *slbo*¹³¹⁰ fenotípus szuppressziójáért.

Miután azonosítottuk a szuppressziót okozó géneket, kiválasztottuk belőlük azokat, amelyeken további vizsgálatokat szeretnénk folytatni. A sejt-vándorlás folyamatának egyik kiemelkedő fontosságú eleme az aktin sejt-váz szabályozott

átrendezÉdése. Emiatt elhatároztuk, hogy a további elemzéseinket elsÉsorban azokra a génekre korlátozzuk, amelyeknél föltételezhetÉ, hogy a vándorló sejtekben betöltött funkciójuk az aktin polimerizáció közvetlen, vagy közvetett szabályozása. Három ilyen gén vizsgálata során elért eredményeinket ismertetjük a továbbiakban.

1. táblázat. Az EPg szírés során azonosított inszerciók által érintett gének.

molekuláris funkció	azonosított inszerciók száma	példa
adapter	1	CG13917
aktinkötés	5	cortactin, cheerio
GEF	2	myoblast city, Gap1
háztartási, hCsokk fehérje	4	hsp70, hsc70cb
kináz	3	nemo, casein kináz II.
membrán összeszerelés	1	CG5508
sejtmagi transzport	1	karioferin β 3
proteáz	1	26-29kd proteináz
RNS kötés	2	pumilio, cuch potato
sejtdhézió	1	capricious
transzkripció faktor	8	hairy, mal-d, neuralized
ubiquitin ligáz	1	hyperplastic discs
ismeretlen	20	CG3368, CG8600
nincs közeli gén	9	-
összesen	59	

A Cortactin fehérjéről említett vizsgálati rendszerekben kimutatták, hogy két módon is élénkíti a sejtek membránjánál történő F-aktin felhalmozódást. Egyrészt az Arp2/3 fehérjekomplex aktivátoraként serkenti annak aktin polimerizációs működését. Másrészt a Cortactin fehérje maga is köti az aktinszálakhoz és stabilizálja azokat. Vizsgálataink kezdetekor a *Caenorhabditis elegans* *cortactin* génjének működéséről rendkívül kevés adat állt rendelkezésre. *cortactin* mutánsokat sem a *Drosophilában*, sem más modellszervezetben nem azonosítottak, a Cortactin sejtváándorlási folyamatokban betöltött szerepéről nem voltak ismeretek.

A *Drosophila* Myoblast city fehérje a humán DOCK180 homológja, molekuláris szerepe a Rac kis GTP-áz aktiválása. A Rac-ról (a Rho-családhoz tartozó többi kis GTP-ázokhoz hasonlóan) ismert, hogy képes az aktin sejtvááz nagymértékű átrendezését kiváltani. Serkenti például az aktin gazdag sejtnyúlványok képzésére, így módon a sejtváándorlás lényeges szabályozó elem lehet. A DOCK180 fehérjecsalád tagjairól különböző vizsgálati rendszerekben (*C. elegans*, *Drosophila*, említett sejt kultúra) kimutatták olyan sejtbiológiai, vagy egyedfejlésbeli folyamatokban való részvételt, ahol az aktin sejtvááz átrendezése kiemelkedő szerepet játszik. Ezen ismeretek alapján feltételeztük, hogy a Myoblast city az *Caenorhabditis elegans* határsejtváándorlása során is lényeges tényezőként léphet föl.

Az *Caenorhabditis elegans* szerszámainak fejlődéséhez szükség van rendezetten elhelyezkedő nagyszámú aktinkötegre, ezek a szerszálok vázát alkotják. Ha az aktinvááz átrendezése a szerszálok kialakításáért felelős sejtekben nem megfelelően működik, a létrejövő szerszámok a normálisnál rövidebbek, torzok lehetnek. Ez az elváltozás jellegzetes mutáns fenotípusa egyes olyan géneknek, amelyek az aktinvááz átrendezését, az aktin polimerizációt szabályozó fehérjét kódolnak (pl. az aktinkötegek összerendezését szabályozó fascin; az aktin polimerek felépülését serkenti profilin). Ha egy új mutáció ezt a jellegzetes elváltozást, a szerszámok torzulását mutatja, ez jele lehet annak, hogy a gén, melynek mutációja ilyen fenotípussal jár, szintén részt vesz aktin sejtvááz átrendezésekkel járó folyamatok szabályozásában. Az EPG mutagenézis során izolált egyik mutáció, az EPG37532 homozigóta formában hasonló fenotípust okozott. Megvizsgáltuk, hogy a mutáció olyan gént érintett-e, amely szerepet játszhat aktinvááz átrendezéssel járó folyamatokban, így a sejtváándorlásban.

3.2. Cortactin

3.2.1. A *cortactin* gén a *slbo* fenotípus szupresszora

Az EPg35301 jeli P-elem inszerció enyhe *slbo* fenotípust szupresszáló hatást mutatott. A Gal4-forrást és EP-inszerciót egyaránt hordozó egyedekben (genotípus: *slbo*¹³¹⁰/*slbo*¹³¹⁰, *slboGal4*; *Epg35301/+*) 40-50 százalékkal több petekamrában figyelhetünk meg valamilyen mértékű határsejtvándorlást (összesen 18,8 %), mint a Gal4-forrás nélküli (genotípus: *slbo*¹³¹⁰/*slbo*¹³¹⁰, *Epg35301/+*), vagy EP-elem nélküli (genotípus: *slbo*¹³¹⁰/*slbo*¹³¹⁰, *slboGal4/+*) kontroll helyzetekben. A plazmid-menekítés és szekvenálás után kiderült, hogy ez az elem a *cortactin* (*cort*) nevi gén 5' végénél található, annak transzkripció starthelyét CEI 622 bázispárryira (10. ábra). Az EP-elem promótert hordozó 3' vége a *cortactin* gén felé irányult, ami valószínűvé tette, hogy az elem képes lehet a gén transzkripció aktiválására.

A *cortactin* gént azért választottuk ki további vizsgálataink céljára, mert úgy véltük, hogy fontos szerepet játszhat az *ecetmuslica* sejteiben történő aktin sejtvezéklésében, így részese lehet a határsejtvándorlás szabályozásának. Ezt a feltételezésünket azokra az ismeretekre alapoztuk, amelyeket az alábbiakban foglalunk össze.

3.2.2. Áttekintés: a Cortactin szerkezete és működése

A Cortactin fehérje azonosítása és szerkezete

A Cortactint elsöként, mint foszfo tirozint hordozó 85 kDa méretű fehérjét izolálták *v-Src* expresszáló csirke embrionális fibroblasztsejtben (Kanner és mtsai, 1990), majd rövidesen a szekvenciáját is megállapították (Wu és Parsons, 1993). A Cortactin fehérje különféle daganatokban a normálnál sokszorosán nagyobb mennyiségben megtalálható (Weed és Parsons, 2001). A fehérje megemelkedett mennyisége együtt jár az érintett sejtek megnövekedett vándorlási és metasztázisos potenciáljával (Schuurung és mtsai, 1993), valószínűleg az intenzívebb aktin polimerizációt követő sejtnyúlványképzés következményeképpen. A Cortactinnak a sejtek alakját szabályozó képességét nem tumoros sejtekben is leírták (például: Liu és mtsai, 1999; McNiven és mtsai, 2000; Rogat és Miller, 2002; Vidal és mtsai, 2002; Vouret-Craviari és mtsai, 2002)

Eddig egy-egy *cortactin* gént azonosítottak minden megvizsgált élőlényben. A Cortactin fehérjét gyakorlatilag minden emlőszövetben megtalálták (Migliarese és mtsai, 1994; Du és mtsai, 1998).

A Cortactin fehérje szerkezete a következőképpen írható le: az N-terminális végen található a főleg negatív töltésű aminosavakat tartalmazó NTA (N-Terminal Acidic) domén (Weed és mtsai, 2000), ezt az aktinkötésért felelős, változó számú (ember: 6,5; muslica: 4) ismétlődő aminosav-sorrendű szakasz (Wu és Parsons, 1993; Sparks és mtsai, 1996; Katsube és mtsai, 1998) követi, melyek közül emberben a negyediknél történik az aktin tényleges megkötése. A molekula középső részén egy helikális struktúra és egy prolingazdag szakasz foglal helyet, mely három Src-foszforilációra alkalmas tirozint tartalmaz. A C-terminális végen helyezkedik el az SH3 (Src-Homológia-3) domén, mely más fehérjékhez való kötődésért felelős (Weed és Parsons, 2001) (7.ábra).

A Cortactin kapcsolata a Src fehérjével

A Src képes közvetlenül kötődni a Cortactinhoz és azt foszforilálni (Zhan és mtsai, 1994; Okamura és Resh, 1995; van Damme és mtsai, 1997), de ennek az aktiválásnak a Cortactin működésében játszott szerepe eddig nem tisztázott. A muslica genomjában két *Src* gén található: *Src42* és *Src64*. A *Src42* mutatja a nagyobb fokú hasonlóságot más szervezetek *Src* génjeihez, muslicában életfontosságú szerepe van: a *Src42* mutációja letális hatású. A *Src64* homozigóta legyek életképesek, de a mutáns nőtények csökkent fertilitásúak. Ennek oka a gyűrűcsatornák tökéletlen fejlődése: az egyébként szabályos alakú, de normálisnál kisebb átmérőjű gyűrűcsatornák nem teszik lehetővé a megfelelő mértékű anyagáramlást a dajkasejtek és a petesejt között, és ezért a kifejlődő peték a normálisnál kisebbek (Dodson és mtsai, 1998).

A gyűrűcsatornák abnormális fejlődése valószínűsíthetően a csatornák vázát adó polimerizált aktin nem megfelelő elrendezésére vezethető vissza. Ezt két fő érv támasztja alá: először, a *Src64* homozigóta petekamrák gyűrűcsatorna-fenotípusa jelentős hasonlóságot mutat olyan gének mutánsainak fenotípusához, amelyek aktin sejt-váz átrendezést szabályozó fehérjéket kódolnak (pl.: *Arp66B*: Hudson és Cooley, 2002; *Akap2000*: Jackson és Berg, 2002). Másodszor, a Src fehérjéken

többféle kísérleti rendszerben végzett vizsgálatok alapján bebizonyosodott, hogy az aktin polimerizáció fontos szabályozó elemei.

A Cortactin szerepe az aktin polimerizációban

Az Arp2/3 fehérjekomplexrEl kimutatták, hogy az aktinváz átrendezÉdésének központi szabályozója (May, 2001). A Cortactin a WASP fehérjével együtt képes Arp2/3-komplex aktiválására (Higgs, 2002; Weaver és mtsai, 2002, 2003), melyhez a Cortactin NTA doménje és az ismétlÉdÉ aminósav-sorrendi szakaszok szükségesek (Urano és mtsai, 2001; Weed és mtsai, 2000; Weaver és mtsai, 2001). Az NTA domén szerepe a komplexhez való kötÉdésben és aktiválásban van, míg az ismétlÉdó szakasz az elágazó aktinszálakhoz kötÉdve gátolja azok lebontását, és így stabilizálja az aktinvázat. A Cortactinnak az aktinvázra kifejtett hatása elsÉsorban a sejtek perifériáján figyelhetÉ meg.

A Cortactin különbözÉ ingerek hatására képes a citoplazmából áthelyezÉdni a sejtmembránhoz. Ezt a folyamatot befolyásolja a Rac kis GTP-áz fehérje is (Weed és mtsai, 1998; Vouret-Craviari és mtsai, 2002).

A Cortactin képessége a sejtperifériákra történÉ elhelyezÉdéshez, az Arp2/3-komplexet aktiváló és az aktinvázat stabilizáló képessége fontos szerepet sugall az aktinváz átrendezÉdésének szabályozásában (Weed és Parsons, 2001).

A Cortactin szerepe egyéb sejtbiológiai folyamatokban

Az Arp2/3 komplex és szabályozó fehérjei nemcsak az aktin-gazdag struktúrák kialakításában játszanak jelentÉs szerepet, de az endocitotikus folyamatok irányításában is (Moreau és mtsai, 1997). A Cortactin fehérjérEl kimutatták, hogy kapocsként szolgálhat az aktin polimerizáció és az endocitózis között, és a fehérje megtalálható volt a vezikulákon, átfedÉ festésben a dynamin2 vezikulatranszport-fehérjével (McNiven és mtsai, 2000). A Cortactin fehérje működésének gátlásával sikerült meggátolni a receptor-aktivált endocitózist (Cao és mtsai, 2003). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a Cortactin részt vállalhat az extracelluláris jelekre való érzékenység beállításában, az aktivált receptorok endocitózissal történÉ inaktiválása révén.

A Cortactin SH3 doménje révén képes a sejtközötti kapcsolatok egyes fehérjeihez kötÉdni és résztvenni a sejtadhéziók szabályozásában (Tilghman és Hoover, 2002).

A cortactin az ecetmuslicában

A Cortactin szerepe és működése *Drosophila melanogaster*ben ezidáig kevésbé ismert. A *Drosophila* Cortactint élesztő-kettőshibridrendszert alkalmazva, mint a ZO-1 fehérjéhez kötődő molekulát azonosították (Katsube és mtsai, 1998). A ZO-1 a sejtek közötti kapcsolóelemekben található, egyaránt kötődik egyes adhéziós fehérjékhez (Occludin, β -catenin, ZO-2) és a sejtvázas bizonyos elemeihez (α -spektrin, F-aktin). A részletes elemzés kimutatta, hogy a Cortactin SH3 doménje köt a ZO-1 prolin-gazdag doménjének PXXP peptidmotívumához. A *Drosophila* cortactin aminosavsorrendje nagymértékben hasonlít a homológ emberi fehérjéhez (7. ábra).

7. ábra A Cortactin fehérjeszerkezete. A *Drosophila* (*D-cort*; 550 aminosav hosszúságú) és az emberi (*H-cort*; 559 aminosav hosszúságú) fehérje szerkezetének sémáján feltüntetettük az egyes domének közötti aminosav-azonosságokat százalékban. *NTA*: N-végi savas domén; *repeats*: ismétlődő elemek; *a-helix*: alfa-hélix; *P-rich*: prolin-gazdag szakasz; *SH3*: SRC-homológ szakasz. (Katsube és mtsai, 1998 alapján).

A fehérje ellen készített ellenanyag a szárny imágókorongja sejtjeinek bazális részén erőteljes kortikális festést mutatott, ami az apikális részeken kevésbé szembetűnik.

Később a *cortactin* gén pontosabb citológiai helyzete (93B8-B9) és génszerkezete is ismertté vált (Katsube és mtsai, 2001).

Rogat és Miller (2002) kimutatták, hogy a miozin VI és a Cortactin fehérjék a spermatidák szétválásának intenzív aktinpolimerizációt igénylő szakaszában együtt lokalizálódnak. Hasonló kolokalizációt találtak a miozin VI és más, az aktinvázas szabályozásában szerepet játszó fehérjék (Arp3, Capping fehérje, ARPC2/p34) között. A miozin VI hiányában a Cortactin és az Arp2/3 komplex eloszlása jelentős zavarokat szenved és az aktinvázas szerkezete is eltorzul, ami arra utal, hogy ezeknek a fehérjéknek az aktinvázas szabályozásában is szerepe van a *Drosophilában*.

Munkánk kezdetekor az *ecetmuslica cortactin* génjének nem volt leírt mutánsa.

3.2.3. A Cortactin fehérje kimutatható a petekamra sejteiben

A muslica petefészkeket anti-cortactin ellenanyaggal megfestve megállapítottuk, hogy a fehérje megtalálható a petekamrát alkotó minden sejt típusban, sejt belüli eloszlása azonban nem egyenletes. A kortikálisan elhelyezkedő fehérje elsősorban a folliculáris sejtek bazális felszíne közelében dúsul föl és a sejt felszín egyes területein nagyon erős festődést mutat (8. ábra).

A Cortactin erős és egyenletes kortikális jelet ad a határsejtekben, de kimutatható az ivarsejtek sejtmembránjánál és a gyűrűsatornáknál is.

8. ábra A Cortactin kimutatható a petekamrákban. A konfokális mikroszkóppal készült felvételeken a cortactin ellenanyaggal végzett festés erős jelet ad a vándorló határsejtekben (A, kapoccsal kijelölve), kimutatható a dajkasejtek membránjánál (nyíl), és a gyűrűsatornákon is (nyílhegy). A petekamrák anteriorális része a képek bal oldalán található. A folliculáris sejtekben (B) a cortactin elsősorban kortikális elhelyezkedését figyelhettük meg. A falloidin az F-aktint, a DAPI a DNS-t (sejtmag) festi. A mértékek 20 (A), illetve 10 (B) mikrométert jeleznek.

3.2.4. A Cortactin fehérje túltermelésének hatásai

Több, emlős sejtenyészetekben végzett kísérletben megállapították, hogy a Cortactin mennyiségének növelése a sejtekben fokozott aktinváz termelést és sejtnyúlvány képződést vált ki. Szerettük volna megállapítani, hogy a jelenség

muslicában is megfigyelhető-e, ezért a petekamrák folliculáris sejtjeiben a Cortactin fehérje túlermelkedését idéztük elő. Az EPg35301 elemet, vagy az *UAS-cortactin* transzgént felhasználva azonos eredményt kaptunk:

- a Cortactint a normálnál nagyobb mennyiségben termelő sejtek bazális felszínén az aktinkötegek mennyisége megnövekedett;
- az érintett sejtek Cortactin- és F-aktin gazdag sejtnyúlványokat bocsátottak ki (9. ábra).

Egyik jelenséget sem tapasztaltuk, ha kontrollként a túl-termelő klónokban kizárólag a GFP fehérjét termeltettük túl.

9. ábra A Cortactin túlermelkedésének hatásai a folliculáris sejtekben. A Cortactin fehérjét az endogén szintnél jóval erőteljesebben termelő folliculáris sejtekben (ld. cortactin-festés az A' és B' képen) magas bazális F-aktin szintet (A, A'), illetve intenzív sejtnyúlvány-képződést (B, B': nyilak) figyelhetünk meg (genotípus: *hsFLP/AFG-Gal4; UAS-cortactin/UAS-GFP*). Mindez nem észlelhető a csak a GFP-t túlermelelő sejtcsoportban (C, C') (genotípus: *hsFLP/AFG-Gal4; UAS-GFP/+*). A mértékek 10 mikrométert jeleznek.

A kísérlet megmutatta, hogy a Cortactin fehérje mennyiségének megnövelése fokozott aktin polimerizációt serkent a sejtek perifériáján, amely a bazális aktinkötegek és az aktin gazdag sejtnyúlványok földúsulásában nyilvánul meg.

3.2.5. *cortactin* mutációk előállítása és térképezése

A *cortactin* gén szerepének megismerésében fontos a gén mutáns változatait hordozó állatok vizsgálata. Ezért a genetikai szűrésben talált, a *cortactin* gént 5' irányban 622 bázisnyira beépült EPg35301 jelű P-elemet próbáltuk kiugrasztani, hogy a *cortactin* génben deléciókat hozzunk létre.

170 olyan muslicatörzset hoztunk létre, amelyekben az EP-elemet hordozó kromoszómáról eltűnt a transzpozon jelenlétét mutató *miniwhite* szemszínjelzés, ami arra utalt, hogy a P-elem a helyéről eltávozott. Mind a 170 kiugrasztás homozigóta életképesnek bizonyult, ami azt jelenti, hogy vagy a *cortactin* gén hiánya nem okoz letalitást, vagy egyik kiugrasztás sem okozott sérülést a génben.

10. ábra A *cortactin* lokusz vázlatos térképe. Az EPg35301 jelű transzpozon kiugrasztásával hoztuk létre a deléciókat, amelyeket az ábra alján tüntettünk föl (K8, A4, D4, M7). A deléciók PCR-es térképezéséhez használt primereket (F11, F5, F1, F6, F7, F9, valamint R8, R2, R4, R10) az ábra felső részén jeleztük.

Hogy a kiugrasztásos vonalakban a *cortactin* gén delécióit molekuláris szinten leellenőrizzük, a föltételezhetően homozigóta deléciót hordozó hímekben DNS-t preparáltunk és azzal PCR-reakciókat végeztünk, melyek segítségével betérképezhettük a deléció pontos kiterjedését (10. ábra).

A PCR-es térképezés első lépéseként megkíséreltük eldönteni, hogy van-e a kromoszómán az EPg35301 beépülési helyétől a *cortactin* gén irányába terjedő deléció. Ezért egy primerpárt terveztünk (R4-F5), amely az EPg35301 közvetlen közelében, attól 5' irányban megtalálható genomikus szakasz jelenlétét ellenőrzi. Azok a vonalak, amelyek DNS-ével ez a szakasz többszörözhető, valószínűleg nem hordoznak a *cortactin* gént érintő deléciót.

A térképezés másik fontos lépéseként azt kívántuk bizonyítani, hogy a deléció nem terjed ki az EPg elem másik oldalán található *Annexin IX.* nevű gén irányába, hiszen az esetleges kettős mutánsok kevésbé használhatók a *cortactin* gén elemzésében. Ezt a lehetőséget az R8-F11 primerpárral ellenőriztük.

Ugyanezen okból vizsgáltuk meg a *cortactin* gén 3' végi szakaszán lévő genomikus DNS szakasz jelenlétét az R10-F9 primerpárral.

E három PCR-reakció segítségével négyre szikítettük le a csakis a *cortactin* érintett deléciók számát.

Több primerpárral végrehajtott PCR-reakció (K8: R2-F1; A4, D4: R2-F6; M7: R2-F7) használatával sikerült azonosítani a mutáns kromoszómák azon szakaszait, melyek a deléciót tartalmazták. E DNS szakaszok szekvenálása után megállapítottuk a mutációk pontos molekuláris töréspontjait (2. táblázat).

2. táblázat. Az EPg35301 elem pontatlan kivágódásával izolált, a *cortactin* gént érintett deléciók. A kezdő és végpontokat a *cortactin* gén transzkripció starthelyéhez viszonyítottuk. A teljes *cortactin* transzkriptum 2723 bázispár (ld. még 10. ábra).

allél	deléció kiterjedése			
	kezdőpont	végpont (bázispár)	méret	érintett exonok
K8	-773	106	879	1.
A4	-689	847	1536	1-2-3.
D4	-689	1395	2084	1-2-3-4.
M7	-733	2741	3474	1-2-3-4.

A *cort^{M7}* deléció eltávolította a teljes *cortactin* gént, így ezt null allélnek tekinthetjük. A négy allél fenotípusa hasonlóan bizonyult, ami arra utal, hogy mind a

négy allél null mutáns. A további elemzések céljára a *cort^{M7}* és *cort^{D4}* allélokot választottuk ki.

A homozigóta *cortactin* deléciós mutáns legyek semmilyen külső morfológiai elváltozást nem mutattak, mindkét nem termékenynek bizonyult. A törzsek rövid idő alatt elvesztették balanszer kromoszómájukat, ezért valószínű, hogy a *cortactin* mutációja nem befolyásolja lényegesen a legyek életképességét és fertilitását.

A homozigóta mutáns egyedek életképessége lehetővé tette az ivarsejtképződés és a határsejtvándorlás közvetlen vizsgálatát.

3.2.6. A specifikus Cortactin festődés nem mutatható ki a *cort^{M7}/*cort^{M7}** mutáns petekamrákban

A *cort^{M7}/*cort^{M7}** sejtekben nem termelődhet Cortactin fehérje. Hogy ezt a mutáns sejtekben leellenőrizzük, ellenanyagfestést végeztünk *cort^{M7}/*cort^{M7}** mutáns legyek petekamráiban cortactin ellenanyag segítségével (11. ábra). A kortikális jel eltűnése egyértelműen arra utalt, hogy ezekben az állatokban nem képződik Cortactin fehérje. A tapasztalt gyenge citoplazmai festődés minden bizonnyal háttérjel, az ellenanyag nem specifikus reakciója más fehérjékkel.

11. ábra Konfokális mikroszkópos felvétel a Cortactin immunofestéssel vad típusú, cortactin mutáns és mozaikos petekamrákban. A: Vad típusú kontroll petekamra ellenanyagfestése. B: Homozigóta *cort^{M7}/cort^{M7}* mutáns petekamra ellenanyagfestése. A vad típusú petekamra sejtjeiben (a kapoccsal jelölt határsejtekben is) megfigyelhető kortikális festődés a mutáns petekamrában nem mutatható ki. C: A mozaikos petekamrák (genotípus: *hsFLP;; FRT82-cort^{M7}/FRT82-GFP*) *cort^{M7}/cort^{M7}* mutáns folliculáris sejtjeiben (GFP-negatív folt) nem figyelhető meg a specifikus kortikális cortactin-festődés. A petekamrák anteriorális része a képek bal oldalán található. A mértékek 20 mikrométert jeleznek.

Hasonló eredményt kaptunk, amikor a mozaikos petekamrákban összehasonlítottuk a vad típusú és a *cort^{M7}* homozigóta mutáns folliculáris sejtek cortactin-festődését. Ebben az esetben is a kortikális jel eltűnik (11. ábra).

Az ellenanyagfestések eredménye megerősítette a PCR-alapú deléció térképezés eredményét, vagyis, hogy a *cort^{M7}* homozigóta mutáns legyekben nem képződik Cortactin fehérje.

3.2.7. A cortactin mutáció ivarsejtképződésben mutatott fenotípusai

3.2.7.1. A folliculáris sejtréteg szakadásai

A vad típusú petekamrákban a petekamrák ivarsejtjeit körülvevő folliculáris sejtek egy rétegben helyezkednek el, a 8. fejlődési szakaszig teljesen körülfogják azt, majd a 9. szakasztól kezdve fokozatosan ráhúzódnak a petesejtre, és a 10. szakasz után már kizárólag a petesejtet fedik be.

A *cort/cort* mutáns legyek petekamráinak egy részében a folliculáris sejteknek ez a folytonossága megszakad, a folliculáris sejtrétegben "lyukak" keletkeznek (12. ábra). Ez a fenotípus alacsony penetranciát (6%) mutat.

A folliculáris sejtréteg szakadásai összhangban vannak azzal a megfigyeléssel, hogy a Cortactin fehérje részt vehet a sejtadhéziók szabályozásában (Tilghman és Hoover, 2002).

12. ábra A cortactin mutáns petekamrákban észlelhető folliculáris sejt-szakadások. A mutáns petekamra folliculáris sejtrétege a nyílhegyek között jelzett részen nem fedi a csíravonal sejtjeit. Ez jól látható mind a keresztmetszeti (A), mind a felszíni (B) konfokális felvételeken. A petekamrák anteriorális része a képek bal oldalán található. A mérték 20 mikrométert jelez.

3.2.7.2. Zavarok a dajkasejtek és a petesejt közötti anyagszállításban

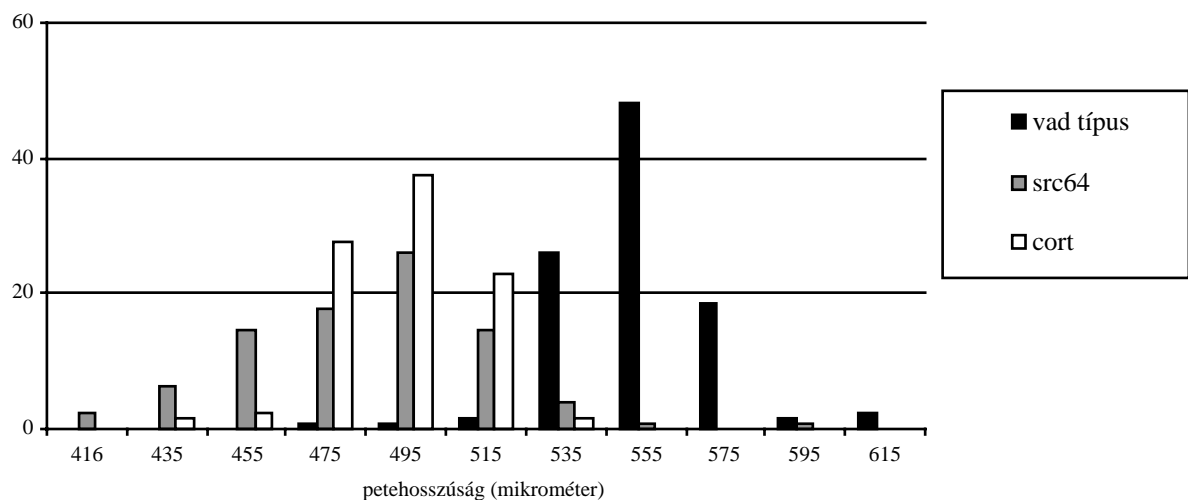
A mutáns *nEstények* peteképzésének elemzése során fölfigyeltünk egy, a peteérés későbbi (a 9. stádium utáni) szakaszaiban jelentkező abnormális morfológiai jellegzetességre. A petekamrák jelentős részében a petesejt és a dajkasejtcsoport közötti méretarány eltért a vad típustól. A 10. stádiumú vad típusú petekamrákban a petesejt hozzávetőlegesen akkora térfogatot tölt ki a petekamrán belül, mint a dajkasejtek csoportja együttesen. Ezzel szemben a *cortactin* mutáns legyek petekamráiban a petesejt ennél kisebb (13.A ábra). A 11. stádiumban a vad típusú petekamrákban a dajkasejtek nagy mennyiségű F-aktint halmoznak föl, és ennek segítségével citoplazmájuk nagy részét átpréselik a petesejtbe. A *cort/cort* mutáció esetében ez a folyamat késik. Bár a dajkasejtekben óriási mennyiségű F-aktin figyelhető meg, a petesejtbe történő anyagszállítás mégis elakad, és ezért a petesejt térfogata is kisebb (13.B ábra). Ez a rendellenesség a dajkasejtektől a petesejt felé vezető anyagszállítás akadályoztatottságára utal.

A dajkasejtektől a petesejtbe irányuló anyagszállítás zavara hasonló a *Src64/Src64* mutánsban leírt fenotípushoz (Dodson és mtsai, 1998). A *Src64* esetében azt találták, hogy az ivarsejtcsoporton belüli tökéletlen citoplazmamozgást a gyűrűsatornák normálisnál szűkebb keresztmetszete okozza. Ezért ebből a szempontból is megvizsgáltuk a *cortactin* mutáns legyek petefészkeit. A gyűrűsatornák alakja normális volt, de méretük kisebb volt a vad típushoz képest.

A 10. stádiumú petekamrák petesejtjeiben a gyűrűsatornák a *cortactin* mutánsokban több, mint 20 százalékkal szűkebb átméreteiek, mint a vad típusban (3. táblázat). A kisebb méret miatt korlátozottabb az átérésztéképesség, ami a dajkasejtek és a petesejt közötti anyagszállítás lelassulását, akadályoztatottságát okozhatja.

13. ábra A dajkasejtek és a petesejt közötti anyagszállítás lelassul a *cortactin* mutáns petekamrákban. A *cortactin* mutáns (*cort*) ováriumokban a petesejtnak a teljes petekamrában elfoglalt viszonylagos mérete kisebb a normálisnál, mind a 10. (A), mind a 11. (B) fejlődési szakaszban. A petekamrák anteriorális része a képek bal oldalán található. A mértékek 20 mikrométert jeleznek.

A korlátozott transzport következtében a peték mérete is csökken. Méréseink szerint a vad típusú legyek által lerakott peték 553 μm -es átlagos hosszúságával szemben a homozigóta *cort^{M7}* legyek petéinek hossza átlagosan mindössze 493 μm (3. táblázat). Az utóbbihoz hasonló értékeket kaptunk a *Src64* peték esetében a peték méretét ($484 \pm 30,6 \mu\text{m}$), ill. a méretkategóriák eloszlását tekintve (14. ábra). A peték kisebb mérete befolyásolja az embriók életképességét. Feltételezhetően a csökkent peteméret következménye a *cort^{M7}/cort^{M7}* legyek petéinek alacsonyabb kikelési aránya (3. táblázat). A fenotípus menekíthető a *tubulin* általános promóterrel működtetett *cortactin* cDNS transzgénnel (kelési arány: 81,1%; n=433).



14. ábra A Src64- és cortactin-mutánsok petéinek méreteloszlása Vad típus: w^{1118} , $n=123$; Src64: $Src64^{\Delta 17}/Src64^{\Delta 17}$, $n=108$; cort: $cort^{M7}/cort^{M72}$, $n=115$.

3. táblázat. A cortactin mutáció ivarsejtekre kifejtett hatásai

genotípus	fenotípus		
	gyiricsatornák átmérője (µm)	peték hossza (µm)	kelési arány(%)
w^{1118} (kontroll)	$10,27 \pm 1,74$ ($n=88$)	$553 \pm 19,7$ ($n=123$)	$86,8$ ($n=962$)
cort ⁻ /cort ⁻	$8,02 \pm 1,04$ ($n=90$)	$493 \pm 18,5$ ($n=115$)	$64,1$ ($n=811$)

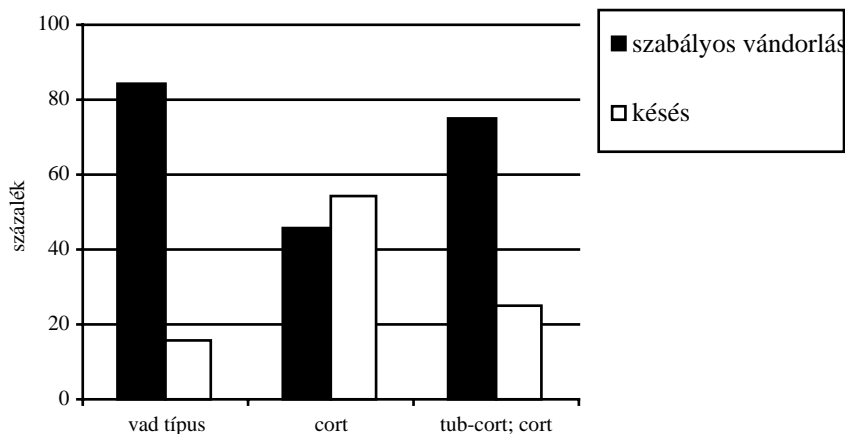
3.2.7.3. Késés a határsejtek vándorlásában

A határsejtvándorlás folyamatában is rendellenességeket találtunk. A vad típusú legyek petekamráiban a 9. fejlődési szakaszban a vándorló határsejtcsoport mozgása hozzávetéleg szinkronban történik a folliculáris sejtek petesetre való húzódásával. A cortactin homozigóta mutáns esetén ez az összhang megbomlik. Az esetek jó részében

a határsejtek a folliculáris sejtek által kijelölt helyzethez képest anteriorális irányban találhatóak, vagyis mozgásuk késést szenved (15. ábra).

A vad típusú 9. stádiumú petekamrákban a vándorló határsejtek 15,4%-a késik, a *cortactin* mutánsnál ez az érték 54,4%. A *tubulin-cortactin* transzgen ezt a fenotípust képes menekíteni (16. ábra). Ez a 9. fejlődési szakaszban megfigyelhető késés azonban nem akadályozza meg a teljes vándorlást: a 10. stádiumra a határsejtcsoportok jelentősen, a vad típushoz hasonló része eléri a petesejtet.

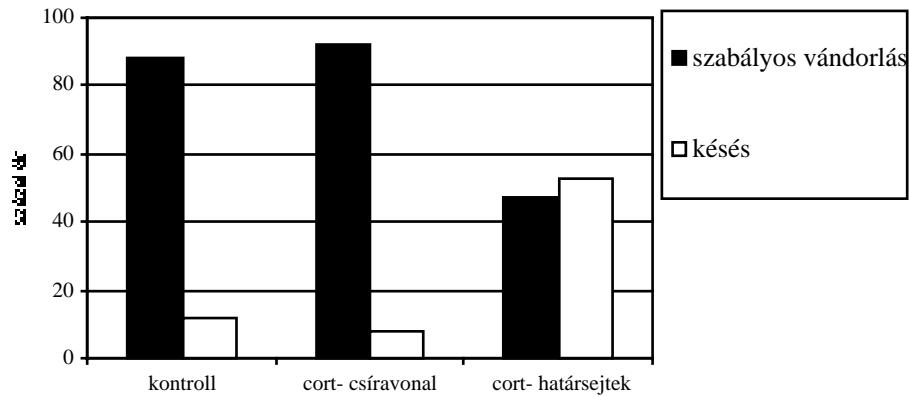
15. ábra Határsejtvándorlás 9. fejlődési stádiumú petekamrákban. A vad típusú petekamrákban (A) a petesejtre húzódo folliculáris sejtek (*egyenes*) és vándorló határsejtek (*kör*) szinkronban mozognak, helyzetük az anteriorális-poszteriorális tengelyen hasonló (A). A *cort^{M7}/cort^{M72}* mutáns petekamrákban (B) a határsejtek a folliculáris sejtek által kijelölt helyzethez képest hátrébb találhatóak. A petekamrák anteriorális része a képek bal oldalán található. A mértékek 20 mikrométert jeleznek.



16. ábra A cortactin mutáns petekamrák határsejtjei késnek a 9. fejlődési stádiumban. Szabályos vándorlásnak azt tekintettük, amikor a határsejtek és a folliculáris sejtek vándorlási helyzete (ld. 15. ábra) közötti távolság kisebb, mint egy dajkasejt-átmérő; késésnek, amikor a nevezett távolság nagyobb egy dajkasejt-átmérőnél. *Vad típus:* w^{1118} , $n=246$; *cort:* $cort^{M7}/cort^{M72}$, $n=285$; *tub-cort; cort:* tubulin-cortactin; $cort^{M7}/cort^{M72}$, $n=89$.

Szerettük volna megtudni, hogy a Cortactin fehérje működésére a határsejtekben, a dajkasejtekben, vagy mindkettőben szükség van-e a normális határsejtvándorláshoz. Ezért mozaikos petekamrákat hoztunk létre, melyekben vagy az ivarsejtek, vagy a folliculáris sejtek hordoztak homozigóta *cortactin* mutációt. Vándorlási rendellenességeket csak abban az esetben tapasztaltunk, amikor a határsejtek voltak mutánsok. Az ivarsejtek mutációja a határsejtvándorlásra nem hatott (17. ábra). A folliculáris sejtrétegben talált részleges mutáns klónoknak a petesejtre irányuló mozgása normális volt.

Ez a kísérlet megmutatta, hogy a normális határsejtvándorlás feltétele a Cortactin fehérje jelenléte a határsejtekben. A Cortactin fehérje hiánya az ivarsejtekben nem gyakorol hatást a határsejtvándorlásra.



17. ábra A *cortactin* mutáns határsejtek vándorlása késik a 9. fejlődési fázisú petekamrákban. *Kontroll:* hsFLP;; FRT82-cort^{M7}/FRT82-GFP, n=131; *cort csírvonal:* hsFLP;; FRT82-cort^{M7}/FRT82-cort^{M7}, n=26; *cort határsejtek:* hsFLP;; FRT82-cort^{M7}/FRT82-cort^{M7}, n=52.

3.2.8. A Cortactin fehérje részt vesz a PVR tirozinkináz receptortól az aktin sejtvázhhoz vezetCE jelátvitelben

A Cortactin eddig leírt tulajdonságai alapján föltételezhetCE, hogy a fehérje aktin sejtváza gyakorolt hatása kapcsolatban állhat egyes tirozinkináz-receptorok (TKR) hasonló működésével. Ezt az támasztja alá, hogy:

- korábban kimutatták, hogy a határsejtek vándorlását két tirozinkináz receptor, a PDGF/VGF receptor (PVR) és az EGF receptor (EGFR) irányítja (Duchek és Rørth, 2001; Duchek és mtsai, 2001). A vándorló határsejtek irányításának lényeges eleme az aktin sejtváza polarizált átrendezCEdése, melyhez nyilvánvalóan szükség van az aktinszálak polimerizációját irányító enzimekre. Ez utóbbiak hiánya, vagy csökkent működése hátrányosan befolyásolhatja a határsejtvándorlást;

- a PVR aktivált formájának (λ -PVR (Duchek és mtsai, 2002)) hatására az azt termelCE folliculáris sejtek a vad típustól eltérCE módon sejtnyúlványokat bocsájtanak ki. A Cortactin fehérje túltermeltetése hasonló, bár a λ -PVR-hez képest mérsékeltebb hatást fejt ki;

- emlCEs sejttenyészetekben végzett kísérletekben (Maa és mtsai, 1992; Zhan és mtsai, 1993; Hinsby és mtsai, 2003) kapott eredmények valószínűsítik, hogy a Cortactin kapocsként szolgálhat egyes tirozinkináz receptorfehérjék (köztük a PDGF) és az aktin sejtváza között.

3.2.8.1. A Cortactin fehérje mennyisége növekszik a PVR-aktivált sejtek sejtmembránjánál

Azért, hogy megtudjuk, milyen jelátviteli kapcsolat van a határsejteket vezető tirozinkináz receptorok egyike, a PVR fehérje és a Cortactin fehérje között, megvizsgáltuk a PVR túltermelésének hatásait a folliculáris sejtekben. A PVR vad típusú formájának egyes folliculáris sejtekben *slbo-Gal4* meghajtóval történő túltermelése enyhe, de jól megfigyelhető fenotípust eredményezett:

1. A PVR megemelkedett szintjével együtt járó fokozott aktivitás eredményeként a sejtekben az aktin polimerizáció szintje magasabb, az aktinszálak sűrűségének megnövekedése jól megfigyelhető a sejtek bazális felszínének közelében (18.A ábra).

2. Ugyanezen sejtekben a Cortactin fehérje erőteljesebb kortikális festést mutat, a sejtmembránhoz való fokozott kapcsolódás és/vagy amiatt, hogy a membránhoz kötött Cortactin fehérje stabilabbá válik. Ez a magasabb fehérjeszint nem egyszerűen annak a következménye, hogy az aktinkötő Cortactin nagyobb mennyiségben kapcsolódik a megemelkedett mennyiségű F-aktinhoz. Ezt egyrészt onnan tudjuk, hogy a Cortactin ellenanyagfestése nem mutat a falloidin-festéssel teljesen átfedő mintázatot. Másrészt két, ugyanilyen körülmények között megvizsgált más aktinkötő fehérje (Moezin, Spectrin) a Cortactintól eltérően változatlan mértékű jelet ad a PVR-aktivált sejtekben (18.B ábra).

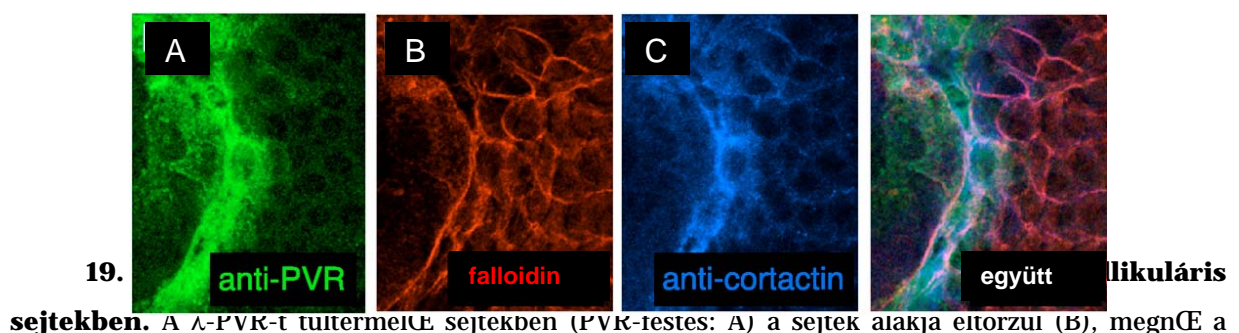
A Cortactin fehérje szintje megemelkedik tehát azokban a sejtekben, ahol a PVR tirozinkináz receptor aktivitását fokozzuk.

18. ábra A PVR tirozinkináz receptor túltermelésének hatásai folliculáris sejtekben. A PVR-t túltermelő sejtekben (PVR-festés: A, B) megemelkedik a bazális F-aktinszint (falloidin-festés: A', B'), valamint a kortikális cortactin szintje (A"). Ez a fehérjeszint emelkedés nem figyelhető meg a kontrollként használt aktin kötő Moezin fehérje esetében (B"). Egy-egy szemléletes példát nyílhegyekkel kiemeltünk. A mérték 10 mikrométert jelez. Genotípus: slboGal4 / UAS-PVR.

3.2.8.2. A Cortactin fehérje hiánya szuppresszálja a folytonosan aktivált PVR-receptor hatásait

A Cortactinnak a tirozinkináz-receptorokról induló jelátviteli útban való részvételét a PVR receptor folytonosan aktivált változatának (λ -PVR) a felhasználásával vizsgáltuk. A λ -PVR hibrid fehérje tervezésekor (Duchek és mtsai, 2001) a PVR extracelluláris doménjét konstitutívan dimerképzésre képes, úgynevezett λ -doménra cserélték, a más tirozinkináz-receptoroknál korábban már leírt módon (Lee és mtsai, 1996; Queenan és mtsai, 1997). Ez a domén állandó dimerizációt vált ki a receptoron, ami megfelel a normális esetben a ligandum által kiváltott hatásnak. A receptor további részei, vagyis a transzmembrán és az intracelluláris domének változatlanok maradtak, tehát az állandóan aktivált receptor sejtben belüli molekuláris partnerei feltételezhetően ugyanazok, mint egyébként, így az általa bekapcsolt jelátviteli utak megfelelnek a vad típusú állapotoknak.

A λ -PVR termelése a folliculáris sejtekben drámai hatást vált ki. A fölépő erőteljes F-aktin képzés eltorzítja a sejtek alakját. A sejtek nyúlványokat bocsátanak ki, kilépnek az egyrétegű sejtsor szintjéből. Míg a vad típusú PVR elsősorban a sejtmembránban található, addig a λ -PVR a sejt belsejében lévő vezikulák felszínén is nagy mennyiségben megjelenik. A λ -PVR-aktivált sejtekben a Cortactin mind a sejtfelszínen, mind a citoplazmában földúsul (19. ábra).



kortikális és citoplazmás cortactin szintje (C). A petekamra anteriorális része a képek bal oldalán található. A mérték 10 mikrométert jelez. Genotípus: *slboGal4 / UAS-λ-PVR*.

A λ-PVR-nek a folliculáris sejtekben mutatott jellegzetes fenotípusa alkalmat adott egy episztázisos kísérlet megvalósítására. A kísérlet a következő gondolatmeneten alapult: a λ-PVR fehérjét *slbo-Gal4* meghajtóval termeltetve kiváltjuk a folliculáris sejtek torzulásos fenotípusát vad típusú, illetve *cort^{M7}/cort^{M7}* mutáns háttéren. A két kísérleti helyzetben tapasztalt fenotípusokat összevetve megállapíthatjuk, hogy a *cortactin* mutációjának milyen következménye van a PVR aktiválása által kiváltott sejtalkak-változásokra (20. ábra). Amennyiben azt tapasztaljuk, hogy a Cortactin fehérje eltávolítása a λ-PVR-fenotípusra szuppresszálo hatással van, föltételezhetjük, hogy a Cortactin fehérje szerepel abban a jelátvitelben, ami a receptor és a fenotípust közvetlenül kiváltó aktinváz átrendezÉdés között található.

20. ábra A λ-PVR aktivált receptor által kiváltott fenotípusok kategóriái a centripetális folliculáris sejtekben. Enyhe fenotípusnak tekintettük azt, ahol a centripetális folliculáris sejtek (az anteriorálisan elhelyezkedÉ egy-két sejtsor) alakja alig, vagy egyáltalán nem tér el a normálistól és a folliculáris sejtek anteriorális határvonala egyenes lefutású (C). Súlyos fenotípusnak vettük azokat az eseteket, amelyeknél a centripetális folliculáris sejtek alakja teljesen szabálytalan, és a folliculáris sejtek anteriorális határvonala erÉsen szabdalt, alig követhetÉ (A). Közepes fenotípus esetén a centripetális folliculáris sejtek alakja kismértékben deformálódott, és a folliculáris sejtek anteriorális határvonala nem egyenes lefutású. A petekamrák anteriorális része a képek bal oldalán található. A mérték 10 mikrométert jelez. Genotípus: *slboGal4 / UAS-λ-PVR*.

A kísérletben kismértékű, de szignifikáns (χ^2 -próba: $p < 0,001$) fenotípus szuppressziót találtunk. A vad típusú háttéren a 10. stádiumú petekamrák 47,3%-ban súlyos elváltozásokat mutattak és csak 11,4%-uk mutatott enyhe fenotípust. A *cort/cort* homozigóta mutáns petekamrák 31,7%-ban súlyos, míg 22,6%-ban enyhe fenotípust mutattak (4. táblázat).

A Cortactin fehérje hiánya miatt tapasztalt fenotípus szuppresszió azt jelzi, hogy a fehérje részt vesz a PVR-tCEI induló jelátviteli útban. A csak kismértékben jelentkező szuppressziós hatás arra utal azonban, hogy ebben a jelátviteli útban a Cortactin nem játszik döntő szerepet.

4. táblázat. A λ -PVR transzgén okozta folliculáris sejt-fenotípusok megoszlása vad típusú és cortactin mutáns petekamrákban (%)

genotípus		fenotípuskategória	
		súlyos	enyhe
slboGal4/UAS- λ -PVR(n=402)	47,3	41,3	11,4
slboGal4/UAS- λ -PVR; <i>cort/cort</i> (n=287)	31,7	45,6	22,6

3.2.9. A Cortactin fehérje eleme a Src és az aktin sejt-váz közötti jelátviteli útnak

A *cortactin* gén általános ismertetésekor megemlítettük a Src fehérjének a Cortactin fehérje foszforilálásában és aktiválásában játszott szerepét. A *Drosophila melanogaster* két *Src* génje közül a kevésbé konzervált *Src64* az életképességhez nem esszenciális gén. A *Src64*-nek elsősorban a nCEstények csíravonalában van specifikus feladata, mutáns fenotípusa (gyűrűsatorna-beszűkülés) a *cortactin* mutánsokkal mutat nagyfokú hasonlóságot. A *Src42* ellenben a szomatikus sejtekben működik, általánosabb szerepi, az életképességhez esszenciális gén. A *Src42* mutációja letális, a gén FLP-FRT technikával elCEállított mozaikos vizsgálata azonban nem kivitelezhető, mivel a *Src42* lókusza az FRT-helytCEI proximálisan helyezkedik el.

A Src42 aktivált formájának (*Src42^{CA}*, Tateno és mtsai, 2000) a folliculáris sejtekben slboGal4 meghajtóval történő termeltetése a λ -PVR transzgénhez

rendkívül hasonló fenotípust okoz. Az érintett sejtekben élénk aktin polimerizáció, és a sejthalak eltorzulása tapasztalható. A Cortactin fehérje ezekben a sejtekben földúsul. A Src^{CA} által kiváltott jellegzetes fenotípus lehetővé adta arra, hogy megvizsgáljuk, a *cortactin* mutációja képes-e szuppresszálni a Src^{CA} hatását. A kísérlet gondolatmenete és végrehajtási módja megegyezett azal, amit a 3.2.8.2. pontban a PVR esetére leírtunk.

A szuppressziós kísérlet eredménye az volt, hogy Cortactin fehérje eltávolítása a Src^{CA} okozta fenotípus gyengítette, azaz a fenotípus-kategóriák eloszlása az enyhébbek irányába tolódott el (5. táblázat; χ^2 -próba: $p < 0,001$).

Az eredmény azt sugallja, hogy a Cortactin részt vesz a Src és az aktin sejtvezérlés közötti jelátvitelben, de ez a szerepe nem döntő fontosságú.

5. táblázat. Az Src42^{CA} okozta folliculáris sejt-fenotípusok eloszlása vad típusú és cortactin mutáns háttéren (%)

genotípus	fenotípuskategória		
	súlyos	közepes	enyhe
slboGal4/UAS-Src42 ^{CA} (n=765)	36,2	40,1	23,7
slboGal4/UAS-Src42 ^{CA} ; cort ⁻ /cort ⁻ (n=422)	32,5	33,9	33,6

3.3. Myoblast city és sponge

3.3.1. A myoblast city a slbo fenotípus szupresszora

Az EPg36390 inszerciós mutáns a *slbo*¹³¹⁰/*slbo*¹³¹⁰ fenotípust gyengítette. A plazmidmenekítés és szekvenálás kimutatta, hogy ez az elem a megfelelő (vagyis az enhanszer-promóter szekvenciákkal a gén 5' vége felé mutató) irányultsággal a *myoblast city* (*mbc*) nevi gén 5' végénél található, a transzkripció starthelyétől 350 bázispárnyi távolságra. A géntől a következő pontban összefoglalandó ismeretek alapján tudtuk, hogy a sejtek aktinváz átrendezési folyamatainak fontos szabályozója. Feltételeztük, hogy jelentős szerepet játszhat a határsejtvándorlás során is, ezért további vizsgálatok elvégzését határoztuk el.

3.3.2. Áttekintés: az MBC fehérje szerkezete és működése

Az *ecetmuslica* genomjának *myoblast city* (*mbc*) lókuszt a mioblasztok fúziójában okozott mutáns fenotípusa alapján azonosították (Rushton és mtsai, 1995). A gén izolálása és bázissorrendjének megismerése (Erickson és mtsai, 1997) azt mutatta, hogy az MBC fehérje magas szintű homológiát mutat az emberi DOCK180 fehérjével, amely kötődik a Crk SH2-SH3 adaptor molekulához és részt vesz a fokális adhézióktól a sejtek felé történő jelátvitelben (Hasegawa és mtsai, 1996). Az MBC Crk fehérjéhez való kötődését később *Drosophilában* is kimutatták (Galletta és mtsai, 1999). Az *mbc* az *ecetmuslica* szöveteinek nagy részében kifejeződik: a poláris sejtek, az epidermiszben, az endodermában, a szomatikus, illetve emésztészszeri izomszövetekben, és a dorzális tömlőben (Erickson és mtsai, 1997). A mutációk által okozott fenotípusok a sejtváz átrendezés szabályozásában bekövetkező rendellenességekre utaltak. A mutánsokban hibás a mioblasztfúzió, az embriók háti záródása (Erickson és mtsai, 1997), illetve a szemfejlődés, a ventrális axonkötegek összekapcsolódása (Nolan és mtsai, 1998).

Nolan és munkatársai (1998) *muslicában* genetikai és biokémiai módszerekkel kimutatták, hogy a Myoblast city a Rac kis GTP-áz fehérje aktivátora (a Rac GDP-kötött inaktív állapotát a GTP-kötött aktív állapot irányába módosítja), így módon képes részt venni a membrántól az aktinsejtváz felé vezető jelátvitelben és számos morfogenetikai folyamat szabályozásában. A Rac az aktinsejtvázra leginkább a SCAR fehérjén keresztül az Arp2/3 komplex aktiválása révén hat. *C. elegansban* végzett

kutatások a Crk-DOCK180-Rac jelátvitel jelentőségét mutatták ki a programozott sejthalált követő fagocitózis (Reddien és Horvitz, 2000), illetve az axonok útkeresésének (Lundquist és mtsai, 2001) szabályozásában. Ugyanez a jelátviteli út játszik szerepet az emlős fehérvérsejtek irányított vándorlásában (Nishihara és mtsai, 2002).

A fehérje szerkezetét tekintve a Myoblast city a DOCK180 nagycsaládhoz tartozik (Coté és Vuori, 2002), melyek tagjaira jellemző az N-terminálison található SH3 (Src-Homológia-3) domén, a Rac-aktiváló domének (Brugnera és mtsai, 2002; Coté és Vuori, 2002) a fehérje középső részén (Docker, vagy DHR1-2), illetve a C-terminális végen elhelyezkedő Crk-kötő hely (21. ábra).

21. ábra A DOCK-A fehérjecsalád szerkezete. Fő egységek: SH3-domén (SH3), Rac-aktiváló domének (DHR-1, DHR-2), Crk-kötő domén (Crk). (Coté és Vuori, 2002 alapján).

Az újonnan felfedezett DOCK180 nagycsalád négy, az *ecetmuslica* genomikus szekvenciája alapján azonosított tagja közül vizsgálataink kezdetekor egyedül a *myoblast city* gént ismerték (22. ábra).

22. ábra A DOCK180 fehérje nagycsalád rokonsági viszonyai. A DOCK180 nagycsalád fehérjéi emberben, *Drosophilában* és *C. elegansban* azonosított tagjainak rokonsági fája. A muslicában talált fehérjéket kiemeltük (Coté és Vuori, 2002 alapján).

Összefoglalva, a Myoblast city szerepet játszik egy, az állatvilágban széles körben megtalálható jelátviteli útban (receptor-(Crk)-MBC-Rac-sejtváz), amely külső jelek hatására átrendeződéseket szabályoz a sejtek aktinvázában, és így különféle morfogenetikai változásokat segít el az egyedfejlődési folyamatokban.

3.3.3. Az MBC fehérje kimutatható a petekamra sejtjeiben

Az MBC-ellenanyagfestéssel kimutattuk, hogy az MBC fehérje jelen van a petekamrákban a peteképződés minden szakaszában. A *myoblast city* gén terméke kimutatható a citoplazmában is, de legérősebb jelet a sejtek kortikális részén mutatja. A határsejtvándorlásban játszó szerepre utal az, hogy ezek a sejtek erősen festődnek (23.A ábra).

23. ábra A Myoblast city fehérje kimutatható a petekamrákban. A vad típusú petekamrában megfigyelhető a kortikális MBC-festés, amely a határsejtekben (kapocs) is jelen van (A). Az MBC fehérjét EP elemmel túltermeltetve (B, genotípus: *slboGal4/+; EPg36390/+*) erőteljes jelet figyelhetünk meg a határsejtekben (kapocs) és a centripetális folliculáris sejtekben (nyilak). A petekamrák anteriorális része a képek bal oldalán található. A mértékek 20 mikrométert jeleznek.

3.3.4. Az MBC túltermeltetésének nincs hatása a pete-kamrákban

Az EPg39360 inszerciót és a *slbo-Gal4* meghajtót egyaránt hordozó (genotípus: *slboGal4/+; EPg36390/+*) egyedek petekamrájában erősen határsejti mbc-festést figyelhetünk meg (23.B ábra). Ez az eredmény egyrészt igazolja, hogy az EPg39360 elem képes az MBC fehérje túltermeltetését kiváltani, másrészt mutatja, hogy az ellenanyag specifikus az MBC fehérjére.

A Myoblast city fehérje túltermeltetése a petekamrákban semmilyen látható elváltozást nem okozott. Ez arra utal, hogy a fehérje mennyiségének megnövelése önmagában nem jár jelentős következményekkel, szemben azzal, amit a Cortactin fehérje esetében megfigyeltünk.

3.3.5. A Myoblast city fehérje hiánya késést okoz a határsejt-vándorlásban

Az *mbc* génnek több mutációja is ismert (Erickson és mtsai, 1997). Az *mbc^{D11.2}* allél a 97-es aminosav helyén stopkodont hordoz, és mivel null allél, a funkcióvesztéses vizsgálatainkhoz ezt választottuk. A homozigóta *mbc^{D11.2}* legyek életképtelenek, az embrionális fejlődéskor a háti záródásnál elakad. Az *mbc* petekamrai funkcióvesztéses fenotípusának elemzéséhez tehát mitotikus klónok előállítására volt szükség. Kísérleteink szerint a mutáns állapotban a határsejtek vándorlása súlyos rendellenességeket mutat (24. ábra).

24. ábra Az *mbc* mutáns határsejtek vándorlása. A mutáns (GFP-negatív, kapocccsal kiemelve) határsejtcsoportok az esetek többségében nem érik el időben a petesejtet. Genotípus: *hsFLP;; FRT82-*mbc^{D11.2}*/FRT82-GFP*. A petekamra anteriorális része a kép bal oldalán található. A mérték 20 mikrométert jelez.

A mutáns határsejtcsoportok 10%-a képes csak időben elérni a petesejtet, a többség jelentős késést szenved (24. és 25. ábra), ami jelzi, hogy a *myoblast city* fontos szerepet tölt be a határsejtek vándorlásában. A kísérlet azt is megmutatta, hogy a MBC szerepe nem kizárólagos ebben a vándorlásban, hiszen a fehérje jelenléte nélkül is megfigyelhető a határsejtek kisebb-nagyobb mértékű elmozdulása.

3.3.6. A Myoblast city fehérje részt vesz a PVR-től induló jelátvitelben

Emlés sejtenyészetekben végzett vizsgálatok kimutatták, hogy az MBC képes a tirozinkináz receptorok (TKR) aktivitását a citoplazma felé közvetíteni. Ez a megfigyelés, valamint az a kísérleti eredményünk, hogy az *mbc* mutációi a TKR-ok által vezetett határsejtvándorlásban súlyos késési fenotípust okoznak, indított

bennünket annak megvizsgálására, hogy az MBC fehérje részt vesz-e a TKR-októl induló jelátvitelben muslicában is.

Az MBC szerepét a PVR és a citoplazmatikus folyamatok közötti jelátvitelben betöltött szerepének elemzését a Cortactin esetében korábban (3.2.8.2. pont) leírt λ -PVR-fenotípus-szuppresszió segítségével vizsgáltuk, módosított formában. Az *mbc* gén a *cortactin*mal ellentétben szükséges az életképességhez, ezért a homozigóta mutáns petekamrák közvetlen vizsgálata nem lehetséges. Így *mbc* homozigóta mutáns FRT-klónokat hoztunk létre a petekamrák centripetális sejtjeiben és megfigyeltük, hogy módosítja-e a λ -PVR-fenotípust az *mbc* hiánya. Kontrollként az ugyanebben a mintában talált, mutáns klónokat nem tartalmazó petekamrákat használtuk. Először a falloidin-festés segítségével csoportosítottuk a petekamrákat a megfelelő fenotípus-kategóriába, majd a klonális markerként szolgáló GFP-jel alapján megállapítottuk a minta genotípusát. A homozigóta *mbc*-klónokban a mutáns centripetális folliculáris sejtek λ -PVR fenotípusa jelentősen mérséklődött (6. táblázat; χ^2 -próba: $p < 0,001$). Ez azt jelzi, hogy a Myoblast city részt vesz a PVR-től az aktin sejtváz felé vezető jelátvitelben, mégpedig a Cortactin fehérjénél jelentősebb mértékben.

6. táblázat. A λ -PVR okozta follikuláris sejt-fenotípusok eloszlása *myoblast city* mutánsra heterozigóta (kontroll) és homozigóta egyedek petekamráiban (%)

	fenotípus		
	súlyos	közepes	enyhe
kontroll	83,4	7,6	9,0
mbc ⁻	22,2	25,9	51,9

Kontroll: slboGal4/UAS- λ -PVR; FRT82-GFP/FRT82-*mbc*^{D11.2} (n=524); *mbc*⁻: slboGal4/UAS- λ -PVR; FRT82-*mbc*^{D11.2}/FRT82-*mbc*^{D11.2} (n=27).

3.3.7. A Sponge részt vesz a határsejt-vándorlási folyamat-ban és a PVR-t CEl induló jelátvitelben

A *myoblast city* Drosophila-homológjai (Coté és Vuori, 2002) közül az *mbc*-vel legközelebbi rokonságot mutató CG11754 jeli gént CEl bizonyították, hogy azonos a *sponge (spg)* lókusszal (Schejter, személyes közlés). A *sponge* gén mutáns alléljait is azonosították, így ezeket fölhasználva megvizsgáltuk, hogy ez a gén részt vesz-e azokban a folyamatokban, amelyekben az *mbc* szerepét el CEzCE g kimutattuk. Ezért elemeztük a *spg* részvételét a határsejtvándorlásban, illetve a PVR-t CEl induló jelátviteli folyamatban. Szerettük volna azt is megtudni, hogy a két homológ gén mindegyike szükséges-e ezekben a folyamatokban, illetve ki tudunk-e mutatni redundanciát az *mbc* és a *spg* gének között.

A *spg*²⁴² null mutáns allél homozigóta életképes, de anyai hatású letalitást mutat: a homozigóta n CEstények petéi megtermékenyíthet CEk , de az embriók fejl CEdése igen korai szakaszban elakad. Ha ezekben a legyekben megvizsgáljuk a peteérést, semmilyen elváltozást nem tapasztalunk, mind az ivari, mind a testi sejtek morfológiája szabályos és a határsejtek vándorlása is normális.

Az *mbc* és a *spg* között esetleges funkcionális rokonságot kett CEs mutánsok létrehozásával vizsgáltuk. Mindkét lókusz a harmadik kromoszóma jobb karján található, az *mbc* a 95B5-7, az *spg* a 98E6-F1 citológiai pozícióban. Meiótikus rekombináció segítségével el CEállítottuk az FRT82-*mbc*^{D11.2}-*spg*²⁴² kett CEs null mutáns kromoszómát, amely hordozta a mitotikus klónok létrehozásához szükséges FRT-szekvenciát is.

A kettős mutáns határsejt klónokban súlyos vándorlási rendellenességeket találtunk. Az esetek 2/3 részében nem tapasztaltunk vándorlást és csak a 10. stádiumú petekamrák töredékében találtunk határsejteket a petesejt közelében (25. ábra). Az *mbc-spg* kettős mutáció hatása határsejt-specifikus, ha a petekamrában az ivarsejtvonal hordozza a kettős mutáns klónokat, a vándorlás normális. A határsejtvándorlásnak a kettős *mbc-spg* mutáns kombinációban talált fenotípusa jóval erősebb annál, amit a két gén mutációja önmagában okoz. Ez azt mutatja, hogy a két gén mindegyike szerepet játszhat a vándorlási folyamatban és egymást részben helyettesíteni is tudják.

A *mbc* és a *spg* géntermékeinek a határsejtvándorlásban mutatott hasonló szerepe arra utalt, hogy a két gén a λ -PVR-fenotípus szuppressziójában is kölcsönhatást mutathat, ezért elvégeztük az *mbc* esetén korábban leírt kísérletet. A kettős mutáns sejtekben jelentős szuppressziót tapasztaltunk (7. táblázat). Ez alapján megállapíthatjuk, hogy a *myoblast city* és a *sponge* gének fontos szerepet játszanak a PVR fehérjékel induló jelátviteli folyamatban.

7. táblázat. A λ -PVR transzgén folliculáris sejtekben okozott fenotípusainak eloszlása a *myoblast city-sponge* kettős homozigóta mutáns petekamrákban (%) *Kontroll:* *slboGal4/UAS- λ -PVR* (n=54); *mbc^{-/-}spg^{-/-}:* *slboGal4/UAS- λ -PVR*; *FRT82-mbc^{D11.2}-spg²⁴²/FRT82-mbc^{D11.2}-spg²⁴²* (n=47).

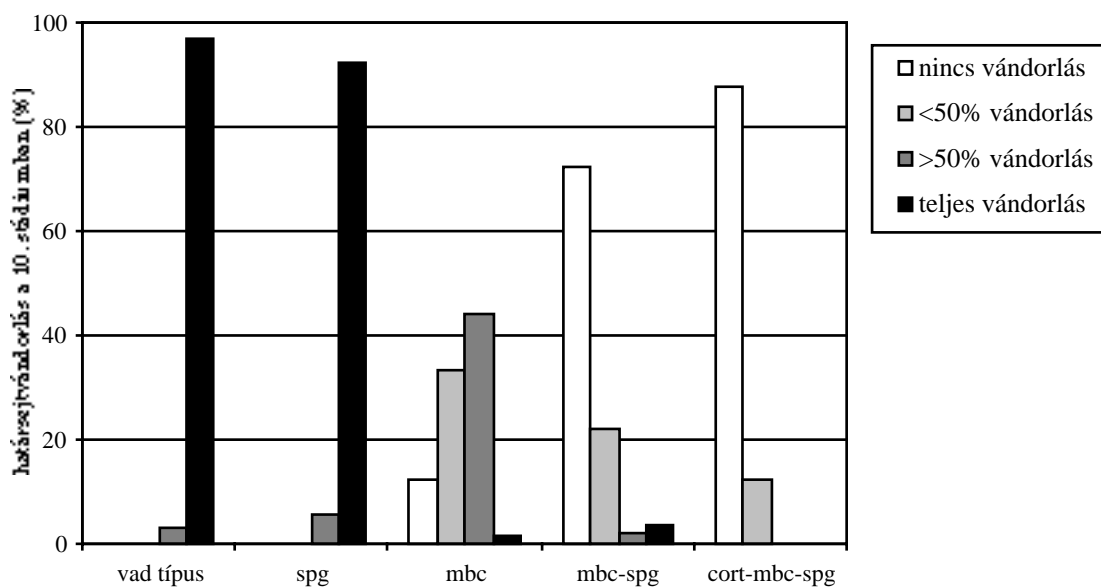
		fenotípuskategória		
		súlyos	közepes	enyhe
kontroll	66,7		20,4	13,0
<i>mbc^{-/-}spg^{-/-}</i>		4,3	25,5	70,2

3.4. A *myoblast city*, a *sponge* és a *cortactin* gének hasonló funkciójának vizsgálata

Az elCezCEekben kimutattuk, hogy a *myoblast city*, a *sponge* és a *cortactin* gének terméke szerepet játszik a határsejtek szabályos vándorlásában és a PVR tirozinkináz receptortól az aktin sejtvázhoz vezetCE jelátviteli útbán. Azt is megállapítottuk, hogy a három gén bármelyikének kiiktatása nem gátolja teljesen sem a határsejtvándorlást, sem az aktivált PVR által kiváltott fenotípust. A következCEekben megkíséreltük elemezni, vajon mind a három gén működésének együttes kiiktatása képes-e teljes mértékben gátolni ezeket a folyamatokat.

3.4.1. A *cort-mbc-spg* hármas mutáns határsejtek vándorlása nagyon korán elakad

A vizsgált három gén a 3. kromoszóma egyazon karján, citológiailag egymáshoz közel helyezkedik el (*cort*:93B8-9; *mbc*: 95B5-7; *spg*: 98E6-F1). A hármas mutáns létrehozása érdekében a *cort*^{M7} allélt meiotikus rekombináció segítségével juttatuk a már elCETTE kialakított FRT82-*mbc*^{D11.2}-*spg*²⁴² kromoszómára. A *mbc* és *spg* mutáns allélek jelenlétét genetikai módszerrel, a *cort* deléció jelenlétét pedig PCR technikával mutattuk ki. Az így elkészített törzs segítségével hármas mutáns mozaikos petekamrákat hoztunk létre. A *cort-mbc-spg* homozigóta mutáns határsejtek alacsony arányban voltak képesek a vándorlásra: alig több, mint 10 százalékuk mutatott csekély mértékű elmozdulást (25. ábra). Ez jelzi, hogy a három gén együtt döntCE szerepet tölt be a határsejtvándorlásban.



25. ábra *sponge*, *myoblast city* és *cortactin* mutációk és kombinációik hatása a határesejt-vándorlásra. *Vad típus:* w^{1118} , $n=75$; *spg:* spg^{242}/spg^{242} , $n=139$; *mbc:* $hsFLP;;FRT82-mbc^{D11.2}/FRT82-mbc^{D11.2}$, $n=57$; *mbc-spg:* $hsFLP;;FRT82-mbc^{D11.2}-spg^{242}/FRT82-mbc^{D11.2}-spg^{242}$, $n=54$; *cort-mbc-spg:* $hsFLP;;FRT82-cort^{M7}-mbc^{D11.2}-spg^{242}/FRT82-cort^{M7}-mbc^{D11.2}-spg^{242}$, $n=41$.

3.4.2. A *cort-mbc-spg* hármas mutáns kombináció λ -PVR-szuppresszálo hatásának vizsgálata

A három génról korábban kimutattuk, hogy elemei a PVR és az aktin sejtvez közötti jelátviteli útnak. Érdemesnek tnt megvizsgálni, vajon mindhárom gén működésének kiiktatása képes-e teljesen gátolni ezt a folyamatot. A *mbc^{D11.2}-spg²⁴²* kettős mutáns esetében alkalmazott λ -PVR-fenotípus szuppressziós kísérletet azonban technikailag nem tudtuk kivitelezni. Nem találtunk ugyanis az elemzéshez szükséges nagyméretű mutáns follikuláris sejtklónokat. Ennek oka bizonyára az, hogy a hármas mutáció gátló hatással van a sejtek életképességére. Emiatt a mutáns follikuláris sejtcsoportok lassan nőnek, vagy alig osztódnak, ezért nem alakulnak ki a kísérlet végrehajtásához szükséges, nagyszámú sejtálló mutáns klónok.

3.5. A *mal-d*

3.5.1. Az EPg37532 inszerció torzult szCERfenotípust okoz

Az EPg elemre alapozott genetikai szírés során megvizsgáltuk az egyes vonalak homozigóta fenotípusát. Az EPg37532 mutáció hatására a legyeken torzult szCERöket figyelhetünk meg. Az elsCERsorban a tor dorzális felszínén található legnagyobb szCERökre nem a vad típusú hosszú, egyenes alak jellemzCÉ, hanem a szCERszálak megtörtek, elágazóak, a kelleténél rövidebbek (26. ábra).

Ezt a fenotípust egyes aktinváz-szabályozó gének (pl. *profilin*, *twinfilin*) mutánsai esetében már leírták (Verheyen és Cooley, 1994; Wahlström és mtsai, 2001). A fenotípus vélhetCÉ oka az, hogy a szCERszálak vázának kialakulásához nagyszámú aktinköteg szabályozott, párhuzamos elrendezésére van szükség. Ha az aktinváz átrendezCÉdésének szabályozása nem megfelelCÉ, a vázat alkotó aktinkötegek rendezetlenül épülnek föl. Ennek eredménye a szCERszálak torz alakja, rövideége.

A fenotípus hasonlósága azt sugallta, hogy az EPg37532 elem egy olyan gén mutációját okozhatja, amely szerepet játszik aktinváz átrendezési folyamatok szabályozásában, így szerepe lehet a határsejtvándorlásban is.

26. ábra Az EPg37532 homozigóta legyeken megfigyelhetCÉ szCERtorzulások. A tor dorzális felszínén található nagy szCERszálak elágazóak, rövidebbek (nyíl). Összehasonlításként egy normális szerkezeti szCERszálat is kiemeltünk (nyílhegy). A légy torának anteriorális része a kép bal oldalán található.

3.5.2 Az EPg37532 elem a *mal-d* gén elsCÉ intronjában található

A EP elem segítségével végrehajtott plazmidmenekítéssel kinyert genomikus DNS szekvenálása azt mutatta, hogy az EPg37532 elem a CG32296 föltételezett gén elsCE intronjába épült be (27. ábra).

27. ábra A *mal-d* genetikai lókuszt vázlatos térképe. Az EPg37532 elem a gén elsCE intronjában található. Az elsCE intron több, mint 35 kilobázis hosszúságú. Az EPg37532 kiugrasztásával hoztuk létre a $\Delta 6$ és $\Delta 7$ jelű deléciókat. A mérték egy kilobázist jelez.

3.5.3. Áttekintés: a MAL fehérjék működése és szerkezete

A CG32296 föltételezett terméke az emlCEsökben leírt MAL (MRTF-A/MKL1/MAL16/MRTF-B/MKL2), ill. Myocardin fehérjék (Mercher és mtsai, 2001; Wang és mtsai, 2001; Miralles és mtsai, 2003; Selvaraj és mtsai, 2003; Cen és mtsai, 2003) egyetlen *Drosophila*-homológja. Ezért a CG32296 *Drosophila* gént a továbbiakban *mal-d*-nek nevezzük. A MAL család fehérjéi kölcsönhatásba léphetnek az SRF (Serum Response Factor) nevű transzkripciós faktorról, így részt vehetnek egyes gének átíródásának szabályozásában (Wang és mtsai, 2001; Miralles és mtsai, 2003; Selvaraj és mtsai, 2003; Cen és mtsai, 2003).

Az SRF transzkripciós faktor olyan gének átíródását képes szabályozni, melyeknek promóter régiójában egy jellegzetes bázissorrendű (CC(A/T)₆GG) DNS-motívum, az úgynevezett SRE elem (Serum Response Element) található (áttekintve: Arsenian és mtsai, 1998; Chai és Tarnawski, 2002). Az aktivált gének több csoportba sorolhatók. Egyik csoport a úgynevezett korai gének (ezek a szérumkezeléstCEl számított percekben belül megemelkedett transzkripciós szintet mutatnak, pl.: *c-fos*, *fosB*, *egr-1*, stb.). További csoportokat képeznek az izomspecifikus gének (α -actin, α -miozin, izom-kreatin-kináz, stb.), és az idegrendszerben működCE gének (*nurr1*, *nurr77*, stb.). Az SRF komplexeket képezhet más transzkripciós szabályozó-fehérjékkel, amely kölcsönhatás pontosabban kijelöli az SRF célgénjeinek csoportját. Ilyen, az SRF működését befolyásoló transzkripciós kofaktor a MAL fehérje is.

A MAL fehérje SRF-re gyakorolt serkentő hatást először a Myocardin (Wang és mtsai, 2001), majd több más MAL-izoforma esetében (Wang és mtsai, 2002) igazolták. A MAL az SRF-fel komplexet alkot, amely kötni tudja az SRE DNS-szekvenciát. A MAL funkcióját fibroblasztokban vizsgálva (Miralles és mtsai, 2003) kimutatták, hogy a fehérje elsősorban a citoplazmában található, de a sejtek sérülés után áthelyeződik a sejtmagba. A MAL nukleáris áthelyeződésére pozitív hatással volt a Rho kis GTP-áz. A Rho aktiváló hatása egyrészt közvetlenül, másrészt az általa szabályozott egyes aktin polimerizációs fehérjéken keresztül (mDia1, profilin, stb.) valósult meg.

Az említett tényezők mellett a MAL sejtmagba történő belépését és transzkripciós aktivitását a sejtekben lezajló aktin polimerizáció is serkentette. Kimutatták továbbá, hogy a MAL képes a monomeres G-aktin kötésére (Miralles és mtsai, 2003).

Mindezek a megfigyelések valószínűsítik azt a modellt, miszerint a MAL fehérje a sejt aktinegyensúlyát érzékelő rendszer részeként működik. Szerepe az, hogy az aktinvázat érintő változások (fokozott aktin polimerizáció, vagy depolimerizáció) hatására a sejtmagban egyes SRF-függő gének transzkripciós szabályozását módosítsa.

A MAL fehérje szabályozására két alapvető modellt javasolnak (Miralles és mtsai, 2003): az egyik változat szerint a G-aktin kötődik a MAL-hoz, megakadályozza annak sejtmagba jutását és transzkripciós aktivitását. A fokozott aktin polimerizáció elvonja az aktin monomereket, szabaddá téve a MAL fehérjét, mely így már képes belépni a sejtmagba és az SRF-hez kötődve kiváltja a célgének fokozott átíródását. Elképzelhető azonban az is, hogy a megnövekedett aktin polimerizáció valamilyen aktív szabályozás révén váltja ki a MAL sejtmagba jutását. Ilyen helyzetben pl. egy speciális aktin-szubpopuláció, vagy egy aktint is tartalmazó komplex halmozódik föl, amely képes a MAL sejtmagba szállítását kiváltani.

Csonkolt fehérjeformák segítségével sikerült térképezni az egyes konzervált fehérjedomének szerepét az említett MAL fehérjében (Miralles és mtsai, 2003). Az N-terminális végen található MKL-homológia domén (MHD) a G-aktin kötésért és a Rho-tól függő szabályozott sejtmagba jutásért felelős. Az SRF-kölcsönhatásban a bázikus és a glutamingazdag (B és Q) domének játszanak szerepet. A DNS kötése az SAP domén, a dimerképzés közvetítése a leucin-zipper (LZ) feladata. A transzkripciós

aktivitás pedig a C-terminális részhez köthet (28. ábra). A *Drosophila* MAL-D fehérje aminosav szekvenciájának elemzése kimutatta ugyanezen doméneknek a jelenlétét.

28. ábra A MAL-D fehérje doménszerkezete. MHD: MKL-homológia domén; B: bázikus domén; Q: glutamin-gazdag domén; SAP; SAP-(DNS-kötés) domén; LZ: dimerizációs domén. A mérték 200 aminosavat jelez.

A *Drosophila mal-d* gén feltételezhető interakciós partnere, az *SRF* (vagy *blistered*, illetve *pruned*) (Affolter és mtsai, 1994; Montagne és mtsai, 1996) életfontosságú gén, több mutáns allélja ismert. A homozigóta *SRF*-mutánsokra jellemző, hogy a későbbi embrionális fejlődési szakaszban a tracheák alapvetően szabályosak, de végső elágazódásaik nem alakulnak ki, vagy igen rövidek (Affolter és mtsai, 1994). Ezenkívül a szárnyakon kisebb-nagyobb hólyagok alakulnak ki, a szárnyvénák lefutása szabálytalan, néhol a vénák hiányozhatnak (Montagne és mtsai, 1996).

3.5.4. A *mal-d* gén deléciós mutánsainak létrehozása

Az EPg37532 elem a *mal-d* első intronjában, az első exonhoz közeli pozícióban található. A homozigóta EPg37532 legyek a korábban leírt szertorzulásokat mutatják a tor dorzális oldalán, de egyéb fenotípust ezeken az állatokon nem találtunk. Ezek a mutáns legyek normális életképességűek, a határsejtvándorlásban sem tapasztaltunk rendellenességeket.

Elképzelhető azonban, hogy az EPg37532 a *mal-d* génnek csak egy gyenge allélja. Ezért új, deléciós allélok létrehozását határoztuk el, melyben az EPg37532 elem kiugrasztásával imprecíz kivágódásokat próbáltunk elállítani.

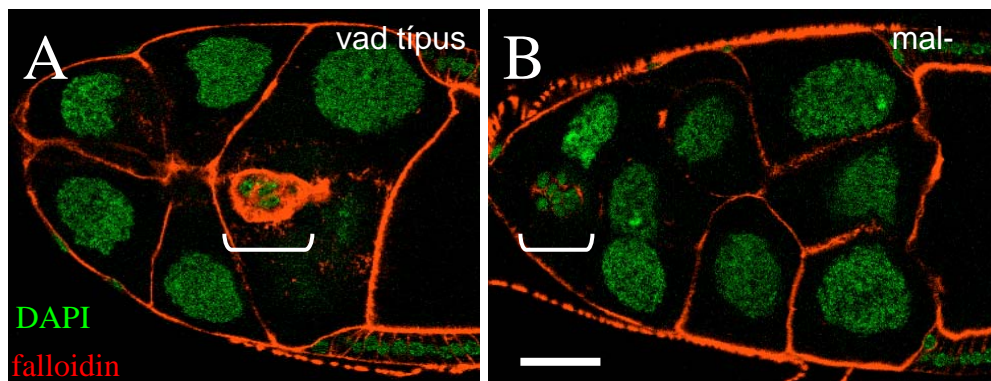
A létrehozott 107 kiugrasztásos törzs többsége, 104 vonal homozigóta életképes volt, ezeken a legyeken semmilyen fenotípusos elváltozást nem tapasztaltunk. Ez az eredmény igazolta, hogy az EPg37532 homozigóta legyeknél észlelt szertorzulást valóban az EP beépülés okozta.

A fennmaradó 3 törzs homozigóta egyedein az EPg37532 esetén megfigyelhető szertorzulást észleltük. A különböző vonalak a fenotípust egymáshoz, illetve az EPg37532 vonalhoz keresztezve is mutatták, jelezve, hogy egyazon gén különböző alléljait izoláltuk. Az új deléciós törzsek ($\Delta 3$, $\Delta 6$, $\Delta 7$) genomikus DNS-én végrehajtott PCR-reakciókkal és a fölszaporított PCR-termékek szekvenálásával próbáltuk betérképezni a deléciók töréspontjait. A $\Delta 3$ deléció esetén nem tudtunk PCR-terméket létrehozni. A két másik esetben a *mal-d* gént érintő deléciót találtunk. A $\Delta 6$ (866 bázispárnyi deléció) és $\Delta 7$ (1323 bázispárnyi deléció) deléciók közül (27. ábra) a $\Delta 7$ -et választottuk ki a további elemzések céljára, mivel ez a mutáció távolított el nagyobb szakaszt a *mal-d* géntől és a $\Delta 7$ töréspontja volt távolabb az 5' irányban szomszédos CG1240 géntől.

A $\Delta 7$ mutáció a transzkripció starthelyéhez viszonyított -257 és +1066 bázisok közötti szakaszt távolítja el, mely a teljes első exont is tartalmazza (27. ábra).

3.5.5. A *mal-d* ^{$\Delta 7$} homozigóta mutáns legyek fenotípusa

A *mal-d* ^{$\Delta 7$} homozigóta mutáns állatok életképesek. Az EPg37532 legyek esetén említett szertorzulási fenotípus a *mal-d* ^{$\Delta 7$} esetén még fokozottabb, mivel a tor nagyobb részén, esetenként még a fejen is találunk ilyen szeröket, amelyek rendellenes alakja is kifejezettebb.



29. ábra A *mal-d* gén mutációja csökkenti a határsejtek F-aktin szintjét és késlelteti vándorlásukat. A vad típusú petekamra határsejtjei (A, kapocs) a vándorlás során erőteljes aktinkérget képeznek. A *mal-d* ^{$\Delta 7$} mutáns határsejtek (B, kapocs) F-aktinkérge ezzel szemben vékony, alig látható, és vándorlásuk is jelentősen lelassul. A két konfokális mikroszkópos felvétel azonos

beállításokkal készült. A petekamrák anteriorális része a képek bal oldalán található. A mérték 20 mikrométert jelez.

A *mal-d^{Δ7}* homozigóta nőstények, bár petéket raknak, azok mindig teljesen életképtelenek. A mutáns nőstények petekamráiban alacsony az F-aktin mennyisége. A vad típusú határsejtek vándorlásuk során erőteljes aktinkérget halmoznak föl sejtmembránjuknál, ez kéreg a a mutáns esetében elvékonyodik, alig megfigyelhető (29. ábra).

A határsejtek vándorlása lelassul és egyik vizsgált esetben sem fejeződik be a 10. stádium végéig. A mutáns fenotípust (szertorzulás, életképesség csökkenése, határsejtvándorlási hibák) a *mal-d* cDNS tubulin-promóterrel történt egyenletes kifejezése menekítette, ami igazolja, hogy fenotípust valóban a *mal-d* gén mutációja okozta.

3.5.6. A MAL-D fehérje nem mutatható ki a *mal-d^{Δ7}* homozigóta mutáns legyek petefészkeiben

A MAL-D fehérje ellen készített ellenanyagot felhasználva Western blot segítségével vizsgáltuk a vad típusú, *mal-d^{Δ7}*, és MAL-D fehérjét túltermelő petefészkekből készített fehérje-kivonatokat. A vad típusú mintában talált (és a túltermelő petefészkekben sokszorosára erősödő) specifikus sáv a $\Delta 7$ mutáns esetében hiányzik (30. ábra). Ez azt mutatja, hogy a MAL-D fehérje szintje a petekamrákban jelentősen, közel a nullára lecsökkent.

30. ábra A *mal-d^{Δ7}* mutáns petefészkekben Western blot elemzéssel nem mutatható ki a MAL-D fehérje. A 200 kilodalton méretű MAL-D fehérje eltűnik a mutáns ováriumokból és

mennyisége erősen megnövekszik a MAL-D fehérjét túlermelő petekamrákban. *Vad típus:* w¹¹¹⁸; *mal-d:* mal-d^{Δ7} / mal-d^{Δ7}; *UAS-mal-d:* slboGal4 / UAS-mal-d.

3.5.7. A MAL-D fehérje kimutatható a határsejtekben a vándorlás alatt

A MAL-D ellenanyagfestés a petekamrákban kizárólag a határsejtekben mutatott specifikus jelet. Ezekben a sejtekben a MAL-D festődést a sejtmagokban találtuk. A határsejtek csak a 9. stádiumban, a vándorlás alatt mutattak pozitív festődést. A határsejtcsoportok kb. felében észleltük a sejtmagi jel jelenlétét, ezekben a csoportokban néhány határsejt volt pozitív, a többi sejt sejtmagja nem mutatott festődést. A *mal-d^{Δ7}* homozigóta mutáns legyek petekamrájában a határsejtek festődését nem tudtuk kimutatni.

A MAL-D transzkripció aktivációjának előfeltétele a sejtmagi jelenlét, ezért a petekamrában tapasztalt festődés azt sugallja, a MAL-D fehérje a határsejtekben mutathatja a legmagasabb transzkripció aktivitást.

3.5.8. A mal-d^{Δ7} mutáns mozaikos petekamrák elemzése

A homozigóta *mal-d^{Δ7}* legyek petefészkeinek vizsgálata során észlelt határsejtvándorlási rendellenességek vonatkozásában kérdéses volt, hogy a vándorló sejtekben magukban, vagy a velük szorosan együttműködő dajkasejtekben van-e szükség a MAL-D fehérjére, vagy esetleg mindkét sejt típusban.

Hogy részletesebben megvizsgálhassuk ezt a kérdést, a FLP-FRT rendszer segítségével mutáns klónokat hoztunk létre a petekamrákban. A mutáns follikuláris sejtcsoportokon nem tapasztaltunk fejlődési, növekedési rendellenességeket, szabályos alakú sejtekből álló, nagy kiterjedési klónokat találtunk. A bazális F-aktin mennyisége azonban ezekben a sejtekben határozottan alacsonyabb a vad típushoz képest. Ez a fenotípus sejt-autonóm módon nyilvánul meg, kizárólag a mutáns sejtekben észlelhető (31. ábra). A sejtek laterális aktinkérge szintén elvékonyodik.

31. ábra A petefészkek *mal-d* mutáns folliculáris sejtklónjaiban erősen lecsökkent F-aktinszintet találunk. A GFP-jel nélküli sejtek a mutánsok. Az F-aktint a falloidin-festés mutatja. Genotípus: hsFLP;; FRT80-*mal-d*^{Δ7} / FRT80-GFP. A petekamra anteriorális része a képek bal oldalán található. A mérték 20 mikrométert jelez.

A sejt vándorlásban késése is sejt autonóm, az ivarsejtek mutációja nem befolyásolja, késést csak akkor figyelhetünk meg, ha maguk a határsejtek mutánsok.

A részlegesen mutáns, de vándorolni képes határsejtcsoportokban mindig az F-aktinban gazdag, vad típusú sejtek helyezkednek el poszteriorális, vagyis a vándorlás irányának megfelelő oldalán, maguk után húzva a vékonyabb F-aktin kéreget fölhalmozó mutáns sejteket (32. ábra).

32. ábra A *mal-d* mutáns határsejtek a vándorló sejtcsoport hátsó részén találhatóak. A GFP-jel nélküli sejtek a mutánsok. Az F-aktint a falloidin-festés mutatja. Genotípus: hsFLP;; FRT80-*mal-d*^{Δ7}/FRT80-GFP. A vándorlás irányát nyíl mutatja. A mérték 10 mikrométert jelez.

3.5.9. A *blistered* gén mutációja a *mal-d*-hez részben hasonló fenotípusokat okoz

Az emlősökön szerzett ismeretek alapján feltételezhető, hogy a MAL-D fehérje az SRF fehérjével együttműködve fejt ki hatását. Megvizsgáltuk tehát a *blistered* (*Drosophila* SRF-homológ) mutánsban (*bs*¹⁴) a *mal-d*^{Δ7} esetén tapasztalt fenotípusokat és nagyfokú hasonlóságokat találtunk. A létfontosságú *blistered* gén mutáns klónjaiban a *mal-d*^{Δ7}-hez hasonlóan torzult szőröket figyelhetünk meg a torz dorzális felszínén. A petekamrákat megvizsgálva a *bs*¹⁴ homozigóta mutáns folliculáris

sejtekben a bazális F-aktin mennyiségének csökkenését észleljük. A határsejtvándorlás a *mal-d^{A7}* esetén tapasztalt mértéki késéseket mutat (34. ábra).

A jelentős hasonlóságok ellenére a két gén fenotípusában különbség is tapasztalható. A *bs¹⁴* mutáció a szárnyakon nagymértéki hólyagosodást okoz. Ezt a jelenséget nem tapasztaljuk a *mal-d^{A7}* esetében.

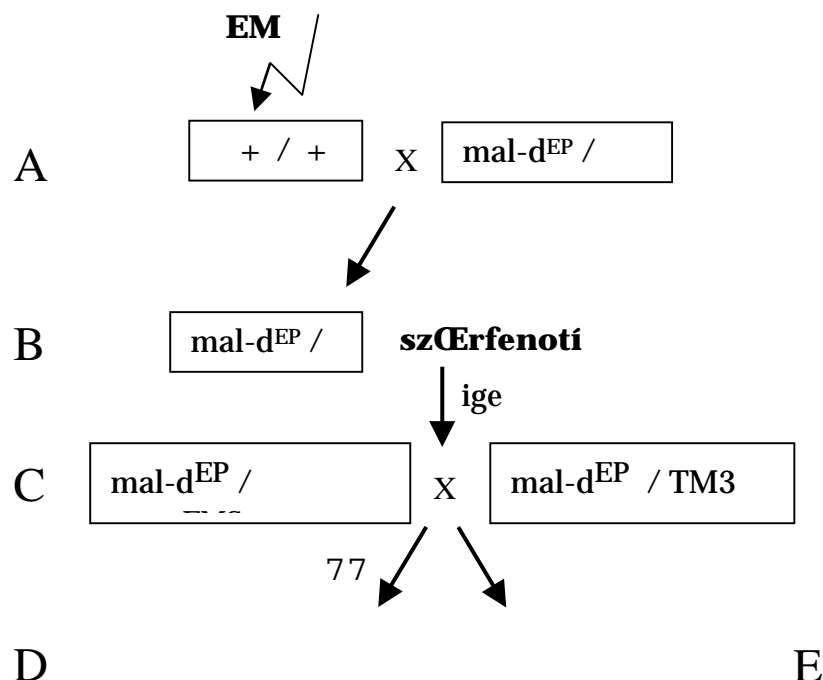
3.5.10. Pontmutációk létrehozása a *mal-d* génben

A *mal-d^{A7}* mutáns vizsgálata nem adott megnyugtató választ arra a kérdésre, hogy ez az allél valóban teljes mértékben alkalmas-e a *mal-d* gén funkcióvesztéses elemzésére.

Ugyan a *mal-d^{A7}* mutáció a petefészkeken végrehajtott Western blot alapján null allélnak mutatkozik, de a legyekből készült fehérjekivonatok Western blot elemzése nem adott hasonlóan egyértelmű eredményt, így nem tudhattuk, hogy a *mal-d^{A7}* homozigóta mutáns legyek többi szövetében nincs-e jelen a MAL-D fehérje.

A kérdés genetikai vizsgálatokkal történő eldöntését nehezítette, hogy nem áll rendelkezésre a *mal-d* gént érintő deficiencia, melyhez a *mal-d^{A7}* mutánst keresztezve elemezhetjük volna a fenotípus változásait.

A *mal-d^{A7}* mutáció eltávolítja a *mal-d* gén első exonját. Ez a deléción azonban nem érinti a jóval távolabb, több, mint 35 kilobázisnyi távolságra található második exont. A második exontól kezdve indul a gén fehérjekódoló szakasza. Fönnállt a lehetőség, hogy létezhetnek az első exont nem érintő, alternatív transzkripciós termékek, melyekből MAL-D fehérje termelődhet. Ebben az esetben a *mal-d^{A7}* mutáns csak egy hipomorf allélnak tekinthető.



mal-d^{EP} /

mal-d^{EMS} /

33. ábra A *mal-d* gén EMS mutagenézisének vázlata. A vad típusú hím legyeket EMS-sel kezeltük, majd az EPg37532 heterozigóta nCestényekhez kereszteztük (A). Az F1 generáció legyei között torzult szCERfenotípusú állatokat kerestünk (B) és ezeket újra kereszteztük az EPg37532 legyekhez (C). Az F2 generáció megfelelőCE genotípusú utódaiban a szCERfenotípust újra leellenCERítettük (D), illetve az új *mal-d* mutánsokból törzseket alapítottunk (E).

ErCesebb allélok izolálását remélve EMS-mutagenézist végeztünk új *mal-d* mutánsok elCállítására (33. ábra). A kísérletben 5 új mutánst azonosítottunk. Ezek nem komplementálják a $\Delta 7$ mutáns allél szCERfenotípusát, homozigóta és transz-heterozigóta állapotban letálisok. A letalitást a tubulin promóter vezérelte *mal-d* transzgén menekítette. Mindez igazolta, hogy az új allélok valóban a *mal-d* gén mutánsai, illetve, hogy a *mal-d* a *Drosophila* SRF-hez hasonlóan életfontosságú gén. Ez egyben azt is mutatta, hogy az életképes $\Delta 7$ mutáció valójában hipomorf allél, gyengébb, mint az új EMS-allélok.

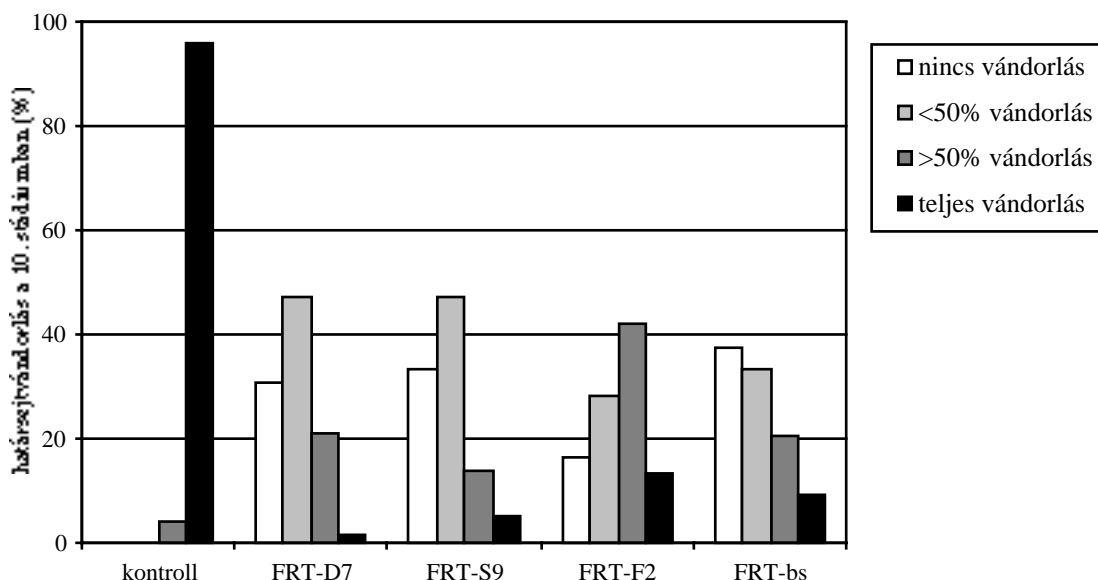
Az új EMS-indukált *mal-d* allélok szekvenciáját meghatároztuk, négy esetben pontosan megállapítható volt a mutáció elhelyezkedése. Az ötödik allél szekvenciájában nem találtunk eltérést a vad típushoz képest. Mivel a szekvencia elemzését a *mal-d* gén exonjaira korlátoztuk, elképzelhetCE, hogy ez esetben egy, valamelyik intront érintCE mutáció van jelen. Az F2 allél esetén a gén fehérjekódoló szakaszának C-terminális oldali végénél a leolvasási keret eltolódik, míg a másik 3 esetben (S2, S5, ill. S9) a mutáció stop kodont hoz létre a fehérje kódoló szakasz közepén (33. ábra).

33. ábra Az új *mal-d* pontmutációk. A három nonszensz mutáció vagyis az S9, S2, ill. S5 (L659st, Q675st, ill. Q736st) az SAP domént követően található, míg az F2 kereteltolódásos mutáció (A1364fs) a C-terminális vég elCett.

3.5.11. Az EMS-allélek fenotípusának elemzése

Az S2, S5, és S9 allélok embrionális, illetve korai lárva letalitást okoznak, a homozigóta egyedek egyike sem éri el a második lárva fejlÉdési stádiumot. Az F2 homozigóta mutáns állatok döntCeen az elsCE és második lárva fejlÉdési stádiumban pusztulnak el, mintegy 10%-uk eljut a harmadik lárva stádiumig. A báb állapotot egyik allél homozigóta mutáns egyedei sem érik el.

A mutáns klónokban észlelt szCertoerzések a $\Delta 7$ allélhoz hasonló mértékben jelentkeznek. A mozaikos petekamrák mutáns határsejtcsoportjainak vándorlása (34. ábra) azt mutatja, hogy az S5, és S9 allélok a $\Delta 7$ allélhoz, illetve a *blistered*¹⁴ mutánshoz hasonló erCességi határsejtvándorlási fenotípust okoznak



34. ábra A különböző *mal-d* allélok és a *blistered*¹⁴ mutáció hatása a határsejtvándorlásra. Vad típus: w¹¹¹⁸, n=50; *FRT-D7*: hsFLP;;*FRT80-mal-d*^{Δ7}/*FRT80-mal-d*^{Δ7},

n=72; *FRT-S9*: hsFLP;;FRT80-mal-d^{S9}/FRT80-mal-d^{S9}, n=57; *FRT-F2*: hsFLP;;FRT80-mal-d^{F2}/FRT80-mal-d^{F2}, n=74; *FRT-bs*: hsFLP;FRT42-bs¹⁴/FRT42-bs¹⁴, n=78.

3.5.12. A *mal-d* fokozott működésének hatásai

A petekamrákon végzett MAL-D ellenanyagfestés nem nyújtott értékelhető információt a fehérje lokalizációjáról. A kapott citoplazmatikus jel aspecifikus volt (mutáns petekamrákban is megtaláltuk). Esetenként észleltünk sejtmagi festést a vándorló határsejtek magjaiban. További kísérleteket igényel annak eldöntése, hogy ez a jel specifikus-e.

Az említett sejttenyészetekben végzett kísérletek (Miralles és mtsai, 2003) alapján úgy tűnik, hogy a MAL N-terminális részén csonkolt változata, amelyből hiányzik az aktinkötésért és a Rho szabályozottságért felelős MKL-homológia domén, minden szabályozás nélkül is nagy mennyiségben bejut a sejtmagba és ott az SRF transzkripciós aktivitását jelentős mértékben serkenti, vagyis domináns aktiváltként működik.

Elkészítettük a *Drosophila* MAL fehérje hasonló változatát (MAL-D-ΔN) és megvizsgáltuk, hogy expressziója milyen hatást vált ki a petekamrák sejtjeiben. Ha a MAL-D vad típusú változatát termeltetjük túl, a fehérje ellen készített ellenanyag erősen, de szinte kizárólagosan a citoplazmában észlelhető jelet ad. Az ellenanyagfestés igazolja, hogy a MAL-D ellenanyag képes fölismerni a fehérjét szövetekben is. A túltermelő sejtek bazális F-aktinkötegei a vad típusú sejtekénél sűrűbb lefutásúak (35. ábra).

35. ábra A MAL-D túltermeltetése a folliculáris sejtekben. A túltermeltetett MAL-D (zöld) elsősorban a citoplazmában halmozódik föl, a sejtmagokban (ld. DAPI, kék) nem tapasztalunk

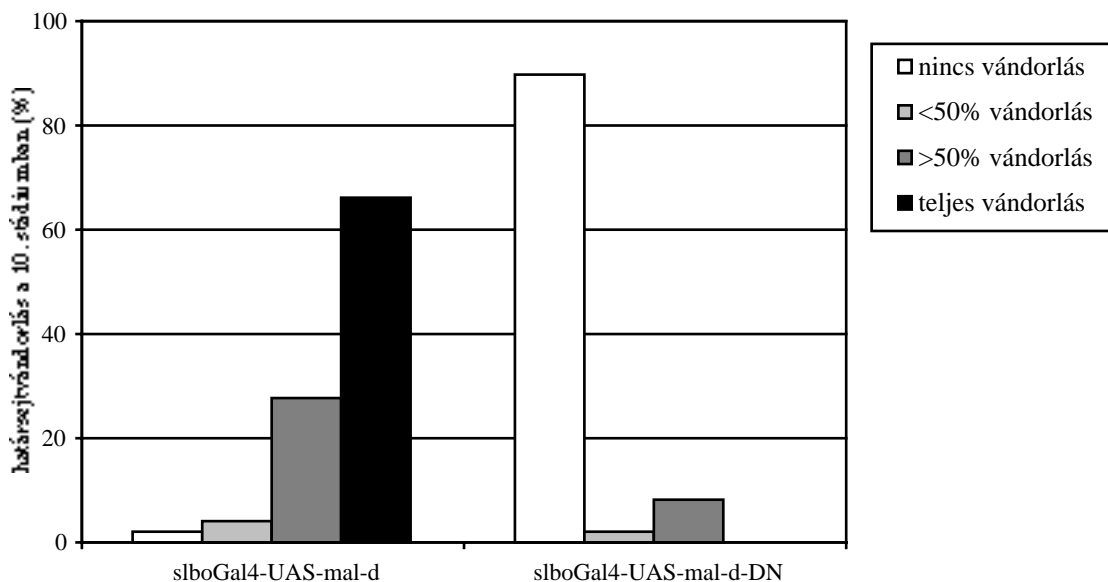
erősebb festést. Ezekben a sejtekben az aktinkötegek (piros) sűrűbbé válnak. A mérték 10 mikrométert jelez. Genotípus: hsFLP / AFG-Gal4; UAS-mal-d / UAS-GFP.

A MAL-D- Δ N túltermeltetése esetén erősebb sejtmagi MAL-D festést tapasztalunk és ezekben a sejtekben fokozott aktin fölhalmozódást figyelhetünk meg (36. ábra). Az aktin változása jelentősebb mértékű annál, mint amit a vad típusú MAL-D túltermeltetése esetén tapasztalunk. A MAL-D-t túltermelő sejtekben az F-aktin fölhalmozódása elsősorban a sejtek bazális felszínére korlátozódik. De ebben az esetben is a megnövekedett számú aktinköteg szabályosan, egymással párhuzamosan helyezkedik el. Ez azt jelzi, hogy az aktinszálak fölépülése ugyan intenzívebb a normálisnál, de még megfelelően szabályozott.

36. ábra A MAL-D- Δ N túltermeltetése a folliculáris sejtekben. A túltermeltetett MAL-D- Δ N (zöld) sejtmagi fölhalmozódást mutat (ld. DAPI DNS-festés, kék; szemléletes példák nyilakkal kiemelve), az érintett sejtek nagy mennyiségű F-aktint halmoznak föl (piros). A MAL-D-túltermelő sejteket folyamatos vonallal kijelöltük. Az alsó sorban ugyanazon petekamra egy kinagyított részlete látható. Genotípus: slboGAL4 / UAS-mal-d Δ N. Az anterior a kép bal oldalán található. A mértékek 20 mikrométert jeleznek.

Ezzel szemben a MAL-D- Δ N túltermeltetése a sejt apikális, laterális és bazális oldalán is F-aktin-fölhalmozódást vált ki. Ennek az aktinkéregnek a kialakulása nem mutat szabályosságot. A bazális felszín közelében nem párhuzamosan, hanem rendszertelenül helyezkednek el az aktinszálak. Vélhetően az aktin sejtvez torzulásának következménye az is, hogy a sejtek alakja szabálytalanná válik. Hosszabb ideji erős MAL-D- Δ N túltermeltetés a sejtek pusztulását okozza, hasonlóan a λ -PVR korábban leírt hatásához.

A vad típusú MAL-D túltermeltetése a határsejtekben megzavarja a sejtcsoport mozgását, de 66%-uk képes a teljes vándorlásra. Ezzel szemben a MAL-D- Δ N transzgén hatására a határsejtek mozgása elakad, az esetek 90 %-ában ezek el sem hagyják a petekamra anteriorális csúcsát (37. ábra).



37. ábra A MAL-D fehérje vad típusú és aktivált formájának túltermeltetése által okozott határsejtvándorlási fenotípus. *slboGal4-UAS-mal-d*: *slboGal4/+; UAS-mal-d/+*, n=101; *slboGal4-UAS-mal-d- Δ N*: *slboGal4/+; UAS-mal-d- Δ N/+*, n=50.

A két fehérjeváltozat túltermeltetésének hatásainak összehasonlítása arra utal, hogy a MAL-D fehérje sejtmagba jutása szabályozott folyamat, ami nem elsősorban a fehérje mennyiségétől függ. Hiába van a vad típusú forma nagy mennyiségben jelen a

a sejtek citoplazmájában, nem okoz olyan mértékű hatásokat, mint a sejtmagba szabályozás nélkül bejutni képes domináns aktivált forma.

3.5.13. A *mal-d* mutációja nem befolyásolja a sejtek G-aktin-szintjét

Mint láthattuk, a *mal-d*^{Δ7} mutáció jelentős hatással van a petekamra folliculáris sejtjeinek F-aktin-szintjére. Ez a hatás alapvetően két módon alakulhat ki. A *mal-d* gén serkentő hatással lehet az aktin polimerizációjára, mutációja ezért csökkenti az F-aktin mennyiségét. A másik lehetőség szerint a *mal-d* gén pozitívan befolyásolja a sejtek aktintermelését, mutációja lecsökkenti a sejtekben levő aktin fehérje mennyiségét és így megakadályozza a megfelelő mértékű aktin polimerizációt.

A kérdés vizsgálatára *mal-d*^{Δ7} mutáns folliculáris sejt klónokat hoztunk létre és azokat megfestettük anti-aktin ellenanyaggal. Az immunofestés nem mutatott különbséget a vad típusú és a mutáns sejtek aktinszintje között a citoplazmában (38. ábra). Nem tudtunk különbséget kimutatni a vad típusú, illetve a MAL-D fehérjét túltermelő sejtek citoplazmai aktinszintjében sem.

Mindezt alátámasztja, hogy a Δ7 homozigóta mutáns, a vad típusú és a MAL-D fehérjét túltermelő petekamrák Western blot analízise sem mutatott különbséget az aktin fehérje szintjében.

38. ábra A *mal-d^{Δ7}* mutáció nem okoz változást a folliculáris sejtek G-aktin szintjében. A *mal-d^{Δ7}* mutáns (GFP-jel nélküli) folliculáris sejtekben nem tapasztalunk eltérést a citoplazmában észlelt aktin festés tekintetében, összehasonlítva a vad típusú (GFP pozitív) folliculáris sejtekkel. Genotípus: *hsFLP;;FRT80-mal-d^{Δ7}/FRT80-mal-d^{Δ7}*. Jelölések: *fs*: folliculáris sejtek; *ps*: petesejt. A mérték 20 mikrométert jelez.

Ezek a kísérleti eredmények azt sugallják, hogy a *mal-d* génnek az aktin sejtváza kifejtett hatása nem az aktin fehérje mennyiségének szabályozásában, inkább az aktin polimerizáció szabályozásának szintjén jelentkezik.

4. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

4.1. A *slbo*¹³¹⁰/*slbo*¹³¹⁰ mutáció fenotípusát szuppresszálo gének azonosítása

A transzpozonnal végrehajtott mutagenézis és a Gal4-UAS rendszer elCenyait egyesítCE EP elemet (Rørth, 1996) használta elCeször. A mi laboratóriumunkban 1510 harmadik kromoszómás EP beépülést vizsgáltunk meg, hogy segítségével a határsejtvándorlásban szerepet játszó géneket azonosítsunk. Azokat a törzseket választottuk ki, amelyek a súlyos vándorlási rendellenességeket okozó *slbo*¹³¹⁰/*slbo*¹³¹⁰ mutáció fenotípusát enyhítették, ha az EP elem által érintett gén transzkripcióját a határsejtekben fokozott mértékben megnöveltük (Rørth és mtsai, 1998). Ez a módszer működCEképesnek bizonyult, fölhasználásával több, a határsejtek vándorlásának szabályozásában szerepet játszó gént sikerült azonosítanunk.

Az általunk alkalmazott eljárás gondos elemzést kívánt meg, mivel az esetek többségében a szuppresszor hatás meglehetCesen gyenge volt, amit csak megemelt mintamérettel és többszöri ismétléssel lehetett bizonyítottnak tekinteni. A csekély fenotípus változás miatt minden bizonnyal több olyan gént is azonosítottunk, amelyekben a szuppresszió inkább a genetikai háttérnek tulajdonítható, és nem az EP elemmel szomszédos gén túlmiködésének a következménye. Alapos vizsgálat nélkül azonban az azonosított gének egyikét sem zárhatjuk ki, hogy szerepe lehet a határsejtvándorlásban.

Az egyes gének funkcióját vagy a korábban végzett vizsgálatok eredményei alapján tudhatjuk, vagy a gén más génekhez mutatott homológiájára építve föltételezhetjük. Ezekre az ismeretekre alapozva megállapítható, hogy az EP-szirésben azonosított 50 gén 10%-a (5 gén) aktinkötCE fehérjét kódol. A sejtvándorlás és az aktin sejtvez átrendezésének szabályozása közötti kapcsolat nagy fontosságú, ezért ezeknek a géneknek a megismerése segítheti a határsejtvándorlási folyamat alaposabb föltárását.

Szintén fontos szerepe lehet a szírésben azonosított gének 16%-t kitevCE transzkripciósfaktort kódoló géneknek. Ezeknek a géneknek a részletes vizsgálata a határsejtek vándorlásában a *mal-d*-t kivéve nem történt még meg, így csak föltételezéseink lehetnek, milyen esetleges funkciót tölthetnek be ebben a folyamatban. Több közülük, mint a *hairy*, vagy a *neuralized* az egyedfejlCEdési

folyamatokban az egyes sejttípusok specializálódását irányítják (Fisher és Caudy, 1998; Lai és Rubin, 2001), így elképzelhetCE, hogy a poláris sejtek, vagy a határsejtek kialakulásán keresztül fejtik ki hatásukat.

Azonosítottunk 5 olyan gént is, amelyek foszforilációra képes fehérjéket (kinázok, GEF fehérjék) kódolnak. Az ilyen fehérjék a jelátviteli utak fontos szereplCEi, ezért sokféle sejtbiológiai folyamatban is szerepet játszhatnak. Részletes vizsgálatuk kiderítheti, hogy kimutatható-e jelenlétük valamilyen, a határsejtvándorlásban lényeges jelátviteli folyamatban.

A szűrésben azonosított gének közül további elemzésre azokat választottuk ki, amelyek valószínűsíthetCEen szerepet játszanak az aktin sejtváaz átrendezCEésének szabályozásában. A kiválasztott gének egyike (*cortactin*) olyan fehérjét kódol, amely aktinkötésre képes, emellett az aktin polimerizációt serkentCE egyik jelátviteli útnak is eleme. A másik részletesen vizsgált gén (*myoblast city*) fehérjeterméke a Rac kis GTP-áz aktiválását végzi, ezen keresztül az aktin sejtváaz átrendezCEéseire gyakorol hatást. A harmadik elemzés alá vont gén (*mal-d*) transzkripciós fehérjét kódol és eredményeink szerint jelentCEs szerepet játszik az aktin sejtváaz szabályozásában.

4.2. A cortactin

Az egyik első szuppresszor gént, a *cortactin* azért választottuk ki további vizsgálatainkhoz, mert feltételeztük, hogy hatással lehet az aktin sejtváza átrendezésére a határsejtvándorlás során.

A Cortactin fehérjéről szerzett ismeretek kizárólag emlős sejtenyészetekben, vagy *in vitro* körülmények között végrehajtott kísérletekből származtak. Munkánkban a *cortactin* gén szerepét vizsgáló, élő szervezeteken végrehajtott kísérleteket írtunk le. Ezek során elsőként azonosítottunk a *cortactin* gént érintő mutációkat, mely lehetévé tette a gén szerepének funkcióvesztéses vizsgálatát.

4.2.1. A cortactin gén szerepe a határsejtvándorlásban

A Cortactin fehérje hiánya esetén a határsejtek vándorlása késik. A peteérés 9. szakaszában két jelentős sejtmozgás figyelhető meg: a folliculáris sejtréteg ráhúzódik az egyre növekvő petesejtre, azzal párhuzamosan a határsejtcsoport leválik a petekamra anteriorális végének csúcsáról, és a dajkasejtek között a petesejthez vándorol. Megfigyelésünk szerint a *cort^{M7}/cort^{M7}* mutáns petekamrákban a határsejtek elmozdulása késik a folliculáris sejtekhez képest. Mozaikos, vagyis mutáns és vad típusú sejteket egyben tartalmazó petekamrák segítségével megállapítottuk, hogy ezt a viszonylagos késést nem a folliculáris sejteknek a szokásosnál gyorsabb elmozdulása okozza, hanem a Cortactin fehérje hiánya a határsejtekben.

A két sejtcsoport mozgása alapvetően különbözik. A folliculáris sejtek petesejtre húzódnak, ahhoz szükséges erő a sejtek egyszerre bekövetkező alakváltozása biztosítja. A laposabb, kuboidális sejthalak oszlopossá módosul. Ezzel a folyamatos, egyenletes sejtkéreg átrendezéssel szemben a határsejtekben gyors sejthalak változás következik be: sejtnyúlványokat bocsátanak ki, majd a megfelelő irányban ezeket az egész sejt követi, a hátulsó sejtrészek visszahúzódnak. Mindez a dajkasejtek nyújtotta változatos formájú felszíni és nyomásbeli körülmények között megy végbe. Ez magyarázhatja azt a több más, az aktinváza átrendezésben szerepet játszó gén elemzésén alapuló megfigyelésünket, hogy a határsejtek sokkal érzékenyebbek a sejtváza érintő mutációkra, mint a folliculáris sejtek.

A *cort^{M7}/cort^{M7}* mutáns határsejtek a vándorlás kezdetén tapasztalható késés ellenére a 10. fejlődési stádiumig eléri a petesejtet. A mutáns petekamrák vizsgálata alapján valószínű, hogy a kezdeti késések oka a határsejtek elindulásának

akadályoztatása. Sok olyan 9. stádiumú petekamrát találtunk, ahol a határsejtek nem kezdték el időben a mozgásukat. A Cortactin fehérjéről kimutatták, hogy szerepet játszhat a lokális aktin polimerizáció kiváltásában, és a sejtnyúlványok képzésében (Bowden és mtsai, 1999). Ezzel összhangban van az a megfigyelésünk, hogy a fehérje túlermelletése esetén fokozott F-aktin- és sejtnyúlványképzés következik be a follikuláris sejtekben. A határsejtvándorlás elkezdéséhez szükség van az ún. "hosszú sejtnyúlványok" kibocsátására (Fulga és Rørth, 2002). Ezeknek a nyúlványoknak a gyakorisága azonban nem különbözik a vad típusú és *cortactin* mutáns petekamrákban (saját megfigyelés). Ezért ez nem lehet oka a határsejtvándorlás korai szakaszában tapasztalt késéseknek.

Más típusú sejtnyúlványok is képződnek a vándorló sejtekben, melyek jóval kisebbek a hosszú sejtnyúlványoknál. Ezek a rövid, fénymikroszkópos vizsgálattal csak nehezen megfigyelhető filopódiumok szintén jelentős szerepet játszhatnak a vándorlásban. A filopódiumok valószínűleg a környezet érzékelésében fontosak, segítségükkel érzékelik a vándorló sejtek a kemotaktikus grádienszt. A dajkasejtekkel is ezek segítségével veszik föl az első kapcsolatokat. Elképzelhető, hogy a Cortactin fehérje hiányában ezek a filopódiumok a szükségesnél kisebb számban, vagy lassabban alakulnak ki, ami hátráltatja a sejtmozgás megindulását. A kérdés kísérletes vizsgálata nehéz, több okból is. Ezeknek a sejtnyúlványoknak gyorsan változik az alakjuk, tulajdonságaikat élő állapotukban történő megfigyeléssel lehetne a legjobban vizsgálni. A határsejtek mozgásának mozgófilmre vétele azonban technikailag még nem megoldott feladat. A határsejtcsoport alakja gömbszerű, sejteit más sejtek veszik körül. Így, ellentétben a sejtnyúlványok vizsgálatában általánosan alkalmazott sejtenyészetekkel, az egyes filopódiumok pontos azonosítása nehéz.

A *cortactin* mutáció fenotípusa a határsejtvándorlásban enyhe. Ez azt mutatja, hogy a *cortactin* gén szerepét más gének is képesek ellátni, a Cortactin fehérje hiánya nem okoz súlyos rendellenességeket ebben a folyamatban.

4.2.2. A Cortactin és a Src fehérjék kapcsolata

A Src fehérjék az aktin sejtváza elemeinek általános szabályozói. A Src és a hozzá hasonló más kinázok átveszik az aktivált tirozinkináz receptoroktól a foszforilációs jelet és az aktinváz szabályozó fehérjét egész sorának működését képesek serkenteni (Kellie és mtsai, 1991; Brown és Cooper, 1996; Parsons és Parsons, 1997).

A Src tirozinkináz által foszforilált egyik fehérje a Cortactin. A Src és a Cortactin fehérjék között valószínű funkcionális kapcsolatra utal a *Src64* és a *cortactin* gének mutánsainak *Drosophila*-ban megfigyelhető hasonló fenotípusa. A petekamrák gyűrűsatornái aktinban gazdag képződmények, kialakulásuk elengedhetetlen feltétele a megfelelően szabályozott aktin összerendezés. Több aktin szabályozó fehérjéről, pl. az Arp2/3 komplex egyes tagjairól is kimutatták, hogy hiányukban a gyűrűsatornák a normálisnál kisebbek (Hudson és Cooley, 2002). A *Src64* (Dodson és mtsai, 1998) ill. a *cort* homozigóta mutáns petekamrákban is megfigyelhető ezt a jelenség. A szűk gyűrűsatornák miatt gátolt anyagszállítás következtében kisebb peték képződnek.

A *cort^{M7}/cort^M; Src64^{A17}/Src64^{A17}* kettős mutáns kombináció esetén a *Src64^{A17}/Src64^{A17}* homozigótához képest nem találtunk súlyosabb fenotípust. Ez alapján feltételezhető, hogy a *Src64* gén a jelátvitelben episztatikus a *cortactin* génhez képest.

Hasonló következtetésre jutottunk a másik *Drosophila Src* gén, a *Src42* vizsgálatakor. Kísérletünkben kimutattuk, hogy a *cortactin* gén homozigóta mutációja képes szuppresszálni a konstitutívan aktivált Src42^{CA} fehérje (Tateno és mtsai, 2000) által okozott follikuláris sejttorzulási fenotípust. Ez az eredmény is arra utal, hogy a Cortactin fehérje részt vesz a Src fehérje és az aktin sejtváz közötti jelátvitelben.

A *cortactin* mutáció csak kismértékben szuppresszálna a Src42^{CA} által kiváltott fenotípust. Ez azt jelzi, hogy a Cortactin csak egyik komponense a Src és az aktin sejtváz közötti jelátvitelnek. Ez a megfigyelés összhangban áll azzal az ismerettel, hogy a Src fehérjék nagyszámú más fehérje foszforilálására képesek. A foszforilált fehérjék funkciója jelentős mértékben átfedhet, ezért egyikük eltávolítása nem feltétlenül jár jelentős következményekkel. Valószínűsíthető, hogy a Cortactin fehérjének más fehérjékkel redundáns szerepe van a Src fehérjéktől származó, aktin átrendezését szabályozó jelek közvetítésében.

4.2.3. A Cortactin fehérje áthelyeződése a citoplazmából a sejtmembránokhoz

Emlős sejttípusokban kimutatták, hogy a Cortactin fehérje sejten kívüli jelek hatására foszforilálódik és a citoplazmából jelentős mértékben áthelyeződik a sejtmembránokhoz (Ozawa és mtsai, 1995; Weed és mtsai 1998; Cantarelli és mtsai, 2000). A *Drosophila* petekamráiban a Cortactin fehérje elsősorban a sejtek kortikális

részében található, ami összhangban van azzal, hogy a fehérje a sejtek membránjánál fejt ki működését, ahol az aktin polimerizációt segíti elő. Valószínű, hogy a Cortactin jelentős mennyiségben található a citoplazmában is, azonban az általunk használt ellenanyag magas citoplazmatikus háttérjelet ad, és ez lehetetlenné teszi a fehérje immunfestéssel történő kimutatását ebben a sejt-kompartimentben. Emiatt a citoplazmából a sejtmembránhoz történő áthelyeződést nem tudtuk kimutatni.

Megfigyeltünk azonban, hogy a PVR tirozinkináz receptor egyes follikuláris sejtekben történő ektopikus expressziója - ami a receptor enyhén megemelt aktivitását váltja ki - képes a sejtmembránál található Cortactin fehérje szintjét megemelni. Ez az eredmény arra utal, hogy ezekben a sejtekben is megtörténhet a fehérjének a sejten belüli jelentős áthelyeződése.

4.2.4. A cortactin a tirozinkináz receptorok egyik jelátvitelje

A *cortactin* génről kimutattuk, hogy a határsejtvándorlásban szerepet játszik. Emlékes sejttenyészetekben végzett vizsgálatok szerint a Cortactin fehérje különböző tirozinkináz receptorok hatására aktiválódhat (Maa és mtsai, 1992; Zhan és mtsai, 1994). Azt is kimutatták, hogy a Cortactin fehérje az Arp2/3 komplex aktiválása és az aktinszálak keresztkötése révén az aktinváz átrendeződésének egyik szabályozója (Uruno és mtsai, 2001; Weaver és mtsai, 2001). Eredményeink szerint a Cortactin részt vesz a határsejtvándorlást szabályozó egyik tirozinkináz receptor, a PVR és az aktin sejt-váz közötti jelátvitelben. Ezt az támasztja alá, hogy a homozigóta *cortactin* mutáció képes szuppresszálni a konstitutívan aktív PVR receptor által kiváltott fenotípust a follikuláris sejtekben.

A határsejtvándorlás, mint kísérleti rendszer hátránya, hogy nehéz a segítségével az irányított vándorlást szabályozó tirozinkináz receptorokkal (EGFR, PVR) kapcsolatos kísérleteket végrehajtani. Akár túlaktiváljuk a receptorokat domináns negatív formáik (DN-PVR, DN-DER) fokozott kifejeztetésével, akár aktivált alakjukat juttatjuk az állatokba transzgen formájában, a határsejtek vándorlása lelassul, vagy leáll. Ezért próbáltuk meg az aktivált PVR (λ -PVR) follikuláris sejtekben előidézett hatását módosítani. A λ -PVR kifejeztetése ezekben a határsejtekhez leginkább hasonlítható sejtekben olyan fenotípust eredményez (F-aktin-fölhalmozódás, sejtalak torzulása), amelyek erősödése, vagy gyengülése jól észrevehető. A Cortactin hiánya a follikuláris sejtekben csökkenti a λ -PVR transzgen fenotípusát. Ez alátámasztja azt a

föltételezésünket, hogy a Cortactin valóban részt vesz a PVR-ről induló jelek közvetítésében. A szuppresszió viszonylag csekély mértéke azt is jelzi, hogy a jel nagyobb része a Cortactinról függetlenül jut el az aktin sejtvezig.

Az a jelátviteli út, amely a PVR fehérjéről az aktin sejtvezig a Cortactin fehérjén keresztül halad, föltételezésünk szerint így épülhet föl:

1. *A PVR receptor közvetlenül foszforilálja a Src fehérjét.* Korábban kimutatták, hogy tirozinkináz receptorok képesek a Src foszforilációjára (Maa és mtsai, 1992; Zhan és mtsai, 1993; Hinsby és mtsai, 2003).

2. *A Src fehérje foszforilálja a Cortactin fehérjét.* A Src képes közvetlenül kötni Cortactinhoz és foszforilálni azt (Zhan és mtsai, 1994; Okumara és Resh, 1995; van Damme és mtsai, 1997). A Cortactin fehérje szerepét a Src fehérjéről származó jelek közvetítésében alátámasztotta az a kísérletünk is, amelyben a cortactin homozigóta mutáció az aktivált Src42 által okozott fenotípust szuppresszálja. A Src és a Cortactin közötti jelátviteli kapcsolat nem zárja ki más fehérjék esetleges szerepét a Cortactin aktiválásában, hiszen a Src-on kívül más fehérjéről is kimutatták, hogy képesek a Cortactinról foszforilálni (Weed és Parsons, 2001; Vidal és mtsai, 2002; Huang és mtsai, 2003).

3. *A Cortactin fehérje kötni az Arp2/3 fehérjekomplexhez és aktiválja azt.* A Cortactin ezt a szerepét a WASP fehérjével együtt tölti be (Higgs, 2002; Weaver és mtsai, 2002, 2003).

4. *Az aktivált Arp2/3 serkenti az aktin sejtvez fölépülését* (May, 2001). Az újonnan kialakuló aktinszálakat a Cortactin fehérje közvetlen kötéssel stabilizálja (Urano és mtsai, 2001; Weed és mtsai, 2000; Weaver és mtsai, 2001).

A határsejteket vándorlását szabályozó másik receptor, a DER (EGFR) esetén nem tudtuk az aktivált receptor által okozott fenotípus szuppresszióját vizsgálni *cortactin* homozigóta mutáció jelenlétében. A DER aktivált változata csak kismértékű elváltozásokat okoz a folliculáris sejtekben, ezért egy esetleges változás sem észlelhető. Ezért nem tudjuk bizonyítani, hogy a Cortactin fehérje szerepet játszik az EGFR receptortól induló jelátviteli útban.

4.2.5. A *cortactin* nem életfontosságó gén

A *cortactin* gén mutánsainak izolálásakor némiképp meglepően találtuk, hogy a *cortactin* nem esszenciális gén. Ez azonban összhangban van azzal, hogy azokban az

általunk megvizsgált folyamatokban, amelyekben ki tudtuk mutatni a Cortactin fehérje szerepét (határsejtvándorlás, gyűrűsatorna-képzés, PVR, ill. Src alatti jelátvitel), a Cortactin részvétele viszonylag csekély volt. Valószínű, hogy a Cortactin funkciója nagymértékben redundáns más fehérjékkel, ezért ellentétben sok, az aktinsejtváz szabályozásában résztvevő génnel (*Rac1*, *Src42*, *Arp2*, *Dia*, *SCAR*, *mbc*, *stb.*) a *cortactin* gén mutációja nem letális. A *cortactin*hoz hasonló szerepet ellátó gének azonosítása további vizsgálatokat igényel.

4.3. A Myoblast city és a Sponge

4.3.1. A Myoblast city a határsejtvándorlás szabályozásának kulcsszereplője

A *slbo*/*slbo*-szuppresszor gének között azonosítottuk a *myoblast city* (*mbc*) gént. Az MBC az emberi DOCK180 fehérje *Drosophila* homológja. A DOCK család fehérjéi a Rho kisméretű GTP-ázok egyikének, a Rac fehérjének aktiváló faktorai (Nolan és mtsai, 1998), ezen keresztül az aktin polimerizáció fontos szabályozói, ezért képesek az egyes aktinfüggő sejtfolyamatok szabályozására. A fagocitózis (Reddien és Horvitz, 2000), az axonok útkeresése (Lundquist és mtsai, 2001), vagy a fehérvérsejtek vándorlásának (Nishihara és mtsai, 2002) folyamatára gyakorolt hatásuk jó példák arra, hogy a DOCK180, illetve homológjai milyen fontos élettani és fejlődésbiológiai feladatokat láthatnak el. Vizsgálataink bizonyították, hogy az MBC fehérje ezenkívül a határsejtvándorlásban is fontos szerepet tölt be.

A *myoblast city* korábban izolált mutáns alléljének (Erickson és mtsai, 1997) felhasználásával megállapítottuk, hogy a mutáns határsejtek vándorlása jelentős késést szenved. Föltételeztük, hogy az MBC géntermék hiánya az aktinváz átrendezés elmaradását okozza. Hasonló fenotípus figyelhető meg, ha az MBC által szabályozott Rac fehérjét annak domináns negatív formájával (*Rac^{N17}*) gátoljuk a határsejtekben (Murphy és Montell, 1996). A két fenotípus hasonlósága arra utal, hogy az *mbc* mutáció fenotipikus hatása elsősorban a Rac-aktiválás hibája miatt következik be.

Az *mbc^{D11.2}* homozigóta mutáció képes jelentős mértékben szuppresszálni a határsejtvándorlás fontos szabályozójaként ismert PVR receptor aktivált változata (λ -PVR) által okozott fenotípust. A Rac fehérje domináns negatív változata szintén szuppresszálna a λ -PVR transzgen okozta fenotípust (Duchek és mtsai, 2001). Ezek alapján elképzelhető a PVR – MBC – Rac jelátviteli út működése.

A PVR és a DER, illetve emlCEs megfelelCEik képesek a MAP kináz jelátviteli utat aktiválni. A funkcióvesztéses és a funkciónyereses mutánsokkal végzett genetikai kísérletek arra utaltak, hogy a MAPK jelátviteli rendszer nem szükséges a határsejtvándorláshoz (Duchek és Rørth, 2001).

EmlCEs sejtvonalakon végzett vizsgálatok kimutatták a foszfatidil-inozitol-3-kináz fehérje (PI3K) jelentCEségét a kemotaxis szabályozásában. Az enzim domináns negatív, vagy aktivált formája azonban nem mutat lényeges hatást a határsejtvándorlásban (Duchek és Rørth, 2001). Egyúttal kimutatták, hogy a PLC- γ (egy tirozinkináz receptort kötCE fehérje) szintén kizárható a jelátviteli út fehérjéi közül, mivel mutációjának nincs hatása a fenotípusra. Hasonló módszereket alkalmazva több tirozinkináz receptorhoz kapcsolódó fehérjérCEl (Drk, Shc, Dos, Sty, Dock, Pak, Trio; Duchek és mtsai, 2001) bizonyították, hogy nincs lényeges szerepük a határsejtvándorlásban.

Éppen ezért kiemeljük, hogy mind az MBC, mind a Rac fehérjék esetében bizonyítottuk, hogy fontosak a határsejtek vándorlásában. Vizsgálataink igazolták, hogy a PVR – MBC – Rac jelátviteli út döntCE fontosságú a határsejtvándorlás szabályozásában.

4.3.2. A Myoblast city (MBC) fehérje aktiválása

EgyelCEre nem ismert, hogyan aktiválják a tirozinkináz receptorok a MBC fehérjét. Valószínűnek látszik, hogy egy legalább négy tagból álló fehérjekomplex elemeként képes az MBC a receptortól jövCE jelet a Rac felé továbbítani. Az MBC mellett a komplex föltételezett tagjai a Crk kis adaptor (Feller és mtsai, 1995), a p130Cas (Salgia és mtsai, 1996) és az ELMO fehérje (Gummienny és mtsai, 2001). Az is föltételezhetCE, hogy a komplex aktiválásához szükséges a membránhoz közeli áthelyezCEés, majd a receptorhoz való kötCEés. A Crk fehérje valószínűleg a komplexnek a receptorhoz való kötCEéséért felelCEs. EgyelCEre nem világos azonban, hogy az ezt megelCEzCE lépést, a membrán-lokalizációt a fehérjekomplex melyik tagja szabályozza.

Vizsgálataink azt sugallják, hogy az *ecetmuslica* határsejtvándorlásában a membrán-lokalizációért nem a Myoblast city fehérje a felelCEs. Erre utal, hogy az ellenanyagfestés igazolja az MBC nagy mennyiségű elCEfordulását membránnál és nem mutat polarizált elhelyezkedést. Ezenkívül a PVR egyes sejtekben történCE aktiválása a

Cortactin fehérjével ellentétben nem eredményezi a MBC fokozott membránkötődését. Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy a MBC állandóan jelen van a sejtkeletben, aktiválásához nincs szükség a citoplazmából történő áthelyeződésére. Ezzel együtt a membrán menti kismértékű átrendeződések nem zárhatók ki.

4.3.3. A Sponge és a Myoblast city fehérjék funkciója hasonló

Az *mbc* gén legközelebbi *Drosophila* homológja a *sponge* (*spg*) gén (E. Schejter, személyes közlés). Ezért megvizsgáltuk, hogy a Sponge fehérje az MBC fehérjéhez hasonló funkciót tölt-e be.

Az *mbc,spg* kettős mutánsok vizsgálata súlyos határsejtvándorlási késést mutatott és a λ -PVR fenotípus szuppressziója is jelentős mértékű volt. Mindez a két fehérje funkciójának nagymértékű hasonlóságára utal. Mivel a *sponge* mutációja önmagában nem befolyásolja a határsejtek vándorlását, valószínű, hogy a vándorlás szabályozása féleként az MBC feladata, a Sponge csak az MBC hiánya esetén képes annak funkcióját helyettesíteni.

4.4. A Cortactin, a Myoblast city és a Sponge fehérjék hasonló funkciót látnak el

A három gén mutációinak együttes fenotípusa, hogy nincs határsejtvándorlás. Ez nehezen értelmezhető, mivel a Cortactin, illetve az MBC-Sponge fehérjéken keresztül vezetett jelátviteli utak nem tekinthetők egymástól függetlennek. Kimutatták ugyanis, hogy a Rac fehérje befolyásolja a Cortactin fehérjének a sejtek perifériájára történő átrendeződését és aktiválását (Weed és mtsai, 1998), ill. a Cortactin is szerepet játszik a Rac fehérje és az általa aktivált a PAK fehérjére közötti kapcsolatban (Vidal és mtsai, 2002).

A 3 vizsgált gén mutánsainak a határsejtekre gyakorolt hatását nem lehet kizárólag az Arp2/3 komplex hiányos aktiválásának tulajdonítani, mivel a *mbc-spg* kettős, vagy a *cort-mbc-spg* hármas mutáns határsejtvándorlás késése erősebb annál, mint amit az Arp2/3 fehérjekomplex legfontosabb elemeinek (*Arpc1* és *Arp3*) mutánsai okoznak (saját megfigyelés). Valószínűbb, hogy az MBC és a Sponge az Arp2/3 komplextől független aktin polimerizációs szabályozásban is részt vesz. Ezt a kérdést az ARP2/3 komplexet fölépítő gének és az ettől az aktin polimerizáló faktortól függetlenül működő gének mutánsainak elemzése tisztázhatja. Jelentős

szerepet tölthet be pl. a Diaphaneus fehérje és az általa aktivált Profilin fehérje az aktinváz átépítésében. Ezt az útvonalat elsősorban a Rho fehérje aktiválja (Grosse és mtsai, 2003), de nem zárható ki a Rac (így ezen keresztül az MBC és a Sponge) fehérje felére érkező jelek hatása sem.

4.5. A MAL-D

4.5.1. A *Drosophila mal-d* génjének azonosítása és mutáns fenotípusai

Az EP elemes genetikai szűrésből azonosított egyik törzs jellegzetes fenotípust mutatott. Az EPg37532 homozigóta legyek torának dorzális oldalán torzult hosszú szérszalakat találtunk. Ez egy aktinváz átrendezést szabályozó gén mutációjára utalt. Kimutattuk, hogy a transzpozon egy olyan gén első intronjában helyezkedik el, amely egyedüli *Drosophila*-homológja az emlősökben már azonosított MAL fehérjecsald tagjait kódoló géneknek. Ezért ezt a gént *mal-d*-nek neveztük el.

A MAL fehérjék transzkripciós kofaktorok, amelyek képesek az SRF transzkripciós faktor aktivitását fokozni (Wang és mtsai, 2001; Miralles és mtsai, 2003; Selvaraj és mtsai, 2003; Cen és mtsai, 2003). Az SRF több biológiai folyamat irányításának fontos tényezője (Arsenian és mtsai, 1998; Chai és Tarnawski, 2002). A *Drosophila* SRF kötődését a MAL-D fehérjéhez *Drosophila* sejt-kultúra-sejtekben kimutatták (P. Rørth, személyes közlés).

Az aktinváz átrendezéssel kapcsolatos szabályozó szerepet igazolja a *mal-d* mutánsok fenotípusa. A pontatlan transzpozon-kivágódással, ill. EMS mutagenézissel létrehozott allélek a tor hosszú dorzális oldali hosszú széreinek torzulását okozzák. Ezen kutikula-képzédmények kialakulásában szerepe van a megfelelően szabályozott aktin polimerizációnak, hiszen a nagy mennyiségi, összehangoltan növekedő aktinkötegek alakítják ki a szérszalak vázát. Rendezetlen aktin polimerizáció esetén ez a szerkezet eltorzul, megtörik, abnormális szerformák jönnek létre (Verheyen és Cooley, 1994; Wahlström és mtsai, 2001). Az ilyen hatásokra a leghosszabb szérszalak a legérzékenyebbek. Ezzel összhangban áll az a megfigyelésünk, hogy a legyek leghosszabb, hátoldali tori szérei deformálódnak elsősorban.

A *mal-d* mutáns petekamrát megvizsgálva a sejtekben jelentősen csökkent polimerizált aktin mennyiséget találtunk. Ez különösen szembetűnő a határsejtekben, ott, ahol a vándorlás során jelentős mértékű az aktin fölhalmozódása. A sejtek

viselkedése is megváltozik, vándorlásukban komoly késés figyelhető meg. A mozaikos technikával létrehozott részlegesen mutáns sejtcsoportokban az F-aktinban gazdag vad típusú sejtek magukkal viszik a vékony aktinkérgű mutáns sejteket. Mindezek az elváltozások sejtautonóm módon nyilvánultak meg.

A *mal-d* null mutáns alléljai letalitást okoznak és ez mutatja, hogy a gén az SRF-hez hasonlóan életfontosságú funkciót kódol. A petefészkekben kialakított mutáns sejtcsoportok a már leírt aktinfüggő fenotípusok mellett más rendellenességet nem mutattak.

A *mal-d* gén $\Delta 7$ deléziós mutációja a pontmutációt hordozó null allélokkal azonos fenotípust mutat a petekamrákban. Ez összhangban van azzal, hogy a *mal-d ^{$\Delta 7$}* homozigóta mutáns petefészkekben készült fehérjekivonatban nem tudtuk kimutatni a MAL-D fehérje jelenlétét. Mindezek alapján a $\Delta 7$ allél a petefejlődés vonatkozásában null allélnak tekinthető. A pontmutáns null allélok letalitást okoznak. Ezzel szemben a $\Delta 7$ homozigóta mutáns legyek életképesek.

Ez arra utal, hogy a *mal-d* génről két különböző promóter közvetítésével is képződhet fehérjetermék. Az egyik promóter elsősorban a peteképződés során működhet és feltételezhetően olyan transzkriptum termelését irányítja, amelynek átíródása a *mal-d* gén első exonjáról indul. Az első exont eltávolító $\Delta 7$ deléció megszünteti ezt a transzkripciót, a $\Delta 7$ homozigóta mutánsok ezért a peteképződésben null allélként viselkednek. A másik promóter által szabályozott transzkripció valószínűleg nem az első exonról, hanem csak az attól mintegy 35 kilobázis távolságra lévő másodikról indul. A MAL-D fehérje jelentős szerepet játszik az egyedfejlődésben, hiánya ezért korai letalitást okoz. A $\Delta 7$ deléció ezt a transzkripciót nem érinti, a $\Delta 7$ homozigóta mutáns legyek emiatt életképesek. A torzult szőrfenotípus mind a deléziós, mind a pontmutáns alléloknál jelentkezik, ez azt sugallja, hogy a szőrfejlődésben az első *mal-d* exont érintő promóter fontos szerepet játszik.

4.5.2. A MAL-D aktivitásának szabályozása

A MAL-D fehérje túltermeltetése a funkcióvesztéses mutációk hatásával ellentétes következményekkel jár. A MAL-D-t túltermelő sejtek F-aktin mennyisége megnövekszik. A MAL-D vad típusú formája nagy mennyiségben túltermeltetve sem

mutatható ki a folliculáris sejtek magjaiban. Ha azonban a sejtmagba lépés szabályozásáért felelős N-terminális fehérjeszakaszt eltávolítjuk, a csonkolt fehérje (MAL-D- Δ N) nagy mennyiségben megjelenik a sejtmagban. Ezzel összhangban a MAL-D- Δ N fehérje túltermelésének jelentősebb hatása van, mint a vad típusú formának. Kis mennyiségi, vagy rövid ideig jelen lévő MAL-D- Δ N is erőteljes F-aktin felhalmozódást okoz, még fokozottabb túltermelése pedig a sejtek alakjának torzulását váltja ki. Ezek a kísérletek igazolják, hogy a MAL-D fehérje sejtmagba jutásának szabályozása a fehérje működését nagy mértékben befolyásolhatja.

A MAL fehérje kötődnek az aktin monomerekhez (Miralles és mtsai, 2003), így elképzelhető, hogy sejtmagba jutása a G-aktinon keresztül is szabályozható. Erre a szabályozásra két modell javasolható (Miralles és mtsai, 2003). Az egyszerűbb modell szerint az aktin monomerek a MAL fehérjéhez kötődve gátolják annak sejtmagi transzportját. Eredményeink nem támogatják ezt az elképzelést. A MAL-D túltermeltetett formája is túlnyomórészt a citoplazmában marad. Ez azt jelenti, hogy a G-aktin szinte korlátlan mennyiségben megköthető és a citoplazmában tarthatná a MAL fehérjét, ami a javasolt szabályozó mechanizmust megakadályozná. Ezenkívül az aktin egyik polimerizációra képtelen, de a MAL-D fehérjéhez kötődő változatának (Posern és mtsai, 2002) a folliculáris sejtekben történő túltermelése semmilyen fenotípust nem okoz (P. Rørth, személyes közlés). Vagyis a megnövelt mennyiségi G-aktin nem képes megkötni és a sejtmagból elvonni a MAL-D fehérjét, nem alakul ki a MAL-D hiányára jellemző fenotípus.

Ezért lehet, hogy a MAL-D elhelyezkedését nem egyszerűen az aktin monomerek, hanem azoknak egy módosult szubpopulációja, vagy egy, aktint tartalmazó komplex befolyásolná, a sejt aktin-polimerizációs állapotától függően. Ennek a modellnek az igazolására további kísérletek szükségesek.

Ismert, hogy az egyes *aktin* gének szabályozó szakaszaiban SRE elem található (Miwa és Kedes, 1987; Muscat és mtsai, 1988; Ng és mtsai, 1989), vagyis ezek átíródása SRF-szabályozott lehet. A MAL-D aktin-transzkripciót szabályozó szerepét megfigyeléseink nem erősítették meg. A *mal-d* mutáns szövetekben sem Western analízissel, sem közvetlen immunofestéssel nem tudtuk az aktin fehérjeszint csökkenését kimutatni. Valószínűbbnek tartjuk, hogy a MAL-D inkább egyes, az aktinnal kölcsönható fehérjék (pl. miozin), ill. az aktin polimerizációt serkentő faktorok termelését szabályozza és nem az aktin gének transzkripcióját befolyásolja.

4.5.3. A MAL-D szerepe a transzkripció szabályozásban és az egyedfejlésben

A *mal-d* által szabályozott gének ismerete szükséges a gén funkciójának megértéséhez. Többféle módszer is közelebb vihet ezeknek a géneknek az azonosításához. Egyes géneket, melyekre feltételezzük, hogy transzkripciójukra a MAL-D-nek hatása lehet, célirányosan megvizsgálhatunk. Kiválaszthatunk pl. olyan géneket, melyek aktin polimerizációt szabályozó fehérjéket kódolnak (pl. *profilin*, *fascin*, *twinfilin*, stb.). Ennél nagyobb számú, *mal-d* által szabályozott gén azonosítása várható *mal-d* mutáns és vad típusú szövetek (pl. petekamra) génexpressziós mintázatának összehasonlításától.

Nyitott kérdés még, hogy milyen szerepet játszik a *mal-d* gén az *ecetmuslica* egyedfejlésében. A mutációja korai letalitást okoz, ezért a *mal-d* fontos az embrionális fejlődésben. A *mal-d* mutáns embriók fejlődésének vizsgálata, a mutáns fenotípus elemzése segíthet a *mal-d* szerepének alaposabb megértésében.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

A többsejtű állatok fejlődésének jellegzetessége bizonyos sejteknek, illetve sejtcsoportoknak a szervezeten belüli helyváltoztatása, vándorlása. Több olyan szövetet ismerünk, melynek őssejtjei végső helyüktől 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 kulcsszereplői, a fehérvérsejtek, vagy a sebzáródásban nélkülözhetetlen fibroblasztok.

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

Ezek a felsorolt példák szemléltetik, hogy a sejtvándorlási folyamatok tanulmányozása, részletes megértése a biológiai kutatások fontos területe.

Funkciónyeréses genetikai szírés

A sejtvándorlás tanulmányozására az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) ivarsejtképzése során megfigyelhető határsejtvándorlási folyamatot választottuk. A határsejtek csoportja 6-8 sejtből áll. Ezek a sejtek az ecetmuslica peteérési folyamata során jellegzetes vándorlást hajtanak végre. A 9. fejlődési fázis elején kiválnak az ivarsejteket körülvevő egyrétegű, szomatikus eredetű epiteliális sejtrétegből és a dajkasejtek között poszteriorális irányban vándorolnak, és végül elérik a petesejtet.

Ezt a vándorlást két redundánsan működő vezetési rendszer irányítja. Ennek kulcsszereplői a vándorlás irányát jelző extracelluláris fehérjemolekulákat 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.

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

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 erő jelentős részét. A sejtnyúlványok képzésében az aktin polimerizáció és az aktinszálak 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 szerint szerepet játszhatnak az aktin hálózat átépítésében. Három ilyen gén alaposabb jellemzését végeztük el.

cortactin

A Cortactin fehérjét kódoló gént emlősökben mint onkogént azonosították. Főismerték fontosságát az aktin sejtváz átrendezésének szabályozásában. A Cortactin köti és aktiválja az Arp2/3 fehérjekomplexet, ezáltal serkenti az aktin polimerizációt. Túlermelése a sejtek metasztatikus transzformációját és megnövekedett mozgási hajlandóságát eredményezi.

Imprecíz EP-elem kivágódások segítségével a *cortactin* gén négy új deléziós mutációját azonosítottuk. Az egyik deléció (M7) eltávolítja a teljes *cortactin* gént. A

mutáns legyek életképesek és termékenyek. A peteképzés vizsgálata 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* gén mutánsai mutatnak. Az aktivált Src42 fehérje által okozott fenotípust a cortactin mutációja szuppresszálja, ami arra utal, hogy a Cortactin szerepet vállal a Src fehérjék és az aktin sejtváza közötti jelátvitelben.

A *cortactin* mutánsokban határsejtek vándorlásában késést 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 aktinváza átrendezésben 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 jelentős mértékben szuppresszálja 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 *musca*-homológja, a *sponge* (*spg*) szerepét is. A *spg* nem okoz késést a határsejtvándorlásban, de a *mbc*, *spg* kettős homozigóta 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 *ecetmusca* határsejtvándorlási folyamataiban játszott szerepéről. Továbbra sem tisztázott azonban, hogy az *ecetmusca* 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 határsejtvándorlás 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 sejtváz átépítésében szerepet játszó géneknek a transzkripciósf szabályozásán keresztül vehet részt.

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

6. SUMMARY

Background

Cell motility is an important aspect of the development of multicellular organisms. Many cell populations and tissues are known to be derived from precursor cells which were differentiated at places far from the final location. These precursor cells sometimes have to perform a long migration during which they follow a path to find their target place. For example primordial germ cells in *Drosophila melanogaster* are determined during early embryogenesis and migrate from the posterior pole of the embryo towards the presumptive gonad. Neural crest cells originate at the site of neural tube closure of the vertebrate embryo and later migrate along specific pathways in the developing animal to give rise to a large range of different tissues, including neurones, melanocytes, cartilage and bones in the head. Myoblasts also spread through the embryonic body and form musculature of the limbs.

Less frequently cells also migrate in the adult organisms. During immune response leukocytes penetrate through the blood vessels and migrate to the sites of infection. After that they have to find their way to the lymphatic organs. During wound healing when fibroblasts move to the place of injury where they start to proliferate and synthesise components necessary for wound closure.

Many pathologic conditions are caused by the improper regulation of cell migration. Tumour cells can undergo malignant transformation, detach from the tumour, and colonise other organs. Such metastatic changes increase the difficulties of medical treatment.

The above examples demonstrate the importance of understanding how migratory cells are determined, what are the regulatory processes that make them able to migrate, and what are the molecular components of the guidance system which help the cells to find their target.

Modular misexpression screen

To address these questions *in vivo* we studied the migration of border cells in the fruitfly *Drosophila melanogaster*. Border cells are a group of 6-8 specialised follicle cells which perform a stereotypic migration during oogenesis. At the beginning of stage 9 of oogenesis they delaminate from the epithelial monolayer surrounding the germline cluster, then migrate through the nurse cells towards the posteriorly located oocyte. This migration is known to be guided by two redundantly acting guidance system, based on the function of two receptor tyrosine kinases, EGFR and PVR. Although the basic nature of the chemotactic guidance has been described, the signalling events downstream of these receptors are hardly understood.

In order to identify molecular components of the migratory system we performed a large scale modular misexpression screen. In *slbo* mutant background 1510 randomly targeted genes of the third chromosome were overexpressed in border cells and these flies were scored for the suppression of a defective migration phenotype. The genes behaving as suppressors in that screen are expected to code for rate-limiting factors for cell migration in this situation or are positive regulators of migration and when overexpressed are able to force cells to get migratory.

In this screen we found 72 positive lines. Out of them 59 lines were further characterised. 50 EP transposon insertions were found to be inserted near to genes. These genes encoded proteins functional in a wide scale of cellular processes. For instance we found inserts near to genes encoding actin binding proteins, transcription factors, protein kinases or house keeping proteins.

Actin rearrangements are fundamental in migrating cells. The major force needed for the movement is supported by the network of actin filaments. The polymerisation of actin at the leading edge of moving cells pushes the membrane forward and the extending protrusions (lamellopodia, filopodia) establish stabile contact with the substrate. Without this cellular process cells are not able to move. We wanted to investigate how actin rearrangements are regulated in migrating border cells. For that reason we chose for further analysis the EP lines that had inserts at genes likely involved in the regulation of actin cytoskeleton rearrangements.

Cortactin

One of the genes identified in the screen was *cortactin*. Cortactin protein is a Src substrate that interacts with F-actin and can stimulate actin polymerisation by directly interacting with the Arp2/3 complex. Generating imprecise excision of the EP insert 622 base pairs upstream of the gene we have isolated the first loss-of-function mutants of the single *Drosophila cortactin* gene. Mutants were viable and fertile, showing that *cortactin* is not an essential gene.

However, *cortactin* mutants show distinct defects during oogenesis. During oogenesis, Cortactin protein is enriched at the F-actin rich ring canals in the germ line, and in migrating border cells. In *cortactin* mutants, the ring canals are smaller than normal. A similar ring canal phenotype has been observed in *Src64* mutants and in mutants for genes encoding Arp2/3 complex components, supporting that these protein products act together in vivo. *Cortactin* mutants also show impaired border cell migration. We find that the accumulation of Cortactin protein is positively regulated by PVR, one of the guidance receptors in border cell migration. Also, overexpression of Cortactin can by itself induce F-actin accumulation and ectopic filopodia formation in epithelial cells.

We performed epistasis experiments which demonstrate that Cortactin is one of the factors acting downstream of PVR and Src to stimulate F-actin accumulation. Cortactin is only a minor contributor in this regulation, consistent with the *cortactin* gene not being essential for development.

Myoblast city and Sponge

Another gene identified in the genetic screen was *Myoblast city*. *Myoblast city* (*mbc*) is homologous to mammalian DOCK180, a potent activator of Rac1. Rac1 activation is known to lead to multiple changes in the actin cytoskeleton network. Using null mutant of *mbc* in mosaic analysis we found that in the absence of MBC the border cells migrate very poorly. This phenotype is similar to the one observed in *Rac1* loss-of-function situation. Performing epistasis experiment we found evidence that MBC is involved in the downstream signalling pathway of PVR and probably through Rac1 MBC mediates the effects of the guidance receptor to the actin cytoskeleton.

We also analysed the closest *Drosophila mbc*-homolog, *sponge*. *sponge* mutation alone did not influence the migration but strongly enhanced the border cell delay caused by *mbc* loss-of-function. *Sponge* also enhanced the suppression of the effect of activated PVR.

These data suggest an important role of *myoblast city* and *sponge* and high redundancy between these two related genes acting in the migratory process downstream of PVR.

Mal-d

Based on homozygous bristle phenotype similar to the ones of certain actin regulating genes we identified a new gene potentially involved in actin cytoskeleton reorganisation. The gene named *mal-d* is the *Drosophila* homolog of mammalian genes encoding for MAL/Myocardin proteins, transcriptional cofactors of Serum Response Factor (SRF).

The mutants of *mal-d* generated by EMS mutagenesis and imprecise excision of an EP element showed different phenotypes, each of them related to defects of actin polymerisation. The actin cytoskeleton of the mutant follicle cells was visibly reduced. Similar but more pronounced effect was observed in border cells which also had strong migration delays. By analysing the loss-of-function effects of *mal-d* and *SRF* mutants we found that they significantly overlap. The overexpression of the activated form of MAL-D caused the opposite effect, a robust accumulation of polymerised actin. Non of these loss-of-function or gain-of-functions effects caused changes of the amount of monomeric actin in cytoplasm.

These observations suggest that *mal-d* may positively regulate transcription of genes encoding proteins involved in the building up and/or maintenance of actin networks.

7. IRODALOMJEGYZÉK

Affolter M, Montagne J, Walldorf U, Groppe J, Kloter U, LaRosa M, Gehring WJ, 1994: The Drosophila SRF homolog is expressed in a subset of tracheal cells and maps within a genomic region required for tracheal development. *Development*. 1994 Apr;120(4):743-53.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD, 1994: *Molecular Biology of the Cell*. (3rd ed.) Garland Publishing; c1994. Online Edition. Part III. Chapter 16.

Arsenian S, Weinhold B, Oelgeschlager M, Ruther U, Nordheim A, 1998: Serum response factor is essential for mesoderm formation during mouse embryogenesis. *EMBO J*. 1998 Nov 2;17(21):6289-99.

Bai J, Uehara Y, Montell DJ, 2000: Regulation of invasive cell behavior by taiman, a Drosophila protein related to AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast cancer. *Cell*. 2000 Dec 22;103(7):1047-58.

Beccari S, Teixeira L, Rørth P, 2002: The JAK/STAT pathway is required for border cell migration during Drosophila oogenesis. *Mech Dev*. 2002 Feb;111(1-2):115-23.

Bowden ET, Barth M, Thomas D, Glazer RI, Mueller SC, 1999: An invasion-related complex of cortactin, paxillin and PKCmu associates with invadopodia at sites of extracellular matrix degradation. *Oncogene*. 1999 Aug 5;18(31):4440-9.

Brand AH, Perrimon N, 1993: Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*. 1993 Jun;118(2):401-15.

Brown MT, Cooper JA, 2002: Regulation, substrates and functions of src. *Biochim Biophys Acta*. 1996 Jun 7;1287(2-3):121-49.

Brugnera E, Haney L, Grimsley C, Lu M, Walk SF, Tosello-Trampont AC, Macara IG, Madhani H, Fink GR, Ravichandran KS, 2002: Unconventional Rac-GEF activity is mediated through the Dock180-ELMO complex. *Nat Cell Biol*. 2002 Aug;4(8):574-82.

Buckingham M, 2001: Skeletal muscle formation in vertebrates. *Curr Opin Genet Dev*. 2001 Aug;11(4):440-8.

Cantarelli VV, Takahashi A, Akeda Y, Nagayama K, Honda T, 2000: Interaction of enteropathogenic or enterohemorrhagic *Escherichia coli* with HeLa cells results in translocation of cortactin to the bacterial adherence site. *Infect Immun*. 2000 Jan;68(1):382-6.

Cao H, Orth JD, Chen J, Weller SG, Heuser JE, McNiven MA, 2003: Cortactin is a component of clathrin-coated pits and participates in receptor-mediated endocytosis. *Mol Cell Biol*. 2003 Mar;23(6):2162-70.

Cen B, Selvaraj A, Burgess RC, Hitzler JK, Ma Z, Morris SW, Prywes R, 2003: Megakaryoblastic leukemia 1, a potent transcriptional coactivator for serum response factor (SRF), is required for serum induction of SRF target genes. *Mol Cell Biol*. 2003 Sep;23(18):6597-608.

Chai J, Tarnawski AS, 2002: Serum response factor: discovery, biochemistry, biological roles and implications for tissue injury healing. *J Physiol Pharmacol*. 2002 Jun;53(2):147-57.

Chung CY, Funamoto S, Firtel RA, 2001: Signaling pathways controlling cell polarity and chemotaxis. *Trends Biochem Sci*. 2001 Sep;26(9):557-66.

Copeland JW, Treisman R, 2002: The diaphanous-related formin mDial controls serum response factor activity

through its effects on actin polymerization. *Mol Biol Cell*. 2002 Nov;13(11):4088-99.

Cote JF, Vuori K, 2002: Identification of an evolutionarily conserved superfamily of DOCK180-related proteins with guanine nucleotide exchange activity *J Cell Sci*. 2002 Dec 15;115(Pt 24):4901-13.

Dehio C, Prevost MC, Sansonetti PJ, 1995: Invasion of epithelial cells by *Shigella flexneri* induces tyrosine phosphorylation of cortactin by a pp60c-src-mediated signalling pathway. *EMBO J*. 1995 Jun 1;14(11):2471-82.

Dodson GS, Guarnieri DJ, Simon MA, 1998: Src64 is required for ovarian ring canal morphogenesis during *Drosophila* oogenesis. *Development*. 1998 Aug;125(15):2883-92.

Du Y, Weed SA, Xiong WC, Marshall TD, Parsons JT, 1998: Identification of a novel cortactin SH3 domain-binding protein and its localization to growth cones of cultured neurons. *Mol Cell Biol*. 1998 Oct;18(10):5838-51..

Duchek P, Rørth P, 2001: Guidance of cell migration by EGF receptor signaling during *Drosophila* oogenesis. *Science*. 2001 Jan 5;291(5501):131-3.

Duchek P, Somogyi K, Jékely G, Beccari S, Rørth P, 2001: Guidance of cell migration by the *Drosophila* PDGF/VEGF receptor. *Cell*. 2001 Oct 5;107(1):17-26.

Durieu-Trautmann O, Chaverot N, Cazaubon S, Strosberg AD, Couraud PO, 1994: Intercellular adhesion molecule 1 activation induces tyrosine phosphorylation of the cytoskeleton-associated protein cortactin in brain microvessel endothelial cells. *J Biol Chem*. 1994 Apr 29;269(17):12536-40.

Edwards KA, Demsky M, Montague RA, Weymouth N, Kiehart DP, 1997: GFP-moesin illuminates actin cytoskeleton dynamics in living tissue and demonstrates cell shape

changes during morphogenesis in *Drosophila*. *Dev Biol*. 1997 Nov 1;191(1):103-17.

Edwards KA, Kiehart DP, 1996: *Drosophila* nonmuscle myosin II has multiple essential roles in imaginal disc and egg chamber morphogenesis.. 1996 May;122(5):1499-511.

Erickson MR, Galletta BJ, Abmayr SM, 1997: *Drosophila* myoblast city encodes a conserved protein that is essential for myoblast fusion, dorsal closure, and cytoskeletal organization. *J Cell Biol*. 1997 Aug 11;138(3):589-603.

Fawaz FS, van Ooij C, Homola E, Mutka SC, Engel JN, 1997: Infection with *Chlamydia trachomatis* alters the tyrosine phosphorylation and/or localization of several host cell proteins including cortactin. *Infect Immun*. 1997 Dec;65(12):5301-8.

Feller SM, Knudsen B, Hanafusa H, 1995: Cellular proteins binding to the first Src homology 3 (SH3) domain of the proto-oncogene product c-Crk indicate Crk-specific signaling pathways. *Oncogene*. 1995 Apr 20;10(8):1465-73.

Fisher A, Caudy M, 1998: The function of hairy-related bHLH repressor proteins in cell fate decisions. *Bioessays*. 1998 Apr;20(4):298-306. 1999 Aug;9(4):473-8.

Forbes A, Lehmann R, 1999: Cell migration in *Drosophila*. *Curr Opin Genet Dev*. 1999 Aug;9(4):473-8.

Forbes AJ, Lin H, Ingham PW, Spradling AC, 1996: hedgehog is required for the proliferation and specification of ovarian somatic cells prior to egg chamber formation in *Drosophila*. *Development*. 1996 Apr;122(4):1125-35.

Fulga TA, Rørth P, 2002: Invasive cell migration is initiated by guided growth of long cellular extensions. *Nat Cell Biol*. 2002 Sep;4(9):715-9.

Galletta BJ, Niu XP, Erickson MR, Abmayr SM, 1999: Identification of a Drosophila homologue to vertebrate Crk by interaction with MBC. *Gene*. 1999 Mar 4;228(1-2):243-52.

Geneste O, Copeland JW, Treisman R, 2002: LIM kinase and Diaphanous cooperate to regulate serum response factor and actin dynamics. *J Cell Biol*. 2002 May 27;157(5):831-8.

Goldberg JL, 2003: How does an axon grow? *Genes Dev*. 2003 Apr 15;17(8):941-58.

Gonzalez-Reyes A, St Johnston D, 1998: Patterning of the follicle cell epithelium along the anterior-posterior axis during Drosophila oogenesis. *Development*. 1998 Aug;125(15):2837-46.

Grosse R, Copeland JW, Newsome TP, Way M, Treisman R, 2003: A role for VASP in RhoA-Diaphanous signalling to actin dynamics and SRF activity. *EMBO J*. 2003 Jun 16;22(12):3050-61.

Gumienny TL, Brugnera E, Tosello-Tramont AC, Kinchen JM, Haney LB, Nishiwaki K, Walk SF, Nemergut ME, Macara IG, Francis R, Schedl T, Qin Y, Van Aelst L, Hengartner MO, Ravichandran KS, 2001: CED-12/ELMO, a novel member of the CrkII/Dock180/Rac pathway, is required for phagocytosis and cell migration. *Cell*. 2001 Oct 5;107(1):27-41.

Hall A, 1998: Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*. 1998 Jan 23;279(5350):509-14.

Harrison DA, McCoon PE, Binari R, Gilman M, Perrimon N, 1998: Drosophila unpaired encodes a secreted protein that activates the JAK signaling pathway. *Genes Dev*. 1998 Oct 15;12(20):3252-63.

Hasegawa H, Kiyokawa E, Tanaka S, Nagashima K, Gotoh N, Shibuya M, Kurata T, Matsuda M, 1996: DOCK180, a major CRK-binding protein, alters cell morphology upon translocation to the cell membrane. *Mol Cell Biol*. 1996 Apr;16(4):1770-6.

Higgs HN, 2002: Actin nucleation: cortactin caught in the act. *Curr Biol.* 2002 Sep 3;12(17):R593-5.

Hill CS, Wynne J, Treisman R, 1995: The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell.* 1995 Jun 30;81(7):1159-70.

Hinsby AM, Olsen JV, Bennett KL, Mann M, 2003: Signaling initiated by overexpression of the fibroblast growth factor receptor-1 investigated by mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics.* 2003 Jan;2(1):29-36.

Huang J, Asawa T, Takato T, Sakai R, 2003: Cooperative roles of Fyn and cortactin in cell migration of metastatic murine melanoma. *Biol Chem.* 2003 Nov 28;278(48):48367-76.

Hudson AM, Cooley L, 2002: A subset of dynamic actin rearrangements in *Drosophila* requires the Arp2/3 complex. *J Cell Biol.* 2002 Feb 18;156(4):677-87.

Jackson, SM, Berg, CA, 2002: An A-kinase anchoring protein is required for Protein kinase A regulatory subunit localization and morphology of actin structures during oogenesis in *Drosophila*. *Development* 2002 129(19):4423--4433.

Kanner SB, Reynolds AB, Vines RR, Parsons JT, 1990: Monoclonal antibodies to individual tyrosine-phosphorylated protein substrates of oncogene-encoded tyrosine kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 May;87(9):3328-32.

Katsube T, Hashimoto N, Sasaki Y, Yamashita A, Takahisa M, Ueda R, Togashi S, 2001: Genomic organization, transcription start sites, and chromosomal location of the *Drosophila* cortactin gene. *Genes Genet Syst.* 2001 Apr;76(2):65-70.

Katsube T, Takahisa M, Ueda R, Hashimoto N, Kobayashi M, Togashi S, 1998: Cortactin associates with the cell-cell junction protein ZO-1 in both *Drosophila* and mouse. *J Biol Chem.* 1998 Nov 6;273(45):29672-7.

Kellie S, Horvath AR, Elmore MA, 1991: Cytoskeletal targets for oncogenic tyrosine kinases. *J Cell Sci.* 1991 Jun;99 (Pt 2):207-11.

King RC, 1970: Ovarian development in *Drosophila melanogaster* (New York, Academic Press)

LaBonne C, Bronner-Fraser M, 1999: Molecular mechanisms of neural crest formation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1999;15:81-112.

Lai EC, Rubin GM, 2001: Neuralized is essential for a subset of Notch pathway-dependent cell fate decisions during *Drosophila* eye development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 May 8;98(10):5637-42.

Lee T, Hacohen N, Krasnow M, Montell DJ, 1996: Breathless receptor tyrosine kinase activity required to pattern cell migration and branching in the *Drosophila* tracheal system. *Genes Dev.* 1996 Nov 15;10(22):2912-21.

Li Y, Liu J, Zhan X, 2000: Tyrosine phosphorylation of cortactin is required for H₂O₂-mediated injury of human endothelial cells. *J Biol Chem.* 2000 Nov 24;275(47):37187-93.

Liu J, Huang C, Zhan X, 1999: Src is required for cell migration and shape changes induced by fibroblast growth factor 1. *Oncogene.* 1999 Nov 18;18(48):6700-6.

Liu Y, Montell DJ, 2001: Jing: a downstream target of slbo required for developmental control of border cell migration. *Development.* 2001 Feb;128(3):321-30.

Lundquist EA, Reddien PW, Hartwieg E, Horvitz HR, Bargmann CI, 2001: Three *C. elegans* Rac proteins and several alternative Rac regulators control axon guidance, cell migration and apoptotic cell phagocytosis *Development.* 2001 Nov;128(22):4475-88.

Maa MC, Wilson LK, Moyers JS, Vines RR, Parsons JT, Parsons SJ, 1992: Identification and characterization of a

cytoskeleton-associated, epidermal growth factor sensitive pp60c-src substrate. *Oncogene*. 1992 Dec;7(12):2429-38.

Mack CP, Somlyo AV, Hautmann M, Somlyo AP, Owens GK, 2001: Smooth muscle differentiation marker gene expression is regulated by RhoA-mediated actin polymerization. *J Biol Chem*. 2001 Jan 5;276(1):341-7.

Manning G, Krasnow MA, 1993: Development of the *Drosophila* tracheal system. In: *The Development of Drosophila melanogaster*, Bate M, Martines Arias A eds (New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press). Pp. 609-686.

Margolis J, Spradling A, 1995: Identification and behavior of epithelial stem cells in the *Drosophila* ovary. *Development*. 1995 Nov;121(11):3797-807.

Martin JR, Raibaud A, Ollo R, 1994: Terminal pattern elements in *Drosophila* embryo induced by the torso-like protein. *Nature*. 1994 Feb 24;367(6465):741-5.

Mata J, Curado S, Ephrussi A, Rørth P, 2000: Tribbles coordinates mitosis and morphogenesis in *Drosophila* by regulating string/CDC25 proteolysis. *Cell*. 2000 May 26;101(5):511-22.

May RC, 2001: The Arp2/3 complex: a central regulator of the actin cytoskeleton. *Cell Mol Life Sci*. 2001 Oct;58(11):1607-26.

McDonald JA, Pinheiro EM, Montell DJ, 2003: PVF1, a PDGF/VEGF homolog, is sufficient to guide border cells and interacts genetically with Taiman. *Development*. 2003 Aug;130(15):3469-78.

McNiven MA, Kim L, Krueger EW, Orth JD, Cao H, Wong TW, 2000: Regulated interactions between dynamin and the actin-binding protein cortactin modulate cell shape. *J Cell Biol*. 2000 Oct 2;151(1):187-98.

Mercher T, Coniat MB, Monni R, Mauchauffe M, Khac FN, Gressin L, Mugneret F, Leblanc T, Dastugue N, Berger R, Bernard OA, 2001: Involvement of a human gene related to the Drosophila spen gene in the recurrent t(1;22) translocation of acute megakaryocytic leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 May 8;98(10):5776-9.

Migliarese MR, Mannion-Henderson J, Wu H, Parsons JT, Bender TP, 1994: The protein tyrosine kinase substrate cortactin is differentially expressed in murine B lymphoid tumors. Oncogene. 1994 Jul;9(7):1989-97.

Miki H, Yamaguchi H, Suetsugu S, Takenawa T, 2000: IRSp53 is an essential intermediate between Rac and WAVE in the regulation of membrane ruffling. Nature. 2000 Dec 7;408(6813):732-5.

Miralles F, Posern G, Zaromytidou AI, Treisman R, 2003: Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL. Cell. 2003 May 2;113(3):329-42.

Mitchison TJ, Cramer LP, 1996: Actin-based cell motility and cell locomotion. Cell. 1996 Feb 9;84(3):371-9.

Miwa T, Kedes L, 1987: Duplicated CARG box domains have positive and mutually dependent regulatory roles in expression of the human alpha-cardiac actin gene. Mol Cell Biol. 1987 Aug;7(8):2803-13.

Montagne J, Groppe J, Guillemin K, Krasnow MA, Gehring WJ, Affolter M, 1996: The Drosophila Serum Response Factor gene is required for the formation of intervein tissue of the wing and is allelic to blistered. Development. 1996 Sep;122(9):2589-97.

Montell DJ, 2003: Border-cell migration: the race is on. Nat Rev Mol Cell Biol. 2003 Jan;4(1):13-24.

Montell DJ, King RC, 1970: Ovarian development in Drosophila melanogaster (New York, Academic Press)**King RC, 1970:** Ovarian development in Drosophila melanogaster (New

York, Academic Press) **P, Spradling AC, 1992:** slow border cells, a locus required for a developmentally regulated cell migration during oogenesis, encodes Drosophila C/EBP. *Cell*. 1992 Oct 2;71(1):51-62.

Moreau V, Galan JM, Devilliers G, Haguenuer-Tsapis R, Winsor B, 1997: The yeast actin-related protein Arp2p is required for the internalization step of endocytosis. *Mol Biol Cell*. 1997 Jul;8(7):1361-75.

Murphy AM, Montell DJ, 1996: Cell type-specific roles for Cdc42, Rac, and RhoL in Drosophila oogenesis. *J Cell Biol*. 1996 May;133(3):617-30.

Muscat GE, Gustafson TA, Kedes L, 1988: A common factor regulates skeletal and cardiac alpha-actin gene transcription in muscle. *Mol Cell Biol*. 1988 Oct;8(10):4120-33.

Ng SY, Gunning P, Liu SH, Leavitt J, Kedes L, 1989: Regulation of the human beta-actin promoter by upstream and intron domains. *Nucleic Acids Res*. 1989 Jan 25;17(2):601-15.

Niewiadowska P, Godt D, Tepass U, 1999: DE-Cadherin is required for intercellular motility during Drosophila oogenesis. *Cell Biol*. 1999 Feb 8;144(3):533-47.

Nishihara H, Maeda M, Oda A, Tsuda M, Sawa H, Nagashima K, Tanaka S, 2002: DOCK2 associates with CrkL and regulates Rac1 in human leukemia cell lines. *Blood*. 2002 Dec 1;100(12):3968-74.

Nolan KM, Barrett K, Lu Y, Hu KQ, Vincent S, Settleman J, 1998: Myoblast city, the Drosophila homolog of DOCK180/CED-5, is required in a Rac signaling pathway utilized for multiple developmental processes. *Genes Dev*. 1998 Nov 1;12(21):3337-42.

Okamura H, Resh MD, 1995: p80/85 cortactin associates with the Src SH2 domain and colocalizes with v-Src in transformed cells. *J Biol Chem.* 1995 Nov 3;270(44):26613-8.

Ozawa K, Kashiwada K, Takahashi M, Sobue K, 1995: Translocation of cortactin (p80/85) to the actin-based cytoskeleton during thrombin receptor-mediated platelet activation. *Exp Cell Res.* 1995 Nov;221(1):197-204.

Parent CA, Devreotes PN, 1999: A cell's sense of direction. *Science.* 1999 Apr 30;284(5415):765-70.

Parsons JT, Parsons SJ, 1997: Src family protein tyrosine kinases: cooperating with growth factor and adhesion signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol.* 1997 Apr;9(2):187-92.

Patel AS, Schechter GL, Wasilenko WJ, Somers KD, 1998: Overexpression of EMS1/cortactin in NIH3T3 fibroblasts causes increased cell motility and invasion in vitro. *Oncogene.* 1998 Jun 25;16(25):3227-32.

Pollard TD, Borisy GG, 2003: Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell.* 2003 Feb 21;112(4):453-65.

Posern G, Sotiropoulos A, Treisman R, 2002: Mutant actins demonstrate a role for unpolymerized actin in control of transcription by serum response factor. *Mol Biol Cell.* 2002 Dec;13(12):4167-78.

Queenan AM, Ghabrial A, Schupbach T, 1997: Ectopic activation of torpedo/Egfr, a Drosophila receptor tyrosine kinase, dorsalizes both the eggshell and the embryo. *Development.* 1997 Oct;124(19):3871-80.

Reddien PW, Horvitz HR, 2000: CED-2/CrkII and CED-10/Rac control phagocytosis and cell migration in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Cell Biol.* 2000 Mar;2(3):131-6.

Ribeiro C, Petit V, Affolter M, 2003: Signaling systems, guided cell migration, and organogenesis: insights from genetic studies in *Drosophila*. *Dev Biol*. 2003 Aug 1;260(1):1-8.

Robinson DN, Cooley L, 1997: Genetic analysis of the actin cytoskeleton in the *Drosophila* ovary. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1997;13:147-70.

Rogat AD, Miller KG, 2002: A role for myosin VI in actin dynamics at sites of membrane remodeling during *Drosophila* spermatogenesis. *J Cell Sci*. 2002 Dec 15;115(Pt 24):4855-65.

Rørth P, 1996: A modular misexpression screen in *Drosophila* detecting tissue-specific phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Oct 29;93(22):12418-22.

Rørth P, Szabo K, Bailey A, Laverty T, Rehm J, Rubin GM, Weigmann K, Milan M, Benes V, Ansorge W, Cohen SM, 1998: Systematic gain-of-function genetics in *Drosophila*. *Development*. 1998 Mar;125(6):1049-57.

Rørth P, Szabó K, Texido G, 2000: The level of C/EBP protein is critical for cell migration during *Drosophila* oogenesis and is tightly controlled by regulated degradation. *Mol Cell*. 2000 Jul;6(1):23-30.

Rushton E, Drysdale R, Abmayr SM, Michelson AM, Bate M, 1995: Mutations in a novel gene, *myoblast city*, provide evidence in support of the founder cell hypothesis *Drosophila* muscle development. *Development*. 1995 Jul;121(7):1979-88.

Salgia R, Pisick E, Sattler M, Li JL, Uemura N, Wong WK, Burky SA, Hirai H, Chen LB, Griffin JD, 1996: p130CAS forms a signaling complex with the adapter protein CRKL in hematopoietic cells transformed by the BCR/ABL oncogene. *J Biol Chem*. 1996 Oct 11;271(41):25198-203.

Savant-Bhonsale S, Montell DJ, 1993: torso-like encodes the localized determinant of Drosophila terminal pattern formation. *Genes Dev.* 1993 Dec;7(12B):2548-55.

Schaller MD, Hildebrand JD, Shannon JD, Fox JW, Vines RR, Parsons JT, 1994: Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src. *Mol Cell Biol.* 1994 Mar;14(3):1680-8.

Schuuring E, Verhoeven E, Litvinov S, Michalides RJ, 1993: The product of the EMS1 gene, amplified and overexpressed in human carcinomas, is homologous to a v-src substrate and is located in cell-substratum contact sites. *Mol Cell Biol.* 1993 May;13(5):2891-98.

Selvaraj A, Prywes R, 2003: Megakaryoblastic leukemia-1/2, a transcriptional co-activator of serum response factor, is required for skeletal myogenic differentiation. *J Biol Chem.* 2003 Oct 24;278(43):41977-87.

Silver DL, Montell DJ, 2001: Paracrine signaling through the JAK/STAT pathway activates invasive behavior of ovarian epithelial cells in Drosophila. *Cell.* 2001 Dec 28;107(7):831-41.

Sotiropoulos A, Gineitis D, Copeland J, Treisman R, 1999: Signal-regulated activation of serum response factor is mediated by changes in actin dynamics. *Cell.* 1999 Jul 23;98(2):159-69.

Sparks AB, Rider JE, Hoffman NG, Fowlkes DM, Quillam LA, Kay BK, 1996: Distinct ligand preferences of Src homology 3 domains from Src, Yes, Abl, Cortactin, p53bp2, PLCgamma, Crk, and Grb2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Feb 20;93(4):1540-4.

Spradling, A, 1993: Developmental Genetics of Oogenesis. In: *The Development of Drosophila melanogaster*, Bate M, Martinez Arias A eds (New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp 1-70.

Stevens LM, Frohnhof HG, Klingler M, Nusslein-Volhard C, 1990: Localized requirement for torso-like expression in follicle cells for development of terminal anlagen of the *Drosophila* embryo. *Nature*. 1990 Aug 16;346(6285):660-3.

St Johnston D, 2002: The art and design of genetic screens: *Drosophila melanogaster*. *Nat Rev Genet*. 2002 Mar;3(3):176-88.

Szabó K, Jékely G, Rørth P, 2001: Cloning and expression of *sprint*, a *Drosophila* homologue of RIN1. *Mech Dev*. 2001 Mar;101(1-2):259-62.

Tateno M, Nishida Y, Adachi-Yamada T, 2000: Regulation of JNK by Src during *Drosophila* development. *Science*. 2000 Jan 14;287(5451):324-7.

Thomas SM, Soriano P, Imamoto A, 1995: Specific and redundant roles of Src and Fyn in organizing the cytoskeleton. *Nature*. 1995 Jul 20;376(6537):267-71.

Tilghman RW, Hoover RL, 2002: The Src-cortactin pathway is required for clustering of E-selectin and ICAM-1 in endothelial cells. *FASEB J*. 2002 Aug;16(10):1257-9.

Treisman R, 1994: Ternary complex factors: growth factor regulated transcriptional activators. *Curr Opin Genet Dev*. 1994 Feb;4(1):96-101.

Uruno T, Liu J, Zhang P, Fan Yx, Egile C, Li R, Mueller SC, Zhan X, 2001: Activation of Arp2/3 complex-mediated actin polymerization by cortactin. *Nat Cell Biol*. 2001 Mar;3(3):259-66.

van Damme H, Brok H, Schuurin-Scholtes E, Schuurin E, 1997: The redistribution of cortactin into cell-matrix contact sites in human carcinoma cells with 11q13 amplification is associated with both overexpression and post-translational modification. *J Biol Chem*. 1997 Mar 14;272(11):7374-80.

Verheyen EM, Cooley L, 1994: Profilin mutations disrupt multiple actin-dependent processes during Drosophila development. *Development*. 1994 Apr;120(4):717-28.

Vidal C, Geny B, Melle J, Jandrot-Perrus M, Fontenay-Roupie M, 2002: Cdc42/Rac1-dependent activation of the p21-activated kinase (PAK) regulates human platelet lamellipodia spreading: implication of the cortical-actin binding protein cortactin. *Blood*. 2002 Dec 15;100(13):4462-9.

Voie AM, Cohen S, 1998: Germ-line transformation of *Drosophila melanogaster*. In: *Cell Biology: A laboratory Handbook, Second Edition Vol. 3, 1998*. pp: 510-517.

Vouret-Craviari V, Bourcier C, Boulter E, van Obberghen-Schilling E, 2002: Distinct signals via Rho GTPases and Src drive shape changes by thrombin and sphingosine-1-phosphate in endothelial cells. *J Cell Sci*. 2002 Jun 15;115(Pt 12):2475-84.

Vuori K, Ruoslahti E, 1995: Tyrosine phosphorylation of p130Cas and cortactin accompanies integrin-mediated cell adhesion to extracellular matrix. *J Biol Chem*. 1995 Sep 22;270(38):22259-62.

Wahlstrom G, Vartiainen M, Yamamoto L, Mattila PK, Lappalainen P, Heino TI, 2001: Twinfilin is required for actin-dependent developmental processes in *Drosophila*. *J Cell Biol*. 2001 Nov 26;155(5):787-96.

Wang D, Chang PS, Wang Z, Sutherland L, Richardson JA, Small E, Krieg PA, Olson EN, 2001: Activation of cardiac gene expression by myocardin, a transcriptional cofactor for serum response factor. *Cell*. 2001 Jun 29;105(7):851-62.

Wang DZ, Li S, Hockemeyer D, Sutherland L, Wang Z, Schratt G, Richardson JA, Nordheim A, Olson EN, 2002: Potentiation of serum response factor activity by a family

of myocardin-related transcription factors. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Nov 12;99(23):14855-60.

Weaver AM, Heuser JE, Karginov AV, Lee WL, Parsons JT, Cooper JA, 2002: Interaction of cortactin and N-WASp with Arp2/3 complex. Curr Biol. 2002 Aug 6;12(15):1270-8.

Weaver AM, Karginov AV, Kinley AW, Weed SA, Li Y, Parsons JT, Cooper JA, 2001: Cortactin promotes and stabilizes Arp2/3-induced actin filament network formation. Curr Biol. 2001 Mar 6;11(5):370-4.

Weaver AM, Young ME, Lee WL, Cooper JA, 2003: Integration of signals to the Arp2/3 complex. Curr Opin Cell Biol. 2003 Feb;15(1):23-30.

Weed SA, Du Y, Parsons JT, 1998: Translocation of cortactin to the cell periphery is mediated by the small GTPase Rac1. J Cell Sci. 1998 Aug;111 (Pt 16):2433-43.

Weed SA, Karginov AV, Schafer DA, Weaver AM, Kinley AW, Cooper JA, Parsons JT, 2000: Cortactin localization to sites of actin assembly in lamellipodia requires interactions with F-actin and the Arp2/3 complex. J Cell Biol. 2000 Oct 2;151(1):29-40.

Weed SA, Parsons JT, 2001: Cortactin: coupling membrane dynamics to cortical actin assembly. Oncogene. 2001 Oct 1;20(44):6418-34.

Wu H, Parsons JT, 1993: Cortactin, an 80/85-kilodalton pp60src substrate, is a filamentous actin-binding protein enriched in the cell cortex. J Cell Biol. 1993 Mar;120(6):1417-26.

Xu T, Harrison SD, 1994: Mosaic analysis using FLP recombinase. J Biol Chem. Methods Cell Biol. 1994; 44:655-81.

Zhan X, Hu X, Hampton B, Burgess WH, Friesel R, Maciag T, 1993: Murine cortactin is phosphorylated in response to fibroblast growth

factor-1 on tyrosine residues late in the G1 phase of the BALB/c 3T3 cell cycle. *J Biol Chem.* 1993 Nov 15;268(32):24427-31.

Zhan X, Plourde C, Hu X, Friesel R, Maciag T, 1994:
Association of fibroblast growth factor receptor-1 with c-Src correlates with association between c-Src and cortactin. *J Biol Chem.* 1994 Aug 12;269(32):20221-4.

8. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

Sinka R, Jankovics F, Somogyi K, Szlanka T, Lukacsovich T, Erdélyi M.

poirot, a new regulatory gene of *Drosophila oskar* acts at the level of the short Oskar protein isoform.

Development. 2002 Jul;129(14):3469-78.

Duchek P, Somogyi K, Jékely G, Beccari S, Rørth P.

Guidance of cell migration by the *Drosophila* PDGF/VEGF receptor.

Cell. 2001 Oct 5;107(1):17-26.

Somogyi K, Rørth P

Cortactin modulates cell migration and ring canal morphogenesis during *Drosophila* oogenesis.

Mechanisms of Development, 2004 Jan;121(1):57-64.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom Dr. Pernille Rørthnak, aki amellett, hogy lehetőséget biztosított számomra, hogy a munkacsoportjához csatlakozhassam, elméleti és gyakorlati tanácsaival, nemegyszer a kísérleti munkába való aktív bekapcsolódással járult hozzá a minél eredményesebb munkámhoz.

Hálás vagyok a Rørth munkacsoport minden egykori és jelenlegi tagjának az ösztönzésért, egyben kellemes hangulatú munkahelyi légkörért és azért a sok kisebb-nagyobb segítségért, ami nélkül sokkal nehezebb, vagy éppen lehetetlen lett volna eredményeket elérni.

Az EMBL heidelbergi fejlődésbiológiai programja olyan munkatársakból álló környezetet teremtett, ahol minden fölmerülő problémához található abban segíteni képes ember. Köszönet érte.

Köszönet illeti Dr. Kiss Istvánt, aki egyrészt szakmai vezetőként mindvégig figyelemmel kísérte a munkámat, másrészt a Szegedi Biológiai Központ Genetikai Intézetében alkalmat adott arra, hogy a munkacsoportjához csatlakozzam és ott a *Drosophila* genetika alapjaival megismerkedhessem. E tanulási folyamatban nagy része volt a környezetemben dolgozó munkatársaknak is, a Szegedi Biológiai Központ Genetikai Intézetének dolgozóinak és különösen a *Drosophila*-közösségnek. Köszönöm segítségüket.

E dolgozat munkahelyi bírálását Dr. Gausz János és Dr. Török Tibor végezték. Köszönettel tartozom alapos és lelkiismeretes munkájukért.

Hála illeti családom tagjait kitartó, szeretettelgi támogatásukért.