

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR

MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA
SZEGEDI BIOLÓGIA KÖZPONT
GENETIKAI INTÉZET

„XXXI. OTDK Biológia Szekció”

***A *Drosophila melanogaster* embrionális háti záródásában résztvevő gének
azonosítása és jellemzése***

OTDK dolgozat

Készítette: Lakatos Zsanett,
Biológus MSc, II.

Témavezető: Dr. Jankovics Ferenc

Belső konzulens: Dr. Sinka Rita

Szeged, 2012

1. Tartalomjegyzék

1. Tartalomjegyzék.....	2
2. Bevezető.....	3
2.1. A sejtvázs.....	3
2.2. A mikrotubulusvázs.....	3
2.3. Az aktinvázs.....	5
2.4. Spektraplakin keresztkötő fehérjék.....	6
3. Háti záródás.....	8
4. A sejtvázs szerepe a háti záródásban.....	10
5. Célkitűzések.....	11
6. Anyagok és módszerek.....	12
6.1. Drosophila melanogaster törzsek és tartásuk.....	12
6.2. Duplaszálú RNS (dsRNS) molekulák előállítása.....	12
6.3. DsRNS injektálása, in vivo mikroszkópia.....	13
6.4. Immunhisztokémia.....	13
7. Eredmények.....	15
7.1. Funkcióvesztéses szűrés.....	15
7.2. A shot gén szerepe a sejtvázs működésében.....	18
8. Összefoglalás.....	19
9. Irodalom.....	20
10. Köszönetnyilvánítás.....	22
11. Nyilatkozat.....	23

2. Bevezető

2.1. A sejtvááz

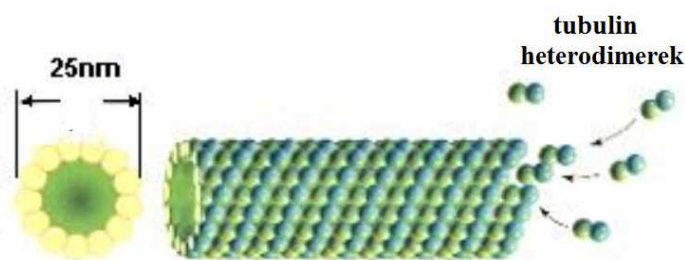
Az eukarióta sejtek jellegzetes szerkezeti eleme a sejtvááz, (citoszkeleton), mely három fő komponensből épül fel: mikrotubulusokból, az aktinfilamentumokból és az intermedier filamentumokból. A sejtvááz egy számos folyamatban fontos szerepet betöltő, dinamikus szerveződött rendszer, amely állandóan változik, ahogy a sejtek alakjukat változtatják, mozognak, vagy éppen osztódnak. Jelentős szerepe van a sejt alakjának meghatározásában és a citoplazma szerkezetének kialakításában. A strukturális szerep mellett a sejt mozgásáért is felelős. Ez nem csak a sejt egészének mozgását jelenti, hanem az egyes organellek intracelluláris transzportját, illetve a kromoszómák mozgását, vagy a sejt kettéválasztását a sejtosztódás során (1).

2.2. A mikrotubulusvááz

A mikrotubulusoknak meghatározó szerepük van a sejtek szerkezetének kialakításában. Hosszú és viszonylag merev csőrendszert alkotnak, amely igen gyorsan képes a szétszerelésre, illetve arra, hogy a sejt egy másik részén újból összeszerelődjön (1).

A mikrotubulusok (MT) kb. 25 nm átmérőjű polimer molekulák, melyeket globuláris szerkezetű α - és β -tubulin alegységekből álló heterodimerek építenek fel. A polimerizáció során a tubulin-heterodimerek szigorúan fej-farok elrendezésben összekapcsolódnak és fonalszerű struktúrákba, ún. protofilamentumokba szerveződnek. A MT-ok jellegzetes hengeres formájának kialakulásához 13 protofilamentum laterálisan illeszkedik egymáshoz oly módon, hogy egymáshoz képest mintegy 0,9 nm-rel el vannak csúszva (1. ábra). A mikrotubulusok polarizált struktúrák. A tubulin heterodimerek MT-hoz történő asszociációjának, illetve disszociációjának sebességét a citoplazma szabad dimer koncentrációja szabja meg. Ez a kritikus koncentráció a MT két végén nem azonos, így megkülönböztethetünk egy gyors („+”) és egy lassú („-”) véget (2). A mínusz vég általában a mikrotubulus-organizációs centrumhoz (MTOC) kapcsolódik, amely az állati sejtekben általában a centroszóma. A MT-ok „-” végei az itt található, tubulinból álló gyűrűkhöz

kapcsolódnak. Egy-egy ilyen gyűrű 13 alegységből áll és polimerizációs magként működik, melyre az α - és β - tubulinból álló heterodimerek fokozatosan ráépülnek (3-5).



1. ábra. A mikrotubulusok felépítése (6).

A mikrotubulusok „+” végei dinamikus instabilitást mutatnak. Ha egy élő sejtben megfigyeljük őket, azt találjuk, hogy ha egyszer a polimerizáció elindult, akkor egy jó ideig nagy sebességgel folytatódik, majd a polimerizációt hirtelen depolimerizáció követi, az alegységek nagyon gyorsan disszociálódnak a szabad végről. Dinamikus instabilitás következtében a mikrotubulusok hossza több mikron tartományban változhat, ez a mikrotubulusok és végső soron a sejtek működése szempontjából nagyon fontos mikrotubulus hálózatok átszerveződését biztosítja (1). Ha valamilyen vegyülettel megakadályozzuk a dinamikus instabilitást, megakadályozzuk a MT-hoz kapcsolt sejtfunkciók elvégzését is, ami a sejtek elpusztulásához vezet. Az egyik legrégebben ismert ilyen molekula a kolhicin, mely a tubulin heterodimerekhez szorosan kapcsolódva megakadályozza azok polimerizációját és nagy koncentrációban a MT-ok gyors lebomlását okozza (7). A MT-ok igen sokrétű feladatának ellátását és azok összehangolását a hozzájuk kapcsolódó fehérjék, mikrotubulus-asszociált fehérjék (MAP) teszik lehetővé. A MAP-ok megóvják a MT-okat a szétszerelődéstől, stabilizálják a kialakult struktúrát. Ezek a fehérjék nem csak stabilizálják a MT-okat, hanem kapcsolódnak más sejtalkotókhoz is, mint pl. egyéb sejtvézelemek vagy transzportvezikulák (1).

2.3. Az aktinváz

A mikrofilamentumok, 7-9 nm átmérőjű helikális szerkezetű aktin polimerek, melyeket globuláris G-aktin monomerek építenek fel. Akárcsak a mikrotubulusoknak, az aktin polimernek is határozott polaritása van: a mikrofilamentumok egy gyorsan növekvő „+” véggel és egy lassan növekvő „-” véggel rendelkeznek (2.ábra). A MT-okkal ellentétben azonban az aktinfilamentumok nem mutatnak drámai dinamikus instabilitást, hanem taposómalom (treadmilling) módjára viselkedik: folyamatosan lépnek be monomerek a plusz végen és lépnek ki a mínusz végen, és eközben a filamentum hossza nem változik (8).



2. ábra. Az aktinfilamentum felépítése (6).

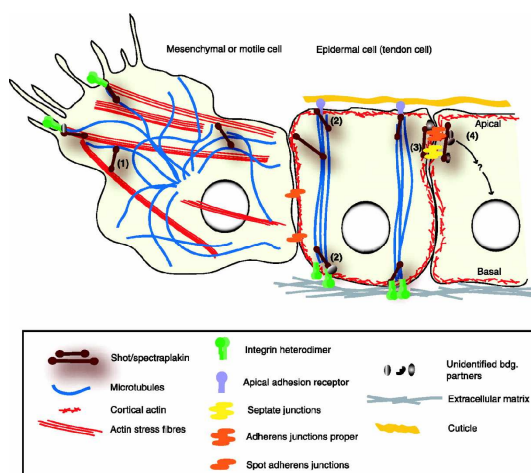
Azt, hogy egy bizonyos helyen és időben milyen típusú aktinlánc és magasabbrendű filamentumszerkezet jön létre, különböző szabályozó funkciókkal bíró fehérjék szabják meg. Ilyenek egyrészt a szabad filamentumvégeket lefedő (capping) fehérjék, melyek megakadályozzák, hogy az adott filamentum a szükségesnél tovább növekedjen vagy éppen idő előtt depolimerizálódjon. Másrészt ilyenek a depolimerizációt vagy a filamentum elhasítását (severing) elősegítő fehérjék, illetve harmadrészt az új aktinláncok inicializációját elősegítő nukleáló/polimerizációs faktorok. Szükség van továbbá olyan fehérjékre is, melyek képesek az aktinfilamentumokat hálózatos szerkezetbe, vagy kötegekbe rendezni (bundling).

A mikrofilamentumok járulékos fehérjék révén nagyon változatos struktúrákat alakítanak ki, amelyek egyaránt lehetnek stabil vagy instabil képződmények. Stabil képződmény például a sejtkortex, ami plazmamembrán közelében koncentrálódó mikrofilamentumok háromdimenziós hálózata. Az aktinszálak a sejt belsejében található stresszfilamentumokban is akár órákig stabilak lehetnek. A dinamikus struktúrákban azonban az aktinfilamentumok perces-másodperces időskálán is képesek átépülni. Ilyen dinamikus aktin alapú képződmények a lamellipódiumok és a filopódiumok, melyek folyamatosan

alakulnak ki és húzódnak vissza a sejt mozgásának irányába eső végén (9). A lamellipódiumok nagy felületű, lapos kitüremkedések, melyekben az összekapcsolódó aktinfilamentumok sűrű hálózatot alkotnak. A filopódiumok ezzel szemben ujszerű sejtnyúlványok, melyekben az aktinszálak nem ágaznak el, hanem hosszú, párhuzamos kötegekbe rendeződnek.

2.4. Spektraplakin keresztkötő fehérjék

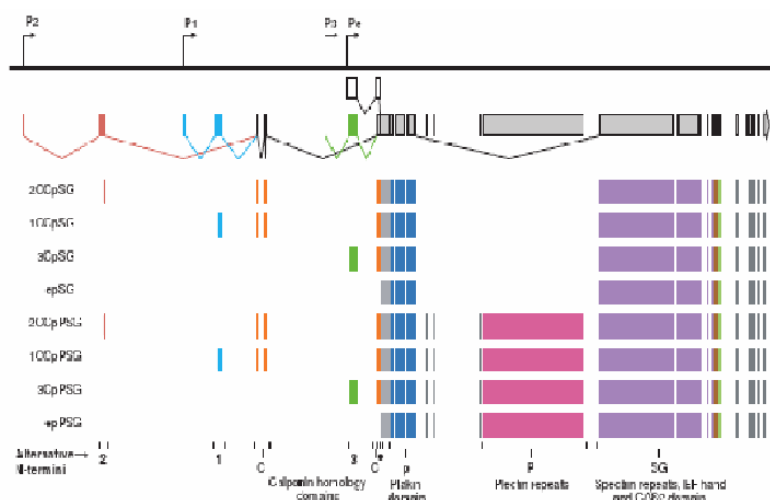
A sejtek és a szövetek integritásának megőrzése érdekében a sejtvázs különböző összetevői kölcsönhatásba lépnek egymással (10). Ezeket a kölcsönhatásokat olyan fehérjék szabályozzák, amelyek egyidejűleg többféle sejtvázelemekhez képesek kapcsolódni. A különféle sejtvázelemek közötti kölcsönhatásokat biztosító fehérjék egyik legfontosabb csoportja az evolúciósan konzervált spektraplakinok családja. A spektraplakinok óriási méretű citoszkeletális fehérjék, melyeknek számos funkcionális doménnel rendelkeznek. A spektraplakinok nevüket a spektrin és a plakinn doménjeikről kapták, de rendelkeznek még N-terminális aktinkötő és C-terminális MT-kötő EF-hand és GAS doménekkel is (11). Változatos doménszerkezetüknek köszönhetően a spektraplakinok minden sejtvázelemmel és a sejtadhéziós komplexekkel is kölcsönhatásba léphetnek és azokat keresztköthetik.



3. ábra. Spektraplakin fehérjék funkcióinak vázlatja ecetmuslicában. 1. Sejtvázs elemek közötti keresztkötéseket alakítanak ki. 2. citoszkeletont a sejtmembrán fehérjeihez kötik, 3. kortikális citoszkeletont és a sejtmembrán kapcsolódását biztosítják, 4. váz fehérjék, melyek szignalizációs fehérjéket toboroznak a citoszkeletális aktivitás helyére (10).

Az ecetmuslica genomjában egyetlen spektraplakin gén, a *short stop* (*shot*) található (10). A spektraplakin fehérjék hossza akár 8843 aminosav is lehet, ami a harmadik

legnagyobb fehérje az ecetmuslicában. A magasabbrendű állatokéhoz hasonlóan az ecetmuslica *shot* génje is számos protein domént tartalmaz melyek alternatív splicing és promóterhasználat során szabadon kombinálódhatnak egymással, így változatos hosszúságú és funkciójú fehérjék képződnek (4. ábra). A *shot* gén kivételes hosszúsága és az izoformák változékonysága miatt számos feladatot lát el a különböző típusú differenciált sejtekben: a neuronok növekedési kúpjában a mikrotubulusok dinamikáját szabályozza, a hámban a sejtadhéziók integritását biztosítja, a tracheában az új sejt-sejt kapcsolatokat kialakulását irányítja, az embrionális tendon sejtekben a bazális aktinvázat kapcsolja a MT-okhoz.

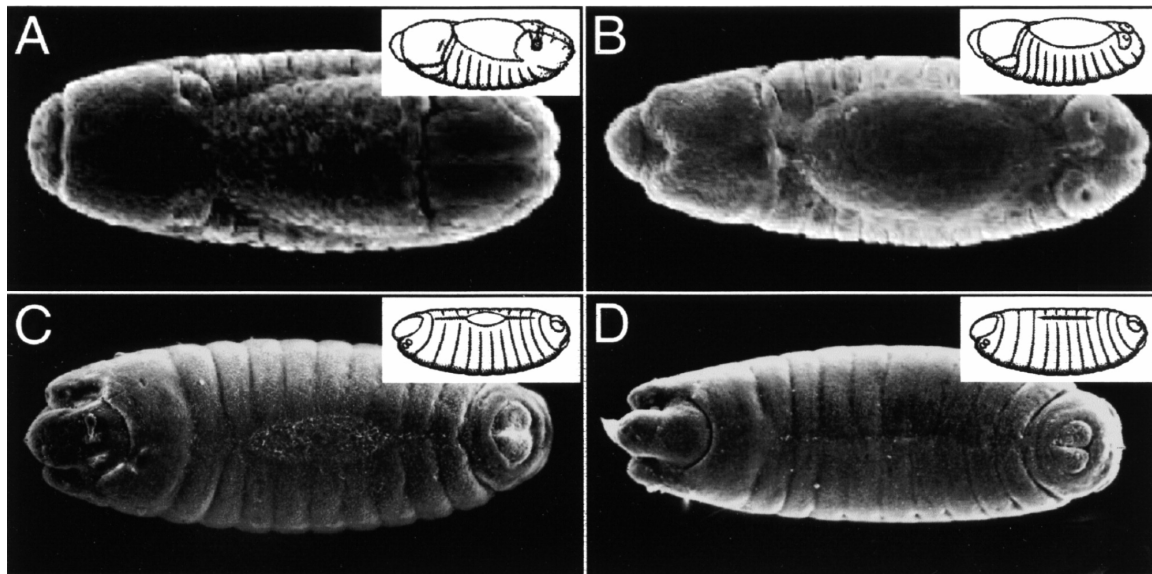


4. ábra. A *shot* gén szerkezete splicing és fehérje izoformák ecetmuslicában(11). A nyilak a vonal felett a transzkripció alternatív starthelyeit mutatják (P2, P1, P3, Pe). A különböző méretű és színű téglalapok az exonokat szemléltetik. A különböző alternatív transzkriptumok lejjebb láthatóak. Balról jobbra haladva: különböző N-terminális (2,1,3, e), C-terminálison calponin homológia domén, közös plakin domén (p), a plectin-repeat domén (P), a spektrin-repeat domain,EF-hand és a GAS2 domain. Bal oldalt az egyes izoformák nevei láthatóak (11).

3. A háti záródás

Az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) teljes átalakulással (holometamorphosis) fejlődik, vagyis egyedfejlődése során pete-larva-báb-imágó stadiumokon megy keresztül. Az embrionális fejlődés a megtermékenyítéstől a peteburokból való kibújásig tart, időtartama szobahőmérsékleten hozzávetőlegesen 24 óra. Az állatok korát a peterakástól, mint kezdőponttól számított órákban mérjük (AEL, after egg laying) (13).

Az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) embriogenezise során az embrió hátán egy nyílás alakul ki, amelyet a két oldalsó hámlemez a háti középvonal mentén bezár. A háti záródás során a két egyrétegű oldalsó hámlemez egymás felé közelít, majd találkoznak és összeolvadnak, kialakítva ezzel egy folytonos hámszövetet. A háti nyílás kialakulásakor az embriót az amnioszeróza fedi a két oldalsó hámlemez között, ami a záródás végére a hám alá kerül és apoptózissal elpusztul (14).

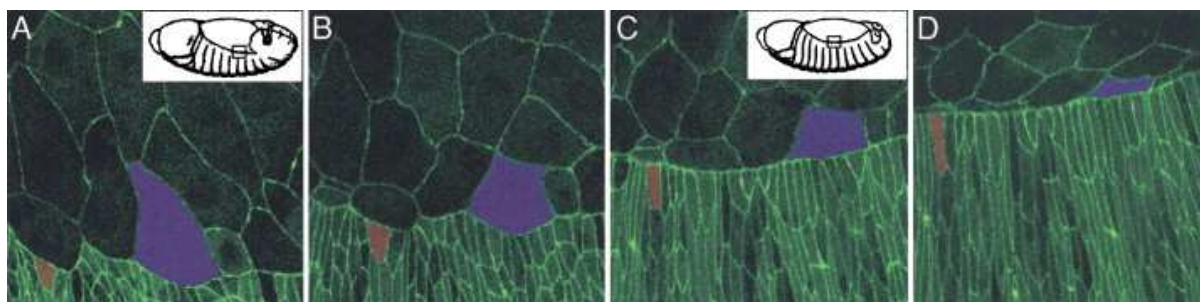


5. ábra. Scanning elektronmikroszkópos felvételek *Drosophila* embriók háti záródásának folyamatáról. A háti záródás 4 fázisát szemlélteti: (A) Iniciáció, (B), a két oldalsó hám egymáshoz közelít, (C) cipzározódás és (D) terminációs fázis (12).

A hámzáródás négy egymást részben átfedő folyamat sorozatából áll. Az iniciáció során (8 óra AEL, 1A ábra) a csírasáv visszahúzódik a fejlődő embrió poszterior részére, így az embriót a háti oldalon egyedül az amnioszeróza sejtréteg védi. A hám és az amnioszeróza morfológiailag jól megkülönböztethető (6. ábra). A két szövet határán, a hám első sejtora

(DME sejtek) kiemelt fontosságú a háti záródás szempontjából. Az iniciáció során ezek a sejtek reagálnak a záródást elindító jelmolekulákra, majd hajtják végre a záródást és végül közöttük alakulnak ki a háti nyílást bezáró sejt-kapcsolatok.

A második fázisban (9,5 óra AEL, 1B ábra) az egymással szemben lévő hámlemezek intenzíven egymás felé közelítenek. A DME sejtek egy sorba rendeződnek, alakjuk megváltozik, hát-hasi irányban megnyúlnak. Ebben a fázisban a hámsejtek polarizálódása figyelhető meg, ami molekuláris szinten a sejt-vázalelemek és a jelátviteli molekulák egyenetlen eloszlásában jelentkezik.



6. ábra. *alfa-Catenin-GFP-t* expresszáló embrió: Lila amnioszeróza (nagyobb sejtek) és a piros kisebb, megnyúlt, laterális hámsejtek. Az amnioszerózasejtek összehúzódnak, miközben a hámsejtek a mozgás irányába megnyúlnak (12).

A 3. szakasz (kb. 11óra AEL, 1C ábra) során, amelyet „cipzározás” szakasznak is neveznek, a hámsejtek a háti nyílás két végén összeérnek és a hámlemezek cipzárként összeolvadnak az embrió háti középvonala mentén. A sejtek találkozása az amnioszeróza sejtek kontrakciója által létrehozott húzóerő segítségével valósul meg, ami az oldalsó hámlemezeket húzza a háti középvonal felé. A DME sejtek közötti új sejt-sejt kapcsolatok kialakulása a filopódiumok segítségével történik. Ezek az aktinképződmények fontos szerepet játszanak abban, hogy a megfelelő embrionális szelvények egymásra találjanak és a lyuk bezáruljon.

Az utolsó, terminációs fázisban (12 óra AEL, 1D ábra) az összekapcsolódó hámlemezek mozgása megszűnik, a sejtek között megfelelő sejt-sejt kapcsolatok alakulnak ki (15).

4. A sejtvázs szerepe a háti záródásban

A háti záródás során a hámsejtekben a sejtvázelemek dinamikusan átrendeződnek, ami nélkülözhetetlen a normális hámzáródáshoz. A háti záródás előtt a hámsejtek aktinváza a sejt-kortex minden pontján egyenletes eloszlású. A záródás során azonban a DME sejtek amnioszerózával határos (dorzális) felszínén aktinfilamentumok halmozódnak fel és vastag aktinkötegeket alkotnak. A sejtek dorzális felszínén továbbá dinamikus filopódiumok és lamellipódiumok jelennek meg. Nagyszámú olyan gén ismert, ami a hámsejtek aktinvázának átalakulásához szükséges folyamatokat szabályozza. Ha az aktin felhalmozódás vegyszeres kezelés hatására vagy az aktinregulátorok hibás működése miatt zavart szenved, akkor a hámlemezek nem mozognak, a záródás nem történik meg és az embrió nyitott háttal elpusztul. Abban az esetben azonban, ha csupán a sejtnyúlványok működése hibás, akkor a két oldalsó hámlemez közel kerül egymáshoz, de a hámlemezek összekapcsolódása, a „cipzározódás” nem történik meg.

Bár az aktinváz szerepe a háti záródásban részletesen ismert, a sejtvázs másik komponensének, mikrotubulusváznak az elrendeződéséről és működéséről keveset tudunk. A záródást megelőzően a hámsejtekben a mikrotubulusok rendezetlenül, véletlenszerűen helyezkednek el. A záródás során azonban a MT-ok a sejt hossz tengelyével párhuzamosan stabil kötegekbe rendeződnek el. A MT-ok átrendeződése elsőként a DME sejtekben indul meg és később a laterálisabban elhelyezkedő hámsejtekre is kiterjed. A MT-ok nem centroszómából erednek, hanem az apikális sejt-kortexhez kapcsolódnak (16). A MT kötegek stabilak, de az őket felépítő egyedi MT-ok dinamikusan lebomlanak és újra polimerizálódnak. A dinamikus mikrotubulusok a sejtek dorzális felszínén belenőnek a lamellipódiumokba és a filopódiumokba, ami arra utal, hogy a sejtek ezen a részén a két sejtvázelem szorosan együttműködik. A záródás befejeztével a MT kötegek lebomlanak és a hámsejtekben ismét rendezetlen MT elrendeződés alakul ki. Mikrotubulusok teljes hiányában a hámlemezek mozgása normális, de a DME sejtek sejtnyúlványai csökevényesek, így a „cipzározódás” lelassul.

5. Célkitűzések

Különböző genetikai, biokémiai és sejtbioológiai vizsgálatok segítségével fény derült azokra szerkezeti és jelátviteli molekulákra, melyek fontos szerepet játszanak a háti záródásban. Számos tanulmány rámutatott már az aktin alapú struktúrák -- a filopódiumok és lamellipódiumok -- átrendeződésének fontosságára a háti záródásban, de a mikrotubulus hálózat funkciója kevésbé ismert. Több fehérjét leírtak már, melyek a polarizált mikrotubulusok plusz (+) végéhez kötődnek és így fokozzák vagy gátolják annak dinamikáját (EB1, Clip190, CHB, D-TACC, Msp, Klp10A) (17). Az elmúlt évtizedben végzett nagy léptékű funkcionális genomikai szűrések a mikrotubulusok új interakciós partnereinek azonosításához vezettek. Ezen túlmenően, sok előrelépés történt a mikrotubulusok dinamikájának és a mikrotubulusok mentén történő transzport folyamatok molekuláris mechanizmusainak megértése felé. Az azonban még mindig nem ismert, hogy az egyedi mikrotubulusok hogyan hoznak létre komplex mintázatokat és ezeknek mi a funkcionális jelentősége. Az sem világos még, hogy mi a mikrotubulusok pontos szerepe a sejt-kortexen képződő aktin alapú képződmények- a filopódiumok és lamellipódiumok kialakulásában a háti záródás alatt. A muslica embrió háti záródását modellként használva jobban megérthetjük a MT-váz átrendeződésének folyamatát, funkcióját és az ezt szabályozó fehérjéket. Elsődleges célunk a MT hálózat szerveződése és működése szempontjából fontos, a háti záródásban résztvevő gének azonosítása volt. Összességében arra akartunk választ kapni, hogy a mikrotubulusok miként járulnak hozzá az összehangolt változások sorozatához, melyek ahhoz vezetnek, hogy az embriók hátán keletkezett nyílás látható jel nélkül tűnik el.

6. Anyagok és módszerek

6.1. *Drosophila melanogaster* törzsek és tartásuk

A törzseket az általánosan használt kukorica-élesztő alapú táptalajon tartottuk 18 vagy 25°C-on, fiolákban és üvegben. Kísérleteink során vad típusú, ZCL432, shot[sf20] és Df(2R)BSC383 genotípusú törzsekkel dolgoztunk.

6.2. Duplaszálú RNS (dsRNS) molekulák előállítása

A génekre szekvencia-specifikus dsRNS molekulákat terveztünk. Az off-target hatás elkerülése érdekében a kiválasztott szakaszokat BLAST segítségével összehasonlítottuk a genom más régióival. A kiválasztott szekvenciákhoz pontosan illeszkedő, komplementer primereket terveztünk Primer3 programmal. A primereket PCR reakcióban használtuk fel.

A PCR során szigorúan ügyeltünk a megfelelő paraméterek optimalizálására. 18-20 nukleotid hosszúságú primereket terveztünk melyek GC:AT arányát 50-60 % közé állítottuk be. Olvadási hőmérsékletnek optimálisan 58 °C-ot állítottunk be. Továbbá feltételként szabtuk meg, hogy egymás után maximum 3 ugyanolyan nukleotid következzen. A termékek hossza 400-700 nukleotid közé esett. A primerek 5' vége elé T7 promóter szekvenciát illesztettünk. A PCR reakciót 50 µl végtérfogatú jégen tartott 0,2 ml-es polipropilén csövekbe mértük össze és DNA Engine® Peltier Thermal Cycler készülékben futtattuk.

A PCR reakció összetevőit 50 µl végtérfogatban mértük össze és a reakciót „DNA Engine Peltier Thermal Cycler” készülékben futtattuk. A reakcióelegy összetétele a következő volt: 1X Taq puffer, 2,5 µg/µl MgCl₂ oldat (25 mM), 0,4 µg/µl dNTP keverék (1 mM dATP, 1 mM dGTP, 1 mM dCTP, 1 mM dTTP), *Drosophilából* tisztított genomi DNS és végül, 0,02 U/µl Taq polimeráz, $0,4 \cdot 10^{-3}$ µg/µl forward primer, $0,4 \cdot 10^{-3}$ µg/µl reverz primer. A következő PCR-programot állítottuk be: 1. Denaturáció: 94 °C-on 1 percig, 2. Primertapadás: 55-60 °C-on 1percig, 3. Lánchosszabbítás: 72 °C, 1 percig. 25 x ismételtük a ciklust.

A PCR reakciók termékeit „QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN)” segítségével tisztítottuk meg.

In vitro transzkripcióval az amplifikált DNS szakaszokról RNS-t készítettünk T7 RiboMAX készlet segítségével. 2 x puffert (RiboMAX Express T7), PCR termékeket és T7 enzim mixet mértünk össze és 1 óráig 37°C-on inkubáltuk. 1 óra után a mintákhoz mértünk 1 μ DNáz oldatot és tovább inkubáltuk 37 °C-on 30 percig.

Az RNS molekulák kinyeréséhez RNS kicsapást végeztünk. 0,1 tf 3M Na-acetát oldatot és 1 tf izopropanolt adtunk a mintákhoz és 10 percig jégen hagytuk. 4 °C-on 13000 rpm-el 10 percig centrifugáltuk, a felülúszót óvatosan leszívtuk, majd -20 °C-os 70%-os etanolban mostuk, majd újra 4°C-on 13000 rpm-el 10 percig centrifugáltuk és a felülúszót leszívtuk. A termékeket vákuumban beszáritottuk (1 perc) és az RNS molekulákat RNáz mentes vízben oldottuk fel. Végül az egyszálú RNS-eket dsRNS-ké olvasztottuk össze. A PCR készülékben 60 °C-ra melegítettük a mintákat és fokozatosan hűtöttük le. 1 %-os agaróz gélben elválasztva TAE puffer felhasználásával ellenőriztük a dsRNS-ek jelenlétét és lemértük a koncentrációjukat.

6.3. dsRNS injektálása, *in vivo* mikroszkópia

A 0-30 perc AEL embriókat összegyűjtöttük és 1 percig 50%-os hipóval mostuk így eltávolítottuk az embriók külső korion burkát. Fedőlemezen a háti oldallal lefelé fordítva egyenként sorba rendeztünk és Halocarbon7S (VWR) olajjal lefedtük. Az 1 μ g/ μ l koncentrációjú dsRNS oldatot Transjector 5246 (Eppendorf) injektort használva üvegapillárisal az embrió laterális részébe injektáltuk. A kapillárisokat Flaming/Brown P-97 (Sutter Instrument Co.) micropipetta-húzóval állítottuk elő. Az embriókat a 7 óráig 25°C-on tartottuk, majd a háti záródásukat programozható Olympus CellR fluoreszcens mikroszkóppal filmeztük. A filmezéshez 10X objektívet és F-View II kamerát (Soft Imaging System, Münster) használtunk.

6.4. Immunhisztokémia

Az embriókat 50%-os hipóval dekorionizáltuk, majd heptán, 4%-os PBS-ben oldott formaldehid 1:1 arányú elegyében 20 percig rázattuk, ezután 3x20 percig PBT (PBS, 0.1% Triton X-100) oldatban mostuk. Az embriókat PBTN-ben (PBT, 5%FCS, 0,1% BSA) 3 órán keresztül blokkoltuk. Az embriókat egy éjszakán át 4°C-on anti-tubulin (1:10, DSHB)

elsődleges ellenanyaggal inkubáltuk. Az embriókat 3x20 perces PBT-s mosás után 1 órán keresztül PBTN-ben oldott Alexa-488-al jelölt másodlagos ellenanyaggal inkubáltuk (1:600), majd az aktint egy óráig rhodaminnal jelölt phalloidinnal festettük (1:20). Az embriókat ezután 3x20 percig PBT-ben mostuk, tárgylemezre raktuk és Leica konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk.

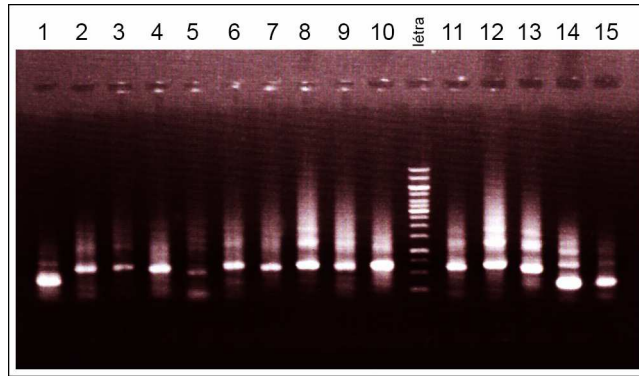
7. Eredmények

7.1. Funkcióvesztéses szűrés

Tizenhét gént választottunk ki, melyek irodalmi adatok alapján a mikrotubulusok dinamikáját befolyásolják (1. táblázat). A géneket RNS interferencián alapuló funkcióvesztéses vizsgálatnak vetettük alá. *In vitro* transzkripcióval a kiválasztott génekre specifikus dsRNS-eket szintetizáltunk, majd a géneket egyedileg, szekvencia-specifikusan csendesítettünk és megvizsgáltuk a háti záródásban betöltött szerepüket *in vivo* fluoreszcens videó mikroszkópiával.

	gének	primerek 5'-3' irányban		ds RNS koncentráció µg/µl
		forward	reverz	
1	Msp	ACGGAACGCGAAATAACC	AACGGTTGTCGTGGTCAG	4,2
2	clip190	GGGTGTTGTCCTTGACGA	GGGTGTTGTCCTTGACGA	3,9
3	Eb1	GATCGCCACGTGATTAAATAG	ACGAGTCTGTGAACCTTTCAA	2,9
4	Apc	TTTCGTCGTGGAGATTGG	ATGCAGAAGCGGAAGTCA	2,9
5	Apc2	AGAGACGATCCGCTCAGAC	TCCCTTCTCGGAGATTGAG	4,1
6	shot	AACCCACAGCTCCAGAT	TGGCAACAAAGCTGATCC	5,42
7	Glued	TTGCCCAACATCTTCTGG	GTGGACGTGTTGCCTGAT	4,03
8	Dhc64C	CAAGTTGCGACACCTTCTG	GTGGCTTGATTACCGAAC	3,74
9	Klp10A	GGAATCGACTGGCTTCC	GGGCAAGTGCATCACAGT	3,91
10	Klp59C	GAATGCTGACCACATCCTG	TGCGTGGTAAGGAAGTGC	2,69
11	CG13366	ATCCAGCACTTCGCTCAG	ACTTGCAAACCCAGCTGAC	3,49
12	katanin60	CTCGTTGGTGTTCGATGTG	CAAGGCCATTAGAGAAC	3,09
13	Lis-1	TCTGGGCTCAAATGGCTA	TCGTTATGCTGGCACGAT	2,60
14	Patronin	ATTTCGGGAGATTTGACAC	GATAGGTGAGATTGCCGCT	4,36
15	Spastin	TCCTCTGTGCACAAACAGAAC	CATTCAACCGTTGGAGA	6,03
16	chb	TCCACGCTAAGGACATGG	CTGCGGCTGAGTGTGATAG	4,10
17	ssp2	TGAACGGATGAACAACCTCG	TCCGCTGTAGTAGCACTCG	3,49

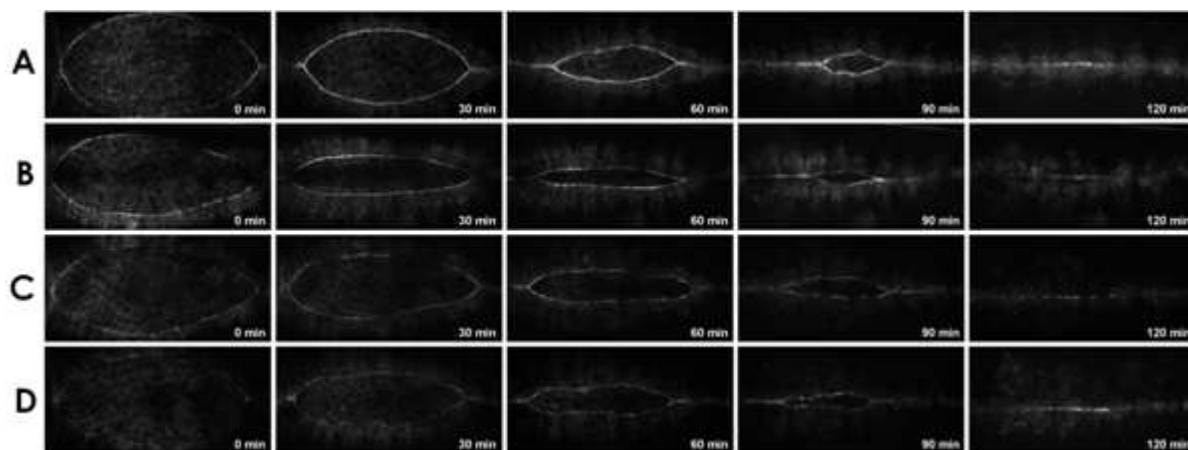
1. táblázat A kiválasztott génszakaszokra specifikus primerek szekvenciái és a dsRNS oldatok koncentrációja



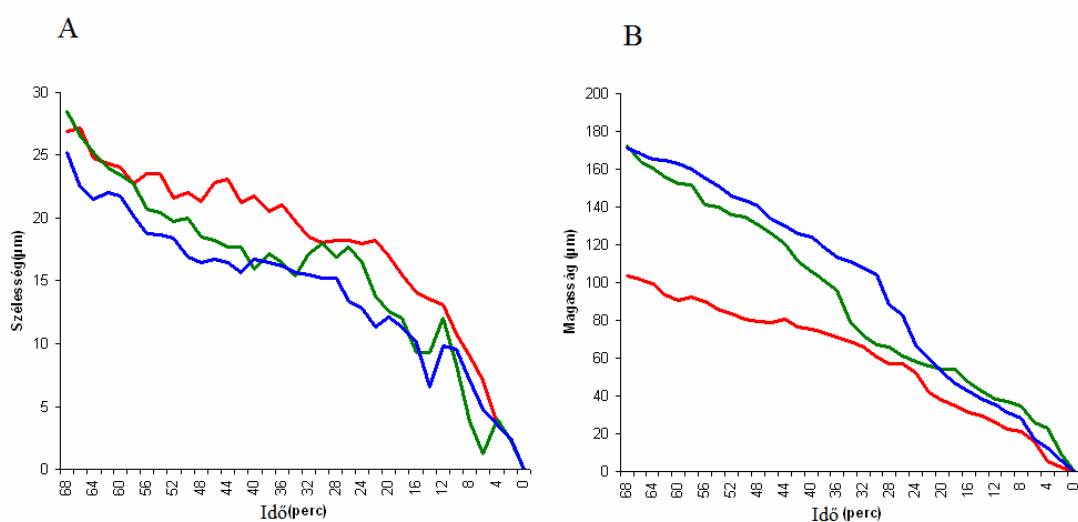
7. ábra. Gél dokumentáció agaróz gélben megfuttatott dsRNS-mintákról. A számok az 1. táblázatban megfeleltethető génekhez tartoznak.

A szinciciális blasztoderma stádiumban lévő embriókat mikroinjektáltunk az *in vitro* szintetizált dsRNS-sekkel. Az injektált embriók a háti záródás során a záródó hám első sejtsorában EGFP-t fejeztek ki. Az EGFP fluoreszcenciája kivilágítja a háti záródás frontját alkotó egyetlen hámsejtsort, így a háti nyílás körvonala kirajzolódik és alakjának időbeli változása könnyen nyomon követhető. Miközben a hámlemezek még egymás felé közelednek, a háti nyílás mindkét végén már zajlik a hámlemezek összekapcsolódása, a „cipzározódás”. A vad típusú embriókban a záródás alatt a háti nyílás így mindvégig megtartja jellegzetes lencse alakját.

A tizenhét vizsgált gén közül csupán egynek, a *Drosophila* spektraplakint kódoló *short stop*-nak (*shot*) a csendesítése okozott abnormális háti záródást. A *shot* génre specifikus dsRNS-ekkel injektált embriókban a szemben lévő hámlemezek a vad típusú embriókéhoz hasonló sebességgel közeledtek a háti középvonal felé, de a hámlemezek összekapcsolódása a középvonalon lassú volt. A háti nyílás alakja így a vad típusra jellemző lencse alak helyett rendellenesen keskeny lett. A *shot* dsRNS-sel kezelt embriókban a „cipzározódás” nem állt le teljesen, amikor a hámlemezek a középvonal teljes hosszában közel voltak egymáshoz, a háti nyílás a vad típusnál sokkal gyorsabban záródni kezdett, majd teljesen bezáródott. Megvizsgáltuk a *shot* gén funkcióvesztéses alléljainak a fenotípusát is, hogy a dsRNS által okozott esetleges off-target hatást kizárjuk. A *shot*^{sf20} homozigóta és a *shot*^{sf20}/Df(2R)BSC383 hemizigóta embriókban a *shot* gén csendesítésével megegyező abnormális háti záródást tapasztaltunk, ami azt jelzi, hogy a *shot* gén funkciója szükséges a háti nyílás normális bezárásához.



8. ábra. A: vad, B: shot RNSi, C: shot^{sf20}, D: shot^{sf20}/Df(2R)BSC383 embriók háti záródása.

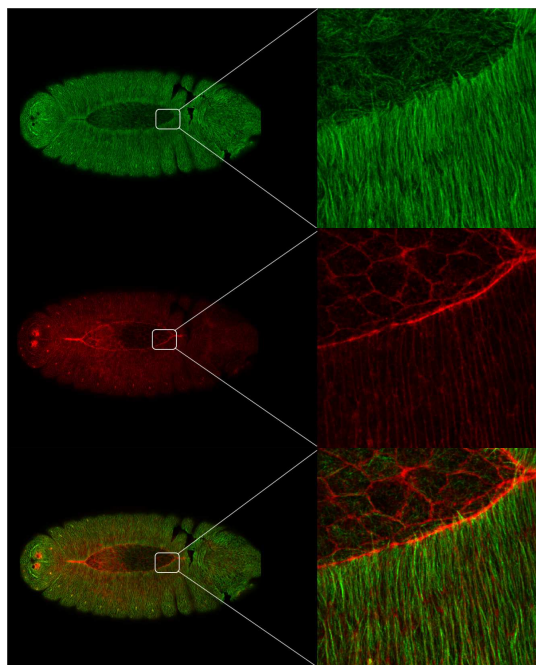


9. ábra. Rendellenes háti záródás dinamikájának kvantitatív elemzése. A és B grafikonon látható a háti záródás kinetikája vad (piros), homozigóta shot mutáns (zöld), RNSi-val csendesített shot (kék) embriók. Az A diagram az egymás felé elmozduló hámrétegek távolságát a B diagram a háti nyílás szélességét szemlélteti az idő függvényében.

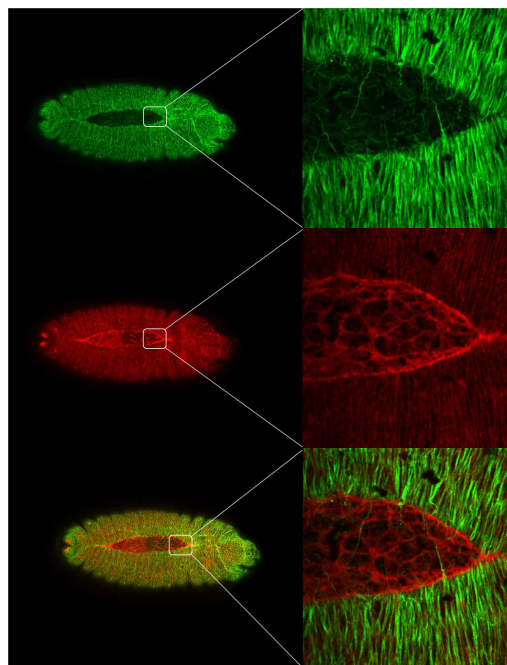
7.2. A *shot* gén szerepe a sejtíváz működésében

A *shot* mutáns záródási fenotípusa megegyezik a MT-ok teljes hiányakor jelentkező fenotípussal, ami arra utal, hogy a *shot* gén funkciója szükséges a hámsejtek MT-ainak átrendeződéséhez vagy működéséhez. Mivel az aktinalapú sejtnyúlványok rendellenes működése is a „cipzározódás” hibáit eredményezi, elképzelhető az is, hogy a *shot* a hámsejtek aktinvázát szabályozva járul hozzá a háti záródáshoz. Első lépésként ezért immunfestéssel megvizsgáltuk a *shot* mutáns hámsejtek aktin- és MT-vázának elrendeződését. A vad és a mutáns sejtek aktinváza között nem találtunk eltérést: az aktinváz a sejt-kortexen helyezkedik el és a hámsejtek dorzális részén aktinfelhalmozódás figyelhető meg. A háti záródás alatt a mutáns embriók MT-ai a hámsejtekben a vad típushoz hasonlóan párhuzamos kötegekbe rendeződnek. A sejtnyúlványokba benövő dinamikus MT-ok azonban abnormálisak voltak a *shot* mutánsokban: a vad típusra jellemző rövid, egyenes MT-ok helyett a mutáns hámsejtek nyúlványaiban rendkívül hosszú, meghajlott MT-ok jelentek meg. Ezek a megfigyelések összefoglalva arra utalnak, hogy a *shot* a sejtnyúlványokba benövő MT-ok szabályozásán keresztül hat a háti záródásra.

A.



B.



10. ábra. Vad típusú (A) és *shot*^{sf20}/*Df*(2R)BSC383 mutáns embrió konfokális mikroszkóppal készített felvétele. MT-ok zöld, aktin piros.

8. Összefoglalás

Kísérleteink célja a MT-váz embrionális hámzáródásban játszott szerepének a vizsgálata volt, amihez egy funkcióvesztéses genetikai szűrést végeztünk RNSi felhasználásával. A funkcióvesztéses fenotípust *in vivo* videó-mikroszkópiával nyomon követve olyan géneket is lehet azonosítani, melyek a háti záródás dinamikáját szabályozzák. A MT-okkal együttműködő fehérjéket kódoló gének tipikusan ilyenek lehetnek, hiszen a MT-ok teljes hiánya is csupán a „cipzározódás-i” hibákat eredményez, ami csak élő embrió filmezésével vizsgálható. Számos MT-vázhoz kapcsolódó fehérjét kódoló gént csendesítve egy olyat találtunk, amelyik funkciójának hiánya abnormális dinamikájú háti záródást okozott. Mivel a nyilvános adatbázisok adatai alapján a MT-asszociált fehérjék száma kb. 250-re tehető, az általunk is használt géncsendesítéssel kapcsolt *in vivo* videó-mikroszkópiát alkalmazva további gének azonosítása is lehetséges.

Eredményeink azt mutatják, hogy az általunk részletesen vizsgált *shot* gén működése elengedhetetlen a háti nyílás cipzározódásához. A *shot* gén a spektraplakinek családjába tartozik. Mivel a génről nagyszámú, különböző doménekkel rendelkező fehérje képződhet, a *shot* gén szerepének magyarázatára a háti záródásban számos, egymást ki nem záró lehetőség kínálkozik. Elképzelhető, hogy a *shot* az N-terminális aktinkötő doménje és a C-terminális MT-kötő doménjei segítségével a sejtnyúlványokban az aktinfilamentumok és a MT-ok keresztkötését végzi. A keresztkötő funkció kiesésével a MT-ok nem az aktinfilamentumok mentén nőnek, ami szabálytalan lefutású MT-okat eredményez. Lehetséges, hogy a *shot* fehérje a plakin doménjeivel a találkozó hámsejtek közötti sejt-sejt kapcsolatok kialakulásához járul hozzá, melynek hiányában a hámlemezek nem tudnak összekapcsolódni. A *shot* mutánsokban megfigyelt rendellenesen hosszú, meggörbült MT-ok mégis inkább egy harmadik hipotézist valószínűsítenek. Eszerint a *shot* fehérje az EF-hand doménjeivel közvetlenül befolyásolja a MT-ok dinamikáját a sejtnyúlványokban. További vizsgálatok, pl. különböző izoformákkal történő menekítési kísérletek szükségesek a *shot* gén háti záródásban játszott szerepének pontosabb megismeréséhez.

9. Irodalomjegyzék

1. Szabó Gábor, Sejtbiológia, Medicina könyvkiadó Zrt., Budapest 2009, 251-264
2. Centrosomal control of microtubule dynamics, Vladimir Rodionov, Elena Nadezhdina, Gary Borisy, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, Vol.96,pp.115–120,January1999, CellBiology
3. Chen YH, Yang JT, & Martinez HM (1972) *Biochemistry* 11, 4120-4131
4. Unger E, Bohm KJ, & Vater W (1990) *Electron Microsc Rev* 3, 355-395,
5. Unger E, Bohm KJ, Muller H, Grossman H, Fenske H, & Vater W (1988) *Eur J Cell Biol* 46, 98-104.
6. <http://wallyplant.wordpress.com/cytoskeleton/>
7. Bhattacharyya B, Panda D, Gupta S, & Banerjee M (2008) *Med Res Rev* 28, 155
8. The electron microscopy of F-actin, G. Rozsa, A. Szent-Györgyi, Ralph W.G.
9. 8Wyckoff, Laboratory of Physical Biology, Experimental Biology and Medicine Institute, National Institutes of Health, Bethesda 14, Maryland U.S.A.
- 10.Elizabeth E. Grevenkoed1 and Mark Peifer, Cytoskeletal Connections: Building Strong Cells in New Ways, *Current Biology*, Vol. 13, R568–R570, July 15, 2003,
11. K. Röper, Stephen L. Gregory and Nicholas H. Brown, The ‘Spectraplakins’: cytoskeletal giants with characteristics of both spectrin and plakin families, *Journal of Cell Science* 115, 4215-4225 © 2002
12. Development of the Fruit Fly *Drosophila melanogaster*, chapter 8, 1-2
13. Jacinto, A., Woolner, S. & Martin, P. Dynamic analysis of dorsal closure in *Drosophila*: from genetics to cell biology. *Dev. Cell* 3, 9–19 (2002).
14. Ferenc Jankovics and Damian Brunner, Transiently Reorganized Microtubules Are Essential for Zippering during Dorsal Closure in *Drosophila*: from genetics to cell biology. *Dev. Cell* 3, 9–19 (2002).
15. Ferenc Jankovics, Laszlo Henn, Agnes Bujna, Peter Vilmos, Nora Kiss, Miklos Erdelyi, A Functional Genomic Screen Combined with Time-Lapse Microscopy Uncovers a Novel Set of Genes Involved in Dorsal Closure of *Drosophila* Embryos, 2011.

16. Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 2000;404:293-6.
17. Akhmanova, A. & Hoogenraad, C. C. Microtubule plus-end-tracking proteins: mechanisms and functions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17, 47–54 (2005).

10. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Jankovics Ferencnek, hogy lehetőséget biztosított munkám sikeres elvégzéséhez és dolgozatom megírásához. Köszönöm szakmai irányítását, hasznos tanácsait. Köszönöm az Erdélyi Miklós csoport minden tagjának, hogy segítették a munkámat. Henn Lászlónak, hogy segítségemre volt a molekuláris technikák elsajátításában. Köszönettel tartozom Kristó Ildikónak a dolgozatom alapos és kritikus átnézéséért. Továbbá köszönöm Takács Tibornak a grafikai elemek kidolgozásában nyújtott segítségéért.

11. Nyilatkozat

Alulírott Lakatos Zsanett Biológus MSc szakos hallgató, kijelentem, hogy az OTDK dolgozatban leírt munkafolyamatok közül a:

- *Drosophila melanogaster* törzsek fenntartását
- Duplaszálú RNS (dsRNS) molekulák előállítását
- PCR reakciót
- DsRNS injektálását, in vivo mikroszkópiát
- Immunhisztokémia jelölést

végeztem el.

.....
aláírás

Szeged, 2012 december 07.

.