

XXXI. OTDK Biológia Szekció

**A MIOZIN ATP-ÁZ AKTIVÁCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA *DROSOPHILA*
INDIREKT REPÜLŐIZMÁBAN**

TDK dolgozat

Szabó András

II. éves MSc-s biológus hallgató

Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és Informatikai Kar

MTA SZBK, Genetikai Intézet

Témavezető:

Dr. Mihály József

MTA SZBK, Genetikai Intézet

Belső konzulens:

Dr. Maróy Péter

Genetikai Tanszék

Szeged, 2012.

Tartalomjegyzék

<u>Tudományos háttér</u>	<u>3.</u>
Bevezető.....	3.
<i>A Drosophila</i> izomfelépítése.....	3.
A vékony filamentumok felépítése.....	5.
A vastag filamentumok felépítése.....	5.
Aktomiozin kapcsolat, kontrakció.....	6.
Az aktomiozin kapcsolat és az aktin aktiváció.....	7.
<u>Célkitűzések</u>	<u>10.</u>
<u>Felhasznált anyagok és módszerek</u>	<u>11.</u>
Felhasznált <i>Drosophila</i> törzsek és mutánsok.....	11.
attP-attB integrációs rendszer.....	11.
Az Act88F és Mhc konstrukciók klónozása.....	12.
Indirekt repülőizom boncolás és immunhisztokémia.....	14.
Felhasznált ellenanyagok.....	14.
A repülési képesség, a szarkomerhossz és a fehérjemennyiség vizsgálatához szükséges keresztezések.....	15.
Repülési teszt.....	16.
Poliakrilamid gélelektroforézis.....	16.
<u>Eredmények</u>	<u>18.</u>
Az <i>Aktin88F</i> gén és az Act88F konstrukciók.....	18.
Az Act88F transzgének hatása a repülési képességre.....	19.
Az aktin fehérje szint vizsgálata.....	21.
A szarkomer szerkezetének vizsgálata.....	22.
<i>A Drosophila</i> Mhc gén és az Mhc konstrukciók.....	25.
A letalitás és a röplési képesség menekítése.....	27.
A miozin fehérje szintjének vizsgálata.....	29.
A szarkomer szerkezetének vizsgálata.....	29.
<u>Összefoglaló</u>	<u>33.</u>
<u>Felhasznált irodalom</u>	<u>35.</u>

TUDOMÁNYOS HÁTTÉR

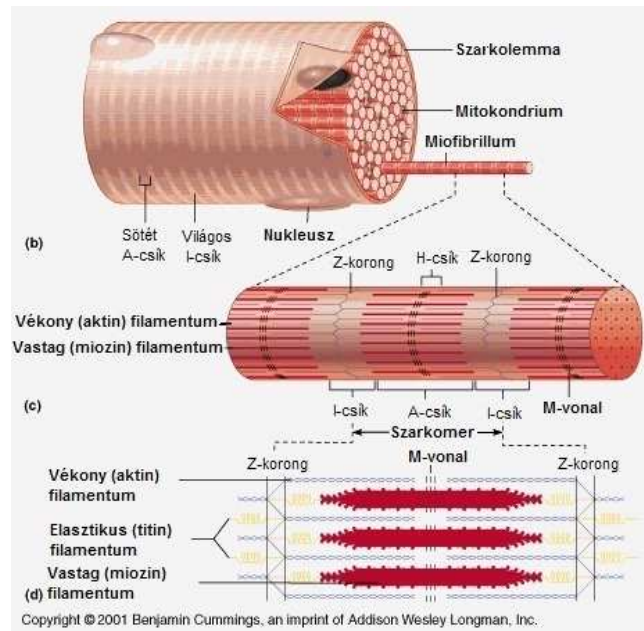
Bevezető

Az izomműködés alapja az aktin és miozin filamentum rendszerek egymáshoz képest történő elmozdulása, amelyhez az energiát az ATP hidrolízise biztosítja. Régóta ismert, hogy az ATP lebontását a miozin molekulák végzik, ugyanakkor az aktin miozinhoz való kötődése nagy mértékben fokozza a miozin ATP-áz aktivitását. Ezt a jelenséget nevezzük aktin aktivációnak, ami az ATP hidrolízis hatékonyságán keresztül jelentősen befolyásolja az izomműködés hatékonyságát. Munkacsoportunk együttműködő partnere (Málnási-Csizmadia András csoportja az ELTE Biokémiai tanszékén) az elmúlt években számos vizsgálatot végzett az izomkontrakció és az aktin aktiváció jobb megértése érdekében. Legújabb, *in vitro* és *C. elegans* modellszervezeten végzett kísérleteik alapján azonosították az aktin aktivációban szerepet játszó aminosavakat és leírták az aktin aktiváció egy lehetséges modelljét (Varkuti et al., 2012). Tekintve azonban a fonalférgek kicsiny testméretét, az új elképzelés szempontjából kulcsfontosságú izommechanikai méréseket nem volt lehetséges elvégezni, ezért felmerült egy genetikailag könnyen manipulálható, de nagyobb testméretű modellorganizmus vizsgálata. Erre a célra a *Drosophila melanogaster* tökéletesen alkalmasnak látszik, főként amiatt, hogy a muslicák ún. indirekt repülőizma nem szükséges az életben maradáshoz, de egyszerű preparálása révén lehetővé teszi az izom mechanikai tulajdonságainak alapos vizsgálatát. Kísérleteink hosszú távú célja az, hogy a miozin ATP-áz aktivációját befolyásoló aktin és miozin mutációkat hozzunk létre *Drosophila*-ban és megvizsgáljuk azok hatását az izom szerkezeti felépítésére és mechanikai tulajdonságaira nézve.

A *Drosophila* izomfelépítése

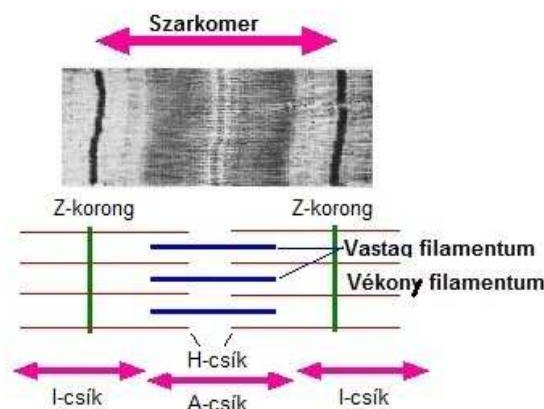
Kísérleteim célja az ecetmuslica indirekt repülőizmában létrehozott mutációk vizsgálata volt, így elsőként a modellorganizmus izomszerveződését ismertetném. A gerincesek és az ízeltlábúak harántcsíkolt izmainak a felépítése nagy mértékben hasonlít egymáshoz.

Izomzatuk kötegekbe rendeződött rostokból épül fel, melyeket miofibrillumok alkotnak. Legkisebb kontraktilis működési egységük a szarkomer, melynek fő alkotóelemei a vékony, a vastag és a titin filamentum rendszerek (1. ábra). A szarkomerek szabályos felépítésűek, egy adott miofibrillumon belül azonos méretűek, ez azonban izomtípustól függően eltérő is lehet.



1. ábra A gerinces és gerinctelen vázizomzat szerkezete.

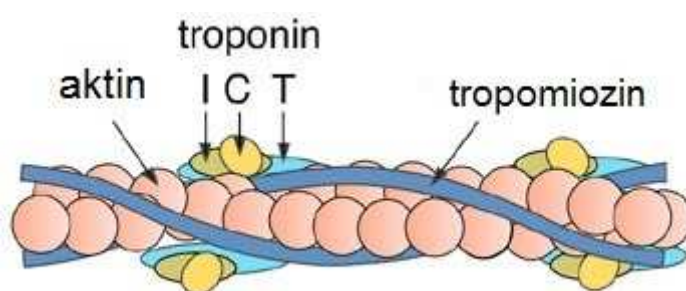
Harántcsíkolt izmokban a kontraktilis filamentumok rendkívül szabályosan helyezkednek el, és ennek a szabályos elrendeződésnek köszönhető, hogy mikroszkópos preparátumokon ezek az izmok jellegzetes, csíkos mintát mutatnak. Egy szarkomert két Z-korong közötti terület határoz meg, amelyen belül az aktin és miozin molekulák átfedése révén 5 jól elkülöníthető sávot látunk (1. és 2. ábra). A Z-korong melletti világos, aktin gazdag régió az I-csík, melyet a szarkomer belseje felé haladva az aktin-miozin átfedés következtében egy sötétebb sáv, az A-csík követ. A szarkomer közepén ismét egy világosabb, csak vastag filamentumokat tartalmazó terület látható, a H-csík, majd újra egy A-csík és egy I-csík következik a Z-korongig (1., 2. ábra). A szarkomer és egyben a H-csík közepén az általában csak elektronmikroszkóppal detektálható M-vonal található (Shafiq, 1963, Reedy and Beall, 1993, Au, 2004).



2. ábra A szarkomer elektronmikroszkópos képe és szerkezeti felépítése.

A vékony filamentumok felépítése

A vékony filamentumok legfontosabb alkotóeleme az aktin. A globuláris szerkezetű aktin monomerek (G-aktin) egymáshoz kapcsolódva hosszú, kettős helix szerkezetű polimereket alkotnak, melyet filamentáris aktinnak (F-aktinnak) nevezünk (Chesarone and Goode, 2009). Az F-aktin polarizált struktúrájú polimer, amelynek megkülönböztetjük az ún. plusz (+) és mínusz (-) végét. Az aktin filamentumok (+) vége szarkomerekben mindig a Z-korong területén található, ahol a filamentumok keresztkötő fehérjékkel (pl. α -aktinin) vannak egymáshoz rögzítve, míg a (-) vég az A-csík/I-csík határon található (Au, 2004).

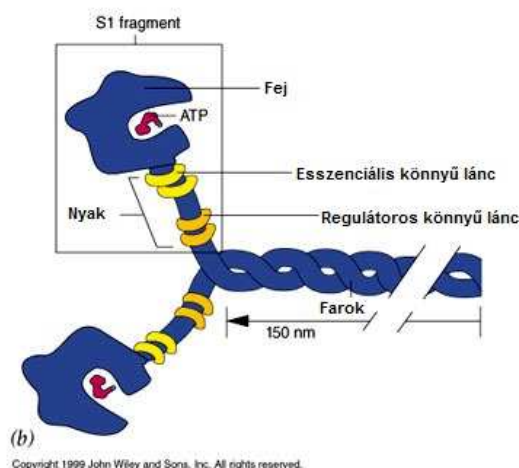


3. ábra A filamentáris F-aktin polimer és a troponin-tropomiozin komplex kapcsolata.

A helikális szerkezetű aktin filamentumok tropomiozin dimerekhez kapcsolódnak, amelyek maguk is helikális szerkezetűek és 7 aktin monomerrel létesítenek kötést. Emellett a tropomiozin molekulák felelősek a három alegységből álló troponin komplex kötéséért is (3. ábra). A tropomiozin/troponin komplexnek kitüntetett szerepe van az izom összehúzódás szabályozásában, hiszen a tropomiozin gátolja a miozin/aktin kölcsönhatást, a troponin komplex azonban Ca^{2+} jelenlétében képes feloldani ezt a gátlást és így lehetővé teszi az izom működését (Zot and Potter, 1987).

A vastag filamentumok felépítése

A vastag filamentumok legfőbb alkotóelemei a miozin molekulák. A miozin molekula valójában 6 polipeptid lánc komplexe, amely 2 nehéz láncot és 2 pár különböző (esszenciális és szabályozó) könnyű láncot tartalmaz (4. ábra) (Au, 2004).

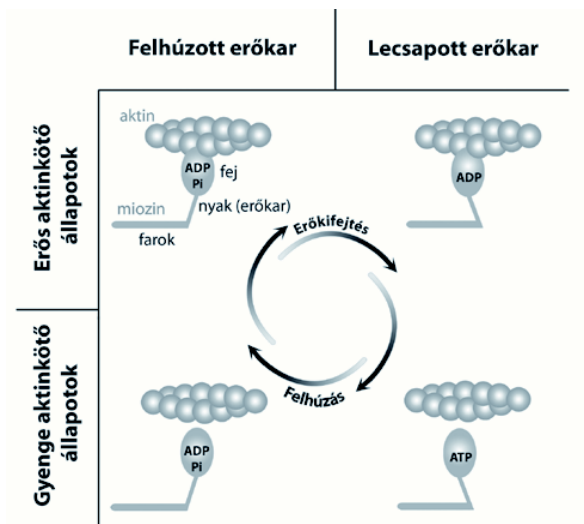


4. ábra A miozin molekula szerkezeti felépítése.

A nehéz lánc N-terminális vége, a könnyű láncokkal együttműködve a motor-doménnek nevezett globuláris fejet alkotja, míg a C-terminális része egy α -helikális farki régiót hoz létre (4. ábra). Egy-egy szarkomerikus vastag filamentum felépítése ~200-400 miozin molekula kötegbe rendeződésével valósul meg. A miozin fejek egy irányba rendeződnek, polaritásuk ellenkező irányba mutat, mint az M-vonal. A vastag filamentumok az M-vonalat alkotó titin, miomezin, M-fehérje, skelemin és kreatin kináz fehérjékhez is kapcsolódnak (Au, 2004). Fontos megjegyezni, hogy az M-vonal közvetlen közelében nincsenek miozin fejek.

Aktomiozin kapcsolat, kontrakció

Az izom összehúzódás alapja az aktin és miozin láncok egymáshoz való kötődése és egymáson való elcsúszása. A megfelelő idegi impulzus hatására felszabaduló Ca^{2+} ionok a troponin komplex konformációjának megváltozását okozzák, minek hatására a troponin a tropomiozin molekulát leválasztja az aktin polimerről, így szabaddá válnak az aktin miozin kötő helyei. A miozin feji része, ezáltal képes kötődni az aktin filamentumhoz. Az izom kontrakciójához a miozin molekula által kötött ATP hidrolízisére van szükség, mely megmozgatja a molekula motor domén-jét, ezzel elcsúsztatva a két filamentumot egymáson. A miozin az ATP-ben tárolt kémiai energiát - szerkezeti átalakulásokon keresztül - mechanikai energiává alakítva az „aktinsínen” történő egyirányú elmozduláshoz hasznosítja. A jelen levő Ca^{2+} ionok szükségesek a miozin ATP-áz aktivitásának beindulásához is. Jelenlegi tudásunk szerint valamennyi miozin izoforma a Lymn és Taylor által leírt általános sémának megfelelően fejti ki működését (5. ábra) (Lymn and Taylor, 1971).



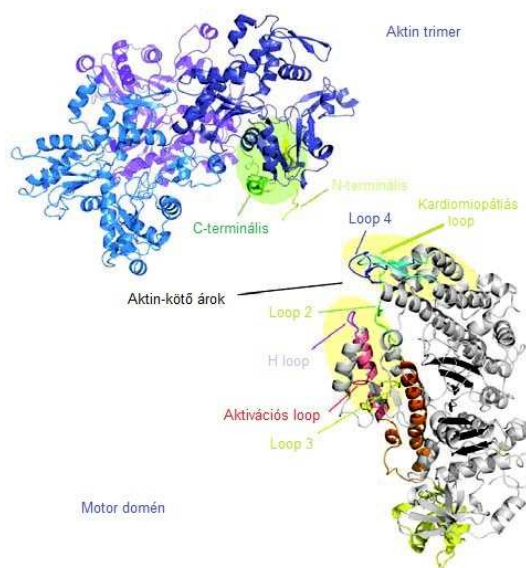
5. ábra A miozin ATP-áz aktivitásának Lymn-Taylor által leírt sémája.

A miozinon található ATP- és aktinkötő helyek közötti kapcsolat révén az ATP kötése a miozin motor domén aktinról való leválását okozza. Az ATP-molekula hidrolíziséhez kapcsolódó kis szerkezetváltozások az erőkar (a miozin feji és farki régióját összekötő nyaki domén) felhúzását eredményezik, majd a miozin feji vége újra kapcsolódik az aktinhoz. Az ATP hidrolízise során keletkező termékek (pirofoszfát és ADP) disszociációjához kapcsoltan megtörténik az erőkifejtés: az erőkar lecsapódik, az enzim pedig egy újabb kemomechanikai ciklus megtétele előtt áll (Terada et al., 2002, Conibear et al., 2003, Malnasi-Csizmadia et al., 2005). Izomkontrakció esetén a vastag filamentumot alkotó miozin molekulák az F-aktin polimereket húzzák a szarkomer közepe felé. A folyamat révén a szarkomer megrövidül, így az egész miofibrillum, sőt az egész izom összehúzódik anélkül, hogy a vékony és a vastag filamentumok hossza megváltozna. Ez a csúszófilament elmélet (Huxley and Niedergerke, 1954). A folyamat véges mértékben következhet be, az összehúzódás akkor teljes, ha a vastag és vékony filamentumok átfedése maximális.

Az aktomiozin kapcsolat és az aktin aktiváció

Az aktin-miozin kapcsolat atomi struktúrája még nem teljes mértékben meghatározott, azonban magas felbontású elektronmikroszkópos felvételek és *in silico* dokkolási szimulációk alapján egyértelműnek látszik, hogy az aktin és miozin molekulák viszonylag nagy felületen kapcsolódnak egymáshoz (6. ábra). Ezt a kölcsönható felületet egy mély árok oly módon osztja két részre, hogy azt a miozin motor doménjének alsó és felső kölcsönható szubdoménje határolja (Varkuti et al., 2012). A modellek alapján ennek a hasadéknak a bezárulása megerő-

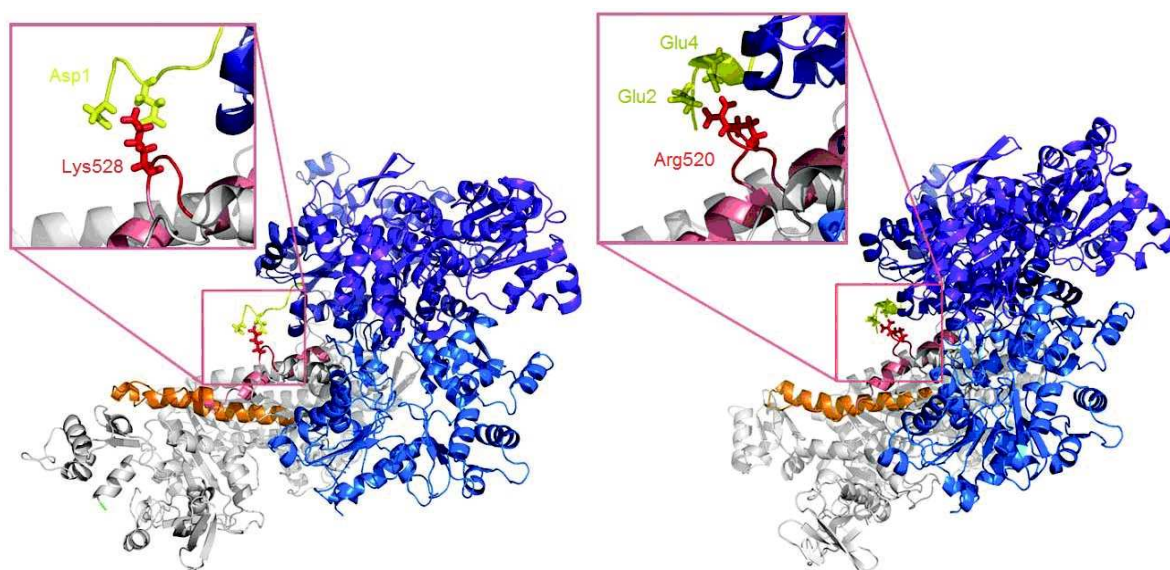
síti az aktin kötést (Takacs et al., 2011). Az alsó szubdomén aktin kötő hurkaiban bekövetkezett mutációk az aktin aktiváció és a miozin motilitás lecsökkenését eredményezték. Ezek az eredmények azt sugallták, hogy a motilitás és az aktin aktiváció mechanikailag kapcsolt az aktin kötő hely hasadékanak bezárulásával. Ezzel szemközt, más megfigyelések alapján az aktin aktiváció és a motilitás szétkapcsolható egymástól. Ezt a lehetőséget azok a kísérletek vetették fel amelyek alapján az aktin N-terminális, negatívan töltött régióját érintő mutációk anélkül voltak képesek gátolni a miozin ATP-áz aktivációját, hogy megakadályozták volna az aktomiozin komplex *in vitro* motilitását (Anson et al., 1995).



6. ábra Az aktomiozin kapcsolat kialakításában szerepet játszó szerkezeti elemek. (Varkuti et al., 2012)

A fent említett eredmények alapján a G-aktin molekula flexibilis, evolúciósan konzervált, negatívan töltött N-terminális régiója kritikus az aktin-miozin interakció szempontjából. Tekintve azonban, hogy ennek a régiónak az aktin-miozin kapcsolat kialakulásában játszott szerepe molekuláris szinten nem volt ismert, együttműködő partnereink az ELTE Biokémiai tanszékén nemrégiben elhatározták, hogy újból elvégzik az aktin-miozin kapcsolat *in silico* modellezését immáron az N-terminális negatívan töltött aktin aminosavak bevonásával. Ennek során azt találták, hogy a negatívan töltött aktin N-terminális vég sóhidat képez a miozin motor domén Arg520 aminosavával (*Dictyostelium discoideum* miozin nomenklatúra szerint) (7. ábra) (Varkuti et al., 2012). Az újonnan felfedezett kölcsönhatást mediáló Arg520 aminosav a miozin felső kölcsönható szubdoménjének egy kicsi hurkában található, melyet aktivációs huroknak neveztek el (Gyimesi et al., 2008). Az aktivációs hurok szekvenciája viszonylag konzervált, mégis mutat némi variációt miozin típusok között, azonban minden miozin

izoforma esetén tartalmaz egy pozitívan töltött aminosavat a hurok csúcsi részén. *In vitro* kísérletek alapján megállapították, hogy az aktivációs hurok és az aktin közti kapcsolat meggyorsítja a miozin erőkar mozgását, a molekula ATP-áz aktivitásának stimulálása révén. Transzgenikus fonalférgeket vizsgálva azt az eredményt kapták, hogy az aktivációs hurkot érintő mutációkat hordozó állatok izomszerkezete - melyekben az aktin aktiváció gátolt volt - a vad típusúakéhoz hasonlóan mutatkozott. Emellett azt tapasztalták, hogy az aktin aktiváció hiánya, a miozin aktinon való elcsúszását (izom összehúzódás) sem gátolta meg teljesen, de jelentősen gyengítette az izom erő kifejtésének mértékét. Mindezek alapján az újonnan leírt aktin-miozin interakció az aktin aktiváción keresztül szükséges a hatékony erő generáláshoz, azonban nem esszenciális a nyugalmi izomtónus létrejöttéhez. Aktin aktiváció hiányában a kontrakció bizonyos szinten működik, de az ATP-áz aktiválás jelentősen megnöveli az aktív miozin fejek számát, ami hatékonyabb izom kontrakcióhoz vezet (Varkuti et al., 2012).



7. ábra A miozin feji végének szerkezeti felépítése felhúzott és erős aktin kötő állapotban. (Varkuti et al., 2012)

CÉLKITŰZÉSEK

Az aktin aktiváció molekuláris alapjainak a felderítése után felmerült az igény olyan *Drosophila* mutánsok előállítására amelyek megzavarják az aktiváció folyamatát az ún. indirekt repülőizmokban (IFM), ami a muslicák legnagyobb méretű izma. Ezek a mutánsok rendkívül hasznosak lehetnek izom biokémiai (kinetikai) vizsgálatok és izom mechanikai kísérletek céljaira, és ily módon segítségükkel még mélyebb bepillantást nyerhetünk az aktin aktiváció in vivo folyamataiba. Hosszútávú célunk olyan *Drosophila* miozin és aktin mutánsok előállítása, amelyek mutációt hordoznak a miozin aktivációs hurkában, ill. az aktin negatívan töltött N-terminális régiójában. Mivel a helyspecifikus mutagenézis igen hosszadalmas és általában igen alacsony hatékonyságú *Drosophila*-ban, helyette egy transzgenikus stratégiát dolgoztunk ki. Ennek az a lényege, hogy a mutáns aktin és miozin géneket egy transzgénről fejeztetjük ki a megfelelő aktin, ill. miozin null mutáns háttéren. Korábbi vizsgálatok alapján ismert, hogy az IFM szerkezete és működése nagyon érzékeny az aktin és miozin fehérjék arányára (Beall et al., 1989), így pl. az *Mhc* (miozin nehéz lánc) gént egy kópiában hordozó muslicák IFM-je szerkezetileg aberrált és az állatok repülési képessége erősen csökkent (O'Donnell and Bernstein, 1988). Ezért annak érdekében, hogy biztosítsuk, hogy a tervezett transzgenikus vonalak hasonló szinten fejeződnek ki, elhatároztuk, hogy egy helyspecifikus integráción alapuló transzgenikus rendszert alkalmazunk. Tekintve azonban, hogy ilyen rendszert korábban miozin és aktin transzgenikus vonalak előállítására nem használtak, először a rendszer optimalizálását kellett elvégeznünk. Ennek során *Mhc* és *Act88F* (IFM specifikus aktin izoforma) mutáns törzsek menekítését terveztük vad típusú extra miozin és aktin kópiák bevitelével. A kísérlet során különböző genomi integrációs helyek összehasonlítását terveztük, és így kívántuk kiválasztani a megfelelő kifejeződési szintet biztosító genomikus pozíciót. A továbbiakban a mutáns konstrukciókat már csak ezekre a megfelelő helyekre tervezzük integrálni.

A vad típusú (és később a mutáns) konstrukciókkal végzett menekítési kísérletek során terveztük a repülési képesség vizsgálatát, az IFM szerkezeti vizsgálatát immunhisztokémiai eljárással és a kifejeződési szintek összehasonlítását fehérje gélek segítségével.

FELHASZNÁLT ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Felhasznált *Drosophila* törzsek és mutánsok

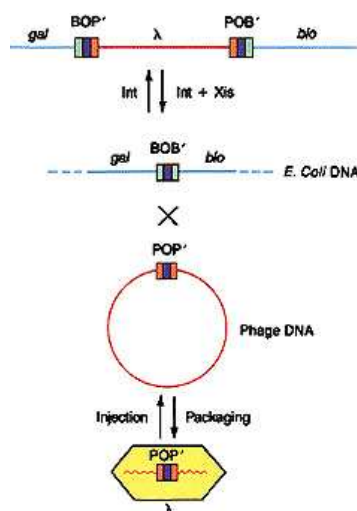
- w^{1118} (vad típusú kontrollként)
- w ; Mhc^1/CyO , $Act-GFP$
- w ; Mhc^{10}/Mhc^{10} ; $TM2/MKRS$
- w ; $MHC-WT^{86Fa}/TM3$
- w ; $MHC-WT^{68E}/TM6D$
- w ; Mhc^1/CyO ; $MHC-WT^{68E}/TM3$
- w ; Mhc^1/Mhc^1 ; $MHC-WT^{68E}/MhcWT^{68E}$
- w ; Mhc^1/CyO ; $MHC-WT^{86Fa}/TM3$
- w ; Mhc^1/Mhc^1 ; $MHC-WT^{86Fa}/MhcWT^{86Fa}$
- w ; $Mhc^{10}/CyO,y^+$; $MHC-WT^{86Fa}/TM2$
- w ; Mhc^{10}/Mhc^{10} ; $MHC-WT^{86Fa}/MhcWT^{86Fa}$
- w ; $CyO,y^+/Sp$; $Act88F^{KM}/TM6b$
- w ; $Act88F-WT^{51C}/CyO$
- w ; $Act88F-WT^{58A}/CyO$
- w ; $Act88F-WT^{attP40}/CyO$
- w ; $SM6b/Sp$; $TM3/CXD$
- w ; $Act88F-WT/CyO,y^+$; $Act88F^{KM}/TM3$
- w ; $Act88F-WT/Act88FWT$; $Act88F^{KM}/Act88F^{KM}$

Az attP-attB integrációs rendszer

A mutáns és vad típusú konstrukciók genomba való integrálásához az attP-attB rekombinációs rendszert használtuk.

Helyspecifikus rekombináció esetén a beépíteni vagy kivágni kívánt DNS szakasz integrációját vagy delécióját meghatározott bázissorrendű szakaszok és specifikus enzimek irányítják, így a rekombináció nem véletlenszerű. Bizonyos fágok ezt a módszert alkalmazzák a gazdagenomba való beépülésre. A módszer átvitele más kísérleti rendszerekbe nagyban bővítette a molekuláris vizsgálatok tárházát.

A rendszer alapja, hogy a beépülés helyeként a kromoszómán csak egyszer található specifikus szekvencia szolgál. A Lambda fág esetén ez az *att* régió (attachment site). A lambda fág a lizogén baktériumban profágként csak a baktérium *att* helyére képes beépülni. A helyspecifikus beépülést egy integráz fehérje végzi. Az *att* régió mind a fág (*attP*), mind a gazda genomban (*attB*) megtalálható. A régió belül 15 bp homológ szakasz található: GCTTTTTTATACTAA, melynek két oldalán helyezkedik el a fág esetén a P és P', a baktériumnál a B és B' szekvencia. A fág integrációja következtében kialakul egy BOP'-lambda, genom-POB' szerkezet (8. ábra).



8. ábra A fág alapú attP-attB rekombinációs rendszer sematikus ábrázolása.

A mi kísérleti rendszerünkben is ezt a módszert alkalmaztuk. A beépíteni kívánt konstrukció tartalmazza az *attB* szekvenciát. A konstrukciót egy meghatározott helyen *attP* szekvenciát tartalmazó törzsbe injektáltuk, ahol megtörtént a helyspecifikus rekombináció (Bischof et al., 2007). A mutáns, illetve vad típusú konstrukciókat így irányítottan, előre meghatározott helyre integráltuk be.

Az Act88F és Mhc konstrukciók klónozása

A vad típusú Act88F konstrukció klónozásához a pUD88F jelű klónt (Sparrow et al., 1991) használtuk fel, ami egy 4,1 kb-os SalI fragmenten tartalmazza a teljes *Act88F* gént és a szabályozó régióit is. Ezt a SalI fragmentet először a pH7.30 vektorba (Seifert et al., 1986) klónoztuk át SalI helyre. Majd ebből a vektorból pattB vektorba klónoztuk egy 4,1 kb-os NotI fragmentként, és így elkészült a genomi integrációra alkalmas pattB-Act88F-WT konstrukció.

Az Act88F fehérje N-terminálisán mutáns konstrukciók előállítását Várkuti Boglárkával (ELTE, Biokémiai tanszék) közösen végeztük. A mutagenézist ő végezte el a pH7.30 vektorba klónozott *Act88F* génen, oly módon, hogy a vad típusra jellemző N-terminális CDDD aminosavakat CNDN, ill. CNNN aminosavakat kódoló szekvenciákra módosította. Ezek után a két mutáns változatot NotI fragmentként klónoztuk át a pattB vektorba, amelyek készen állnak a genomi integrációra.

A vad típusú Mhc konstrukció (Mhc-WT) klónozása során a pMHC5' klónból indultunk ki. Ez a klón Sanford Bernstein (SDSU, San Diego) laboratóriumából származik, és a pCasper4 vektorban hordozza az *Mhc* gén 5' felét egy 11,7 kb-os Bsu36I-EagI fragmentként HpaI-EagI helyekre klónozva. Ebből a vektorból XhoI-EagI fragmentként átklónoztuk az inszertet pattB vektorba (pattB-MHC5') (12. ábra). Az *Mhc* gén 3' fele egy (szintén Sanford Bernstein-től származó) pBS klónként állt rendelkezésünkre ahová egy 12,4 kb-os EagI fragmentként lett klónozva (12. ábra). Az Mhc-WT konstrukció elkészítéséhez a pattB-MHC5' vektorba klónoztuk az *Mhc* 3' 12,4 kb-os EagI fragmentet, így módon elkészült a teljes *Mhc* gént hordozó Mhc-WT konstrukció, ami 24,1 kb-nyi genomiális régiót hordoz a pattB vektorban (12. ábra).

A pattB-Mhc-K525E mutáns konstrukció klónozása során a pattB-MHC5' klónból indultunk ki. Ebből a klónból átklónoztuk a 9a exont is tartalmazó 4,6 kb-os AvrII-EagI fragmentet (Mhc5' 4.6kbAE) egy olyan pBS változatba amelynek a teljes MCS régiója ki lett cserélve (pBS-Multi, az új MCS szekvenciát lásd alább) és abban elrontottuk az SpeI és EcoRV helyeket (pBS-Multi- Δ SpeRV) (13. ábra). A következő lépésben az Mhc5' 4.6kbAE klónból átklónoztuk a 9a exont is tartalmazó 1,6 kb-os SpeI-EcoRV fragmentet a pBS-Multi vektorba (a klón az Mhc5' 1.6kbSR nevet kapta). Ebben a klónban elvégeztük a mutagenézis kísérletet, amelynek során az 525-ös pozíciójú lizin aminosavat kódoló tripletet glutaminsavat meghatározó tripletre cseréltük egy PCR alapú mutagenézis kísérlet során (13. ábra). A mutagenézishez használt primerek a következők voltak: MhcK525E-R (CACCTC-TTCAATCAGATCGATAC) és MhcK525E-F (CTTAATAGATTCAAATTACTCCATG). A mutagenézist szekvenálással ellenőriztük, aminek eredményképp megállapítható volt, hogy sikeresen előállítottuk az Mhc 1.6kbSR-K525E jelű mutáns klónt. Ezt a klónt felhasználva az előzőekben részletezett klónozási stratégiát fordított sorrendben követve létrehoztuk az Mhc5'-K525E klónt pattB vektorban, ami a teljes 11,7 kb-os 5' régiót hordozza a K525E mutációval a 9a exonban (minden köztes klónozási lépés szekvenálással is ellenőrizve volt) (13. ábra). Ezek után az *Mhc* 3' régiót az Mhc-WT klón előállításához hasonló módon klónoztuk

egy 12,4 kb-os *EagI* fragmentként az Mhc5'-K525E klónba és így elkészült a pattB-Mhc-K525E mutáns konstrukció (13. ábra).

A Dr. Sipos László kollégánktól származó pBS-Multi vektor MCS (többszörös klónozó hely) szekvenciája a következő:

```
GAGCTCTCTAGAGAATAGGAACCTTCACTAGTGAATTCCTGCAGGATATCTAGGGA  
TAACAGGGTAATATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATGCGGCCGCA  
AGCTTCCGCGGATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATCAAAACGTCG  
TGAGACAGTTTGGTCAATTGCTCGAGGTTTAAACCCTAGGGAAGTTCCTATACTTT  
CTAGAGGGCCCCGGTACC
```

Indirekt repülőizom boncolás és immunhisztokémia

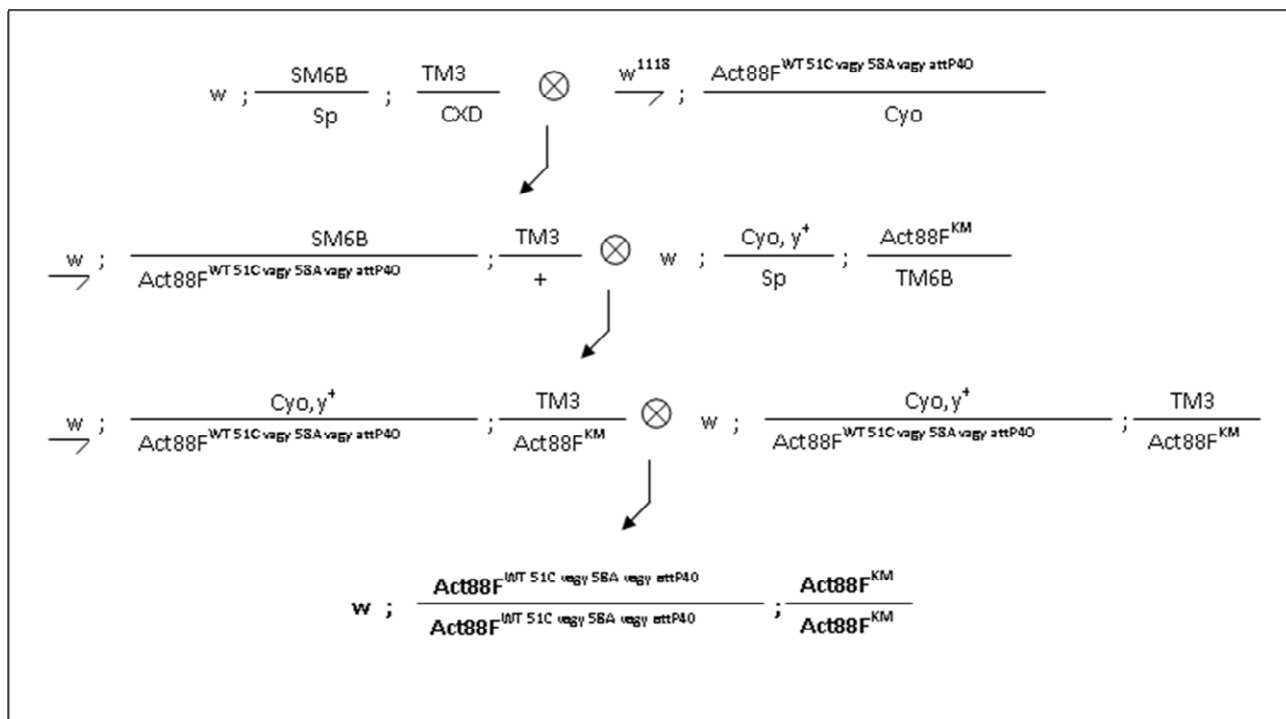
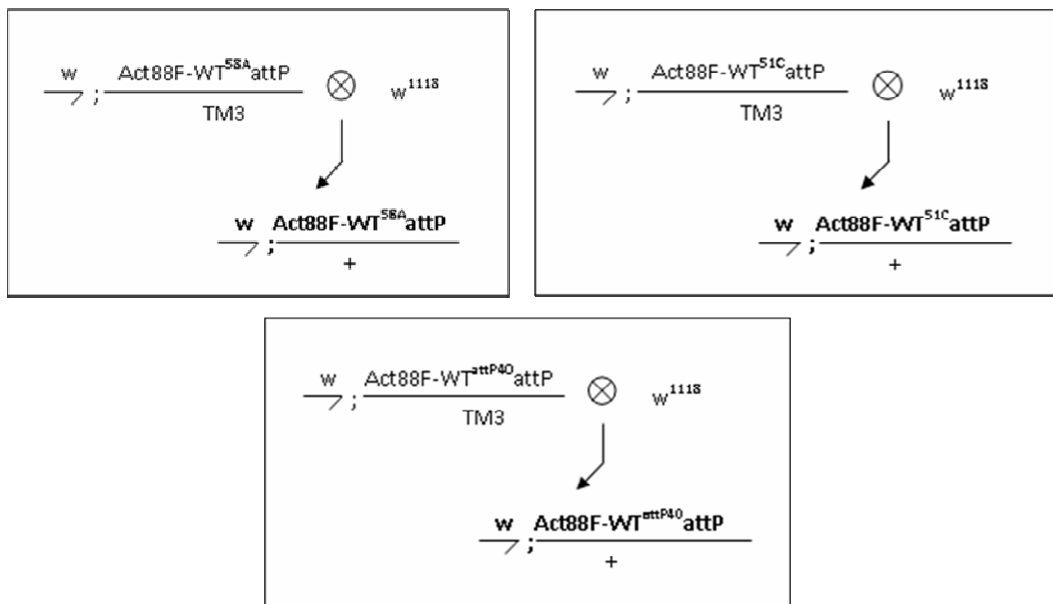
A kiválasztott egyed 600 µl frissen készített 4%-os paraformaldehidbe tettem. A bal oldalára fektettem, úgy hogy a fejéhez hozzáférhessek. Boncoló csipesszel megfogtam a fejét és a másik csipesszel ellentartva óvatosan eltávolítottam. A fejvel együtt kihúztam a tápcsatornát is. Ezt követően a torra vigyázva leszakítottam a potrohot. A legyet a lábainál fogva szembe fordítottam úgy, hogy a boncoló olló egyik szárát a toron látható nyílásba tudjam illeszteni. A tort függőlegesen félbevágtam, így egy jobb és bal oldalt kaptam. Így már látható a repülőizom, melyet boncoló tű és olló segítségével lehetőleg szakításmentesen eltávolítottam. Az izmot a boncolás kezdetétől számítva 15 percig tartottam a PF-ben. Ezt követően a mintákat min. 3x20 percig PBS-T-vel mostam, majd min. 1 óráig PBS-BT-ben blokkoltam. A blokkolást követően az elsődleges antitestet vittem a mintákra, melyet PBS-BT-ben higítottam a megfelelő arányban. A preparált izmokat éjszakára 4°C-ra tettem. Másnap a mintát min. 3x20 percig PBS-T-vel mostam, majd a másodlagos ellenanyagot tettem rá a megfelelő hígításban. A második festési eljárás 2 órán keresztül vagy overnight 4°C-on történt, majd újabb min 3x20 perc mosás következett. A mintákat ezután egy csepp PBS:Glicerín (1:1)-be a tárgylemezre helyeztem, majd fedőlemezzel lefedtem. A fedőlemez széléit lakkal vontam be, majd a mintát hűtőben tároltam.

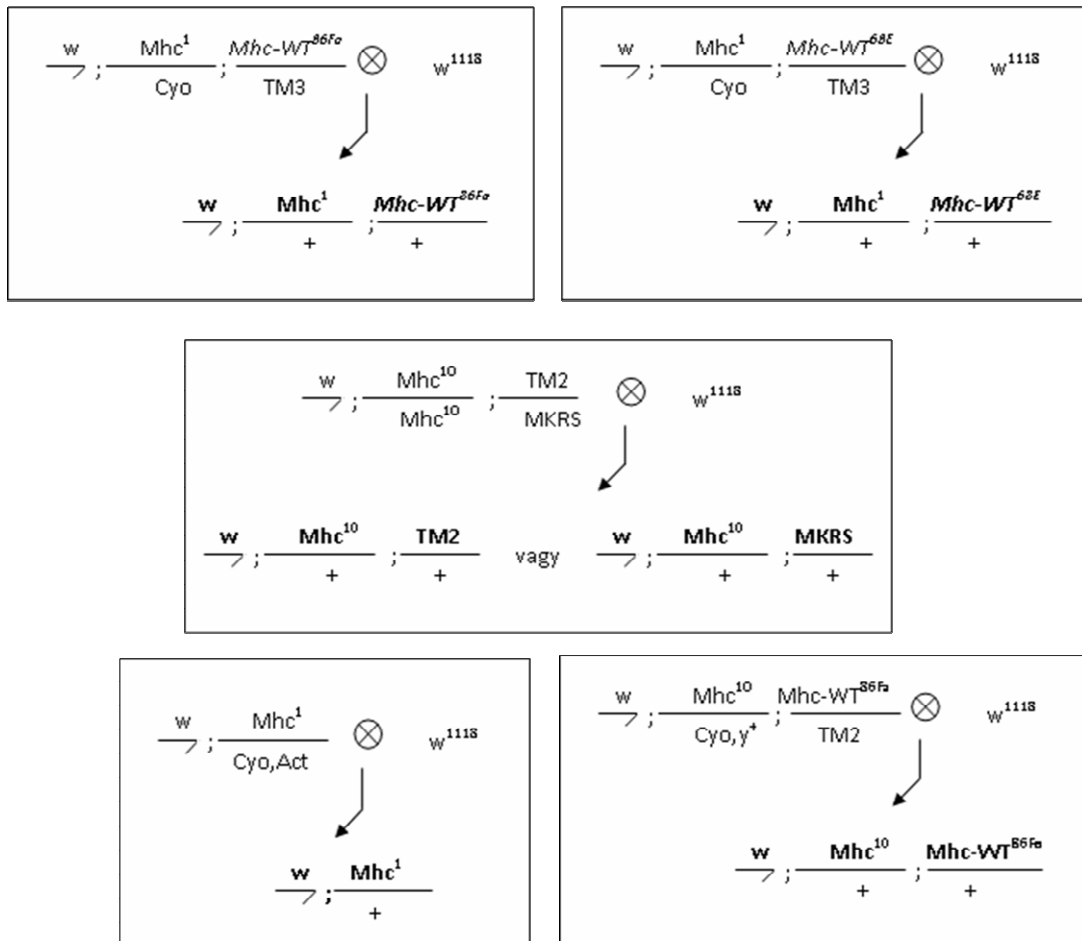
Felhasznált ellenanyagok

A kettin jelöléséhez kettin patkány elsődleges ellenanyagot használtam (1:200), másodlagos ellenanyagként Alexa488 anti patkányt (1:500). Az aktin festését Rhodamin-Phalloidinnal végeztem (1:100).

A repülési képesség, a szarkomerhossz és a fehérjemennyiség vizsgálatához szükséges keresztezések

A repülési képesség, az izomszerkezet és a fehérjeszint tanulmányozásához a fenotípust befolyásoló balanszer kromoszómákat w^{1118} -hoz való keresztezéssel vad típusú kromoszómákra cseréltem.





Repülési teszt

A legyek röpképességét egy zárt plexi dobozban vizsgáljuk. A doboz oldalán levő ke-
rek nyíláson keresztül engedjük be a legyeket, és a hátsó falon található vízszintes jelhez vi-
szonyítjuk a legyek röptét. A röpképtelen legyek lehullanak a doboz aljára, a jól repülő legyek
a vonal feletti régióba szállnak, míg a kevésbé jó röpképességűek a vonal alatti dobozoldalra
repülnek.

Poliakrilamid gélelektroforézis

Semleges pH-n a fehérjék az elsődleges szerkezetüktől függően negatív vagy pozitív
töltéssel rendelkeznek. Ha a makromolekulákat oldatba helyezzük elektromos erőter hatására
elektromos töltésüknek, méretüknek és alakjuknak megfelelően vándorolnak. Ezt a folyamatot
nevezik elektroforézisnek. Az SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate- PolyAcrylamide Gel
Electrophoresis) esetén a vándorlás egy erősen hidratált poliakrilamid gélben történik, amely-
nek pórusátmérője szabályozható. Az eljárás alapja, hogy az akrilamid vizes közegben, bizo-
nyos katalizátorok jelenlétében (Temed) polimerizálódik, így megszilárdulva egy hálózatos

szerkezetet ad. A módszer során alkalmazott, a fehérjék kicsomagolásához használatos SDS egy anionos detergens, mely egyúttal egy negatív töltést is kölcsönöz a fehérjének, gyorsítva a pozitív elektróda felé történő mozgását. A fehérjemintához β -merkaptoetanolt adva, az felbontja a polipeptid láncok közötti S-S kötést, kizárva ezzel a fehérjék alakjától való függést.

Az eljárás során miozin és aktin mutáns legyek indirekt repülőizmát vizsgáltam annak érdekében, hogy összehasonlítsam az aktin és miozin fehérjék kifejeződési szintjét. A vizsgálni kívánt legyek fejét, potrohát, lábait és szárnyait eltávolítottam így csak a tor részt lizáltam. A legyeket PBS-ben boncoltam és a tort 20 μ l jégen tartott lízis pufferben éjszakára 4°C-ra tettem. Másnap a mintákhoz 5 μ l 5%-os SDS mintapuffert és 1,315 μ l β -merkaptoetanolt mértem, majd 10 percig forraltam. Ezt követően lecentrifugáltam a mintákat 13000 rpm-el 1 percig.

A 6%-os gél elkészítéséhez előkészítettem az üveglapokat és összeszereltem a gélöntő kitet (Cleaver Scientific). A running gélét összemértem és a két üveglap közé pipettáztam. A gél szintje a fésű alatt kb 1 cm-el legyen. A még folyékony running gél tetejére izopropanolt pipettáztam majd 20-40 percet vártam a gél polimerizációjára. Ezt követően leöntöttem az izopropanolt, és az alkoholmaradék elpárolgásával párhuzamosan összemértem a stacking gélét. A stacking felvitelét követően rögtön behelyeztem a fésűt figyelve a buborékmentességre. 20 perc elteltével óvatosan eltávolítottam a fésűt és az összeszerelt kitet az 1x SDS running puffert tartalmazó tankba helyeztem. A gélét tartalmazó belső részt is feltöltöttem pufferrel, hogy ellepje a zsebeket, majd átmostam pipettával őket. A legszélső zsebekbe a mintákkal megegyező térfogatú 1x SDS mintapuffert tettem, majd a maradékot feltöltöttem a mintákkal és a markerrel. A gélét 70V feszültséggel futtattam, míg a futási front el nem tűnt (kb 2 óra).

A futtatást követően a gélét előkészítem Coomassie-kék festéshez. Elsőként 2x5 percig mostam dH₂O-val. A mosást követően 50 ml fixáló oldatban (50% metanol, 10% ecetsav) 1 órán keresztül mozgattam. A fixáló oldatot leöntöttem és 5 perces desztillált vizes mosással távolítottam el a gélről. Ezt követően Coomassie blue festéket öntöttem a gélre, hogy ellepje és fél órán keresztül hagytam festődni. A gélét folyamatosan mozgattam. A fél óra leteltével mosófolyadékban (20 % metanol, 10% ecetsav) mostam, míg szép tiszta képet nem kaptam, majd a gélét 5%-os ecetsavat tartalmazó dH₂O-ban tároltam.

EREDMÉNYEK

Az *Actin88F* gén és az *Act88F* konstrukciók

A legtöbb eukarióta genom számos aktin izoformát tartalmaz, amelyek aminosav szekvenciája csak minimális mértékben különbözik. A *Drosophila melanogaster* esetében hat aktin gént találunk, melyek közül kettő a citoszkeleton, négy az izom felépítésében játszik szerepet. A négy izomban kifejeződő gén közül az *Act88F* jelű kizárólag a torban fejeződik ki, azon belül is főként csak az indirekt repülőizomban (IFM), ahol ez az egyetlen ismert szarkomerikus aktin izoforma. Mivel az IFM a muslicák legnagyobb izma, és mérete eléri azt a tartományt, hogy kiboncolás után akár kinetikai és izom mechanikai méréseket is lehessen rajta végezni, az aktin aktiváció vizsgálatát célzó kísérleteinket, a miozin mellett, ezzel az IFM specifikus aktin izoformával terveztük elvégezni. Távlati kísérletes célunk az, hogy olyan *Act88F* mutánsokat vizsgáljunk, amelyekben megváltoztattuk azokat a negatívan töltött N-terminális aminosavakat, amelyek együttműködő partnereink eredményei alapján fontos szerepet játszanak az aktin aktivációban (Varkuti et al., 2012).

A harmadik kromoszómán elhelyezkedő *Act88F* gén protein null mutánsai heterozigóta és homozigóta formában is életképesek, röpködni viszont egyáltalán nem képesek (Beall et al., 1989). Korábbi munkákból ismert, hogy az *Act88F* mutánsok röpképtelenségét menekíteni lehet olyan transzgenikus konstrukciókkal, amelyek hordozzák az *Act88F* gén ép kópiáját a szabályozó régiókat is beleértve (Drummond et al., 1991). Ugyanakkor, a publikált eredmények alapján az is nyilvánvaló, hogy az IFM szerkezete és működése nagyon érzékeny az aktin és miozin fehérjék arányára, ill. a gének kifejeződési szintjére (Beall et al., 1989). Ennek tudható be, hogy a genomba random integrációval bejuttatott *Act88F* transzgének többsége nem képes tökéletesen menekíteni a gén hiányát, mert a transzgenikus kópiák kifejeződési szintjét kromatin szintű pozicionális hatások módosíthatják, ezért a transzgénekben található *Act88F* gének hiába állnak elvileg vad típusú génszabályozás alatt, a kifejeződési szintjük mégis jelentősen eltérhet attól. Mindezek figyelembe vételével, de a rendkívül munkaigényes és bizonytalan kimenetelű helyspecifikus rekombináción alapuló mutagenézis módszereket elvetve, egy az *Act88F* null mutánsok menekítésén alapuló transzgenikus kísérleti stratégiát dolgoztunk ki. Ellentétben azonban a korábban használt megközelítésekkel, annak érdekében, hogy biztosítsuk, hogy a tervezett transzgenikus vonalak hasonló szinten fejeződnek ki, elhatároztuk, hogy egy helyspecifikus integráción alapuló transzgenikus rendszert alkalmazunk. Ennek az a lényege, hogy a Φ C31 integráz rendszer segítségével mindig a genom egy adott, ismert, *attP* fogadó szekvenciát hordozó helyére tudjuk beépíteni az *attB* szekvenciákat hor-

dozó konstrukcióinkat (Bischof et al., 2007). Jelenleg több tucat ilyen *attP* szekvenciát hordozó, ún. platform kromoszóma is elérhető a *Drosophila* genetikusok számára. Mivel korábban az *attP* platform kromoszómákat nem használták *Act88F* transzgenikus vonalak előállítására, hosszútávú céljaink elérése érdekében arra volt szükség, hogy meghatározzuk melyik az az integrációs hely (platform kromoszóma), ahol megfelelő szinten képes kifejeződni az oda beépült *Act88F* transzgén. Ennek megállapítása érdekében a teljes vad típusú *Act88F* gént egy 4,1 kb-os *SalI* fragmenten hordozó *attB-Act88F-WT* konstrukciót készítettünk (a klónozás pontos menetét lásd a Módszerek között), ami alkalmas a genomi integrációra. Mivel pozíció effektusok a platform kromoszómákon is előfordulhatnak, úgy döntöttünk, hogy azok közül három független második kromoszómán elhelyezkedő integrációs helyet (*attP51C*, *attP58A* és *attP40*) hasonlítottunk össze, abban bízva, hogy közülük legalább egy hasonló kifejeződési szintet fog biztosítani, mint ami az endogén *Act88F*-re jellemző. Ennek érdekében az *Act88F-WT* konstrukciót a megfelelő Φ C31 integráz; *attP* törzsekbe injektáltuk és sikeresen megalapítottuk a transzgenikus törzseket mindhárom platform kromoszómával. A továbbiakban a második kromoszómás vad típusú *Act88F* gént hordozó transzgenikus törzseket több szempontból is tesztelni akartuk. Kíváncsiak voltunk arra, hogy az *Act88F* homozigóta és heterozigóta null mutánsok röpképtelenségét képes-e menekíteni a transzgének jelenléte egy, ill. két kópiában. Ezen a funkcionális teszten túl, össze akartuk hasonlítani, hogy a menekítő kísérletek során milyen mértékű aktin fehérje szint jellemző az IFM-re és milyen szarkomerikus szerkezet figyelhető meg az IFM-ben.

Az *Act88F* transzgének hatása a repülési képességre

Az *Act88F* null mutánsok mind homo-, mind heterozigóta formában életképesek, de röpkülni nem tudnak (1. táblázat). Az *Act88F-WT* konstrukciót a második kromoszómán hordozó transzgenikus vonalakat a harmadik kromoszómás *Act88F^{KM}* null mutánsokkal kombinálva megvizsgáltuk, hogy képesek-e a transzgenikus kópiák menekíteni az *Act88F^{KM}* mutánsok röpképtelenségét. Először az *Act88F-WT^{51C}/+*; *Act88F^{KM}/+*, *Act88F-WT^{58A}/+*; *Act88F^{KM}/+* és *Act88F-WT^{attP40}/+*; *Act88F^{KM}/+* kombinációkat vizsgáltuk. Azt találtuk, hogy mindegyik inszerció menekítette valamilyen mértékben az *Act88F^{KM}* heterozigóták röpképtelenségét, de teljes mértékben egyik sem működött (1. táblázat), a leghatékonyabbnak az *Act88F-WT^{58A}* inszerció bizonyult ami a mutánsok 83%-ában menekített. Kontroll kísérletként megvizsgáltuk, hogy a transzgenikus vonalak vad típusú *Act88F* háttéren heterozigóta formában befolyásolják-e a repülési képességet, azonban ezek a muslicák tökéletesen jól re-

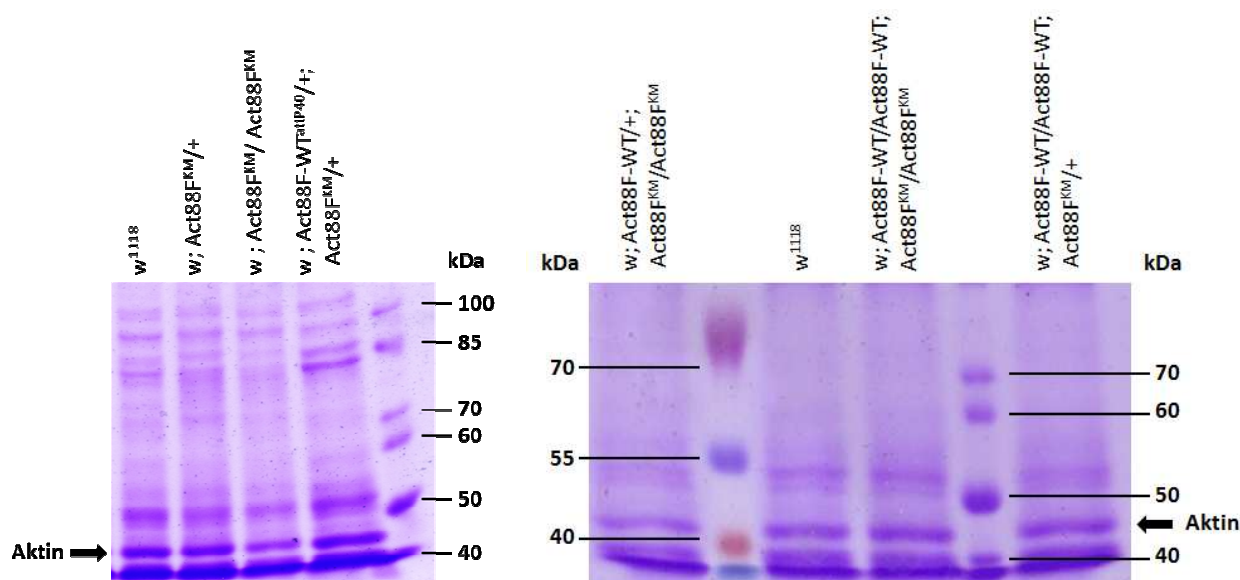
pültek (1. táblázat), tehát a transzgénekben bejuttatott extra *Act88F* gén kópiák jelenléte önma-
gában nem okoz repülési fenotípust. Ezek után a kettős homozigóta (*Act88F-WT/Act88F-WT*;
Act88F^{KM}/Act88F^{KM}) kombinációk repülési képességét vizsgáltuk. Megfigyeléseink szerint
ezek az egyedek egyáltalán nem voltak képesek repülni (1. táblázat), ami azt jelzi, hogy a
homozigóta mutánsok fenotípusát két kópia transzgenikus *Act88F* gén jelenléte még részlege-
sen sem tudja menekíteni. A kettős heterozigóta kombinációk fenotípusa alapján a transzgé-
nekről bizonyosan képződik funkcionálisan aktív Act88F fehérje, hiszen ott részleges menekí-
tés figyelhető meg. Tekintve azonban, hogy a menekítés a kettős heterozigóták esetében is
csak részleges, a kettős homozigótákban pedig egyáltalán nem figyelhető meg, feltételezzük,
hogy a transzgénekről funkcionálisan aktív fehérjék képződnek, de nem a megfelelő mérték-
ben. Mivel a transzgének heterozigóta formában nem befolyásolták a repülési képességet, jó
okunk van feltételezni, hogy nem egy a vad típushoz képest megnövekedett, hanem egy csök-
kent fehérje szint lehet az oka a menekítés hiányának.

genotípus	nem repülő egye- dek aránya (%)	vizsgált egyedek száma (n)
w ; <i>Act88F^{KM}/+</i>	100%	156
w ; <i>Act88F-WT^{58A}/+ ; Act88F^{KM}/+</i>	17%	166
w ; <i>Act88F-WT^{58A}/Cyo,y⁺ ; Act88F^{KM}/Act88F^{KM}</i>	100%	37
w ; <i>Act88F-WT^{58A}/Act88F-WT^{58A} ; Act88F^{KM}/TM3</i>	38%	21
w ; <i>Act88F-WT^{58A}/Act88F-WT^{58A} ; Act88F^{KM}/Act88F^{KM}</i>	100%	16
w ; <i>Act88F-WT^{51C}/+ ; Act88F^{KM}/+</i>	24%	118
w ; <i>Act88F-WT^{51C}/Cyo,y⁺ ; Act88F^{KM}/Act88F^{KM}</i>	100%	35
w ; <i>Act88F-WT^{51C}/Act88F-WT^{51C} ; Act88F^{KM}/TM3</i>	14%	29
w ; <i>Act88F-WT^{51C}/Act88F-WT^{51C} ; Act88F^{KM}/Act88F^{KM}</i>	100%	8
w ; <i>Act88F-WT^{attP40}/+ ; Act88F^{KM}/+</i>	56%	203
w ; <i>Act88F-WT^{attP40}/Cyo,y⁺ ; Act88F^{KM}/Act88F^{KM}</i>	100%	21
w ; <i>Act88F-WT^{attP40}/Act88F-WT^{attP40} ; Act88F^{KM}/TM3</i>	40%	10

1. táblázat Az *Act88F* homo és heterozigóta null mutánsok repülési képességének alakulása a különböző transz-
gének jelenléte esetén.

Az aktin fehérje szint vizsgálata

Az előző fejezetben részletezett menekítési kísérletek alapján arra következtettünk, hogy a transzgenikus *Act88F* konstrukciók által biztosított *Act88F* kifejeződési szint nem egyezik meg a vad típussal. Ezért elhatároztuk, hogy megpróbáljuk összehasonlítani az aktin fehérje mennyiségét a különböző *Act88F* mutáns és menekített kombinációkban, ill. a megfelelő kontroll állatokban. Kísérleteink során vad típusú, *Act88F^{KM}/Act88F^{KM}*, *Act88F^{KM}/+*, *Act88F-WT/+*; *Act88F^{KM}/+*, *Act88F-WT/+*; *Act88F^{KM}/Act88F^{KM}*, *Act88F-WT/Act88F-WT*; *Act88F^{KM}/Act88F^{KM}* és *Act88F-WT/Act88F-WT*; *Act88F^{KM}/+* genotípusú állatok torból származó fehérje kivonataiban vizsgáltuk az aktin szintet. Mivel a tor szöveteinek, azon belül is az izmok legnagyobb részét az IFM teszi ki és az aktin egy nagyon abundáns fehérje, az aktin szintet SDS gélelektroforézis és Coomassie-kék festés után hasonlítottuk össze (9. ábra), min-tánként egyetlen torból származó fehérje kivonatokban.



9. ábra Az aktin fehérje szintje heterozigóta és homozigóta null mutáns, valamint egy illetve két transzgént tartalmazó állatok esetén. A nyíl a 43 kDa-os tartományban található aktinra mutat.

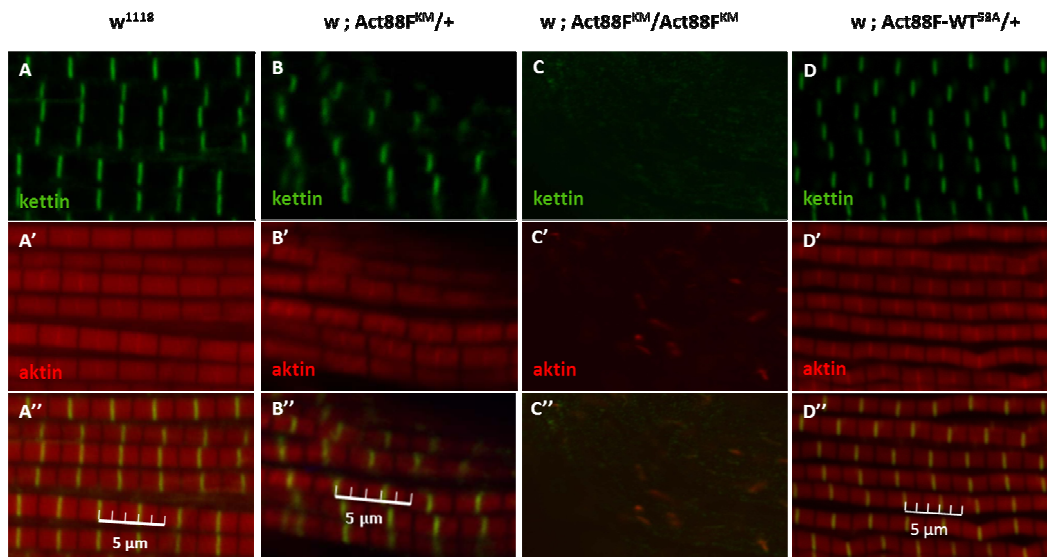
Kísérleteink alapján egyértelműen kimutatható volt, hogy az *Act88F^{KM}* homozigóta mutánsokban jelentősen alacsonyabb az aktin szint, mint a vad típusban (9. ábra), azonban a heterozigóta *Act88F^{KM}* mutánsban és az *Act88F-WT/+*; *Act88F^{KM}/+* kettős heterozigótákban nem láttunk egyértelmű különbséget a vad típushoz képest (9. ábra). A homozigóta null mutáns háttéren egy transzgént tartalmazó állatok aktin szintje viszont kimutathatóan alacsonyabb a vad típusénál. Ezzel szemközt, a kettős homozigóta *Act88F-WT/Act88F-WT*; *Act88F^{KM}/Act88F^{KM}* mutánsok aktin mennyisége a vad típusával megegyezőnek látszik (9. ábar). Végezetül, a heterozigóta null mutáns háttéren két menekítő kópiát tartalmazó állatok

valamelyest magasabb aktin szintet mutattak, mint a vad típus (9. ábra). Eddigi eredményeink tehát nem szolgáltak egyértelmű bizonyítékkal arra vonatkozóan, hogy az *Act88F-WT* menekítő transzgénnek alacsonyabb expressziós szintet biztosítanak, mint az endogén *Act88F* gén. Fontos azonban látnunk, hogy az általunk használt szemi-kvantitatív összehasonlító módszer a kisebb különbségek kimutatására nem alkalmas, ezért kísérleteink ismétlését mindenképpen tervezzük. Egy másik potenciális probléma pedig az lehetett, hogy igaz ugyan, hogy a tor legnagyobb méretű szövete az IFM, de az *Act88F* homozigóták torában nem csökken le nullára az aktin szint (9. ábra), mert az IFM-en kívüli szövetekben is termelődik aktin fehérje, ami már nem az *Act88F* terméke. Ily módon, a nem az *Act88F*-nek megfelelő izoformák jelenléte zavarhatja a kimutatás érzékenységét, ezért a későbbiekben nem a torból, hanem kiboncolt IFM-ből származó fehérje kivonatokkal akarjuk elvégezni a kísérleteket, ahol az *Act88F* izoforma lesz a döntő többségben jelenlévő izoforma.

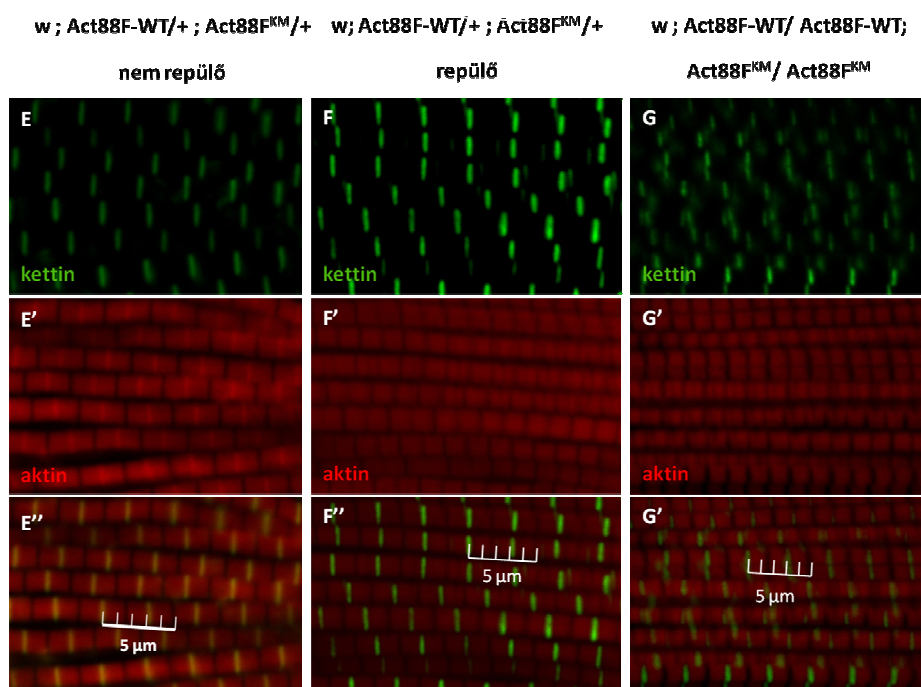
A szarkomer szerkezetének vizsgálata

A vad típusú menekítő konstrukció hatékonyságát a szarkomerek szerkezeti változásainak vizsgálatával is nyomon követtük. Konfokális mikroszkópia segítségével megvizsgáltuk a menekítő kópiát mutáns háttéren hordozó muslicák IFM-jét, ami jelezheti a menekítés hatékonyságát. Kontroll kísérletként először a vad típusú, az *Act88F^{KM}* heterozigóta és homozigóta, valamint az *Act88F-WT* heterozigóta mutánsok izomszerkezetét vizsgáltuk meg. A vad típusú IFM szerkezetére az jellemző, hogy rendkívül szabályos felépítésű szarkomerekből állnak benne a miofibrillumok, a szarkomerek száma és hossza az izomrostokon belül állandó (10. ábra). Az *Act88F^{KM/+}* mutánsok repülőizma alapvetően rendezett szerkezetű szarkomereket mutat, azonban a miofibrillumok átmérője gyakran kisebb a vad típusra jellemzőnél, míg a szarkomerhossz tekintetében az egyedek egy része (~ 60 %) vad típusú (10. ábra), másik részében azonban egyértelmű rövidülés tapasztalható: a vad típusú 3,2 µm-es szarkomerhosszhoz viszonyítva az *Act88F^{KM}* heterozigóta állatok Z-korong távolsága gyakran csak 2,5 µm körüli. Annak ellenére tehát, hogy ebben a mutánsban a miofibrillumok szerveződése viszonylag kis mértékben különbözik a vad típustól, a szarkomerek hosszának ~ 22%-os rövidülése jól magyarázza a röpképtelenség elvesztését. Az *Act88F^{KM}* heterozigóta mutánsokkal szemben, az *Act88F^{KM}* homozigóta mutánsok repülőizmai drámai szerkezeti változásokat mutatnak, azokban szabályos szerkezetű szarkomerek nem figyelhetők meg, a vad típusra jellemző miofibrilláris organizáció nyomokban sem fedezhető fel (10. ábra), ami teljes összhangban van a mutánsok röpképtelenségével. Az *Act88F-WT/+* legyek izomszerveződés-

sét az extra kópia jelenléte nem befolyásolja (10. ábra). A vad típushoz hasonló miofilamentum szerkezetet és szarkomerhosszt tapasztalunk, ami alátámasztja a vad háttéren egy kópia menekítő *Act88F-WT* gént tartalmazó legyek tökéletes repülési képességét.



10. ábra Vad típusú, hetero-, és homozigóta *Act88F* null mutánsok, valamint vad típusú háttéren egy transzgént hordozó állatok szarkomer szerkezete. A felső képsor (A, B, C, D) az izomzat kettin festését, a középső sor (A', B', C', D') az aktin festését, a legalsó sor (A'', B'', C'', D'') pedig a két kép átfedését mutatja.



11. ábra Hetero-, és homozigóta null mutáns törzsek szarkomer szerkezetének vizsgálata egy illetve két menekítő kópia jelenlétében. A felső képsor (A, B, C, D) az izomzat kettin festését, a középső sor (A', B', C', D') az aktin festését, a legalsó sor (A'', B'', C'', D'') pedig a két kép átfedését mutatja.

A kontrollnak tekinthető törzsek vizsgálata után a menekítő konstrukciót mutáns háttéren hordozó muslicák IFM-jét vizsgáltam. Ahogy a fentiekben részletezve van, az *Act88F-WT/+*; *Act88F^{KM}/+* kettős heterozigóták egy része képes repülni másik részük viszont röpképtelennek bizonyult (1. táblázat), ezért a két fenotípus kategóriába eső egyedek IFM-jét külön vizsgáltam mindhárom integrációs hely esetén. Mindkét kategória esetén 8-10 IFM-et tanulmányoztam, de izom szerkezeti szinten egyik esetben sem találtam jelentős eltérést a vad típushoz képest (10., 11. ábra). Ez az eredmény összhangban van azzal a korábbi konklúzióval, hogy az *Act88F-WT* transzgén valóban egy funkcióképes *Act88F* gént hordoz, hiszen szerkezeti szinten is menekíti az *Act88F^{KM}/+* mutánsok fenotípusát. Ezen túlmenően azt is megállapíthatjuk viszont, hogy az *Act88F-WT/+*; *Act88F^{KM}/+* genotípusú egyedek egy része annak ellenére röpképtelen, hogy az IFM szerkezete alapvetően hibátlannak látszik, ami azt sugallja, hogy a repülési képesség elvesztése olyan finom szerkezet változásokra vezethető vissza, melyeket az általunk használt Z-korong és aktin markerekkel nem tudunk kimutatni (11. ábra). Az *Act88F-WT/Act88F-WT*; *Act88F^{KM}/Act88F^{KM}* mutánsokból származó IFM-ek szarkomerhossza a vad típussal megegyező méretet adta, ami a menekítő konstrukciók funkcióképes fehérjét expresszáló képességét megerősítette (10., 11. ábra).

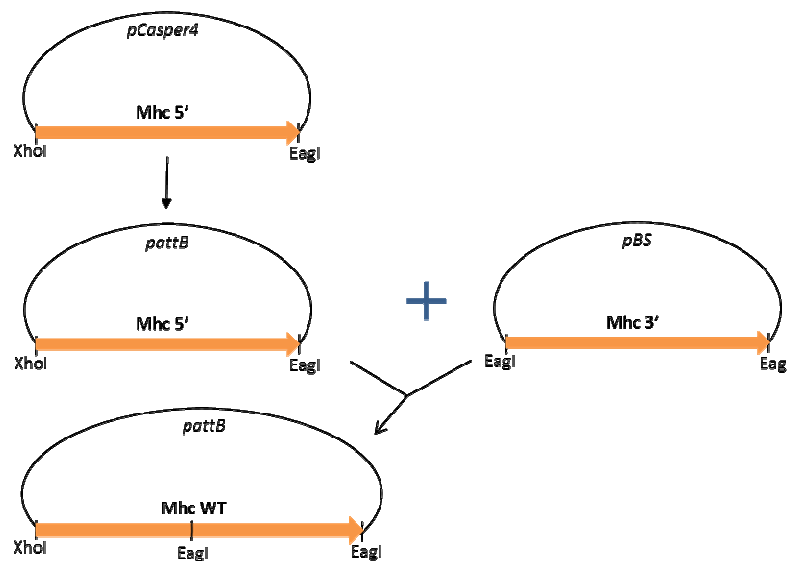
Összegésében az *Act88F-WT* konstrukcióval végzett vizsgálataink alapján a legfontosabb következtetésünk az, hogy az eddig megvizsgált transzgenikus vonalak két kópiában nem képesek menekíteni a homozigóta null mutánsok fenotípusát. Direkt kísérletes bizonyítékkal ugyan erre vonatkozóan nem rendelkezünk, de a menekítés hiánya nagy valószínűséggel a transzgénnek vad típushoz képesti alacsonyabb kifejeződési szintjével van összefüggésben. Ezek alapján a továbbiakban egyrészt új platform kromoszómák tesztelését tervezzük, másrészt meg akarjuk vizsgálni, hogy változik-e az eddig előállított transzgenikus vonalak menekítő képessége, ha három kópiát kombinálunk belőlük homozigóta mutáns háttéren. Időközben együttműködő partnereinkkel megosztva a munkát, elkészítettük az *Act88F* mutáns változatát hordozó konstrukciókat is. Ezekben az aktin aktivációban szerepet játszó N-terminális, vad típus esetében CDDD aminosavakat CNDN, ill. CNNN aminosavakat kódoló szekvenciákra módosítottuk. A mutáns konstrukciók genomi integrációját azonban csak akkor tervezzük elvégezni, ha az *Act88F-WT* konstrukcióval sikeres menekítési kísérletet tudunk elvégezni homozigóta *Act88F^{KM}* mutáns háttéren.

A *Drosophila* Mhc gén és az Mhc konstrukciók

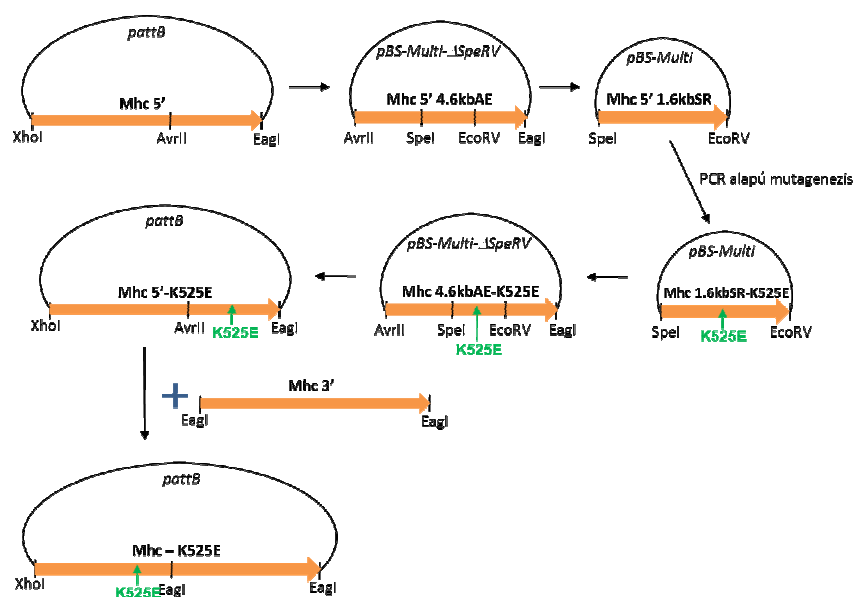
Az aktin és miozin kapcsolat, azon belül is az aktin aktiváció tanulmányozása érdekében a miozin génnel is hasonló kísérleteket terveztünk elvégezni mint az *Act88F* génnel. Eltérően azonban a *Drosophila* aktin génekkel, amelyek közül négy izomban kifejeződő formát ismerünk, a *Drosophila* genomban egyetlen izomban kifejeződő miozin nehéz lánc gén ismert, a második kromoszómán elhelyezkedő *Mhc* gén. Az *Mhc* génről viszont számos alternatív fehérje termék keletkezhet alternatív exonok használatával. Az *Mhc* gén 19 exonja közül 6 exonnak van alternatív splice variánsa, ily módon az *Mhc* génről elméletileg több száz különböző miozin izoforma keletkezhet. Ezek közül pár tucatnak a létezésére van kísérletes bizonyíték, amelyek fejlődési stádium, ill. izom specifikus kifejeződési mintát mutatnak (Bernstein et al., 1986, Rozek and Davidson, 1986, George et al., 1989). Logikus módon, az *Mhc* gén ismert null alléljai (így pl. az *Mhc*¹) homozigóta formában embrió letálisak és a közös (minden transzkriptben jelenlévő) exonokat érintik, míg az alternatív módon használt exonokat érintő mutációk izom specificitást mutatnak (Mogami et al., 1986, O'Donnell and Bernstein, 1988). Erre jó példa az *Mhc*¹⁰ allél, ami homozigóta életképes, de az adult állatok röpképtelenek, és ismert, hogy a mutáció a 15a jelű, IFM specifikus alternatív exon splicingját gátolja (Collier et al., 1990). Az aktin aktiváció szempontjából kritikusnak látszó Lys525 aminosavat (a *Dictyostelium* Arg520 megfelelője) a 9-es számú *Mhc* exon kódolja. Ez egy alternatívan használt exon, aminek három variánsa (9a, 9b, 9c) közül a 9a variáns IFM specifikus. Mindezek figyelembevételével úgy döntöttünk, hogy a 9a jelű exonban mutagenizáljuk a Lys525 aminosavat kódoló tripletet, ami elméletileg egy IFM specifikus mutációként fog viselkedni. Azt várjuk, hogy ha az *Mhc* K525E mutációt hordozó *Mhc* transzgenikus konstrukcióval próbáljuk menekíteni az *Mhc*¹ null allélt, akkor az életképességet menekíteni tudjuk, a mutáció hatása pedig az indirekt repülőizomban tanulmányozható lesz.

Annak érdekében, hogy tervezett vizsgálatainkat el tudjuk végezni, az *Mhc* gén esetében is szükség volt egy olyan konstrukció létrehozására, ami tartalmazza a teljes *Mhc* gént és lehetővé teszi annak genomi integrálódását. Az *Act88F* vizsgálatával kapcsolatban is említett megfontolások miatt, nevezetesen az erősen dózis érzékeny működésmód miatt, céljainkra ez esetben is a genomiális menekítő konstrukciók használata látszott alkalmasnak, ezért egy vad típusú és egy a 9a exonban K525E mutációt hordozó konstrukció létrehozását határoztuk el. A vad típusú *Mhc* gén meglehetősen nagy méretű, egy kb. 20 kilobázisnyi genomi régióban helyezkedik el. Korábbi megfigyelések alapján egy 24 kb-os genomi DNS-t tartalmazó transzgenikus konstrukció hordozza a teljes *Mhc* gént, beleértve annak szabályozó régióit is, mert

ezzel a transzgénnel lehetséges volt menekíteni az *Mhc*¹ null mutáns letalitását (Swank et al., 2000). Ezek alapján célszerűnek látszott, hogy olyan konstrukciókat építsünk amiben ugyan-
 ezt a 24 kb-nyi genomiális régiót klónozzuk a ΦC31 integrációra alkalmas vektorba. A vad
 típusú konstrukció elkészítéséhez felhasználtuk a Sanford Bernstein (San Diego State Univer-
 sity) által rendelkezésünkre bocsájtott konstrukciókat, amelyek az *Mhc* gén egyik, ill. másik
 felét hordozták (12. ábra). Ezt a két szubklónt felhasználva a 12. ábrán bemutatott séma sze-
 rint klónoztuk a teljes *Mhc* gént pattB vektorba. A K525E mutáns klónozása során egy jóval
 bonyolultabb klónozási stratégiát dolgoztunk ki (13. ábra), de végül sikeresen megoldottuk a
 mutáns konstrukció elkészítését, szintén a pattB vektorban.



12. ábra A vad típusú MHC-WT konstrukció létrehozása, a gén 5' és 3' részének pattB vektorba klónozásával.



13. ábra A pattB-Mhc-K525E mutáns konstrukció klónozása.

A transzgenikus állatok előállítására alkalmas konstrukciók létrehozása után a vad típusú konstrukciót integráltuk először a genomba. Tekintve, hogy az *Mhc* gén a második kromoszómán helyezkedik el, a későbbi genetikai kísérleteket megkönnyítendő, két harmadik kromoszómás fogadó helyet (*attP*) használtunk, a 68E és a 86Fa jelűeket. Annak ellenére, hogy az injektált konstrukció meglehetősen nagy méretű volt (~ 31,5 kb), mindkét esetben sikerült a genomi integrálás. A 68E esetében egyetlen integránst kaptunk 156 G₀ utódtól, a 86Fa esetében pedig két integránst 362 G₀ utódtól. Ezek az adatok jelzik, hogy a ΦC31 integráz hatékonyabb transzgenezist tesz lehetővé, mint a random P-elemes integráció, mert abban az esetben egy hasonló *Mhc* konstrukcióval 1/516 volt a beépülési ráta (Swank et al., 2000).

A letalitás és a röpképesesség menekítése

A vad típusú *Mhc* konstrukciót hordozó transzgenikus állatok előállítása lehetővé tette a tervezett funkcionális vizsgálatok megkezdését. Kísérleteink során először azt vizsgáltuk, hogy képes-e a vad típusú transzgén menekíteni az *Mhc* null mutánsok letalitását. Amikor *w; Mhc¹/SM6b; MHC-WT^{86Fa}/TM3* hímeket és nőtényeket kereszteztünk egymáshoz, azt tapasztaltuk, hogy az utódgenerációban *Mhc¹/Mhc¹*; *MHC-WT^{86Fa}/MHC-WT^{86Fa}* és *Mhc¹/Mhc¹*; *MHC-WT^{86Fa}/+* genotípusú adult egyedek is megjelentek. Ez azt jelezte, hogy az *MHC-WT^{86Fa}* transzgenikus vonalban funkcióképes *Mhc* fehérje termelődik, ami képes menekíteni az *Mhc¹* homozigóta mutánsokra jellemző letalitást. Azt is megfigyeltük ugyanakkor, hogy a menekített egyedek jóval kisebb számban keltek ki, mint az a Mendel-féle szegregációs szabályok alapján várható lenne, ami azt sugallta, hogy az *MHC-WT^{86Fa}* transzgenikus vonal nem képes teljes mértékben biztosítani a vad típusra jellemző *Mhc* kifejeződési szintet. Az *MHC-WT^{68E}* jelű transzgenikus vonallal nagyon hasonló eredményeket kaptunk, de ebben az esetben a menekített mutánsok száma még alacsonyabb volt, mint az *MHC-WT^{86Fa}*-val, tehát valószínűsíthető volt, hogy az *MHC-WT^{68E}* transzgénről sem vad típusú szinten fejeződik ki az *Mhc*.

A röpképesesség vizsgálata során azt vizsgáltuk, hogy az *MHC-WT* transzgenikus vonalak képesek-e menekíteni az *Mhc¹* null mutánsok, ill. az *Mhc¹⁰* röpképtelen mutánsok röpképes fenotípusát homo- és heterozigóta formában. Az ismert irodalmi adatokkal megegyezően, azt találtuk, hogy az *Mhc¹/+*, *Mhc¹⁰/+* és *Mhc¹⁰/Mhc¹⁰* genotípusú egyedek szinte mindegyike röpképtelen (2. táblázat). Ezzel szemközt, az *Mhc¹/+*; *MHC-WT^{86Fa}/+*, az *Mhc¹/+*; *MHC-WT^{68E}/+* az *Mhc¹⁰/+*; *MHC-WT^{86Fa}/+* genotípusok esetében a röpképesesség kb. 90%-ban helyreállt (2. táblázat). Ezek az eredmények tehát szintén megerősítették, hogy az

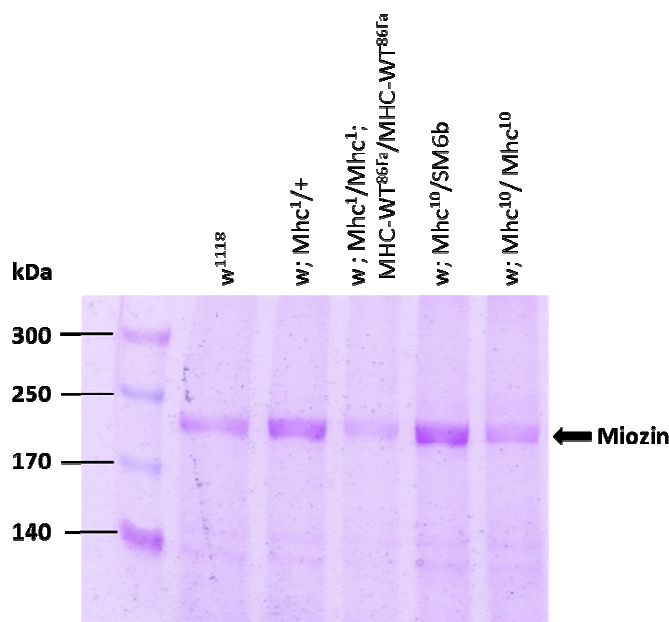
MHC-WT konstrukciókról funkcióképes *Mhc* fehérjék termelődnek. A következőkben azonban, amikor az *Mhc*¹/*Mhc*¹; *MHC-WT*^{86Fa}/*MHC-WT*^{86Fa}, *Mhc*¹/*Mhc*¹; *MHC-WT*^{68E}/*MHC-WT*^{68E} és *Mhc*¹⁰/*Mhc*¹⁰; *MHC-WT*^{86Fa}/*MHC-WT*^{86Fa} mutáns kombinációk röpképeségét vizsgáltuk, azt figyeltük meg, hogy homozigóta mutáns háttéren a transzgén két kópiában sem voltak képesek menekíteni a röpképtelenséget, ill. a repülési képesség egyáltalán nem vagy csak néhány százalékos mértékben állt helyre (2. táblázat). Kontroll kísérletként megvizsgáltuk az *MHC-WT*^{86Fa}/+ és *MHC-WT*^{68E}/+ genotípusú egyedek röpképeségét is, és azt tapasztaltuk, hogy a 68E transzgén jelenléte egyáltalán nem, míg a 86Fa inszert csak az egyedek 6%-ában okozott repülési fenotípust (2. táblázat). Mivel ismert, hogy az IFM működése, ill. a repülési képesség nagyon érzékeny a miozin fehérje szintjére, kísérleteink alapján azt a konklúziót tudjuk levonni, hogy ugyan az *MHC-WT* transzgenikus vonalak funkcióképes *Mhc* fehérjéket kódolnak, a termelődő fehérjék mennyisége valószínűleg eltér a vad típusától és emiatt a homozigóta *Mhc* mutánsok röpképtelenségét nem tudjuk menekíteni.

genotípus	nem repülő egyedek aránya (%)	vizsgált egyedek száma (n)
w ; <i>Mhc</i> ¹ /+	99%	411
w ; <i>Mhc</i> ¹ /+ ; <i>MHC-WT</i> ^{86Fa} /+	16%	358
w ; <i>Mhc</i> ¹ / <i>Mhc</i> ¹ ; <i>MHC-WT</i> ^{86Fa} / <i>MHC-WT</i> ^{86Fa}	93%	44
w ; <i>Mhc</i> ¹ /+ ; <i>MHC-WT</i> ^{68E} /+	0%	48
w ; <i>Mhc</i> ¹ / <i>Mhc</i> ¹ ; <i>MHC-WT</i> ^{68E} / <i>MHC-WT</i> ^{68E}	100%	41
w ; <i>Mhc</i> ¹⁰ /+	100%	52
w ; <i>Mhc</i> ¹⁰ / <i>Mhc</i> ¹⁰	100%	102
w ; <i>Mhc</i> ¹⁰ /+ ; <i>MHC-WT</i> ^{86Fa} /+	6%	34
w ; <i>Mhc</i> ¹⁰ / <i>Mhc</i> ¹⁰ ; <i>MHC-WT</i> ^{86Fa} / <i>MHC-WT</i> ^{86Fa}	100%	30

2. táblázat Az *Mhc*¹ és *Mhc*¹⁰ hetero-, és homozigóta mutánsok röpképeségének vizsgálata a menekítő transzgén jelenlétében.

A miozin fehérje szintjének vizsgálata

Az IFM specifikus *Act88F* génnel végzett kísérleteinkhez hasonlóan a miozin esetében is össze akartuk hasonlítani a fehérje szinteket a különböző mutáns és menekítő konstrukciók esetében. Csakúgy mint az aktin, a miozin is rendkívül abundáns fehérje a torban, ill. az IFM-ben, ezért itt is SDS gélelektroforézist és Coomassie-kék festést alkalmaztunk az egyetlen torból származó fehérje kivonatok összehasonlítására. Az 14. ábrán bemutatott eredmények alapján módszerünkkel a vad típusú és a heterozigóta *Mhc*¹ vagy *Mhc*¹⁰ mutánsok miozin szintje nem mutat nyilvánvaló különbségeket, ellenben az egyértelműen látható, hogy a kontrollként használt *Mhc*¹⁰ homozigóták és az *Mhc*¹/*Mhc*¹; *MHC-WT*^{86Fa}/*MHC-WT*^{86Fa} menekített mutáns jóval alacsonyabb miozin fehérje szinttel rendelkezik mint a vad típus. Ezek a megfigyelések tehát megerősítették azt a feltételezést, hogy a transzgenikus *MHC-WT* konstrukciók alacsonyabb miozin kifejeződési szintet biztosítanak, mint az endogén lókus, ami ugyan elegendő az életképesség helyreállításához, de nem elegendő a repülési képesség biztosításához.

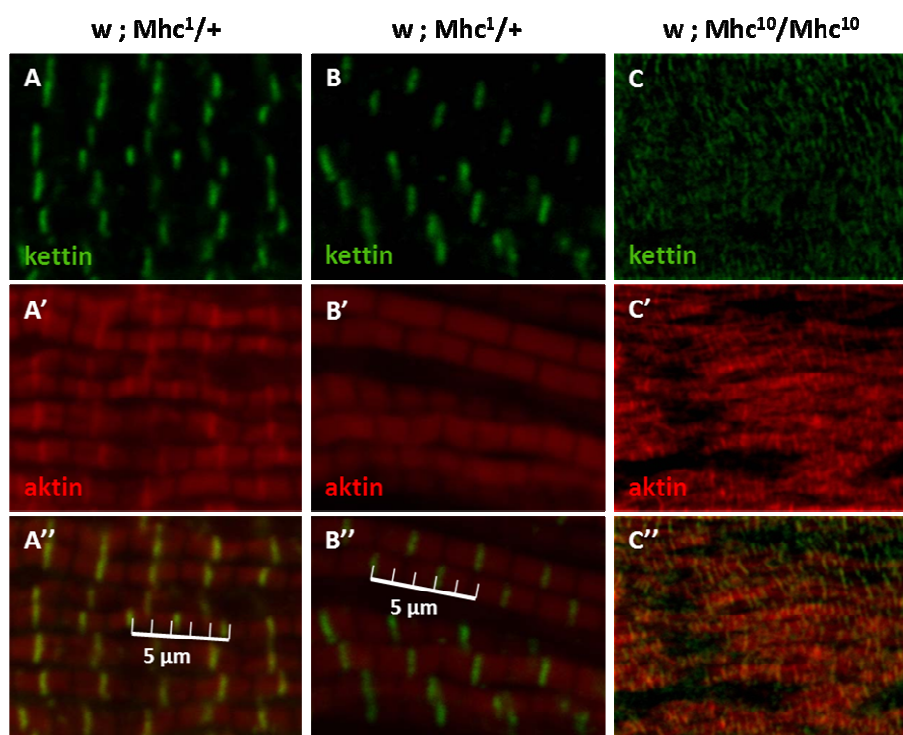


14. ábra A miozin fehérje mennyiségének összehasonlítása homo és heterozigóta null mutánsok, valamint heterozigóta háttérű null mutáns két transzgénnel történő menekítése esetén. A vastag fekete nyíl a 230 kDa-os miozin elhelyezkedését mutatja.

A szarkomer szerkezetének vizsgálata

A repülési tesztek elvégzése során kapott eredmények kimutatták, hogy a transzgenikus vonalak funkcióképes *Mhc* fehérjéket kódolnak, mert az életképességet menekítik, azonban homozigóta null mutánsokban két extra kópia bevitele esetén nem eredményezik a repü-

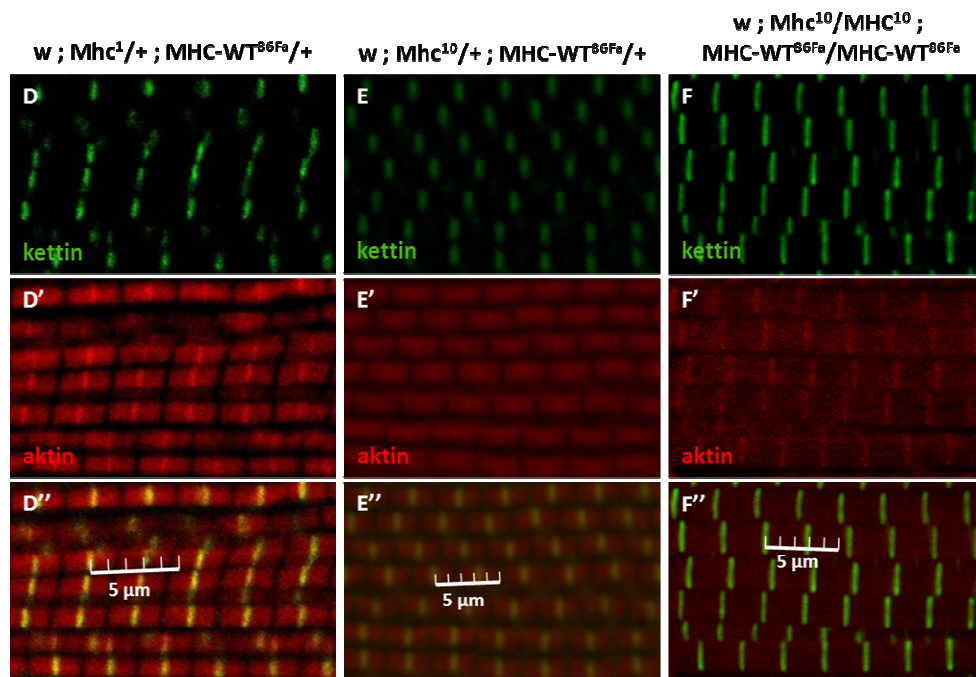
lőkéesség visszanyerését. Annak érdekében, hogy megtudjuk, mi okozza a transzgenikus legyek röpképtelenségét az aktinos kísérleteinkhez hasonlóan ebben az esetben is megvizsgáltuk a szakromerek szerkezeti felépítését. Konfokális mikroszkópos felvételeken a 100%-ban röpképtelen $Mhc^1/+$ mutáns legyek izomszerveződése a vad típusú izom felépítéséhez hasonlóan mutatkozott (15. ábra). Egyetlen fontos különbséget tudtunk detektálni, a szarkomerek rövidülését, ami egy kb. $0,8\mu\text{m}$ -es rövidülésnek adódott (15. ábra). A $\sim 25\%$ -os rövidülés olyan mértékű izomszerkezetbeli változásnak minősül, amely elegendő a repkéesség elvesztéséhez. A szintén röpképtelen Mhc^{10}/Mhc^{10} homozigóta mutáns legyek vizsgálata során a röpképtelenséget teljes mértékben alátámasztó kaotikus, a vad típustól eltérő szerkezetű izomfelépítést tapasztaltunk (15. ábra).



15. ábra Mhc^1 heterozigóta és Mhc^{10} homozigóta null mutáns állatok izomszerkezete. A felső képsor (A, B, C, D) az izomzat kettin festését, a középső sor (A', B', C', D') az aktin festését, a legalsó sor (A'', B'', C'', D'') pedig a két kép átfedését mutatja.

A menekítő kópiát tartalmazó genetikai kombinációk közül az $Mhc^1/+;MHC^{WT86Fa}/+$, $Mhc^{10}/+;MHC^{WT86Fa}/+$ és az $Mhc^{10}/Mhc^{10};MHC^{WT86Fa}/MHC^{WT86Fa}$ genotípusú mutánsokat vizsgáltuk. A repülési teszt alapján majdnem 100%-osan menekített $Mhc^1/+;MHC^{WT86F}$ és $Mhc^{10}/+;MHC^{WT86Fa}/+$ legyek izomszerkezetét vizsgálva azt várnánk, hogy a menekítés hatására a szarkomerek rövidülése helyreáll. Festéseink alapján a vártak megfelelően a Z-

korongok távolsága a vad típusú $\sim 3,2\mu\text{m}$ -nek mutatkozott (16. ábra). Az Mhc^{10}/Mhc^{10} mutáns állatok röpképtelenségét a homozigóta háttéren levő két extra kópia MHC^{WT86Fa} nem volt képes visszaállítani. A szarkomer szerkezeti vizsgálatok alapján az $Mhc^{10}/Mhc^{10};MHC^{WT86Fa}/MHC^{WT86Fa}$ menekített állatok miofibrillumai nagy mértékben rendezettek és szarkomer hosszuk nem tér el a vad típustól (16. ábra). Figyelemreméltó azonban, hogy ezekben a mutánsokban a miofibrillumok vastagsága megnőtt, a vad típusú $\sim 1,2\mu\text{m}$ -es Z-korong magasság ebben az esetben $2\mu\text{m}$ -nek adódott (16. ábra). Eredményeink alapján elmondható, hogy összhangban a repülési tesztek eredményeivel, a heterozigóta mutánsok menekítése egy kópia menekítő konstrukcióval valóban helyreállítja a normális szarkomer szerkezetet. Az IFM null mutánsnak tekintett Mhc^{10} homozigóták szarkomer fejlődési hibáit azonban két kópia menekítő konstrukció jelenléte sem volt képes tökéletesen helyreállítani, ami jól magyarázza az $Mhc^{10}/Mhc^{10};MHC^{WT86Fa}/MHC^{WT86Fa}$ genotípusú állatok röpképtelenségét. Az ezekben a mutánsokban megfigyelhető vastagabb miofibrillumok képződésének oka egyelőre nem világos, de korábbi ismeretek alapján a vad típushoz képesti bármilyen csekély szerkezeti eltérés is röpképtelenséget okoz, tehát a fenotípus ebben a vonatkozásban egyértelműen értelmezhető.



16. ábra Heterozigóta háttéren egy menekítő kópiát, valamint homozigóta háttéren 2 menekítő kópiát tartalmazó állatok izomszerveződése. A felső képsor (A, B, C, D) az izomzat kettin festését, a középső sor (A', B', C', D') az aktin festését, a legalsó sor (A'', B'', C'', D'') pedig a két kép átfedését mutatja.

Az MHC-WT transzgenikus muslicákkal végzett kísérleteink együttesen nagyon hasonló konklúzióval zárultak mint az Act88F-es kísérletek. Nevezetesen, annak ellenére, hogy a heterozigóta mutánsok fenotípusát a transzgének biztatóan magas százalékban képesek menekíteni, az eddig megvizsgált transzgenikus vonalak két kópiában nem képesek menekíteni a homozigóta null mutánsok fenotípusát. Az *MHC-WT^{86Fa}* vonal esetében a miozin fehérje szintek összehasonlítása alapján egyértelműnek látszik, hogy a menekítés hiánya a transzgének alacsonyabb génkifejeződési szintjére vezethető vissza. Emiatt a továbbiakban a miozin esetében is új platform kromoszómák tesztelésére lesz szükség, illetve itt is el fogjuk végezni a menekítési kísérleteket három kópia *MHC-WT* transzgén jelenlétében, emellett a kromoszóma párosodástól függő inaktivációs hatás kizárása érdekében az *MHC-WT^{86Fa}* és *MHC-WT^{68E}* transzgének menekítő hatását transz helyzetben is vizsgálni fogjuk *Mhc¹⁰/Mhc¹⁰;MHC^{WT86Fa}/MHC^{WT68E}* genotípusú egyedek előállításával. Azt reméljük, hogy a későbbiekben sikerülni fog az alkalmas platform kromoszómák vagy platform kombinációk kiválasztása, ami lehetővé fogja tenni, hogy a korábban elkészített MHC^{K525E} mutáns konstrukciót is integrálni és vizsgálni tudjuk.

ÖSSZEFOGLALÓ

Munkám célja olyan *Drosophila* mutánsok előállítása, melyek megzavarják a miozin aktin aktivációját a muslicák legnagyobb méretű izmában, az indirekt repülőizomban. Hosszútávú célként olyan aktin és miozin mutáns *Drosophila* törzsek előállítását tűztük ki célul, melyek mutációt hordoznak az aktin és a miozin aktin aktivációban szerepet játszó részeiben. Együttműködő kutatócsoportunk előzetes vizsgálatai alapján kiderült, hogy az aktin negatív töltésű N-terminális vége az aktin aktiváció során kapcsolódik a miozin molekula motor doménjének aktivációs hurkához. Az aktivációs hurok tanulmányozása során kapott eredmények alapján az aktinnal való kapcsolat alapja egy pozitív töltésű lizin aminosav az 525-ös pozícióban. Célunk az aktin negatív töltésű N-terminálisát, ill. a miozin K525-ös aminosavát érintő mutációk vizsgálata olyan transzgenikus konstrukciók segítségével, amelyeket aktin, ill. miozin null mutáns háttéren fejeztetünk ki. A tervezett kísérletekhez szükséges mutáns konstrukciókat sikeresen létrehoztuk mind az aktin, mind pedig a miozin esetében. Ezen konstrukciók vizsgálata előtt azonban kísérleti rendszerünk optimalizálására volt szükség, aminek az volt a lényege, hogy vad típusú menekítő konstrukciók segítségével megpróbáltuk meghatározni melyek azok a genomi inszerciós helyek, amelyek megfelelő génkifejeződési szintet tesznek lehetővé a transzgénekre. TDK dolgozatomban főként ezeket a kísérleteket mutattam be, amelyek célja az volt, hogy a *Drosophila*-ban rendelkezésre álló *attP* helyeket hordozó integrációs platformként szolgáló kromoszómák közül kiválasszuk a mutáns konstrukciók vizsgálatára legalkalmasabbakat.

Kísérleteimet az IFM specifikus *Act88F* és az *Mhc* génekkel végeztem. Az általunk használt mutánsok közül az *Act88F^{KM}* és az *Mhc¹⁰* homo- és heterozigóta formában is életképesek, míg az *Mhc¹* miozin null mutáns törzs homozigóta életképtelen. Ezek a mutánsok homo- és heterozigóta formában is röpképtelenek. Kísérleteim során olyan transzgenikus állatokat hoztam létre, melyek aktin vagy miozin null mutáns háttéren hordoztak egy vagy több extra kópia aktin vagy miozin transzgént. Mivel a Φ C31 integráz/*attP* rendszert korábban *Act88F* és *Mhc* transzgének vizsgálatára nem használták, kísérleteink elvégzése előtt nem volt ismert, hogy a különböző *attP* platform kromoszómák milyen kifejeződési szintet biztosítanak az IFM-ben, ezért az *Act88F* esetében három, míg az *Mhc* esetében két integrációs helyet hasonlítottunk össze. A különböző genomi pozíciókba integrálódott vad típusú kópiák funkció- és menekítő képességét az életképességre és a repülőképeségre gyakorolt hatásukkal vizsgáltam, ezeken túl pedig az aktin és miozin mennyiséget, és a szarkomerek szerkezetét is megvizsgáltam a különböző mutáns kombinációkban.

Az Act88F-WT és MHC-WT transzgenikus muslicákkal elvégzett kísérleteinkről összegzésében elmondható, hogy alapvetően hasonló konklúziókkal zárultak. Az első fontos konklúzió az volt, hogy a fenotípusos menekítési kísérletek mindkét esetben egyértelműen bizonyították, hogy az általunk létrehozott transzgenikus konstrukciók funkcióképesek, tehát róluk aktív fehérjék képződnek. A második legfontosabb megfigyelés az volt, hogy a heterozigóta mutánsok repülési fenotípusa, az *Act88F-WT^{attP40}* beépülés kivételével, igen nagy hatékonysággal menekíthető volt egy kópia transzgén jelenlétében. A harmadik lényeges konklúzió azonban az volt, hogy a heterozigótákkal kapott biztató eredmények ellenére, az eddig megvizsgált transzgenikus vonalak két kópiában nem képesek menekíteni a homozigóta null mutánsok fenotípusát. Kontroll kísérleteink alapján megállapítottuk, hogy az *Act88F-WT* vagy *MHC-WT* transzgenikus konstrukciók jelenléte vad típusú háttéren nem befolyásolja az állatok repülési képességét. Mindezt egybevetve azzal a ténnyel, hogy a heterozigóta null mutánsokban különböző visszacsatolási mechanizmusok miatt általában nem csökken a felére a génkifejeződési szint, eredményeink leglogikusabb magyarázata az lehet, hogy a vizsgált transzgenikus konstrukciók alacsonyabb kifejeződési szintet biztosítanak a vad típusnál. Ez a csökkent szint elegendő lehet az 50%-osnál magasabb mértékű kifejeződést biztosító heterozigóta mutánsok menekítésére, de a csökkent szint kétszerese már nem elegendő a null mutánsok menekítésére. Hipotézisünkkel összhangban, az *MHC-WT^{86Fa}* vonal esetében a miozin fehérje szintek összehasonlítása alapján egyértelműnek látszik, hogy a transzgén két kópiában null mutáns háttéren valóban alacsonyabb génkifejeződési szintet mutat mint a vad típus. A transzgéneken megfigyelhető csökkent génkifejeződési szint magyarázata valószínűleg az endogén gének kromoszómális környezetétől eltérő kromoszómális pozícióeffektusokhoz köthető. Ezek kiküszöbölése és eredeti célunk elérése érdekében a továbbiakban több kísérleti megközelítést is szeretnénk használni. Egyrészt az aktin és a miozin transzgének esetében is tervezzük új platform kromoszómák tesztelését, másrészt meg akarjuk vizsgálni, hogy változik-e az eddig előállított transzgenikus vonalak menekítő képessége, ha nem kettő, hanem három kópiát kombinálunk belőlük homozigóta mutáns háttéreken. Végezetül, az is elképzelhető, hogy a homozigóta transzgénekre jellemző csökkent kifejeződési szint a kromoszóma párosodástól függ, ezért azt is tervezzük, hogy a menekítő konstrukciókat transz kombinációban (pl. *MHC-WT^{68E}/MHC-WT^{86Fa}*) is kipróbáljuk majd. Azt reméljük, hogy ezen megközelítésekkel a későbbiekben sikerülni fog az alkalmas platform kromoszómák vagy platform kombinációk kiválasztása, ami lehetővé fogja tenni, hogy a korábban elkészített *Act88F^{CNDN}*, *Act88F^{CNNN}* és *MHC^{K525E}* mutáns konstrukciókat is integrálni tudjuk, és meg tudjuk vizsgálni milyen hatást gyakorolnak az IFM szerkezetére és mechanikai tulajdonságaira.

FELHASZNÁLT IRODALOM

- Anson M, Drummond DR, Geeves MA, Hennessey ES, Ritchie MD, Sparrow JC (Actomyosin kinetics and in vitro motility of wild-type *Drosophila* actin and the effects of two mutations in the Act88F gene. *Biophys J* 68:1991-2003.1995).
- Au Y (The muscle ultrastructure: a structural perspective of the sarcomere. *Cell Mol Life Sci* 61:3016-3033.2004).
- Beall CJ, Sepanski MA, Fyrberg EA (Genetic dissection of *Drosophila* myofibril formation: effects of actin and myosin heavy chain null alleles. *Genes Dev* 3:131-140.1989).
- Bernstein SI, Hansen CJ, Becker KD, Wassenberg DR, 2nd, Roche ES, Donady JJ, Emerson CP, Jr. (Alternative RNA splicing generates transcripts encoding a thorax-specific isoform of *Drosophila melanogaster* myosin heavy chain. *Mol Cell Biol* 6:2511-2519.1986).
- Bischof J, Maeda RK, Hediger M, Karch F, Basler K (An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific phiC31 integrases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:3312-3317.2007).
- Chesarone MA, Goode BL (Actin nucleation and elongation factors: mechanisms and interplay. *Curr Opin Cell Biol* 21:28-37.2009).
- Collier VL, Kronert WA, O'Donnell PT, Edwards KA, Bernstein SI (Alternative myosin hinge regions are utilized in a tissue-specific fashion that correlates with muscle contraction speed. *Genes Dev* 4:885-895.1990).
- Conibear PB, Bagshaw CR, Fajer PG, Kovacs M, Malnasi-Csizmadia A (Myosin cleft movement and its coupling to actomyosin dissociation. *Nat Struct Biol* 10:831-835.2003).
- Drummond DR, Hennessey ES, Sparrow JC (Characterisation of missense mutations in the Act88F gene of *Drosophila melanogaster*. *Mol Gen Genet* 226:70-80.1991).
- George EL, Ober MB, Emerson CP, Jr. (Functional domains of the *Drosophila melanogaster* muscle myosin heavy-chain gene are encoded by alternatively spliced exons. *Mol Cell Biol* 9:2957-2974.1989).
- Gyimesi M, Tsaturyan AK, Kellermayer MS, Malnasi-Csizmadia A (Kinetic characterization of the function of myosin loop 4 in the actin-myosin interaction. *Biochemistry* 47:283-291.2008).
- Huxley AF, Niedergerke R (Structural changes in muscle during contraction; interference microscopy of living muscle fibres. *Nature* 173:971-973.1954).
- Lymn RW, Taylor EW (Mechanism of adenosine triphosphate hydrolysis by actomyosin. *Biochemistry* 10:4617-4624.1971).
- Malnasi-Csizmadia A, Dickens JL, Zeng W, Bagshaw CR (Switch movements and the myosin crossbridge stroke. *J Muscle Res Cell Motil* 26:31-37.2005).
- Mogami K, O'Donnell PT, Bernstein SI, Wright TR, Emerson CP, Jr. (Mutations of the *Drosophila* myosin heavy-chain gene: effects on transcription, myosin accumulation, and muscle function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:1393-1397.1986).
- O'Donnell PT, Bernstein SI (Molecular and ultrastructural defects in a *Drosophila* myosin heavy chain mutant: differential effects on muscle function produced by similar thick filament abnormalities. *J Cell Biol* 107:2601-2612.1988).
- Reedy MC, Beall C (Ultrastructure of developing flight muscle in *Drosophila*. II. Formation of the myotendon junction. *Dev Biol* 160:466-479.1993).

- Rozek CE, Davidson N (Differential processing of RNA transcribed from the single-copy *Drosophila* myosin heavy chain gene produces four mRNAs that encode two polypeptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:2128-2132.1986).
- Seifert HS, Chen EY, So M, Heffron F (Shuttle mutagenesis: a method of transposon mutagenesis for *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:735-739.1986).
- Shafiq SA (Electron microscopic studies on the indirect flight muscles of *Drosophila melanogaster*. II. Differentiation of myofibrils. *J Cell Biol* 17:363-373.1963).
- Sparrow J, Drummond D, Peckham M, Hennessey E, White D (Protein engineering and the study of muscle contraction in *Drosophila* flight muscles. *J Cell Sci Suppl* 14:73-78.1991).
- Swank DM, Wells L, Kronert WA, Morrill GE, Bernstein SI (Determining structure/function relationships for sarcomeric myosin heavy chain by genetic and transgenic manipulation of *Drosophila*. *Microsc Res Tech* 50:430-442.2000).
- Takacs B, O'Neill-Hennessey E, Hetenyi C, Kardos J, Szent-Gyorgyi AG, Kovacs M (Myosin cleft closure determines the energetics of the actomyosin interaction. *FASEB J* 25:111-121.2011).
- Terada TP, Sasai M, Yomo T (Conformational change of the actomyosin complex drives the multiple stepping movement. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:9202-9206.2002).
- Varkuti BH, Yang Z, Kintses B, Erdelyi P, Bardos-Nagy I, Kovacs AL, Hari P, Kellermayer M, Vellai T, Malnasi-Csizmadia A (A novel actin binding site of myosin required for effective muscle contraction. *Nat Struct Mol Biol* 19:299-306.2012).
- Zot AS, Potter JD (Structural aspects of troponin-tropomyosin regulation of skeletal muscle contraction. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* 16:535-559.1987).

Köszönetnyilvánítás

Ez úton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Mihály Józsefnek a tudományos háttér megteremtéséért, szakmai tanácsaiért, és munkám felügyeletéért.

Köszönöm Gombos Ritának, Migh Edének és Molnár Imrének a gyakorlatban alkalmazott nélkülözhetetlen tudnivalók átadását, munkám segítségét.

Nyilatkozat

Szabó András, Biológia MSc szakos hallgató, kijelentem, hogy a TDK dolgozatomban foglaltak saját munkám eredményei, és csak a hivatkozott forrásokat (szakirodalom, eszközök, stb.) használtam fel.

SZEGED, 2012. 11. 15.