

XXXII. OTDK Biológia Szekció

*Az izom differenciálódást és a szarkomer képződést
szabályozó IV-es kollagén peptid domének azonosítása
interallélikus komplementáció révén*

Kiss András Attila

Biológia M.Sc. II. Évfolyam

2014



Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és
Informatikai Kar

Témavezető: Dr. Mink Mátyás associate professor

SZTE-TTIK Genetikai Tanszék

Tartalomjegyzék:

TARTALOMJEGYZÉK:	2
1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE:	3
2. BEVEZETÉS	4
AZ EXTRACELLULÁRIS TÉR ÉS SZEREPE	4
A KOLLAGÉN	5
A IV-ES TÍPUSÚ KOLLAGÉN	7
A IV-ES TÍPUSÚ KOLLAGÉN MOLEKULÁRIS FELÉPÍTÉSE	7
A IV-ES KOLLAGÉN ÁLTAL LÉTREHOZOTT HÁLÓZAT TÍPUSOK	9
A IV-ES TÍPUSÚ KOLLAGÉN SZEREPE AZ IZOMFEJLŐDÉSBEN	10
SZARKOMER KÉPZŐDÉS, MIOGENEZIS	10
A VÁZIZOM ANATÓMIÁJA ÉS SZÖVETTANA	11
AZ IZOMÖSSZEHÚZÓDÁS MOLEKULÁRIS MECHANIZMUSA	12
IZOMROST TÍPUSOK	13
A COL4 MUTÁCIÓKKAL ÉS MIOPÁTHIAKKAL KAPCSOLATOS BETEGSÉGEK A HUMÁN PATHOLÓGIÁBAN	13
Alport-szindróma	13
Goodpasture-szindróma	14
HANAC-tünetegyüttes	14
IZOMBETEGSÉGEK, MIOPÁTHIÁK	14
Miofibrilláris miopáthia	15
Centronukleáris miopáthia	15
A IV-ES TÍPUSÚ KOLLAGÉN GÉN <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> -BEN	15
A KOLLAGÉN IV GÉNRE NÉZVE MUTÁCIÓT HORDOZÓ TÖRZSEK	16
A VIZSGÁLANDÓ SZERV	18
<i>Oviductus communis</i>	18
KOMPLEMENTÁCIÓ	18
3. CÉLKITŰZÉS	19
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	20
FELHASZNÁLT TÖRZSEK	20
IMMUNHISZTOKÉMIA	21
Elsődleges ellenanyag	21
Másodlagos ellenanyag	21
Texas RED és DAPI festékek	22
5. EREDMÉNYEK	22
SZÉLES FENOTÍPUSUT MUTATÓ TRANSZ-HETEROZIGÓTÁK	24
6. KÖVETKEZTETÉSEK	30
7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	32
8. IRODALOMJEGYZÉK	33
9. ÁBRAJEGYZÉK:	34
10. TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS	35

1. Rövidítések jegyzéke:

ADP: adenzin difoszfát

Arg: arginin

AS: aminosav

Asp: aszparagin

ATP: adenzin trifoszfát

Ca: kalcium

ECM: extracelluláris mátrix

EMS: etil-metán-szulfonát

ER: endoplazmatikus retikulum

Gly: glicin

MHC: miozin heavy chain

MLC: miozin light chain

NCL: non-collagen like

PBS: Phosphate buffered saline

PFA: faraformaldehid

Pro: prolin

Ser: szerin

SR: sarkoplazmatikus retikulum

Thr: threonin

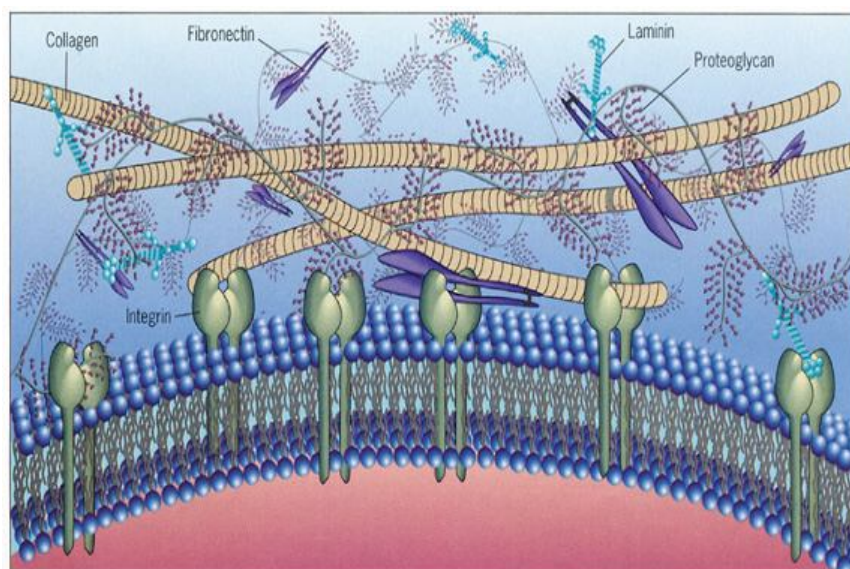
2. Bevezetés

A legújabb klinikai adatok és az emlős genetikai tanulmányok azt mutatják, hogy a *COL4A1* mutációk következtében létrejövő alapmembrán defektusok izomgyengeséget, izomrángást, görcsöket, izomdisztrófiát és atrófiát okozhatnak. Az egyébként mélyreható tanulmányokban a mutáns *COL4A1* izomfenotípus pontos leírása azonban még hiányzik, és az izomspecifikus patomechanizmus jelentős részletei is felderítetlenek maradtak. Ebben a tanulmányban átfogó képet nyújtunk a *Drosophila col4a1* mutánsokról genetikai elemzés, gén-, és fehérje expresszió, valamint immunhisztokémiai kísérletek alkalmazásával, létrehoztunk egy *Drosophila* modellt és fényt derítettünk számos kérdésre. Ebben a tanulmányban a *Drosophila col4a1* mutánsok allél sora segítségével transz-heterozigótákat állítottunk elő és megállapítottuk a génen belüli komplementáció mértékét az összes allélkombináció és reciprokai (56) esetében 13563 utódleveget átvizsgálva, valamint meghatároztuk a transz-heterozigótáknak a harántcsíkolt izomra kifejtett fenotípusát, ami centronukleáris/miofibrilláris miopathiaként manifesztálódik.

Az extracelluláris tér és szerepe

Az állati sejtek evolúciója során azokat a sejteket, melyek azonos feladatra specializálódtak, az extracelluláris térben az extracelluláris mátrix (ECM) szervezi szövetté és a különböző funkciójú szervek köré is az extracelluláris mátrixból képződik a határ. Az ECM segít a sejtek fejlődésében, továbbá mechanikai védelmet is nyújt. A mátrix alapstruktúráját képező hálózat révén, mely a környező sejtek által termelt makromolekuláris elemekből épül fel, így lehetővé válik a sejtmigráció és a szövetek között lezajló kommunikáció. A szerveződés ezen magas szintje olyan fehérjék által valósul meg, melyeket a környező sejtek termelnek és juttatnak a sejtközzéti térbe. Ezen fehérjék közül a legnagyobb mennyiségben a vízben oldhatatlan kollagén és kollagén szerű fehérjék termelődnek, továbbá a vízoldékony proteoglikánok. Az ECM fontos alkotói még a fibronectin, vitronectin, elasztin, keratin, perlekán, nidogén és a lamininek is. A kapcsolódás kétféle módon jöhet létre a sejtek és a mátrix között, hogy szerveket hozhassanak létre. Az egyik lehetőség, hogy közvetlen sejt-sejt kapcsolat jön létre, a másik pedig az, hogy közvetett módon az ECM makromolekuláris rendszerét használva alakítanak ki egymással kapcsolatot. Az egymáshoz képest viszonylag távol lévő, lazán kapcsolódó sejtek között az ECM nagy aránya

figyelhető meg, míg az egymáshoz szorosan kapcsolódó sejtek és szövetek között ez az arány jelentősen kisebb. Az utóbbi esetben a szűk helyet kitöltő ECM, bazális membránná (membrana basalis) alakul ki és szinte csak határoló funkciót tölt be. A bazális membrán extracelluláris fehérje összetétele szerint két fő részre osztható, melyek a bazális laminában (lamina basalis) és a retikuláris laminában (lamina reticularis) nyilvánulnak meg. A bazális laminában találhatjuk a nem fibrilláris kollagéneket, a nem kollagén jellegű glikoproteineket és proteoglikánokat. A retikuláris laminában a proteoglikánokba ágyazott fibrilláris kollagéneket találjuk. Az emberi testben szinte mindenhol megtalálható a bazális membrán. Körbeveszi a harántcsíkolt izomrostokat, köti a simaizomrostokat, hozzá kapcsolódnak továbbá az epitel és endotel sejtek is. Megtalálható a szemlencsében, a szemgolyót védő szaruhártyában és a belső fülben is.



1. Ábra: Az ECM sematikus szerkezete

A kollagén

A kollagén és a kollagén szerű fehérjék jelen vannak a szivacsoktól kezdve minden soksejtű állati szervezetben, mint a testüket összetartó rostos kötőszöveti elemek. A triplahelikális fehérjék nagy csoportjába tartoznak, jelentős és sokrétű szerepkörrel rendelkeznek, ilyenek például a tartószerkezetet biztosító funkciójuk, de jelentős rugalmasságot is kölcsönöznek a szerveknek, szöveteknek. Segítenek a regenerációban, a sejtadhézióban, a sejtmigráció kivitelezésben. A kollagén szupercsaládon belül 9 családba soroljuk szerkezetük alapján az eddig ismert 28

kollagént és kollagén szerű fehérjét. Az ECM-ban a leginkább a fibrilláris kollagének fordulnak elő, ezek közül is a legnagyobb mennyiségben az I. típus található meg a legtöbb szövetben. A porcok fő alkotóeleme a II. típusú kollagén, továbbá ez képi az üvegtest finomabb rostjait. A III. típusú kollagén található a véredények falában, tüdőben és a bőrben. A hálózatos felépítésű kollagének csoportjába tartoznak a VIII. és IV. típusúak, melyek megtalálhatóak a cornea endotéliális sejtjeiben. A IV. típusú kollagén a bazális lamina fő alkotója. A FACIT kollagének más kollagén rostokhoz kapcsolódnak és a szupramolekuláris szerkezetet képesek módosítani szövetspecifikusan. A kollagén VI és I összekapcsolódásával gyöngyházszerű struktúra alakul ki, míg a bazális laminát a lazarusos kötőszövethez a VII. típusú kollagén köti [1].

Dolgozatomban a IV-es típusú kollagénnel kívánok részletesebben foglalkozni, mely a hálózatakkotó kollagének családjába tartozik.

	Kollagén család	Kollagén gén
1.	Fibrilláris	I, II, III, V, XI, XXIV, XXVII
2.	FACIT = Fibrillum asszociált, megszakított triplahélixet tartalmazó kollagének	IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI, XXII, XXVI
3.	Hálózatakkotó (hexagonális)	VIII, X
4.	Hálózatakkotó (kollagén IV típusú)	IV
5.	Gyöngyös filamentumok	VI, XXVIII, (XXVI)
6.	Horgonyzó fibrillumok	VII
7.	Transzmembrán doménnel rendelkezők	XIII, XVII, XXIII, XXV
8.	Endosztatin-képzők	XV, XVIII
9.	Triplahelikális kollagényszerű domént tartalmazó fehérjék	C1q, adiponektin, fikolin, acetilkolin-észteráz, ektodiszplazin

1. Táblázat: A kollagének csoportosítása (Kiss Márton nyomán)

A IV-es típusú kollagén

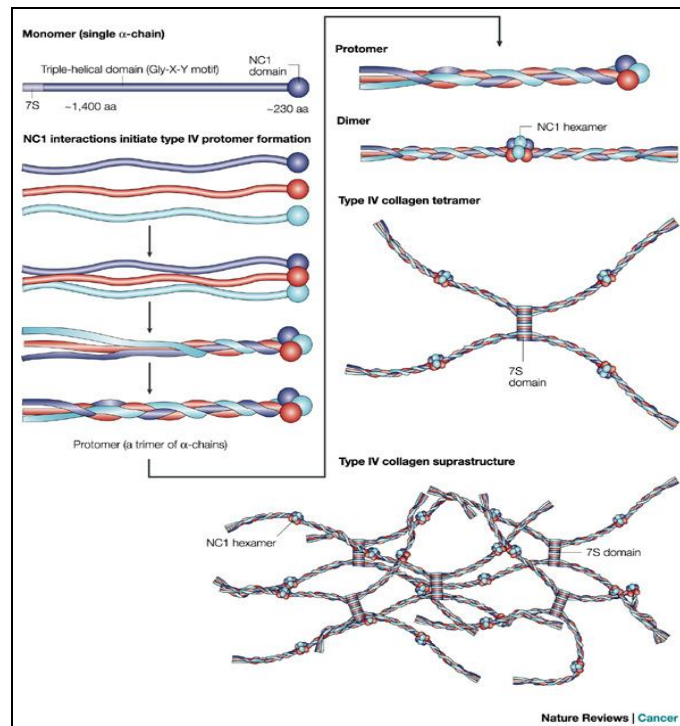
Általában 1-1 gén kódolja a kollagén szupercsalád nagy részét, kivétel ez alól például a IV-es kollagén, melyet több gén is meghatározhat. A humán genomban a kollagén lánc fehérjéit hat gén kódolja. Ez a hat gén, három párt alkotva, páronként egymás mellett fej-fej orientációban helyezkedik el. *Caenorhabditis elegans* genomjában, két egymástól távoli pozícióban elhelyezkedő gén kódolja a IV. típusú kollagént. *Drosophila melanogaster*-ben szintén két példányban található meg a IV-es kollagén génje, fej-fej genomi elrendeződésben. Ez a fehérje adja a bazális membrán részét képező bazális lamina fő alkotóelemét. A szövetek szorosan egymáshoz simuló sejtjei, alapi részükkel kapcsolódnak a bazális laminához, amihez a másik oldalról a szomszédos szövet sejtjei szintén alapi részükkel érintkeznek (például az epitéliumot alkotó hámsejtek). Ez a hálózatos felépítésű struktúra a járulékos fehérjékkel kapcsolja össze szorosan a szomszédos szöveteket. A kollagén fehérje bármely hibája esetén a rendezett hálózatos struktúra hibás elrendeződést mutat, ami miatt felléphet a járulékos fehérjék kapcsolódási pozíciójának elmozdulása, elfordulása, ami kihathat a sejt-szövet közötti adhéziós kapcsolatokra és ezek fennmaradására.

A IV-es típusú kollagén molekuláris felépítése

A IV-es kollagén szuperhelikális szerkezetű fehérje három darab prokollagén alegységből áll, melyek egyenként 1500-1800 aminosavból álló polipeptid láncok. Az egyes polipeptid láncok bal menetesek. A három darab prokollagén lánc egymással szorosan összetekeredve alkotja a jobb menetes szuperhélixet. Az összetekeredett három A-lánc lehet azonos, de általában több különböző mRNS-ről transzlálódik, de mindig azonos típusú kollagén fehérjék alkotnak egy protomert. Az elsődleges szerkezetű A-lánc aminosav sorrendjében 3 különböző domént találunk. Két nem helikális, nem kollagénszerű domén (NCL) a 7S és NC1, továbbá egy helikális szerkezetű domént.

C-terminálison találjuk az NC1 domént, ami körülbelül 230 AS-ból álló ciszteinben gazdag szakasz. N-terminálison a 7S domén helyezkedik el, amit körülbelül 250 AS alkot. A közepén elhelyezkedő triplahelikális szerkezetet ténylegesen kialakító domén, ami glicinben gazdag, körülbelül 1400 AS-ból álló szekvencia.

A három darab A-lánc triplahélix-szé való összeszerelődésének folyamatát a C-terminális NC1 domén szervezi az itt található speciális kötőhelyek segítségével. Ez a domén felelős a megfelelő kollagén szálak kiválasztásáért, létrehozva a negyedleges szerkezetet. Az itt található tizenkét cisztein segítségével, melyeknek a diszulfid-hidak kialakításában van szerepük, amik stabilizálják a struktúrát. Szintén a C-terminális NC1 domén a felelős a negyedleges struktúra kialakításáért, azáltal, hogy egy másik C-terminális NC1 doménnel alakít ki kötést. Ezzel szemben az N-terminális 7S domén, 3 másik protomerrel lép kapcsolatba, úgy hogy nem redukálható kötést hoznak létre, kialakítva így az NC1 tetramer struktúrát a megfelelő protomerek kiválasztásával, amely létrehozza az alapmembránra jellemző ún. "drótháló" szerkezetet. A centrálisan elhelyezkedő domén szerkezete sajátos. Erre a doménre jellemző a Gly-X-Y repetitív szekvencia, mely azt mutatja, hogy az A-láncok aminosav sorrendjében többnyire minden harmadik pozícióban a glicin foglal helyet. Ennek köszönhető a triplahélix merevsége, továbbá a kollagén filamentumok egymás közötti szoros összetekeredése, hiszen a glicin a legkisebb térigényű AS. A repetitív szekvencia X-tagja jellemzően prolin, az Y-tagja pedig hidroxiprolin. Az aminosav láncba beépül még lizin és hidroxilizin, melyek a hidroxiprolinnal együtt poszttranszlációs modifikáción estek át és úgy hidroxilálódnak. Szerepüket tekintve a kollagén molekulákon belüli és közötti kovalens keresztkötések kialakításában játszanak szerepet, stabilizálva a szupramolekuláris szerkezetet. Ezen felül tovább erősítik a negyedleges struktúrát a H-hidak, amik a peptidkötésben lévő Gly –NH (hidrogén-donor), és a másik A-lánc Pro –C=O (hidrogén akceptor) csoportjai között alakulnak ki.



2. Ábra: A IV-es kollagének szerveződési szintjei

A IV-es kollagén által létrehozott hálózat típusok

A kollagén IV fehérjék különböző hálózati típusokat képesek létrehozni, melyek szövet és szerv specifikitást mutatnak. Az eltérő AS sorrendű A-láncok változatos összetételű struktúrákat hozhatnak létre. A legtöbb és legelterjedtebb a bazális laminában található $(A1)_2(A2)$ - $(A1)_2(A2)$ triplahélixből álló hálózat. A tüdőben, szemben, cochleában és herében a $(A3)(A4)(A5)$ - $(A3)(A4)(A5)$ típusokat találjuk, míg a nyelőcsőben, bőrben, simaizomban és a Bowmann-tokban a $(A1)_2(A2)$ - $(A5)_2(A6)$ kombináció található. Az egyedfejlődés során is változhat az egyes kollagén hálózatok összetétele. Emberben, például az embrionális korban a vesében, $(A1)_2(A2)$ - $(A1)_2(A2)$ kombináció van jelen, de később ez az érgomolyag falában megváltozik a $(A3)(A4)(A5)$ - $(A3)(A4)(A5)$ típusra. A Bowmann-tok $(A1)_2(A2)$ láncai mellett megjelennek a $(A5)$ és $(A6)$ típusok és a nyomásnak jobban ellenálló $(A1)_2(A2)$ - $(A5)_2(A6)$ kollagén hálót hoznak létre.

A IV-es típusú kollagén szerepe az izomfejlődésben

A IV-es típusú kollagén hálózatnak nélkülözhetetlen szerepe van az izomsejtek fejlődésében, osztódásában, differenciálódásában, a megfelelő helyre való irányításában és pozicionálásában. A *Drosophila* extracelluláris mátrix fehérjéi nagyfokú homológiát mutatnak a gerincesek hasonló funkciót ellátó fehérjéivel. A haemociták termelik az ecetmuslica ECM fehérjéit, melyek az egész testben előfordulnak. Az ECM fejlődésben betöltött szerepét jelzi, hogy körbeveszi az izomsejteket, így alapvető jelentőségük van a miogenezisben. Érdeemes megemlíteni az ECM néhány komponensét. Ilyen például a laminin, ami hatással van az izomsejtek osztódására, mozgására és végső morfológiájára. A fibronektinnek a fibroblasztok letapadásához és mioblaszt dedifferenciációhoz van szorosabb kapcsolata. Az integrinek, amik részt vesznek a sejt és az ECM közötti kapcsolat kialakításában, továbbá szignáltranszdukciós folyamatokban, mint például a sejtnövekedés, differenciáció, túlélés és apoptózis.

A bazális membrán szerepe az izom ép struktúrájának fenntartásában nélkülözhetetlen. A citoszkeletontól a bazális membránig az egymással szoros kapcsolatban lévő rendszerek bármely tagjának diszfunkcionalitása betegség kialakulásához vezet. Ezek közül érdemes néhányat megemlíteni: a Duchenne-féle izomdisztrófiát, ami a disztrofin fehérje kóros működése vált ki; a kongenitális izomdisztrófiát, ami a laminin, és a Bethlem miopátiát, ami a VI-os típusú kollagén a betegsége. Ezekben a kórképekben normális az izomsejtek fejlődése és differenciációja, de az érett sejtek hamar apoptózisba kezdenek.

Szarkomer képződés, miogenezis

Mezodermális eredetű miogén sejtekből differenciálódnak a mioblaszt sejtek az embrionális fejlődés alatt. Primer és szekunder rostok képződnek, illetve szatellita sejtek, melyek szükségesek a posztnatális izomnövekedéshez és regenerálódáshoz [2]. Az izmokat alkotó izomrostok száma döntően genetikailag meghatározott, de környezeti tényezők befolyásolhatják, különösen a perinatális időszakban. Születést követően az izomnövekedés már csak az izomrostok megnagyobbodásából származik, a számuk nem növekszik. Figyelembe kell venni ugyanakkor azt is, hogy a nagyon kifejezett hipertrófia hátrányosan befolyásolhatja az izom működőképességét, és az izomtömeget.

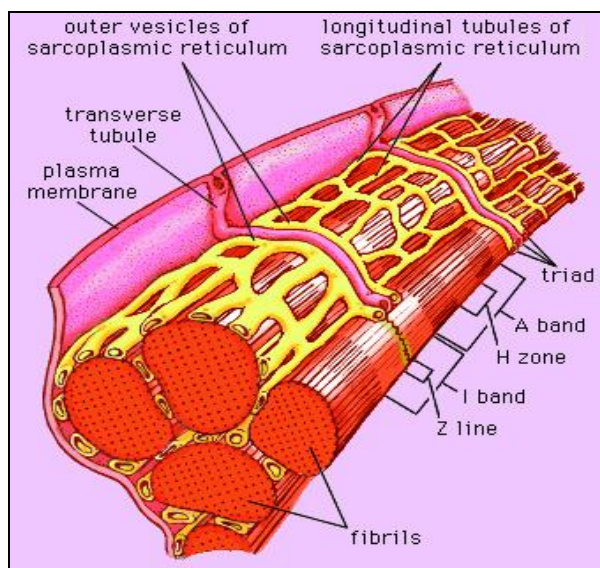
A vázizom anatómiája és szövettana

A vázizmok képezik a mozgás aktív szervrendszerét, de nem utolsósorban jelentős aminosav forrásként is szolgálnak és a hőszabályozásban (hőtermelés) is jelentős a szerepük. A vázizmokat harántcsíkolt izomszövet alkotja.

Az izom aktív része az izomhas, amely izomrostokból áll, melyeket finom kötőszövet veszi körül (endomysium). Kötőszövet burkolja be az izomkötegeket (perimysium) és az egész izmot (epimysium). Az izomsejtek átmérője 10-80µm, és az izomrostok akár 30 cm hosszúak lehetnek, amelyek a miogenezis alatt több éretlen sejt, mioblaszt (többmagvú sejtek) összeolvadásából jönnek létre. A szarkolemma veszi körbe őket. Az izomsejt feltűnően sok mitokondriumot tartalmaz, amik a sejtmagokkal együtt a rostok perifériáján, a sejthártya alatt helyezkednek el. A mioglobinnal fehérje képes az oxigént megkötni, tárolni és leadni az izomszövetnek, ahol hasonló funkciót lát el, mint a vér hemoglobinja. Fénymikroszkóp alatt a sejtek harántcsíkolt mintázatot mutatnak, melyek az izotrop (I, világos) és anizotrop (A, sötét) sávok váltakozásából adódik. Az izomrostok citoplazmája a rost tengelyével párhuzamosan elrendeződő vastag és vékony filamentumokat tartalmaz. Az izom működési egysége a szarkomer, amely két Z-csík közötti területen helyezkedik el. A Z-csík az I-kötegeket köti össze középen. A vastag filamentum a miozint, míg a vékony az aktint tartalmazza. A sötét zónát (A) a vastag és a vékony filamentum átfedése adja, melynek közepén, ahol nincs a filamentumok között átfedés, található a H-zóna (világos), közepén az M-csíkkal.

A szarkomer megrövidül az izomkontrakciótól, a vastag és a vékony filamentum egymáson való elcsúszása következtében (csúszó filamentum elmélet).

A szarkoplazmatikus retikulum (SR) a sejtek endoplazmatikus retikulumának (ER) többé-kevésbé megfelelő sejtalkotó, amely a Ca-ionok tárolására specializálódott. Az SR-ben a szabad Ca-ion mennyisége kicsi, mivel a Ca kötött formában raktározódik. Elektromos ingerlés következtében az ingerület a sejtmembránról áttevődik a SR-ra, és az Ca-ion kiáramlást eredményez. A szabad Ca-szint megemelkedik a citoszolban, ami beindítja az izomösszehúzódás molekuláris mechanizmusát.



3. Ábra: A szarkomer szerkezet grafikus ábrázolása

Az izomösszehúzódás molekuláris mechanizmusa

A miofilamentumok motorfehérjéi az aktin és a miozin, ezek alkotják az izomrostok fehérje állományának körülbelül 75 %-át. A miozin a szarkomer A-kötegének vastag, míg az aktin az I-kötegek vékony filamentuma.

A globuláris aktin monomer fehérje a G-aktin, amely polimerizálódva a fonálszerű F-aktint alkotja, majd egy alfa-hélix láncot képez. A miozin két könnyű (MLC) és két nehéz (MHC) láncsal rendelkezik. A könnyű lánc a farki részt, míg a nehéz a nyaki és feji részt adja. Körülbelül 300-500 miozin molekula alkot egy vastag filamentumot.

Nyugalmi fázisban az aktint és a miozint a szabályozó (regulátoros) fehérjék rögzítik helyzetükben. A tropomiozin helikális szerkezetű, és az F-aktinhoz kapcsolódik. A troponin a legfontosabb szabályozó fehérje. Globuláris, Ca-ion és tropomiozin-kötő hellyel, valamint inhibitorikus résszel rendelkezik.

Akciós potenciál hatására a SR-ból kiáramló Ca-ionok kötődnek a troponin Ca-kötő helyéhez, megváltoztatva a tropomiozin elhelyezkedését az aktin láncon, felszabadítva ezzel az aktin felületén lévő miozin-kötő helyeket. A miozin az aktinhoz kötődve aktiválódik, ATP-áz aktivitással az ATP-t ADP-re bontja, miközben a nyugalmi állapotban a feji résszel 90°-ot bezáró nyaki rész elmozdul, a szög 60 °, majd 45 °-ra csökken, elhúzva ezzel a vékony filamentumot a vastag filamentum mentén.

Izomrost típusok

Az izomrostok diverzitását Ranvier (francia kutató, 1835-1922) írta le először, 1873-ban, “fehér” és “vörös” izmot elkülönítve. További besorolások I (lassú) és II (gyors), valamint α , β és $\alpha\beta$ rostokat különböztettek meg.

A besorolások alapját az izomrost kontraktilis és metabolikus jellemzői adják. A β -vörös (lassú, oxidatív) rostok lassan húzódnak össze, magas a mioglobin tartalmuk, gazdagon kapillarizáltak, a sejtekben sok a mitokondrium, viszont kicsi a glikogén tartalmuk. Tónusos izmok, általában tartósan összehúzott állapotban vannak, energiájukat oxidatív úton nyerik. Az α -fehér (gyors, glikolitikus) rostok gyorsan összehúzódnak, alacsony a mitokondriumok száma és a mioglobin tartalom, kevésbé kapillarizáltak, energianyerésük ezért inkább glikolitikus. Fáztos izmok, gyorsan elfáradnak. Átmenetet képeznek az α -vörös rostok (gyors, glikolitikus), gyorsan összehúzódnak, magas a mioglobin tartalmuk, viszont kevés kapillárist tartalmaznak, fáztosak és inkább glikolitikusak. A vörös izomrost vékonyabb, míg a fehér vastagabb. A vörös rostok több intramuszkuláris zsírt raktároznak, és jobban hasznosítják a zsírsavakat.

A COL4 mutációkkal és miopáthiákkal kapcsolatos betegségek a humán pathológiában

Alport-szindróma

Az Alport-szindróma X kromoszómához kötötten öröklődik, néha azonban előfordul autoszómális manifesztációja is, körülbelül 15%-ban [3]. Elsősorban a COL4A5 mutációja játszik szerepet a betegség kialakulásában, de ritkán az autoszómális COL4A3 és a COL4A4 gének mutáns alléljai is szerepet játszhatnak a tünet együttes létrejöttében.

Ennek eredményeképpen veseelégtelenség, sükettség (cochlea érintettség), vakság (retina érhálózatának érintettsége miatt) alakul ki [4].

A betegségben érintett szövet jellegzetessége, hogy az epitélium és a hozzá kapcsolódó mátrix elválik egymástól, ezáltal súlyos működésbeli zavart okoz. A mutációt szenvedett fehérjeláncok nem képesek az összekapcsolódásra és az összerendeződésben részt venni nem tudó fehérjéket proteázok bontják le.

Goodpasture-szindróma

A Goodpasture-szindróma egy olyan autoimmun betegség, melyben a betegeknél progresszív veseelégtelenség alakul ki, a tüdőben bevérzések jönnek létre. Kialakulásának az a magyarázata, hogy a szervezet antitesteket termel a környezeti hatásra (például dohányfüst) a széttekeredő A-láncok NC1 doménjaival szemben. Ez elsősorban a COL4A3 láncot érinti.

HANAC-tünetegyüttes

Örökletes angiopáthia, nefropáthia, aneurizma és izomgörcsök (Hereditary Angiopathy, Nephropathy, Aneurysms, and Muscule Cramps)

Ez egy mozaikszó, amely magában foglalja az erek falának meggyengülésével kapcsolatos megbetegedések egy csoportját. A tekervényes retinális artériát, agyi aneurizmát, a vese szöveteinek abnormális fejlődésével kapcsolatba hozható hematuriót, ciszták megjelenését, és az izomban fellépő görcsös állapotot okoz [5]. A laboratóriumunkban lévő kollagén IV mutációt hordozó *Drosophila melanogaster* törzsek biztosítják a lehetőséget arra, hogy e betegség hátterét alaposan megérthessük.

Izombetegségek, miopáthiák

A harántcsíkolt- és a szívizom megjelenése megelőzte a gerincesek és az ízeltlábúak közös őstől való evolúciós szétválását, körülbelül 700 millió éve. Három izomtípus van: a vázizom, szívizom és a simaizom. Habár a gerinces simaizom úgy tűnik egy független úton fejlődött a többi izomtípustól. Az izmok teszik ki az állat testének nagy részét, körülbelül a testsúly felét. Normális esetben az izmokban egyensúlyban vannak a degeneratív és regeneratív folyamatok. Az izmok betegségeit, az izmok rendellenes állapotát, az izomrostok szövettani változásait tág értelemben véve miopáthiáknak nevezzük. Vannak azonban ezektől eltérő izomrendelleneségek által okozott megbetegedések is, például az idegi diszfunkció, vagy a disztrofias izomrost degeneráció. A specifikus diagnózist tesztek segítségével állapítjuk meg, például szérum enzim szintekkel, elektromiográfiával, vagy izombiopsziával. A miopáthias izomrostok nem működnek megfelelően, így az izomgyengeség az enyhe foktól a súlyoson át az életveszélyes állapotig is terjedhet. A közös nomenklatúra sajnálatos módon akadályozza a miopáthiák pontos leírását. A miopáthiák az izombetegségeknek klinikai és genetikai szempontból nézve egy nagyon heterogén csoportját képezik. Az izomrostok olyan kóros elváltozásaival jellemezhetjük őket, melyek az

izom összehúzódási képességét veszélyeztetik. Mindemellett két nagy csoportra oszthatjuk mégis őket. A szerzett miopáthiákra, melyek kialakulását nagyban befolyásolja számos környezeti tényező. A másik nagy csoportot az örökletes miopáthiák képezik. Ide tartoznak a multi/minicore miopáthia centrális mag miopáthia, nemaline miopáthia, miofibrilláris miopáthia, distal miopáthia, X-linked miopáthia, inclusion body miopáthia, centronucleáris vagy miotubuláris miopáthia, mitochondriális miopáthia, metabolikus miopáthia, glikogén raktározási betegség, zsír raktározási betegség (lipid storage disease), és periódikus paralízis, a teljesség igénye nélkül. Az öröklött miopáthiák klinikai megnyilvánulásai gyakran allélikusak, vagyis ugyanazon génben történő mutációk okozzák, ugyanakkor különböző gének mutációi okozhatnak azonos fenotípust. A pontos genotípus-fenotípus analízis eredmények gyakran hiányoznak, vagy a genetikai és klinikai eredmények ellentmondásosak [7].

Miofibrilláris miopáthia

Ezt a betegség csoportot lassú, progresszív gyengeség jellemzi, mind a proximális, mind a disztális izmokban. Körülbelül 50 éves kor körül kezdődik. Ez a betegség elnevezés, egy kóros patológiai mintázatát írja le az izomrostok bomlásának, a miofibrilláris bomlástermékek felhalmozódásának és sokféle, a betegségben szerepet játszó fehérje ektópikus expressziójának. Eddig 6 génen belüli mutációról tudunk, ami előidézheti a szimptomákat [7].

Centronukleáris miopáthia

Szintén lassú progressziójú izomgyengeséget, izomsorvadást okoz. Öröklött neuromuszkuláris betegség. Elsősorban a vázizmok megbetegedése, a végtagövek izmai, a törzs, a nyak és az arc izmai érintettek. Tünetei között szerepelnek a gyenge magzati mozgások, hypotónia, légzési elégtelenség, ophthalmoplegia, és pl. a le nem szálló herék. Legfontosabb morfológiai jellemzője ennek a tünetegyüttesnek az izomsejt magok centrális orientációja. A betegség már gyermekkorban támad és előfordulása az egyén 30-as éveit jellemző. Létezik autoszómális recesszív és autoszómális domináns formája is [7].

A IV-es típusú kollagén gén *Drosophila melanogaster*-ben

Drosophila melanogaster-ben két gén kódolja a kollagént, a *col4a1* és *col4a2* gének. A 2. kromoszóma bal karján a 25C lókusztban találhatóak egymás mellett, fej-fej orientációban.

Transzkripciójukhoz közös promótert használnak, de transzlációjuk ellentétes irányú. Az *col4a1* gén másik neve *Dcgl*, vagy más néven *Cg25C*, a *col4a2* gén neve pedig *viking*, vagy *vkg*.

A *Drosophila* COL4A1 fehérjére is jellemző a 3 doménből álló molekuláris szerkezet. A 3 domén, hasonlóan a fentebb leírtakhoz áll két NCL doménből és egy centrális doménből. A két NCL domén a C-terminális NC1 és az N-terminális 7S domének. A centrális domén pedig a kollagénre jellemző triplahelikális szerkezetért felelős polipeptideket kódoló Gly gazdag régió. Ezen domén AS sorrendjére jellemző a Gly-X-Y repetitív szekvencia többszöri megszakítottága. A *Cg25C* gén által kódolt A1-láncnál ez 21 alkalommal fordul elő, a *vkg* gén által kódolt A2-láncon pedig 25 alkalommal történik. További ismétlődő szekvenciákat is megfigyelhetünk az A1 és A2 láncokban a Gly-X-Y repetitív szekvenciák mellett. Arg-Gly-Asp-Thr (RGDT) és Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) repetitív szekvenciák az A1 láncokban, és Arg-Gly-Asp (RGD) az A2 láncokban. Ezek a szekvenciák azért fontosak, mert olyan sejtfelszíni receptorok és adhézión fehérjék számára szolgálnak kötőhelyül, mint például a fibronectin, integrin, vagy a laminin. Ezek a fehérjék a kollagén háléhoz kötődve nemcsak egy rugalmas hálózatot hoznak létre, hanem kapcsolatot biztosítanak az ECM és a szomszédos sejtek, szövetek között. Az adhézión nélkülözhetetlen a szövetek, szervek fejlődésében, működésében, embrionális fejlődésben, immunválaszban, trombózis kialakulásában, gyulladásos folyamatokban, tumor képződésében, és nem utolsósorban a metasztázisok létrejöttében. A kollagén sokféle funkciót lát el a szervezetben, jelenléte és működése nélkülözhetetlen. Amennyiben mutáció lép fel a két kollagén gén valamelyikében (*col4a1*, *col4a2*), a gén működésében keletkező hiba az általa kódolt fehérje szerkezetére, működésére is hatással van. A kollagén filamentumok egymáshoz való szoros kapcsolódását, a drótháló szerkezet létrehozását befolyásolja az eltérő aminosav sorrend. A kollagén fehérje szekvenciájában található sejtfelszíni receptorok és adhézión fehérjék kötőhelyei, a nem megfelelő összeszerelődés miatt elfordulhatnak, takarásba kerülhetnek, meggátolva ezzel a sejtek hálózathoz való kapcsolódását.

A kollagén IV génre nézve mutációt hordozó törzsek

1970-ben D. T. Suzuki és munkatársai, *Drosophila* törzsek etil-metán-szulfonát (EMS) kezelését követően, domináns hőérzékeny (DTS) mutánsokat állítottak elő [6]. A DTS megnevezés a Dominant Temperature Sensitive rövidítése és csak a véletlen játéka, hogy egybeesik D.T. Suzuki

kutató nevének kezdőbetűivel. A később megismételt EMS mutagenézis szintén eredményezett DTS mutációkat [10].

Az EMS erős alkilezőszer, hatására a kettősspirálban a timinnel és a guaninnal szemben nem a megfelelő bázisok (adenin - citozin) épülnek be a replikáció során. Az EMS így pontmutációkat eredményez a genomban. A hőmérséklet emelkedésére érzékeny, DTS mutánsok genetikai analízise bebizonyította, hogy a mutációk a *Drosophila L(2)25C* lokuszra térképeződnek, ezen belül is az A1 láncot kódoló *Dcgl* génszakaszra [8].

Az *L(2) 25C DTS/DTS* homozigóta mutánsok késői embrionális vagy korai lárvális letalitást mutattak, ami a mutációk recesszív fenotípusa. Az *L(2) 25C DTS/+* heterozigóták túlélése permisszív körülmények között (20 °C) biztosított, fejlődtek és szaporodni is képesek voltak. Restriktív körülmények között (29 °C) azonban 1-3 hét után elpusztulnak, amit a mutációk domináns volta okoz.

Balanszer kromoszóma segítségével megőrizhető volt a mutáció, így ezeket a hőérzékeny törzseket sikerült fenntartható állapotba hozni és modellszervezetté tenni a *col4a1* mutációk által okozott elváltozások megfigyeléséhez.

A laboratóriumban nyolc *L(2)25C/col4a1/DTS* törzzsel rendelkezünk, amelyeken a mutációval szemben, a 2. kromoszómán egy *CyRoi* balanszert hordoznak. Az ezen található markerek a következők: Durva felszínű ocellumok és pörge szárnyak, melyek által a balanszert hordozó egyedek könnyen megkülönböztethetők a mutációt nem hordozóktól.

A nyolc törzs az *col4a1* gén 8 különböző mutáns allél valamelyikét hordozza, és a genetikai analízist követően megállapítottuk, hogy a *col4a1* és a *col4a2* gének két komplementációs csoportot alkotnak. Az egyik csoportba tartoznak az *a-30*, a *DTS-2*, a *DTS-3*, a *DTS-4*, *DTS-5*, *DTS-10*, *b-9*, *b-17* allélok, míg a másik komplementációs csoportot a *col4a2* gén alléljai alkotják. A két intergén komplementációs csoport tagjai eltérő erősségű allélokat tartalmaznak a heterozigóták restriktív hőmérsékleten való túlélés alapján [7].

Az *a-30*, *DTS-2*, *DTS-3* allélek úgynevezett erős allélek, azonnal szembetűnő elváltozásokat és gyors lefolyású disztrófiát okoznak, könnyen vizsgálhatóak [8].

A *DTS-4*, *DTS-5*, *DTS-10*, *b-9*, *b-17* allélok enyhébb elváltozásokat okoznak, melyek nem annyira szembetűnőek, nehezebben vizsgálhatóak, lassúbb lefolyású disztrófiát okoznak [9]. Ezeket az allélokat mi gyenge alléloknak neveztük el, bár jelenlétük ugyanúgy letalitáshoz vezet.

Kutatócsoportunk még nem közölt eredménye alapján tehát a heterozigóták domináns fenotípusa restriktív hőmérsékleten gyors vagy lassú progressziójú izom disztrófia [9].

A vizsgálandó szerv

Oviductus communis

Jelen tanulmányban elsősorban a nőtény *Drosophila melanogaster*, vagy más néven az ecetmuslinca szaporító szervrendszerével foglalkozom, ezen belül is kiemelve a közös petevezeték (oviductus communis). A nőtény ecetmuslinca szaporító szervrendszere 3 fő részre tagolható: a petefészkekből, ami páros szerv és az ezekhez tartozó laterális petevezetékekből áll az első szakasz. A második fő rész a oviductus communis, melybe torkollik bele két oldalról a petefészkekből a két laterális oviductus. A harmadik fő szakasz az oviductus communis folytatásaként megjelenő uterus, melynek csatlakozásánál kapcsolódik be a páros spermatéka és a seminalis receptaculum. Ezt követően a vaginával csatlakozva eléri a gonopórust és nyílik a külvilág felé. A 15-20 darab ovariolából álló ováriumokat egy ún. peritoneális membrán tartja össze. Az ovariolákat pedig külön-külön is beburkolja az bazális membrán. Mindkét membrán tartalmaz IV-es típusú kollagént, továbbá harántcsíkolt, körkörös izomrostokat. Az érett peték ideiglenes tárolása és továbbítása a communis oviductus szerepe aktív, izommunka által. Azért esett erre a szervre a választásom, mert egyrétegű harántcsíkolt izomszövetet tartalmaz a külső és belső epithél réteg között, így könnyen láthatóvá tudom tenni mikroszkópos technikákkal, vékony metszetek készítése felesleges, az izom rostok morfológiája direkt megfigyelhető, mindemellett ez egy nagyon intenzív izommunkának kitett szerv, tehát az esetleges elváltozásokat könnyen tudom detektálni. A közös petevezeték felső 1/3-a aktív izommunkára is képes, amivel segíti a peték mielőbbi továbbítását.

Komplementáció

A klasszikus genetika egyik fontos eszköze a mutánsok előállítása és vizsgálata. Azok a mutánsok, melyeknek fenotípusa ugyanolyan, komplementációs (cisz-transz) teszttel állapíthatjuk meg, hogy azonos vagy különböző génekben történtek-e a mutációk. Az egy génen belüli mutációk egymás allélikus változatai. Meg kell jegyezni, hogy csak recesszív mutációkkal, allélekkel tudunk komplementációs vizsgálatokat végezni. Ennek az analízisnek a lényege, hogy megállapítjuk a kettős mutánsok fenotípusát. A mi esetünkben az információt a transz-

heterozigóták fenotípusa hordozza. Abban az esetben, ha a mutációk két különböző génben vannak, a transz-heterozigóta vad fenotípusú lesz, mivel mindkét génből tartalmaz egy-egy vad allélt az élőlény. Viszont ha a két mutáció ugyanabban a génben található, akkor a transz-heterozigóta fenotípusa mutáns lesz, mert mindkét kromoszómáról hibás fehérje képződik. A *col4a1* mutációk e szabály alól kivételt képeznek, mivel a transz-heterozigótákban fellép egy fehérje szintű esemény, az interallélikus/intragénis komplementáció, azaz a kettős mutánsok életképessége, szemben a homozigóta mutánsok letalitásával [8].

3. Célkitűzés

Kihasználva a *col4a1* allélsorban rejlő genetikai potenciált és az interallélikus komplementáció jelenségét állítottuk elő a transz-heterozigótákat. A mutáns/vad heterozigóták permisszív hőmérsékleten enyhe miopáthiás fenotípust mutatnak [8], melyek patológiai besorolása bizonytalan. Hipotézisünk szerint a komplementációra képes kettős mutánsokban a recesszív fenotípus erősödését vártuk, ami a rendellenesség pontos diagnózisát, a fenotípus-genotípus kapcsolat mélyebb megértését teszi lehetővé. Ezen túlmenően a mutációs helyek ismeretének birtokában (G->A tranzíciók, glicin szubsztitúciók, 2. Táblázat) az izom differenciálódást és a szarkomer képződést szabályozó IV-es kollagén peptid domének azonosítása is lehetővé válik. A hármas helix mutációs helyeit a 10. Ábrában foglaltuk össze.

Korábbi megnevezés	<i>a-30</i>	<i>b-9</i>	<i>DTS-L2</i>	<i>DTS-L3</i>
Jelen megnevezés	<i>col4a1</i> ^{G233E}	<i>col4a1</i> ^{G467E}	<i>col4a1</i> ^{G552D1}	<i>col4a1</i> ^{G552D2}
Korábbi megnevezés	<i>DTS-L4</i>	<i>DTS-L5</i>	<i>DTS-L10</i>	<i>b-17</i>
Jelen megnevezés	<i>col4a1</i> ^{G1025E1}	<i>col4a1</i> ^{G1025E2}	<i>col4a1</i> ^{G1043S}	<i>col4a1</i> ^{G1393E}

2. Táblázat. Aminosavcserék a *col4a1* allélekben. A *col4a1* allélsor mutánsainak mindegyikében glicin cserélődött nagyméretű, töltött (D, E) vagy poláros (S) aminosavra. A továbbiakban az allélek megnevezése során a jelen nomenklatúrát használjuk elsősorban. Kiss Márton kísérlete.

4. Anyagok és módszerek

A rendelkezésünkre álló nyolc *col4a1* DTS törzzsel dolgoztam, amelyeken a mutációval szemben, a 2. kromoszómán egy *CyRoi* markereket mutató balanszert hordoznak és ezen a kromoszómán találhatóak a kollagén gének is. A balanszer által biztosított tulajdonságok segítségével, amelyek durva felszínű ocellumokat, és pörge szárnyakat eredményeznek, a mutációt hordozó egyedek könnyen megkülönböztethetőek a mutációt nem hordozó társaiktól. A nyolc kollagén mutáns törzset kereszteztük egymással minden kombinációban, és a megszülető F1 generációban, *col4a1* génre nézve transz-heterozigóta kettős mutáns nőtényekből izolált oviductus communis szövetmintákkal dolgoztunk tovább, melyekben a vizsgálandó fehérjét specifikus ellenanyaggal és fluoreszcens festéssel tettünk láthatóvá immunhisztokémiai módszerekkel.

Felhasznált törzsek

- *Oregon R*: Piros színű és sima felszínű szem, egyenes szárny.
- *a-30/CyRoi*: Piros színű és durva felszínű szem, Pörge szárny. A kollagén fehérje mutációt hordoz az aminosav szekvencia 233. pozíciójában (G/E).
- *w,DTS-L2/CyRoi*: Fehér színű és durva felszínű szem, pörge szárny. A kollagén fehérje mutációt hordoz az aminosav szekvencia 552. pozíciójában (G/D).
- *DTS-L3/CyRoi*: Piros színű és durva felszínű szem, pörge szárny. A kollagén fehérje mutációt hordoz az aminosav szekvencia 552. pozíciójában (G/D).
- *DTS-L4/CyRoi*: Piros színű és durva felszínű szem, pörge szárny. A kollagén fehérje mutációt hordoz az aminosav szekvencia 1025. pozíciójában (G/E).
- *DTS-L5/CyRoi*: Piros színű és durva felszínű szem, pörge szárny. A kollagén fehérje mutációt hordoz az aminosav szekvencia 1025. pozíciójában (G/E).
- *DTS-L10/CyRoi*: Piros színű és durva felszínű szem, pörge szárny. A kollagén fehérje mutációt hordoz az aminosav szekvencia 1043. pozíciójában (G/S).

- *b-9/CyRoi*: Piros színű és durva felszínű szem, pörge szárny. A kollagén fehérje mutációt hordoz az aminosav szekvencia 467. pozíciójában (G/E).
- *b-17/CyRoi*: Piros színű és durva felszínű szem, pörge szárny. A kollagén fehérje mutációt hordoz az aminosav szekvencia 1393. pozíciójában (G/E).

Immunhisztokémia

A kettős mutáns transz-heterozigóta nőtényekből fénymikroszkóp alatt foszfát pufferelt sóoldatban (PBS) kipreparáltam a vizsgálandó szerveket. Ezt követően 10 percen keresztül fixálom a szöveteket 4%-os friss paraformaldehid oldatban (PFA), majd 3x10 percig mosom a mintát PBS-ben. Ezután átjárhatóvá teszem a sejtek membránjait 0,1%-os Triton-X 100 detergens alkalmazásával 5 percen keresztül, hogy a specifikus anti-COL4A1 ellenanyag és az izom és sejtmag jelölő festékek hatékonyan diffundáljanak be a szövetekbe. Ezután megint 3x10 perces mosás következik PBS-ben. Következik a fehérje telítési, blokkolási fázis, amit 5% bovine serum albuminnal (BSA) végzek és egy órát inkubálom szobahőmérsékleten. Újból 3x 10 perces mosás következik PBS-el. Következik az elsődleges ellenanyag felvitele (anti-COL4A1, 0.1 mg/mL, Abmart), mellyel újabb 1 órát inkubálom szobahőmérsékleten. Ezután következik 3x10 perc mosás PBS-el. Újabb 1 óra inkubálás jön a fluorescensen jelölt másodlagos ellenanyaggal (Alexa Fluor 488, anti-mouse, 1:1000 hígításban, Invitrogen, Life Technology), de az inkubáció 40. percénél felviszek a mintára 0,5 µl Texas Red (1µg/ml) festéket, majd 7 perc múlva 0,5 µl DAPI festéket (0,01 mg/ml) és ezután már sötétben dolgozok vele. Majd 3x10 perc mosás következik PBS-el. Végül következett a mounting és a fedés.

Elsődleges ellenanyag

Egérben termeltetett, majd liofilizált, monoklonális anti-COL4A1(Abmart) ellenanyagot használtam. Ezt egy olyan pufferban hígítottam, ami tartalmazott 1% BSA, 0.01% nátrium-azidot, 50% glicerint és 10 mM HEPES (pH 7.5). Ez az ellenanyag specifikusan lett megtervezve a kollagén A1-es láncának egy epitópjára, ami a 29.-38. AS-ig (ATGAGSIQDS) tartott.

Másodlagos ellenanyag

Anti-egér, Alexa Fluor 488-at használtam másodlagos ellenanyagként, ami 488 nm-en zöld színben fluoreszkál.

Texas RED és DAPI festékek

A Texas RED-phalloidin, más néven szulforodamin-101, a fluoreszcens technikákban gyakran használt fluoreszcens festék. Specifikusan kötődik az F-aktinhoz, így kiválóan alkalmas a citoszkéletális váz illetve izom kimutatására 543 nm-en, piros színt mutat a phalloidin kötött F-aktin.

A DAPI, másnéven 4',6 diamidino-2-phenilindol, szintén egy a fluoreszcens technikában jól ismert festés, amely erősen kötődik a kettősszájú DNS-hez. A sejtmag festésére használtam 408 nm-en, kék színt ad, a DAPI interkalálódik a kettősszájú DNS-be.

A megfigyeléseket és a felvételeket az SZBK-ban lévő Olympus FV1000 konfokális mikroszkóppal végeztük 600x-os nagyítással. A képfeldolgozást az FV100-ASW 1.7 program segítette.

5. Eredmények

Az interallélikus komplementáció széles határok közt lép fel

A transz-heterozigóták balanszer veszteséssel azonosíthatók, várható értékük a mutáns/*CyRoi* állomány fele egy keresztezést követően. Ez alapján az interallélikus komplementáció mértékét a várható értékhez viszonyítva fejeztük ki százalékban. A 28 allél kombináció és reciprokaik komplementációs értékeit a 3. Táblázat foglalja össze.

	Túlélés	7.4 %	5.9 %	5.3 %	0.5 %	1.8 %	3.3 %	2.9 %	48.2 %
		<i>a-30</i>	<i>b-9</i>	<i>DTS-L2</i>	<i>DTS-L3</i>	<i>DTS-L4</i>	<i>DTS-L5</i>	<i>DTS-L10</i>	<i>b-17</i>
		<i>col4a1^{G233E}</i>	<i>col4a1^{G487E}</i>	<i>col4a1^{G552D1}</i>	<i>col4a1^{G552D2}</i>	<i>col4a1^{G1025E1}</i>	<i>col4a1^{G1025E2}</i>	<i>col4a1^{G1043S}</i>	<i>col4a1^{G1393E}</i>
<i>a-30</i>	<i>col4a1^{G233E}</i>	0	107	93	149	77	88	131	97
<i>b-9</i>	<i>col4a1^{G487E}</i>	109	0	59	107	60	36	103	114
<i>DTS-L2</i>	<i>col4a1^{G552D1}</i>	80	86	0	0	107	108	69	98
<i>DTS-L3</i>	<i>col4a1^{G552D2}</i>	90	79	26	0	83	54	49	124
<i>DTS-L4</i>	<i>col4a1^{G1025E1}</i>	65	125	97	73	0	0	24	146
<i>DTS-L5</i>	<i>col4a1^{G1025E2}</i>	66	97	106	98	0	0	0	138
<i>DTS-L10</i>	<i>col4a1^{G1043S}</i>	100	67	89	60	6	6	0	97
<i>b-17</i>	<i>col4a1^{G1393E}</i>	130	79	105	100	114	107	84	0

3. Táblázat. Az interallélikus komplementáció eredményeinek összefoglalása. Felső sor: A *col4a1*^{+/-} heterozigóták túlélése folyamatosan 29 °C-on tartott állomány esetében.

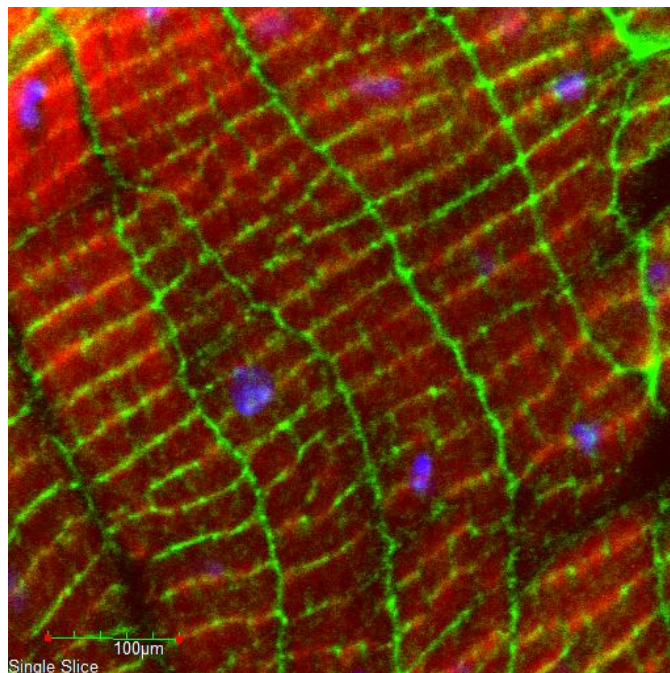
A komplementációs mintázat szembetűnő tulajdonsága, hogy a COL4A1 fehérje centrális kollagén doménjének C-terminális végén található *col4a1^{G1393E}* mutáció az összes allélt teljes mértékben komplementálja, így életképesség tekintetében a vad típusú COL4A1 szállal egyenértékű.

További szélsőséges komplementációs esemény a *col4a1^{G1025E1}/col4a1^{G1043S}* allél kombinációt érinti: Habár a két mutációs helyet mindössze 17 aminosav választja el, 6, 6, 0, 24 % mértékig interallélikus komplementáció lép fel 4 független kísérlet adataiból (3. Táblázat). Mint várható, a *col4a1^{G552D1}* és *col4a1^{G552D2}*, valamint a *col4a1^{G1025E1}* és a *col4a1^{G1025E2}* izoallélikus mutációk egymást nem komplementálják, homozigótaként viselkednek, és valójában azok is. A többi allél kombinációk esetében az interallélikus komplementáció mértéke változó, 20-30%-tól 100 %-ig terjed.

Széles fenotípust mutató transz-heterozigóták

A transz-heterozigóták miopáthiás fenotípusát a petevezeték egyrétegű harántcsíktolt izomzatának szöveti megjelenése alapján minősítettük. Ennek megfelelően enyhe, kvázi fenotípus nélküli, súlyos rendellenességeket mutató, amihez az endoplazmatikus/szarkoplazmarikus retikulum (ER) stressz jeleit hordozó, miotubuláris megjelenésű, szarkomer/kosztamer hiányát mutató, valamint regenerálódó fenotípusos bélyegek társulnak.

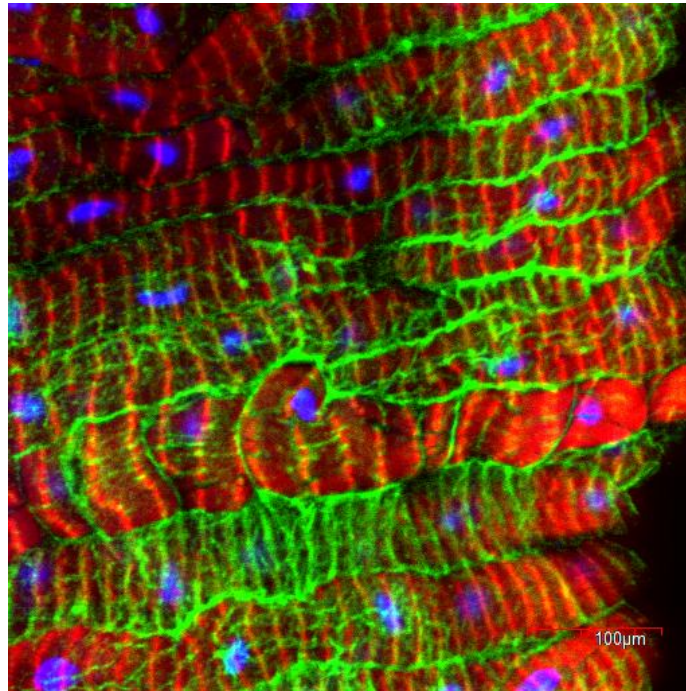
A kettős mutánsok egy jellegzetes fenotípusos kategóriája a pathológiás fenotípus elmaradása. A fehérje szinten a G233E/G1393E, G233E/G1043S, G233E/G552D1, G233E/G467E kombinációk nem, vagy csupán enyhe fenotípust mutatnak (3. Ábra).



3. Ábra. A fenotípus nélküli G233E/G1393E kombináció.

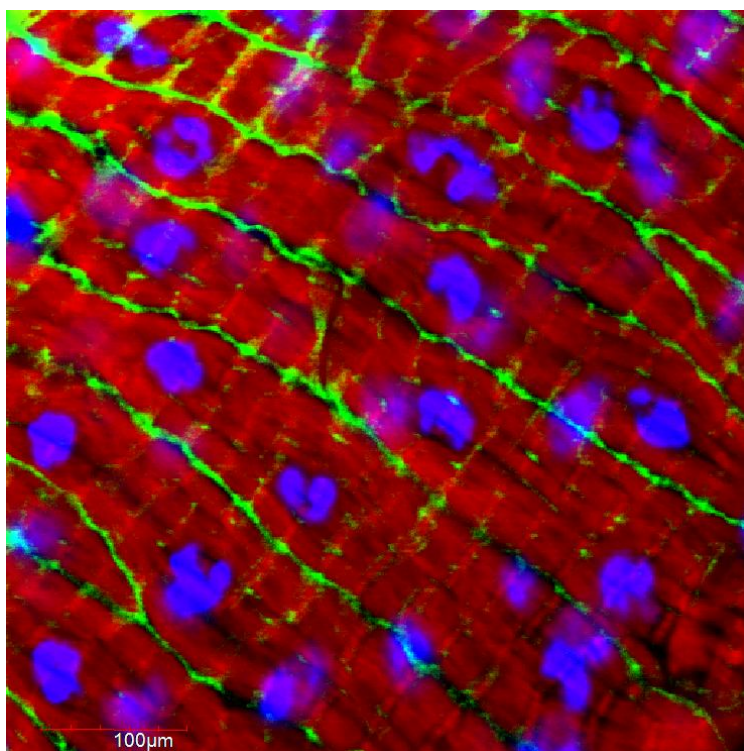
A súlyos szöveti rendellenességet mutató fehérje kombinációk a fenti fenotípusos bélyegek számos elemét tartalmazzák. Így a G552D2/G467E variánsban a szarkomer/kosztamer hiányzik, ER/SR-stressz lép fel, az izomrostok myotubuláris megjelenésűek (4. Ábra). Hasonló fenotípust mutatnak a G233E/G552D2, G552D2/G233E, G552D2/G467E, G1043S/G467E,

G1025E1/G1393E, G1025E2/G467E, G1025E2/G552D1, G552D2/G1043S, G1043S/G552D2, G1043S/G552D1, G552D2/G1393E, és a G552D1/G467E variánsok.



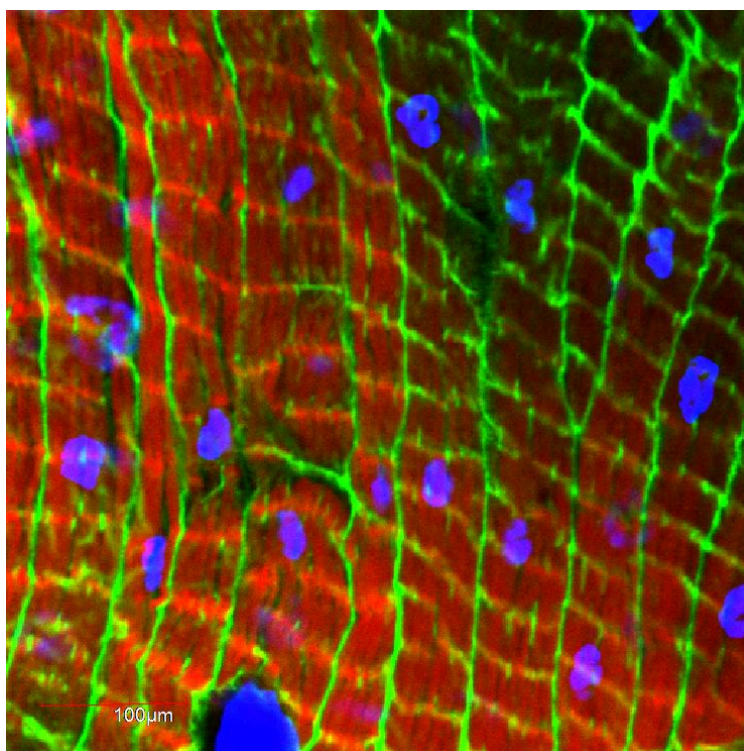
4. Ábra. Súlyosan károsodott izom a G552D2/G467E variánsban.

A szarkomer/kosztamer hiányát mutató kombinációk, G467E/G552D1, G467E/G552D2, G467E/G1393E, G467E/G1043S, G1043S/G552D2, G1043S/G233E, G1043S/G552D1, G1025E1/G552D2, G1025E2/G1393E, G1025E2/G552D2, G233E/G552D2, G552D2/G233E, G552D2/G467E, G1043S/G467E, G1025E1/G1393E, G1025E2/G467E, G552D1/G467E, G1393E/G467E, G1393E/G552D2, G467E/G233E, G1043S/G1393E, G552D1/ G552D2 körében az ER/SR-stressz a G467E/G552D2, G1043S/G552D2, G1043S/G233E, G1025E1/G467E, G1025E1/G552D2, G1025E1/G552D1 variánsokban lép fel.



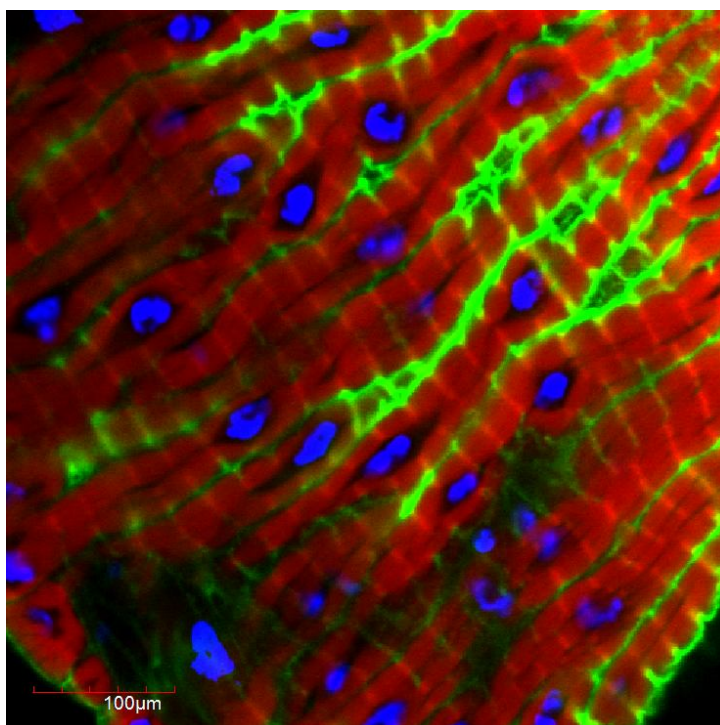
5. Ábra. Szarkomer/kosztamer hiányos, ER-stresszt mutató variáns (G1393E/G552D2).

A szarkomer/kosztamer hiányával együtt a miotubuláris megjelenés a G1043S/G552D2, G1043S/G552D1, G552D2/G1393E, G1025E1/G552D2, G552D2/G233E, G552D2/G467E, G1025E1/G1393E, G1025E2/G467E, G552D2/G1043S, G552D1/G467E, G1393E/G467E, G1393E/G552D2, G552D1/G1043S variánsokban társul a fenotípushoz (6. Ábra).



6. Ábra. A szarkomer/kosztamer hiányával együttesen jelentkező miotubuláris megjelenés (G1025E1/G552D2).

Normális esetben az izomrostok magjai perifériás elhelyezkedésűek, membránnal asszociálnak. A kettős mutánsok mindegyikében ugyanakkor a magok centrális helyzetűek (7. Ábra).



7. Ábra. Centrális magok a G1043S/G1393E kettős mutánsban.

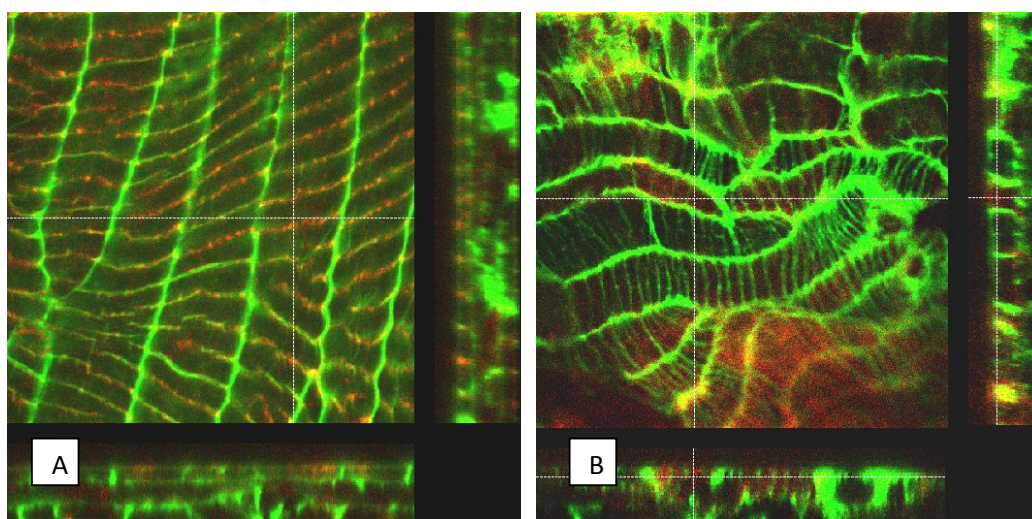
A súlyosan miopathiás fenotípussal leggyakrabban az izoallélikus *col4a1*^{G552D1} és *col4a1*^{G552D2}, valamint a *col4a1*^{G233E} allélek társulnak. A *col4a1*^{G552D1} és *col4a1*^{G552D2} mutációk elhelyezkedését a COL4A1 szálon, és a vele asszociálódó COL4A2 szál részletét a 8. Ábra mutatja:

531	D
GRP GTP GAA GAP GQK GDA GRP GTP GQK GDM GIK GDV G GK CSSCRA GPK G	
NIV GPP GSQ GPP GFR GLP GDD GYN GLR GLP GEK GLR GDD CPVCNA GPR G	

8. Ábra. A G552D mutáció helye a COL4A1 fehérjében és a hozzá kapcsolódó COL4A2 szál részlete.

A **GLPGEKGLRGD** peptid kanonikus integrin kötőhely, amit közvetlenül két cisztein híd követ. A velük szemben található G->D szubsztitúció alkalmas a kötőhely kompromittálására, amit kísérletesen is megfigyeltünk (Kelemen-Valkony és mtsai, kézirat, 9, Ábra10. Ábra).

A *col4a1*^{G233E} mutáció a GFPG/EEKGERGDS peptidben található (10. Ábra), mely szintén tartalmaz integrin kötőhelyet. A mutánsban az integrin és a kollagén nem együttesen lokalizálódik (nem mutatjuk be).



9. Ábra. Integrin és COL4A2 nem átfedően festődnek a *col4a1*^{G552E}/GFP mutánsban. A: 20 °C-os, B: 29 °C-os minta / Valkonyné Kelemen Ildikó /. A piros színnel az integrint jelöltük, a zöld a COL4A2::GFP fúziós fehérjét jelöli. Megfigyelhető az integrin dezorganizáltsága és súlyos izom dystrophia fellépte a 29 °C-os mintában.

6. Következtetések

A transz-heterozigóták jellegzetes fenotípusa a centronukleáris/miofibrilláris miopátia, a szarkomer szerveződés elmaradása, az izomrostok differenciálatlan, miotubuláris állapota. A mutációval érintett peptidek egyikében GLP GEK GLR GD direkt integrin kötőhely, RGD szekvencia található (10. Ábra). A GLP GEK GLR GD integrin kötő peptiddel szemben, egy trimer molekulán belül elhelyezkedő G->D szubsztitúció indirekt módon kompromittálja a kötő helyet (10. Ábra). Kettős mutásokban az enyhe miopáthiás fenotípus felerősödését figyeltük meg. Ezek a mutációk az integrin kötő helyektől távol, C-terminálisan helyezkednek el, és a kollagén trimer stabilitását, valamint a hármas hélix összeszerelődését érinthetik. E kérdések eldöntését három dimenziós fehérje modellek építésével és azok tulajdonságainak elemzésével kívánjuk eldönteni. Mivel az integrinek izomrostokban a rendezetlen szarkomerek precíz összeszerelődését, valamint a vastag és vékony filamentumok összesímulását irányítják, szerepüket horgonyhoz, vasmacskához hasonlítják [2]. Ugyanakkor a citoplazma - extracelluláris mátrix tengely számos eleme közül az integrin receptor csupán egy képviselő, aminek egyik ligandja a IV-es kollagén. Kísérleteink bebizonyították, hogy a receptor-ligand kapcsolat megszűnése (9. Ábra) súlyos következményekkel jár, hasonlóan, mint amikor a lemacskált hajó leszakad a horgonyról. Így, ha az integrinek az izom rostok kialakításában horgonyként viselkednek, addig a IV-es kollagének horgonykötélként interpretálhatóak. Mindezekkel összhangban a *col4a1* mutációk által kifejtett genetikai inzultus az izom differenciálódás és a szarkomer képződés eddig ismeretlen kóroki tényezőjeként azonosítja a IV-es típusú kollagént, és a fehérjén belül az ebben részvevő peptid doméneket.

A mutációt hordozó szekvenciák és környezetük

a-30/CyRoi G²³³E GFPGEK -- RGD α_1
 GFDGDR - GSK α_2
 GFPGEK -- RGD α_1

Monomer (single α -chain)



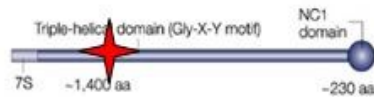
DTS-4/CyRoi G¹⁰²⁵E DQGLAG α_1
 DTS-5/CyRoi SGDDGP α_2
 DQGLAG α_1

Monomer (single α -chain)



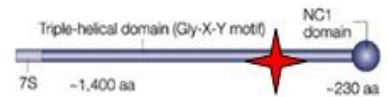
b-9/CyRoi G⁴⁶⁷E GPKGSI α_1
 GFIGPP α_2
 GPKGSI α_1

Monomer (single α -chain)



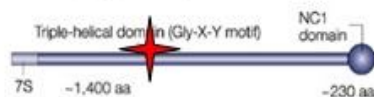
DTS-10/CyRoi G¹⁰⁴³S EKGNQG α_1
 GETGNP α_2
 EKGNQG α_1

Monomer (single α -chain)



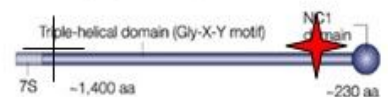
DTS-2/CyRoi G⁵⁵²D PTGPGQKGD MGI---- α_1
 DTS-3/CyRoi GLPGEK--RGD α_2
 PTGPGQKGD MGI---- α_1

Monomer (single α -chain)



b-17/CyRoi G¹³⁹³E QKGDKG α_1
 IVGRGJ α_2
 QKGDKG α_1

Monomer (single α -chain)



10. Ábra. A mutációt hordozó peptid szekvenciák

7. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek Dr. Mink Mátyás egyetemi docensnek a szakmai irányításáért, és támogatásáért, továbbá hogy lehetővé tette pályaművem elkészítését a Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar Genetika Tanszéken.

Köszönettel tartozom Valkonyné Kelemen Ildikónak aki a kísérletek kivitelezéséhez nyújtott elméleti és gyakorlati segítséget, amely nélkül nem készült volna el a dolgozatom.

Szeretném megköszönni Kiss Mártonnak szakmai segítségét, melyet nem volt rest este 11 órakor is rendelkezésemre bocsájtani.

Továbbá szeretném megköszönni alsóbb évfolyamos hallgató társaimnak, Popovics Nikolettának és Szabó Gábornak, akik minden külső kényszer hatása nélkül ajánlották fel segítségüket számomra a laborban munkaidőben, és néha még azon is kívül.

8. Irodalomjegyzék

- [1] Myllyharju, J. and Kivirikko, K.I., 1994. Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet.* 18, 33-43.
- [2] Rui Y, Bai J, Perrimon N (2010) Sarcomere Formation Occurs by the Assembly of Multiple Latent Protein Complexes. *PLoS Genet* 6(11): e1001208. doi:10.1371/journal.pgen.1001208
- [3] Tryggvason, K., Zhou, J., Hostikka, S.L. and Shows, T.B., 1993. Molecular genetics of Alport syndrome. *Kidney Int.* 43(1), 38-44.
- [4] Alport, A.C., 1927. Hereditary familial congenital haemorrhagic nephritis. *Br. Med. J.* 1, 504-506.
- [5] Plaisier, E., Gribouval, O., Alamowitch, S., Mougenot, B., Prost, C., Verpont, M. Ch. Marro, B., Desmettre, Th., Cohen, S. Y., Roullet, E., Dracon, M., Fardeau, M., Van Agtmael, T., Kerjaschki, D., Antignac, C. and Ronco P., 2007. COL4A1 Mutations and Hereditary Angiopathy, Nephropathy, Aneurysms, and Muscle Cramps. *N. Engl. J. Med.* 357, 2687 - 2695.
- [6] Suzuki, D.T. and Procunier, D., 1969. Temperature-sensitive mutations in *Drosophila melanogaster*, III. Dominant lethals and semilethals on chromosome 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 62, 369-376.
- [7] Kelemen-Valkony, Ildikó, Márton Kiss, Katalin Csiszár, Mátyás Mink, (Department of Genetics, University of Szeged, Hungary). Inherited Myopathies. In: *Myopathies: New Research*. Eds: Howard S. Washington and Chris E. Castillo Jimenez, Nova Publishers, New York, ISBN: 978-1-62257-372-1, 2012B.
- [8] Kelemen-Valkony, Ildikó, Márton Kiss, Judit Csiha, András Kiss, Urs Bircher, János Szidonya, Péter Maróy, Gábor Juhász, Orbán Komonyi, Katalin Csiszár and Mátyás Mink. *Drosophila* basement membrane collagen col4a1 mutations cause severe myopathy. *Matrix Biol.*, 31(1), 29-37, 2012A.
- [9] Kelemen-Valkony, Ildikó, Katalin Csiszár, Mátyás Mink. Onset of muscular dystrophy by fast or slow progression in *Drosophila* type IV collagen mutants. *Kézirat*.
- [10] Szidonya, J. and Reuter, G., 1988. Cytogenetic analysis of the *echinoid (ed)*, *dumpy (dp)* and *clot (cl)* region in *Drosophila melanogaster*. *Genet. Res. Camb.* 51, 197-208.

9. Ábrajegyzék:

1. Ábra: <http://greatcourse.cnu.edu.cn/xbfzswx/wlkc/kcxx/kcxx-4.htm>
2. Ábra: Raghu Kalluri Nature Reviews Cancer 3, 422-433 (June 2003)
doi:10.1038/nrc1094, Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis
3. Ábra: <http://www.mcatzone.com/glosslet.php?letter=s>

10. Tétel szerzői hozzájárulás

Alulírott Kiss András Attila a dolgozatban leírt folyamatok közül az:

1. Kísérleti állatok fenntartását
2. Kísérleti állatok keresztezését
3. Kísérleti állatokból történő mintavételt (szervek preparálása)
4. Immunhisztokémia (oviductus communis festése)
5. Konfokális mikroszkópia segítségével készítettem a felvételeket

A felsorolt munkákat önállóan végeztem el.

.....

aláírás

Szeged, 2015. január 6