

A dDAAM sejtvázsabályozó fehérje szinaptikus fejlődésben betöltött szerepének vizsgálata

Migh Ede

Ph.D. értekezés tézisei

Témavezető: Dr. Mihály József

Tudományos tanácsadó

Magyar Tudományos Akadémia

Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Genetikai Intézet

SZTE TTIK

Biológia Doktori Iskola

Szeged, 2018.

BEVEZETÉS

Az agyban kialakuló milliárdnyi szinaptikus kapcsolat nélkülözhetetlen feltétele annak, hogy bonyolult idegi hálózatok alakuljanak ki. A szinaptikus fejlődés és a funkció mechanizmusainak a vizsgálatával jobban megérthetünk olyan komplex idegi folyamatokat, mint pl. a tanulás, a memória és az érzékelés. Az utóbbi évtizedek neurobiológiai kutatásai fényt derítettek arra, hogy a szinaptikus fejlődés, funkció és struktúra fenntartás bonyolult folyamataiban a sejtvázs dinamikusan átrendeződése is fontos szerepet játszik ebben. Annak ellenére, hogy számos olyan fehérjét ismerünk, amely képes szabályozni az aktin és a mikrotubulus szerveződését, még nagyrészt ismeretlen a sejtvázsabályozás mechanizmusainak a többsége a szinaptikus fejlődés során. A tudásunk folyamatosan bővül új upstream sejtvázsabályozó elemek megismerésével, viszont még keveset tudunk arról, hogy a sejtvázs effektor fehérjék miként kötődnek az aktin/mikrotubulus sejtvázhoz és hogyan szabályozzák azokat. A sejtvázs effektor fehérjék vizsgálatával jobban megérthetjük a sejtvázs-átrendeződések dinamikusan zajló folyamatait.

Néhány évvel ezelőtt kezdtük el vizsgálni a *Drosophila* DAAM, formin típusú sejtvázsabályozó fehérje szerepét neuronális folyamatokban. Számos *Drosophila* neuronális modellrendszerrel használva megállapítottuk, hogy a dDAAM az aktin összeszerelő aktivitása révén szerepet játszik az axon növekedés és navigáció folyamataiban. Később számos bizonyítékot adtunk arra vonatkozólag, hogy a dDAAM képes közvetlenül kötődni a mikrotubulusokhoz, valamint szerepe lehet az aktin/mikrotubulus kölcsönhatások elősegítésében. Tovább folytatva ezt a munkát, a dolgozatban a dDAAM szerepét vizsgáltam a szinaptikus fejlődés folyamataiban.

CÉLKITŰZÉSEK

Kísérleteink során a következő célokat tűztük ki:

1. Megvizsgálni, hogy a dDAAM a sejtvázsabályozás egyik fontos szereplőjeként részt vesz-e a szinaptikus fejlődésben.
2. Felderíteni a dDAAM szerepét a szinaptikus fejlődés során végbemenő sejtvázátreendezési folyamatokban.
3. Genetikai interakciós vizsgálatok segítségével kideríteni, hogy milyen jelátviteli útvonalakkal állhat kapcsolatban a dDAAM az NMJ kialakulása során.
4. Megvizsgálni, hogy a dDAAM szerepet játszik-e a szinaptikus aktív zónák létrejöttében.
5. Elektrofiziológiai módszerekkel megvizsgálni, hogy a dDAAM hiánya befolyásolja-e szinaptikus transzmisszió hatékonyságát.

ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

1. Rekombináns DNS technikák
2. *Drosophila* genetika
3. Knock-in allél létrehozása génkonverziós technika segítségével
4. Funkcióvesztéses allélok létrehozása CRISPR/Cas9 technika segítségével
5. Metanollal fixált embriók készítése
6. Lárva preparátumok készítése
7. Embriók immunfluoreszcens vizsgálata
8. Lárva preparátumok immunfluoreszcens vizsgálata
9. Western blot
10. Tömegspektrometriai analízis
11. Elektronmikroszkópia
12. Elektrofiziológia
13. STED (super-resolution stimulated emission depleted) mikroszkópia

AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. A dDAAM szükséges a szinaptikus bouton képződéshez

Először megállapítottuk, hogy a dDAAM a szinapszisképződés egyik korai szereplője, már az embrionális fejlődés során szükség van a fehérje kifejeződésére. A dDAAM fehérje hiányában az embrionális motoraxon növekedési és navigálási hibát egyaránt mutat az NMJ terminálisoknál. A vizsgálatainkat kiterjesztve a lárvális NMJ végződések vizsgálatára megállapítható, hogy a dDAAM pre- és posztzinaptikus kifejeződést egyaránt mutat. A *dDAAM* mutáns NMJ terminális lárvában abnormális fejlődést mutat bouton szám és NMJ morfológia tekintetében. A dDAAM hiányos motoraxon végzések drasztikus bouton szám csökkenést mutatnak, illetve a boutonokat összekötő inter-boutonikus régió kiszélesedik bouton fúziós fenotípust eredményezve. Habár a dDAAM mindkét szinaptikus oldalon kifejeződik, további funkcióvesztéses vizsgálatokból kiderült, hogy a látott NMJ fenotípusokat elsősorban a dDAAM preszinaptikus hiánya okozza

2. A dDAAM szükséges a preszinaptikus mikrotubulusok szerveződéséhez

Annak érdekében, hogy jobban megértsük a dDAAM preszinaptikus szerepét az NMJ fejlődés során, elhatároztuk, hogy megvizsgáljuk a sejtvázszerveződést az NMJ terminálisokban. Mivel a Futsch, mint preszinaptikus mikrotubulus marker a legígéretesebb dDAAM kölcsönható partnernek tűnt, ezért a mikrotubulus rendszert vizsgáltuk először a

dDAAM mutánsokban. A vad típusú preszinaptikus motoraxon végződésben megfigyelhető, hogy a központi mikrotubulus sejtváza egy egységes kötegbe rendeződik, amely fokozatosan a preszinaptikus végződés disztális része felé haladva elvékonyodik. Ezzel ellentétben a *dDAAM* hiányában fragmentált és dezorganizált szerveződést mutat a központi mikrotubulus köteg, valamint a terminális boutonokból gyakran hiányoznak a mikrotubulusok. A forminokat eddig főként aktin polimerizációs faktorként ismertük, de az utóbbi időben egyre több eredmény áll rendelkezésünkre arra vonatkozólag, hogy képesek szabályozni a mikrotubulusokat is. Ezek alapján úgy gondoltuk, érdekes lenne megvizsgálni, hogy vajon a *dDAAM* aktin és/vagy mikrotubuluskötő funkciója fontos-e a bouton képződésben. A kérdés megválaszolásához menekítési kísérleteket végeztünk olyan teljes hosszúságú *dDAAM* pontmutáns fehérjékkel, amelyek nem képesek az aktinhoz vagy az aktinhoz és a mikrotubulusokhoz kötődni. A vad típusú és az aktin inkompetens teljes hosszúságú *dDAAM* fehérje képes volt menekíteni a *dDAAM* mutáns NMJ fenotípusát, ezzel szemben az aktin és mikrotubulus kötésre képtelen kettős mutáns nem volt képes helyreállítani a vad típusú NMJ morfológiát. Ez után felmerült bennünk a kérdés, hogy a *dDAAM* mutáns NMJ-ben vajon a preszinaptikus aktin organizáció érintett-e. A *dDAAM* mutáns preszinaptikus motoraxon végződésben az aktin szerveződés a vad típusúhoz nagyon hasonló volt. Ezek az eredmények megerősítettek bennünket abban, hogy a *dDAAM* elsődleges funkciója a mikrotubulus sejtvázaszabályozáshoz köthető az NMJ fejlődés során, míg az aktin összeszerelő aktivitása nem tűnik fontosnak a szinaptikus bouton képződés folyamataiban.

3. A dDAAM elősegíti a preszinaptikus bouton képződést

A funkcióvesztéses kísérletek alapján a dDAAM preszinaptikus jelenléte képes elősegíteni a bouton képződést. A továbbiakban kíváncsiak voltunk arra, hogy ha a fehérje aktivitását megemeljük, akkor annak milyen hatása lesz az NMJ morfológiára vagy a bouton képződésre. Korábbi kísérleteink során sikerült a dDAAM N-terminális részének az eltávolításával egy konstitutívan aktív dDAAM formát létrehoznunk, amit C-DAAM-nak hívunk. A C-DAAM preszinaptikus túltermelése jelentős mértékben megemelte a bouton számot, ami megerősíti azt az elképzelésünket, hogy a dDAAM-nak meghatározó szerepe van a boutonok kialakulásában.

4. A dDAAM genetikai kölcsönhatást mutat a *wg* és az *Ank2* géekkel

A következőkben arra voltunk kíváncsiak, hogy a dDAAM működését milyen jelátviteli útvonalak szabályozzák. A genetikai interakciós vizsgálatok alapján a dDAAM együttműködhet a *Wg* és az *Ank2* fehérjékkel az NMJ fejlődés során. Érdekes módon korábban már leírták, hogy a dDAAM tagja lehet a Wnt/Fz jelátviteli útnak különböző szövetekben. Illetve azt is tudjuk, hogy a divergens kanonikus Wnt/*Wg* jelátviteli út az *Ank2*-vel együtt szabályozza a preszinaptikus mikrotubulus organizációt. A fenti adatok megerősítik azt az elképzelésünket, hogy a dDAAM a *Wg* és az *Ank2* fehérjékkel együttműködik a megfelelő NMJ morfológia létrehozásában. Korábbi kísérletekben bemutatták, hogy az *Ank2* valószínűleg a *Wg* szignalizáció egyik effektor fehérjeje az NMJ

terminális kialakulásában. Így érdekesnek találtuk megvizsgálni a dDAAM helyzetét ebben a hierarchia rendszerben episztázis kísérletek használatával. A korábbi eredményekkel összhangban az *Ank2* null mutáns állatokban csökkent bouton szám és nagymértékű mikrotubulus felhalmozódás volt megfigyelhető az NMJ végződéseken. Ezzel szemben a kettős homozigóta *dDAAM; Ank2* mutánsokban a dDAAM hiánya képes volt megszüntetni az *Ank2* mutánsra jellemző mikrotubulus felhalmozódást, valamint az inter-boutonikus régió kiszélesedését. A kísérletek alapján a dDAAM episztatikus az *Ank2*-höz képest, valamint a dDAAM mikrotubulus stabilizáló szerepe ebben a hierarchia rendszerben valószínűleg downstream szabályozó elemként viselkedik. A *dDAAM; Ank2* kettős mutáns fenotípusa viszont nem teljesen azonos a *dDAAM* mutáns NMJ fenotípusával, ami arra utal, hogy nem egy egyszerű alá-fölé rendeltségi viszony van a két fehérje között. Az *Ank2* mellett a mikrotubuluskötő Futsch fehérjéről is ismert, hogy a szinaptikus Wg szignalizáció egyik effektor molekulája. Hasonlóan az *Ank2*-höz a Futsch esetében is *dDAAM/futsch* kettős mutáns NMJ végződéseket vizsgáltunk, hogy jobban megértsük a dDAAM szerepét vagy helyzetét a divergens kanonikus Wg szignalizációban. A kettős mutáns NMJ végződéseken csökkent bouton szám, bouton fúzió valamint szakadozott mikrotubulus kötegek jelentek meg, ami nagyon hasonlított a *dDAAM* fenotípusra. A fenti eredmények alapján a *dDAAM* episztatikus a *futsch*-hoz képest.

5. A dDAAM Brp függő jelenléte moduláris funkcióval bír a szinaptikus transzmisszióban

Tovább folytatva a lokalizációs vizsgálatokat megállapítottuk, hogy a dDAAM fehérje a kortikális felhalmozódás mellett a preszinaptikus oldalon egy pöttyszerű kifejeződési mintát is mutat. Tovább vizsgálva ezt az érdekes pöttyszerű kifejeződési mintázatot, nagy felbontású STED mikroszkópiával megállapítottuk, hogy a dDAAM felhalmozódás egy gyűrűszerű struktúrát rajzol ki, ami nagyrészt átfed a Brp C-terminális fehérjerész mintázatával, ami az aktív zóna fehérjekomplex disztális vége. A lokalizációs vizsgálatok mellett funkcionális bizonyítékokat is találtunk arra vonatkozólag, hogy a dDAAM befolyásolhatja az aktív zóna kialakulását, illetve annak működését. Megvizsgálva az aktív zónák ultrastrukturális szerkezetét a *dDAAM* mutáns állatokban az aktív zóna átmérője kis mértékben megnőtt. Végezetül elektrofiziológiai mérésekkel megvizsgáltuk azt, hogy a dDAAM hiánya befolyásolja-e a szinaptikus transzmisszió hatékonyságát. Habár a spontán szinaptikus áramok karakterisztikájában nem láttunk változást, a kiváltott akciós potenciál mértéke kisebb volt dDAAM hiányában.

ÖSSZEFOGLALÁS

Ebben a munkában bemutattuk azt, hogy a formin típusú sejtvázsabályozó dDAAM fehérje képes elősegíteni az új bouton képződést és úgy tűnik, hogy moduláris funkcióval bír az aktív zóna képződésben és funkcióban.

SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

A dolgozat alapját képező közlemény:

Migh E, Gotz T, Foldi I, Szikora S, Gombos R, Darula Z, Medzihradszky KF, Maleth J, Hegyi P, Sigris S, Mihaly J Microtubule organization in presynaptic boutons relies on the formin DAAM. DEVELOPMENT 145:(6) Paper dev158519. 13 p. (2018) IF: 5.843 MTMT: 3343168

További közlemények:

A T Vig, I Földi, S Szikora, E Migh, R Gombos, M Á Tóth, T Huber, R Pintér, G C Talián, J Mihály, B Bugyi The activities of the c-terminal regions of the formin protein disheveled-associated activator of morphogenesis (daam) in actin dynamics JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 292:(33) pp. 13566-13583. (2017) IF: 4.125 MTMT: 3242535

Szikora S, Foldi I, Toth K, Migh E, Vig A, Bugyi B, Maleth J, Hegyi P, Kaltenecker P, Sanchez-Soriano N, Mihaly J The formin DAAM is required for coordination of the actin and microtubule cytoskeleton in axonal growth cones. JOURNAL OF CELL SCIENCE 130:(15) pp. 2506-2519. (2017) IF: 4.431 MTMT: 3240757

M Á Tóth, A K Majoros, A T Vig, E Migh, M Nyitrai, J Mihály, B Bugyi Biochemical Activities of the Wiskott-Aldrich Syndrome Homology Region 2 Domains of Sarcomere Length Short.: WH2 domains in sarcomeric actin regulation JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 291: pp. 667-680. (2016) IF: 4.125 MTMT: 2974845

Gombos R, Migh E, Antal O, Mukherjee A, Jenny A, Mihaly J The Formin DAAM Functions as Molecular Effector of the Planar Cell Polarity Pathway during Axonal Development in Drosophila JOURNAL OF NEUROSCIENCE 35:(28) pp. 10154-10167. (2015) IF: 5.924 MTMT: 2931297

Migh E, Foldi I, Molnar I, Szikora S Developmental signaling pathways in human cancer Selected Topics from Contemporary Experimental Biology, Volume 2. 288 p. Szeged: MTA Szegedi Biológiai Központ, (2015) pp. 171-188. IF: - MTMT: 3003062

Molnár I, Migh E, Szikora S, Kalmár T, Végh A G, Deák F, Barkó S, Bugyi B, Orfanos Z, Kovács J, Juhász G, Váró G, Nyitrai M, Sparrow J, Mihály J DAAM is required for thin filament formation and sarcomerogenesis during muscle development in Drosophila PLOS GENETICS 10:(2) Paper e1004166. 15 p. (2014) IF: 7.528 MTMT: 2506301

Vogler G, Liu J, Iafe TW, Migh E, Mihály J, Bodmer R Cdc42 and formin activity control non-muscle myosin dynamics during Drosophila heart morphogenesis JOURNAL OF CELL BIOLOGY 206:(7) pp. 909-922. (2014) IF: 9.834 MTMT: 2760711