

# **Sejtváz fehérjék vizsgálata idegsejtekben**

**Tézisek az egyetemi doktori cím Ph.D. fokozattá  
történő átminősítésért**

**Készítette: Dr. Ádám Géza**

**MTA Szegedi Biológiai Központ**

**Genetikai Intézete**

**1997**

Az idegsejtek sajátos morfológiájukat a sejttestből kiinduló kiterjedt nyúlványrendszerüknek köszönhetik. Funkciójuk alapján, ezeknek a nyúlványoknak két típusát különböztetjük meg: a dendritek a sejttest irányába, az axonok pedig a sejttestből kifelé vezetik az ingerületet. A nyúlványok kialakulásában a sejtvázszerkezetek közül a mikrotubulusoknak és a membrán alatti, ún. kortikális sejtváznak van alapvető szerepe. A nyúlványok növekedése során a két sejtvázszerkezet ellentétesen hat egymásra: a citoplazmatikus mikrotubulus kötegek nyomóereje a membrán sejtvázszerkezet aktin filamentumai által létrehozott ellenállásba ütközik. (Edson et al. 1993)

Az idegsejtek mikrotubulusai sok szempontból különböznek a többi sejt mikrotubulusaitól: függetlenek a centroszómától, stabilabbak, merevebbek és kötegekbe rendeződve a sejtnyúlványok hosszanti tengelye mentén helyezkednek el. A neurális mikrotubulusok ezen tulajdonságaikat az idegsejtekre specifikus mikrotubuláris fehérjéknek köszönhetik. Ezek közül a MAP2 (microtubule associated protein 2) és a tau fehérjék mennyisége a legnagyobb az idegsejtekben (Matus 1988), így döntő részben ezek felelősek a neurális mikrotubulusok fenti sajátosságainak a kialakításáért. Annak ellenére, hogy ez a két fehérje a mikrotubulusoknak hasonló tulajdonságot kölcsönöz, az idegsejtek morfogenezisében eltérő szerepet tölt be. A tau fehérjék az axonális mikrotubulus rendszer szervezését végzik, a MAP2 fehérjék pedig a sejttestben és a dendritekben levő mikrotubulusokhoz kötődnek.

A MAP2 fehérjék számos izoformáját egyetlen gén kódolja. Az 1830 aminosavból felépülő nagy molekulású MAP2 (~200 000 kDa) C-terminálisa közelében található a mikrotubulus-kötő domén, amely 31 aminosavból álló szekvencia háromszori vagy négyszeri tandem ismétlődéséből épül fel. Mellette egy prolinban gazdag régió helyezkedik el, amit egy 1363 aminosavból felépülő, a molekula kb. három-negyed részét kitevő szakasz, az ún.

"szürke zóna" követ. Ennek funkciója eddig még nem ismeretes. A MAP2 N-terminálisán található egy kb. 100 aminosavból álló domén, ami a cAMP-függő protein kináz (PK-A) regulátor (R) alegységét köti, s így annak a mikrotubulusokon történő lokalizációjáért felelős. A kis molekulású izoforma, a MAP2c ( mely 467 aminosavat tartalmaz) ugyanazokból a doménekből épül fel mint a MAP2, kivéve a "szürke zónát". Ez a szakasz a mRNS érése során vágódik ki alternatív "splicing" útján. A két izoforma az idegsejtek fejlődésének különböző szakaszaiban jelenik meg: a MAP2c csak az embrionális neuronokban található meg, amit a szinaptogeneziskor a nagy molekulású MAP2 vált fel, s a felnőtt idegsejtekben már csak ez figyelhető meg. A MAP2 fehérjét számos protein kináz képes foszforilálni, így az N-terminálishoz kötött PK-A is. A foszforiláció hatására gyengül a kölcsönhatás erőssége a MAP2 és a mikrotubulusok, illetve a MAP2 és az egyéb sejtvezeték fehérjék (pl. aktin) között. Mivel a MAP2 fehérjék nem csak a mikrotubulusokkal hanem a többi sejtvezeték elemmel is kapcsolatban vannak, így fontos szerepük van a dendritek morfogenezisében az idegsejtek érése során, illetve később ezek plasztikus változásaiban is (Goedert et al. 1991).

A tau fehérjét is egyetlen gén kódolja, amelyről legalább hat izoforma képződik alternatív "splicing" segítségével, s amelyek az egyedfejlődés különböző szakaszaiban jelennek meg. Mindegyik izoforma a C-terminálison tartalmazza a mikrotubulus-kötő domént, amely nagy fokú homológiát mutat a MAP2 fehérjék hasonló doménjével: szintén három vagy négy, egyenként 31 aminosavból álló, tandem ismétlődő szekvenciát tartalmaz. A tau fehérjét is számos protein kináz képes foszforilálni, s a foszforilált molekulák kisebb affinitással kötődnek a mikrotubulusokhoz. A tau fehérjéknek az axonális mikrotubulusok stabilizálása révén szabályozó szerepük van az axonok morfológiájának kialakításában (Goedert 1993).



Az egyes idegsejtek alakja ugyan genetikailag meghatározott, ami azonban az egyedi élet során kisebb-nagyobb morfológiai változáson megy keresztül a neuronokat ért ingerületek hatására. Az idegsejtek plasztikus változásai feltételezik a mikrotubulus rendszer átrendeződését, s mivel a mikrotubulusok tulajdonságait a mikrotubuláris fehérjék szabályozzák, így a MAP2 és a tau fehérjék az idegsejtek plaszticitásában is lényeges szerepet kapnak (Kaech et al. 1996).

A másik sejtvázszerkezet, ami az idegsejtek nyúlványainak kialakításában vesz részt, a membrán alatti sejtvázszerkezet, amelynek lényeges alkotó eleme a polimerizált aktinból felépülő filamentum hálózat. Ez a képződmény a sejtmembrán mechanikai tulajdonságainak a kialakítását végzi, s igen nagy mennyiségben található a posztszinaptikus területen, ahol első sorban a posztszinaptikus densitás (PSD) mentén koncentrálódik (Kelly et al. 1978, Matus et al. 1982). A PSD a posztszinaptikus membránhoz szorosan kapcsolódó korong alakú, elektrondenz struktúra (Gray és Guillery 1966), melynek megjelenése az egyedfejlődés során egybeesik a pre- és posztszinaptikus membránok közötti kapcsolat kialakulásával (Jones et al. 1974). Ez arra utal, hogy a PSD egyik funkciója az, hogy meghatározza a szinaptikus kapcsolat helyét és kiterjedését. Molekuláris összetétele igen komplex, számos ismert, illetve eddig még nem azonosított fehérjét találtak az építő elemei között (Walsh és Kuruc 1992). Egyik fő alkotórésze, ami az összes fehérje kb. 20-30%-át teszi ki, a kalcium/kalmodulin függő protein kináz II (CaMK II)  $\alpha$  alegysége (Kennedy et al. 1983). Ezenkívül koncentráltan tartalmaz gátló és stimuláló neurotranszmitter receptorokat illetve membrán sejtvázszerkezeteket, aktint és spektrint. A PSD alakja és kiterjedése döntően meghatározza a posztszinaptikus membrán morfológiáját s ezen keresztül annak funkcióját is. Az idegsejtek

plasztikus változásai során a PSD szerkezetében is változások következnek be, amiben fontos szerepe lehet a PSD-hez kötött membrán sejtvez fehérjéknek.

Téziseimben a mikrotubulus rendszer és az aktin filamentumok neuronális szerepét vizsgáltam meg. Az idegi mikrotubulus rendszer kialakításában egyik leglényegesebb tényező a MAP2, viszont az idegsejtben betöltött in vivo szerepéről szegényes adatok állnak rendelkezésre. A MAP2 idegi funkcióját oly módon vizsgáltam, hogy a fehérjét az ecetmuslica idegsejtjeiben kifejeztettem, részint azért mert a MAP2 nem található meg ebben az élőlényben, s így a saját MAP2 zavaró hatásával nem kell számolni, részint pedig azért mert az ecetmuslica genetikai manipulálhatósága lehetővé teszi, hogy a MAP2 expresszióját az organizmus szintjén vizsgáljuk. A membrán sejtvez fehérjék közül az aktin szerepét tanulmányoztam a PSD szerkezetének a kialakításában.

## **MAP2 expressziója ecetmuslicában**

### ***1. Idegsejt eredetű mikrotubuláris fehérjék jellemzése ecetmuslicában***

A MAP2 szerepének az ecetmuslicában történő tanulmányozásához először is az ecetmuslica idegsejtjeiből származó mikrotubuláris fehérjéket kellett jellemeznünk. Ezzel kapcsolatos eredményeinket a következő közleményben írtuk le: **Géza Ádám and Peter Friedrich (1988)** *Microtubule-associated cyclic AMP-dependent protein kinase in Drosophila melanogaster* *J.Neurochem.* 51, 1014-1022.

Ecetmuslica fejkivonatból taxolos polimerizációval mikrotubulusokat preparáltunk. A mikrotubulus frakcióban a tubulinon kívül számos mikrotubuláris fehérjét lehetett detektálni

SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel, de a MAP2-nek megfelelő látszólagos molekulásúly tartományban, 280 kDa körül nem volt látható sáv. Legnagyobb mennyiségben egy 205 kDa-os fehérje volt jelen, ami az emlős MAP2-höz hasonlóan hőstabilnak bizonyult, viszont nem mutatott idegsejt specifikitást, mivel *ecetmuslica* sejttenyészetben illetve embrióban is megfigyelhető volt (Goldstein et al. 1986). A nagyobb molekulásúly tartományban további három sávot lehetett látni 230; 125 és 88 kDa körül. Számos mikrotubuláris fehérje volt jelen még az alacsonyabb molekulásúly tartományban is, ezek közül némelyek hőstabilak voltak. Annak bizonyítására, hogy ezek a sávok valóban mikrotubuláris fehérjék, a kiindulási fejkivonathoz nem adtunk GTP-t és taxolt, s az így nyert csapadékban csupán két fehérje sáv volt látható 55 kDa körül.

Feltételezhető volt az is, hogy a MAP2 mennyisége a preparátumban alatta van a Coomassie Blue festéssel történő detektálhatóságnak, s így a kimutatás érzékenységének a fokozására a MAP2 azon tulajdonságát használtuk ki, hogy az emlős MAP2 jól foszforilálódik PK-A-val. A fejpreparátumból származó mikrotubulus frakciót cAMP nélkül, illetve annak jelenlétében foszforiláltuk a frakcióban lévő endogén protein kinázok segítségével. Egy cAMP-re specifikusan foszforilálódó sávot lehetett megfigyelni 300 kDa körül, amely viszont nem volt hőstabil. Az alacsonyabb látszólagos molekulásúly tartományban is számos, cAMP-re foszforilálódó sáv jelent meg, annak jeleként, hogy a feji mikrotubulus frakció tartalmaz kötött PK-A-t. Legerősebben egy 150 kDa-os sáv jelölődött, amit viszont Coomassie Blue festéssel nem lehetett detektálni. Ez valószínűleg egy neurofilamentum fehérje, ami jó szubsztrátja a PK-A-nak (Leterrier et al. 1981).

A MAP2 kimutatását *ecetmuslica*ban immunológiai módszerekkel is megpróbáltuk. Sertés agyból izolált MAP2 ellen poliklónális ellenanyagot termeltettünk, de immunobloton nem

kaptunk keresztreakciót az ecetmuslica mikrotubuláris fehérjével. Nukleinsav szinten is próbálkozásokat tettünk az esetleges MAP2 gén kimutatására Southern-blot analízissel, de az ecetmuslica genomiális DNS-e sem hibridizált az emlős MAP2 polipeptid kódoló szekvenciáival. Ezek a kísérletek mind arra engedtek következtetni, hogy az ecetmuslicában nem található a MAP2-vel homológ, idegsejt specifikus fehérje, illetve gén.

Megnéztük azt is, hogy az emlős MAP2 hozzá tud-e kötődni az ecetmuslica mikrotubulusaihoz. Emlős agyból hőstabil mikrotubuláris fehérje frakciót készítettünk, (ez hozzávetőleg 70%-ban tartalmaz MAP2-t), ezt ecetmuslica fejkivonathoz adva mikrotubulusokat preparáltunk. A mikrotubulus frakcióban a MAP2-t is detektálni tudtuk, annak jeleként, hogy az emlős MAP2 jól kötődött az ecetmuslica mikrotubulusaihoz.

Mivel a MAP2-vel homológ fehérjét nem sikerült kimutatnunk az ecetmuslicában, megnéztük azt, hogy az ecetmuslica mikrotubuláris fehérjéi között található-e a MAP2-től eltérő, de hasonló funkciójú fehérje. A MAP2 egyik sajátossága, hogy az N-terminálisán stabilan köti a PK-A R alegységét, aminek a feltételezett jelentősége az, hogy az így kihorgonyozott PK-A, cAMP hatására elsősorban magát a MAP2-t fogja foszforilálni. Az ecetmuslica fejkivonatból preparált mikrotubulusok szintén tartalmaznak kötött PK-A-t, így megvizsgáltuk, hogy ennek a kináznak a kötődési sajátosságai mennyire hasonlítanak az emlős MAP2-höz kötött PK-A tulajdonságaihoz. Először az ecetmuslica mikrotubulusaihoz kötött PK-A relatív mennyiségét határoztuk meg kétféleképpen: enzimaktivitás méréssel, ami a C alegység mennyiségét jellemzi, és a cAMP kötés vizsgálatával, ami viszont a kötött R alegység mennyiségére ad felvilágosítást. Mind a két vizsgálattal azt kaptuk, hogy a kiindulási fejkivonathoz viszonyítva a mikrotubulus frakció 4,4 illetve 0,9 %-ban tartalmaz kötött C illetve R alegységet. Az

emlősben mért adatokkal összevetve, ahol az agyi szolubilis PK-A-nak mintegy 33 %-a kötődik a MAP2-höz, ez az érték jelentősen alacsonyabbnak bizonyult.

Az emlős MAP2 és a hozzá kötött R alegység közötti kapcsolat további jellegzetessége, hogy rendkívül stabil, cAMP hatására a C alegység ledisszociál a molekuláról ugyan, de az R alegység továbbra is kötve marad (Theurkauf és Vallee 1982). *Ecetmuslica* esetében viszont azt tapasztaltuk, hogy a cAMP-re nem csak a C hanem az R alegység is ledisszociált a mikrotubulusokról. Ezt a megfigyelésünket három különböző kísérletes adat is támogatta:

1. *Ecetmuslica*-ban a PK-A R alegysége foszforilálható a saját C alegységével (Dévay et al. 1986). Ezzel a módszerrel mind a kiindulási fejkivonatban, mind a mikrotubulus frakcióban jelöltük az R alegységet. Amikor a fejkivonathoz cAMP-t adtunk, a mikrotubulus preparátumban az R alegységnek megfelelő 56 kDa-os sáv intenzitásának jelentős gyengülését figyeltük meg. Ez vagy a jelölődés, vagy az R alegység mennyiségének a csökkenéséből adódhat. Annak eldöntésére, hogy a két lehetőség közül melyik következett be, közvetlenül az autofoszforilált fejkivonatokat vizsgáltuk meg. Azt tapasztaltuk, hogy az R alegységnek megfelelő sáv intenzitása nem hogy csökkent volna, hanem inkább erősödött cAMP hatására a korábbi adatokkal összhangban (Dévay et al 1986). Eredményeinket összevetve, a legvalószínűbb magyarázat az, hogy az 56 kDa-os sáv gyengülése a mikrotubulus frakcióban cAMP hatására azért következett be, mert az R alegység ledisszociált a mikrotubulusokról.

2. A második kísérlet során először mikrotubulusokat preparáltunk fejkivonatból, majd ezeket inkubáltuk cAMP-vel, illetve anélkül. A centrifugálással visszanyert mikrotubulus frakcióban PK-A aktivitását mértük, a felülúszóban pedig az R alegységet autofoszforiláció segítségével jelöltük. A mikrotubulus frakcióban a cAMP kezelés hatására a PK-A holoenzim



a kontroll érték 20%-ra csökkent le, a szabad C alegység és a független protein kináz aktivitás nem változott. Az autofoszforilált felülúszóban a cAMP hozzáadására az R alegységnek megfelelő sáv intenzitásának a jelentős erősödése volt megfigyelhető. Ez az intenzitás fokozódás csak az R alegység mennyiségének növekedésével magyarázható, és nem tudható be foszfatáz hatásnak, mivel a mikrotubulus frakció gyakorlatilag nem tartalmaz ilyen enzimaktivitást. A holoenzim csökkenése a mikrotubulus frakcióban és az R alegység növekedése a felülúszóban arra enged következtetni, hogy cAMP hatására nemcsak a C, de az R alegység is ledisszociált az *ecetmuslica* mikrotubulusairól.

3. A harmadik kísérletben az R alegység mennyiségét a mikrotubulus frakcióban cAMP-kötési teszt segítségével határoztuk meg. A cAMP kezelés hatására a kötött R alegység mennyisége 39 %-ra csökkent le a cAMP-vel nem kezelt mikrotubulusokhoz képest. Emlősből taxolos kezeléssel, illetve kétszeres ciklizálással preparált mikrotubulusok esetében ez az érték 69, illetve 83 %-nak adódott. A cAMP kezelés nélkül kapott értékeket a két élőlényben összevetve azt kaptuk, hogy az *ecetmuslicában* a mikrotubulusokhoz kötött R alegység mennyisége kb. egy tizede volt az emlősökben mért értéknek.

Ezekből az eredményekből két következtetés vonható le:

1. A citoplazmatikus PK-A eloszlása *ecetmuslicában* magas cAMP szint mellett megváltozik: a mikrotubulusokhoz kötött forma szolubilissá válik. Az ilyen jellegű változások a cAMP-vel kapcsolatos jelátvitel sajátosságainak a módosulását vonhatják maguk után. A *dunce* mutáció magas cAMP szintet eredményez az *ecetmuslicában*, ugyanakkor ezekben a legyekben nincs szaglási emlékenyom rögzülés. A memoria hiány molekuláris hátterének egyik lehetséges magyarázata, hogy a magas cAMP szint hatására megváltozik a PK-A eloszlása az idegsejteken belül, ami a jelátvitel zavarát eredményezi.



2. A MAP2-höz hasonló PK-A-kötő mikrotubuláris fehérje valószínűleg nem található az ecetmuslicában, mivel a fejkivonatból izolált mikrotubulusok lényegesen kevesebb kötött PK-A-t tartalmaznak, s ennek kötődési sajátosságai is mások mint az emlős mikrotubulusok esetében.

## **2. Emlős MAP2 bevitele ecetmuslicába**

Eddigi vizsgálataink azt tükrözték, hogy az ecetmuslicában nem található a MAP2-höz hasonló idegsejt specifikus mikrotubuláris fehérje, viszont az emlős MAP2 hozzá tud kötődni az ecetmuslica mikrotubulusaihoz in vitro és feltételezhetően funkcionálni is tud in vivo. Az ecetmuslica genetikai átalakíthatósága lehetőséget nyújt arra, hogy az emlős MAP2-t kifejeztethessük az idegsejtjeiben, s így azt in vivo körülmények között, az organizmus szintjén tanulmányozhassuk: **G.Ádám, A. Udvardy and P. Friedrich (1992) Mouse microtubule-associated protein 2 expression in transgenic Drosophila Neuroscience 51, 221-230.**

Az egér nagy molekulásúlyú MAP2 teljes hosszúságú cDNS-ét hősokk fehérje 70 (hsp70) promoteréhez kötve P-elem transzformáció segítségével vittük be az ecetmuslicába. Három szenz és kettő antiszenz transzgénikus vonalat izoláltunk, amelyekben a MAP2 cDNS a hsp70 promoteréhez viszonyítva kódoló, illetve fordított, nem kódoló orientációban volt. A MAP2 cDNS beépülésének helyét a nyálmirigy kromoszómán végzett in situ hibridizációval határoztuk meg. Mind a szenz, mind az antiszenz vonalakban hősokk (2h, 37°C) alkalmazása után a várt mérettartományban (6 kb) MAP2 specifikus szekvenciákat lehetett kimutatni az ecetmuslica RNS-ei között Northern-analízissel, viszont a cDNS-t befogadó törzsben (rosy<sup>506</sup>) ilyen RNS-eket nem lehetett látni. Hősokk nélkül ezek az RNS-ek gyengén ugyan, de

láthatóak voltak, annak jeleként, hogy a hsp 70 promoter 25°C-on is mutat egy kevés aktivitást. Hősokkot követően a MAP2 mRNS-ek szintje azonnal magas értéket mutatott, ami 6 órával később a hősokk előtti szintre tért vissza.

Azt, hogy ezekről a mRNS-ekről transzláció is történik metioninos jelölés segítségével igazoltuk. Harmadik stádiumos lárvákból agyakat preparáltunk, amiket 25, illetve 37 °C-on inkubáltunk [<sup>35</sup>S]metionin jelenlétében. A hősokkot követően, a hősokk fehérjék kivételével, az összes fehérje szintézise leállt. A szenz transzgenikus vonalakban az ismert hősokk fehérjék mellett egy új, a hősokk hatására indukálódó sávot is lehetett látni a MAP2-nek megfelelő látszólagos molekulásúly tartományban, ami hiányzott az antiszenz vonalaktól, valamint a rosy<sup>506</sup> törzsből. Ezek az eredmények azt jelentették, hogy csak a szenz orientációjú transzgenről képződött fehérje.

Annak igazolására, hogy ez az új, hősokra indukálódó fehérje azonos az egér MAP2-vel, mikrotubulusokat preparáltunk ecetmuslica fejkivonatból, s immunoblot analízist végeztünk MAP2 specifikus poliklonális ellenanyaggal. Csak a szenz vonalakban, és csak a hősokkot követően, egy 280 kDa fehérjét lehet kimutatni, ami alig volt látható a kiindulási fejkivonatban annak jeleként, hogy ez a fehérje jelentősen feldúsul a mikrotubulus frakcióban. Eredményeink azt jelzték, hogy a bevitt egér MAP2 cDNS nem csak kifejeződött az ecetmuslicában, de a mikrotubuluskötő képességét is megőrizte.

Az egér MAP2 expresszióját az agyon kívül lárva nyálmirigyben és a zsírtestben is megfigyeltük. A vizsgált szervekben a MAP2 stabilisnak bizonyult, 2 órával a hősokkot követően maximális szintet ért el, de 24 órával később is csupán 10-20%-os csökkenés volt látható. Hősokk nélkül aMAP2 fehérjét nem lehetett megfigyelni. Különböző fejlődési



stádiumokat megvizsgálva a MAP2-t ki tudtuk mutatni nem csak lárvában, de embrióban és felnőtt legyekben is. Továbbá, azt találtuk, hogy a MAP2 megjelenése ecetmuslicában, nem befolyásolta az életképességet vagy a fejlődés ütemét. Ennek valószínű magyarázata az, hogy a hsp70 promoterről termelődő MAP2 mennyisége nem érte el azt a kritikus szintet, ami már a sejtosztódás leállítását okozta volna.

A MAP2 mRNS lokalizációját in situ hibridizációval vizsgáltuk felnőtt ecetmuslica agyokban. A szenz, az antiszenz valamint a vad típusú Canton S legyek fejéből horizontális metszeteket készítettünk hősök nélkül, illetve 1 órával a hősöket követően. A metszeteket a MAP2 szekvenciákat tartalmazó, <sup>35</sup>S jelölt RNS próbával hibridizáltuk. Mind a szenz, mind az antiszenz vonalakban specifikus hibridizációs jeleket lehetett látni az idegsejttesteknek megfelelő agyi régiókban. Hősök nélkül, illetve a kontroll preparátumokon ilyen jeleket nem lehetett megfigyelni.

Az egér MAP2 fehérje eloszlását is megvizsgáltuk felnőtt legyek agyából készült metszeten immunohisztokémiai módszerekkel, s a következő megfigyeléseket tettük:

1. Az antiszenz vonalakban hősokkal vagy a nélkül specifikus festődés nem volt megfigyelhető.
2. A szenz vonalakban specifikus reakció volt látható, nem csak az idegsejttestek, hanem a nyúlványok is festődtek, bizonyos esetekben az idegsejttestek azonosíthatók voltak (pl. a T1 sejtek a látólebenyben, a lamina és a medulla között a MAP2 2A transzformáns vonal esetében).
3. A neuronok festődése független volt a hősök alkalmazásától.
4. Mind a három szenz transzgenikus vonalban a festődési mintázat eltérő volt, más-más idegsejttestekben történt a MAP2 expressziója.

5. Az azonosított idegsejtekben (pl. T1 sejtek a MAP2 2A vonalban) a MAP2 nem okozott morfológiai elváltozásokat fénymikroszkópos szinten.

Ezekből az eredményekből arra lehet következtetni, hogy az egér MAP2 az ecetmuslica idegsejtjeiben is hasonló eloszlást mutat mint az emlős idegsejtekben, a sejttesten kívül a nyúlványokban is megtalálható. A metszeteken a dendritszerű nyúlványok jól megfigyelhetők voltak, ami arra utal, hogy a MAP2 fehérje az ecetmuslica idegsejtekben is bejutott a dendritekbe. Az axonszerű nyúlványok nem voltak azonosíthatóak, így annak eldöntése, hogy a MAP2 ott is megtalálható-e nem volt lehetséges. Mégis a MAP2 2A vonalban, a T1 neuronok esetében, a sejttest és a dendritek jól festődtek, míg a lamina felé futó axonokat nem lehetett látni, ami azt jelenti, hogy ezekbe az axonokba az egér MAP2 nem jutott be.

Az a tény, hogy a három különböző vonalban más-más idegsejtek váltak láthatóvá, valamint ezen festődési mintázatok függetlensége a hősokktól, ellentétben áll az immunoblottal kapott adatokkal, ahol csak a hősokk után lehetett detektálni a MAP2-t. Erre az ellentmondásra az ún. "enhanszer csapda" (enhancer trap) jelenség adja a magyarázatot. Mind a három vonalban a P-elem beépülése a genom különböző helyeire történt. A hsp 70 promoter hősokk alkalmazása nélkül egy gyenge promóter, így az integrálódás helyének közelében levő sejt-specifikus enhanszerek hatásuk alá tudják vonni, s így a MAP2 expressziója is ezen enhanszerek aktivitásától függ. A három vonalban valószínűleg más-más idegsejt-specifikus enhanszer irányítja a MAP2 kifejeződését, ezekben az idegsejtekben a MAP2 felhalmozódik, s így immunofestéssel láthatóvá válik. Mivel ezek az enhanszerek a hősokktól függetlenül működnek, hősokk nélkül is ugyanazt a festődési mintázatot lehet látni. Hősokk hatására minden idegsejtben képződik ugyan MAP2, de ezek koncentrációja alatta van az immunofestéssel detektálható küszöbnek, s így a hősokk után nem látható változás. Az

immunoblotot viszont hozzávetőleg 20 agyból származó kivonatból készítettük, ami már tartalmaz elegendő mennyiségű MAP2-t ahhoz, hogy hősök után megfigyelhető legyen. Hősök nélkül a sejtspecifikus enhanszerek miatt, a MAP2 csak az idegsejtek egy töredékében fejeződik ki, ami immunoblottal nem, csak immunohisztokémiailag mutatható ki.

Ez a megfigyelés azt is jelenti, hogy a MAP2-t fel lehet használni mint jelző fehérjét idegsejtspecifikus enhanszerek detektálására ecetmuslicában. Erre acélra a  $\beta$ -galaktozidáz használják ugyan, de azzal az idegsejtek azonosítása nem minden esetben lehetséges, mivel a  $\beta$ -galaktozidáz a nyúlványokba csak korlátozott mértékig jut be. A MAP2 viszont azokban az idegsejtekben amelyekben kifejeződik az összes nyúlványt megfesti, az idegsejtek kapcsolatai láthatóvá válnak. A MAP2-vel, mint riporter fehérjével lehetőség nyílik arra, hogy az idegsejtek különböző típusaira, illetve ideghálózatokra specifikus géneket azonosítsunk.

### **3. A MAP2c expressziója ecetmuslica idegsejtekben**

A MAP2-nek riporter fehérjeként történő alkalmazása a GAL4/UAS rendszer kidolgozása után vált lehetségessé. Ez egy kettős rendszer a génexpresszió szabályozására (Brand és Dormand 1995), amely két transzgénikus ecetmuslica vonallal dolgozik. Az egyik a GAL4 enhanszer csapda vonal, ahol a GAL4 (egy élesztő specifikus transzkripciós faktor, amelynek homológ változata ecetmuslicában nem található meg) cDNS-e egy gyenge promoterhez, a P-elem-transzpozáz promoteréhez van kapcsolva, s így számos olyan vonal állítható elő amelyben a GAL4 expressziója szövet-, illetve sejtspecifikus. A rendszer másik tagjában, az UAS transzgénikus vonalban egy mesterséges promoter található, amihez bármilyen gént hozzá lehet kapcsolni. Az UAS (Upstream Activator Sequences) promoter GAL4 kötőhelyeket tartalmaz, s így GAL4-el aktiválható. Ha a két vonalat keresztezik, az UAS

promoterhez kapcsolt gén a GAL4 enhanszer csapda vonal által meghatározott sejtekben fejeződik ki. Ilyen módon bármilyen fehérjét ki lehet fejeztetni azokban a sejtekben amelyekre már előállítottak GAL4-es vonalat.

A GAL4/UAS rendszert arra is felhasználtuk, hogy a MAP2c idegsejteken belüli eloszlását vizsgáljuk. A MAP2 egyik kis molekulású, embrionális isoformája a MAP2c. Ennek idegsejten belüli lokalizációját nehéz tanulmányozni, mivel immunológiailag nem különböztethető meg a nagy molekulású izoformától. Emlős sejtekben a MAP2c bizonyos esetekben nem csak a dendritekben, hanem az axonokban is kimutatható volt (Meichsner et al. 1993). Mivel az ecetmuslicában MAP2 nem található, a MAP2c eloszlását endogén háttér zavaró hatása nélkül lehet tanulmányozni.

A GAL4/UAS rendszer két lehetőséget kínált számunkra:

1. Használatával a MAP2c és a tau fehérjéket ugyanazokban a neuronokban tudtuk kifejeztetni, így az idegsejteken belüli eloszlásukat össze lehetett hasonlítani.

2. A MAP2c-t mint riporter fehérjét tudtuk használni az idegsejtek egyes típusaira, illetve ideghálózatokra specifikus gének detektálására különböző GAL4 enhanszer csapda vonalakban. Ezzel kapcsolatos eredményeink közlés alatt állnak: **G. Adam**, *K. Kaiser and A. Matus (1997) Novel connections between optic lobes and mushroom bodies in Drosophila melanogaster revealed by transgenic expression of microtubule associated proteins Cell and Tissue Research* (kézirat benyújtva).

A patkány MAP2c elhelyezkedését az ecetmuslica idegsejtjein belül a humán tau fehérjék egyik izoformájával vetettük össze. Mindkét fehérje cDNS-ét a UAS promoterhez kapcsoltuk, majd transzgénikus vonalakat hoztunk létre P-elem transzformációval. A GAL4

vonallakkal történő keresztezés után az expresszálódott fehérjéket immunofestéssel tettük láthatóvá amiket konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. A MAP2c és tau fehérje irányított kifejeztetésére olyan, már ismert GAL4 vonalat választottunk, amely specifikus volt a gombatestre. A gombatest ugyanis egyféle, ún. Kenyon sejtekből épül fel, amelyek rendezett szerkezetet alkotnak, s így az idegsejtek dendritjei és axonjai jól elkülöníthetők: a kehely részben vannak az idegsejttestek és a dendritek, míg a nyél és a lebenyek csak axonokból állnak. Mindkét fehérjét a gombatestben kifejeztetve eloszlásukban nem tapasztaltunk lényeges eltérést: mind a MAP2c, mind a tau nem csak a gombatest kehely részében, de a lebenyekben és a nyélben is megfigyelhető volt. Ez azt jelzi, hogy a MAP2c az axonokba is bevándorolt.

Élettani viszonyok mellett a két fehérje egy időben van jelen az idegsejtekben, így feltételezhető, hogy a tau fehérjék az axonális mikrotubulusokhoz történő nagyobb affinitásuk miatt kiszorítják a MAP2-t az axonális mikrotubulus-kötőhelyekről. Ennek eldöntésére egy kettős UAS/MAP2c-tau vonalat hoztunk létre, s így MAP2c és tau fehérjéket egyszerre fejeztettük ki a gombatestben, majd kettős immunofestést végeztünk. Az eloszlásuk megegyezett azzal a korábbi képpel amit a külön-külön történő az expressziójuk során kaptunk, vagyis a két fehérje nem befolyásolta egymás eloszlását az ecetmuslica idegsejtjeiben. Ezekből a eredményeinkből arra következtettünk, hogy az emlős idegsejtekhez hasonlóan a MAP2c az ecetmuslicában is transzportálódik az axonokba.

Mivel a MAP2c az axonokba is bejutott, így előnyösen használható idegsejthálózatokra specifikus gének keresésére. A UAS-MAP2c vonal segítségével számos GAL4 enhanszer csapda vonalat vizsgáltunk át, olyanokat keresve amelyekben a GAL4 expressziója az gombatestre korlátozódott. A gombatest a különböző érzékszervektől jövő ingerületek





integráló helye a rovar agyban. Az ecetmuslica esetében jól megfigyelhető összeköttetésben van a szagló lebennyel, de a többi érzékszervvel kapcsolatos viszonya még nem tisztázott. A szem, illetve az ehhez szorosan kapcsolódó látólebeny az ecetmuslica agyának jelentős részét teszi ki, viszont a gombatesttel való kapcsolata nem ismeretes.

A MAP2c-t mint riporter gént használva sikerült találni olyan GAL4 enhanszer csapda vonalat (c302) amelyben immunohisztokémiával két pálya rendszert lehetett detektálni a látólebenytől a gombatest felé. Az egyik csak megközelítette a gombatestet, de nem lépett kapcsolatba vele, míg a másik a gombatest kehely részében végződött. Az egyedfejlődés során ez a pálya a lárvában még nem volt látható, csak a szem kialakulásával párhuzamosan jelent meg. A báb képződést követő 48 óra körül volt megfigyelhető a pálya kialakulása, de a végleges formáját a felnőtt legyekben érte el. A bábokból készített preparátumokon az is jól látható volt, hogy a pályát létrehozó idegsejtek dendritjei benyomultak a látólebenybe, ahol valószínűleg az ott levő idegsejtekkel létesítettek kapcsolatot.

Megfigyeléseink arra engednek következtetni, hogy az ecetmuslicában a gombatest a látólebennyel is szoros kapcsolatban áll, részt vesz a látási információ feldolgozásában. Mivel a gombatestnek a szaglással kapcsolatos emléknym rögzítésben fontos szerepe van, adataink alapján feltételezhető, hogy a gombatest a látási memória kialakításában is részt vesz. A GAL4 vonalból történő plazmidmentéssel lehetőség nyílik az arra, hogy ezt, a látólebeny-gombatest pályára specifikus gént azonosítsuk, jellemezzük. Eredményeink azt is mutatják, hogy a MAP2c eredményesen használható nemcsak idegsejtekre illetve ideghálózatokra specifikus gének megtalálására, de segítségével új idegi kapcsolatok is megfigyelhetők.

## Az aktin szerepe a PSD szerveződésében

A PSD az előagyi szinapszisok nagy részében előforduló jellegzetes struktúra a posztzinaptikus membrán alatt. Számos adat szól amellett, hogy a PSD kulcsfontosságú a szinaptikus kapcsolatok helyének és méretének a kialakításában. Ennek a nyilvánvalóan fontos szerepnek ellenére a PSD molekuláris szerkezete még nem teljesen feltárt. Az elektronmikroszkópos vizsgálatok feltárták, hogy a PSD két fő komponensből áll: a posztzinaptikus membránba ágyazott partikulumokból és a citoplazmába nyúló filamentumokból (Landis et al. 1987). A partikulumok hozzávetőleg 23 nm átmérőjű, gömbszerű alegységekből állnak (Matus et al. 1975). Ezek alapját egy finom filamentum hálózat, a posztzinaptikus junkcionális rácsozat (postsynaptic junctional lattice, PJJ) alkotja, amely közel egyforma méretű, poligonális alakzatot hoz létre, s amely csak nátrium deoxikolat extrakció után válik láthatóvá.

A PSD továbbá igen szoros kapcsolatban van a posztzinaptikus membránba ágyazott neurotranszmitter receptorokkal. A membrán alatti sejtváz fehérjék és a neurotranszmitter receptorok kapcsolata legjobban a neuromuszkuláris junkció estében ismert. Itt a nikotinos acetilkolin (ACh) receptorok nagyfokú koncentrációja tapasztalható a beidegzés hatására, s ebben alapvető szerepe van számos olyan posztzinaptikus fehérjének, mint a 43 kDa fehérje, a citoplazmatikus aktin, a  $\beta$ -spektrin (Froehner et al. 1990, Phillips et al. 1991). Az aktin illetve a spektrin eltávolítása az izommembránról szelektív extrakció segítségével, az ACh receptor kötegek szétesését eredményezi (Froehner 1993). Az izolált PSD szintén tartalmaz spektrint és aktint (Carlin et al. 1983, Kelly és Cotman 1978), s így valószínűnek tűnik, hogy

ezek a sejtvez fehérjék a PSD szerkezetének kialakításában is részt vesznek, szerepük van a PSD és a neurotranszmitter receptorok közötti kapcsolat létrejöttében is. Megvizsgáltuk, hogy a sejtvez fehérjék közül az aktinnak milyen szerepe van a PSD szerkezetének kialakításában, illetve hogyan befolyásolja a PSD és a neurotranszmitter receptorok közötti kölcsönhatást. Ezzel kapcsolatos eredményeink a következő közleményben jelentek meg: **Geza Adam**, *Andrew Matus (1996) Role of actin in the organisation of brain postsynaptic densities Molecular Brain Research 43, 246-250.*

Eljárást dolgoztunk ki az aktin és a spektrin szelektív eltávolítására izolált PSD-ről. A sűrűség grádiens centrifugálással izolált PSD frakciót 20mM lítium dijód-szaliciláttal (LIS) kezeltük 0°C-on, majd a PSD-t 35%-os szaharóz párnán centrifugáltuk keresztül. A szolubilis frakcióban három fehérje volt megfigyelhető. Immunoblottal megállapítottuk, hogy a 45 kDa fehérje azonos az aktinnal. A LIS extrakció a PSD-ről majdnem teljes mértékben eltávolította az aktint, csak nyomnyi mennyiség maradt rajta. A 240/230 kDa körüli sáv azonosnak bizonyult a PSD-ben már korábban kimutatott  $\alpha$  és  $\beta$  spektrinnel (Zagon et al. 1986). A spektrinnek kb. 50%-a továbbra is kötve maradt a PSD-n. A 120 kDa-os sávot mikroszekvenálásnak vetettük alá, s ez a hexokinázzal bizonyult azonosnak. Ez a fehérje erős keresztreakciót mutatott anti-hexokináz ellenanyaggal is.

A PSD-hez szorosan kötődnek a különböző izgalmi és gátló neurotranszmitter receptorok. Ezek közül megvizsgáltuk az AMPA típusú glutamát receptorok B alegységének, az NMDA típusú glutamát receptorok R1 alegységének, illetve a GABA<sub>A</sub> receptor  $\alpha$  alegységének a kapcsolatát a PSD-hez LIS extrakció után. Immunoblottal azt kaptuk, hogy ezek a receptorok igen szorosan kötődtek a PSD-hez, LIS kezeléssel nem lehetett őket szolubilizálni. Ehhez hasonlóan a LIS extrakció után a PSD fő fehérjéje, a CaMK II  $\alpha$  is asszociálva maradt a PSD-



hez. Ezekből a megfigyelésekből arra következtettünk, hogy a neurotranszmitter receptorok, illetve a CaMK II  $\alpha$  szorosan kapcsolódnak a PSD-hez, s az aktin eltávolítása nem befolyásolja a köztük fennálló kölcsönhatást.

Ezt követően azt néztük meg, hogy az aktin eltávolítása milyen morfológiai változásokat hoz létre az izolált PSD-ben. Az izolált PSD ultrastrukturális szerkeztére jellemző a C-alakú forma, melynek méretei egybeesnek az intakt agyszövetben leírt PSD dimenzióival.

A PSD frakció ultrastrukturális szerkezetét elektronmikroszkóppal megvizsgálva azt találtuk, hogy az aktin LIS kezeléssel történő eltávolítását követően a PSD kompakt szerkezete fellazult, kisebb darabokra hullott szét, de a PJI továbbra is felismerhető maradt.

Megfigyeléseinkből arra lehet következtetni, hogy mind az izgalmi, mind a gátló neurotranszmitter receptorok fő típusai szorosan kötődnek a PJI-hez és ellenállnak olyan, LIS-os extrakciónak, amely az aktint eltávolítja a PSD-ről. Az aktin extrakciója a PSD feldarabolódását eredményezi, de annak alapváza, a PJI továbbra is intakt marad. Tehát a PSD-ben található aktin nem vesz részt a PJI felépítésében, viszont aktív szerepe van abban, hogy a PJI-t egy nagyobb funkcionális egységgé, PSD-vé szervezze.

A fenti magyarázat hasonló ahhoz amit korábban az izomsejtmembránokon végzett vizsgálatokból vontak le (Bloch 1986). Az aktin és a spektrin extrakciója után az izolált Ach receptor kötegek kisebb ún. mikroagregátumokká estek szét. Xenopus izomsejtmembránok esetében azt találták, hogy az Ach receptor kötegek két szinten szerveződnek (Luther et al. 1994). Az Ach kötegek citoplazmatikus felszínének elektronmikroszkópos vizsgálatával megfigyelték ugyanis, hogy az Ach receptorok kis aggregátumokat alkotnak, amelyeket 7 nm-es, elektrondenz filamentumokból felépülő hálózat köt össze. Ezek a filamentumok valószínűleg polimerizált aktint tartalmaznak. Amikor ezt a mikrofilamentum hálózatot

eltávolították az izomsejtmembráról a posztzinaptikus Ach receptor kötegek szétetek, de a mikroagregátumok épek maradtak. Ebből arra következtettek, hogy a mikrofilamentum hálózatnak kulcsszerepe van abban, hogy az Ach receptor mikroagregátumok nagyobb kötegekké szerveződjenek. Analógiát lehet megfigyelni a között, ahogyan az aktin filamentumok az Ach receptor mikroagregátumokat nagyobb kötegekké szervezik a neuromuszkuláris junkcióban, és a között, ahogyan az aktin részt vesz a PDL-nek PSD-vé történő szervezésében a központi idegrendszer szinapszisaiban. Mind a két esetben úgy tűnik, hogy a kortikális aktin sejtvázaiban részt vesz, hogy a kisebb receptor kötegeket egy nagyobb egységekké kapcsolja össze, amelyek már egy funkcionális posztzinaptikus helyet határoznak meg.

### **Irodalomjegyzék**

Bloch, R.J. (1986) Actin at receptor-rich domains of isolated acetylcholine receptor clusters. *J. Cell Bio.* 102, 1447-1458.

Brand, A.H. and Dormand, E.-L. (1995) The GAL4 system as a tool for unravelling the mysteries of *Drosophila* nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5, 572-573.

Carlin, R., Bartelt, D.C. and Siekevitz, P. (1983) Identification of fodrin as a major calmodulin-binding protein in postsynaptic density preparations. *J. Cell Biol.* 96, 443-448.

Dévay, P., Pintér, M., Yalcin, A.S. and Friedrich, P. (1986) Altered autophosphorylation of adenosine 3',5'-phosphate-dependent protein kinase in the dunce memory mutant of *Drosophila melanogaster*. *Neuroscience* 18, 193-203.

Edson, K., Weisshaar, B. and Matus, A. (1993) Actin depolymerisation induces process formation on MAP2-transfected non-neuronal cells. *Development* 117, 689-700.

Froehner, S.C., Luetje, C.W., Scotland, P.B. and Patrick, J. (1990) The postsynaptic 43K protein clusters acetylcholine receptors in *Xenopus* oocytes. *Neuron* 5, 403-410.

Froehner, S.C., Regulation of ion channel distribution at synapses. (1993) *Ann. Rev. Neurosci.* 16, 347-368.

Gray, E.G. and Guillery, R.W. (1966) Synaptic morphology in the normal and degenerating nervous system. *Int. Rev. Cytol.* 19, 111-182.

Goedert, M., Crowther, R.A. and Garner, C.C. (1991) Molecular characterization of microtubule associated proteins tau and MAP2. *Trends Neurosci.* 14, 193-199.

Goedert, M. (1993) Tau protein and the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* 16, 460-465.

Goldstein, L.S.B., Laymon, R.A. and McIntosh J.R. (1986) A microtubule-associated protein in *Drosophila melanogaster*. Identification, characterization, and isolation of coding sequences. *J. Cell Biol.* 102, 2076-2087.

Jones, D.G., Dittmer, M.M. and Reading, L.C. (1974) Synaptogenesis in guinea pig cerebral cortex: a glutaraldehyde-PTA study. *Brain Res.* 70, 245-259.

Kaech, S., Ludin, B. and Matus, A. (1996) Cytoskeletal plasticity in cells expressing neuronal microtubule-associated proteins. *Neuron* 17, 1189-1199.

Kelly, P.T. and Cotman, C.W. (1978) Synaptic proteins. Characterization of tubulin and actin and identification of a distinct postsynaptic density protein. *J. Cell Biol.* 79, 173-183.

Kennedy, M.B., Bennet, M.K. and Erondy, N.E. (1983) Biochemical and immunohistochemical evidence that the "major postsynaptic density protein" is a subunit of a calmodulin-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 7357-7361.

Landis, D.M.D., Weinstein, L.A. and Reese, T.S. (1987) Substructure in the postsynaptic density of purkinje-cell dendritic spines revealed by rapid freezing and etching. *Synapse* 1, 552-558.

Leterrier, J.-F., Liem, R.K.H. and Shelanski, M.L. (1981) Preferential phosphorylation of the 150,000 molecular weight component of neurofilaments by a cyclic AMP-dependent, microtubule-associated protein kinase. *J. Cell Biol.* 90, 755-760.

Luther, P.W., Samuelson, S.J., Pumplin, D.W. and Block, R.J. (1994) Clustered acetylcholine receptors have two levels of organisation in *Xenopus* muscle cells. *Cell Motil. Cytoskeleton* 28, 179-193.

Matus, A., Walters, B.B. and Jones, D.H. (1975) Junctional ultrastructure in isolated synaptic membranes. *J. Neurocytol.* 4, 357-367.

Matus, A., Ackermann, M., Pehling, G., Byers, H.R. and Fujiwara, K. (1982) High actin concentrations in brain dendritic spines and postsynaptic densities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 7590-7594.

Matus, A. (1988) Microtubule-associated proteins: their potential role in determining neuronal morphology. *Ann. Rev. Neurosci.* 11, 29-44.

Meichsner, M., Doll, T., Reddy, D., Weisshaar, B., and Matus, A. (1993) The low molecular weight form of microtubule-associated protein 2 is transported into both axons and dendrites. *Neurosci.* 54, 873-880.

Phillips, W.D., Kopta, C., Blount, P., Gardner, P.D., Steinbach, J.H. and Merlie, J.P. (1991) ACh receptor-rich domains organized in fibroblasts by recombinant 43K protein. *Science* 251, 568-570.



Theurkauf, W.E. and Vallee, R.B. (1982) Molecular characterization of the cyclic AMP-dependent protein kinase bound to microtubule-associated protein 2. *J. Biol. Chem.* 257, 3284-3290.

Walsh, M.J. and Kuruc, N. (1992) The postsynaptic density: Constituent and associated proteins characterized by electrophoresis, immunoblotting and peptide sequencing. *J. Neurochem.* 59, 667-678.

Zagon, I.S., Higbee, R., Riederer, B.M. and Goodman, S.R. (1986) Spectrin subtypes in mammalian brain: an immunoelectron microscopic study. *J. Neurosci.* 6, 2977-2986.