

## Új mikrotubulus funkció a genetikai boncolás tükrében

### Témaválasztás és a genetikai boncolás módszere (szemelvény műhelyünk munkáiból)

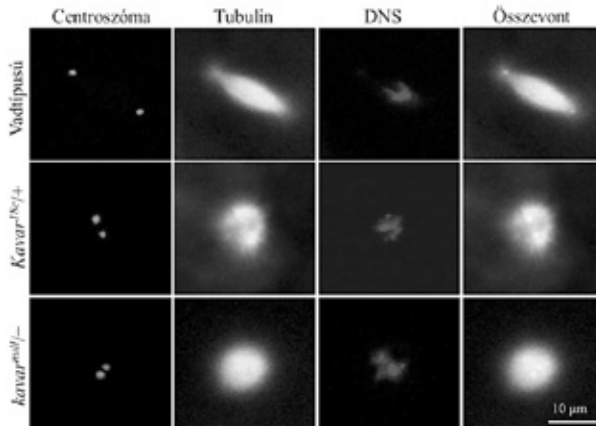
A „miért kezdődik el az embriógenézis egy megtermékenyült petesejtben” kérdés sokak érdeklődésére számíthat. A feltételek minden bizonnyal a petesejt érése során teremtődnek meg, hisz’ a zigóta fejlődése kezdetén nem hagyatkozik saját génjeire, azok egy ideig be sem kapcsolnak. A START jelet azonosítandó feltételeztük, hogy az olyan gén (gének) terméke, amely az anyában fejeződik ki, és termékének a megtermékenyülés után, az embriógenézis elkezdődésében van szerepe. Kísérleti objektumként a genetikusok egyik kedves modell-faját, a muslicát (*Drosophila melanogaster*) választottuk, valamint az ún. genetikai boncolás módszerét: olyan domináns nőstény-steril (*Fs*) mutációkat indukáltunk és vizsgáltunk, amelyek valamelyikét hordozó mutáns nőstényeknek ugyan képződnek petéik, amelyek bár meg is termékenyülnek, ám nem kezdődik el bennük az embriógenézis. Az *Fs* mutáns allélok lényegében olyan eszközök, amelyekből kiindulva megismerhetjük az ép (+) gén molekuláris funkcióját.

### *Kavar*<sup>18c</sup>, a domináns nőstény-steril mutációk egyike

A műhelyünkben indukált *Fs* mutációk egyike *Kavar*<sup>18c</sup> (Erdélyi and Szabad 1989). Amíg a vad típusú nőstények petéiben az első osztódás során kialakul a jellegzetes magorsó két centroszómával és a mikrotubulusokkal (MT), addig a *Kavar*<sup>18c</sup>/+ nőstények petéiben alig különülnek el a leánycentroszómák, a MT-ok pedig csupán egy kicsiny bojtocskát képeznek (1. ábra). A szokatlan jelenség alapján arra következtettünk, hogy az ép gén termékének a leánycentroszómák elkülönülésében lehet szerepe, egy eladdig ismeretlen folyamatban.

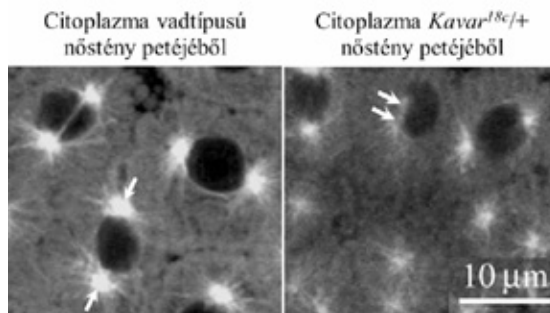
A *Kavar*<sup>18c</sup> allélból az ép génhez, annak szerepének megismeréséhez a következő lépések vezettek. Először *Kavar*<sup>18c</sup>/+ nőstények petéiből kevéske citoplazmát szívtunk ki, és injektáltuk olyan nőstények petéibe, amelyekben a tubulinmolekulák egyik típusa zölden fluoreszkált (2. ábra). A citoplazma

injekció nyomán a leánycentroszómák csak részlegesen váltak szét, ami azt jelzi, hogy a *Kavar<sup>18c</sup>/+* nőstények petéinek citoplazmája mérgező, ép embriókba injektálva is kifejti hatását. Ebből az következik, hogy a *Kavar<sup>18c</sup>* mutáció ún. funkciónyeréses típusú: kódolja a géntermék-képződést.



1. ábra. A centroszómák, a MT-okból álló magorsó, valamint a DNS helyzete a megtermékenyülést követő első osztódás során vadtípusú, *Kavar<sup>18c</sup>/+*, valamint *kavar<sup>null</sup>/-* nőstények petéiben. (Itt – egy olyan deficiencia jele, amely eltávolítja az ép gént.)

A centroszómákat vörösen, a MT-okat alkotó tubulin molekulákat zölden fluoreszkáló ellenanyaggal, a DNS-t kéken fluoreszkáló festékkel jelöltük.



2. ábra. A *Kavar<sup>18c</sup>/+* nőstények citoplazmája mérgező: ép embriókba injektálva megakadályozza a leánycentroszómák elkülönülését (↙ és ↘). A beinjektált petékben a tubulin-molekulák egyik típusa zölden fluoreszkált, kivilágította a MT-okat és a centroszómákat.

A következő kérdés az volt, hogy vajon a *Kavar<sup>18c</sup>*-kódolt toxikus, és az ép gén terméke ugyanabban vagy más-más folyamatban szerepel. A kérdést megválaszolando olyan *Kavar<sup>18c</sup>/+/+* nőstényeket készítettünk, amelyek a *Kavar<sup>18c</sup>*

mutáns allél mellett két ép gént hordoztak. Minthogy a *Kavar*<sup>18c</sup>/+/+ nőtények petéiben az embriogenezis tovább haladt a bojtocska-stádiumnál, sőt némelyikből lárva kelt ki, arra következtettünk, hogy a *Kavar*<sup>18c</sup> mutáció ún. domináns negatív típusú: az ép és a *Kavar*<sup>18c</sup> mutáns allél által kódolt géntermékek ugyanabban a folyamatban játszanak szerepet. Úgy, hogy a mutáns géntermék akadályozza az ép funkcióját. Megismerve *Kavar*<sup>18c</sup> domináns negatív természetét kezdtük el az ép gén molekuláris szintű vizsgálatát.

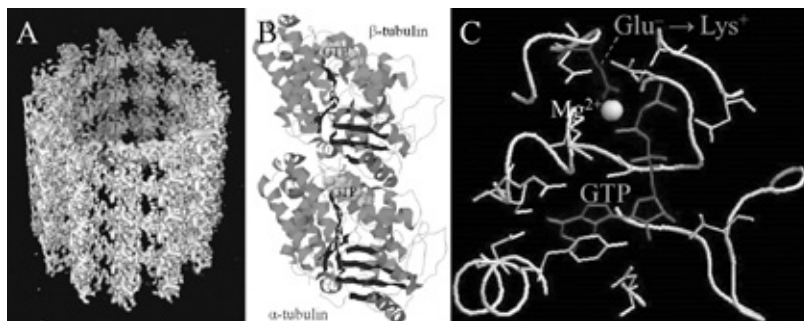
## A *kavar*<sup>null</sup> mutáció és haszna

A funkciónyeréses domináns mutációk (mint pl. *Kavar*<sup>18c</sup>) egy második mutációval funkcióvesztéses, recesszív alakíthatók (Erdélyi and Szabad 1989; Venkei and Szabad 2005). Mi is ezt tettük: mutagenizáltuk *Kavar*<sup>18c</sup>-t, miáltal *kavar*<sup>null</sup> allélokot készítettünk. (*Kavar*<sup>18c</sup>-t hordozó hímekeket sugaraztunk be röntgensugárzással, és kereszteztük +/+ nőtényekkel). Az utód *Kavar*<sup>18c</sup>/+ nőtények sterilek, kivéve azokat, amelyek *kavar*<sup>null</sup>/+-ak. Tőlük utódok származnak, akiből a *kavar*<sup>null</sup> allél izolálható; Venkei and Szabad 2005.) A *kavar*<sup>null</sup> mutációknak három haszna van. (1) Vele megállapítható, hogy mi történik az ép gén funkciójának hiányában. Amint azt az 1. ábra mutatja, az ép gén hiányában nem különülnek el a centroszómák, ahogy a *Kavar*<sup>18c</sup>/+ nőtények embrióiban sem. Ez a tény megerősítette korábbi következtetésünket: az ép gén termékének a leánycentroszómák elkülönülésében van szerepe. (2) Itt be nem mutatott kísérletek alapján meg lehet határozni az ép gén helyét, aminek ismeretében a *kavar*<sup>null</sup> allélt kombinálni lehet a közeli gének mutáns alléljaival. Mi is ezt tettük, és megállapítottuk, hogy *Kavar*<sup>18c</sup> és a *kavar*<sup>null</sup> allélok az  $\alpha$ Tub67C gént azonosítják (Venkei and Szabad 2005). Az  $\alpha$ Tub67C gén terméke az  $\alpha$ 4-tubulin, az  $\alpha$ -tubulin család egyike, az ún. anyai eredetű tagja (Matthews és mtsai. 1993). (3) A *kavar*<sup>null</sup> allélból kiindulva megklónoztuk az  $\alpha$ Tub67C gént, és megismertük molekuláris funkcióját.

## Tubulinok és MT-ok

Az eukarióta sejtekben az  $\alpha$ - és  $\beta$ -tubulinok azok a fehérjemolekula-féleségek, amelyek polimerizációjával 24 nm átmérőjű csövecskék épülnek fel, a MT-ok (3 a. ábra). A MT-ok nemcsak a sejtvázs alkotói, hanem egyben olyan pályák is, amelyeken motormolekulák haladnak, miközben terhet szállítanak. A MT-ok téglácskái olyan tubulin dimer molekulák, amelyekben egy  $\alpha$ -, valamint egy

$\beta$ -tubulin kapcsolódik össze (3 b. ábra). A tubulinmolekulákba egy-egy GTP is illeszkedik. A GTP nemcsak szerkezeti elem, hanem ahhoz is szükséges, hogy dimerek képződjenek, kapcsolódjanak. A GTP-t aminosav-oldalláncok tartják a helyén, közvetlenül vagy egy  $Mg^{2+}$  ionon át (3 c. ábra). A MT-ok csodálatos tulajdonsága, hogy gyorsan képesek össze- és szétszerelődni, átrendeződni a sejt pillanatnyi szükséglete szerint. Olykor sejtvázként és pályaként funkcionálnak, hogy aztán a sejtosztódás során a magorsó épüljön fel belőlük.



3. ábra. MT és építőelemei. Az ábra (A) része egy MT szakasz molekula-modelljét mutatja. Egy  $\alpha$ - és egy  $\beta$ -tubulin kapcsolódásával képződnek azok a tubulin dimerek, amelyekből a MT-ok felépülnek. (B és C) Mindkét tubulinféleség szerkezeti eleme a GTP, amely aminosav-oldalláncokkal, valamint egy  $Mg^{2+}$  ionon keresztül egy glutaminsavval kapcsolódik. A *Kavar*<sup>18c</sup>-kódolt E82K- $\alpha$ 4-tubulin molekulákban a 82., negatív töltésű glutaminsav (egybetűs kódja E) helyén pozitív töltésű lizin (K) van. Az E<sup>82</sup>→K aminosavcsere a *Kavar*<sup>18c</sup>-vel kapcsolatos minden rendellenesség forrása.

### $\alpha$ 4-tubulin, az anyai eredetű $\alpha$ -tubulinféleség

A tubulinok az evolúció során bevált, aminosav-sorrendjükben erősen megőrzött molekulák (4. ábra). Az  $\alpha$ 4-tubulin egy, a muslica korai embriogenezise során használt, az ún. anyai eredetű  $\alpha$ -tubulinféleség (Matthews és mtsai. 1993; Máthé és mtsai. 1998; Venkei and Szabad 2005; Venkei és mtsai. 2006). Az embriogenezis azon szakaszában játszik szerepet, amelyben a sejtmagvak nyolcpercenként osztódnak, mélyen a citoplazmában vannak, távol a támpontként szolgáló sejthártyától (5. ábra). Az  $\alpha$ 4-tubulin a pete citoplazma  $\alpha$ -tubulin-készletének 20%-át alkotja, a további 80% az  $\alpha$ 1-, illetve a vele csaknem azonos aminosav-sorrendű  $\alpha$ 3-tubulin, az a két ún. konstitutív típusú  $\alpha$ -tubulinféleség, melyek mindig és minden sejtben jelen vannak. Azt, hogy az  $\alpha$ 4-tubulinra szükség van, az bizonyítja a legjobban, hogy hiányában nem

kezdődik el az embriógenesis, és csak egy kicsiny MT-bojt képződik (1. ábra). Vajon mi az  $\alpha 4$ -tubulin-molekulák szerepe az embriógenesis korai szakaszában? A kérdést megválaszolandó olyan anti- $\alpha 4$ -tubulin ellenanyagot készítetünk, amellyel az  $\alpha 4$ -tubulin-molekulák láthatóvá tehetők, amely ellenanyag nem ismeri fel a többi tubulinféleséget (Venkei és mtsai. 2006).

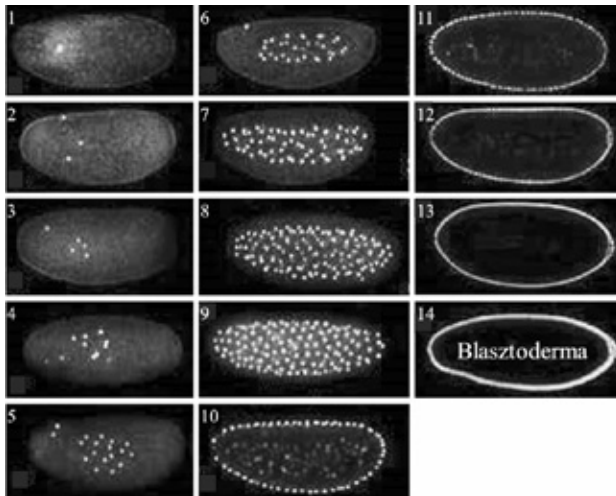


4. ábra. A szarvasmarha és a musca  $\alpha$ -tubulinjai csak a szaggatott vonallal körbefuttatott és halványan kitöltött helyeken különböznek.

A musca  $\alpha 4$ -tubulinja a szürkén jelölt helyeken tér el az  $\alpha 1$ -tubulintól.

(Az 52. helyen beékelődött, 11 aminosavból álló blokk szerepe máig ismeretlen.)

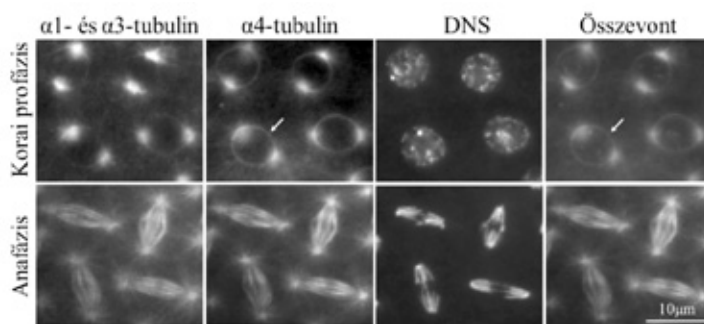
A *Kavari<sup>18c</sup>* mutáció nyomán a 82. aminosav (glutaminsav; E) helyén lizin (K) van.



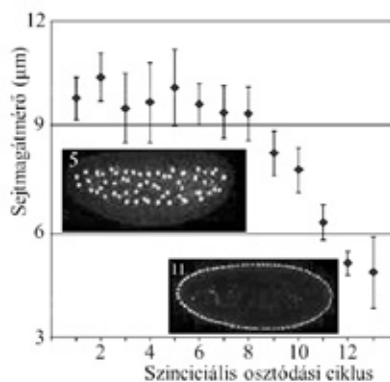
5. ábra. A musca-embriógenesis első kilenc stádiumában a fehér pöttyként feltűnő sejtmagvak nagyok, a citoplazma mélyén vannak, távol a sejtártyától.

A citoplazma egy szincícium: egyetlen sejt sok-sok sejtmaggal.

Az anti- $\alpha 4$ -tubulin ellenanyaggal folytatott vizsgálatok világosan megmutatják, hogy az  $\alpha 4$ -tubulin, ugyanúgy, mint az  $\alpha 1$ -, illetve az  $\alpha 3$ -tubulinok, beépül a MT-okba (6. *ábra*). Az is nyilvánvaló, hogy az  $\alpha 4$ -tubulin előszeretettel épül be az ún. interpoláris MT-okba, amelyek az egyik centroszómától a másikig nyúlnak, és követik a sejtmaghártyát (Venkei és mtsai. 2006). Ez a megfigyelés azt jelzi, hogy az  $\alpha 4$ -tubulin-molekulák teszik lehetővé, hogy az interpoláris MT-ok kapcsolatban legyenek a sejtmaghártyával. Nem véletlen, hogy az embriógenézis kezdeti szakaszában a sejtmagok nagyok, görbületi sugaruk kicsi, és az egyébként meglehetősen merev MT-ok anélkül követhetik a sejtmaghártya görbületét, hogy eltörnének (5. és 7. *ábra*). Ám amint a magok a sejhártya közelébe érnek, és azt támpontként használhatják, már nincs szükségük az interpoláris MT-okra, a sejtmagvak mérete a korábbiak felére, harmadára csökken (7. *ábra*; Venkei és mtsai. 2006).



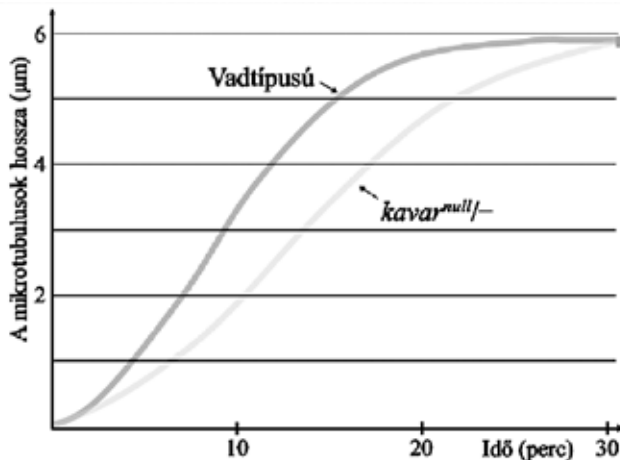
6. *ábra*. A konstitutív  $\alpha 1$ - és  $\alpha 3$ -tubulin, valamint az  $\alpha 4$ -tubulin egyaránt a MT-ok alkotója. Az  $\alpha 4$ -tubulin előszeretettel van jelen azokban az ún. interpoláris MT-okban, amelyek a sejtmaghártya mentén futnak, az egyik centroszómától a másikig ( $\sphericalangle$ ).



7. *ábra*. A sejtmagátmérő változása az osztódási ciklusok során a muslicaembriókban.

## Interpoláris MT-ok és a centroszómák pozicionálása

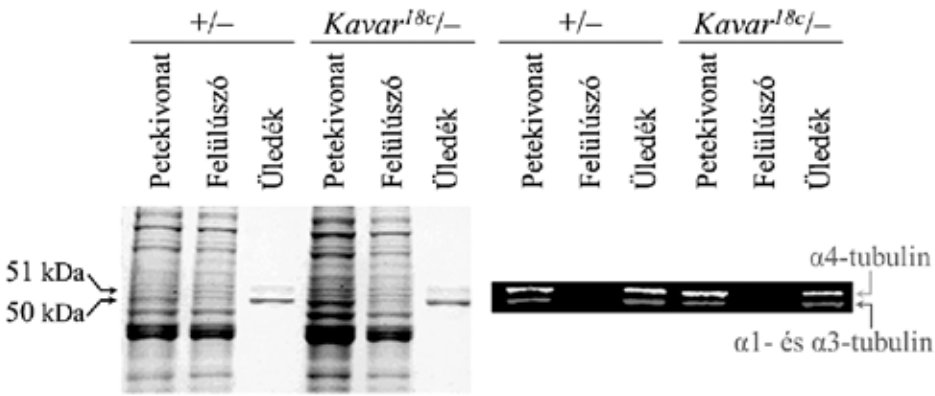
Az  $\alpha 4$ -tubulin szerepére azok az *in vitro* kísérletek derítettek fényt, amelyekben a MT-ok növekedését követtük nyomon az idő függvényében. A kísérlet menete a következő volt. Citoplazmát gyűjtöttünk vad típusú (+/-), valamint *kavar<sup>null</sup>/-* nőstények petéiből, mely utóbbiakban nincs  $\alpha 4$ -tubulin. A citoplazmához GTP-t adtunk, segítettő a MT-ok képződését és növekedését, majd megmértük a képződött MT-ok hosszát. Nem kis meglepetésünkre 30 perc alatt a MT-ok egyforma hosszúra növekedtek. Ám a MT-ok nyolc perc elteltével és  $\alpha 4$ -tubulin jelenlétében mintegy kétszer olyan hosszúra növekedtek, mint  $\alpha 4$ -tubulin nélkül (8. ábra). Ez a megfigyelés azt jelenti, hogy az  $\alpha 4$ -tubulin a MT-ok gyors növekedéséhez szükséges (Venkei és mtsai. 2006). Igyekezettük érthető, hiszen az embrióban egy ciklin/ciklin-dependens-kináz „óra” szabályozza a magosztódás-ciklusokat. Akkor is, ha a centroszómák a sejtmaghártya mentén az ellentétes pólusokba jutottak, és akkor is, ha nem. A *kavar<sup>null</sup>/-* nőstények petéiben,  $\alpha 4$ -tubulin hiányában a MT-ok lassan növekszenek, a centroszómákat csak csekély mértékben tudják elkülöníteni, azok lekésik a ciklus eseménysorozatát, nem képződnek magorsók, a sejtmagvak nem osztódnak, az embriók elpusztulnak, a nőstények sterilek.



8. ábra. A MT-ok méretének változása *in vitro* polimerizáció során  $\alpha 4$ -tubulin jelen- és távollétében, rendre vad típusú (+/-), valamint *kavar<sup>null</sup>/-* nőstények petéiből izolált citoplazmában.

Azt, hogy miként okozzák a *Kavar<sup>18c</sup>*-kódolt E82K- $\alpha 4$ -tubulin-molekulák MT-bojtok képződését, a következő kísérlet eredményei nyomán értettük meg

(9. ábra). Vadtípusú (+/-), valamint *Kavar<sup>18c</sup>/-* nőtények peteiből citoplazmát gyűjtöttünk, bennük MT-ok képződését indukáltuk, a mintákat lecentrifugáltuk, hogy a MT-ok leülepedjenek. Mintát gyűjtöttünk a petekivonatból, a felülúszóból, valamint az üledékből. A mintákból fehérjét izoláltunk, és alkotóit gélelektroforézissel elválasztottuk. Anti- $\alpha$ 4-tubulin, valamint anti- $\alpha$ 1- és  $\alpha$ 3-tubulin ellenanyaggal megvizsgálva a mintákat, arra derült fény, hogy az E82K- $\alpha$ 4-tubulintmolekulák beépülnek a MT-okba (9. ábra). Minthogy az E<sup>82</sup>→K aminosav-csere miatt az E82K- $\alpha$ 4-tubulin molekulákban a GTP-kötés, a  $\beta$ -tubulinnal történő kapcsolódás bizonytalan, a normálisnál rövidebb MT-ok képződnek (1. és 3. ábra). Olyannyira rövidek, hogy nem tudják a centroszómákat az ellentétes pólusokba tolni.

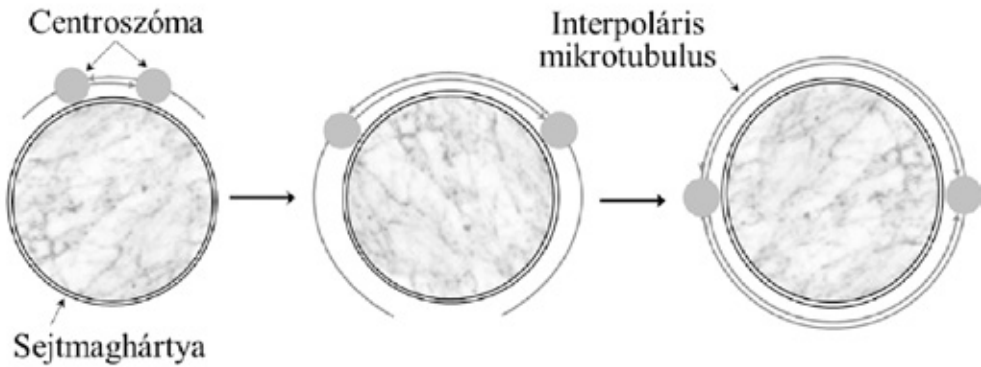


9. ábra. A *Kavar<sup>18c</sup>*-kódolt E82K- $\alpha$ 4-tubulinmolekulák beépülnek a MT-okba.

## A centroszómák pozicionálása

Munkánk során arra derült fény, hogy az  $\alpha$ 4-tubulin-molekuláknak ahhoz szükségesek, hogy (i) az interpoláris MT-ok rövid idő alatt kellő hosszúságúra növekedjenek, és (ii) mindeközben kapcsolatban legyenek a sejtmaghárttyával, követhessék annak görbületét. Növekedésük közben a poláris MT-ok a centroszómákat a sejtmaghárttya mentén az átelleni pólusokba tolják, hogy aztán lehetővé tegyék ép magorsók képződését, a magosztódások lefolyását (10. ábra). Az embriogenezis kezdetén, amikor a sejtmagvak még a citoplazma mélyén, a sejtjárártól távol vannak. A fent bemutatottak alapján megismertük az  $\alpha$ 4-tubulin szerepét, és a centroszómák elkülönülésének új, korábban ismeretlen mechanizmusát írtuk le (10. ábra; Venkei és mtsai. 2006).





10. ábra. Az interpoláris MT-ok, miközben gyorsan növekszenek és a sejtmaghártyához tapadnak, a centroszóákat az átelleni pólusokba tolják. A centroszóák mozgása akkor ér véget, amikor az ellentétes irányból érkező MT-ok egyforma erővel tolják őket.

## Köszönetnyilvánítás

Az itt bemutatott kutatások sikere elsősorban két kiváló doktoranduszhallgatónak köszönhető, Gáspár Imrének és Venkei Zsoltnak. Kutatásaink anyagi fedezetét egy MTA (B08 211), egy OTKA (NI 69180) kutatási program, valamint a Szegedi Tudományegyetem Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskolája biztosította.

## Irodalom:

- ERDÉLYI, M. AND SZABAD, J.: Isolation and characterization of dominant female sterile mutations of *Drosophila melanogaster*. I. Mutations on the third chromosome. *Genetics* 122: 111–27. 1989.
- MATTHEWS, K. A., REES, D. AND KAUFMAN, T. C.: A functionally specialized  $\alpha$ -tubulin is required for oocyte meiosis and cleavage mitoses in *Drosophila*. *Development* 117, 977–91. 1993.
- MÁTHÉ, E., BOROS, I., JÓSVAY, K., LI, K., KAUFMAN, T.C. AND SZABAD, J.: The Tomaj mutant alleles of  $\alpha$ -tubulin67C reveal a requirement of the encoded maternal specific tubulin isoform in the sperm aster, the cleavage spindle apparatus and neurogenesis during embryonic development in *Drosophila*. *Journal of Cell Science* 111: 887–96. 1998.

- VENKEI Z. AND SZABAD J.: The *Kavar<sup>D</sup>* dominant female-sterile mutations of *Drosophila* reveal a role for the maternally provided  $\alpha$ -tubulin4 isoform in cleavage spindle maintenance and elongation. *Molecular Genetics and Genomics* 273: 283–89. 2005.
- VENKEI, Z., GÁSPÁR, I., TÓTH, G. AND SZABAD J.:  $\alpha$ 4-tubulin is involved in rapid formation of long microtubules to push apart the daughter centrosomes during early *Drosophila* embryogenesis. *Journal of Cell Science* 119: 3238–48. 2006.