

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/35805> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Lahaye, Liza

Title: Drosophila Ryks and their roles in axon and muscle guidance

Issue Date: 2015-10-14

SAMENVATTING

Het afgelopen decennium is duidelijk geworden dat de moleculaire mechanismen die nodig zijn voor de correcte navigatie van axonen in het complexe zenuwstelsel ook kunnen worden aangewend om spieren te begeleiden naar hun aanhechtingspunt. Voorbeelden van gen families die deze diverse processen mediëren zijn de goed geconserveerde Slit en Roundabout gen families en de Ryk familie. Deze laatst genoemde familie is het onderwerp van dit proefschrift. De fruitvlieg (*Drosophila melanogaster*) bezit drie Ryk familieleden: DRL, DRL-2 en DNT. Het doel van ons onderzoek is een beter begrip te verkrijgen van de mechanismen die de *Drosophila* Ryk's ontplooiën in het zenuwstelsel en de spieren met behulp van biochemische en genetische benaderingswijzen.

In **hoofdstuk 2** demonstreren we dat DRL homodimeren kan vormen in een *Drosophila* cellijn en ook heterodimeren kan creëren met zijn orthologen DRL-2 en DNT. Dit suggereert dat de gedeeltelijke overlapping van de temporele en spatiële expressie patronen van de verschillende Ryk familieleden *in vivo* belangrijke consequenties heeft voor hun functie. Ryks functioneren als receptoren voor hun ligand Wnt in zoogdieren en invertebraten. Wij tonen aan dat het *Drosophila* WNT5 eiwit in staat is om de homodimerisatie van DRL significant te verhogen, wat ook leidt tot een toename in de rekrutering van SRC64B, een non-receptor tyrosine kinase, voorheen geïdentificeerd als een downstream effector van DRL. Verder laten we zien dat ligand onafhankelijke homodimerisatie van DRL wordt gemedieerd door het TLIGV motief in het transmembraan domein van DRL. De formatie van het DRL/SRC64B complex vereist de aanwezigheid van DRL's PDZ-binding motief en het SH2 domein van SRC64B. Bovendien hebben we verscheidene mutaties geïntroduceerd in het vermeende inactieve kinase domein van DRL die de formatie van het DRL/SRC64B complex voorkomen. Dit indiceert dat een WNT5 geïnduceerde conformatieverandering wellicht essentieel is voor hun interactie. Gebruikmakend van een *in vivo* axon geleidingsanalyse onderbouwen we dat DRL zijn Wnt bindingsdomein, juxtamembraan extracellulaire klief-motief en zijn PDZ bindingsdomein nodig heeft voor zijn rol in axon repulsie. Deze resultaten impliceren dat DRL een aantal moleculaire veranderingen moet ondergaan om zijn functie als een axon begeleider te kunnen vervullen. Tot deze veranderingen behoren onder meer de dimerisatie en proteolytische verwerking van DRL.

In **hoofdstuk 3** bestuderen we de functie van *Drosophila* RYK's in het mushroom body (MB): een hersenstructuur die in verband gebracht wordt met kennis en geheugen acquisitie. The α - en β axonen van het MB verbinden verschillende hersenregio's die nodig zijn voor deze processen. Wij tonen aan dat DRL gedurende de hersenontwikkeling nodig is om de α axonen te begeleiden zodat ze contact kunnen maken met hun targetneuronen. DRL wordt echter niet

tot expressie gebracht in de α MB neuronen zelf maar kan daarentegen gedetecteerd worden in een neuronale cellijn die grenst aan de uitgroeiende α axonen. Onze bevindingen laten zien dat deze α axonen DRL-2, een *Drosophila* RYK ortholoog, tot expressie brengen en dat de correcte uitgroei van de α axonen wordt begeleid door, en afhankelijk is van, DRL-2. Het cytoplasmatische domein van DRL-2 is noodzakelijk voor zijn functie. Deze resultaten geven weer dat DRL-2 kan optreden als een axon-intrinsieke begeleidingsreceptor in deze cellulaire context. Het cytoplasmatische domein van DRL daarentegen is in de aangrenzende cellen niet vereist voor α axon begeleiding. Om de α axonen te kunnen begeleiden hangt de functie van de DRL receptor volledig af van zijn klieving in het tetrabasic klief motief. Deze klieving heeft tot gevolg dat het extracellulaire deel van DRL, het Wnt bindingsdomein, vrijkomt. Dit impliceert dat DRL extrinsiek functioneert om WNT5 af te vangen en te presenteren aan de α axonen die DRL-2 tot expressie brengen aan hun celoppervlak en dit signaal intracellulair doorgeven. Dit model is consistent met onze biochemische data en ondersteunt het bestaan van een ternair complex dat bestaat uit het gekliefte ectodomein van DRL, WNT5 en de DRL-2 receptor. Daarom concluderen we dat MB-extrinsieke en -intrinsieke RYK's de MB- α axonen begeleiden via hun gemeenschappelijke ligand WNT5.

Drosophila RYK's functioneren niet alleen als begeleidingsreceptor voor axonen. Ze zijn ook betrokken bij de begeleiding van de laterale transversale spieren (LTM's) naar hun uiteindelijke aanhechtingspunt (MAS) in de lichaamswand van het *Drosophila* embryo. In **hoofdstuk 4** beschrijven we dat in een embryo waar *wnt5* ontbreekt, zoals eerder is aangetoond voor zijn receptor *drl*, deze LTM's regelmatig voorbij schieten aan hun aanhechtingspunt en zich verder ventraal hechten aan een ectopische plek in de lichaamswand. We demonstreren dat als WNT5 tot expressie gebracht wordt in de spieren of de MAS's de spieraanhechting hersteld wordt, terwijl DRL specifiek aanwezig moet zijn in de spier om zijn functie te vervullen. Opvallend heeft de *drl-2* mutant dit fenotype niet, maar de *dnt* mutant heeft ook het fenotype waarbij de spier verder ventraal een ectopisch aanhechtingspunt vindt. Daarbij zien we tijdens de afwezigheid van zowel *drl* als *dnt* het aantal doorschietende spieren dramatisch toeneemt. Dit laat zien dat *drl* en *dnt* samenwerken in de begeleiding van de LTM's naar hun MAS. We tonen ook aan dat *wnt5*, *drl* en *dnt* zeer waarschijnlijk in dezelfde pathway opereren, omdat het verwijderen van een copy van *wnt5* het fenotype van de *drl*, *dnt* mutanten significant verhoogt. De uitgroeiende spier en zijn beoogde MAS wisselen een aantal moleculaire signalen uit, die ze in staat stellen om een stabiele aanhechting tussen spier en MAS tot stand te brengen. Deze aanhechting wordt gefaciliteerd door de extracellulaire matrix. We vinden tot onze verrassing dat de meerderheid van de nieuwe ectopische MAS's geen Stripe tot expressie brengen; een nucleair eiwit waarvan verondersteld werd dat het zowel noodzakelijk als voldoende is voor de differentiatie van de MAS. Verder leveren we bewijs voor de interactie tussen de doorschietende spier en de voorbestemde MAS,

ook al maakt de doorschietende spier een ectopisch contact elders met een epidermale cel in de lichaamswand. We concluderen dat de wisselwerking van DRL, DNT en WNT5 verantwoordelijk is voor het genereren van een stopsignaal dat herkenning en aanhechting van de spier met de correcte MAS mogelijk maakt. Waarom en hoe de aanhechting met de ectopische epidermale cel tot stand komt is op dit moment niet duidelijk. Verder onderzoek is nodig om het nog onbekende stopsignaal te identificeren.

Het hier gepresenteerde onderzoek vergroot ons begrip van de fundamentele biologische rol en de werkingsmechanismen van Ryk's tijdens aansturing van axonen en spieren naar hun target cellen. Wij hopen dat dit werk ook zal bijdragen aan toekomstige therapieën voor ziektebeelden waar deze eiwitten bij betrokken zijn, waaronder kanker en regeneratie na trauma van het zenuwstelsel.

