

Ph.D. ÉRTEKEZÉS

Virágh Eszter Erika

Biológiai Doktori Iskola
Szeged
2013

Édesapám emlékének

**Az *importin- α 2* paralóg-specifikus szerepe és összehangolt
együttműködése az *importin- β /Krtel* génnel az *ecetmuslica*
korai embrionális fejlődésében**

Ph.D értekezés

Virágh Eszter Erika

Témavezető: Dr. Kiss István

Biológiai Doktori Iskola SZTE TTIK

MTA SZBK Biokémiai Intézet

DKFZ Heidelberg

Szeged

2013.

TARTALOMJEGYZÉK

IRODALMI ÁTTEKINTÉS	3
1. Kommunikáció határokkal és határok nélkül	3
2. A sejtmagi szállítás és az orsó kialakulás szabályozása.....	3
2.1 Nukleáris transzport – néhány karioferin, ezernyi célfehérje.....	4
2.2. Ran, a karmester	4
2.3 A klasszikus transzport.....	6
2.4. A Ran, Imp- α és Imp- β trió a mitózisban.....	8
2.5. Az osztódási orsó kialakulása	8
2.6 A titokzatos RanGTP gradiens.....	9
2.7. Az Imp- α/β komplex közvetlen szabályozása alatt álló SAF fehérjék.....	10
2.8. Az Imp- α/β komplex és a sejtmagmembrán lebomlása/újra formálódása.....	12
3. Az Importinok molekuláris felépítése	12
3.1. Az Importinok evolúciós eredete	12
3.2. Importin- α , az adaptor fehérje	14
3.3. Importin- β , a szállító egység	16
4. Az ecetmuslica <i>importin-α</i> génjei és feladataik	17
4.1. Az ecetmuslica oogenezisének sajátosságai	19
4.2. A korai embriófejlődés a muslicában	20
4.3. Az <i>imp-$\alpha 2$</i> speciális szerepe az oogenezisben	22
4.4. A <i>Ketel</i> az <i>importin-β</i> <i>Drosophila</i> ortológja	23
CÉLKITŰZÉS.....	25
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	27
1. Felhasznált <i>Drosophila melanogaster</i> törzsek	27
2 Az <i>imp-$\alpha 2$</i> mutáns transzgének rekombinálása a <i>nos-Gal4</i> kromoszómára	28
3. A mutáns anyáktól származó embriók életképességének vizsgálata	28
4. Statisztikai elemzések	29
5. Az <i>imp-$\beta^{KetRE34}$</i> mutáns DNS szekvenciájának meghatározása	29
6. Az Imp- $\beta^{KetD725N}$ mutáció <i>in silico</i> vizsgálata	30
7. Embriók gyűjtése és fixálása az immunfestésekhez	30
8. Az embriók immunohisztokémiás festése	31
9. Az <i>imp-β^{Ketel}</i> gén <i>in vitro</i> mutagenézise	32
10. Az <i>imp-β^{Ketel}</i> mutációk klónozása <i>pGEX</i> fehérje-expressziós vektorba	33
11. GST pull down és western blot.....	33

EREDMÉNYEK.....	35
1. Az <i>imp-α2</i> és <i>imp-β^{Ketel}</i> közötti kölcsönhatás genetikai vizsgálata	35
2. Az <i>imp-β^{KetRE34}</i> allél molekuláris természetének jellemzése.....	38
2.1. Az <i>imp-β^{KetRE34}</i> allél vizsgálata DNS szekvenálással.....	38
2.2. Az <i>Imp-β^{KetD725N}</i> IBB domén-kötő képességének <i>in silico</i> vizsgálata	38
2.3. Az <i>Imp-β^{Ketel}</i> és <i>Imp-β^{KetRE34}</i> egyformán kötik az <i>Imp-α2</i> fehérjét.....	39
2.4. Az <i>Imp-β^{Ketel}</i> és <i>Imp-β^{KetD725N}</i> térszerkezetének <i>in silico</i> összehasonlítása.....	40
3. Az <i>imp-α2</i> kulcsszerepe az embrió korai fejlődésében	41
4. Az <i>imp-α2</i> NLSB doménjének inaktiválása az <i>imp-β^{Ketel}</i> gén csökkentett dóziséval párosulva embrió letalitást okoz	43
5. Az <i>Imp-α2</i> és <i>Imp-β^{Ketel}</i> specifikus aktivitásának csökkenése leállítja a mitózist az embriófejlődés korai szakaszában.....	46
6. Az <i>Imp-α2/Imp-β^{Ketel}</i> komplex szabályozza a mitotikus folyamatokat.....	49
7. Az <i>Imp-α2/Imp-β^{Ketel}</i> komplex hozzájárul a centroszómák dinamikájához.....	56
7.1. Az <i>Imp-α2/ Imp-β^{Ketel}</i> komplex gátolja a centroszóma amplifikációt.....	58
8. Az Importin-α2 az osztódási orsókhoz kötődik a mitózisban	60
9. <i>Imp-α2</i> az NLSB doménjén keresztül köti meg a sejtosztódásban szerepet játszó ISWI, CP190 és lamin fehérjéket	64
10. Az <i>Imp-β^{KetD}</i> és <i>Imp-β^{KetRE34}</i> egyaránt erősen kötik mind RanGTP, mind RanGDP fehérjét	64
11. A RanGTP szint csökkentése menekíti az <i>imp-β^{KetRE34}</i> embriók letalítását ...	66
EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA.....	68
1. Az <i>Imp-α2</i> és <i>Imp-β^{Ketel}</i> kiegyensúlyozott együttműködése szükséges a muslica szinciciális embrióban zajló gyors, szinkron sejtmegosztódásokhoz.....	68
2. A mutáns <i>Imp-β^{Ketel}</i> fehérjék molekuláris természete.....	69
3. Az <i>Imp-α2</i> paralóg-specifikus szerepe	70
4. Az <i>Imp-α2/Imp-β^{Ketel}</i> komplex szabályozza a mitotikus folyamatokat a szinciciális embrióban	73
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	77
ÖSSZEFOGLALÓ	78
SUMMARY	83
FÜGGELÉK.....	87
IRODALMI HIVATKOZÁSOK	93

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1. Kommunikáció határokkal és határok nélkül

Az eukarióta sejtekben a fajfennmaradást biztosító genetikai örökítő anyag a sejtmagba zárult. Ez lehetővé tette, hogy a DNS megkettőződése és átíródása térben és időben is elkülönüljön a citoplazmában zajló fehérjeszintézistől. A sejtfolymatok elkülönülése szükségessé tette, hogy felépüljön egy kommunikációs rendszer a sejtmag és a citoplazma között. A kommunikációt, egy kétirányú szelektív makromolekuláris transzport testesíti meg, amely biztosítja, hogy mindig a megfelelő faktorok és szabályozó molekulák jussanak be a magba illetve ki a citoplazmába. A sejtmagot a citoplazmától kettős membránból álló sejtmaghártya határolja el, ennek pórusai biztosítják az átjárhatóságot a két, nagyon eltérő biokémiai környezet között. A magasabbrendű szervezetekben sejtosztódás során a sejtmaghártya lebomlik és immár közös térben kell a sejtnak megőrizni az osztódási folyamatok integritását és biztosítani a kromoszómák pontos szétválását. A mitózis végén a két utódsejt sejtmagja körül újra kialakul a maghártya és beindul a sejtmag és a citoplazma közötti két-irányú molekuláris kommunikáció. A sejtmagi szállítás és a sejtosztódási folyamatok részleteikben eltérhetnek a különböző szervezetekben, de szabályozásuk és alapvető lépéseik evolúciósan konzerválódtak az eukarióták törzsejlődése során. Az évmilliók alatt csiszolódott vezérlési mechanizmus segíti a hibátlan kommunikációt és biztosítja az egymással kölcsönható molekulák bonyolult térbeli és időbeli elérhetőségét és együttműködését.

2. A sejtmagi szállítás és az orsó kialakulás szabályozása

A magasabbrendű szervezetek interfázisos sejtjeiben a makromolekulák sejtmagi szállítását, valamint a sejtosztódás során az osztódási orsó kialakulását, a metafázisos kromoszómák elrendeződését és a magmembrán összeszerelődését, ugyanaz a szigorú vezérlési mechanizmus szabályozza. A rendszer központi eleme a Ran, egy kis molekulásúlyú GTP-áz, ami hatását a citoplazmában oldott állapotban található transzport-receptor fehérjéken keresztül fejti ki.

2.1 Nukleáris transzport – néhány karioferin, ezernyi célfehérje

Az eukarióta szervezetekben, a sejtmag és a citoplazma közötti aktív anyagforgalom, különböző transzport receptorok közreműködésével, a maghártya nukleáris pórus komplexein (NPC) keresztül megy végbe (Chook és Blobel, 2001). A szállító rendszer olyan jól szervezett, hogy például az emberi testben található NPC-ken keresztül, percenként több mint egy kilogramm anyagmennyiség halad át (Weis, 2007). Molekulák ezrei; fehérjék, mRNS-ek, riboszómális fehérjék várakoznak szállításra a maghártya mindkét oldalán és ennek az óriási feladatnak ellátására különböző transzport utak alakultak ki. A legtöbb útvonal egymással homológ transzport-receptorokkal, karioferinokkal operál és valamennyi megegyezik abban, hogy a szubsztrát-felismerés, megkötés, szállítás és időbeni elengedés, ugyanazzal a mechanizmussal zajlik.

A karioferineket Importinoknak (Imp) vagy Exportinoknak (Exp) is nevezik, attól függően, hogy a sejtmagba illetve a citoplazmába történő szállításban vesznek részt. Szubsztrátjaikat, azok jellemző szignálja segítségével azonosítják. A nukleáris lokalizációs szignál (NLS), egy adott fehérje sejtmagba történő beszállítását, míg a nukleáris export szignál (NES) a citoplazmába történő kiszállítását biztosítja (Dingwall és Laskey, 1991; Fischer és mtsai., 1995). Mindkét irányú transzport folyamatot a RanGTP koncentrációja irányítja megegyező módon, de fordított előjellel.

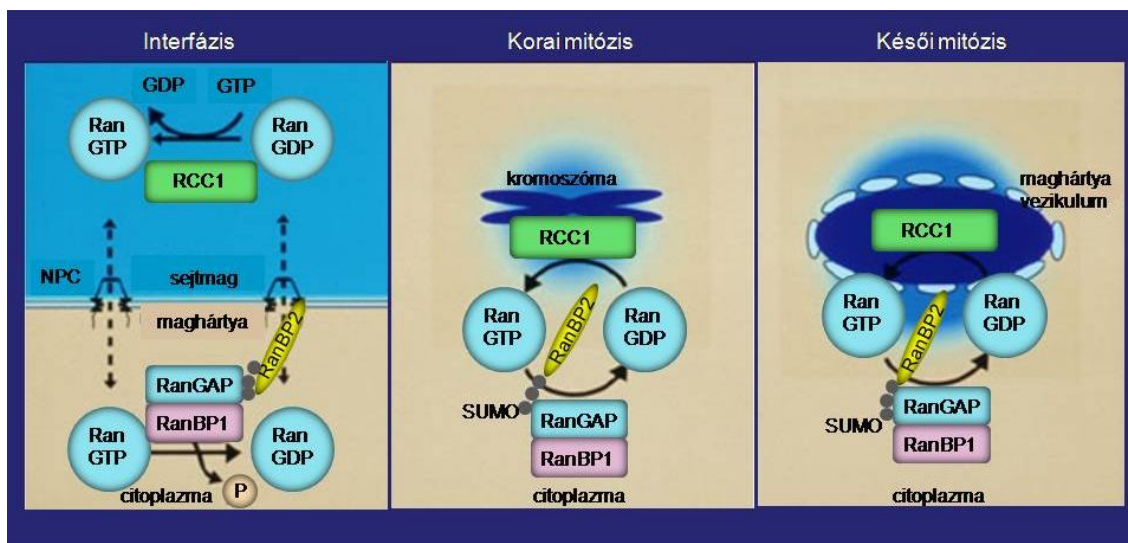
2.2. Ran, a karmester

A Ran, egy erősen konzervált kis molekulasúlyú GTP-áz, a többi "kapcsoló" fehérjéhez hasonlóan, GTP- és GDP-kötött formában vesz részt a sejtfolyamatokban. A citoplazmában GDP-kötött formája, a sejtmagban főleg GTP-kötött formája van jelen (Ren és mtsai., 1993). A kétféle molekula eltérő eloszlásáért, regulátor fehérjéinek aszimmetrikus lokalizációja a felelős (1. ábra). A RanGEF/ RCC1 (Ran guanyl-nucleotid exchange factor) fehérje, a Ran GDP-GTP cserélő faktora, egy kromatinhoz kötött fehérje (Nemergut és mtsai., 2001). Az RCC1 N terminális részén rendelkezik egy NLS szekvenciával és interfázisban az Imp- α 3/ β komplex szállítja a sejtmagba. Ez az NLS átfed a hiszton kötő doménjével, ami a fehérjét a nukleoszóma-hoz kapcsolja (Nemergut és mtsai., 2001). Az RCC1 foszforilált állapotban a H2A és H2B hisztonokhoz horgonyzódik ki, míg a Ran fehérje a H3 és H4 hisztonokhoz

kapcsolódik. A két fehérje fizikai kapcsolata biztosítja a nukleotid cserét (Bilbao-Cortés és mtsai., 2002) és ezáltal a sejtmagban illetve az osztódó sejtekben a kromoszóma közeli, magas RanGTP koncentrációt (Caudron és mtsai., 2005; Kaláb és mtsai., 2006) (1. ábra)

A RanGTP hidrolízise a citoplazmában történik. A folyamatos hidrolízis biztosítja a magas citoplazmás RanGDP koncentrációt (Azuma és Dasso, 2000; Mahajan és mtsai., 1997). A Ran fehérjének, önmagában csak nagyon alacsony GTP-áz aktivitása van, amit a citoplazmatikus Ran GTPase Activating Protein (RanGAP) 10^5 -szeresére növel (Klebe és mtsai., 1995). A hidrolízis hatékonyságát még további két, Ran-kötő doménnel rendelkező, mediátor fehérje (Ran binding protein) faktor fokozza.

Ezek, a citoplazmában oldott állapotban található RanBP1 (Bischoff és mtsai., 1995) illetve az NPC-k citoplazmás fonalain található RanBP2 (Seewald és mtsai., 2002), amelyek hozzákapcsolódnak az NPC-n kijutó export-komplexekhez és elérhetővé teszik a Ran kötőhelyeit a RanGap számára. A RanBP2/Nup358 jelenléte önmagában még nem elégséges a RanGTP hatékony hidrolíziséhez, ehhez még a SUMO-ílt RanGAP sejtmaghártya-lokalizációja is szükséges.



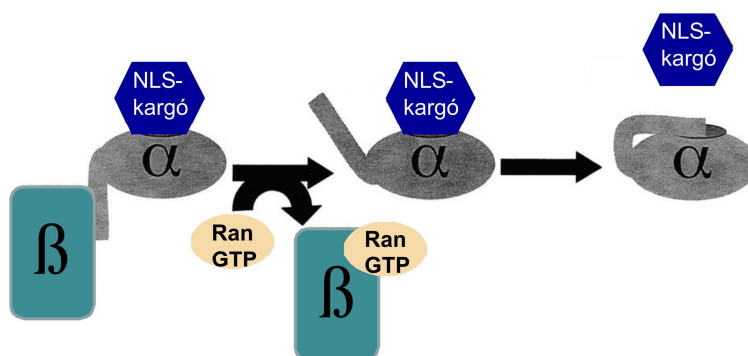
1. ábra A RanGTP/GDP ciklus, nyugvó és osztódó sejtekben (Mattaj, 2012. nyomán).

A SUMO-ílláció, olyan konformáció változást idéz elő a RanGAP molekulaszerkezetében, ami lehetővé teszi közvetlen kötődését a RanBP2/Nup358-hoz (Dasso, 2008; Mahajan és mtsai., 1997). A növényekben a RanGAP magmembrán asszociációjáért egyedül a fehérje N-terminális részének WPP doménje felelős. Az állatoktól és növényektől eltérően, az élesztőben a RanGAP kizárólag oldott állapotban

van jelen a citoplazmában (Rose és Meier, 2001; Zhao és mtsai., 2008). Mitózisban a SUMO-ilált RanGAP, komplexet alkotva a RanBP2 fehérjével, az orsó fonalakhoz és a kinetokórokhoz kapcsolódik (Joseph és mtsai., 2004; Kalab és Heald, 2008; Salina és mtsai., 2003). A RanBP1 fehérje pedig a centroszómák környezetében halmozódik fel (Guarguaglini és mtsai., 2000).

2.3 A klasszikus transzport

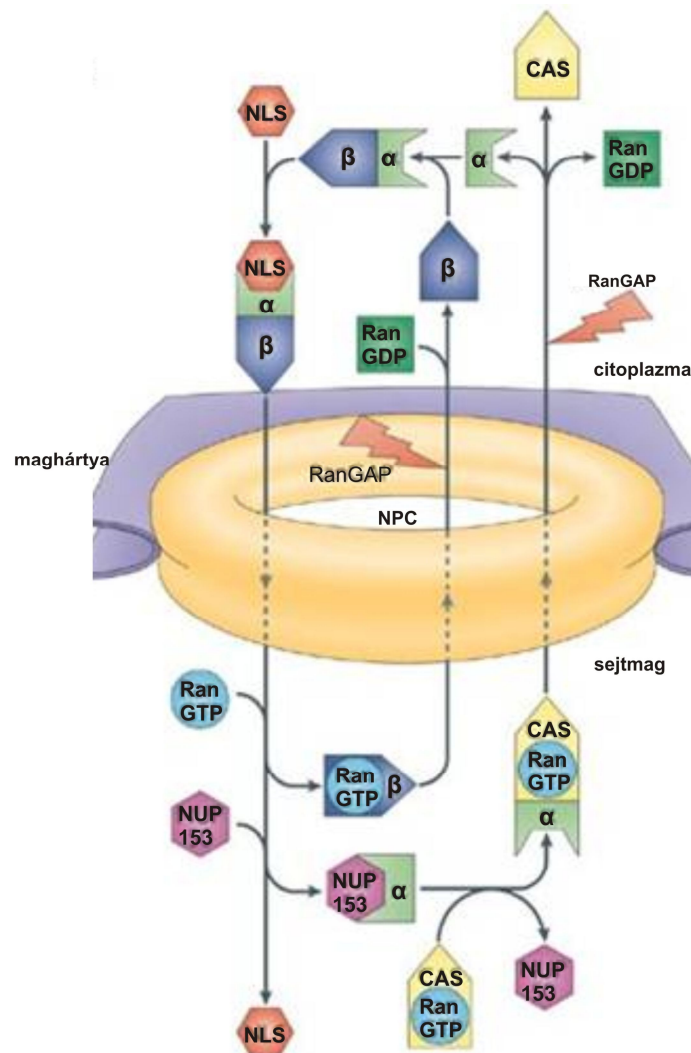
A sejtmagi-citoplazmás fehérje transzport alapvető vonásait az elsőként azonosított és klasszikus nukleáris importnak nevezett szállítási mechanizmus jól körvonalazza. Transzportreceptorai a citoplazmában oldott állapotban található Importin- α és (Imp- α) és az Importin- β (Imp- β), melyek meghatározott idő- és térbeli sorrendben sok más fehérjével lépnek kapcsolatba. A folyamat kezdetén, az Imp- α IBB (Importin- β Binding) doménje az Imp- β -hoz kötődik és ezáltal kinyílik zárt konformációja (Görlich és mtsai., 1996), 2. ábra). A nyitott szerkezetű Imp- α ismeri fel a szállítandó fehérje klasszikus, egy- vagy kétagú, NLS szekvenciáját és ezt megkötvé hozzákapsolja a célfehérjét az Imp- β -hoz (Görlich és mtsai., 1995; Imamoto és mtsai., 1995; Moroianu és mtsai., 1996). A szállítási folyamat aktív közreműködője az Imp- β (Christophe és mtsai., 2000), ami az NPC-k hidrofíli csatornáján keresztül juttatja a magba a citoplazmában kialakult hármas komplexet.



2.ábra A szállítási folyamat sematikus ábrázolása (Harremann nyomán, 2003). Az Imp- α nyitott konformációja biztosítja az Imp- β -hoz és az NLS-fehérjékhez kötődését a citoplazmában, zárt szerkezete pedig a szállított fehérjék felszabadulását és az autoinhibíciót sejtmagban.

Legújabb eredmények leírják, hogy az NPC önmaga is egy dinamikus, adaptív makromolekuláris komplex, amelynek komponensei közvetlenül befolyásolják az áthaladó NLS-kargó/Imp- α / β komplex helyzetét (Tran és Wenté, 2006). Az NPC-ket

felépítő nukleoporinok (nup) mintegy harmada eltérő hosszúságú, konzervált FG (fenilalanin-glicin) ismétlődéseket tartalmaz, amelyek flexibilis sorompót jelentenek az áthaladó molekulák számára. Az NPC-k citoplazmás oldalán található filamentumokat és a nukleáris oldalon elhelyezkedő sejtmagi kosarat (nuclear basket) kialakító perifériális-, valamint az NPC csatornájában komplexbe szerveződő, ún. központi-nup-ok fontos kölcsönható partnerei az importinoknak a transzport során (Clever és mtsai., 2013). Az Imp- β először a nagy molekulásúlyú Nup358-al létesített kapcsolaton keresztül kihorgonyozza az NLS-kargó/Imp- α/β komplexet az NPC-hez (Hutten és mtsai., 2008), majd további FG nukleoporinokkal történő gyors, átmeneti kötések láncolatán keresztül viszi tovább az NPC belső csatornájában (Bednenko és mtsai., 2003). A folyamat dinamikáját jelzi, hogy például az élesztő nup-ok, mintegy 200 dokkoló helyet biztosítanak az importin- β -nak (Gilchrist és mtsai., 2002).



3. ábra A kanonikus fehérje import és export (Stewart, 2007. alapján)

A sejtmagba bejutó trimer számára a Nup153, Nup50 és Nup98 alakítanak ki

molekuláris platformot a disszociációhoz (Walther és mtsai., 2001, Clever és mtsai., 2013). Itt RanGTP kapcsolódik az Imp- β -hoz, olyan konformációs változást idézve elő annak szerkezetében, hogy nem tudja tovább megkötni az Imp- α hajlékony IBB doménjét (Görlich és mtsai., 1996). A felszabaduló IBB domén NLS-hez hasonló szekvenciája, erős autóinhibíciós képessége folytán, leszorítja a szubsztrát fehérje NLS-ét az NLS kötő helyről és a célfehérje felszabadul (Kobe, 1999).

A folyamat befejező lépéseként, a transzport receptorok kijutnak a sejtmagból és ezzel megkezdődhet egy újabb szállítási ciklus. Az Imp- α önmagában nem képes a citoplazmába visszajutni, ehhez speciális nukleáris export receptorra van szüksége. Ez a receptor a CAS fehérje, amely valójában egy Imp- β homológ és RanGTP-kötött formában képes megkötni és kiszállítani az Imp- α fehérjét a citoplazmába (Kutay és mtsai., 1997). Az Imp- β a Ran GTP-vel heterodimert képezve önmaga jut vissza a citoplazmába. Az NPC-ék citoplazmás fonalain lokalizált RanBP1, RanBP2 és RanGAP1 megkötik a reciklizált receptor komplexeket és aktiválják a RanGTP hidrolízisét. A GDP-kötött Ran a továbbiakban már nem tud sem a CAS fehérjéhez sem pedig az Imp- β -hoz kötődni, és a szabaddá vált Imp- α és Imp- β elindíthat egy újabb nukleáris import ciklust (Fried és Kutay, 2003; Görlich és mtsai., 1998).

2.4. A Ran, Imp- α és Imp- β trió a mitózisban

A sejtosztódás során a RanGTP-áz, az orsók és az új sejtmaghártya (nuclear envelope NE) megszervezését, ugyancsak az Importin fehérjékkel együtt irányítja (Di Fiore és mtsai., 2004; Walczak és Heald, 2008). Az Imp- α /Imp- β heterodimer megköti, és inaktív állapotban tartja az NLS tartalmú SAF (spindle assembly factor), MAP (microtubule-associated protein) fehérjéket (Gruss és mtsai., 2001; Nachury és mtsai., 2001), az orsó kialakításában résztvevő motorfehérjéket, valamint a sejtmaghártya megszervezésében résztvevő mitotikus faktorokat is (Clarke és Zhang, 2004; Walczak és Heald, 2008). A szabályozás teljesen analóg a sejtmagi transzport folyamattal és az összes eukarióta szervezetben hasonlóan működik, kezdve a növényektől (Jeong és mtsai., 2005; Pay és mtsai., 2002) az élesztőn át (Fleig és mtsai., 2000; Sato és Toda, 2007) az emberig (Li és Zheng, 2004; Moore és mtsai., 2002).

2.5. Az osztódási orsó kialakulása

A magasabbrendű organizmusok sejtjeinek interfázisból a mitózisba történő átmenete során a mikrotubulus hálózat és a magmembrán szerkezete teljesen átalakul. A folyamat végeredményeként a maghártya lebomlik és a citoplazmába jutó nukleáris szignálok előidézik a mikrotubulusok (MT) dinamikus átszerveződését és a mitotikus orsók kialakulását (Wilde és Zheng, 1999). Az osztódási orsók képződését két független folyamat eredményezi. A centroszómális mechanizmus („search and capture”) során, a két centroszómáról a kromoszómák felé növekedő mikrotubulusok dinamikus, plusz végei mintegy elkapják a testvérkromatidák kinetokórijait és így alakul ki a bipoláris orsó (Kirschner és Mitchison, 1986; McIntosh és mtsai., 2002). A kromoszómális mechanizmus során a mikrotubulus nukleáció és növekedés a kondenzált kromatin környezetében történik meg (Walczak és Heald, 2008). Legújabb eredmények bizonyítják, hogy a centroszómális és kromoszómális mikrotubulus nukleáció az egyes szervezetekben és a különböző sejttypusokban eltérő arányban, de párhuzamosan zajlik (Basto és mtsai., 2006; Khodjakov és mtsai., 2000).

2.6 A titokzatos RanGTP gradiens

Bármelyik módja legyen is az orsó szerveződésének, abban mindegyik mechanizmus megegyezik, hogy egyaránt RanGTP-áz függő folyamat és a RanGTP koncentráció gradiense vezérli (Caudron és mtsai., 2005; Kalab és Heald, 2008). Ugyanakkor, kísérletesen igazolták, hogy a centroszómális mechanizmus kevésbé érzékeny a Ran útvonal esetleges hibáira, mint a kromatin irányított folyamat (Kalab és mtsai., 2006). Karmosbéka és emlős sejt kultúrákban egyaránt kimutatták, hogy a Ran GTP-kötött formában a kromoszómák környezetében egy gradienst képez, ami távolodva a kromoszómáktól élesen csökken és ennek következtében megszűnik az orsó-szerveződéséhez kedvező környezet (Kalab és Heald, 2008). FRET analízissel (Caudron és mtsai., 2005), mágneses rezonancia vizsgálatokkal és matematikai modellezéssel (Bastiaens és mtsai., 2006) még pontosabb képet alakítottak ki az egyes molekulák eloszlásáról. A RanGAP és RCC1 polarizált eloszlása a RanGTP koncentráció meredekebb csökkenését eredményezi, míg a RanGTP/Imp- β szabad diffúziója egy kiegyenlítettebb gradienst alakít ki. Feltehetően a Ran útvonal szabályozásának alapja az, hogy egy adott mitotikus esemény (MT nukleáció, -polimerizáció, -stabilizáció) számára létezik a RanGTP egy optimális koncentrációja (Clarke és Zhang, 2008). A mikrotubulus nukleáció magasabb RanGTP

koncentrációnál, egy kromatin közeli 5µm-es szűk régióban erős, míg a centroszómális plusz végi mikrotubulus stabilizáció 10µm távolságban a legerőteljesebb (Caudron és mtsai., 2005).

2.7. Az Imp-α/β komplex közvetlen szabályozása alatt álló SAF fehérjék

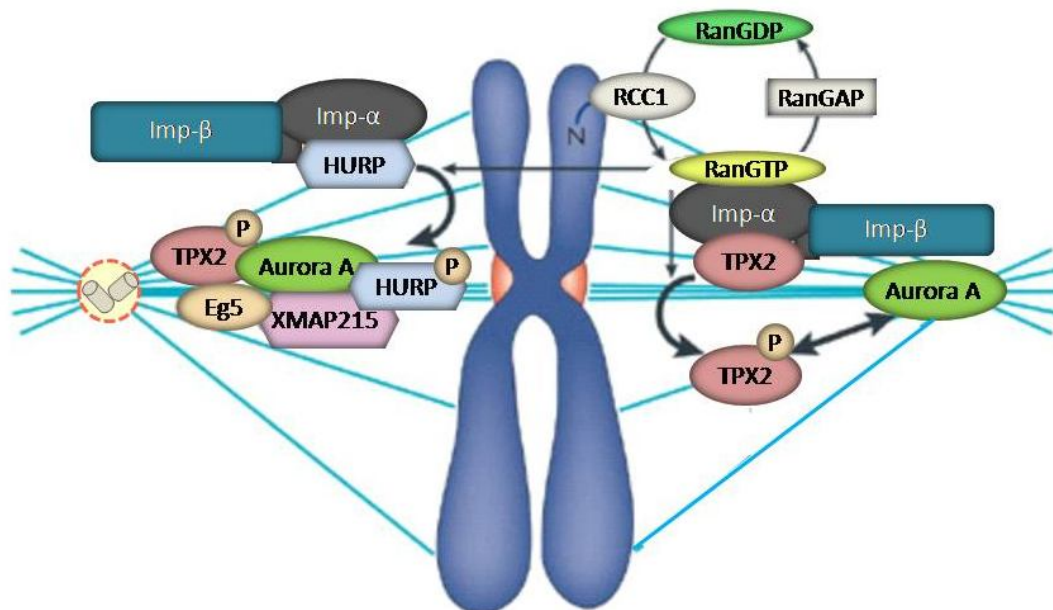
Az osztódási orsó kialakulásának során az Imp-α/β komplex többféle fehérjecsoportot is szabályoz, amelyek közös jellemzője, hogy rendelkeznek egytagú vagy kéttagú NLS szekvenciával. A legnépesebb csoport az orsó mikrotubulusokhoz kötődő SAF/MAP fehérjék, amelyek biztosítják az osztódási orsók képződését és stabilitását, valamint szabályozzák és biztosítják a kromoszómák pontos szegregációját.

Cargo	Fehérje osztály	Szabályozott funkció	Kísérleti rendsz.	Irodalom
TPX2	MAP	kromatin függő MT nukleáció, Aurora aktiváció	XEE, CMCs	Brunet, 2004; Gruss, 2001; Schatz, 2003; Tulu, 2006
Maskin/TACC	orsó pólus MAP	Aurora foszforilálja, centroszómális MT nukleáció	XEE, S. pombe	Albee, 2006; Sato és Toda, 2007
NuMA	orsó pólus MAP	MT mínusz vég stabilizáció	XEE,	Haren és Merdes, 2002; Nachury, 2001; Wiese, 2001
NuSAP	MAP	MT stabilizáció, kromatin kötés	XEE, CMCs	Ribbeck, 2007
HURP	MAP	MT kötés, kinetokór MT stabilizáció, orsó bipolaritás	XEE, CMCs	Koffa ,2006; Silljé, 2006; Wong és Fang, 2006
XCTK2	orsó kinezin	MT kötés	XEE	Ems-McClung, 2004; Walczak., 1998
Kid	kromo. kinezin	kromoszóma karok MT irányú orientálása, orsószervezés	CMCs	Tahara, 2008; Trieselmann, 2003
LaminB	magmembrán	maghártya összeszerelődés, orsó mátrix kialakítása,	XEE	Tsai ,2006

1. táblázat A Ran/Imp-α/β komplex által közvetlenül szabályozott NLS fehérjék és funkcióik. XEE-Karmosbéka (*Xenopus laevis*) pete kivonat, CMCs-Humán sejt kultúra, S.pombe- (*Schizosaccharomyces pombe*)-hasadó élesztő.

Mutációik súlyos osztódási rendellenességeket okoznak, ezért funkcióiknak és szabályozásuknak jobb megértése, fontos adatokat szolgáltat a rákos folyamatok

kutatásának is. A SAF és MAP fehérjék és importinok közötti kapcsolatot emlős sejt kultúrában és karmosbeka petekivonatban *in vitro* modellezték. Ezekben a rendszerekben a Ran/Importin vagy az NLS-fehérjék mennyiségi viszonyainak megváltoztatása során súlyos osztódási orsó rendellenességeket figyeltek meg (Clarke és Zhang, 2008). Karmosbeka petekivonatban a RanGTP szintjének növelése kromatin hiányában is előidézte a MT-ok polimerizációját illetve orsók kialakulását (Dasso, 2002), Imp- α hiánya ill. TPX2 túltermeltetése szintén MT aszterek kialakulását eredményezte (Schatz és mtsai., 2003). A TPX2 az egyik legjobban jellemzett SAF fehérje, ami elsősorban a kromatin-függő MT nukleációban játszik szerepet (Gruss és mtsai., 2001; Schatz és mtsai., 2003; Tulu és mtsai., 2006), valamint aktiválja és a MT-okhoz irányítja az Aurora A kináz fehérjét, amely a mitózis korai szakaszában az orsó összeszerelésében és a centroszóma funkciókban játszik szerepet (Kufer és mtsai., 2002; Trieselmann és mtsai., 2003; Eysers és mtsai., 2003). *Xenopus* petekivonatban a TPX2 komplexet alkot az XMAP215, Eg5, HURP és az Aurora A mitotikus fehérjékkel (Koffa et al., 2006; Clarke és Zhang 2008). A SAF fehérjék orsó-kialakulásban betöltött szerepének és a Ran/Importin rendszerrel való kölcsönhatásának vázlatos modelljét mutatja a 4. ábra.



4. ábra. Az Imp- α és Imp- β szerepe az osztódási orsót megszervező SAF-ok aktivitásának szabályozásában (Clarke és Zhang, 2008 nyomán)

Az Imp- α/β komplex által, az NLS kötésen keresztül szabályozott számtalan MAP és SAF fehérjéről derült ki, hogy rákos sejtekben a normálisnál erősebben fejeződnek ki (Tsou és mtsai., 2003; Wong és Fang, 2006). Különböző tumoros

sejtvonalakon végzett nagy-léptékű, mintegy 3700 gént érintő, RNS csendesítéses tesztben magát a Ran fehérjét, valamint a TPX2-t is azonosították, mint olyan fehérjéket, amelyek szintjének csökkenése előidézte a tumorsejtek pusztulását (Morgan-Lappe és mtsai., 2007). Differenciálaltan tumorsejtekben az Imp- α 2/KPNA2 fehérjének figyelték meg magas expressziós szintjét (Rhodes és mtsai., 2004) és nemrég számoltak be a stressz indukált génszabályozásban betöltött szerepéről is Hela sejtekben (Miyamoto és mtsai., 2012).

2.8. Az Imp- α / β komplex és a sejtmagmembrán lebomlása/újra-formálódása

A metazoa szervezetek sejtosztódásakor, a profázis/prometáfázis átmenetben a sejtmaghártya lebomlik. Ebben a folyamatban a RanGTP-áz szerepe még nem teljesen tisztázott, de karmosbeka petekivonatban végzett *in vitro* kísérletek azt mutatták, hogy a Ran közreműködése nem nélkülözhető. RanGTP ill. RCC1 ektopikus expressziója meggátolja a maghártya lebomlását, ugyanez idézhető elő az Imp- α IBB doménjének kifejeztetésével. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a NE (nuclear envelope) bizonyos összetevőit, az NLS szekvenciával rendelkező laminB-t és a lamin-kötő belső magmembrán fehérjéket (MAN1, LEM2, King és mtsai., 2006) a mitotikus citoszólban az Imp- α /Imp- β heterodimer horgonyozza ki és ezáltal segíti elő a magmembrán teljes lebomlását (Mühlhäusser és Kutay, 2007).

A kromoszómák szétválása után telofázis-ban a maghártya ismét felépül a dekondenzálódó kromoszómák körül. A RanGTP-Importin rendszer szerepét, a poszt-mitotikus sejtmagmembrán újra-formálódásában egyaránt bizonyították élesztőben, karmosbeka petekivonatban, fonalféregben (*Caenorhabditis elegans*) és muslicában (Askjaer és mtsai., 2002; Hetzer és mtsai., 2000; Ryan és mtsai., 2003; Timinszky és mtsai., 2002). A Ran/Imp- β rendszer hibátlan működése szükséges a sejtmaghártya integritásának fenntartásához, a nukleoporinok kromatin-lokalizációjához és az NPC-k kialakulásához is (Mattaj, 2004).

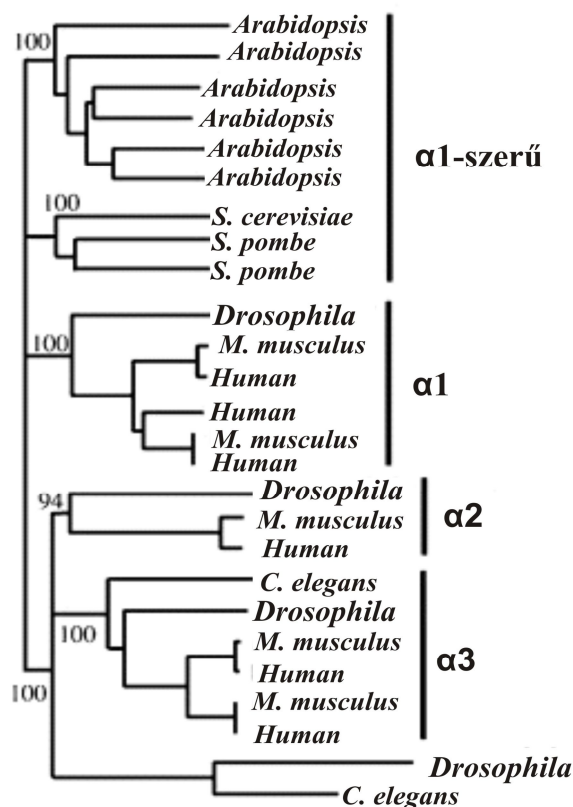
3. Az Importinok molekuláris felépítése

3.1. Az Importinok evolúciós eredete

Az importinok/karioferinek evolúciósan konzervált fehérjék, valószínűleg egy közös őstől erednek, szekvencia azonosságuk aránylag alacsony (20%), de hasonló

molekulasúlyúak és szerkezeti felépítésűek. A fehérjecsalád általános jellemzője, hogy rokon eredetű szekvenciák többszörös ismétlődései speciális, szuperhelikális szerkezetet alakítanak ki, ami szelektív fehérjekötést tesz lehetővé (Conti és mtsai., 1998; Huber és mtsai., 1997). Az Imp- α -ban ez a jellemző ismétlődés az ARM (armadillo) szekvencia, az Imp- β -ban pedig a HEAT motívum. Az elsőként azonosított karioferin az Imp- α volt. A karmosbéka petekivonatból izolált Imp- α , 44%-os szekvencia azonosságot mutatott a sarjadzó élesztő (*Saccharomyces cerevisiae*) Srp1 fehérjével (Loeb és mtsai., 1995). Később a sarjadzó élesztőben még 14 karioferint azonosítottak, amelyek közül kilenc az importban, négy pedig az exportban vesz részt (Goldfarb és mtsai., 2004).

Az emberi genomban ez idáig 22 Importint írtak le, közülük hat tartozik az Imp- α fehérjecsaládba (Görlich és Kutay, 1999). Filogenetikai vizsgálatok kimutatták, hogy az *imp- α* gének többsége három (α 1, α -2 és α -3) alcsaládba (5. ábra) sorolható (Hogarth és mtsai., 2006; Köhler és mtsai., 1999; Malik és mtsai., 1997). Az egyes alcsaládokon belül 85%-os, a különböző alcsaládok tagjai között 50%-os átlagos szekvencia azonosságot találtak (Quensel és mtsai., 2004).



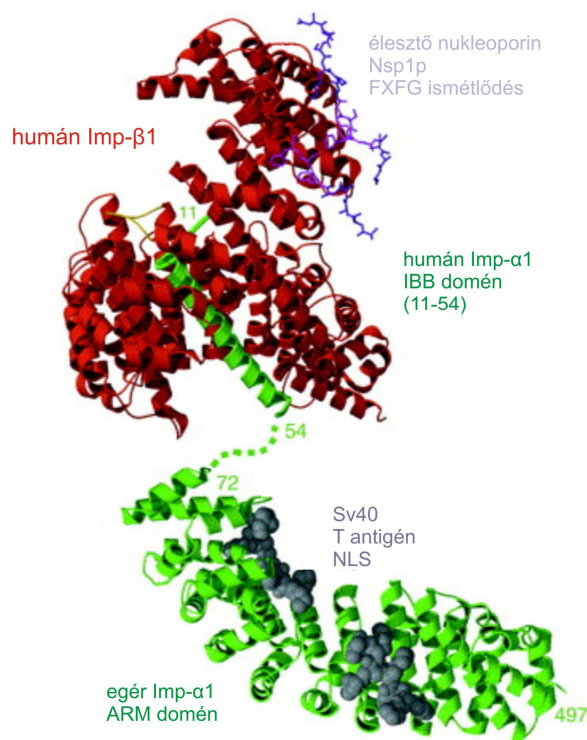
5. ábra Az eukarióta *imp- α* gének családja (Mason és Goldfarb, 2009 alapján).

Míg az élesztőben és a növényekben található Importinok kivétel nélkül az Imp- α 1 alcsaládhoz tartoznak, a magasabb rendű szervezetekben mindhárom csoport képviselői jelen vannak (Köhler és mtsai., 1997). A fonalféreg három Imp- α fehérjéje közül csak az *IMA-3* sorolható az Imp- α 3 csoportba, másik kettő egy nem konvencionális alcsaládba tartozik (Geles és Adam, 2001, Geles és mtsai., 2002). Az *ecetmuslica* mindhárom fő alcsaládból rendelkezik egy képviselővel (Goldfarb és mtsai., 2004, Mason és Goldfarb, 2009). A közelmúltban azonosítottak még egy *muslica imp- α* gént, az *imp- α 4*-t (Phadnis et al., 2012), amely nem tartalmaz kanonikus, az Imp- β kötéséhez szükséges, IBB domént, ezért nem sorolható a konvencionális *imp- α 3* alcsaládba. Az emberi genomban három *imp- α 1*, egy *imp- α 2* és két *imp- α 3* gén található (Hogarth és mtsai., 2006). Úgy tűnik, hogy a szervezetek fejlettségi fokával nő az *imp- α* gének száma, amely a gerinceseknél éri el a legmagasabb számot és változatosságot. Ezzel párhuzamosan zajlott a funkciók specializálódása, minek folytán egyes paralógok szerepe kizárólag a transzportra, míg másoké főként a sejtosztódási folyamatokra koncentrálódott. Az emberi genom 22 importin fehérjéje közül az Imp- α 1, Imp- β , Imp7 és Exp-1 vesz részt a sejtosztódási folyamatok szabályozásában a többi háztartási funkciót lát el (Kalab és Heald, 2008).

3.2. Importin- α , az adaptor fehérje

Az 50-60 kDa molekulásúlyú Imp- α fehérjék szerkezete három részre osztható: az N terminális IBB (Imp- β kötő) domén, a középső, helikális ARM domén (NLS kötőhely) és a C terminális CASB (az export receptor kötő) domén (Chook és Blobel, 2001). A flexibilis, 44 aminosavból álló IBB domén (α 11- α 54) kettős feladatot lát el, köti az Imp- β -t és részt vesz a célfehérje disszociációjában. Az IBB domén N terminálisán található lineáris szerkezetet kialakító 13 bázikus aminosav (α 11- α 23) teremti meg azt az elektrosztatikus felületet, amely egyaránt kötődik az *imp- β* helikális, illetve lineáris savas felszínéhez is (HEAT 7-11 és savas hurok) (Cingolani és mtsai., 1999; Koerner és mtsai., 2003). Az IBB domén C terminális egysége (α 24- α 54) *imp- β* -kötött illetve -nem-kötött állapotban eltérő szerkezetű. Imp- β -kötött formában ez az egység helikális szerkezetet vesz fel, amely beleilleszkedik az Imp- β belső árkába (6. ábra). Nem-kötött állapotban viszont a teljes IBB domén lineáris szerkezetű, és az *imp- α* saját, ún. nagy NLS kötő doménjéhez kapcsolódva, kialakítja az Imp- α zárt konformációját, amely meggátolja a szubsztrátok megkötését (Fanara és mtsai., 2000;

Moroianu és mtsai., 1996). Az imp- α fehérje auto-inhibíciós képessége jelentősen hozzájárul a szállított molekulák megkötésének ill. elengedésének szabályozásához (Harreman és mtsai., 2003; Kobe, 1999). Mivel a kötések preferenciája időben és térben nagyon pontosan szabályozott, az egyes NLS-célféhérjék Imp- α -hoz viszonyuló eltérő affinitása és ezenfelül az Imp- α és a további közreműködők koncentrációs viszonyai is nagyban befolyásolják (Goldfarb és mtsai., 2004; Timney és mtsai., 2006).



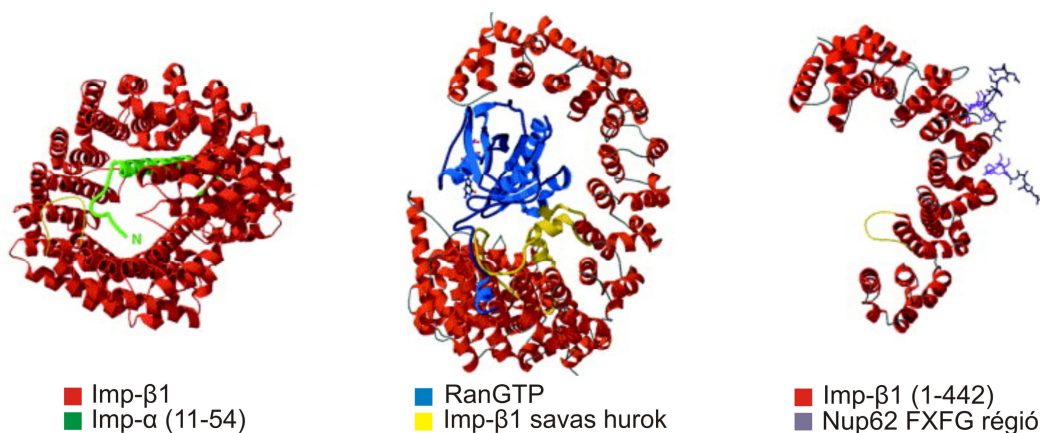
6. ábra Az Imp- α fehérje szerkezete (Chook és Blobel, 2001. nyomán). Az IBB doménnek az Imp- β -hoz való kapcsolódása teszi lehetővé, hogy az ARM domén NLS kötő helyei az NLS szekvenciával rendelkező fehérjéket megkössék.

A középső szerkezeti egység tízszer ismétlődő ARM motívumai, egy megnyúlt, jobbmenetű spirális szuperhelikális molekulát formálnak, amelyben az egymással szomszédos ismétlődések szoros kölcsönhatásban állnak (Conti és mtsai., 1998; Huber és mtsai., 1997). Egyetlen ARM ismétlődés három hélixből tevődik össze. Kettő (H1 és H2) alakítja ki a molekula külső, konvex felszínét, a harmadik (H3) pedig a belső, konkáv oldalon található ligand-kötő barázdát (Conti és Kuriyan, 2000; Conti és mtsai., 1998; Fontes és mtsai., 2000). A molekula belső felszínén az NLS-kötésért felelős oldalláncok két NLS-kötő zsebet alakítanak ki. Az N terminálishoz közelebb eső nagy- (ARM 2-4) és a C terminálishoz közelebb eső a kis NLS-kötő domént (ARM 7-8).

A C terminális külső H1 és H2 héliceinek felszínén (ARM 9-10) található a CAS-kötőhely (Herold és mtsai., 1998). A CAS fehérje (cellular apoptosis susceptibility protein) szintén egy karioferin, ami az Imp- α sejtmagból történő exportját végzi (Hood és Silver, 1998; Kutay és mtsai., 1997). Nemrégiben az IBB doménben is azonosítottak még két további régiót (α 12-18 és α 40-45), amelyeken keresztül, az Imp- α interakciót létesíthet a CAS fehérjével (Matsuura és Stewart, 2004). Szintén a 10. ARM ismétlődés külső hélixén, határoztak meg egy RanGTP-t közvetlenül megkötő régiót is, ami lehetővé teszi, hogy a CAS és RanGTP egyidejűleg kötődjön a C terminális régióhoz és az IBB domén N terminális aminosavaihoz is. A CAS fehérje egy allosztérikus regulátorként stabilizálja az Imp- α fehérje térbeli szerkezetét, úgy hogy biztosítja a lineáris IBB domén szoros kapcsolódását a nagy és kis NLS-kötő helyekhez is, ezáltal megnövelve az IBB domén autoinhibíciós képességét (Matsuura és mtsai., 2003).

3.3. Importin- β , a szállító egység

Az Importin- β nagycsaládjának képviselői átlagosan 18-20 HEAT (Huntingtin, Elongation faktor 3, protein foszfatáz 2A PR65/A alegysége és lipid-kináz (TOR)) ismétlődést tartalmaznak. A 40 aminosav méretű, spirális hajtú szerkezetű HEAT ismétlődések, két kihurkolódással összekapcsolt, antiparallel hélixből (A és B) állnak (Andrade és mtsai., 2001). A HEAT ismétlődések egymással interakcióba lépve, hasonlóan az ARM ismétlődésekhez, szuperhelikális szerkezet alakítanak ki (Chook és Blobel, 1999; Cingolani és mtsai., 1999).



7. ábra Az Imp- β fehérje szerkezeti változatossága a ligand kötés függvényében (imp- α IBB doménje, RanGTP és Nup62) Chook és Blobel, 2001, nyomán.

A rugószerű molekulában a spirálok hajlásszöge és relatív orientációja rendkívül flexibilis, ez biztosítja az Imp- β fehérjék széleskörű szubsztrát-felismerési és -kötési képességét. A legtöbb Imp- β fehérje 8. HEAT ismétlődése tartalmaz egy változatos méretű, többnyire savas aminosavakból álló inszerciót (savas hurok), ami tovább növeli a szubsztrát-specifitást. Ligand-kötés során, az S alakú szuperhelikális molekula harmadlagos szerkezetének konformációja, interakciós partnereitől függően (7. ábra), zártabb vagy lazább spirált formál (Fukuhara és mtsai., 2004). A molekula szerkezete akkor a legtömörebb, amikor a belső B (7-19 HEAT) héliceihez kötődik az Imp- α IBB doménje (Fukuhara és mtsai., 2004, Cingolani és mtsai., 1999). Kisebb a szerkezeti változás, ha RanGTP-vel lép kapcsolatba, szintén a belső B hélixeken (HEAT 1-4, 7, 8, 12-15) keresztül (Conti és mtsai., 2006; Lee és mtsai., 2005; Vetter és mtsai., 1999). Az Imp- β szerkezet akkor a legnyitottabb, amikor a külső, A hélixek (HEAT 5-6 és 6-7), a nup-ok konzervált FXFG motívumaival alakítanak ki hidrofób interakciót (Bayliss és mtsai., 2000, 2002).

4. Az *ecetmuslica importin- α* génjei és feladataik

A muslicának három importin- α paralóg génje van, az *imp- α 1*, az *imp- α 2* és az *imp- α 3*. Expressziójuk sok esetben átfed, de egymástól eltérő, specifikus mintázatot is mutat (Török és mtsai., 1995; Máthé és mtsai., 2000; Giarre és mtsai., 2002). A három fehérje közül az Imp- α 3 nélkülözhetetlen a szomatikus sejtekben az egyedfejlődés során (Mason és mtsai., 2003), ezt kifejeződési mintázata is alátámasztja, hiszen a muslica összes fejlődési stádiumában (a korai embrió kivételével) és szöveteiben expresszálódik. Hiányában megakad a lárvák fejlődése, elpusztulnak az L1-ből L2 stádiumba történő átalakulásnál és a kifejlett egyedek szöveteinek differenciálódása is zavart szenved. Szemben történő klón analízis során az *imp- α 3* gén vad allélját nem hordozó mozaik foltokban nem differenciálódnak a fotoreceptor sejtek (Mason és mtsai., 2003), ezzel szemben ektopikus sejtmagi felhalmozódása az érzékelő szőrök (mechano-sensor) súlyos hibáját eredményezi (Tekotte és mtsai., 2002). Az *imp- α 3* szerepe az evolúció során főként a sejtmagi import folyamatokra specializálódott (Máthé és mtsai., 2000; Tekotte és mtsai., 2002; Ting és mtsai., 2007). Az elmúlt években számos olyan, célfehérjét azonosítottak, aminek kizárólagosan az *imp- α 3* a receptora: az RCC1, (Nemergut és mtsai., 2001; Quensel és mtsai., 2004), a DNS polimeráz nagy-alegysége

(Máthé és mtsai., 2000) a hősoikk gének aktivációját indukáló hősoikk transzkripciósfaktor (dHSF) (Fang és mtsai., 2001), és a Wnt/ β -catenin szignálút antagonistájaként ismert Naked (Nkd) fehérje (Chan és mtsai., 2008). Az *imp- α 3* inaktivációja által okozott lárvális letalitást a paralóg importin gének kifejeztetése csak részlegesen menekítette. Az *imp- α 1* transzgén kifejeztetése átsegítette a lárvákat az első, esetenként még a második vedlésen, azonban az L3 stádiumban egységesen elpusztultak. Az *imp- α 2* gén túltermelésekor a lárvák egy része elérte a bábállapotot, de ezekből kifejlett egyed soha nem kelt ki. A menekítési kísérletek alapján feltételezhető, hogy az Imp- α 3 redundáns a lárvális fejlődés során az Imp- α 2 és az Imp- α 1 fehérjével, későbbi fejlődési szakaszokban pedig részlegesen redundáns az Imp- α 2-vel (Mason és mtsai., 2003). Ez a funkcionális szerep megegyezik a filogenetikai adatokkal (5. ábra), amelyek azt mutatják, hogy az Imp- α 3 és az Imp- α 2 között sokkal kisebb az evolúciós távolság (Köhler és mtsai., 1999; Mason és mtsai., 2002). Ennek ellenére az *imp- α 2* gén kifejeződése jelentősen különbözik az *imp- α 3*-tól. Nagyon erős a korai embrióban, a bábban és a felnőtt legyek ivarszerveiben. Lárvális szövetekben, az agy ill. adult szervkezdemények kivételével, nem expresszálódik (Török és mtsai., 1995).

Homozigóta állapotban az *imp- α 2* mutánsok egyedfejlődése teljes mértékben normális, a legyek elérik a felnőtt kort, ami azt jelzi, hogy Imp- α 2 hiányában nem szenved károsodást az általános sejtmagi import (Gorjánác és mtsai., 2002), viszont a mutáns kifejlett nőstények teljesen, a hímek pedig részlegesen (75%) sterilek. A súlyos nősténysterilitásnak az az oka, hogy a petefejlődés során a petesejtet és dajkasejteket összekötő gyűrűcsatornák elzáródnak és ez megakadályozza, hogy fontos citoplazmatikus faktorok a petesejtbe jussanak. Az alulfejlett ováriumokból ritkán lerakott peték sokkal kisebbek a vad típusú petéknél és jellegzetesen megrövidült, összeolvadt dorzális függelékekkel rendelkeznek (Gorjánác és mtsai., 2002). Az *imp- α 2* gén specifikus feladatot lát el az oogenezisben, amit az is alátámaszt, hogy az általa okozott nősténysterilitást *imp- α 1* és *imp- α 3* transzgének kifejeztetése nem tudja menekíteni (Mason és mtsai., 2002). Ezzel szemben a részleges hímsterilitást bármelyik paralóg menekíti (Mason és mtsai., 2002).

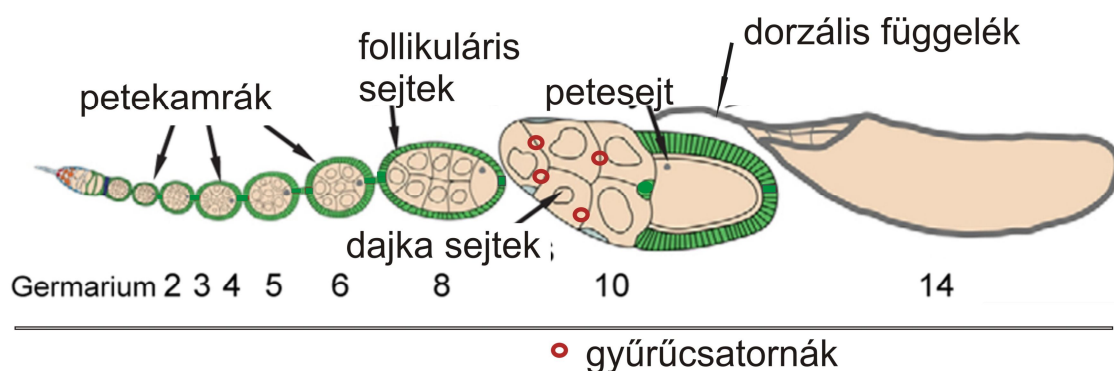
Az *imp- α 1* gén null mutációja szintén nem letális, de teljes hím-és nősténysterilitást okoz (Ratan és mtsai., 2008). A *imp- α 1* homozigóta nőstények ováriumai és a lerakott peték többsége a vad típushoz hasonlóak, bár a naponta lerakott tojások száma egy nagyságrenddel kisebb, mint a vad típus esetében. Feltételezik, hogy a nősténysterilitás oka egy esetleges viselkedési fenotípus, ami a petelerakásban vagy a hibás

párosodási viselkedésben nyilvánul meg (Ratan és mtsai., 2008). Ezzel ellentétben a *imp- α 1* null mutáns hímekben egyáltalán nem képződnek életképes hímvarsejtek. A tesztiszek mérete kisebb a vad típusnál, a cisztákban található mutáns spermatociták flagellumai rendezetlenek, sejtmagjaik rendellenesen nagyok és kerekék. A mutáns fenotípust kizárólagosan az *imp- α 1* transzgén kifejeztetése tudja helyreállítani (Ratan és mtsai., 2008).

Az *imp- α* géneknek a magasabb rendű szervezetekben történő amplifikációja feltehetően az ivarsejtképzés speciális igényére adott evolúciós válaszként értelmezhető (Mason és Goldfarb, 2009).

4.1. Az ecetmuslica oogenezisének sajátosságai

Az oogenezis az ecetmuslica petefészkében (ovarium) játszódik le. A petefészek 15-17 petecsőből áll, az egyes petecsővek a fejlődés egymást követő (1-14) stádiumaiban levő petekamrák lineáris sorozatát foglalják magukba (8. ábra). A petecsővek csúcsán található germáriumban az őscsírasejtek aszimmetrikus osztódása létrehoz egy új őscsírasejtet és egy másik leánysejtet, amiből kialakul a cisztoblaszt. Ez utóbbi, további négy mitózissal, kialakítja a 16 sejtes cisztát.



8. ábra A muslica petefejlődése (Drummond-Barbosa, 2001. nyomán)

Mivel az osztódások során nem megy végbe teljes citokinézis, a 16 sejtes ciszta sejtjei, az osztódási betüremkedésekből származó stabilizálódott csatornákon, úgynevezett gyűrűcsatornákon keresztül kapcsolatban maradnak. A 16 sejtből egy petesejtté differenciálódik, a maradék 15 politén dajkasejtté alakul. A cisztát testi sejtekből álló follikuláris sejtréteg veszi körül, kialakítva az első stádiumú petekamrát, ami a

germáriumot elhagyva a több fejlődési stádiumon keresztül halad a petecső poszterior vége felé.

A petesejtet a dajkasejtekkel összekötő gyűrűcsatornák biztosítják, hogy a transzkripcionálisan szinte teljesen inaktív petesejtbe átjussanak a dajkasejtekben szintetizált mRNS-ek és fehérjék. A petefejlődés során először egy lassú, szelektív anyagáramlás folyik a dajkasejtek irányából a petesejt felé, melynek során a különböző, morfogén molekulák felhalmozódnak a petesejt meghatározott pontjain, meghatározva ezzel a petesejt és egyben a leendő embrió szimmetriatengelyeit (Van Eeden és St Johnston, 1999). Majd a petefejlődés 10. stádiumában a dajkasejtek teljes citoplazmája átpumpálódik a petesejtbe a gyűrűcsatornákon keresztül (dumping) (Mahajan-Miklos és Cooley, 1994). Az érett pete kialakulásának feltétele a gyűrűcsatornák átjárhatósága. Ehhez döntő mértékben járul hozzá, egy aktin kötő fehérje, a Kelch, ami a csatornák aktin szálait rendezett kötegekbe szervezi (Robinson és mtsai., 1994).

4.2. A korai embriófejlődés a muslicában

A megtermékenyítéskor a meiózis I metafázisában levő petesejt befejezi a meiotikus osztódást és a négy anyai eredetű sejtmag közül az egyikből kialakul a női ősmag, a másik háromból pedig az ún. sarki test. A muslicában a női gamétaképzés sajátossága, hogy osztódásai centroszóma nélkül zajlanak le, ezért a meg nem termékenyített petesejtben, sohasem látunk MT asztert. Az embrió fejlődéséhez szükséges centroszóma a megtermékenyítéskor a hímivarsejt által hozott, módosult centriólum "basal body" köré szerveződik meg, majd a centroszómális MT nukleáció egy hatalmas asztert formál. A spermium magjának gyors dekonzenzációjával kialakuló haploid hím ősmag 15-16 perccel a peterakás után párba áll a nőivel, majd az időközben megkettőződött centroszóma a két szorosan együttálló ősmagot összekötő képzeletbeli egyenesre merőleges tengely két ellentétes pólusára vándorol. Ezzel kezdetét veszi az első, ún. gonomerikus osztódás. Ez azt jelenti, hogy mivel a sejtmaghártyák csak részlegesen, az orsó pólusain bomlanak le (Harel és mtsai., 1989), az anafázisig az apai és anyai kromoszómakészlet egymástól térben elkülönülten mozog, és csak a telofázisban keveredik össze, létrehozva a valódi diploid sejtmagokat. Mindeközben, a sarki testet formáló, három női haploid sejtmag prometafázisig mimikálja az ősmagvak viselkedését, majd felfüggesztik a sejtciklust, kromoszómáik

kondenzált állapotban maradnak és sejtmaghártyájuk lebomlik. Kromatinjukon nagy mennyiségben mikrotubulusok nukleálódnak és a kromoszómák, centromerjeikkel a középpontban, csillagszerű alakzatba rendeződnek. (Foe és mtsai, 1993).

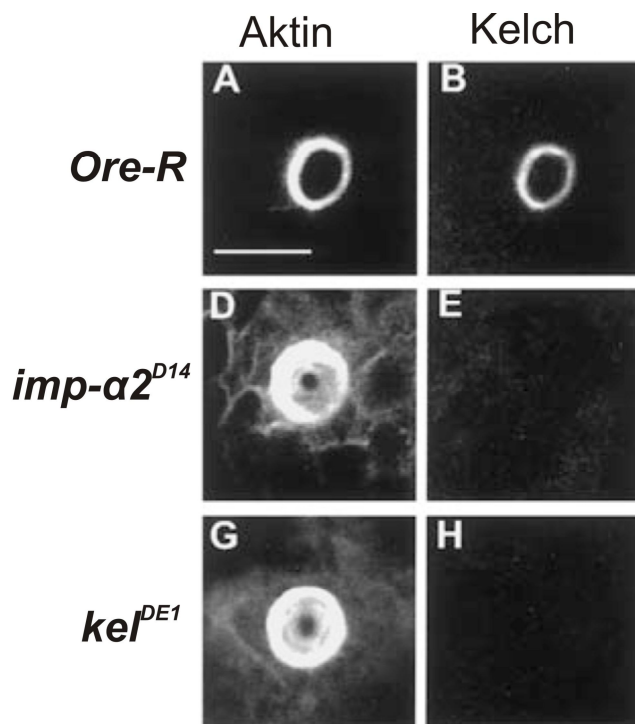
A gonomerikus osztódás után még 13 szinkron magosztódás játszódik le gyors egymásutánban, átlagosan 10 perces osztódási ciklusokkal. A rendkívüli sebességű ciklusokban csak a sejtmagok osztódnak citokinézis nélkül egy közös citoplazmában (szincícium). A sejtmaghártya lebomlása továbbra is csak részlegesen, az orsó pólusokon történik meg és az egyes osztódások közötti G fázisok kimaradnak.

A szinciciális osztódásoknak két szakasza van. Az első során (1-9. ciklus) az úgynevezett pre-blasztoderma állapotban 512 sejtmag keletkezik, míg a második során (10-13. ciklus) a szinciciális blasztoderma szakaszban az embrió eléri a 6000 sejtmagos állapotot. A pre-blasztoderma stádiumban a sejtmagok mélyen a tojás belsejében helyezkednek el és mindegyiket szikanyag nélküli, saját, kis citoplazma „sziget” vesz körül. A 8. ciklusban még közel szinkron-osztódó sejtmagok nagy része elindul az embrió felszíne felé. A 9. ciklusban néhány sejtmag elkezd vándorolni az embrió poszterior vége felé és közben folytatják az osztódást. A 10. ciklus szinciciális blasztoderma periódusában az embrió poszterior végére vándorolt sejtmagok lefűződnek a közös citoplazmából és kialakulnak a későbbi ivarszervek kezdeményei, a poláris-sejtek (pole cells). A felszínre ért sejtmagok egy rétegben helyezkednek el a közös citoplazmában és még kétszer, közel szinkron osztódnak a kéreg (kortex) síkjában. Mivel az embrió mérete nem változik, a számtalan osztódó sejtmag egyre jobban kitölti a rendelkezésre álló teret és végül kiszorítja a sarki testet a kortikális régióból a belső szikanyagba, ahol az lebomlik. A 13. osztódás utáni interfázisban a szikanyag-mentes, úgynevezett peri-plazma jelentősen megnövekedik az embrió belseje felé, a plazmamembránok befűződnek, a sejtmagok megnyúlnak és kialakul a sejtes blasztoderma, még mielőtt az embrió belépne a 14. mitotikus ciklusba. Az utolsó ciklus már egy óra hosszú és az 50. perc körül megkezdődik a gasztruláció folyamata. Ekkor indul meg a zigotikus gének döntő többségének az expressziója is (Foe és mtsai, 1993).

A szinciciális osztódásokhoz szükséges mRNS-t és fehérjét, a tojás citoplazmájába előre “betöltve” az anya biztosítja az embrió számára. A korai embrionális fejlődéshez szükséges géneket, amelyek termékei összetevői ennek a raktárnak, anyai hatású géneknek nevezzük.

4.3. Az *imp-α2* speciális szerepe az oogenezisben

Az *imp-α2*^{D14} homozigóta null mutáns petekamrák gyűrűcsatornáiban a Kelch fehérje, nem lokalizálódik, így a kortikális aktin sejtíváz fellazulásának következtében, azok beszűkülnek (9. ábra). A jellegzetes zsákszerű tojás fenotípust a “dumping” folyamat hiánya idézi elő a mutáns anyák petéiben. (Gorjánác, 2002).



9. ábra A beszűkült gyűrűcsatornák megakadályozzák a petesejtbe irányuló tápanyag transzportot. (A-B) Vad típusú gyűrűcsatorna aktin és Kelch lokalizációja. (D-G) Az *imp-α2*^{D14} és *kelch* deléciós mutánsokban a rendezetlen aktin kötegek eltömítik a gyűrűcsatornákat, Kelch lokalizáció pedig nem figyelhető meg (Gorjánác, 2002.)

Ugyanakkor, a dajkasejtek citoplazmájában normális mennyiségű Kelch van jelen, ami azt jelenti, hogy az Imp-α2 a Kelch fehérje gyűrűcsatornában történő felhalmozódásért felelős (Gorjánác és mtsai., 2002). Az Imp-α2 fehérje hiánya által okozott nősténysterilitás menekítését több különböző, *in vitro* mutagenézissel előállított mutáns alléllal is megkísérelték. A fehérje kis és nagy NLS-kötő helyén egyaránt elrontott (*imp-α2*^{NLSB⁻}), illetve az export receptor kötő régióban mutáns (*imp-α2*^{CASB⁻}) transzgének null mutáns háttéren nem menekítették a petefejlődési hibát, jelezvén, hogy ezek a domének fontos szerepet játszanak az Imp-α2 fehérje petefejlődésében betöltött funkciójában. Ezzel szemben, a ΔIBB, és SNLSB⁻ valamint az IBB doménen belül található, foszforilálható szerint alaninra cserélő allélok (S37A, S56A, S98A)

menekítették az ovárium fenotípust, azaz a mutáns nőtények, vad típusú társaikhoz mérten, közel azonos számú petét raktak. Ezek a mutáns allélok azonban teljesen, vagy részlegesen blokkolták a lerakott petékben az embriók fejlődését, azaz lárvák nem, vagy csak ritkán keltek ki belőlük (Gorjánác és mtsai., 2006). Az embriók letalitásának okát a 97%-os letalitást mutató *S56A* foszforilációs mutánsban vizsgálták részletesebben. Azt találták, hogy az első, szinkron-osztódások lelassulnak, ill. elakadnak a mitózisok korai szakaszában és csak az embrióknak csak közel 20 %-a jutott el a 10-13. ciklusig. Azokban az embriókban pedig, amelyek elérték a fejlettebb állapotot a ciklusok elvesztették szinkronitását és a vad típussal ellentétben, a sejtmagok sem oszlottak el egyenletesen a citoplazmában.

4.4. A *Ketel* az *importin-β* *Drosophila* ortológja

A humán *imp-β* génnel 60% homológiát mutató *Drosophila imp-β* gént (Lippai és mtsai., 2000) korábban, mint domináns nőtényszeril mutációt azonosították és *imp-β^{KetD}* vagy *Fs(2)Ket^D* néven írták le (Erdélyi és mtsai., 1997). Az *imp-β^{KetD}/+* nőtények által lerakott tojások morfológiája a vadtypussal megegyező, de ezekből nem fejlődik embrió. Vizsgálata során kiderült, hogy az *Imp-β^{Ketel}* fehérje nemcsak a sejtmagi importban esszenciális, hanem a sejtosztódás végén az új sejtmaghártya kialakulásában is fontos szerepe van (Tirián és mtsai., 2000, 2003). Érdekes módon, az *Imp-β^{KetD}* mutáns fehérje embriókba injektálva nem akadályozta meg az általános sejtmagi importot és nem okozott zavart a mitotikus orsók kialakulásában és lebomlásában sem. Az injektálás helyén a kromoszóma szegregálódás a kontroll embriókhoz hasonlított (Timinszky és mtsai., 2002).

Az *imp-β^{KetD}* allélben egy EMS mutagenézis okozta pontmutáció prolin-leucin cserét eredményezett az *Imp-β^{KetD}* fehérje 446-os pozíciójában. A Pro⁴⁴⁶ funkcionálisan egy fontos aminosav, a HEAT 10. és 11. ismétlődést összekapcsoló régióban helyezkedik el és leucinra való cserélődése csökkenti a mutáns *Imp-β^{KetD}* fehérje flexibilitását. Ez a molekula nyitottabb szerkezetét eredményezi, ezáltal megváltoztatva az *Imp-β^{Ketel}* fehérje RanGTP/GDP-kötő képességét (Timinszky és mtsai., 2002): feltehetően ez az oka a nagyon erős domináns fenotípusnak. Az eredeti *imp-β^{KetD}* mutáció második mutagenézisével előállított recesszív revertáns mutációk közül az *imp-β^{KetRX13}*, *imp-β^{KetRP13}* és *imp-β^{KetRE34}* homozigótában, L2 stádiumos lárvális letalitást

eredményeztek, bármiféle morfológiai hiba nélkül. Ezenfelül, az *imp-β^{KetRE34}* hidegérzékeny domináns nősténysterilitást is mutatott (Erdélyi és mtsai., 1997).

Hasonlóan az *imp-α* génekhez, az *imp-β^{Ketel}* is kifejeződik a petefejlődés során. A petekamrák dajkasejtjeinek citoplazmájában és sejtmaghártyájánál, valamint a follikuláris sejtek maghártyáján feldúsulva mutatható ki. (Lippai és mtsai., 2000). Az *Imp-β^{Ketel}* fehérje korai embrióban történő lokalizációját rodamin-jelölt *Imp-β* fehérje szinciciális embrióba injektálásával követték. Az *Imp-β* az interfázisos sejtmagok maghártyájához, illetve az osztódási orsók külső felszínéhez kötődött (Trieselmann és Wilde, 2002). A közelmúltban az *imp-β^{KetGFP}* allélt expresszáló petében vizsgálták a fehérje lokalizációját (Katsani és mtsai., 2008). A fehérje inter- és profázisban a sejtmaghártyánál, metafázistól anafázis végéig a mitotikus orsónál lokalizálódott, majd telofázisban ismét a nukleáris membránnál halmozódott fel. Az *imp-β^{Ketel}* gén zigotikus kifejeződése, csak a gasztruláció folyamatakor kezdődik meg, majd a lárvális fejlődés során csak a mitotikusan aktív, diploid sejtekben marad fenn. A nem osztódó, lárvális szövetekben a sejtmagi import folyamatot a korábban képződött, rendkívül hosszú életidejű (féléletidő: öt nap) *Imp-β^{Ketel}* fehérje látja el (Villanyi és mtsai., 2008).

CÉLKITŰZÉS

Az importinok és a RanGTP által vezérelt sejtmagi transzport jól ismert mechanizmusa mellett, a Ran útvonalnak a mitózis szabályozásában betöltött szerepéről is egyre több ismeret áll rendelkezésre. A két eltérő feladat szabályozása, teljesen analóg módon valósul meg, és ez a mechanizmus a különböző szervezetekben az élesztőtől az emberig evolúciósan konzervált. Míg a törzsfajlás különböző szintjein levő szervezetek mindegyike egyetlen Ran fehérjét kódoló génnel rendelkezik, addig közvetítő partnereinek, az importin géneknek a száma egyre növekedett az élőlények szervezettségi fokával párhuzamosan és ezzel a szerepük is egyre specializálódott. A jelenlegi kutatások elsődlegesen arra irányulnak, hogy a különböző fajok importin ortológjai milyen transzport-, és/vagy mitotikus folyamatban vesznek részt, illetve hogy az egyes fajokon belüli paralóg gének, miként specializálódtak a különböző feladatok ellátására. Az ecetmuslica mindhárom importin- α alcsalád képviselőjével rendelkezik és ismeretes, hogy bár a muslica paralógok átfedő funkciókkal is rendelkeznek, az *imp- $\alpha 3$* főleg az általános sejtmagi transzportban, míg az *imp- $\alpha 1$* és *imp- $\alpha 2$* az ivarsejtképződésben játszik szerepet.

A különböző importinoknak a mitózisban, és azon belül az osztódási orsó kialakulásában betöltött szerepét *Drosophila melanogasterben in vivo* még nem vizsgálták. Erre kiváló eszközt szolgáltat az ecetmuslica szinciciális embriója. Az embriófejlődés első két órájában könnyen megfigyelhetők a közös citoplazmában egymást gyorsan követő mitózisok. Az ehhez szükséges mitotikus faktorok mindegyike nagy mennyiségben van jelen, így aktivitásuk szabályozásának mechanizmusa jól tanulmányozható.

Munkánk célja, hogy részletesen vizsgáljuk az importinoknak a *Drosophila* embrionális fejlődésében betöltött szerepét. Az *imp- α* gének és az *imp- β* közötti kapcsolatot feltáró genetikai analízisekkel, illetve a mutáns anyák embrióinak sejtbiológiai és biokémiai vizsgálatával az volt a célunk, hogy fényt derítsünk az egyes *imp- α* paralógok szerepére, és megismerjük az Imp- $\alpha 2$ /Imp- β^{Ketel} komplex funkciót az ecetmuslica korai embrionális osztódásai során. Ennek érdekében a következő vizsgálatokat terveztük:

1. Az *imp- $\alpha 2^{D14}$* és az *imp- β* recesszív allélok genetikai analízise.
2. Az *imp- $\alpha 2^{D14}$ /imp- $\beta^{KetRE34}$* interakció molekuláris genetikai és biokémiai hátterének feltárása DNS szekvenálással, homológ modellezéssel és pull

down kísérletekkel.

3. Az *imp- α 2* paralóg specifikus szerepének tisztázása genetikai interakciós kísérletekkel és immunocitológia segítségével.
4. Az Imp- α 2 NLS függő mitotikus szabályozásának vizsgálata genetikai és sejtbiológiai kísérletekkel.
5. Az Imp- α 2/Imp- β^{Ketel} komplex funkcióinak feltárása sejtbiológiai módszerekkel.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

1. Felhasznált *Drosophila melanogaster* törzsek

A *Drosophila* törzsek fenntartásához és a keresztezésekhez az általánosan elterjedt kukoricaliszt-élesztő alapú muslica táptalajt használtuk. Keresztezéseinket 25 °C-on végeztük. A kísérleteinkben felhasznált *imp-α2^{D14}* allélt (az *imp-α2* gén null allélja; Török és mtsai., 1995), illetve a *pUASP2* vektorba klónozott, az *imp-α2* gén, különböző régióinak *in vitro* mutagenézissel előállított, mutánsait (Gorjánác, 2006), már korábban leírták, összefoglalásukat a 2. táblázat mutatja.

<i>imp-α2</i> mutáns vonalak
<i>yw; imp-α2^{D14}/CyO; P{UAS-ΔIBB}/TM6,Ubx</i>
<i>yw; imp-α2^{D14}/CyO; P{UAS-SNLSB⁻}/TM6,Ubx</i>
<i>yw; imp-α2^{D14}/CyO; P{UAS-NLSB⁻}/TM6,Ubx</i>
<i>yw; imp-α2^{D14}/CyO; P{UAS-CASB⁻}/TM6,Ubx</i>

2. táblázat. Az *imp-α2* gén fő doméjeiben mutáns konstrukciókat hordozó vonalak összefoglalása.

A fenotípusok menekítéséhez, a szintén a harmadik kromoszómás, *pUASP2*-alapú, vad *imp-α2* cDNS-t kifejező *P{UAS-imp-α2cDNS}* és az *imp-α2* teljes genomi régiójának szekvenciáját hordozó, *P{imp-α2⁺}* konstrukciókat (Gorjánác, 2002) használtuk. Az *imp-α1i²⁸⁹²¹*, *imp-α2i³⁴²⁶⁵*, *imp-α2i³⁴²⁶⁶*, *imp-α3i³⁶¹⁰³* és *imp-α3i* RNSi gén-csendesítő konstrukciókat tartalmazó transzgénikus törzseket a VDRC törzsközpontból szereztük be (Dietzl és mtsai. 2007). A *pUASP2*-alapú transzgéneket és a *pUAST* RNSi konstrukciókat az ovárium-specifikus *nos-Gal4:VP16* (Van Doren és mtsai. 1998) driverrel fejeztettük ki. Az *imp-β^{Ketel}* recesszív revertáns vonalakat *imp-β^{KetRE34}*, *lt,bw/CyRoi*, *imp-β^{KetRP13}*, *lt,bw/CyRoi*, *imp-β^{KetRX13}*, *lt,bw/CyRoi* (Erdélyi, 1997) és a vad típusú genomi *imp-β^{Ketel}*-t kifejező *w¹¹¹⁸*; *imp-β^{Ketel}* törzset (Lippai és mtsai. 2000), Szabad János bocsátotta rendelkezésünkre. A *piggyBac*.inszerciákat hordozó *imp-β^{Ketel}* törzseket *w¹¹¹⁸*; *Fs(2)Ket^{c02473}/CyO*, *w¹¹¹⁸*; *Fs(2)Ket^{e02657}/CyO*, *w¹¹¹⁸*; *Fs(2)Ket^{e03750}* (Thibault és mtsai. 2004) az Exelixis Collection, Harvard Medical School gyűjteményéből szereztük be. Az *imp-α1* gént kiejtő *w¹¹¹⁸*; *Df(3L)imp-α1^{Sl}ca/ TM6B* deléciót (Ratan és mtsai. 2008), az *imp-α3^{17.7}/TM3(KR-GFP)*, *Sb* (Ting és mtsai. 2007)

mutánst és az *UTR^A-imp-α* konstrukciókat tartalmazó, második kromoszómás *UTR^A-imp-α1*, *UTR^A-imp-α2* és *UTR^A-imp-α3* (Mason, 2003) törzseket Robert J. Fleming (Trinity College, Hartford) szíves közreműködésével kaptuk meg. A *w¹¹¹⁸*; *RanGap^{EP1173}/CyO* -#16995 (Rørth 1996), a *yw*; *P{EPgy2}RanGap^{EY21763}* #22503 (Bellen és mtsai. 2004), a *Df(3L)w5.4/TM6,Tb* #4551 (Anderson és mtsai. 1995) vonalak a Bloomington Törzsközpontból származnak (Indiana University). Vad típusú kontrollként az Oregon-R törzs szolgált. A kísérletekben használt genetikai markerek leírása megtalálható a (<http://flybase.org/>) adatbázisában.

2 Az *imp-α2* mutáns transzgének rekombinálása a *nos-Gal4* kromoszómára

Az *UAS-ΔIBB/nos-Gal4*, *UAS-SNLSB⁻/nos-Gal4*, *UAS-NLSB⁻/nos-Gal4* és *UAS-CASB⁻/nos-Gal4* heterozigóta nőtények utódai közül a rekombináns jelölt hímeket a dupla P elem inszerció okozta erősebb „miniwhite” szemszín alapján választottuk ki. Mivel, a csak egy P-elem beépülést hordozó állatok közül a *nos-Gal4* konstrukttal rendelkezőnek volt erősebb szemszíne a mutáns *imp-α2* konstruktokat hordozókhoz képest, ezért az *imp-α2* transzgének jelenlétét ellenőriztük le *imp-α2* specifikus primerekkel, PCR módszerrel. A jelölt hímekből, harmadik kromoszómás balanszeres nőtényekhez való keresztezés után, kromoszómális DNS-t izoláltunk az “1 légy” módszerben leírtak szerint (Gloor, 1993) és az *imp-α2* gén 2. és 3. intronját közrefogó *imp-α2*-primer1 (5'-ATGAGTAAGGCGGATTCTAACTCAC-3') és *imp-α2*-primer7 (5'-CCATTTGCAGCAGTTTGACCAGG-3') primerpárral PCR reakciót végeztünk. Ha az állatok genomjában jelen volt valamelyik, intronokat nélkülöző *imp-α2* cDNS transzgén is, akkor egy kisebb méretű, 880 bp hosszúságú PCR termék is keletkezett, ami a sikeres rekombinációs esemény bizonyítékául szolgált. A rekombinánsokat *TM6,Ubx* kromoszómával balanszírozva állítottuk törzsbe.

3. A mutáns anyáktól származó embriók életképességének vizsgálata

A keresztezésekből a vizsgálni kívánt allékombinációjú szüzeket gyűjtöttünk (20-30), majd *Oregon-R* hímeikkel (20) kereszteztük. A 3-6 napos nőtényeket aktív szénnel színezett friss almás agar táptalajon (22,5 gr agar 750 ml vízben főzve, 250 ml almalével és 25 gr cukorral kiegészítve) 12 órát petéztettük 25 °C-on. Ezt követően az embriókat újabb lemezre, legalább 4x25-ös sorokba raktuk és 28 óra elteltével

megszámoltuk az elhagyott pete-burkokat. Az embriók életképességét az üres peteburkoknak az összes lerakott peteszámra vonatkoztatott százalékában határoztuk meg. Minden kísérletet, legalább háromszoros ismétlésben végeztünk.

4. Statisztikai elemzések

Eredményeink feldolgozását az ORIGIN programmal végeztük. A statisztikai elemzés az adatok leíró statisztikáját (átlag, szórás, átlag hibája), variancia analízisét (ANOVA) és az átlagok páronkénti összehasonlítását (Scheffe-teszt) foglalta magába.

5. Az *imp-β^{KetRE34}* mutáns DNS szekvenciájának meghatározása

Az *imp-β^{KetRE34}* allélt *yw*; *y+CyO* háttérre tettük és az így szelektálhatóvá vált homozigóta 2. stádiumú lárvából az “egy légy” PCR-ben leírtaknak megfelelően izoláltunk genomi DNS-t. Az *imp-β^{Ketel}* gén, kódoló régióját lefedő DNS szekvenciát (682-4428, a FlyBase számozásnak megfelelően) két átfedő, 2257bp és 1699bp hosszú szakaszban, High Fidelity PCR Master Kit (Roche Applied Science) felhasználásával amplifikáltuk PCR reakcióban. Az első szakaszhoz, a transzlációs start előtt 83 bázispárral kezdődő Forward 682 és Reverse 2938 primerpárt, a másodikhoz, amely a terminációs kodon után 134 bázispárral ér véget, a Forward 2730 és Reverse 4428 primerpárt használtuk. Ezek után az amplifikált termékeket agaróz gélből izoláltuk és QIAGEN DNA Purification Kit segítségével tisztítottuk. Az így előállított DNS-t szekvenáltattuk ABI 3730XL DNS szekvenátorral. A szekvenáláshoz használt primerek:

Forward 682: 5'-TCCATCACCCACACAGACGCAC-3'

Reverse 2051: 5'-GTCAGCACATCGTTCTGACTGGTTC-3'

Reverse 2489: 5'-AACTGCAGAGCACCTCGAGCATAG-3'

Forward 2730: 5'-CTTAAAGCCGCTCGTGGAGCAAG-3'

Reverse 2938: 5'-TATGTCTCGTTGATAGCCGCCTCG-3'

Forward 3259: 5'-AGCGCTTGAACCAGGTGATGCAG-3'

Reverse 4428: 5'-CAAGAATCGACACACCATTCGTTC-3'

A kapott szekvenciáknak az aktuális Release 3 *Drosophila* Genom Projektben megadott, vad típusú *imp-β^{Ketel}* genomi DNS szekvenciájával történő összehasonlítását

az NCBI honlapján elérhető **BLAST** programcsomag
(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) **Align two** programjával végeztük.

6. Az Imp- β^{KetD725N} mutáció *in silico* vizsgálata

A modellezéseket a MODELLER program segítségével végeztük és a Protein Data Bank-ban (PDB) megadott humán Imp- β /Imp- α -IBB-domén komplex adatait használtuk, mint templátot (PDB code:1QK, Cingolani és mtsai., 1999). Az energia állapotokat az ANOLEA (Atomic Non-Local Environment Assessment) programmal értékeltük ki.

7. Embriók gyűjtése és fixálása az immunfestésekhez

A nőtényeket 2 óra hosszat petéztettük, majd további két órán keresztül 25 °C-on tartottuk, hogy a legfiatalabb embrió is elérhesse a 12. osztódási ciklust. Ezek után az embriókat 4%-os Nátrium-hypoklorit oldatban 4 percig áztattuk a korion burok eltávolítása céljából. A dekorionozált embriókat csapvízzel, utána 0,2%-os Tritonnal mostuk, majd különböző módokon fixáltuk és a felhasználásig metanolban -20 °C-on tároltuk.

Metanolos fixálás: a dekorionizált embriókat metanol:n-heptán 1:1 arányú keverékében 45 másodpercig erősen ráztuk, a vitellin membrán eltávolítása érdekében. Az alsó, metanolos fázis aljára süllyedt devitellinizált embriókat még háromszor mostuk, 5-5 percig, metanolban forgatva. Ezután, metanol:EGTA 9:1 arányú oldatában kétszer 5 percig, majd ismét metanolban, kétszer 10 percig mostuk.

Gyors formaldehides fixálás: a dekorionizált embriókat n-heptánba tettük és azonos térfogatú 37%-os formaldehid oldat hozzáadása után 15 másodpercig erősen ráztuk, majd 5 percen át forgatva inkubáltuk. A fázisok szétválása után az alsó formaldehides fázist eltávolítottuk, majd azonos térfogatú metanolt hozzáadva 45 másodpercig erősen ráztuk. Ezután, a felső, n-heptános fázist eltávolítottuk és még háromszor 5 percig metanollal mostuk az embriókat. (Rothwell és Sullivan, 2000).

Lassú formaldehides fixálás: a dekorionizált embriókat 3,7%-os formaldehidet tartalmazó PEM pufferben (100 mM Pipes, pH 6,9, 1mM EGTA, 1mM MgSO₄) és azonos térfogatú n-heptánban 15 másodpercig erősen ráztuk, majd forgatva még 20 percig inkubáltuk. Az alsó vizes fázis kipipettázása után ugyanolyan térfogatú metanol

hozzáadásával az embriókat tovább ráztuk, annak érdekében, hogy a vitellin membránt eltávolítsuk. Majd a devitellinizált embriókat metanolban még háromszor 5 percig mostuk.

8. Az embriók immunohisztokémiás festése

A metanolban, -20 °C-on tárolt embriókat a PBT (PBS + 0,1 % Tween 20) koncentrációját fokozatosan emelve 40 percig, 4 lépcsőben rehidratáltuk (metanol:PBT 8:2, 6:4, 4:6, 2:8) és még további 1 órát PBT-ben forgatva inkubáltuk. A rehidratált embriókat 2 órán keresztül blokkoló oldatban (PBS + 0,1 % Tween 20 + 0,2 % Triton X-100 + 1,5% BSA), majd további 2 órán át blokkoló-GSN oldatban (blokkoló + 5% Kecse Normál Szérum) forgatva blokkoltuk. Ezt követően a blokkoló-GSN oldatban hígított elsődleges ellenanyagokkal 4 °C-on éjszakán át (over-night) inkubáltuk (3. Táblázat).

Elsődleges Ellenanyag	Hígítás	Forrás és irodalom
anti-Imp- α 2 poliklonális, nyúl	1:400	Török és mtsai., 1995
anti- α -Tubulin monoklonális (YL1/2), patkány	1:400	Serotec
anti-Centroszomin poliklonális, nyúl	1:200	ajándék T. Kauffmann
anti-LaminB monoklonális, egér	1:30	ajándék H. Saumweber
anti-Foszfohiszon poliklonális, nyúl	1:500	Santa Cruz Biotechnology
anti-c-myc monoklonális (9E10), egér	1:200	Santa Cruz Biotechnology
anti-SPD2 poliklonális, nyúl	1:200	ajándék David Glover

3. táblázat. Az embriók immunfestéséhez használt elsődleges ellenanyagok

A nem kötött elsődleges ellenanyagokat hatszor 20 perces blokkoló oldatban történő mosással távolítottuk el, majd az embriókat 2 órán keresztül blokkoló-GSN oldatban újra blokkoltuk. Ezután az embriókat blokkoló-GSN oldatban hígított megfelelő másodlagos ellenanyagokkal szobahőmérsékleten, fénytől védve 2 órán át inkubáltuk. A kecskében termeltetett másodlagos ellenanyagokat, egér elleni Alexa-488-konjugált (Invitrogén) 1:300, nyúl elleni Alexa-488-konjugált (Invitrogén) 1:500 és patkány elleni Cy3-konjugált (Jackson & Immuno Research Laboratories) 1:400

hígításban használtuk. A meg nem kötött másodlagos ellenanyagokat hatszor 20 perces, blokkoló oldatos mosással távolítottuk el. Ezután az embriókat a DNS festéshez háromszor 10 percig PBT-ben mostuk és PBT-ben hígított, 1 µg/ml Dapi (4',6-diamidion-2-phenylindole) oldatban 1 órán keresztül sötétben inkubáltuk. Háromszor 20 perces PBT-s mosás után az embriókat Elvanol médiumba ágyztuk be és a kész preparátumokat Leitz fluoreszcens mikroszkóppal (Leica), illetve Nikon (Nikon C1Si-CLEM) konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. A mikrográfokat az embriók 5-10 µm vastagságú optikai szeleteiből (10-20 db) állítottuk össze, a Nikon EZ-C13.30 FreeViewer és az ImageJ programok segítségével.

9. Az $imp-\beta^{Ketel}$ gén *in vitro* mutagenézise

A mutagenézis során templátként a *Bluescript II SK (+)* vektor *EcoRI* klónozó helyére beépített 3612 bp méretű vad típusú $imp-\beta^{Ketel}$ cDNS-t használtuk (Lippai, 2000), amelyet Szabad János nagylelkűen bocsátott rendelkezésünkre. Az $imp-\beta^{Ketel}$ gén *in vitro* mutagenézisét a PCR reakción alapuló QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) segítségével végeztük el. Először a domináns nőstényszeril $imp-\beta^{KetD}$ allél P⁴⁴⁶L prolin-leucin helyettesítést okozó mutációt generáltuk, egy citozint timinre cserélve, a Ket-P446L-Forw. 5'-C GGA CGT ATT TGC GAT ATA ATT CTC GAG GCG GCT ATC AAC G-3' és a Ket-P446L-Rev: 5'-C GTT GAT AGC CGC CTC GAG AAT TAT ATC GCA AAT ACG TCC G-3' primerpárral. Második lépésben a P446L konstrukcióba bevezettük az $imp-\beta^{KetRE34}$ allélban azonosított D725N aszparaginsav-aszparagin helyettesítést. A guanin-adenin cserét, a Ket-D725N-Forw: 5'-G GTT CTG TCT GCT TTC GGA AAT ATT GCG TTG AGC-3' és a Ket-D725N-Rev: 5'-GCT CAA CGC AAT ATT TCC GAA AGC AGA CAG AAC C-3' primerpárral hoztuk létre. Az amplifikációt a kit használati utasításának megfelelő program szerint végeztük 16 cikluson keresztül. Ezután a metilált templát DNS-t *DpnI* restrikciós endonukleázzal 37 °C-on, 1,5 óráig emésztettük, majd a mutagenizált plazmid DNS-t XL1-Blue szuperkompetens (Stratagene) sejtekbe transzformáltuk. Mutánsokként 3-3 kolóniából PerfectPrep Spin Mini Kit (5Prime) segítségével plazmid DNS-t preparáltunk és szekvenáltattuk. A szekvenáláshoz ugyanazokat a primereket használtuk, mint a genomi mutáció azonosítása esetében. Végül az NCBI **Align two** program segítségével a kapott szekvenciákat a összehasonlítottuk az aktuális Release 3 *Drosophila* Genom Projektben megadott vad típusú $imp-\beta^{Ketel}$ cDNS szekvenciájával,

hogy meggyőződjünk arról, hogy a tervezett mutációt sikerült előállítani, illetve más helyeken nem történt mutáció.

10. Az *imp-β^{Ketel}* mutációk klónozása *pGEX* fehérje-expressziós vektorba

A *pGEX-4T* expressziós vektorban (GE Healthcare Life Sciences) a vad típusú *imp-β^{Ketel}* cDNS teljes kódoló régióját (Török István nem közölt eredmény) hordozó plazmid megfelelő szakaszát kicseréltük a *Bluescript II SK (+)* vektorban előállított *imp-β^{KetD}* (P446L) és a *imp-β^{KetRE34}* (P446L és D725N) cDNS-ek, szóban forgó mutációit hordozó szakaszaival. A klónozás során *BglII* és *SacII* (mivel ezek fogják körül a mutáltatott helyeket) restrikciós endonukleázokkal emésztettük a *Bluescript-imp-β^{Ketel}* plazmidokat és QIA quick Gel Extraction Kit (QIAGEN) segítségével izoláltuk a mutációt hordozó fragmenteket. Ezt követően, a *pGEX-4T-imp-β^{Ketel}* plazmid azonos módon emésztett és tisztított, megfelelő fragmentjéhez ligáltuk a mutáns szekvenciákat hordozó fragmenteket, kicserélve így az eredeti *pGEX-imp-β^{Ketel}* vad típusú *imp-β^{Ketel}* szekvenciát a mutáns (P446L: klónE1 és P446L-D725N: klónE2) változatokra. Mivel az E1 klónban levő mutáció generál egy *XhoI* hasító helyet, míg E2 klónban levő egy *SspI* hasítóhelyet, ezért jelenlétüket *BglII*, *SacII* és *XhoI*, illetve *BglII*, *SacII* és *SspI* emésztéssel ellenőriztük. A klónokat BL21-CodonPlus kompetens sejtekbe (Stratagene) transzformáltuk. A *pGEX-4T* expressziós vektor segítségével, így olyan fúziós fehérjéket fejeztettünk ki baktériumban, amelyek a különböző *Imp-β^{Ketel}* fehérjék N-terminálisához kapcsolva hordozták a Glutathion S-transzferáz (GST) aminosav-szekvenciáját.

11. GST pull down és western blot

A különböző plazmid konstrukciókkal frissen transzformált BL21 sejteket 22 °C-on növesztettük és 0,6 optikai sejtsűrűségnél IPTG-vel (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) 1mM végkoncentrációban indukáltuk a fúziós fehérjék termelését. Indukálás után további hat órán át rázattuk, majd a baktérium szuszpenziót Sorvall RC5C típusú centrifugával 5000 rpm-es fordulatszámon, 4 °C-on lecentrifugáltuk. A pelletet, 1X PBS-ben történő mosás után, a feltáró oldatban (1X PBS + proteináz gátlók) ötször 30 másodpercig, 30 másodperces szünetekkel jégen ultrahangoztuk. Ezután Triton X-100-at adtunk hozzá 1 % végkoncentrációra, majd

megismételtük az ultrahangozást. A feltárt sejteket 20 percig 15000 g-vel 4 °C-on centrifugáltuk. A felülúszót azonnal Glutathion szefaróz-4B gyöngyhöz adtuk és egy órát 4 °C-on kevertettük, hogy a GST-fúziós fehérje kikötődjék a gyöngyhöz. A gyöngyöket háromszor tíz percig mosó oldatban (feltárási oldat + 0,1 % Triton X-100) mostuk és végül jégen tároltuk, legfeljebb 4 napon át.

Az embrionális fehérje-kivonat készítése során *Drosophila* 0-2 órás dekarionizált embriókat IP pufferben (10mM Tris-HCl, pH7,5, 50nM KCl, 0,1% Tween 20, proteínáz gátlók) homogenizáltunk 0,2g embrió/ml-es koncentrációban (Máthé, 2000). Az Imp- α 2 fehérje kötődési erősségét ezzel a teljes fehérje kivonattal teszteltük. A Ran fehérjével elvégzett kísérletben az embrió extrakthoz adtuk a baktériumban termeltetett és affinitás tisztított His-RanT²⁴ (RanGDP fagyott forma) vagy a His-RanQ⁶⁹. (RanGTP fagyott forma) mutáns karmosbeka fehérjét (Ian Mattaj szíves hozzájárulásával) 10 μ M koncentrációban. Az elkészült fehérje-elegyeket 5:1 arányban kevertük a szefaróz gyöngy szuszpenzióval, amelyhez előzetesen a GST-fúziós Imp- β ^{Ketel} fehérjét kötöttük. Mindkét esetben a keveréket 25 °C-on egy órán át folyamatos kevertetés közben inkubáltuk, majd ötször IP pufferben mostuk, végül kétszeres koncentrációjú SDS-mintapufferben vettük fel. A kötött fehérjét tíz perces forralással távolítottuk el a gyöngy felszínéről és SDS-PAGE-vel választottuk szét, majd western blot módszerrel mutattuk ki. A felhasznált ellenanyagokat: poliklonális nyúl anti-Imp- α 2 1:6000, poliklonális nyúl anti-Imp- β ^{Ketel} (Szabad János jóvoltából) 1:2000, poliklonális nyúl anti-Ran (H-96) (Santa Cruz Biotechnology) 1:200, és alkalikus foszfatázzal konjugált anti-nyúl másodlagos ellenanyag (Serva Feinbiochemica) 1:25 000 hígításban használtuk.

EREDMÉNYEK

1. Az *imp-α2* és *imp-β^{Ketel}* közötti kölcsönhatás genetikai vizsgálata

Az *imp-α2* génnek a *Drosophila* embrió fejlődésében játszott szerepét az *imp-α2* és az *imp-β/Ketel* gének közötti kölcsönhatáson keresztül vizsgáltuk. Az *imp-α2^{D14}* allélt és az *imp-β^{Ketel}* különböző recesszív mutáns alléljeit transzheterozigóta kombinációban hordozó nőtényeket mindig vad típusú (*Oregon-R*) hímekkel kereszteztük. A nőtények által lerakott peték életképességét a belőlük kikelő lárvák százalékos arányával fejeztük ki, az összes lerakott petére vonatkoztatva. Az *imp-α2^{D14}*-es allél egy, az *imp-α2* gén 5' régiójába beépült P elem újra-mobilizációjával előállított, úgynevezett excíziós mutáns, ami hordoz egy génen belüli deléciót, róla fehérje nem termelődik, így null mutánsnak tekinthető (Török és mtsai, 1995). Az *imp-β^{Ketel}* allélok közül három, a domináns nőténysteril *imp-β^{KetD}* allél, különböző módon előállított recesszív revertánsa volt: az *imp-β^{KetRP13}* (P-elem excízió), az *imp-β^{KetRX13}* (röntgen indukált) és a hidegérzékeny *imp-β^{KetRE34}* (EMS-indukált) (Erdélyi és mtsai., 1997). Továbbá felhasználtunk három, az előző alléloktól független genetikai háttéren létrehozott, *PiggyBac* transzpozont hordozó allélt (*imp-β^{Ketc02473}*, *imp-β^{Kete02657}* és *imp-β^{Kete03750}*; Thibault és mtsai., 2004). Az utóbbiakról a mobilis elem pozíciója alapján feltételezhető volt, hogy null mutánsok, amit az *imp-β^{KetRE34}* mutánssal kombinációban mutatott zigotikus letalitásuk is megerősített. Az *imp-α^{D14}* és *imp-β^{KetRE34}* mutációkat hordozó transzheterozigóta nőtények által lerakott igen nagyszámú pete átvizsgálása során megállapítottuk, hogy a fenti allélkombináció olyan erős embrionális fenotípust eredményez, hogy 10 ezer petéből egyetlen egy lárva sem kel ki. (4. táblázat).

Mivel a mutáns nőtényeket mindig vad típusú hímekkel kereszteztük, a megfigyelt embrionális fenotípus kizárólag anyai hatás következménye lehet, hiszen a zigotikus génkifejeződés beindulása után az apai eredetű vad allél menekítették volna az embriók letalitását. Az összes többi kombinációban nem tapasztaltunk kölcsönhatást, azaz a transzheterozigóta nőtények által rakott peték kelési gyakorisága a vad típuséhoz volt hasonló (4. táblázat). Az *imp-β^{KetRE34}/+* heterozigóták esetében ugyanakkor megfigyelhető egy enyhe domináns negatív fenotípus is, ami csökkent embriókelési gyakoriságot jelent (61 %).

Nőstények genotípusa	Pete életképessége (%)	Szórás	Vizsgált embriók száma
<i>imp-α2^{D14}/+</i>	89	2,49	285
<i>imp-β^{KetRE34}/+</i>	61	9,5	234
<i>imp-α^{D14}/Ket^{RE34}</i>	0	0	10000
<i>imp-β^{KetRX13}/+</i>	79	3,23	120
<i>imp-α2^{D14}/imp-β^{KetRX13}</i>	80	9,97	300
<i>imp-β^{KetRP13}/+</i>	85	5,24	150
<i>imp-α2^{D14}/imp-β^{KetRP13}</i>	85	9,29	276
<i>imp-β^{Ketc02473}/+</i>	93	2,82	100
<i>imp-α2^{D14}/imp-β^{Ketc02473}</i>	90	5,56	290
<i>imp-β^{Kete02657}/+</i>	83	1,41	100
<i>imp-α2^{D14}/imp-β^{Kete02657}</i>	90	2,88	150
<i>imp-β^{Kete03750}/+</i>	92	6,24	275
<i>imp-α2^{D14}/imp-β^{Kete03750}</i>	94	3,44	175

4. táblázat Az *imp-α2^{D14}* és *imp-β^{Ketel}* transzheterozigóta nőstények által rakott peték életképessége.

Ezen eredmények alapján felmerült annak a lehetősége, hogy a megfigyelt mutáns fenotípust, a kísérletekben felhasznált *imp-α2^{D14}* és/vagy *imp-β^{KetRE34}* kromoszómákon lévő esetleges, háttér mutációk okozták. Mivel az *imp-β^{Ketel}* null mutánsok nem mutattak kölcsönhatást az *imp-α2^{D14}* alléllal, ez kizárja annak a lehetőségét, hogy az *imp-α2^{D14}*-es kromoszómán egy hipomorf *imp-β^{Ketel}* mutáció legyen. Fennállt viszont annak a lehetősége, hogy egy hipomorf *imp-α2* mutáció van az *imp-β^{KetRE34}*-es kromoszómán.

Ezt tisztázandó az interakciós fenotípust a vad típusú *imp-α2* és *imp-β^{Ketel}* transzgének harmadik kromoszómáról történő kifejeztetésével próbáltuk menekíteni. A domináns kölcsönhatást az *imp-α2* vagy az *imp-β^{Ketel}* teljes genomi szekvenciáját tartalmazó transzgének, valamint az ovárium-specifikus *nos-Gal4*-el meghajtott vad típusú *imp-α2* cDNS is menekítette (5. táblázat).

Nőstények genotípusa	Peték élet- képessége (%)	Szórás	Vizsgált embriók száma
<i>imp-α2^{D14}/imp-β^{KetRE34}</i>	0	0,00	10000
<i>imp-α2^{D14}/imp-β^{KetRE34}UAS-imp-α2/nosGal4</i>	38	7,77	280
<i>imp-α2^{D14}/imp-β^{KetRE34}; imp-α2⁺/+</i>	46	2,30	340
<i>imp-α2^{D14}/imp-β^{KetRE34}; imp-β⁺/+</i>	30	2,12	172

5. táblázat Az *imp-α2* vagy *imp-β^{Ketel}* transzgénnek menekítő hatása az *imp-α2^{D14}/imp-β^{KetRE34}* nőstények által rakott peték életképességére. Statisztikai elemzés a függelék F1. táblázatban található.

Továbbiakban megvizsgáltuk, hogy vajon akkor is jelentkezik-e a kölcsönhatás, ha az *imp-α2* gén kifejeződését RNS interferencia-csökkentéssel csökkentjük, *imp-β^{KetRE34}* háttéren. Érdekes módon, az *imp-α2i³⁴²⁶⁶* konstruktot (Dietzl és mtsai, 2007) *nos-Gal4VP16* driverrel meghajtva, vad típusú háttéren nem kaptuk meg az *imp-α2^{D14}* homozigóta mutánsra jellemző, korábban leírt ovárium fenotípust, és a peték életképességében sem tapasztaltunk változást. Viszont, szignifikánsan csökkent az embriók életképessége, ha az *imp-α2i³⁴²⁶⁶* konstruktot *imp-α2^{D14}* heterozigóta nőstényekben fejeztettük ki (6. táblázat). Még erőteljesebb hatást figyeltünk meg abban az esetben, amikor az *imp-α2* gén csendesítését *imp-β^{KetRE34}* heterozigóta háttéren végeztük. Ekkor az embrióknak csak a 3%-a volt életképes. Eredményeink azt mutatják, hogy muslica *imp-α2* ovarialis kifejeződésének jelentős csökkenése *imp-β^{KetRE34}* háttéren, a mutáns nőstények által rakott peték letalitását okozza. Ebből arra következtetünk, hogy az Imp-α2 és Imp-β^{Ketel} fehérjék koordinált együttműködése alapvetően fontos a muslica korai embrionális fejlődésében.

Nőstények genotípusa	Peték élet- képessége (%)	Szórás	Vizsgált embriók száma
<i>imp-α2^{D14}/+</i>	89	2,49	285
<i>imp-β^{KetRE34} /+</i>	61	9,5	234
<i>imp-α2i/nosGal4</i>	93	3,42	150
<i>imp-α2^{D14}/+; imp-α2i/nos-Gal4</i>	57	4,55	176
<i>imp-β^{KetRE34} /+; imp-α2i/nos-Gal4</i>	3	1,73	530

6. táblázat Az *imp-α2* gén ováriumban történő RNSi csendesítése. Statisztikai elemzés a függelék F2. táblázatában található.

2. Az $imp-\beta^{KetRE34}$ allél molekuláris természetének jellemzése

2.1. Az $imp-\beta^{KetRE34}$ allél vizsgálata DNS szekvenálással

Az $imp-\beta^{KetRE34}$ allél egy EMS indukált, hidegérzékeny, recesszív revertánsa a 446-os pozícióban prolin-leucin (P446L) cserét hordozó, domináns nősténysteril $imp-\beta^{KetD}$ allélnak ($imp-\beta^{KetP446L}$, ERDÉLYI és mtsai. 1997; LIPPAI és mtsai. 2000; TIRIÁN és mtsai. 2000). Az $imp-\beta^{KetRP13}$ és az $imp-\beta^{KetRX13}$ recesszív null alléljei az $imp-\beta^{KetP446L}$ mutánsnak (LIPPAI és mtsai. 2000) és ezek az allélok $imp-\alpha^{D14}$ alléllal kombinálva nem okoztak fenotípust. Ez alapján feltételeztük, hogy az $imp-\beta^{KetRE34}$ hordozhat egy addicionális intragénikus mutációt. Ennek felderítése érdekében, DNS szekvenálást végeztünk az $imp-\beta^{KetRE34}$ allélen, hogy további mutációkat azonosítsunk. Homozigóta mutáns L2 lárvából genomikus DNS-t izoláltunk, és az $imp-\beta^{KetRE34}$ gén, kódoló régióját (682-4428, a Flybase számozásnak megfelelően) két átfedő szakaszban amplifikáltuk PCR reakcióban. A vizsgált DNS régió a transzlációs start előtt 83 bázispárral kezdődik és 134 bázispárral a stop kód után ér véget. Az amplifikált PCR-termékeket az Anyagok és módszerekben leírt primerekkel szekvenáltattuk, és a Flybase referencia szekvenciájával hasonlítottuk össze. Az eredeti P446L pontmutáción túlmenően, azonosítottunk még egyet, ami egy aszparaginsavnak aszparaginra történő cserélődését eredményezte a fehérje 725-ös pozíciójában. Ez a pozíció az Imp- β^{Ketel} fehérje Imp- α -kötő régiójában található. Az *ecetmuslica* Imp- β^{Ketel} fehérjéjének D725-ös pozíciója a humán Imp- β -ban a D719-esnek felel meg, és a kristályszerkezeti vizsgálatok szerint a humán Imp- α 43-as lizinjével alakít ki poláris interakciót (Cingolani és mtsai., 1999). Ezek szerint az $imp-\beta^{KetRE34}$ allél egy kettős mutáns, amelyben az $imp-\beta^{KetP446L}$ eredeti domináns negatív hatását a D725N mutáció szuppresszálja.

2.2. Az Imp- $\beta^{KetD725N}$ IBB domén-kötő képességének *in silico* vizsgálata

Mivel a D725N helyettesítés az Imp- β^{Ketel} fehérje Imp- α -kötő régiójában található, elvégeztünk egy *in silico* analízist, hogy megtudjuk ez az aminosav csere befolyásolja-e a két Imp fehérje kölcsönhatását. Homológ modellezésben az Imp- α IBB doménjének az $imp-\beta^{KetD725N}$ a mutáns fehérjéhez történő dokkolását követtük nyomon, templátként felhasználva a Protein Data Bank-ban (PDB) megadott humán

Imp- β /Imp- α -IBB-domén komplex adatait (PDB code:1QK, Cingolani, 1999) (7. táblázat).

Receptor	Ligand	Legalacsonyabb dokkoló energia (kcal/mól)
Imp- β^{Ketel}	Imp- α IBB domén	-75,63
Imp- β^{KetD725N}	Imp- α IBB domén	-75,53

7. táblázat A D⁷²⁵N aminosav helyettesítés hatása az Imp- α IBB doménjének, mint ligandnak az Imp- β -n, mint receptoron való dokkolási energiájára

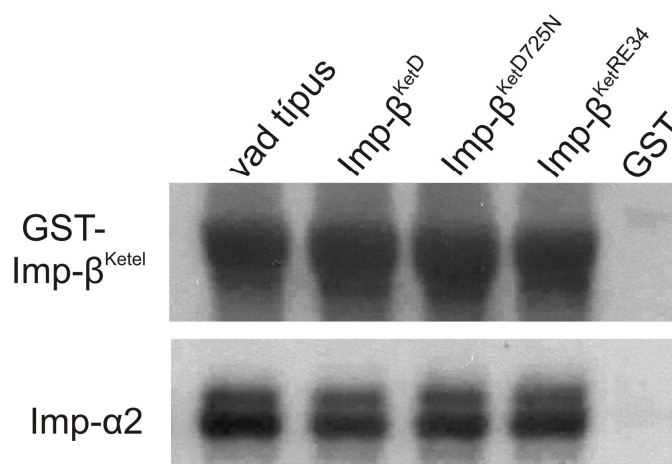
A modellezés eredménye azt mutatta, hogy az Imp- α IBB doménjének egyenlő kötési affinitása van mind a vad, mind az Imp- β^{KetD725N} fehérjéhez, amiből azt a következtetést vontuk le, hogy nem ennek a kölcsönhatásnak a gyengülése okozza *imp- α^{D14} /imp- β^{KetRE34}* interakcióban megfigyelt fenotípust.

2.3. Az Imp- β^{Ketel} és Imp- β^{KetRE34} egyformán kötik az Imp- $\alpha 2$ fehérjét

A kötési viszonyok felderítésének céljából GST (glutathion S-transzferáz) pull-down kísérletet végeztünk a vad Imp- β^{Ketel} , a domináns negatív Imp- β^{KetD} , az Imp- β^{KetD725N} és az Imp- β^{KetRE34} fehérjékkel. Ennek érdekében, a vad típusú *imp- β^{Ketel}* cDNS-ből kiindulva, *in vitro* mutagenézissel előállítottuk az Imp- β^{KetP446L} (Imp- β^{KetD}), az Imp- β^{KetD725N} és az Imp- $\beta^{\text{KetP446L-D725N}}$ (Imp- β^{KetRE34}) mutánsokat, majd a vad típusú cDNS-hez hasonlóan pGEX fehérje-expressziós vektorba klónoztuk. A vektor segítségével olyan fúziós fehérjét fejeztettünk ki baktériumban, amelyek a különböző Imp- β^{Ketel} fehérjék N terminálisához kapcsolódva hordozták a GST aminosav-szekvenciáját.

A különböző Imp- β^{Ketel} fehérjéket a GST szekvencián keresztül glutathion szefaróz gyöngyhöz kötöttük, majd hozzáadtunk 0-2 órás embriókból készült nyers fehérje kivonatot. Inkubálás és kötő pufferrel történő sorozatos mosások után, a megkötött Imp- $\alpha 2$ fehérjét SDS-PAGE-sel elválasztottuk és western blot alkalmazásával, α -Imp- $\alpha 2$ ellenanyaggal mutattuk ki (10. ábra). A vad Imp- β^{Ketel} és a mutáns Imp- β^{KetD} , Imp- β^{KetD725N} és Imp- β^{KetRE34} , hasonló erősséggel kötötték ki az

embrionális fehérje kivonatból az Imp- α 2 fehérjét. Ez az eredmény jó egyezést mutat a fehérje modellezés eredményével.



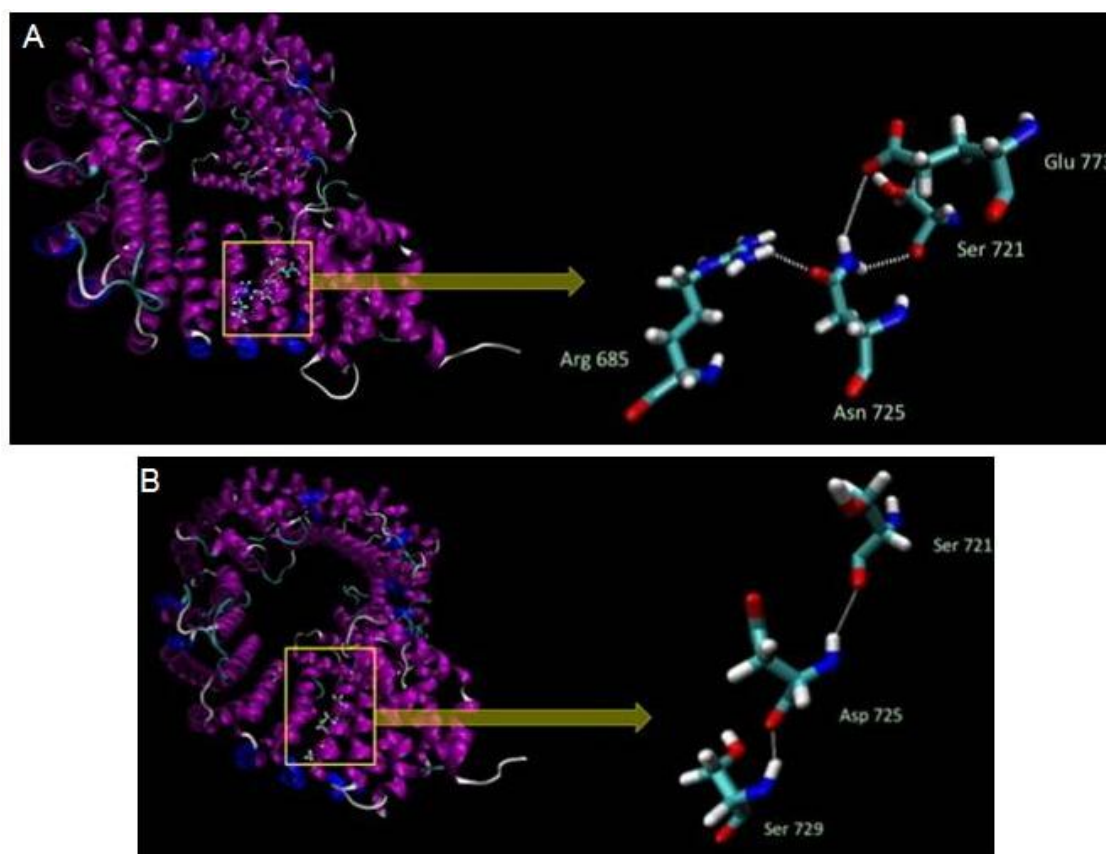
10. ábra. GST pull-down kísérlet eredményének kimutatása western blot segítségével. Glutathion szefaróz gyöngyöz kötött Imp- β^{KetD} (Imp- $\beta^{KetP446L}$), Imp- $\beta^{KetD725N}$ és Imp- $\beta^{KetRE34}$ (Imp- $\beta^{KetP446L-D725N}$) és vad típusú Imp- β^{Ketel} GST-fúziós fehérjékhez, vad típusú muslica embrió kivonatot adtunk. Az Imp- α 2 fehérje jelenlétét anti-Imp- α 2 ellenanyag segítségével mutattuk ki. A gyöngyökről leoldott és gélre felvitt fehérjék mennyiségi viszonyait anti-Imp- β^{Ketel} ellenanyaggal ellenőriztük.

2.4. Az Imp- β^{Ketel} és Imp- $\beta^{KetD725N}$ térszerkezetének *in silico* összehasonlítása

Az Imp- $\beta^{KetD725N}$ fehérje térszerkezetének további elemzése rávilágított, hogy a pontmutáció eredményeként a D725-ös aszparaginsavat váltó N725 aszparagin (N725), ami a HEAT 16 ismétlődés B hélixén található, pozitív töltésű amino-csoportján keresztül, kialakít egy új molekulán belüli poláris kölcsönhatást a szomszédos HEAT 17 ismétlődés B hélixének 773-as pozíciójában lévő glutaminsav negatív töltésű karboxil-csoportjával (E773) (11. ábra A). Ez a kölcsönhatás a vad típusú Imp- β^{Ketel} fehérjében sosem jön létre, mert a 725-ös aszparaginsav negatív töltésű oldallánca taszítja a szintén negatív töltésű glutaminsav oldalláncot (11. ábra B).

A mutáns fehérjében létrejött poláris kölcsönhatás stabilizálja a két szomszédos HEAT ismétlődés pozícióját, azáltal, hogy lecsökkenti a két B hélix egymáshoz viszonyított mozgási szabadságát. Ugyanakkor, az Imp- β fehérje rendkívül széles szubsztrát-specifitását nagyfokú konformációs szabadsága teszi lehetővé (Conti, 2006). Ismeretes, hogy a molekula szerkezete az Imp- α IBB doménjének kötésekor a legzártabb. A domináns negatív Imp- β^{KetD} fehérjében található P446L helyettesítés, feltehetően egy túlzottan nyitott konformációt eredményez (Timinszky, 2002). A

D725N szuppresszor mutáció, a 16-os és 17-es HEAT ismétlődések elcsúszásának gátlása révén, egy zártabb szerkezetet eredményez, és valószínűsíthetően ezáltal ellensúlyozza (habár csak részlegesen) a P446L domináns negatív mutációnak a nyitottabb konformáció irányába mutató hatását.

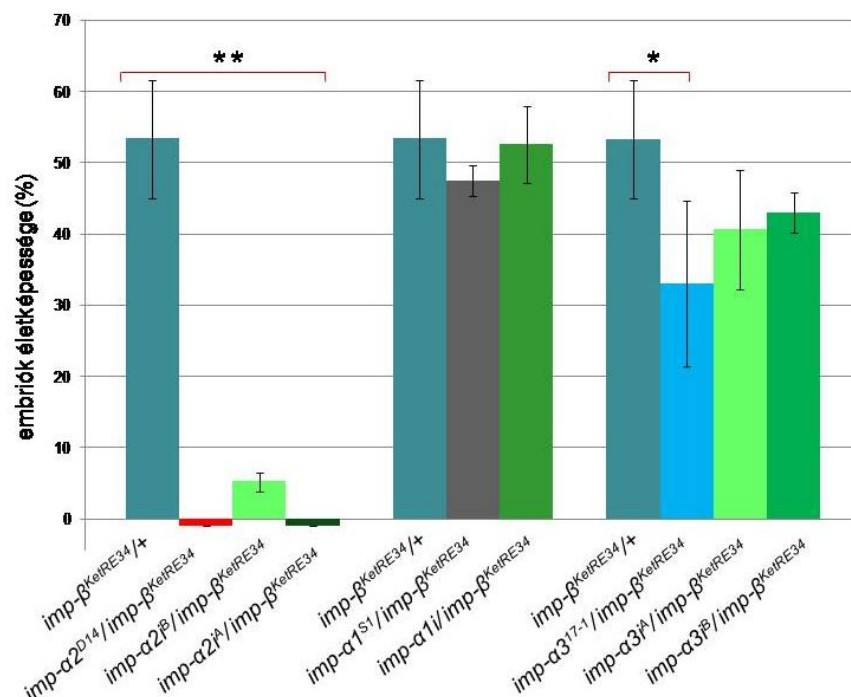


11. ábra Az Imp-β^{Ketel} és Imp-β^{KetD725N} fehérjék szerkezete. (A) A mutáns Imp-β^{KetD725N} fehérjében az Asn725 aminosav a molekulán belül poláros kölcsönhatásokat alakít ki. Az Asn725 (HEAT 16) és a Glu773 (HEAT 17) közötti kölcsönhatás stabilizálja a 16-os és 17-es HEAT ismétlődések B héliceinek egymáshoz viszonyított relatív pozícióját. (B) A vad típusú Imp-β^{Ketel} fehérjében az Asp725 csak a HEAT 16 B hélixén belül alakít ki poláros kölcsönhatásokat, ami nem akadályozza szomszédos hélixek egymáshoz viszonyított elmozdulását. Bal panel: a másodlagos szerkezet áttekintése. alfa hélix (bíbor), S10 hélix (kék), kanyar (cián), rendezetlen-szerkezeti egység (fehér). Jobb panel: Az atomok részletes áttekintése. H (fehér), C (cián), N (kék), O (vörös), H-hidak (fehér pontozás) vonalak).

3. Az *imp-α2* kulcsszerepe az embrió korai fejlődésében

Annak érdekében, hogy felderítsük vajon az *imp-α* géncsalád másik két tagja is kölcsönhat-e az *imp-β*^{Ketel} génnel az embriófejlődés korai szakaszában, előállítottuk az *imp-β*^{KetRE34} allélnak az *imp-α1* illetve az *imp-α3* gének funkcióvesztéses mutációival alkotott kombinációját, valamint megvizsgáltuk mindkét *imp-α* gén RNS

csendesítésének hatását is $imp-\beta^{KetRE34}$ háttéren. Eredményeinket a 12. ábrán foglaltuk össze.



12. ábra Az $imp-\alpha2$, $imp-\alpha1$, és $imp-\alpha3$ gén csökkentett dózisának hatása $imp-\beta^{KetRE34}$ allél kombinációban és mindhárom $imp-\alpha$ gén $imp-\beta^{KetRE34}$ háttéren történő ovárium-specifikus RNS csendesítésének hatása az embriók életképességére. A delécio $Df(3L)\alpha1S1$ kiejti az $imp-\alpha1$ gént ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$, a teljes statisztikai elemzés a függelék F3. táblázatában található.

Mind az $imp-\alpha1$ gént kiejtő, $Df(3L)imp-\alpha1S1$ delécio (47 %) (Ratan és mtsai., 2008), mind az $imp-\alpha3^{17-1}$ mutáció (33%), amely egy csonkolt fehérjét eredményez (Mason, 2003) szignifikánsan kisebb mértékben csökkentette az embriók életképességét $imp-\beta^{KetRE34}$ háttéren, mint az $imp-\alpha2^{D14}$ (0 %). Az RNS csendesítéssel is hasonló különbséget kaptunk az $imp-\alpha1i$, illetve az $imp-\alpha3i$ és az $imp-\alpha2i$ hatása között (12 ábra).

Ezek a megfigyelések azt mutatják, hogy az anyai eredetű (maternális) Imp- $\alpha1$ vagy Imp- $\alpha3$ fehérjék csökkent mennyisége $imp-\beta^{KetRE34}/+$ háttéren csak kis mértékben csökkentik az embriók életképességét. Ezzel szemben, akár delécióval, akár RNS csendesítéssel, csökkentjük a maternálisan biztosított Imp- $\alpha2$ szintjét $imp-\beta^{KetRE34}$ háttéren, nagyon erős embrió letalitást tapasztalhatunk.

Mivel az Imp- $\alpha2$ mennyisége nyilvánvalóan sokkal nagyobb a petében, mint az Imp- $\alpha1$ vagy Imp- $\alpha3$ fehérjéé (Máté, 2000), az osztódási folyamatokhoz szükséges teljes NLS-kötő kapacitást főleg az Imp- $\alpha2$ biztosítja. Ezért, az $imp-\alpha2$ kifejeződésének csökkenése, ennek a kapacitásnak sokkal erősebb visszaesését eredményezi, mint az $imp-\alpha1$ vagy az $imp-\alpha3$ géneké, következésképpen erősebb hatást fejt ki az embrionális

fejlődésre. Annak eldöntésére, hogy vajon az embriók kelési rátájára gyakorolt hatás független-e a különböző *Imp-α* fehérjék maternálisan biztosított relatív mennyiségétől, olyan transzgéneket fejeztettünk ki *imp-α2^{D14}/imp-β^{KetRE34}* háttéren, amelyek azonos mennyiségű *Imp-α* fehérjét termelnek. Ehhez olyan *UAS-UTR^A-imp-α* konstrukciókat használtunk, amelyek cDNS-ének 5' és 3' nemtranszlálódó (UTR) szekvenciáját eltávolították és a transzlációt elősegítő AAAATG konszenzus szekvenciát (Cavener,1987) klónozták mindhárom *imp-α* gén, kódoló régiója elé (Mason, 2003). Amint, azt a 8. táblázat összefoglalja, *imp-α2^{D14}/imp-β^{KetRE34}* háttéren kizárólag az *UAS-UTR^A-imp-α2* transzgén tudta menekíteni az embriók letalitását. A menekítés mértéke azonban alacsonyabb (21%) volt, mint amit a teljes hosszúságú *imp-α2* cDNS-t kifejező

Nőstények genotípusa	Peték élet-képessége (%)	Szórás	Vizsgált egyedek száma
<i>imp-α2^{D14}/imp-β^{KetRE34}</i>	0	0,00	~10000
<i>UTR^A-imp-α1,imp-α2^{D14}/imp-β^{KetRE34}</i>	0	0,00	1426
<i>UTR^A-imp-α2,imp-α2^{D14}/imp-β^{KetRE34}</i>	21	2,08	355
<i>UTR^A-imp-α3,imp-α2^{D14}/imp-β^{KetRE34}</i>	0	0,00	1350

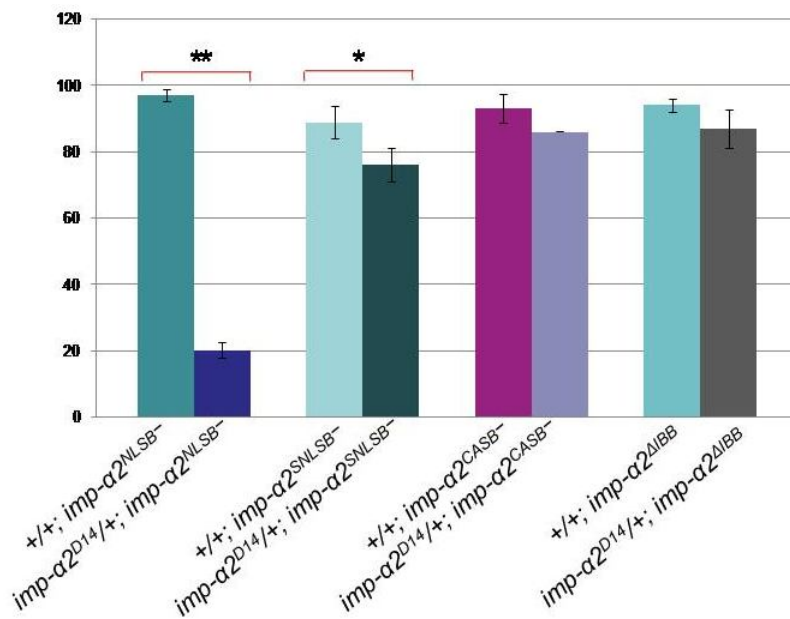
8. táblázat A különböző *UAS-UTR^A-imp-α* konstrukciók hatása az *imp-α2^{D14}/imp-β^{KetRE34}* nőstények petéinek életképességére. A transzgének kifejeződését biztosító *nos-Gal4* driver minden esetben a harmadik kromoszómán a helyezkedett el. Az eredmények statisztikai elemzése a függelék F4. táblázatában található.

konstrukcióval (38%) értünk el. Ezt a különbséget az magyarázhatja, hogy amíg a kontroll kísérleteinkben az *imp-α2^{D14}* homozigóta nőstényekben a teljes hosszúságú *imp-α2* cDNS konstrukció 85%-ban menekítette az *imp-α2^{D14}* allél fenotípusát, addig az *UAS-UTR^A-imp-α2* konstrukt csak 37%-ban. Fenti eredményeink arra engednek következtetni, hogy a korai embrionális szakaszban, amikor az anyai eredetű fehérjék biztosítják a fejlődéshez szükséges faktorokat, az *Imp-α2* az *Imp-β^{Ketel}* fő együttműködő partnere és nem helyettesíthető sem az *Imp-α1* sem az *Imp-α3* fehérjével.

4. Az *imp-α2* NLSB doménjének inaktiválása az *imp-β^{Ketel}* gén csökkentett dóziséval párosulva embrió letalitást okoz

A következőkben arra kerestük a választ, hogy vajon az *imp-α2* gén melyik régiója szükséges, az embrió normális fejlődéséhez. Korábbi vizsgálatok kimutatták,

hogy az *NLSB⁻* (a nagy és kis NLS kötő helyek konzervált triptofán (W) és aszparagin (N) aminosavai alaninnal (A) helyettesítve) és a *CASB⁻* (a CAS sejtmagi export faktor kötőhely hat aminosava (GLDKLE) helyettesítve alaninnal) konstrukció kifejeztetése homozigóta *imp-α2^{D14}* háttéren nem menekítette a súlyos petefejlődési fenotípust. Ezzel szemben az *SNLSB⁻* (W-A és N-A cserék a kis NLS kötő helyen) és a *ΔIBB* (az IBB domén delécioja) konstrukt menekítették a petefejlődést, de blokkolták az embriógenézist *imp-α2^{D14}* homozigóta háttéren (Gorjánác, 2006). Mivel mind a négy mutáns *imp-α2* cDNS konstrukció *UAS* promótert tartalmaz, kísérleteinkben *nos-Gal4* driver segítségével fejeztettük ki a transzgéneket először vad típusú, majd *imp-α2^{D14}* heterozigóta háttéren. Vad típusú háttéren az *imp-α2^{NLSB⁻}*, *imp-α2^{SNLSB⁻}*, *imp-α2^{ΔIBB}*, *imp-α2^{CASB⁻}* transzgéneknek nincsen hatása az embriófejlődésére, *imp-α2^{D14}* heterozigóta háttéren viszont az *imp-α2^{NLSB⁻}* transzgén erős antimorf hatását figyeltük meg 80%-os embrió-leletitással (13. ábra).



13. ábra Az *imp-α2^{NLSB⁻}*, *imp-α2^{SNLSB⁻}*, *imp-α2^{ΔIBB}*, *imp-α2^{CASB⁻}* transzgéneknek hatása az embriók életképességére vad típusú illetve *imp-α2^{D14}/+* heterozigóta háttéren *nos-Gal4* driverrel kifejeztetve.

** P<0,01, *P<0,05.

Amikor a transzgéneket *imp-α2^{D14}* és különböző *imp-β^{Ketel}* null (*imp-β^{KetRX13}*, *imp-β^{KetRP13}*, *imp-β^{KetC02473}*, *imp-β^{KetC02657}*, *imp-β^{KetC03750}*) transzheterozigóta érzékenyített háttéren fejeztettük ki az *NLSB⁻* transzgén domináns negatív hatása felerősödött és az *SNLSB* régió inaktiválása is teljesen leállította az embriók fejlődését. Egyetlen kivétel az *imp-α2^{D14}/imp-β^{KetRP13}* allél kombinációt, ami azt jelzi, hogy az *imp-β^{KetRP13}*

feltehetően egy hipomorf allél. Az $imp-\alpha 2^{AIBB}$ és az $imp-\alpha 2^{CASB^-}$ mutáns transzgének kifejeztetése nem befolyásolta az embriók fejlődését (9. táblázat).

Nőstények genotípusa ^a	Peték életképessége (%)			
	$NLSB^-$	$SNLSB^-$	$CASB^-$	ΔIBB
+/+	97 \pm 1,73	89 \pm 4,94	93 \pm 4,24	94 \pm 2,08
$imp-\alpha 2^{D14}/+$	20 \pm 2,32	76 \pm 4,94	86 \pm 0,00	87 \pm 5,85
$imp-\alpha 2^{D14}/imp-\beta^{KetRX13}$	2 \pm 1,12	0 \pm 0,00	90 \pm na	85 \pm na
$imp-\alpha 2^{D14}/imp-\beta^{KetRP13}$	23 \pm 9,19	32 \pm 4,04	93 \pm na	91 \pm na
$imp-\alpha 2^{D14}/imp-\beta^{Ketc02473}$	0 \pm 0,00	0 \pm 0,00	91 \pm na	87 \pm na
$imp-\alpha 2^{D14}/imp-\beta^{Kete02657}$	0 \pm 0,00	1 \pm 1,12	87 \pm na	83 \pm na
$imp-\alpha 2^{D14}/imp-\beta^{Kete03750}$	0 \pm 0,00	2 \pm 1,76	84 \pm na	79 \pm 1,54

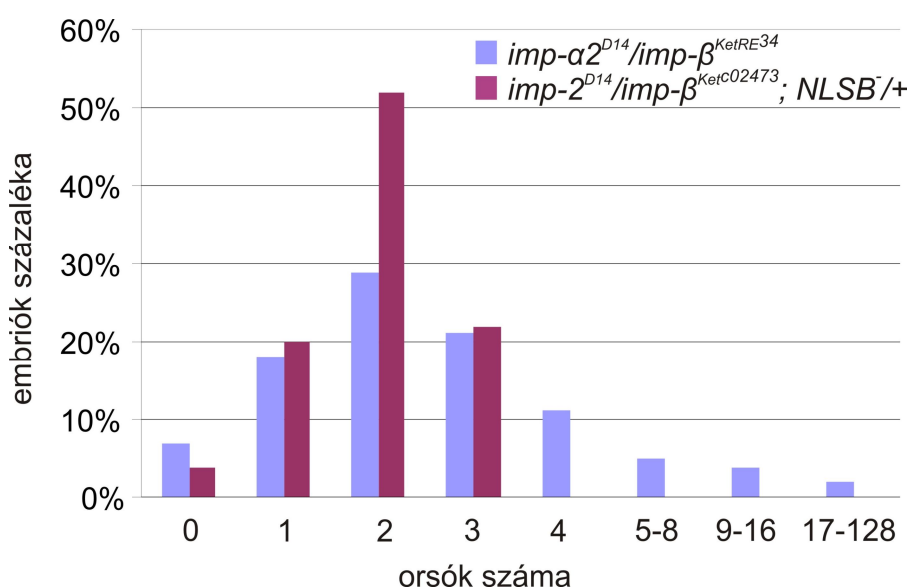
9. táblázat Különböző mutáns $imp-\alpha 2$ transzgének hatása $imp-\alpha 2^{D14}/imp-\beta^{Ketel0}$ érzékenyített háttérek. Az inaktív NLS-kötő doménnel rendelkező mutáns $imp-\alpha 2$ kifejeztetése súlyosan csökkentette az $imp-\alpha 2^{D14}/imp-\beta^{Ketel0}$ nőstények által lerakott peték életképességét. \pm : szórás, a vizsgált embriók száma átlagosan 100-300.^a Az első oszlop csak a 2. kromoszóma mutációit mutatja, az alcsoportokban feltüntetett különböző $imp-\alpha 2$ mutáns konstruktokat a 3. kromoszóma hordozta.

Az IBB domén hiányában az $Imp-\alpha 2^{AIBB}$ nem tud az $Imp-\beta^{Ketel}$ fehérjéhez kötődni, így az érzékenyített háttéren nem képes tovább csökkenteni a működőképes $Imp-\alpha 2/Imp-\beta^{Ketel}$ komplexek mennyiségét. Ezt tükrözi az az eredmény, hogy az $Imp-\alpha 2^{AIBB}$ kifejeztetése nem rontotta az embriók életképességét az $imp-\alpha 2^{D14}/imp-\beta^{Ket0}$ háttérhez képest (4. és 9. táblázat). Ezzel szemben, a másik három mutáns fehérje intakt IBB doménnel rendelkezik, azaz képes kapcsolódni az $Imp-\beta^{Ketel}$ -hez, de az embriók életképességét csak az $Imp-\alpha 2^{NLSB^-}$ és az $Imp-\alpha 2^{SNLSB^-}$ tudta csökkenteni.

Összességében, eredményeink azt mutatják, hogy az NLSB domén és nem a CASB domén közvetíti a genetikai kölcsönhatást az $imp-\alpha 2$ és $imp-\beta^{Ketel}$ között. Ebből megállapíthatjuk, hogy az $Imp-\alpha 2$ és $imp-\beta^{Ketel}$ fehérje közötti együttműködés feltételezi számos NLS-szekvenciával rendelkező faktor megkötését, melyek szerepet játszanak a korai embrionális fejlődésben. Az NLSB domén kitüntetett szerepére az is rávilágít, hogy az $imp-\alpha 2^{NLSB^-}$ transzgén antimorf hatása már az $imp-\alpha 2^{D14}/+$ heterozigóta háttéren is szignifikánsan kimutatható volt és ez a hatás tovább erősödött, amikor az $imp-\beta^{Ketel}$ gén dózisa lecsökkent.

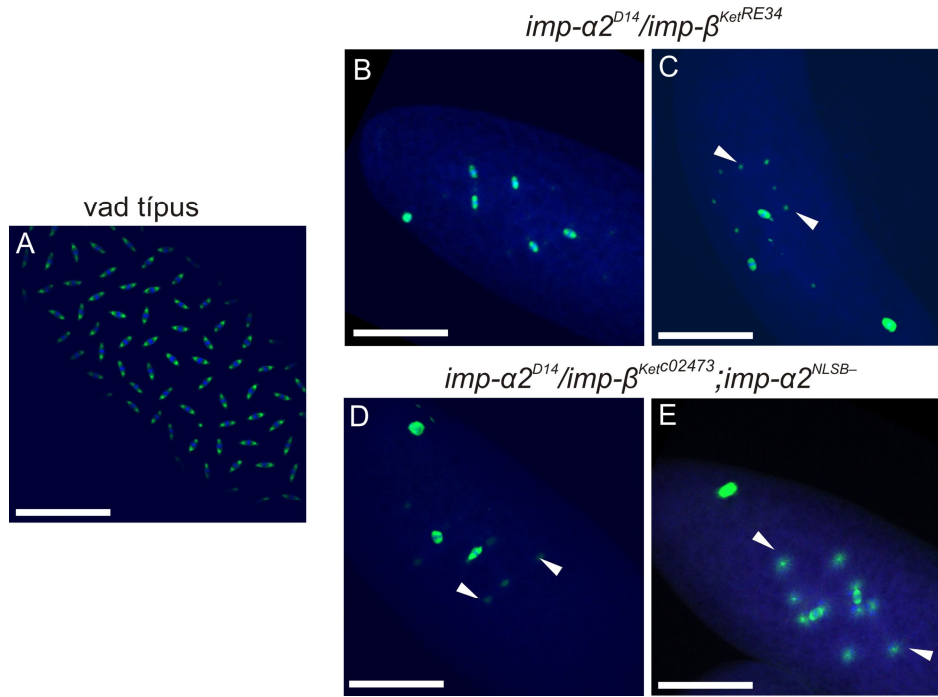
5. Az $\text{Imp-}\alpha 2$ és $\text{Imp-}\beta^{\text{Ket}^{\text{el}}}$ specifikus aktivitásának csökkenése leállítja a mitózist az embriófejlődés korai szakaszában

Annak érdekében, hogy pontosabban meghatározzuk, mikor áll le az embriók fejlődése, az $\text{imp-}\alpha 2^{\text{D14}}/\text{imp-}\beta^{\text{KetRE34}}$ és $\text{imp-}\alpha 2^{\text{D14}}/\text{imp-}\beta^{\text{KetC02473}}; \text{nos-Gal4-NLSB}^-$ nőtényektől származó embriókat 2 órán keresztül gyűjtöttük és fixálás előtt további két órán keresztül 25 °C-on tartottuk. Így a legfiatalabb embrió is elérhetett a 13. osztódási ciklusba (4096 sejtmag). Ezután az embriókat anti- α -tubulin ellenanyaggal és DAPI-val festettük, majd fluoreszcens- és konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. A mutáns embriók fejlődése túlnyomórészt az első három mitotikus ciklus során, gyakran páratlan számú metafázis-szerű alakzatban állt meg (14. ábra). Bár az $\text{imp-}\alpha 2^{\text{D14}}/\text{imp-}\beta^{\text{KetRE34}}$ kombinációban az embriók néhány százaléka eljutott a 6-7 szinciciális osztódásig, ennél tovább megvizsgált embriók egyike sem fejlődött.



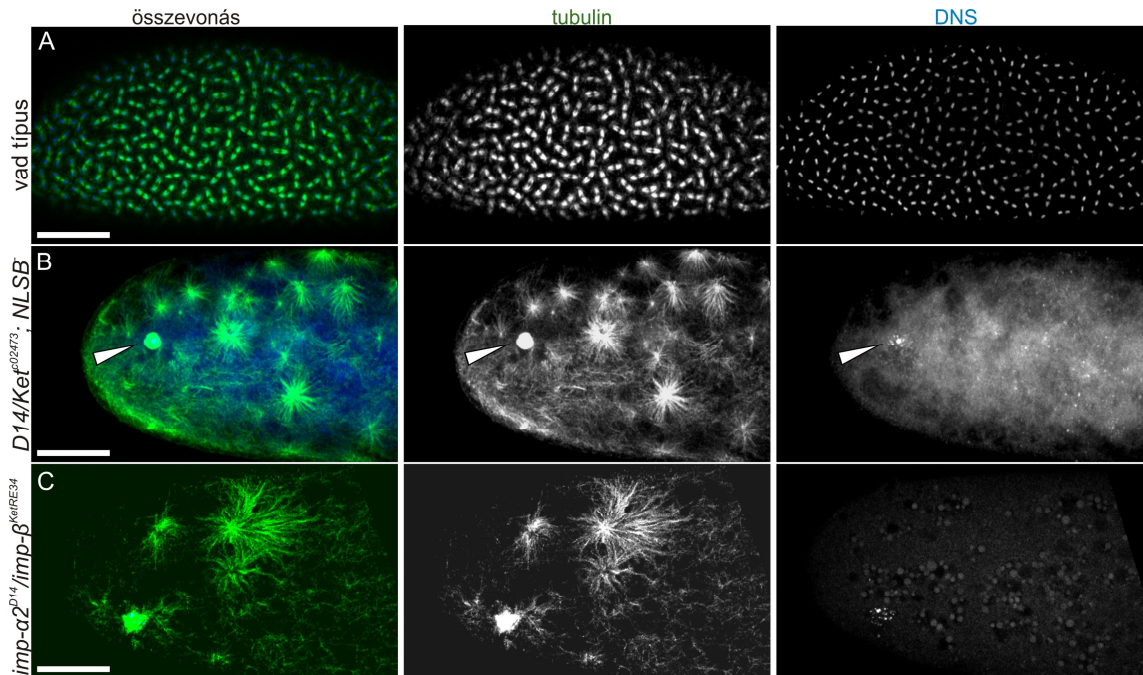
14. ábra Az $\text{imp-}\alpha 2^{\text{D14}}/\text{imp-}\beta^{\text{KetRE34}}$ és $\text{imp-}\alpha 2^{\text{D14}}/\text{imp-}\beta^{\text{KetC02473}}; \text{nos-Gal4-NLSB}^-$ nőtényektől származó 2-4 órás mutáns embriókban található orsók számának alakulása. A vizsgált embriók száma legalább 100.

A vad típusú embriókkal összehasonlítva az $\text{imp-}\alpha 2^{\text{D14}}/\text{imp-}\beta^{\text{KetRE34}}$ és $\text{imp-}\alpha 2^{\text{D14}}/\text{imp-}\beta^{\text{KetC02473}}; \text{nos-Gal4-NLSB}^+/+$ mutáns nőtényektől származó embriókban az orsók számában és alakjában egyaránt hibák figyelhetők meg (15. ábra).



15. ábra A korai embrionális fejlődés 2-4 órás embriókban. (A) vad típusú embrió a 8. osztódási ciklusban, egy órával a pete lerakása után fixálva. Az osztódási orsók már megkezdtek vándorlásukat az embrió felszíne felé. (B és C) *imp-α2^{D14}/imp-β^{KetRE34}* és (D és E) *imp-α2^{D14}/imp-β^{KetC02473}; nos-Gal4-NLSB⁻* nőstények embriói. α-tubulin (zöld), DNS (kék). A nyilak a szabad asztereket jelölik. Mércévonal: 100 μm.

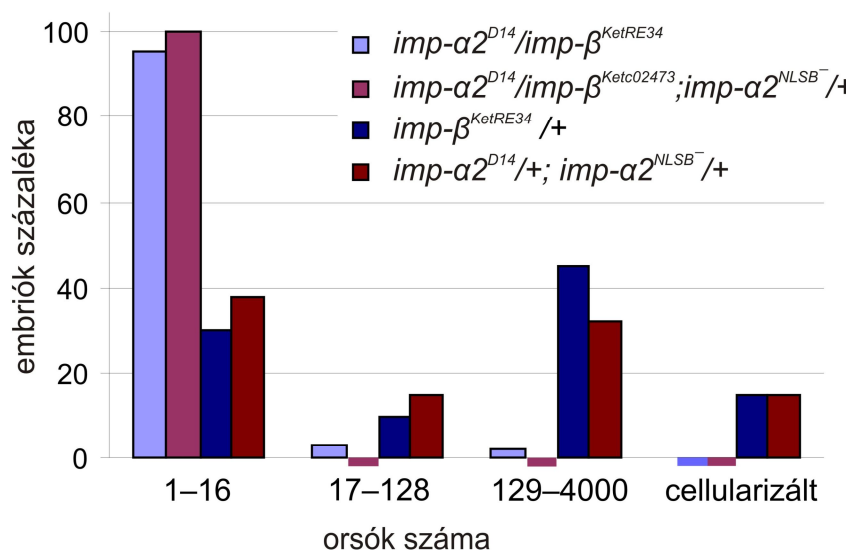
Az osztódási orsók pólusain időnként nagy mikrotubulus tömeg növekedett (15. ábra E). A mikrotubuláris aszterek száma és szerveződése nagyon változó képet mutatott (15. ábra C, D és E).



16. ábra. Aszter túlnövekedés a mutáns nőstények 2-4 órás embrióiban. (A) Vad típusú (B) *imp-α2^{D14}/imp-β^{KetRE34}* (C) az *imp-α2^{D14}/imp-β^{KetC02473}; nos-Gal4-NLSB⁻* (a képen *D14/Ket^{C02473}; NLSB⁻*) nőstényből származó embriók. Rendellenesen elhelyezkedő poláris test (nyíhegyek), α-tubulin (zöld), DNS (kék). Mércévonal: 50 μm.

Az $imp-\alpha 2^{D14}/imp-\beta^{KetRE34}$ és az $imp-\alpha 2^{D14}/imp-\beta^{Ket02473}$; $nos-Gal4-NLSB^{-}$ nőtényektől származó embriókban a rendellenességek széles skálája előfordult, de ezek közül a leggyakoribb a szabad aszterek kialakulása volt, amit az embriók mintegy három negyedében megfigyeltünk. Találtunk embriókat, amelyekben a tubulin polimerizáció teljesen „elszabadult” és az aszterek pókhálószerűen kitöltötték a teljes szincíciumot (16. ábra B és C). Esetenként megfigyeltünk akár 50-60 szabad asztert tartalmazó embriókat is.

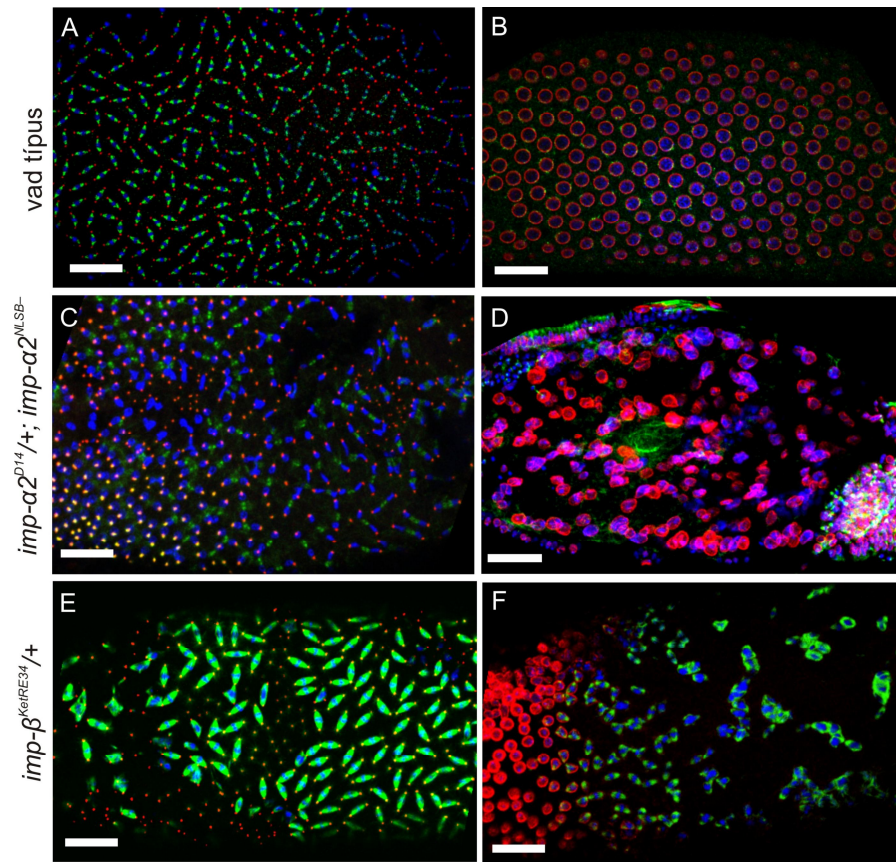
Az $imp-\alpha 2$ és $imp-\beta^{Ketel}$ közötti kölcsönhatás jelentőségét bizonyítja az a megfigyelésünk, amelyet a mutáns $imp-\alpha 2^{D14}/+$; $nos-Gal4-NLSB^{-}/+$ vagy $imp-\beta^{KetRE34}/+$ egyszeres mutáns anyáktól származó (80- illetve 39%-os embrió letalitás), valamint a kettős mutáns $imp-\alpha 2^{D14}/imp-\beta^{KetRE34}$ és az $imp-\alpha 2^{D14}/imp-\beta^{Ket02473}$; $nos-Gal4-NLSB^{-}/+$ nőtényektől származó (100% embrió letalitás) fejlődésben elakadt embriók összehasonlításakor tettünk. Míg a kettős mutáns embriók 95-100%-nak ooplazmájában kevesebb, mint 16 orsót számoltunk meg, addig az egyszeres mutánsok letális embrióinak 35-45%-a elérte a 129-4000 orsós állapotot (17. ábra).



17. ábra Az orsók számának alakulása a különböző mutáns nőtényektől származó, 4-6 órás, fejlődésben leállt embriókban rámutat az $imp-\alpha 2$ és $imp-\beta^{Ketel}$ specifikus mutáns alléjainak szinergikus kölcsönhatására.

Mi több, az egyszeres mutánsok 4-6 órás embrióinak 15%-a már részlegesen cellularizált állapotban volt, bár fejlődésüket leállította a korábbi mitózisok során jelentkezett számtalan rendellenesség (18. ábra C-F). Eredményeink rámutatnak, hogy a kettős mutáns anyák embrióiban a fejlődés határozottan korábban rekedt meg, mint az

olyan anyákéban, amelyek vagy az csak egyik vagy a csak másik gén mutációját hordozták, hangsúlyozva, a két gén mutációja közötti szinergikus hatást.



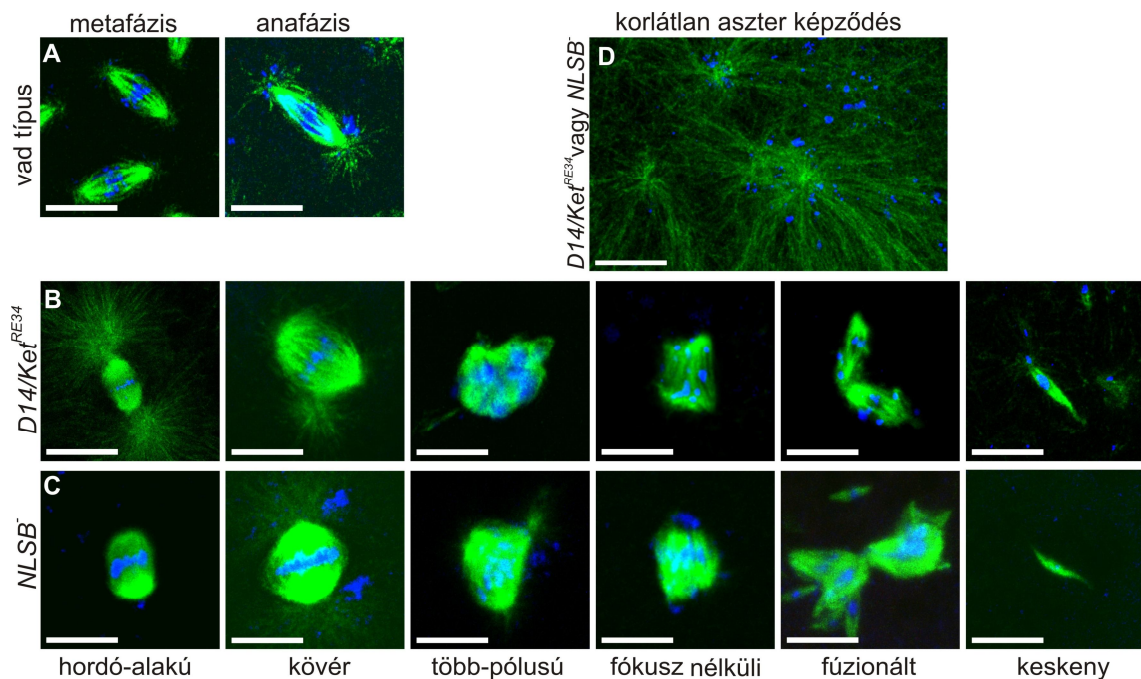
18. ábra. Mitotikus fenotípusjegyek az egyszeres mutáns anyák embrióinak a 8-10 osztódási ciklusában. (A) vad típusú embrió (C és D) *imp-α2^{D14}/+; imp-α2^{NLSB}/+* és (E és F) *imp-β^{KetRE34}/+* genotípusú anya embriója. α -tubulin (zöld), (A, C és E) centrosomin (piros), (B, D és F) lamin (piros), DNS (kék). Mércévonat: 25 μ m.

6. Az Imp- α 2/Imp- β ^{Ketel} komplex szabályozza a mitotikus folyamatokat

Az *imp-α2^{D14}/imp-β^{KetRE34}* és *imp-α2^{D14}/imp-β^{Ketc02473}*; *nosGal4-NLSB⁻* nőstények embrióinak részletesebb konfokális mikroszkópos vizsgálata során számos olyan mitotikus rendellenességet figyeltünk meg, amelyek a korai embriógenezis elakadását jelzik. A vizsgált embriókban, interfázisos sejtmagokat lényegében nem találtunk. Feltűnt, hogy a szincíciumban előforduló legtöbb mitotikus alakzat megnövekedett méretű orsó volt (19. ábra).

Az orsóhibákon belül a leggyakrabban előforduló rendellenes forma az úgynevezett kövér orsó volt, amelyet a két, jól fókuszált orsópólusról kiinduló MT-oknak az orsó közepén kiszélesedő nagy tömege épített fel, és a kromatin az ekvatoriális síkba rendeződve szabályos metafázisos lemezt formált meg. A hordó-alakú orsók

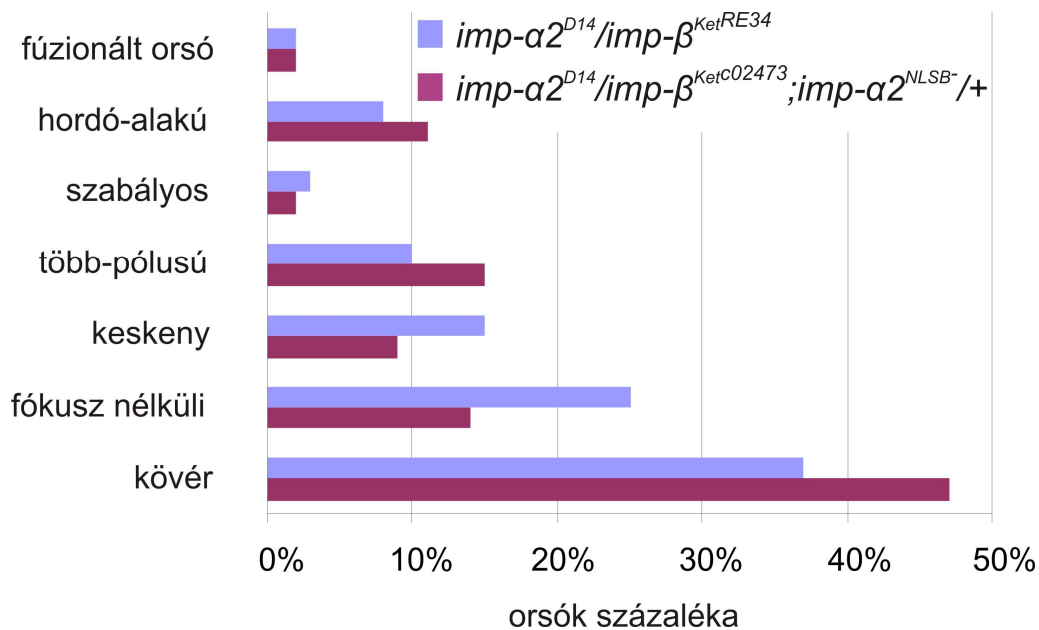
ugyancsak roboztusak voltak és szabályos kromatin eloszlással rendelkeztek, viszont az orsó pólusai szervezetlenek voltak. Lehetséges, hogy ezek a széles pólusú orsók a kövér orsók centroszóma-vesztése után alakultak ki, mivel centroszómák hiányában nem volt, ami fókuszálja a MT-okat. Megfigyeltünk még többpólusú orsókat, különálló kromatin aggregátumokkal és olyan fókusz nélküli orsókat, amelyekben a kromatin apró töredékekben szóródott szét a MT-ok mentén.



19. ábra Orsó rendellenességek az *imp-α2^{D14}/imp-β^{KetRE34}* és *imp-α2^{D14}/imp-β^{Ket02473}; nos-Gal4-NLSB^{-/-}* (az ábrán *NLSB^{-/-}*) nőtényektől származó embriókban. (A) Vad típusú metafázisos és anafázisos osztódási orsók. (B, C) Orsó rendellenességek (B) az *imp-α2^{D14}/imp-β^{KetRE34}* és (C) az *imp-α2^{D14}/imp-β^{Ket02473}; nos-Gal4-NLSB^{-/-}* nőtények embrióiban. (D) Aszter túlnövekedés. α-tubulin (zöld) és DNS (kék) Mércévonala: 10 μm

A többpólusú és az alig 5% t kitevő, egyik pólusuknál összetapadt, fuzionált orsók esetlegesen egy részlegesen osztódó sejtmag maradékát képviselhetik, vagy egy szabálytan centroszóma osztódás eredményei. Az orsók egy csoportja, meglepő módon, nagyon kevés MT-ból felépülő keskeny orsó volt, csekély vagy nem kimutatható DNS-sel. Érdekes, hogy az embriókban nagyon gyakran megfigyelt szabad aszterek növekedésének irányát nem befolyásolta sem a szomszédos aszter, sem az esetlegesen közelben található DNS (19. ábra D). A különböző orsóhibák előfordulásának gyakoriságát az embriókban megszámlolt összes orsó százalékában fejeztük ki és grafikusán ábrázoltuk (20. ábra). Csakúgy, mint az orsók számában (14. ábra), az orsó rendellenességek eloszlásában sem találtunk számottevő eltérést a

imp-α2^{D14}/imp-β^{KetRE34} és *imp-α2^{D14}/imp-β^{KetC02473}*; *nosGal4-NLSB^{-/+}* genotípusú nőtények embriói között.

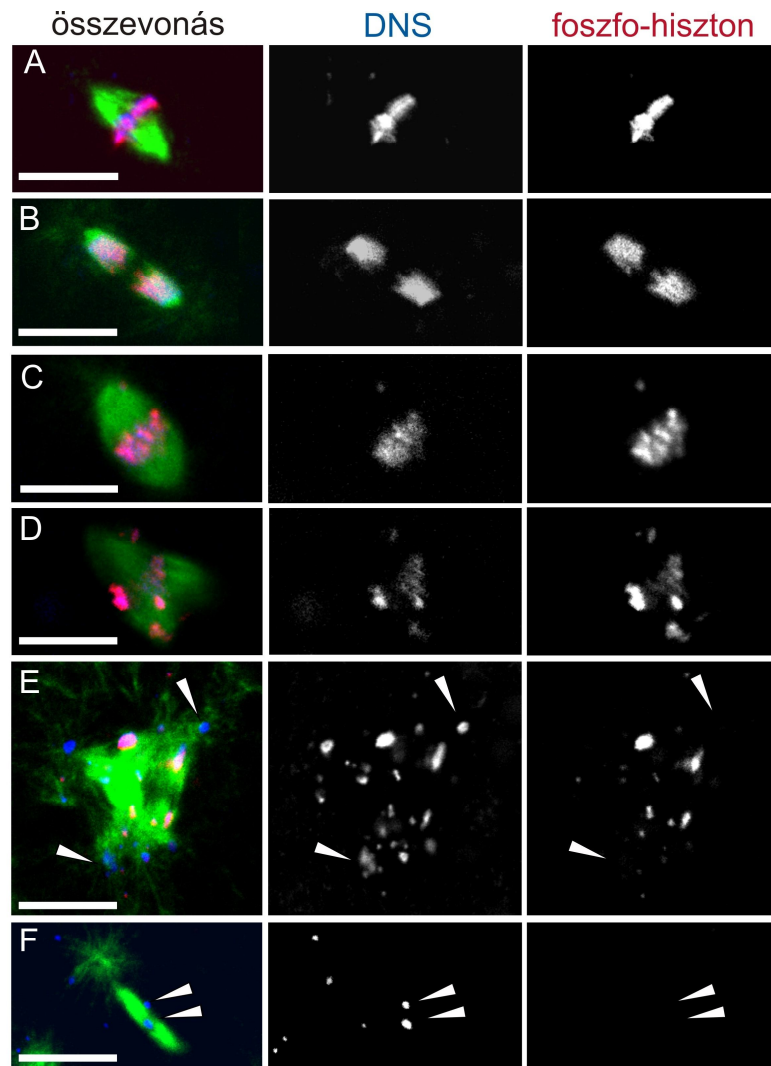


20. ábra A különböző orsó-rendellenességek gyakorisága az *imp-α2^{D14}/imp-β^{KetRE34}* és *imp-α2^{D14}/imp-β^{KetC02473}*; *nos-Gal4-NLSB⁻* genotípusú nőtények embrióiban. Vizsgált orsók száma legalább 200 mindkét genotípusban.

Tovább jellemezve a mitotikus fenotípusokat, megvizsgáltuk az orsók kromatinjának foszfo-hisztin festődési mintázatát. Ehhez, a nukleosómák H3 hisztinjának N terminálisán elhelyezkedő, 28-as foszforilált szerint magába foglaló epitóp ellen termeltetett, poliklonális ellenanyagot használtunk. A H3 hisztin foszforilációja szorosan kapcsolódik a DNS kondenzáltsági fokával, mivel a hisztin-foszforiláció lazítja fel és teszi hozzáférhetővé a kromatint olyan nukleáris faktorok számára, amelyek a kondenzációt előidézik.

A vad típusú embriókban a foszfo-hisztin festődés erős volt a kromoszómák szétválása előtt, utána pedig gyengébb (21. ábra A és B). A mutáns embriók nagyméretű orsóiban, mind a metafázisos lemezben rendezetten elhelyezkedő, mind az orsón rendezetlenül szétszóródott kromatin szerkezeteken, a metafázisra jellemző erős és homogén festődést láttunk (21. ábra C és D). Ezenkívül, gyakran megfigyeltünk foszfohisztinra nem festődő DNS aggregátumokat is az orsók külső széleihez közel, vagy a keskeny orsóknál, amelyek csökkent mennyiségű kromatint tartalmaztak (21.

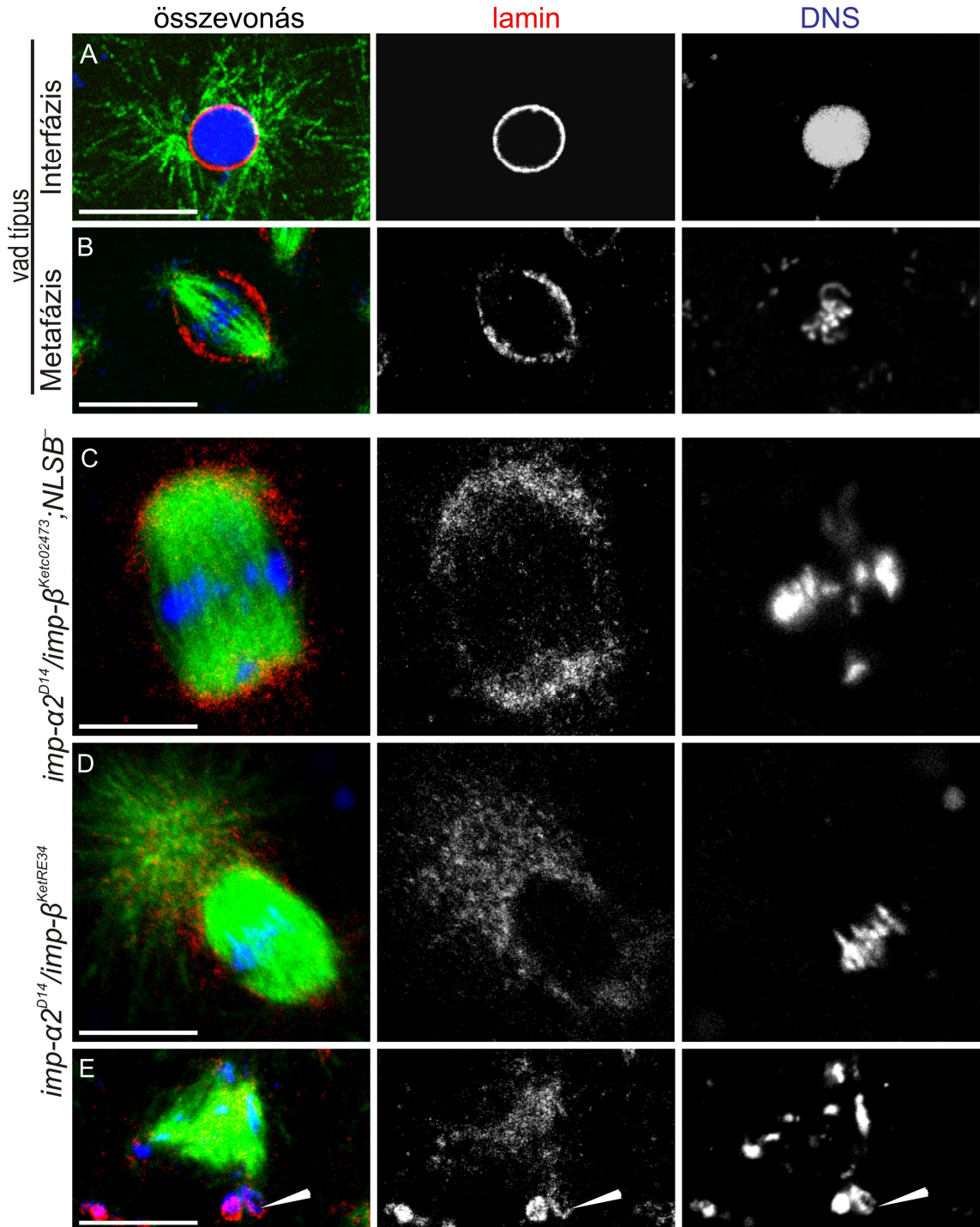
ábra E és F). Ezek az eredmények azt jelzik, hogy a kromatin kondenzációja is zavart szenved a mutáns embriókban.



21. ábra Kromoszóma-kondenzációs rendellenességek anti-foszfo-hisztonH3 ellenanyaggal festett *imp-α2^{D14}/imp-β^{KetRE34}* és *imp-α2^{D14}/imp-β^{Ketc02473}*; *nos-Gal4-NLSB⁻* genotípusú nőstények embrióiban. (A, B) Meta- és anafázis vad típusú embrióban. (C, F) Mutáns nőstények embrióinak orsói. (C) Foszfo-hisztonra pozitívan festődött, kondenzált kromoszómák egy kövér orsó metafázisos lemezében. (D) Foszfo-hiszton-pozitív kromatin szabálytalanul szétszóródva a többpólusú orsóban (E) Multipoláris orsó foszfo-hiszton-pozitív és -negatív (nyílhegyek) rendezetlenül szétvált kromatinnal. (F) Foszfo-hiszton-negatív, nem kondenzált kromatin-rögök (nyílhegyek) a keskeny orsóban. α-tubulin (zöld), foszfo-hiszton (piros), DNS (kék).

Hasonlóképpen, megvizsgáltuk a sejtmaghártya állapotának alakulását *imp-α2^{D14}/imp-β^{KetRE34}* és *imp-α2^{D14}/imp-β^{Ketc02473}*; *nos-Gal4-NLSB⁻* genotípusú anyák embrióiban (22. ábra). A vad típusú embrióban zajló szinkron-osztódások során az anti-lamin Dm0 ellenanyagfestés kirajzolja, az interfázisos sejtmagot határoló, összefüggő maghártyát (22. ábra A), ami a mitózis kezdetén az orsó pólusok körüli régióban lebomlik (részlegesen nyitott mitózis). A metafázisos lamin festődés egy jól látható, széles sávban veszi körbe az orsót, kijelölve a fellazult magmembrán maradványát

(orsóköpeny), és sokkal gyengébben vagy egyáltalában nem látható az orsópólusokon (22. ábra B). A telofázisos festés ismét mutatja az újraformálódó maghártyát a már szétvált, dekonzenzáldó kromatidák felszínén (22. ábra C).

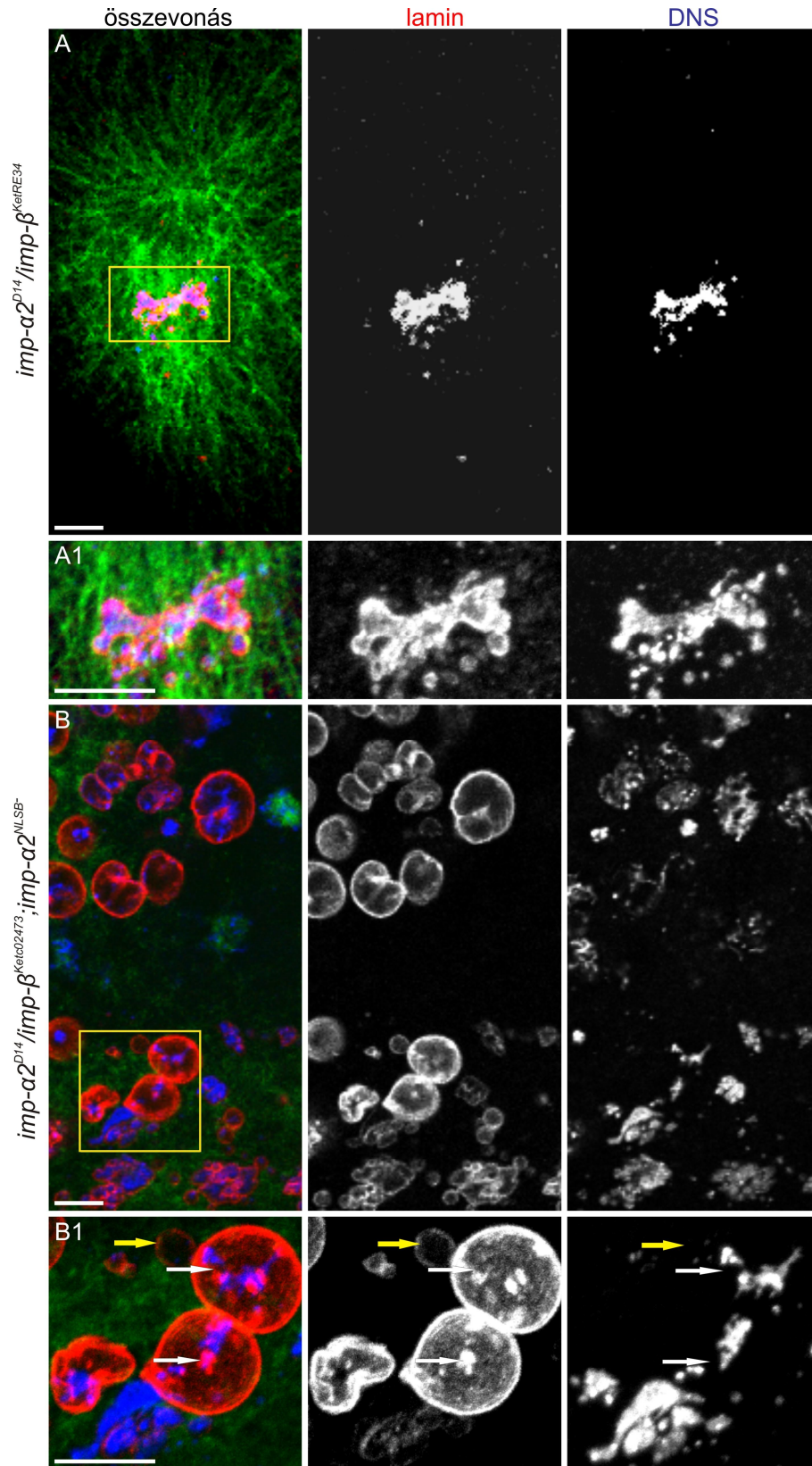


22. ábra A sejtmaghártya szerveződése az *imp-α2^{D14}/imp-β^{KetRE34}* és *imp-α2^{D14}/imp-β^{Ket02473}*; *nos-Gal4-NLSB⁻* genotípusú nőstények embrióiban. (A-C) Vad típusú embrió sejtmagja (A) interfázisban, (B) metafázisban és (C) telofázisban. (D) Feldúsult laminnal övezett orsó pólusok az *imp-α2^{D14}/imp-β^{KetRE34}*; *nos-Gal4-NLSB⁻* embrió hordó-alakú orsójában. (E) Nagy aszter körül koncentrált lamin egy kövér orsó pólusánál *imp-α2^{D14}/imp-β^{KetRE34}* embrióban. (F) Laminnal övezett kromatin aggregátumok (nyilak) egy többpólusú orsó egyik pólusán *imp-α2^{D14}/imp-β^{KetRE34}* embrióban. α-tubulin (zöld), lamin (piros), DNS (kék) Mércévonat: 10 μm

A mutáns nőstények embrióiban a vad típustól teljesen eltérő, lamin-eloszlást láttunk. A kövér és hordó-alakú orsókbán, az orsó pólusokat lamin festődő membrán vezikula felhő övezte. Az ekvatoriális sáv szerű festődés esetenként gyengén látszott, de legtöbbször hiányzott (22. ábra D, E). A pólusokon kialakult hatalmas aszterek környezetében szintén magas koncentrációban láttunk lamin vezikulákat (22. ábra E). A többpólusú orsókbán a lamin rendellenesen a MT-okhoz lokalizáltan, valamint az egyik pólusnál, összefüggő gyűrűt formálva látható (22. ábra F). Elképzelhető, hogy ebben az esetben a sejtmaghártya már elkezdi megszerveződni a metafázisos lemezből kihúzott kromatidák körül.

Időnként az embriókban megfigyeltünk DNS aggregátumokat, melyeket vastag, szabálytalan alakú lamin réteg határolt (23. ábra A és A1). Olyan, változó méretű lamin képleteket is láttunk, amelyek lényegében DNS jelenléte nélkül alakultak ki vagy csak nagyon kevés kromatint tartalmaztak (23. ábra B és B1, sárga nyilak). Ritkán, kialakultak olyan, lamin és DNS-t is tartalmazó aggregátumok, amelyeket nagyméretű, összefüggő, határozott lamin gömbök zártak körül (23. ábra B és B1, fehér nyilak). Ezeknek az alakzatoknak az erős festődése kétségtelenül arra utalt, hogy vastagabbak, mint a szabályos sejtmaghártya.

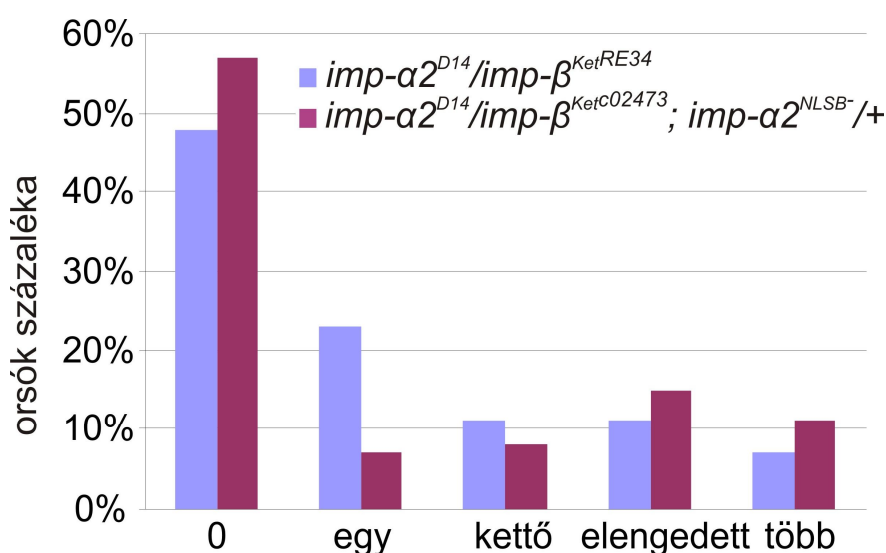
Megfigyeléseinkből arra következtetünk, hogy az *imp- α 2* és az az *imp- β ^{Ketel}* gének aktivitásának csökkenése együtt jár a szabályos orsóköpeny lebomlásával és a vezikulumok orsó pólusokon történő rendellenes felhalmozódásával, valamint a maghártya térbeni és időbeni helytelen megszerveződésével, valamint rendellenes lamin szerkezetek kialakulásával.



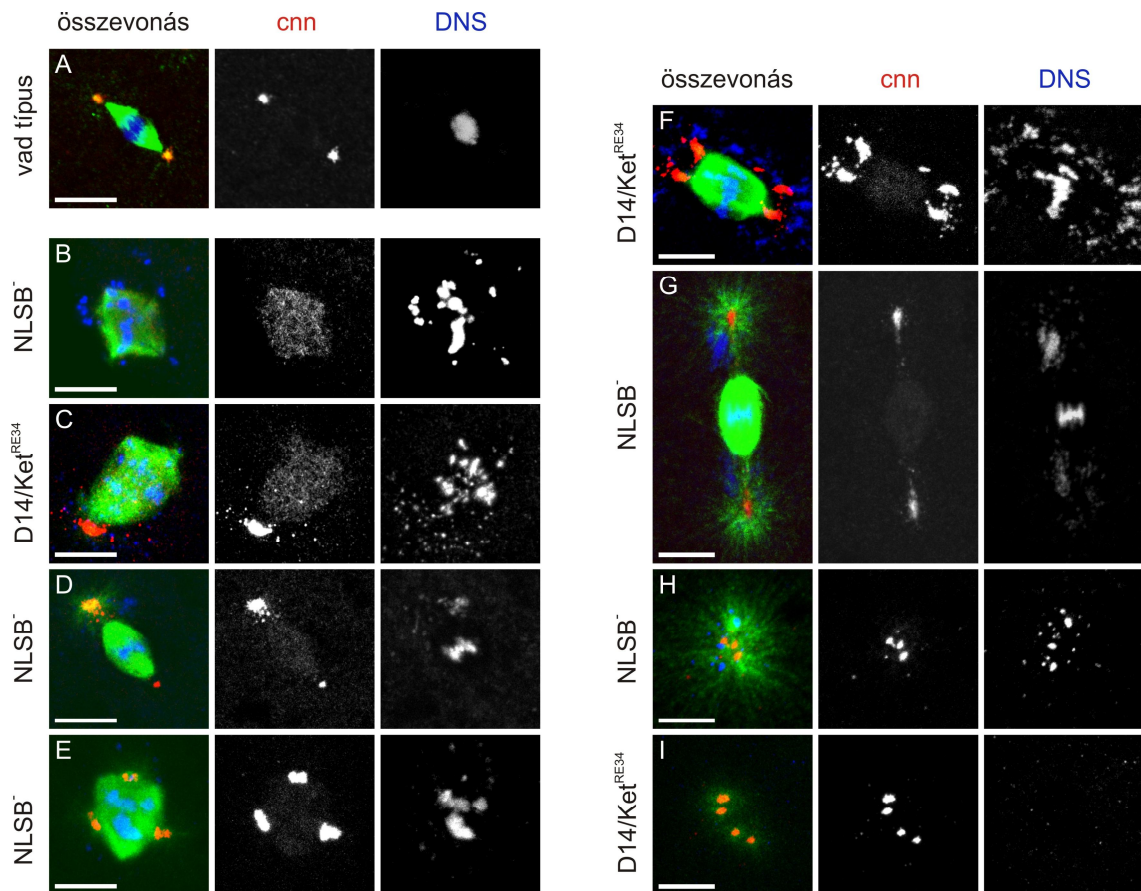
23. ábra. Sejtmaghártya szerveződési rendellenességek az *imp-α2^{D14}/imp-β^{KetRE34}* és az *imp-α2^{D14}/imp-β^{KetC02473}*; *nos-Gal4-NLSB⁻* genotípusú nőtények embrióiban. (A, A1) Kromatin fragmentumok körül megformálódott lamin az aszter-szerű MT felhalmozódáson *imp-α2^{D14}/imp-β^{KetRE34}* embrióban. (B, B1) Rendhagyó, nagyméretű lamin gömbökbe zárt fragmentált kromatin és lamin aggregátumok (fehér nyilak) és kromatin nélkül felépülő maghártya (sárga nyilak) *imp-α2^{D14}/imp-β^{KetC02473}*; *nos-Gal4-NLSB⁻* embrióban. α-tubulin (zöld), lamin (piros), DNS (kék). Mérvonal: 10 μm.

7. Az $\text{Imp-}\alpha 2/\text{Imp-}\beta^{\text{Ketel}}$ komplex hozzájárul a centroszómák dinamikájához

Az orsó pólusok rendellenességei indokolták, hogy alaposabban megvizsgáljuk a mutáns embriók centroszómáit is. A centroszómák szerveződését, egy peri-centrioláris mátrix-összetevő fehérje elleni, anti-centroszomin (Heuer és mtsai., 1995) ellenanyaggal történő immunfestéssel követtük nyomon a vad típusú és mutáns nőtények embrióiban. A centroszóma rendellenességeket mutató orsók előfordulásának gyakoriságát, az összes vizsgált orsó számához viszonyítva, százalékban határoztuk meg és grafikonon ábrázoltuk (24. ábra). A vad típusú orsó két centroszómája az orsópólusokon az asztrális MT-okkal kolokalizálódva helyezkedik el. A mutáns orsók legtöbbször nincs centroszóma (24. ábra és 25. ábra B) és ez független az orsók alakjától. Kisebb gyakorisággal megfigyeltünk viszonylag nagy, centroszominra pozitívan festődő alakzatokat az orsók egyik pólusán (25. ábra C és D), vagy kisebb pontokat az orsó periferiáján (25. ábra C és F). A számfeletti centroszómával rendelkező orsók előfordulási gyakorisága az $\text{imp-}\alpha 2^{D14}/\text{imp-}\beta^{\text{KetRE34}}$ genotípusú nőtények embrióiban 7%, míg az $\text{imp-}\alpha 2^{D14}/\text{imp-}\beta^{\text{KetC02473}}; \text{nos-Gal4-NLSB}^-$ genotípusú nőtények embrióiban 11% volt (24. ábra). Ezek az „extra” centroszómás orsók feltehetőleg úgy keletkeznek, hogy a mutáns anyáktól származó embriókban a centroszómák egy nukleáris cikluson belül akár két, három vagy még több osztódáson is keresztülmennek.



24. ábra. A orsónkénti centroszómák száma az orsók százalékában



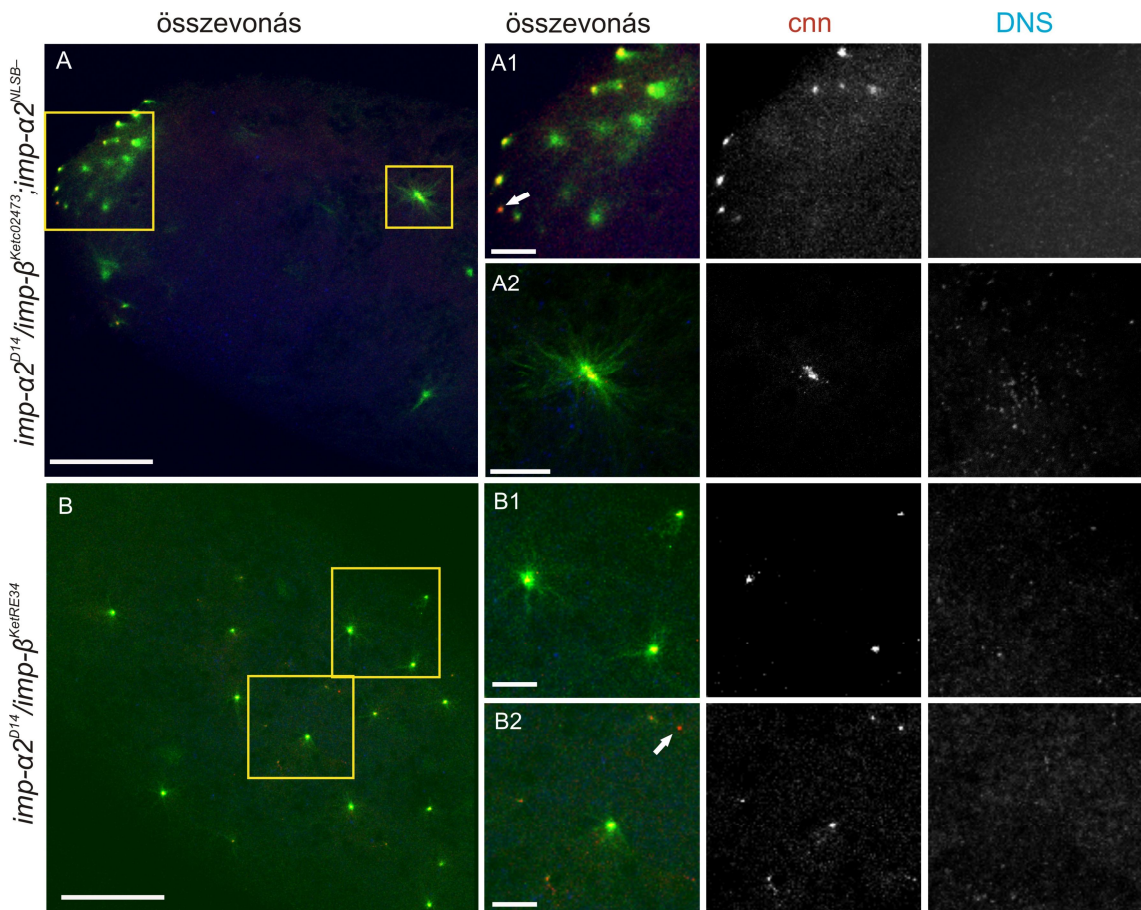
25. ábra A centroszómák szerveződése az *imp-α^{D14}/imp-β^{KetRE34}* (képen *D14/Ket^{RE34}*) és *imp-α^{D14}/imp-β^{Ket02473}*; *nos-Gal4-NLSB⁻* (képen *NLSB⁻*) genotípusú nőstények által rakott petékben. (A) Vad típusú metafázisos orsó. (B-I) Mitotikus alakzatok mutáns nőstényektől származó embriókban. (B) Orsó centroszóma nélkül. (C) Erős centroszomin felhalmozódás egy többpólusú orsó egyik pólusán. (D) Kövér orsó, egy inaktív és egy leváló centroszómával. (E) Hárompólusú orsó, megkettőződött centroszómákkal minden póluson. (F) Hordó alakú orsó négy rendellenesen nagy centroszómával. (G) Kövér orsó, minkét póluson leváló óriási aszter formáló centroszómákkal. (H és I) A szinciciumban szabadon álló (H) erős, illetve (I) gyenge MT-nukleáló aktivitással rendelkező, osztódó centroszómák. α-tubulin (zöld), centroszomin (piros), DNS (kék). Mérvonal: 10μm

Előfordulhat, hogy duplikálódás után nem tudnak tökéletesen szétválni (25. ábra E), vagy szétválnak (25. ábra F), de maradnak az osztódási orsón. Azt sem zárhatjuk ki, hogy miután erős MT nukleáló aktivitásuk folytán leválnak az orsóról (25. ábra G), attól eltávolodva a közös szinciciális térben folytatják az osztódásukat (25. ábra H és I).

Ezekből a megfigyelésekből, arra következtethetünk, hogy a mutáns embriókban a nukleáris és centroszóma ciklus közötti szigorú összekapcsoltság megszűnik, és a centroszómák, tekintet nélkül arra, hogy osztódási orsón vagy attól szabadon helyezkednek el, önállóan osztódnak. Hasonló fenotípust más muslica mutánsokban is leírtak (Beleczy és mtsai., 2001; Zhang és mtsai., 2009).

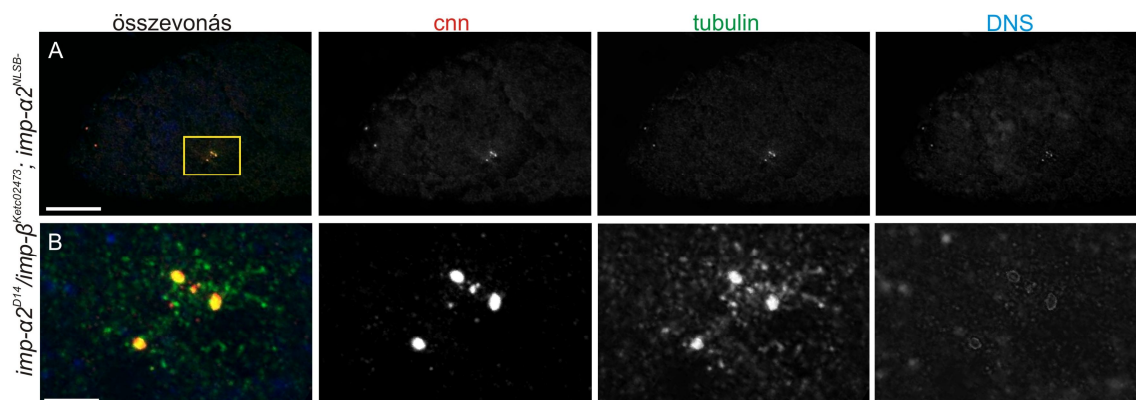
7.1. Az Imp- $\alpha 2$ / Imp- β^{Ketel} komplex gátolja a centroszóma amplifikációt

A centroszóma rendellenességek igen érdekes formáját figyelhetjük meg azokban, a feltehetően meg nem termékenyített petékben, amelyekben sem orsót, sem sarki testet nem találtunk. Mivel a centriólum a hím ivarsejttel kerül a pete ooplazmájába, megtermékenyítés hiányában a vad típusú petékben nem is alakul ki centroszóma (Foe és mtsai, 1993). A mutáns nőstényektől származó peték kis csoportjában, amelyek nem tartalmaztak a megtermékenyítésre utaló orsókat, sem elkülönült poláris testet, számos centroszominra pozitívan festődő, többnyire MT-okkal asszociált centroszóma alakzatot figyeltünk meg, (26. ábra).



26. ábra. Centroszóma alakzatok a mutáns anyák orsót és poláris testet nem tartalmazó, feltehetően meg nem termékenyített petéiben. MT-okat nukleáló, és nem nukleáló (nyilak) centroszóma-szerű képletek (A, A1 és A2) az *imp-α2^{D14}/imp-β^{Ket02473}*; *nos-Gal4-NLSB* és (B, B1 és B2) az *imp-α2^{D14}/imp-β^{KetRE34}* genotípusú nőstények által rakott petékben. α -tubulin (zöld), centroszomin (piros). Mércévonal: 10 μ m

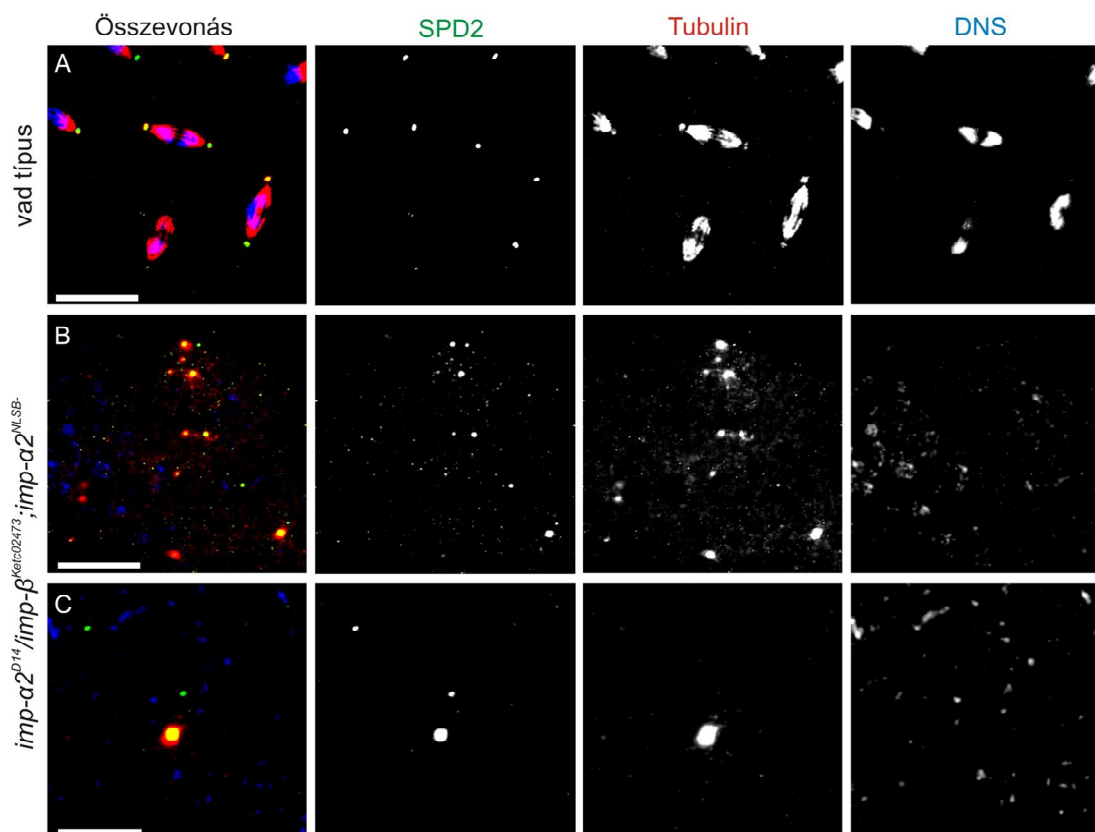
A jelenség részletesebb vizsgálata céljából az *imp-α2^{D14}/imp-β^{Ketc02473}; nos-Gal4-NLSB⁻/+* genotípusú szűz nőtények petéit, a korábbi kísérletekhez hasonló körülmények között gyűjtöttük és fixáltuk, majd immunfestést végeztünk. Ezekben a meg nem termékenyített mutáns petékben, alacsony gyakorisággal, ugyancsak megfigyeltünk centroszomin-festődésű alakzatokat kisebb vagy nagyobb csoportokban elkülönülve (27. ábra), amelyek többsége MT-okkal asszociált volt.



27. ábra Centroszomin-pozitív alakzatok az *imp-α2^{D14}/imp-β^{Ketc02473}; nos-Gal4-NLSB⁻* mutáns szűz nőtények petéiben. centroszomin (piros), α-tubulin (zöld), DNS (kék). Mércevonál: (A): 50μm és (B): 10 μm

Megnéztük, hogy ezek a képletek festődnek-e egy másik peri-centrioláris-anyag összetevő fehérje ellen termeltetett ellenanyaggal. A centriólum biogenezis egyik fontos szereplőjének, a humán CEP192 fehérjének (Carvalho-Santos és mtsai., 2010) *Drosophila* ortológja, az SPD2, szomatikus sejtekben nem vesz részt a centriólum duplikációban. A muslica SPD2 fehérjének kizárólagos feladata, hogy a petébe bejutó hímivar-sejt csupasz bazális teste köré gyűjtse az embrióban maternálisan raktározott peri-centrioláris fehérjét, ezáltal megszervezve az embrió első aktív centroszómáját (Dix és Raff, 2007).

Az *imp-α2^{D14}/imp-β^{Ketc02473}; nos-Gal4-NLSB⁻* genotípusú nőtények meg nem termékenyített petéiben a centroszóma-szerű képletek SPD2 ellenanyaggal is pozitívan festődtek és egyaránt kapcsolatban álltak MT-okkal (28. ábra). Ebből arra következtethetünk, hogy a látható centroszóma-szerű alakzatok megszervezik a peri-centrioláris mátrixot és rendelkeznek MT-nukleáló képességgel is. Annak eldöntéséhez, hogy funkcionális centroszómák keletkeznek-e, egy kizárólagosan centriólum-specifikus ellenanyaggal történő festésre lenne szükség.



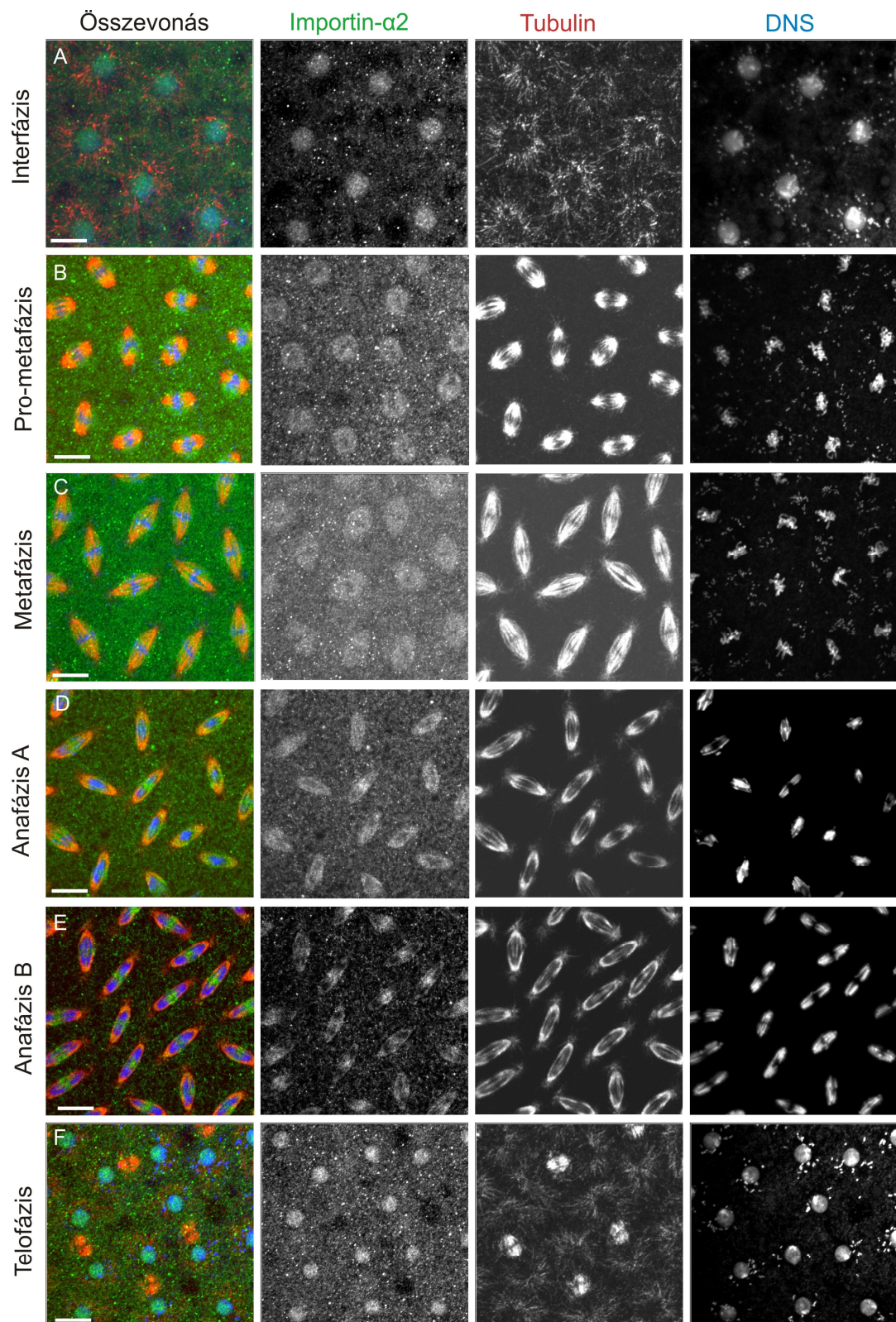
28. ábra SPD2 pozitív képletek *imp-α2^{D14}/imp-β^{Ketc02473}; nos-Gal4-NLSB⁻* szűz nőstények embrióiban. (A) Vad típusú (B és C) mutáns embriók SPD2 (zöld), α-tubulin (piros), DNS (kék). Mércévonal: 10 μm

8. Az Importin-α2 az osztódási orsókhoz kötődik a mitózisban

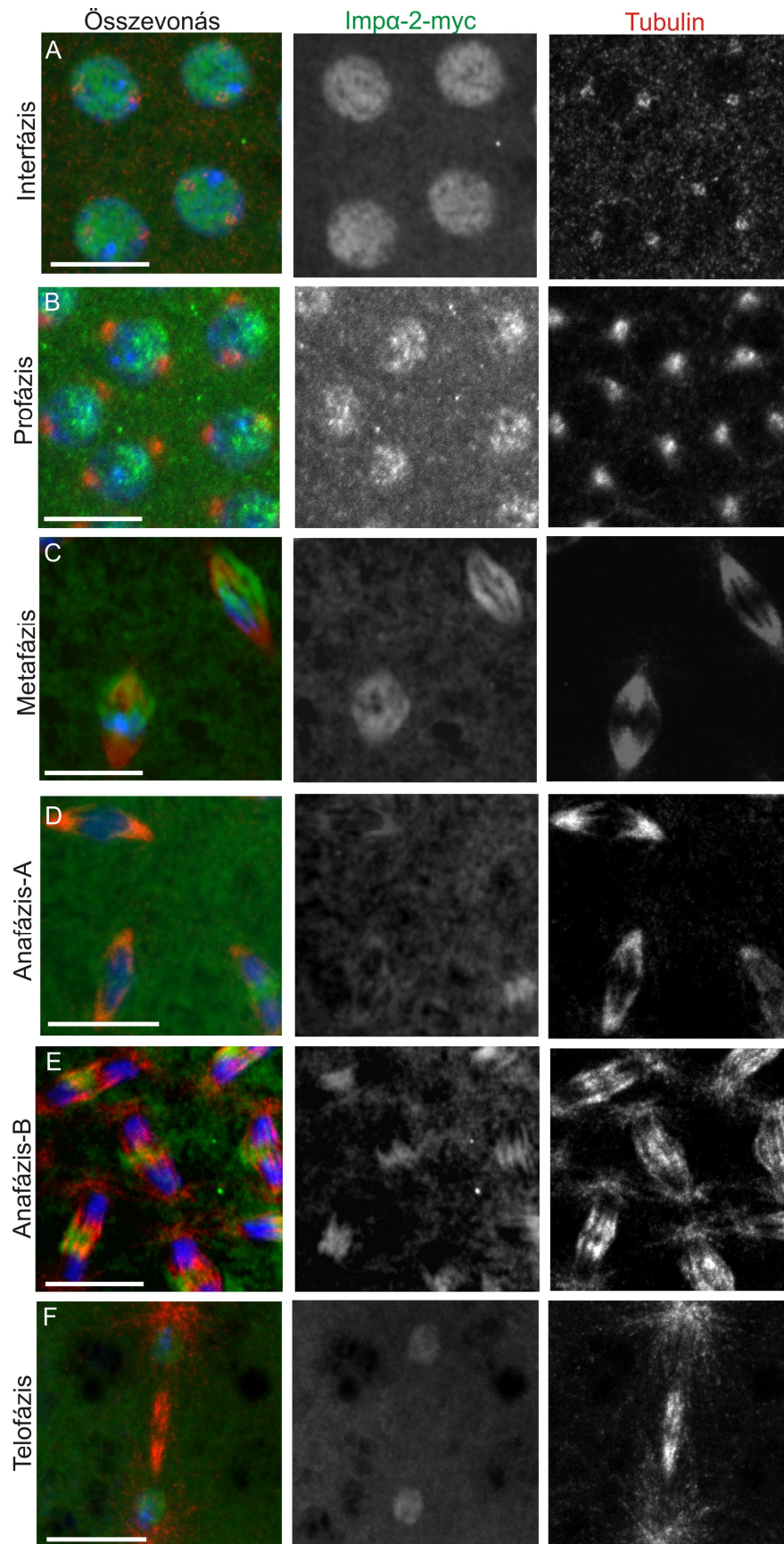
Az Imp-α2 embrionális funkciójának megértése érdekében az Imp-α2 fehérjét vad típusú embrióban az ellene termeltetett poliklonális ellenanyag segítségével követtük nyomon (29. ábra). Másrészt, *imp-α2^{D14}/+; UAS-imp-α2-myc/nos-Gal4* anyáktól származó embriókban myc-taggal jelölt Imp-α2 fehérjét fejeztünk ki és monoklonális c-myc ellenanyaggal festettük (30. ábra). Az interfázisban mindkét ellenanyaggal kifejezett Imp-α2 jelet figyeltük meg a sejtmagban (29. ábra A és 30. ábra A), ugyanakkor a citoplazma is határozottan festődött, ami a nukleáris ciklus során végig fennmaradt. Ez jó egyezést mutatott korábbi megfigyelésünkkel (Török, 1995). Mivel több különböző embrió-fixálási mód, és a két különböző ellenanyag alkalmazása során is ugyanezt eredményt kaptuk, arra következtetésre jutottunk, hogy ez nem pusztán háttérfestődés, hanem az embrió citoplazmájában felhalmozott nagy

mennyiségű Imp- α 2 fehérje által szolgáltatott jel. Az Imp- α 2 ilyen magas koncentrációját valószínűleg a gyorsan zajló osztódási ciklusok megfelelő szabályozása igényli, és mivel a korai embrióban a zigotikus gének még nem kapcsolnak be, ez az igény csak az anya által felhalmozott, nagy mennyiségű Imp- α 2 fehérje révén biztosítható. Az osztódás előrehaladtával prometafázisban, metafázisban és az anafázis korai szakaszában (anafázis A) az Imp- α 2 egyre kifejezettebben az osztódási orsókon jelent meg (29. ábra B-D és 30. ábra B-D), majd az anafázis késői szakaszában (anafázis B) kirajzolta a korábbi metafazisos lemez helyét (29. ábra E és 30. ábra E). Aztán a „midbody” kialakulására már eltűnt a síkból és telofázisra az újonnan kialakult két leány-sejtmagot festette (29. ábra F és 30. ábra F).

Az Imp- α 2 fehérjének az orsón való megjelenését korábban nem figyeltük meg (Török, 1995), mivel az akkor alkalmazott lassú-formaldehides fixálási módszer nem alkalmas az osztódási orsó megtartására. A 29. ábrán bemutatott immun-festéseket ezúttal az ún. gyors-formaldehides módszerrel, a 30. ábrán bemutatott immun-festéseket metanolos módszerrel fixált embriókon végeztük. Mindkét fixálási eljárás megőrizte az orsó szerkezetét, lehetővé téve, hogy megfigyeljük az Imp- α 2 fehérjének az orsón történő lokalizációját. Az Imp- α 2-nek ez a dinamikus eloszlása az osztódási orsókon, a különböző orsószervező faktorokkal történő térben és időben összetett kölcsönhatására utal.



29. ábra. Az Imp- α 2 fehérje eloszlása a mitózis egymást követő stádiumaiban vad típusú embrió fejlődésének korai szakaszában. α - tubulin (piros), Imp- α 2 (zöld), DNS (kék) Az embriókat 37%-os formaldehiddel fixáltuk 5 percig. Fehér mércevonat 10 μ m.



30. ábra. Az Imp- α 2-myc fehérje eloszlása a mitózis egymást követő stádiumaiban az embrió fejlődésének korai szakaszában. α -tubulin (piros), c-myc-Imp- α 2 (zöld), DNS (kék) Az embriókat metanollal fixáltuk. Fehér mércevonál 10 μ m.

9. Imp- α 2 az NLSB doménjén keresztül köti meg a sejtosztódásban szerepet játszó ISWI, CP190 és lamin fehérjéket

Az *imp- α 2* gén NLSB doménjének mutációi nagyon erős embrió fenotípust eredményeznek *imp- α 2^{D14}/imp- β ^{KetC02473}* háttéren, ami arra utal, hogy az NLSB doménnek kulcsszerepe van az embriógenesis kezdetén lejátszódó osztódások során a mitotikus faktorok megkötésében. Ezt a feltevésünket támasztják alá korábbi adataink is, amelyeket új megvilágításba helyeztek mostani eredményeink. Vad típusú és NLSB doménjét nélkülöző Imp- α 2 fehérjék ko-immun-precipitátumát összehasonlítva, számos olyan fehérjét mutattunk ki, melyek csak a vad típusú Imp- α 2 fehérjével alkottak komplexet (Gorjánác PhD dolgozat, 2004). Ezek között azonosítottuk egy-egy résztvevőjét mindhárom olyan mitotikus folyamatnak, melynek rendellenességeit a mutáns embriók immunfestése során megfigyeltük. Az ISWI az orsó összeszerelődésében résztvevő MAP (Yokoyama és mtsai., 2009), a CP190 a centroszóma (Oegema és mtsai., 1995), míg a Lamin Dm0 (Lenz-Böhme és mtsai., 1997) a sejtmaghártya kialakulásában játszik szerepet. A genetika, sejtbiológiai és biokémiai eredményeink egymással jól összeegyeztethetők és együttesen azt mutatják, hogy a muslica szinciciális osztódásaiban résztvevő faktorok aktivitásának szabályozásában az Imp- α 2 fehérje NLSB doménje kulcsfontosságú.

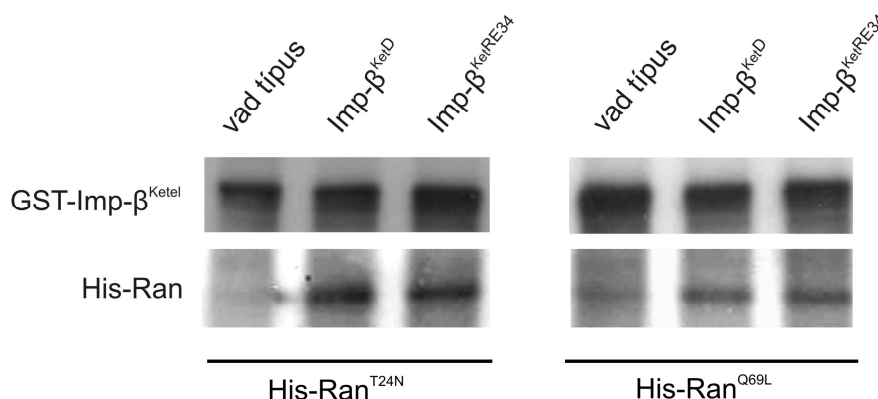
10. Az Imp- β ^{KetD} és Imp- β ^{KetRE34} egyaránt erősen kötik mind RanGTP, mind RanGDP fehérjét

A mitózis elakadására az *imp- α 2^{D14}/imp- β ^{KetC02473}; nos-Gal4-NLSB⁻* mutáns nőtények embrióiban jó magyarázatot ad az NLSB⁻ konstrukt domináns toxikus hatása, ami abból ered, hogy a mutáns Imp- α 2 nem tudja megkötni, és ezáltal inaktiválni az orsó összeszerelődésben szerepet játszó faktorokat. Az Imp- β ^{KetRE34} ártalmas hatását azonban nem tudhatjuk be direkt módon az Imp- α 2 hibájának, hanem csak valami olyan módosulásnak, ami a mitotikus faktorok Imp- α 2 fehérjéhez történő kötődését befolyásolja.

Az Imp- β ^{Ketel} molekula-modellezési (7. táblázat) és Imp- α 2 pull-down (10. ábra) eredményeink azt mutatták, hogy az Imp- β ^{KetRE34} fehérjében lévő D725N szuppresszor mutáció hatására nem csökken a mutáns Imp- β ^{Ketel} és az Imp- α 2 IBB doménje közötti kötés erőssége. Ugyanakkor, az *imp- α 2^{D14}/imp- β ^{KetRE34}* nőtényektől származó

embriókban is jelentkező fenotípus jegyek, a normálisnál nagyobb méretű orsók, a korlátlan aszterképződés, a hatalmas lamin gömbök, a nagy centroszóma-szerű alakzatok illetve számfeletti centroszómák együttesen azt sugallják, hogy ezekben az embriókban is rendellenesen magas a mitotikus folyamatokban résztvevő fehérjék szabad koncentrációja. Ennek egyik oka lehet az, hogy megváltozott az $\text{Imp-}\beta^{\text{KetRE34}}$ kötési hajlandósága a RanGTP/GDP-hez, hasonlóképpen ahhoz, amit a domináns nősténysterilitást okozó $\text{Imp-}\beta^{\text{KetD}}$ fehérjéről leírtak (Timinszky és mtsai., 2002).

A kötési viszonyok felderítésének céljából a vad $\text{Imp-}\beta^{\text{Ketel}}$, a domináns negatív $\text{Imp-}\beta^{\text{KetD}}$ és az $\text{Imp-}\beta^{\text{KetRE34}}$ fehérjékkel GST pull-down kísérletet végeztünk. Megvizsgáltuk, hogy milyen kötési affinitással bírnak ezek a fehérjék a Ran két különböző mutáns formájához. Az egyik a Ran^{Q69L} , ami nem képes a GTP-t hidrolizálni, így ez a fehérje megfelel a RanGTP „fagyott” formájának, a másik pedig a Ran^{T24N} , ami viszont a nukleotid cserét gátolja, ezért ez a RanGDP „fagyott” formájának tekinthető (Klebe és mtsai., 1995). A különböző GST- $\text{Imp-}\beta^{\text{Ketel}}$ fehérjéket a GST szekvencián keresztül glutation szefaróz gyöngyhez kötöttük, majd hozzáadtuk a 0-120 perces embriókból készült nyers fehérje kivonatban hígított, His-tag segítségével tisztított *Xenopus* Ran^{Q69L} vagy Ran^{T24N} mutáns fehérjét. A karmosbéka Ran fehérjének ezt a két mutáns változatát általánosan használják *in vitro* kísérletekben más organizmusok fehérjeivel kölcsönhatásban (heterológ rendszerek), mivel a Ran fehérje nagyfokú evolúciós konzerváltságot mutat.



31. ábra. GST pull-down kísérlet eredményének kimutatása western blot segítségével. Glutation szefaróz gyöngyhez kötött $\text{Imp-}\beta^{\text{KetD}}$ ($\text{Imp-}\beta^{\text{KetP446L}}$), $\text{Imp-}\beta^{\text{KetRE34}}$ ($\text{Imp-}\beta^{\text{KetP446L-D725N}}$) és vad típusú $\text{Imp-}\beta^{\text{Ketel}}$ GST fúziós fehérjékhez, His- Ran^{T24N} (RanGDP), vagy His- Ran^{Q69L} (RanGTP) tisztított, *Xenopus* Ran fehérjét 10 μ M-os koncentrációban tartalmazó, vad típusú muslica embrió kivonatot adtunk. A Ran fehérjék jelenlétét anti-Ran ellenanyag segítségével mutattuk ki. A gyöngyökről leoldott, és a gélre felvitt fehérjék mennyiségi viszonyait anti- $\text{Imp-}\beta^{\text{Ketel}}$ ellenanyaggal ellenőriztük.

Többek között ezeket használják *Drosophila* peték injektálásához is (Bilbao-Cortes és mtsai., 2002, Silverman-Gavrila és Wilde, 2006). Kötő pufferrel történő sorozatos mosások után, a megkötött Ran fehérjét SDS-PAGE-sel elválasztottuk, és western blot alkalmazásával, α -Ran ellenanyaggal mutattuk ki.

Az Imp- β^{KetD} és az Imp- $\beta^{KetRE34}$ fehérjék erősebben kötötték a RanGDP-t, mint a vad Imp- β^{Ketel} . Ugyanakkor, a vad típusú Imp- β^{Ketel} -hez képest, mind az Imp- β^{KetD} , mind az Imp- $\beta^{KetRE34}$ magasabb kötési hajlandóságot mutatott a RanGTP-hez is. (31. ábra). Ez, utóbbi eredmény ellentétben áll a korábban leírtakkal, miszerint az Imp- β^{KetD} gyengébben köti a RanGTP-t, mint a vad típusú Imp- β^{Ketel} (Timinszky és mtsai., 2002). Ennek oka, feltehetően az eltérő kísérleti körülményekben keresendő. Esetünkben, a gyöngyhoz kötött Imp- β^{Ketel} fehérjék azonos mennyiségi viszonyait a 31-es ábra felső paneljén látható felviteli kontroll mutatja. Eszerint, a fent említett affinitási különbség nem származhat sem abból, hogy eltérő mennyiségű fehérjét kötöttünk a gyöngyhoz, sem abból, hogy a géltre felvitt mennyiségek különböztek.

Az Imp- β^{KetD} és az Imp- $\beta^{KetRE34}$ fehérjék erős kötési hajlandósága a RanGTP és RanGDP fehérjékhez azt mutatja, hogy a mutáns Imp- β^{Ketel} -eknek az Imp- $\alpha 2$ fehérjével alkotott komplexe, egyrészt már alacsonyabb RanGTP koncentrációnál is disszociál, másrészt a RanGDP is képes lehet a komplex szétválasztására. Mindkét hatás azt eredményezi, hogy az Imp- $\alpha 2$ nem megfelelő helyen és/vagy időben engedi el az NLS-tartalmú fehérjéket, vagy azok nem tudnak hozzá kötődni ott, és amikor arra szükség lenne. Ez a szabad mitotikus faktoroknak egy állandó, megemelkedett szintjét és túlhajtott aktivitását eredményezheti, ami teljesen felboríthatja az osztódási folyamatok térbeli és időbeli szabályozásának szigorú rendjét és végül a mitózis metafázisban való elakadásába torkollik.

11. A RanGTP szint csökkentése menekíti az *imp- $\beta^{KetRE34}$* embriók letalitását

Láthattuk, hogy a RanGTP/GDP megnövekedett kötési hajlandósága az Imp- $\beta^{KetRE34}$ fehérjéhez elősegíti az Imp- $\alpha 2$ IBB doménjének disszociációját, ezáltal az orsószervező faktorok aktiválódását. Teszteltük, hogy olyan mutációk, amelyek befolyásolják a RanGTP/GDP koncentrációját, módosítják-e az *imp- $\beta^{KetRE34}/+$* nőstények embrióinak szemi-domináns letalitását (10. táblázat).

Nőstények genotípusa	Pete életképessége (%)	Szórás	Vizsgált embriók száma
<i>imp-β^{KetRE34}/+</i>	58	3,56	234
<i>imp-β^{KetRE34}/+; Df(3L)w5.4/+</i>	96	2,33	310
<i>imp-β^{KetRE34}/RanGap^{EP1173}</i>	27	6,55	728
<i>imp-β^{KetRE34}/RanGap^{EY21763}</i>	28	4,72	395
<i>RanGap^{EP1173}/+</i>	92	6,92	150
<i>RanGap^{EY21763}/+</i>	81	3,05	150

10. táblázat A RanGTP koncentrációját befolyásoló mutációk módosítják az *imp-β^{KetRE34}* fenotípusát. Az eredmények statisztikai elemzése a függelék F5. táblázatában található.

Amikor *imp-β^{KetRE34}* heterozigóta háttéren a RanGEF (Ran Guanosine Exchange Factor) fehérjét kódoló *Bjl/RCC1* dózist egy, a gént kiejtő *Df(3L)w5.4* delécióval csökkentettük, a kettős mutáns anyák embrióinak kelési gyakorisága 96%-ra emelkedett. Ha azonban, az *imp-β^{KetRE34}*-et a RanGAP-et (a RanGTP-áz aktiváló fehérje) kódoló gén funkció veszteses mutáns alléljaival kombináltuk *imp-β^{KetRE34}/RanGap^{EP1173}*, vagy *imp-β^{KetRE34}/RanGap^{EY21763}* transzheterozigóta formában, a kettős mutáns nőstényektől származó embriók életképessége 27-28%-ra csökkent. A *RanGap^{EP1173}* vagy a *RanGap^{EY21763}* mutánsoknak önmagukban nem volt számottevő hatásuk az embriók életképességére. Megvizsgáltuk azt is, hogy a két gén RNS csendesítésekor is jelentkezik-e a fenotípus módosító hatás. Az *imp-β^{KetRE34}* háttéren a *Bjl* gén RNS csendesítésével 77%-ra javult, míg a *RanGap* gén csendesítésével 43%-ra csökkent az embriók életképessége.

Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a RanGTP szintjének csökkentése képes volt az *imp-β^{KetRE34}* antimorf hatását kompenzálni, feltehetően azért, hogy több Imp-β^{Ketel}/Imp-α2 komplex kialakulását tette lehetővé és ennek folytán megnövelte a hibás embriókra jellemző, renellenesen alacsony NLS-kötő kapacitást. Ezzel szemben, amikor, a *RanGap* csökkent GTP-áz aktivitása miatt, megemelkedett a RanGTP szintje, akkor kevesebb Imp-β^{Ketel}/Imp-α2 komplex formálódott és felerősödött az *imp-β^{KetRE34}* antimorf hatása. Összességében, a genetikai, sejtbiológiai és biokémiai eredményeink egymással összhangban és egymást erősítve, világítanak rá az Imp-β^{Ketel} és Imp-α2 fehérjék együttműködésének a mitotikus faktorok szabályozásában betöltött szerepére, mely az *ecetmuslica* szinciciális osztódásai során nélkülözhetetlen.

EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

Dolgozatomban bemutatom, hogy a korai embrionális sejtosztódáskor az *imp-α2* és az *imp-β* *Drosophila* ortológja, az *imp-β^{Ketel}* közötti kölcsönhatás elengedhetetlen az osztódási orsók, centroszómák és a sejtmaghártya megszerveződésének szabályozásában. Eredményeim arra is rávilágítanak, hogy az *ecetmuslica imp-α2* génje paralóg-specifikus szerepet játszik a korai embriófejlődésben, amit sem az *imp-α1*, sem az *imp-α3* nem tud helyettesíteni.

1. Az *Imp-α2* és *Imp-β^{Ketel}* kiegyensúlyozott együttműködése szükséges a *muslica* szinciciális embrióban zajló gyors, szinkron sejtmegosztódásokhoz

A sejtosztódás során a Ran-vezérelt *Imp-α2* és *Imp-β* együttműködés szabályozza az NLS-tartalmú SAF fehérjék aktivitását. Az *Imp-α2* és *Imp-β/Ketel* az oogenezis alatt szintetizálódik és viszonylag nagy mennyiségben raktározódik a magasabbrendű állatok, mint például a karmosbéka és a *muslica* petéiben (Görlich és mtsai., 1994; Gruss és mtsai., 2001; Jans és mtsai., 2000). A *muslica* embriófejlődésének első két órájában még nem fejeződnek ki a zigosikus gének és a szinciciális citoplazmában gyors egymásutánban zajló szinkron-osztódások előrehaladását kizárólag az anya által raktározott géntermékek biztosítják (Foe és mtsai., 1993). Az *Imp-α2* és az *Imp-β^{Ketel}* fehérjékből olyan nagy a maternálisan raktározott mennyiség, hogy még felére csökkentett gén-dózis mellett is elegendő fehérje áll rendelkezésre a mitotikus az osztódások levezényléséhez.

A dolgozatomban leírt genetikai kölcsönhatások, melyeket egyrészt az *imp-α2^{D14}* és *imp-β^{KetRE34}*, másrészt az *imp-α2^{NLSB⁻}* vagy az *imp-α2^{NLSB⁻}* és az *imp-β^{Ket02473}* között figyeltünk meg, arra engednek következtetni, hogy az *Imp-α2/Imp-β^{Ketel}* funkcionális komplex mennyiségének egy kritikus küszöbérték felett kell maradni a korai embrióogenezis mitotikus osztódásai során. Míg az *imp-β^{Ket0}* heterozigóta háttéren kifejeztetett *imp-α2^{NLSB⁻}* vagy *imp-α2^{NLSB⁻}* allélok a funkcionális komplexek mennyiségét csökkentik, addig az *imp-β^{KetRE34}*, ahogy az a pull down kísérletből és az interakciós mitotikus fenotípusokból kiderült, az NLS-fehérje/*Imp-α2/Imp-β^{Ketel}* hármas komplex stabilitásával teszi ugyanezt. Az *imp-α2^{D14}/imp-β^{KetRE34}* nőstények embrióiban, a közel 1:1 arányban jelenlevő *Imp-β^{KetRE34}* és vad típusú *Imp-β^{Ketel}* versenyeznek a csökkent mennyiségű *Imp-α2* (50%

géndózis) kötéseért. A ligand-dokkolási szimuláció azt mutatta, hogy az Imp- α 2 IBB doménje azonos kötési hajlandóságot tanúsított mind az Imp- $\beta^{KetRE34}$, mind a vad típusú Imp- β^{Ketel} fehérjéhez. Mivel, eddigi ismereteink szerint, az Imp- α 2 fehérjének az IBB doménje felelős az Imp- β^{Ketel} -hez való kötődésért, a vad és a mutáns Imp- $\beta^{KetRE34}$ kötési affinitásának az IBB domén irányába mutatott hasonlóságát kiterjeszthetjük magára az Imp- α 2 fehérjére is, amit a teljes Imp- α 2 fehérjével végzett GST pull-down kísérlet eredménye is megerősített. Ebből az következik, hogy *imp- α 2^{D14}/imp- $\beta^{KetRE34}$* heterozigótákban a mindenkori, rendelkezésre álló Imp- α 2 fehérjemennyiség fele a mutáns Imp- β^{Ketel} -hez kapcsolódik, megfelelően ez által a normális stabilitású Imp- α 2/Imp- β^{Ketel} komplex mennyiségét. Az eleve csökkent mennyiségű Imp- α 2 fehérjét tartalmazó *imp- α 2^{D14}/imp- $\beta^{KetRE34}$* nőstények embrióiban az Imp- α 2/Imp- β^{Ketel} funkcionális komplexeinek mennyisége így egy olyan küszöbérték alá esik, ami már nem elégséges a korai embrió mitotikus osztódásaihoz.

Hasonlóképpen magyarázható az embriók letalitása az *imp- α 2^{NLSB⁻}* és *imp- α 2^{SNLSB⁻}* mutáns allélek *imp- α 2^{D14}/imp- β^{Ket0}* háttéren történő kifejeztetésekor. Ezeknek a mutáns Imp- α 2 fehérjéknek az IBB doménjei sértetlenek, ezért képesek komplexet alkotni az Imp- β^{Ketel} -el, viszont NLS-kötő doménjeiknek mutációja folytán nem képesek az NLS-fehérjék megkötésére. A csökkent mennyiségű Imp- β^{Ketel} -t tartalmazó *imp- β^{Ket0}* heterozigóta háttéren, a funkcionális Imp- α 2/Imp- β^{Ketel} komplexek mennyisége így ismét a kritikus küszöbérték alá esik. Az a magyarázat is felvetődhet, hogy az NLS-mutáns Imp- α 2, aktív IBB doménjén keresztül a vad típusú Imp- α 2 molekulák NLS-kötő szekvenciájával kerül kölcsönhatásba, ezáltal megakadályozza, hogy az NLS-célfehérjék az Imp- α 2/Imp- β^{Ketel} komplexhez kötődjenek, ami szintén az Imp- α 2/Imp- β^{Ketel} komplex kötő-kapacitásának csökkenését eredményezi.

A genetikai elemzés eredményei az NLSB domén jelentőségét hangsúlyozzák a szinciciális embrióban zajló gyors sejtmegosztódásokban. A mitotikus fehérjék NLS-függő immun-precipitációja ezzel teljesen összhangban áll és azt mutatja, hogy az osztódási orsó kialakulását megszervező SAF fehérjék és egyéb mitotikus faktorok az NLS szekvenciákon keresztül kötődnek az Imp- α 2/Imp- β^{Ketel} komplexhez.

2. A mutáns Imp- β^{Ketel} fehérjék molekuláris természete

Az *imp- $\beta^{KetRE34}$* DNS szekvenciáját összehasonlítva az eredeti *imp- β^{KetID}* allállal, azonosítottunk egy második mutációt, amelyik egy aszparaginsav-aszparagin cserét

eredményezett a 725-ös pozícióban (D725N). Feltehetően ennek a cserének, a molekula térszerkezetét stabilizáló, hatása az, ami az $\text{Imp-}\beta^{\text{KetD}}$ rendellenesen nyitott konformációjából eredeztetett (Timinszky és mtsai., 2002), domináns nőstényszeril fenotípust gyengíti. Ugyanakkor, a domináns negatív $\text{Imp-}\beta^{\text{KetD}}$ fehérje kifejeződését csökkentő harmadik mutáció (a promóter- vagy az UTR régiókban) szintén gyengíthetné a domináns nőstényszeril fenotípust, de egy ilyen előfordulásának az eshetősége elhanyagolható.

Ezen túlmenően, tovább erősíti a D725N cserére, mint szuppresszor mutációra vonatkozó feltételezésünket az a megfigyelés, hogy egy, a fehérje 317-es pozíciójában szerin-treonin helyettesítést (S317T) okozó, mutáció teljesen elnyomja az $\text{Imp-}\beta^{\text{KetD}}$ domináns hatását (Timinszky és mtsai., 2002), rávilágítva arra, hogy egy másodlagos helyettesítéses mutáció képes lehet rá, hogy megváltoztassa az $\text{Imp-}\beta^{\text{KetD}}$ neomorf természetét.

Mindazonáltal, az a megfigyelésünk, hogy az $\text{Imp-}\beta^{\text{KetRE34}}$, az $\text{Imp-}\beta^{\text{KetD}}$ -hez hasonlóan megköti a RanGDP-t, arra enged következtetni, hogy D725N csere csak részlegesen tudja a normális, zártabb konformáció irányába megváltoztatni a mutáns fehérje szerkezetét, hiszen az továbbra is képes arra, hogy erősen megkösse a RanGTP-nél nagyobb térigényű RanGDP-t, amit a vad $\text{Imp-}\beta^{\text{Ketel}}$ nem tud. Az $\text{Imp-}\beta^{\text{KetRE34}}$ RanGDP-kötő képessége feltételezhetően csökkenti $\text{Imp-}\beta^{\text{KetRE34}}/\text{Imp-}\alpha 2/\text{NLS}$ -fehérje komplexek stabilitását, ami végső soron alacsony RanGTP koncentráció mellett is az NLS-fehérjék felszabadulását eredményezi, ezáltal súlyosan megzavarva a mitotikus faktorok Ran-gradiens által történő szabályozását. Minden bizonnyal, ezzel azonos irányú hatást fejt ki az $\text{Imp-}\beta^{\text{KetRE34}}$ RanGTP felé megnyilvánuló affinitásának a megemelkedése is, ami tovább fokozza az $\text{Imp-}\beta^{\text{KetRE34}}/\text{Imp-}\alpha 2/\text{NLS}$ -fehérje komplexek érzékenységét az alacsonyabb RanGTP koncentrációk felé. Ezt a feltételezésünket támasztja alá az a kísérleti eredményünk is, hogy a RanGTP szintjének csökkentése (a *Bjl/RCCI* funkcióvesztéses mutációja) szuppresszálta, míg annak növelése (RanGap funkcióvesztéses mutációk), erősítette az $\text{Imp-}\beta^{\text{KetRE34}}$ gyenge antimorf fenotípusát.

3. Az $\text{Imp-}\alpha 2$ paralóg-specifikus szerepe

Mindhárom $\text{Imp-}\alpha$ fehérje eltérő, de részben átfedő szerepet játszik a muslica fejlődésében (Hogarth és mtsai., 2006; Mason és Goldfarb, 2009). A jelenleg elfogadott szemlélet szerint, az $\text{Imp-}\alpha$ fehérjék specifikus feladatai az ivarsejt képződés sajátos

igényeinek ellátására különültek el (Geles és Adam, 2001; Hogarth és mtsai., 2006; Mason és Goldfarb, 2009), mely feltételezést az is megerősít, hogy a *muslica imp-α1* és *imp-α2* homozigóta mutánsai hím-, illetve nőstényszeril fenotípust mutatnak. Ismeretes, hogy az *imp-α1* a spermatogenezisben (Giarre és mtsai., 2002; Mason és mtsai., 2002; Ratan és mtsai., 2008), míg az *imp-α2* az oogenezisben lát el specifikus feladatot (Gorjánác és mtsai., 2002; Mason és mtsai., 2002; Ratan és mtsai., 2008). Az *imp-α3*, bár kifejeződik mind a tesztiszben, mind az ováriumban (Giarre és mtsai., 2002; Hogarth és mtsai., 2006; Máthé és mtsai., 2000), elsődlegesen a sejtmagi transzportban tölt be alapvető szerepet, amit az is alátámaszt, hogy a három *muslica imp-α* gén közül egyedül az *imp-α3* null mutációja okoz zigotikus letális fenotípust (Mason és mtsai., 2002; Máthé és mtsai., 2000).

A különböző *Imp-α* fehérjéknek a *muslica* korai embrionális fejlődésében betöltött szerepét még nem vizsgálták. Az UTR^{Δ} -*imp-α* kísérleteink eredményei világosan rámutatnak az *imp-α2* paralóg-specifikus, a másik két *imp-α* gén által nem helyettesíthető, szerepére a *muslica* embrió szinciciális osztódásai során. Ezek a megfigyeléseink összecsengenek korábbi eredményeinkkel is, miszerint az *Imp-α2* SNLSB és IBB doménjeiben mutációt hordozó transzgének, ugyan képesek menekíteni az *imp-α2^{D14}* homozigóta nőstények petéinek dumpless fenotípusát, de nem tudják fenntartani a menekített petékben az embriógenezist (Gorjánác és mtsai., 2006).

A mitotikus orsóképződési folyamatban a Ran, az *Imp-α2* és *Imp-β* közreműködésével nagyon sokféle NLS függő célfehérjét szabályoz, ezért a maternális eredetű *Imp-α/Imp-β* magas koncentrációja többszöröse az egyes SAF-ok mennyiségének. A karmosbéka petéjében 1000-szeresre becsülték az *Imp-α/Imp-β* koncentrációját a TPX és NuMA fehérjék mennyiségéhez képest (Jans és mtsai., 2000). Immunfestéseinkkel a *muslica* petében és az osztódások során ugyancsak kimutattuk az *Imp-α2* fehérje magas koncentrációját, ami egyezik a fehérje expressziójára vonatkozó korábbi eredményeinkkel (Török és mtsai., 1995) és a FlyBase *imp-α2*-re vonatkozó adataival. Ezek szerint mind a nőstények ováriumában, mind a 0-2 órás embriók ooplazmájában nagy mennyiségű *Imp-α2* fehérje található.

Azon túlmenően azonban, hogy az *Imp-α2/Imp-β^{Ketel}* komplexnek sok különböző célfehérjét kell inaktiválni a megfelelő helyen és időben a mitózis előrehaladása során, az *Imp-α2* petében történő, ilyen nagymértékű felhalmozásának van egy másik oka is, ami a mitózis szabályozásának egy speciális mechanizmusára vezethető vissza. Az eukarióta osztódó sejtekben a normális mitotikus szabályozás

részeként, a sejtmaghártya lebomlása előtt megszintetizálódott mitotikus faktorok egy részét (ingázó faktorok) az importinok (leggyakrabban az imp- α 3) a sejtmagba szállítják, hogy azok a citoplazmás mitotikus apparátussal közvetlenül ne érintkezhessenek (Kisurina-Evgenieva és mtsai., 2004; Raemaekers és mtsai., 2003; Walczak és Heald, 2008; Shen és mtsai, 2009).

A muslica petének ezekből a faktorokból, a közös citoplazmában kialakuló, több mint 6000 orsó szabályozásához szükséges mennyiséget kell magába foglalnia az ooplazmában. Nyilvánvaló, hogy a szinciciális osztódások kezdetén, amikor még csak 1, 2, vagy 4 mag van jelen a citoplazmában, a több ezer orsó kialakulásához elegendő ingázó faktor nem férne el a kevés számú magban. Ezek inaktiválására, tehát valamilyen más mechanizmus kell, hogy szolgáljon. Erre a különleges feladatra kézenfekvő megoldást jelenthet, hogy ezeket az ingázó faktorokat az NLS-üknel fogva ragadjon meg egy Importin fehérje (az Imp- α 2), és ahelyett, hogy bevinné őket a magba, a citoplazmában tartsa inaktív állapotban. Ehhez azonban, az Importin fehérjének a szokásos sejtmagi transzportban résztvevőnél több ezerszer nagyobb mennyiségben kell jelen lenni, hiszen ő maga nem hasznosulhat újra egy következő transzport ciklus folyamán, mivel a mitotikus faktorok inaktiválása során az Importin is inaktiválódik.

A mechanizmusra jó példát szolgáltat a CP190, centroszóma alkotó fehérje (amit az Imp- α 2 NLS-függő módon köt meg), mivel a CP190 sejtciklus-specifikus módon ingázik a sejtmag és a centroszómák között (Kellogg és Alberts, 1992; Oegema és mtsai., 1995, 1997). Érdekes módon, a CP190 nem található meg a sejtmagban a tizedik nukleáris osztódási ciklust megelőzően, de a citoplazmában és a centroszómák környezetében kimutatható (Frasch és mtsai., 1986). Azt feltételezzük, hogy a tizedik osztódási ciklus előtt a CP190 az Imp- α 2-höz kötődésének köszönhetően marad a citoplazmában inaktív a centroszómák környezetét kivéve.

Az Imp- α 2 sejtciklus függő eloszlása a korai embrió szinkron osztódásai alatt, még inkább alátámasztja fontos szabályozó szerepét. A fehérje interfázisos sejtmagi felhalmozódása azt jelzi, hogy feltehetően a transzport-folyamatokban is részt vállal, mivel az importra szakosodott Imp- α 3 alapvetően nem mutatható ki a korai embrióban (Fang és mtsai., 2001; Máthé és mtsai., 2000). Az orsó szervezésében szerepet játszó fehérjék állandóan vagy időlegesen kapcsolódnak az orsó mikrotubulusaihoz (Silverman-Gavrila és mtsai., 2006). Az Imp- α 2 mitotikus fázisokban megfigyelt orsó-lokalizációja úgy magyarázható, hogy az Imp- α 2 az orsón inaktív konformációban, azaz CAS/RanGTP kötött formában lehet jelen, így kerülhető csak el, hogy újra komplexet

képezzen az $\text{Imp-}\beta^{\text{Ketel}}$ -el. Feltételezésünket az is alátámasztja, hogy a *Drosophila* CAS fehérjének magas koncentrációját írták le korai embrióban (Tekotte és mtsai., 2002), és a humán CAS mitotikus orsóhoz történő lokalizációját is megfigyelték (Scherf és mtsai., 1996). A RanGTP közelmúltban megfigyelt orsó MT-asszociációja megerősíti azt az elképelésünket, hogy a rendelkezésre álló RanGTP egyrészt a CAS fehérjével együttműködve stabilizálja az $\text{Imp-}\alpha 2$ zárt szerkezetét, másrészt megköti, a szintén orsó-lokalizációjú $\text{Imp-}\beta^{\text{Ketel}}$ -t. Az $\text{Imp-}\alpha 2$ az anafázis B-ben az egykori metafázisos sík helyén mutat egy gyors felhalmozódást, aminek okára jelenleg nehéz magyarázatot találni, de elképzelhető, hogy a MT nukleáció gátlásában vesz részt, ami megzavarhatná azt az intenzív MT polimerizációt, ami az átfedő orsófonalak plusz végein folyik az osztódási orsó ezen területén. Az mindenesetre valószínűsíthető, hogy ez a felhalmozódás egy nagyon gyors mozgású, pluszvég-irányított kinezin közreműködésével történik.

4. Az $\text{Imp-}\alpha 2/\text{Imp-}\beta^{\text{Ketel}}$ komplex szabályozza a mitotikus folyamatokat a szinciciális embrióban

Az $\text{Imp-}\beta$ osztódási orsó megszerveződésében játszott szerepét karmosbéka petekivonatban bemutatták (Nachury és mtsai., 2001). Bár a *Drosophila* $\text{Imp-}\beta^{\text{Ketel}}$ egy jól jellemzett gén (Timinszky és mtsai., 2002, Lippai és mtsai., 2000), részvétele a mitotikus orsó kialakulásában még nem tisztázott. Az $\text{imp-}\beta^{\text{KetD}}/+$ nőstények petefejlődése az első osztódás során leáll, mivel nem alakul ki a gonomerikus orsó és csak rendezetlen MT szálakat figyeltek meg (Tirián és mtsai., 2000). Tisztított $\text{Imp-}\beta^{\text{KetD}}$ fehérje muslica embrióba injektálásakor bár a sejtmaghártya nem alakult ki, de sem orsó, sem orsó köpeny rendellenességeket nem találtak (Timinszky és mtsai., 2002). Az $\text{imp-}\beta^{\text{KetRE34}}$ vizsgálatok megfigyelt orsó hibák ugyan nem állnak közvetlen kapcsolatban az $\text{imp-}\beta^{\text{KetD}}$ fenotípussal, de egyértelműen bizonyítják az $\text{imp-}\beta^{\text{Ketel}}$ szerepét az orsószerveződés folyamatában.

Az $\text{imp-}\alpha 2^{\text{D14}}/\text{imp-}\beta^{\text{KetRE34}}$ és $\text{imp-}\alpha 2^{\text{D14}}/\text{imp-}\beta^{\text{Ket0}}$; $\text{nos-Gal4-imp-}\alpha 2^{\text{NLSB}}/+$ nőstények embrióiban megfigyelt egyéb mitotikus rendellenességek, mint például a kromatin kondenzáció, a kromoszóma elrendeződés és szétválás hibái, elvileg lehetnének a szabálytalan orsószerveződés másodlagos következményei is. Az ISWI muslica ortológjának NLS-függő immunprecipitációja az $\text{Imp-}\alpha 2$ -vel, azonban arra enged következtetni, hogy a szabad NLS-fehérjék megváltozott koncentrációjának

közvetlenül is lehet hatása a DNS állapotára és a kromoszómák szerveződésére. Ezt a feltételezésünket támasztja alá az a közelmúltban közzé tett eredmény, miszerint a kromatin újraszerveződéséért (kromatin remodelling) felelős ISWI ATP-áz (Brown és mtsai., 2007; Corona és mtsai., 1999; Siriaco és mtsai., 2009) RanGTP-függő MAP-ként is azonosították, amelynek szerepe van a kromoszómák szétválásában és az anafázisos MT-ok stabilizációjában karmosbéka petében és muslica S2 sejttenyészetben egyaránt (Yokoyama és mtsai., 2009).

A mitotikus orsók hibás szerveződésével centroszóma rendellenességek is gyakran együtt járnak (Di Fiore és mtsai., 2004; Zhang és mtsai., 2008). Az *imp- α 2^{D14}/imp- β ^{KetRE34}* és *imp- α 2^{D14}/imp- β ^{Ket0}*; *nos-Gal4-imp- α 2^{NLSB}-/+* mutáns anyák embrióiban gyakran látható centroszóma vesztés esetleg még betudható az orsószerveződés másodlagos következményének, de a centroszómák orsónkénti többlete vagy citoplazmás duplikációja azt jelzi, hogy a centroszóma és nukleáris osztódások szétkapcsolódtak a mutáns embriókban. Az emlős sejtekben bonyolult szabályozó mechanizmusok hálózata biztosítja, hogy egy sejtciklus alatt csak egy centroszóma duplikáció történjék (Hinchcliffe and Sluder, 2001), mivel a rendellenes centroszóma amplifikáció súlyos következményekkel, például rákos sejtek kialakulásával járhat. Az osztódási orsókon esetenként megfigyelt, normálisnál nagyobb méretű centroszómák viszont felvetik annak a lehetőségét is, hogy ezekben a centroszóma alakzatokban nem történik meg a centriólum replikációja, csak egyre több peri-centrioláris anyag halmozódik fel bennük. Ezt centriólum-specifikus ellenanyag-festésekkel lehetne tovább vizsgálni.

A centroszómák kialakulásában és osztódásában nélkülözhetetlen szerepe van a bennük található centriólumoknak. Megtermékenyüléskor a hímivarsejt szállítja a centriólumot (basális test) az ooplazmába és e köré szerveződik meg a fejlődő embrió első centroszómája. Megtermékenyítés nélküli, azaz *de novo* centroszóma-képződés, ritka kivétellektől eltekintve (szűznemzés) nem fordul elő a magasabbrendű állatok vad típusú nőtényeinek petéiben.

Az *imp- α 2^{D14}/imp- β ^{KetRE34}* és *imp- α 2^{D14}/imp- β ^{Ket0}*; *nos-Gal4-imp- α 2^{NLSB}-/+* szűz nőtények petéiben megfigyelt centroszómák alapján az a hipotézisünk, hogy a petékben raktározott centriólum és centroszóma fehérjéken a mutáns Imp- α 2/Imp- β ^{Ketel} komplexek NLS szekvencia-függő inaktíváló hatása nem érvényesül és az így szabaddá váló fehérje-készletből *de novo* centriólumok és centroszómák képződnek. A *de novo* centroszóma kialakulásával kapcsolatos feltételezésünket megerősítik azok a kísérletek,

amelyekben túltermeltették a centriólum duplikációban nélkülözhetetlen SAK kinázt vagy a SAS6 fehérjét. Míg embriók esetében centroszóma amplifikációról, addig meg nem termékenyített peték esetében *de novo* centriólum szerveződésről számoltak be (Peel és mtsai., 2007; Rodrigues-Martins és mtsai., 2007). Ezzel egybevágóak azok az eredmények, amelyeket egy másik muslica fajban írtak le. A partenogenezissel is szaporodni képes *Drosophila mercatorum* meg nem termékenyített petéiben zajló osztódások során, az általunk megfigyeltekhez hasonló, centriólum-specifikus ellenanyagra is festődő, centroszóma-szerű mitotikus alakzatokat figyeltek meg, amelyek a későbbiekben megszervezték a normális mitózisokhoz szükséges orsókát (Riparbelli és Callaini, 2008). Mindezeket egybevetve, feltételezhető, hogy az Imp- α 2/Imp- β ^{Ketel} fehérjék olyan mitotikus faktorokat is szabályoznak, amelyek a centroszóma kialakulásának és dinamikájának fontos szereplői és a centriólum biogenezis folyamatát is befolyásolják.

A lamin fehérjék a sejtmaghártya belső oldalával állnak kapcsolatban és fontos szerepet játszanak a maghártya szerkezeti integritásának fenntartásában. Strukturális feladatuk mellett részt vesznek még alapvető sejtmagi-folyamatokban, úgy mint a DNS megkettőződése, transzkripció és a kromatin epigenetikus szerveződése (Dechat és mtsai., 2009). A lamin hiszton H2A-közvetített kötődése a kromoszómákhoz egy fontos lépés a nukleáris lamina és a sejtmaghártya megszerveződésében (Mattout és mtsai., 2007). Karmosbéka petekivonatban azonban, RanGTP-vel bevont gyöngyök felületén, kromatin jelenléte nélkül is megfigyelték a sejtmaghártya kialakulását (Zhang és Clarke, 2000).

Az még nem teljesen tisztázott hogy a Ran, hogyan irányítja a sejtmaghártya kialakulását, de az Importin fehérjék részvétele ebben a mechanizmusban is alapvető (Brittle és Ohkura, 2005; Clarke és Zhang, 2008). A DNS nélkül kialakult gömbszerű lamin Dm0 szerveződések, amiket az *imp- α 2^{D14}/imp- β ^{KetRE34}* és *imp- α 2^{D14}/imp- β ^{Ket0}*; *nos-Gal4-imp- α 2^{NLSB}-/+* nőtényektől származó embriókban mi is megfigyeltünk, olyan faktorok felszabadulását jelzik a mutáns Imp- α 2/Imp- β ^{Ketel} komplexből, amelyek a kromatintól függetlenül is képesek megszervezni a sejtmaghártya megformálódását. Az a megfigyelésünk, hogy a lamin aggregátumokat formál a különböző mutáns *imp- α 2^{D14}/imp- β ^{KetRE34}* és *imp- α 2^{D14}/imp- β ^{Ket0}*; *nos-Gal4-imp- α 2^{NLSB}-/+* nőtények embrióiban, rámutat arra is, hogy *in vivo* az Imp- α 2/Imp- β ^{Ketel} komplexek akadályozzák meg a lamin spontán aggregációját, amit a lamin-dimerek belső szerkezeti tulajdonságaként írtak le *in vitro* kísérletek alapján (Moir és mtsai., 1991).

Összevetve a normális lamin eloszlási mintázatot (Paddy és mtsai., 1996; Walker és mtsai., 2000) az *imp- α 2* és *imp- β^{Ketel}* mutáns embriókban látott rendellenes lamin szerveződéssel és azzal az eredményünkkel, hogy a lamin Dm0 NLS-függően asszociál az Imp-2-vel, megállapíthatjuk, hogy a RanGTP/Imp- α 2/Imp- β^{Ketel} rendszer működőképessége nélkülözhetetlen a sejtmaghártya kialakulásában.

Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a muslica embrionális fejlődésének un. pre-blasztodermás szakaszában, az Imp- α 2 és Imp- β^{Ketel} fehérjék olyan egybehangolt szabályozási feladatokat látnak el, amelyeket az osztódási orsók és a sejtmaghártya megszervezésében, valamint a centroszóma biogenezisében résztvevő számos mitotikus faktor NLS-ének Imp- α 2 általi megkötésén keresztül érvényesítenek.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Kiss Istvánnak, hogy laboratóriumában megtanulhattam a klasszikus genetika alapjait és módszereit.

Köszönöm, Dr. Szlanka Tamásnak, hogy segített a molekuláris biológiai módszereket elsajátítanom, hogy fáradhatatlan és inspiráló munka- és szellemi társam volt, és köszönöm, hogy kitartásra biztatott a nehéz időszakokban!

Köszönet illeti a Német Rákkutató Intézetet (DKFZ) és a DFG együttműködést, hogy lehetővé tette, hogy két és fél évet Dr. Bernard Mechler laboratóriumában töltssek, ahol a dolgozatomban leírt kísérletes munkát végeztem. Köszönöm Dorothy Albrecht technikai segítségét, Anh Vu és Gabrielle Robinson barátságát!

Hálával tartozom, Dr. Török Istvánnak a lelki és szakmai segítségért és Török Katikának a sok biztatásért és a csodálatos heidelbergi estékért!

Köszönöm, Dr. Welker Ervinnek a doktori folyamatban nyújtott támogatását!

Köszönöm, Szerp Péter segítségét a statisztikai analízisek elkészítésében!

Köszönöm a barátaimnak, Dr. Füzi Zsuzsának, Kulcsár Erikának, Dr. Nagy Olgának, Forró Tündének, Dr. Fodor Máriának és Dr. Gausz Jánosnak a sok-sok biztatást!

És köszönöm a családomnak: Édesanyámnak, Nővéremnek, Gábornak, Andrisnak és Annának, hogy türelemmel és szeretettel segítettek a végére érni, ennek a történetnek!

ÖSSZEFOGLALÓ

A Ran szabályozása mellett az importinok végzik a makromolekulák aktív szállítását a sejtmagi transzport folyamatokban. A citoplazmában kialakult hármas komplexben az Imp- α közvetíti az NLS szekvenciával rendelkező célfehérjék és az Imp- β közötti kapcsolatot. Az utóbbi évek kutatásai alapján körvonalazódott, hogy az Imp- α /Imp- β a sejtosztódási folyamatok térbeli- és időbeli koordinálásában is részt vesz, mégpedig az osztódási orsót megszervező SAF és MAP fehérjék aktivitásának szabályozásán keresztül. Az *ecetmuslica* egy *imp- β* és három *imp- α* génnel rendelkezik. Az *imp- β* és *imp- $\alpha3$* főként a sejtmagi transzportban, míg az *imp- $\alpha1$* a spermatogenezisben lát el specifikus feladatot. Ugyanakkor, az *imp- α* gének szerepét a *Drosophila* embrió korai osztódásai során eddig még nem vizsgálták.

Korábban, laboratóriumunkban P elem mutagenézis során azonosítottuk az *imp- $\alpha2$* gén *Drosophila* ortológját, és részletes vizsgálatával felderítettük a muslica petefejlődésében betöltött speciális szerepét (Gorjánác et al., 2002; Török et al., 1995). A homozigóta *imp- $\alpha2^{D14}$* null mutánsok felnőtt egyedekké fejlődnek, viszont a nőstények 100%-ban sterilek, többségük egyáltalán nem is rak petét. A nagyon ritkán mégis kialakuló peték súlyos fejlődési rendellenességet mutatnak, amelynek oka a gyűrűcsatornák beszűkülése a petefejlődés során. Ezt a hibát sem az *imp- $\alpha1$* , sem az *imp- $\alpha3$* nem tudta menekíteni. Az *imp- $\alpha2$* kis NLS-kötő régióját érintő, illetve az Imp- β kötésért felelős, IBB doménjét kiejtő mutáns transzgének kifejeztetése normális morfológiájú, érett petét eredményez, viszont a lerakott petékből nem fejlődnek embriók (Gorjánác et al., 2006). Ez az eredmény felvetette annak lehetőségét, hogy az importinok mitózisban, és azon belül az osztódási orsó kialakulásában betöltött szerepét *in vivo* vizsgáljuk meg *Drosophila melanogaster*-ben. Dolgozatomban az *imp- $\alpha2$* korai embrionális funkcióit mutatom be, az *imp- β* -val létrejött genetikai interakcióján keresztül, illetve, sejtbioológiai és biokémiai módszerek segítségével.

Munkánk az *imp- $\alpha2$* gén és az *imp- β* *Drosophila* ortológja, az *imp- β^{Kete1}* gén közötti genetikai kölcsönhatás vizsgálatával kezdődött. Az *imp- $\alpha2$* gén *imp- $\alpha2^{D14}$* -es null allélja, és hat recesszív *imp- β^{Kete1}* allél (*imp- $\beta^{KetRP13}$* , *imp- $\beta^{KetRX13}$* és *imp- $\beta^{KetRE34}$* – a domináns nősténysteril *imp- β^{KetD}* revertánsai –, illetve *imp- $\beta^{Ketc02473}$* , *imp- $\beta^{Ketc02657}$* és *imp- $\beta^{Ketc03750}$* – *piggyBac* inszerciók) különböző kombinációit hordozó, transzheterozigóta anyáktól származó embriók fejlődését követtük nyomon. A fenti kombinációk közül egyedül az *imp- $\alpha2^{D14}$* /*imp- $\beta^{KetRE34}$* eredményezett embrióletalitást,

amelyet mind az *imp-α2*, mind az *imp-β^{Ketel}* vad alléljeinek transzgénikus kifejeztetése egyaránt menekített, jelezvén, hogy az Imp-α2 és Imp-β^{Ketel} fehérjék koordinált együttműködése kritikus a muslica korai embrionális fejlődésében.

Az *imp-β^{KetRE34}* allélban azonosítottunk egy második mutációt, a D725N helyettesítést, amely az Imp-β^{Ketel} Imp-α2-kötő doménjében található. Az Imp-β^{Ketel} fehérje *in silico* és biokémiai módszerekkel történő vizsgálata szerint az Imp-β^{KetRE34} és a vad Imp-β^{Ketel} fehérje az Imp-α2 IBB doménjét ugyanolyan erősen köti. Ugyanakkor, az N725 aminosav olyan, új, molekulán belüli, szerkezetmódosító kötések alakít ki, amelyek feltehetően javítanak az Imp-β^{KetD} rendellenesen nyitott konformációján, ezáltal csökkentve a domináns nősténysteril Imp-β^{KetD} fehérje mérgező hatását. A Imp-β^{KetRE34} szerkezeti módosulása ugyanakkor, nem állítja vissza teljesen a vad típusú Imp-β^{Ketel} molekulára jellemző fehérje kötési flexibilitást, amint arra a RanGTP és RanGDP fehérjékhez történő megemelkedett kötési hajlandósága is rávilágít. Feltehetően ez az oka az *imp-β^{KetRE34}* szemi-domináns természetének. Ezt a feltételezésünket támasztja alá, hogy a RanGTP szintjének csökkentése (a *Bj1/RCCI* funkcióvesztéses mutációja révén) szuppresszálta, míg annak növelése (RanGap funkcióvesztéses mutációk által), erősítette az *imp-β^{KetRE34}* antimorf fenotípusát.

imp-α2, *imp-α1* és *imp-α3* klasszikus funkcióvesztéses allélok *imp-β^{KetRE34}*-el transzheterozigóta kombinációja esetén, vagy mindhárom *imp-α* paralóg *imp-β^{KetRE34}* háttéren történő, ovárium-specifikus RNS csendesítésekor, csak az Imp-α2 szintjének csökkentése okozott embrióletalitást. Továbbá, az *imp-α2^{D14}/imp-β^{KetRE34}* allélkombináció erős embrióletális fenotípusát, az azonos szinten és mintázatban kifejeztetett, *UTR^Aimp-α* transzgének közül, kizárólag az *UTR^Aimp-α2* menekítette. Az Imp-α2 magas koncentrációban van jelen a 0-2 órás embrió szinciciális plazmájában. A gyors osztódási ciklusok során a mitotikus orsó mikrotubulusiahoz kötődik, míg interfázisban a sejtmagban határozottan feldúsul. A genetikai analízisek eredményeivel párosulva ez a sejtciklus-függő eloszlási mintázat egyértelműen rávilágít a muslica *imp-α2* génjének paralóg-specifikus szerepére az embrió korai fejlődési szakaszában a szinkron magosztódások során.

A mutáns *imp-α2* (*imp-α2^{NLSB⁻}*, *imp-α2^{SNLSB⁻}*, *imp-α2^{AIBB}*, *imp-α2^{CASB⁻}*) transzgének analízisét *imp-α2^{D14}/imp-β^{Ketel}* null érzékenyített háttéren végeztük, recesszív *imp-β^{Ketel}* allélokkal (*imp-β^{KetRX13}*, *imp-β^{KetRP13}*, *imp-β^{Ketc02473}*, *imp-β^{Kete02657}*, *imp-β^{Kete03750}*) kombinációban. Az *imp-α2* NLSB és SNLSB doménjeinek inaktiválása az *imp-β^{Ketel}* gén csökkentett dóziséval párosulva embrióletalitást okozott. Kimutattuk

az $imp-\alpha 2^{NLSB-}$ transzgén antimorf hatását is $imp-\alpha 2^{D14/+}$ heterozigóta háttéren, amit az $imp-\beta^{Ketel}$ gén lecsökkent dózisa felerősített. A genetikai elemzés eredményei az NLSB domén jelentőségét hangsúlyozzák a szinciciális embrióban zajló gyors sejtmegosztódásokban és a mitotikus fehérjék (lamin, CP190 és ISWI) NLS-függő immun-precipitációja ezzel teljesen összhangban áll. Az $imp-\alpha 2^{AIBB}$ mutáns kifejeztetésének $imp-\alpha 2^{D14}/imp-\beta^{Ketel}$ null háttéren nem volt hatása az embriók fejlődésére, ami azzal magyarázható, hogy IBB domén hiányában az Imp- $\alpha 2$ nem tud az Imp- β^{Ketel} fehérjéhez kötődni, míg a másik három, intakt IBB doménnel rendelkező Imp- $\alpha 2$ mutáns fehérje képes fizikailag kapcsolatba lépni az Imp- β^{Ketel} -lel. Az Imp- $\alpha 2$ fehérje zárt konformációját stabilizáló CASB domén hiányában, a nyitott konformációt biztosító Imp- $\alpha 2^{CASB-}/Imp-\beta^{Ketel}$ komplexek továbbra is ki tudnak alakulni, és így továbbra is megkötik az NLS szekvenciával rendelkező mitotikus faktorokat, lehetővé téve az embrió normális fejlődését.

A dolgozatomban leírt genetikai kölcsönhatások, melyeket egyrészt az $imp-\alpha 2^{D14}$ és $imp-\beta^{KetRE34}$, másrészt az $imp-\alpha 2^{NLSB-}$ vagy $imp-\alpha 2^{SNLSB-}$ és $imp-\beta^{Ket02473}$ között figyeltünk meg, rávilágítanak arra, hogy az Imp- $\alpha 2/Imp-\beta^{Ketel}$ funkcionális komplex mennyiségének egy kritikus küszöbérték felett kell maradni a korai embriógenézis osztódásai során. Míg az $imp-\beta^{Ket0}$ heterozigóta háttéren kifejeztetett $imp-\alpha 2^{NLSB-}$ vagy $imp-\alpha 2^{SNLSB-}$ allélok a funkcionális komplexek mennyiségét csökkentik, addig az $imp-\beta^{KetRE34}$, ahogy az a pull down kísérletből és az interakciós mitotikus fenotípusokból kiderült, az NLS-fehérje/Imp- $\alpha 2/Imp-\beta^{Ketel}$ hármas komplex stabilitásával teszi ugyanezt.

Az $imp-\alpha 2^{D14}/imp-\beta^{KetRE34}$ és $imp-\alpha 2^{D14}/imp-\beta^{Ket02473}$; *nos-Gal4-imp- $\alpha 2^{NLSB-}$* nőstények által rakott embriók immuno-citológiai vizsgálata szembetűnő osztódási rendellenességeket tárt fel. Mindkét mutáns csoport közös tulajdonsága, hogy az embriók fejlődése túlnyomórészt az első három-négy mitotikus ciklus során megállt és a többnyire metafázis-szerű orsók számában és alakjában is súlyos hibákat figyeltünk meg. Az embriók részletesebb konfokális mikroszkópos vizsgálatakor számtalan mitotikus hibát észleltünk. Korlátlan növekedésű szabad asztereket és túlnövekedett, jól fókuszált, vagy rendezetlen pólusú osztódási orsókat, orsó-fúziót és elvétve, keskeny orsókat láttunk. A robusztus méretű osztódási orsók gyakorta szabályos kromatin-eloszlással és -kondenzációval rendelkeztek. Ezzel szemben megfigyeltünk nem kondenzálódott DNS aggregátumokat, különösen a többpólusú- vagy a keskeny orsókban, amelyek csökkent mennyiségű kromatint tartalmaztak. Feltételezzük, hogy a

túlnövekedett orsók és szabad aszterek, olyan mitotikus faktorok túlzott aktivitásának következményei, amelyek a MT-ok túlnövekedését idézik elő, mivel elégséges mennyiségű, funkcionális Imp- α 2/Imp- β^{Ketel} komplex hiányában kikerülnek a citoplazmás gátlás alól.

A sejtmaghártya rendellenes megszerveződését a hozzákapcsolódó lamin eloszlása rajzolta ki. Az *imp- α 2^{D14}/imp- $\beta^{KetRE34}$* és *imp- α 2^{D14}/imp- $\beta^{Ketc02473}$* ; *nos-Gal4-imp- α 2^{NLSB}*-nőstények embrióiban a lamin vezikulumok az orsó pólusokon, az asztrális MT-ok környezetében rendellenesen feldúsultak. A vad típusú muslica embrió részlegesen nyitott mitózisára jellemző, az osztódási orsókat széles sávban övező, orsóköpeny pedig hiányzott. A többpólusú orsókból gyakorta formálódott összefüggő maghártya a metafázisos lemezből az egyik pólusra kihúzott kromatidák körül. A mutáns anyák embrióiban a lamin aggregátumokat képzett, vagy gyakran a töredezett kromatin körül a normálisnál vastagabb és nagyobb gömböket formált. Érdekes módon, esetlegesen kromatin jelenléte nélkül is kialakult kisebb-nagyobb méretű összefüggő lamin struktúra, ami arra hívja fel a figyelmet, hogy az Imp- α 2/Imp- β^{Ketel} komplex hibás kooperációja olyan faktorokat szabadít fel, amelyek kromatin nélkül is megformálják a maghártyát. A megfigyelt fenotípusok alapján feltételezzük, hogy a sejtmaghártya lebomlásának/újra-formálódásának mechanizmusában az Imp- α 2/Imp- β^{Ketel} együttműködés fontos szerepet játszik és a lamin NLS-függő immunprecipitációja további bizonyíték erre a feltételezésre.

A centroszomin festésekkel láthatóvá vált centroszóma rendellenességek arra világítottak rá, hogy az Imp- α 2/Imp- β^{Ketel} szabályozás, az orsó kialakulásától függetlenül, érvényesül a centroszóma dinamikájában és a biogenezisében is. A mutáns anyák embrióiban az orsók többségén nincsen vagy csak egyetlen centroszóma van. Ennek oka feltehetően a centroszóma vesztés, amit az erőteljes asztrális mikrotubulus polimerizáció idéz elő. A ritkábban előforduló orsónkénti centroszóma-többség, vagy a szabad centroszómák citoplazmás duplikációja, ugyanakkor azt jelzi, hogy a centroszóma és nukleáris osztódások szétkapcsolódtak a mutáns embriókban. Az *imp- α 2^{D14}/imp- $\beta^{Ketc02473}$* ; *nos-Gal4-imp- α 2^{NLSB}*- mutáns nőstények meg nem termékenyített petéiben *de novo* képződő centroszómák, felhívják a figyelmet az Imp- α 2/Imp- β^{Ketel} komplex egy új, esetleges szerepére, miszerint a komplex a centriólum biogenezis regulátorait is szabályozza.

Eredményeinket összefoglalva elmondhatjuk, hogy az Imp- α 2 és Imp- β^{Ketel} specifikus együttműködése szükséges a mitotikus orsók kialakulásának, a sejtmaghártya

megszerveződésének, a centroszómák dinamikájának és a centriólumok biogenezésének a szabályozásához a *Drosophila* embrió korai sejtmegosztódásai során. A különböző mitotikus faktorok regulációja az Imp- α 2 NLSB-doménjének közvetítésén keresztül érvényesül. A kísérleteink eredményei világosan rámutatnak az *imp- α 2* paralóg-specifikus, a másik két *imp- α* gén által nem helyettesíthető, szerepére a muslica embrió szinciciális osztódásai során.

SUMMARY

The active import of macromolecules from the cytoplasmic compartment to the nucleus is carried out by the importins under the regulation of Ran. Imp- α mediates the binding of cargo proteins to the Imp- β through their NLS sequences by forming a ternary complex in cytoplasm. The Imp- α /Imp- β involved in the spatial-temporal coordination of mitotic processes as well, regulating the spindle assembly factors SAFs/MAPs activity. The fruit fly has one *imp- β* and three *imp- α* genes. The *imp- β* and *imp- α 3* are mainly involved in nucleo-cytoplasmic transport and *imp- α 1* has specific function during the spermatogenesis. However, the role of each *imp- α* gene during the embryogenesis is not yet understood.

The *Drosophila* ortholog of *imp- α 2* gene was identified by a P element screen in our group. The further characterization of the gene revealed that *imp- α 2* has a specific function during the oogenesis (Gorjánác et al., 2002; Török et al., 1995). The loss of function mutation of *imp- α 2* leads to female-sterility characterized by the occlusion of the ring canals and over-expression of *imp- α 1* or *imp- α 3* failed to rescue this phenotype. Moreover, amongst a series of mutant *imp- α 2* transgenes generated, only the expression of *imp- α 2*^{SNLSB} or *imp- α 2*^{AIBB} resulted in matured eggs however, the development of these embryos were arrested (Gorjánác et al., 2006). This prompted us to take over further investigation of the *imp- α 2* gene during the early embryogenesis to clarify its contribution for these mysterious processes. In my thesis I describe a work involving methods of genetic analysis, cell biology, molecular biology and *in silico* protein modeling, focused on the *imp- α 2* functions during the early embryo development.

First we set up a genetic analysis with *imp- α 2* and *imp- β* ^{Ketel}, the fly ortholog of *imp- β* . We combined *imp- α 2* null allele *imp- α 2*^{D14}, with six different recessive *imp- β* ^{Ketel} alleles (*imp- β* ^{KetRP13}, *imp- β* ^{KetRX13} and *imp- β* ^{KetRE34} – revertant of the dominant female sterile *imp- β* ^{KetD} – as well as *imp- β* ^{KetC02473}, *imp- β* ^{KetC02657} and *imp- β* ^{KetC03750} – piggyBac insertions) and examined the viability of eggs laid by heterozygous females of each combination. Eggs produced by trans-heterozygous *imp- α 2*^{D14}/*imp- β* ^{KetRE34} females were lethal, whereas eggs laid by all other heterozygous females developed normally. The embryo-lethality could be rescued by expressing the wild type *imp- α 2* or *imp- β* ^{Ketel} transgenes. This indicates that *imp- α 2* and *imp- β* ^{Ketel} interaction is critical during embryogenesis.

We identified a second mutation in *imp-β^{KetRE34}*, a D725N substitution, which located in the Imp-α-binding domain of Imp-β^{Ketel}. The *in silico* analysis showed no difference between the binding affinities of Imp-β^{Ket725N} and Imp-β^{Ketel} to the IBB domain of Imp-α2. GST pull down experiments showed similar results. The D725N substitution forms new intra-molecular interactions which probably weaken the dominant negative character of *imp-β^{KetD}* allele by stabilizing its abnormally opened structure. This structural modification in Imp-β^{KetRE34} is not sufficient to restore the wild type Imp-β^{Ketel} molecule binding flexibility, which is showed by the strengthened binding affinity of Imp-β^{KetRE34} to both RanGTP and RanGDP, the probable cause of the semi dominant character of this allele. Mutations decreasing the level of RanGTP (loss of function mutation in *Bjl/RCCI*) suppressed, while mutations increasing the level of RanGTP (loss of function mutation in *RanGAP*) enhanced the semi-dominant phenotype of Imp-β^{KetRE34}.

Introducing classical *imp-α* alleles into *imp-β^{KetRE34}/+* or ovarian-specific RNA silencing the members of the *imp-α* gene family on the same genetic background showed that only the *imp-α2^{D14}/imp-β^{KetRE34}* and the *imp-α2i/imp-β^{KetRE34}* combinations resulted in strong embryonic lethality. Moreover, expressing *UTR^A* transgenes producing similar amount of Imp-α1, Imp-α2, and Imp-α3 each, only the *UTR^A-imp-α2* was able to restore the embryonic viability of eggs laid by *imp-α2^{D14}/imp-β^{KetRE34}* females. The amount of Imp-α2 is apparently high in the 0-2hs embryo cytoplasm. During the rapid syncytial divisions Imp-α2 associates to the spindle MTs while in the inter-phase it accumulates in the nucleus. The results of genetic analysis and the cell cycle dependent localization of Imp-α2 together reveal that *imp-α2* has a paralog-specific role in the pre-blastoderm stage nuclear divisions of *Drosophila* embryo.

The analysis of mutant Imp-α2 transgenes (*imp-α2^{NLSB⁻}*, *imp-α2^{SNLSB⁻}*, *imp-α2^{AIBB}*, *imp-α2^{CASB⁻}*) was carried out on *imp-α2^{D14}/imp-β^{Ketel}* null sensitized background using different recessive *imp-β^{Ketel}* alleles (*imp-β^{KetRX13}*, *imp-β^{KetRP13}*, *imp-β^{Ketc02473}*, *imp-β^{Kete02657}*, *imp-β^{Kete03750}*). Inactivation of the NLSB or SNLSB domain of *imp-α2* in combination with decreased dosage of Imp-β^{Ketel}, completely block the embryonic development. We detected the antimorphic effect of *imp-α2^{NLSB⁻}* transgene also in *imp-α2^{D14}/+* females, and this effect was enhanced when gene dosage of *imp-β^{Ketel}* was reduced. Altogether, our data emphasize the importance of NLSB domain during the mitosis in the syncytial embryo, and the NLS-dependent co-immunoprecipitation of mitotic factors, like lamin, CP190 and ISWI with Imp-α2

further support this. In contrast, the expression of $\text{Imp-}\alpha 2^{\Delta\text{IBB}}$ exerted no deleterious effect on embryo development, which can be explained on the basis of the lack of IBB domain, which prevents its binding to $\text{Imp-}\beta^{\text{Ketel}}$, whereas the other three $\text{Imp-}\alpha 2$ proteins contain an intact IBB domain and were able to physically interact with $\text{Imp-}\beta^{\text{Ketel}}$. In the lack of CASB domain, which stabilizes the $\text{Imp-}\alpha 2$ closed conformation, the opened structured $\text{Imp-}\alpha 2^{\text{CASB-}}/\text{Imp-}\beta^{\text{Ketel}}$ complexes could be formed and could bind to the mitotic factors as well.

The genetic interactions observed between $\text{imp-}\alpha 2^{\text{D14}}$ and $\text{imp-}\beta^{\text{KetRE34}}$, as well as between $\text{imp-}\alpha 2^{\text{NLSB-}}$ or $\text{imp-}\alpha 2^{\text{SNLSB-}}$ and $\text{imp-}\beta^{\text{Ketc02473}}$, reveal that the concentration of the functional $\text{Imp-}\alpha 2/\text{Imp-}\beta^{\text{Ketel}}$ complexes should be above a threshold level in the developing embryo. While expressing $\text{imp-}\alpha 2^{\text{NLSB-}}$ or $\text{imp-}\alpha 2^{\text{SNLSB-}}$ alleles on $\text{imp-}\beta^{\text{Ket0}}$ heterozygous background reduces the amount of functional complexes, the $\text{imp-}\beta^{\text{KetRE34}}$ allele, as inferred from pull down experiment and mitotic phenotypes, appears to decrease the stability of the NLS-protein/ $\text{Imp-}\alpha 2/\text{Imp-}\beta^{\text{Ketel}}$ ternary complex.

Embryos laid by $\text{imp-}\alpha 2^{\text{D14}}/\text{imp-}\beta^{\text{KetRE34}}$ and $\text{imp-}\alpha 2^{\text{D14}}/\text{imp-}\beta^{\text{Ketc02473}}$; *nos-Gal4-imp-}\alpha 2^{\text{NLSB-}} females displayed a wide range of abnormality. Their development was predominantly blocked during the very first mitotic divisions in cycle 1-4 and, we detected abnormalities both in the number and the organization of the metaphase-like structures. Examination by confocal microscopy of embryos revealed numerous mitotic defects: uncontrolled free asters, overgrowth of well-focused or unfocused spindles, spindle-fusions and, less frequently, narrow spindles. We observed robust spindles with condensed and regularly aligned chromatin at the equator. We also detected discrete, non-condensed aggregates of chromatin mostly in the multipolar and the narrow spindles, which contained smaller amount of chromatin. Our data suggest that phenotypes of overgrowth spindles and free asters could result from the activity of factors that trigger a persistent MT formation in the spindle area, because in the absence of sufficient amount of functional $\text{Imp-}\alpha 2/\text{Imp-}\beta^{\text{Ketel}}$ the SAFs could not be kept inactive.*

The nuclear envelope structure, delineated by lamin, was abnormal in the embryos of $\text{imp-}\alpha 2^{\text{D14}}/\text{imp-}\beta^{\text{KetRE34}}$ and $\text{imp-}\alpha 2^{\text{D14}}/\text{imp-}\beta^{\text{Ketc02473}}$; *nos-Gal4-imp-}\alpha 2^{\text{NLSB-}} females, showing high concentration of lamin-stained vesicles at the spindle poles and nearly lacking the spindle envelope at the equator belt. In the multipolar spindles, the continuous lamin-stained structures, at the periphery of the spindles suggests that nuclear envelope could be formed around chromatids pulled out from the metaphase*

plate. Less frequently, we detected large masses of DNA and lamin aggregates encapsulated by an apparently continuous and particularly thick layer of lamin. Occasionally, we observed large lamin structures devoid of chromatin, which indicates that the factors released from Imp- α 2/Imp- β ^{Ketel} complexes could form nuclear envelope independently of chromatin. Our findings indicate that the Imp- α 2/Imp- β ^{Ketel} regulates the nuclear envelope assembly in the *Drosophila* embryo and the NLS-dependent association of lamin with Imp- α 2 further support this hypothesis.

The observed abnormalities in the centrosomin stained embryos indicate that the Imp- α 2/Imp- β ^{Ketel} complexes contributes to the centrosome dynamics and biogenesis independently of spindle formation. The majority of the mutant spindles contained either no centrosome or a single one, probably as a consequence of centrosome release driven by strong astral microtubule polymerizing activity. The occurrence of extra centrosomes associated with one spindle and the duplicating free centrosomal structures in the cytoplasm indicate that the centrosomes frequently replicate independently of the nuclear cycle. The detected centrosomes in the non-fertilized eggs of *imp- α 2^{D14}/imp- β ^{Ketel02473}; nos-Gal4-imp- α 2^{NLSB⁻}* mutant females suggest a new possible function of Imp- α 2/Imp- β ^{Ketel} complex, i.e. it may regulate factors of centriole-biogenesis as well.

In conclusion, our work shows that Imp- α 2 and Imp- β ^{Ketel} specifically cooperate to essentially regulate spindle dynamics, NE assembly, centrosome dynamics and centriole-biogenesis during the early nuclear divisions in *Drosophila* embryo. The regulation of mitotic factors is mediated by the NLSB-domain of Imp- α 2. Our results also highlight the paralog-specific role of Imp- α 2 in the syncytial nuclear divisions of the pre-blastoderm embryo.

FÜGGELÉK

F1. táblázat Az 5. táblázat statisztikai elemzése

Leíró statisztika

Genotípusok	Átlag	Szórás	Átlag hibája (SEM)
$imp - \alpha 2^{D14} / imp - \beta^{ResRes4}$	0.00	--	--
$imp - \alpha 2^{D14} / imp - \beta^{ResRes4}, UAS - imp - \alpha 2^{+} / nosGal4$	38.54	7.73	5.46
$imp - \alpha 2^{D14} / imp - \beta^{ResRes4}, imp - \alpha 2^{+} / +$	46.50	6.35	3.18
$imp - \alpha 2^{D14} / imp - \beta^{ResRes4}, imp - \beta^{+} / +$	30.23	2.14	1.23

Egy szempontos variancia-analízis

	Szabadsági fok (SzF)	Négyzet összeg	Átlag négyzet	F érték (F)	P-érték (P)
Modell	3	1845.84	615.28	19.45	0.001
Hiba	6	189.78	31.63		
Total	9	2035.61			

H_0 : Az átlagok egyenlők.

H_1 : Az átlagok különböznek.

A csoportok átlagai 0.01 valószínűségi szinten szignifikánsan különböznek.

Átlagok összehasonlítása (Scheffe teszt)

Genotípusok	Átlag különbség	SEM	F	P	α	Sig
$imp - \alpha 2^{D14} / imp - \beta^{ResRes4}, UAS - imp - \alpha 2^{+} / nosGal4$ $imp - \alpha 2^{D14} / imp - \beta^{ResRes4}$	38.54	6.89	10.44	0.008	0.01	2
$imp - \alpha 2^{D14} / imp - \beta^{ResRes4}, imp - \alpha 2^{+} / +$ $imp - \alpha 2^{D14} / imp - \beta^{ResRes4}$	46.50	6.29	18.23	0.002	0.01	2
$imp - \alpha 2^{D14} / imp - \beta^{ResRes4}, imp - \beta^{+} / +$ $imp - \alpha 2^{D14} / imp - \beta^{ResRes4}$	30.23	6.49	7.22	0.020	0.05	1

Ha, Sig egyenlő 2 jelzi, hogy az átlagok különbsége szignifikánsan különbözik 0.01 valószínűségi szinten.

Ha, Sig egyenlő 1 jelzi, hogy az átlagok különbsége szignifikánsan különbözik 0.05 valószínűségi szinten.

Ha, Sig egyenlő 0 jelzi, hogy az átlagok különbsége szignifikánsan nem különbözik.

F2. táblázat A 6.táblázat statisztikai elemzése

Leíró statisztika

Genotípusok	Átlag	Szórás	Átlag hibája (SEM)
<i>imp</i> – $\alpha 2^{D14}/+$	89.50	2.38	1.19
<i>imp</i> – $\beta^{HscRE34}/+$	61.79	10.59	6.12
<i>imp</i> – $\alpha 2i^{34266}/nosGal4$	92.67	3.77	2.67
<i>imp</i> – $\alpha 2^{D14}/+$; <i>imp</i> – $\alpha 2i^{34266}/nosGal4$	56.61	9.76	5.63
<i>imp</i> – $\beta^{HscRE34}/+$; <i>imp</i> – $\alpha 2i^{34266}/nosGal4$	1.31	1.25	0.72

Egy szempontos variancia-analízis

	Szabadsági fok (SzF)	Négyzet összeg	Átlag négyzet	F érték (F)	P-érték (P)
Modell	4	15992.70	3998.16	89.03	$8.91 * 10^{-8}$
Hiba	10	449.07	44.91		
Total	14	16441.70			

H_0 : Az átlagok egyenlők.

H_1 : Az átlagok különbözőek.

A csoportok átlagai 0.01 valószínűségi szinten szignifikánsan különböznek.

Átlagok összehasonlítása (Scheffe teszt)

	Átlag különbség	SEM	F	P	α	Sig
<i>imp</i> – $\beta^{HscRE34}/+$ <i>imp</i> – $\alpha 2^{D14}/+$	-27.71	5.12	7.33	0.005	0.01	2
<i>imp</i> – $\alpha 2i^{34266}/nosGal4$ <i>imp</i> – $\alpha 2^{D14}/+$	3.17	5.80	0.07	0.988	0.01	0
<i>imp</i> – $\alpha 2^{D14}/+$; <i>imp</i> – $\alpha 2i^{34266}/nosGal4$ <i>imp</i> – $\alpha 2^{D14}/+$	-32.89	5.12	10.32	0.001	0.01	2
<i>imp</i> – $\alpha 2^{D14}/+$; <i>imp</i> – $\alpha 2i^{34266}/nosGal4$ <i>imp</i> – $\alpha 2i^{34266}/nosGal4$	-36.06	6.12	8.69	0.003	0.01	2
<i>imp</i> – $\beta^{HscRE34}/+$; <i>imp</i> – $\alpha 2i^{34266}/nosGal4$ <i>imp</i> – $\beta^{HscRE34}/+$	-60.48	5.47	30.55	$1.39 * 10^{-5}$	0.01	2
<i>imp</i> – $\beta^{HscRE34}/+$; <i>imp</i> – $\alpha 2i^{34266}/nosGal4$ <i>imp</i> – $\alpha 2i^{34266}/nosGal4$	-91.36	6.12	55.76	$8.42 * 10^{-7}$	0.01	2
<i>imp</i> – $\beta^{HscRE34}/+$; <i>imp</i> – $\alpha 2i^{34266}/nosGal4$ <i>imp</i> – $\alpha 2^{D14}/+$; <i>imp</i> – $\alpha 2i^{34266}/nosGal4$	-55.30	5.47	25.54	$3.13 * 10^{-5}$	0.01	2

Ha, Sig egyenlő 2 jelzi, hogy az átlagok különbsége szignifikánsan különbözik 0.01 valószínűségi szinten.

Ha, Sig egyenlő 1 jelzi, hogy az átlagok különbsége szignifikánsan különbözik 0.05 valószínűségi szinten.

Ha, Sig egyenlő 0 jelzi, hogy az átlagok különbsége szignifikánsan nem különbözik.

F3. táblázat A 8. táblázat statisztikai elemzése

Leíró statisztika

Genotípusok	Átlag	Szórás	Átlag hibája (SEM)
$UTR^{\Delta} imp - \alpha 2^{+}, imp - \alpha 2^{D14} / imp - \beta^{KetRE34}$	21.18	2.28	0.76
$UTR^{\Delta} imp - \alpha 1^{+}, imp - \alpha 2^{D14} / imp - \beta^{KetRE34}$	0	0	0
$UTR^{\Delta} imp - \alpha 3^{+}, imp - \alpha 2^{D14} / imp - \beta^{KetRE34}$	0	0	0

Egy szempontos variancia-analízis

	Szabadsági fok (SzF)	Négyzet összeg	Átlag négyzet	F érték (F)	P-érték (P)
Modell	2	2583.60	1291.80	681.67	0.00
Hiba	22	41.69	1.89		
Total	24	2625.29			

H_0 : Az átlagok egyenlők.

H_a : Az átlagok különbözőek.

A csoportok átlagai 0.01 valószínűségi szinten szignifikánsan különböznek.

Átlagok összehasonlítása (Scheffe teszt)

	Átlag különbség	SE M	F	P	α	Sig
$UTR^{\Delta} imp - \alpha 1^{+}, imp - \alpha 2^{D14} / imp - \beta^{KetRE34}$	-21.18	0.67	501.23	$4.50 * 10^{-19}$	0.01	2
$UTR^{\Delta} imp - \alpha 2^{+}, imp - \alpha 2^{D14} / imp - \beta^{KetRE34}$	-21.18	0.67	501.23	$4.50 * 10^{-19}$	0.01	2
$UTR^{\Delta} imp - \alpha 3^{+}, imp - \alpha 2^{D14} / imp - \beta^{KetRE34}$	0	0.69	0.00	1.00	0.01	0

Ha, Sig egyenlő 2 jelzi, hogy az átlagok különbsége szignifikánsan különbözik 0.01 valószínűségi szinten.

Ha, Sig egyenlő 1 jelzi, hogy az átlagok különbsége szignifikánsan különbözik 0.05 valószínűségi szinten.

Ha, Sig egyenlő 0 jelzi, hogy az átlagok különbsége szignifikánsan nem különbözik.

F4. táblázat A 12. ábra statisztikai elemzése**1. csoport:** *imp- α 2* leíró statisztika

Genotípus	Átlag	Szórás	Átlag hibája (SEM)
<i>imp</i> – $\beta^{KetRE34}/+$	53.43	8.17	4.72
<i>imp</i> – $\alpha 2^{D14}/imp$ – $\beta^{KetRE34}$	0	--	--
<i>imp</i> – $\alpha 2i^{B4266}/imp$ – $\beta^{KetRE34}$	5.22	2.87	1.29
<i>imp</i> – $\alpha 2^{B4266}/imp$ – $\beta^{KetRE34}/$	0	--	--

Egy szempontos variancia-analízis

	Szabads. fok (SzF)	Négyz.összeg	Átlag négyzet	F érték (F)	P-érték (P)
Modell	3	5226.31	1742.10	62.81	$6.35 * 10^{-5}$
Hiba	6	166.42	27.74		
Total	9	5392.73			

H_0 : Az átlagok egyenlők. H_1 : Az átlagok különböznek. A csoportok átlagai 0.01 valószínűségi szinten szignifikánsan különböznek.

Átlagok összehasonlítása (Scheffe teszt)

Genotípusok	Átlag különbség	SEM	F	P	α	Sig
<i>imp</i> – $\alpha 2^{D14}/imp$ – $\beta^{KetRE34}$ <i>imp</i> – $\beta^{KetRE34}/+$	-53.43	6.08	25.73	$7.98 * 10^{-4}$	0.01	2
<i>imp</i> – $\alpha 2i^{B4266}/imp$ – $\beta^{KetRE34}$ <i>imp</i> – $\beta^{KetRE34}/+$	-48.21	3.85	52.37	$1.07 * 10^{-4}$	0.01	2
<i>imp</i> – $\alpha 2^{B4266}/imp$ – $\beta^{KetRE34}/$ <i>imp</i> – $\beta^{KetRE34}/+$	-53.43	6.08	25.73	$7.98 * 10^{-4}$	0.01	2

Ha, Sig egyenlő 2jelzi, hogy az átlagok különbsége szignifikánsan különbözik 0.01 valószínűségi szinten.

Ha, Sig egyenlő 1 jelzi, hogy az átlagok különbsége szignifikánsan különbözik 0.05 valószínűségi szinten.

Ha, Sig egyenlő 0 jelzi, hogy az átlagok különbsége szignifikánsan nem különbözik

2. csoport: *imp- α 1* leíró statisztika

Genotípusok	Átlag	Szórás	Átlag hibája (SEM)
<i>imp</i> – $\beta^{KetRE34}/+$	53.43	8.17	4.72
<i>imp</i> – $\alpha 1^{s1}/imp$ – $\beta^{KetRE34}$	47.50	2.15	1.08
<i>imp</i> – $\alpha 1i/imp$ – $\beta^{KetRE34}$	52.50	25.36	12.68

Egy szempontos variancia-analízis

	Szabads. fok (SzF)	Négyz. összeg	Átlag négyzet	F érték (F)	P-érték (P)
Modell	2	75.65	37.82	0.15	0.87
Hiba	8	2076.42	259.55		
Total	10	2152.07			

H_0 : Az átlagok egyenlők. H_1 : Az átlagok különböznek. A csoportok átlagai 0.01 valószínűségi szinten szignifikánsan különböznek.

Átlagok összehasonlítása (Scheffe teszt)

Genotípusok	Átlag különbség	SEM	F	P	α	Sig
$imp - \alpha 1^{s1} / imp - \beta^{KetRE34}$ $imp - \beta^{KetRE34} / +$	-5.93	12.30	0.12	0.89	0.01	0
$imp - \alpha 1i / imp - \beta^{KetRE34}$ $imp - \beta^{KetRE34} / +$	-0.93	12.30	$2.84 * 10^{-2}$	0.99	0.01	0
$imp - \alpha 1i / imp - \beta^{KetRE34}$ $imp - \alpha 1^{s1} / imp - \beta^{KetRE34}$	5.00	11.39	0.09	0.91	0.01	0

Ha, Sig egyenlő 2 jelzi, hogy az átlagok különbsége szignifikánsan különbözik 0.01 valószínűségi szinten.

Ha, Sig egyenlő 1 jelzi, hogy az átlagok különbsége szignifikánsan különbözik 0.05 valószínűségi szinten.

Ha, Sig egyenlő 0 jelzi, hogy az átlagok különbsége szignifikánsan nem különbözik

3. csoport: $imp - \alpha 3$ leíró statisztika

Genotípusok	Átlag	Szórás	Átlag hibája (SEM)
$imp - \beta^{KetRE34} / +$	53.43	8.17	4.72
$imp - \alpha 3^{17-1} / imp - \beta^{KetRE34}$	33.33	2.89	1.67
$imp - \alpha 3i^{36103} / imp - \beta^{KetRE34}$	40.67	8.39	4.84
$imp - \alpha 3i^{36104} / imp - \beta^{KetRE34}$	43.00	2.83	2.00

Egy szempontos variancia-analízis

	Szabadsági fok (SzF)	Négyzet összeg	Átlag négyzet	F érték (F)	P-érték (P)
Modell	3	620.91	206.97	4.85	0.039
Hiba	7	298.72	42.674		
Total	10	919.63			

H_0 : Az átlagok egyenlők. H_1 : Az átlagok különböznek. A csoportok átlagai 0.01 valószínűségi szinten szignifikánsan különböznek.

Átlagok összehasonlítása (Scheffe teszt)

Genotípusok	Átlag különbség	SEM	F	P	\square	Sig
$imp - \alpha 3^{17-1} / imp - \beta^{KetRE34}$ $imp - \beta^{KetRE34} / +$	-20.09	5.33	4.73	0.042	0.05	1
$imp - \alpha 3i^{36103} / imp - \beta^{KetRE34}$ $imp - \beta^{KetRE34} / +$	-12.76	5.33	1.91	0.217	0.01	0
$imp - \alpha 3i^{36104} / imp - \beta^{KetRE34}$ $imp - \beta^{KetRE34} / +$	-10.42	5.96	1.02	0.440	0.01	0

Ha, Sig egyenlő 2 jelzi, hogy az átlagok különbsége szignifikánsan különbözik 0.01 valószínűségi szinten.

Ha, Sig egyenlő 1 jelzi, hogy az átlagok különbsége szignifikánsan különbözik 0.05 valószínűségi szinten.

Ha, Sig egyenlő 0 jelzi, hogy az átlagok különbsége szignifikánsan nem különbözik

F5. táblázat A 10. táblázat statisztikai elemzése

Leíró statisztika

Genotípusok	Átlag	Szórás	Átlag hibája (SEM)
$tmp - \beta^{KetRE34} / +$	57.58	3.56	1.78
$tmp - \beta^{KetRE34} / +; Df(3L) 5.4 / +$	95.78	2.97	1.21
$tmp - \beta^{KetRE34} / RanGap^{EP1173}$	26.00	11.31	4.28
$tmp - \beta^{KetRE34} / RanGap^{EY21763}$	28.87	7.12	2.91
$RanGap^{EP1173} / +$	90.67	3.06	1.76
$RanGap^{EY21763} / +$	81.33	3.06	1.76

Egy szempontos variancia-analízis

	Szabadsági fok (SzF)	Négyzet összeg	Átlag négyzet	F érték (F)	P-érték (P)
Modell	5	25658.20	5131.64	103.46	$5.55 * 10^{-15}$
Hiba	23	1140.78	49.60		
Total	28	26799			

H_0 : Az átlagok egyenlők.

H_1 : Az átlagok különböznek.

A csoportok átlagai 0.01 valószínűségi szinten szignifikánsan különböznek.

Átlagok összehasonlítása (Scheffe teszt)

Genotípusok	Átlag különbség	SEM	F	P	α	Sig
$tmp - \beta^{KetRE34} / +; Df(3L) 5.4 / +$ $tmp - \beta^{KetRE34} / +$	38.19	4.55	14.12	$2.28 * 10^{-6}$	0.01	2
$tmp - \beta^{KetRE34} / RanGap^{EP1173}$ $tmp - \beta^{KetRE34} / +$	-31.58	4.41	10.24	$2.93 * 10^{-5}$	0.01	2
$tmp - \beta^{KetRE34} / RanGap^{EY21763}$ $tmp - \beta^{KetRE34} / +$	-28.72	4.55	7.98	$1.75 * 10^{-4}$	0.01	2
$tmp - \beta^{KetRE34} / RanGap^{EY21763}$ $tmp - \beta^{KetRE34} / RanGap^{EP1173}$	2.87	3.92	0.11	0.99	0.01	0
$RanGap^{EP1173} / +$ $tmp - \beta^{KetRE34} / RanGap^{EP1173}$	64.67	4.86	35.41	$4.55 * 10^{-10}$	0.01	2
$RanGap^{EY21763} / +$ $tmp - \beta^{KetRE34} / RanGap^{EY21763}$	52.47	4.98	22.20	$4.17 * 10^{-8}$	0.01	2

H_a , Sig egyenlő 2 jelzi, hogy az átlagok különbsége szignifikánsan különbözik 0.01 valószínűségi szinten.

H_a , Sig egyenlő 1 jelzi, hogy az átlagok különbsége szignifikánsan különbözik 0.05 valószínűségi szinten.

H_a , Sig egyenlő 0 jelzi, hogy az átlagok különbsége szignifikánsan nem különbözik.

IRODALMI HIVATKOZÁSOK

1. Andrade, M.A., Petosa, C., O'Donoghue, S.I., Müller, C.W., and Bork, P. (2001). Comparison of ARM and HEAT protein repeats. *J. Mol. Biol.* *309*, 1–18.
2. Askjaer, P., Galy, V., Hannak, E., and Mattaj, I.W. (2002). Ran GTPase cycle and importins alpha and beta are essential for spindle formation and nuclear envelope assembly in living *Caenorhabditis elegans* embryos. *Mol. Biol. Cell* *13*, 4355–4370.
3. Azuma, Y., and Dasso, M. (2000). The role of Ran in nuclear function. *Curr. Opin. Cell Biol.* *12*, 302–307.
4. Bastiaens, P., Caudron, M., Niethammer, P., and Karsenti, E. (2006). Gradients in the self-organization of the mitotic spindle. *Trends Cell Biol.* *16*, 125–134.
5. Basto, R., Lau, J., Vinogradova, T., Gardiol, A., Woods, C.G., Khodjakov, A., and Raff, J.W. (2006). Flies without centrioles. *Cell* *125*, 1375–1386.
6. Bayliss, R., Littlewood, T., and Stewart, M. (2000). Structural basis for the interaction between FxFG nucleoporin repeats and importin-beta in nuclear trafficking. *Cell* *102*, 99–108.
7. Bayliss, R., Littlewood, T., Strawn, L.A., Wentz, S.R., and Stewart, M. (2002). GLFG and FxFG nucleoporins bind to overlapping sites on importin-beta. *J. Biol. Chem.* *277*, 50597–50606.
8. Belec, I., Gonzalez, C., Puro, J., and Szabad, J. (2001). Dominant-negative mutant dynein allows spontaneous centrosome assembly, uncouples chromosome and centrosome cycles. *Curr. Biol.* *11*, 136–140.
9. Bilbao-Cortés, D., Hetzer, M., Längst, G., Becker, P.B., and Mattaj, I.W. (2002). Ran binds to chromatin by two distinct mechanisms. *Curr. Biol.* *12*, 1151–1156.
10. Bischoff, F.R., Krebber, H., Smirnova, E., Dong, W., and Ponstingl, H. (1995). Co-activation of RanGTPase and inhibition of GTP dissociation by Ran-GTP binding protein RanBP1. *EMBO J.* *14*, 705–715.
11. Brittle, A.L., and Ohkura, H. (2005). Mini spindles, the XMAP215 homologue, suppresses pausing of interphase microtubules in *Drosophila*. *EMBO J.* *24*, 1387–1396.
12. Brown, E., Malakar, S., and Krebs, J.E. (2007). How many remodelers does it take to make a brain? Diverse and cooperative roles of ATP-dependent chromatin-remodeling complexes in development. *Biochem. Cell Biol.* *85*, 444–462.
13. Carvalho-Santos, Z., Machado, P., Branco, P., Tavares-Cadete, F., Rodrigues-Martins, A., Pereira-Leal, J.B., and Bettencourt-Dias, M. (2010). Stepwise evolution of the centriole-assembly pathway. *J. Cell. Sci.* *123*, 1414–1426.
14. Caudron, M., Bunt, G., Bastiaens, P., and Karsenti, E. (2005). Spatial coordination of spindle assembly by chromosome-mediated signaling gradients. *Science* *309*, 1373–1376.
15. Chan, C.-C., Zhang, S., Rousset, R., and Wharton, K.A., Jr (2008). *Drosophila* Naked cuticle (Nkd) engages the nuclear import adaptor Importin-alpha3 to antagonize Wnt/beta-catenin signaling. *Dev. Biol.* *318*, 17–28.
16. Chook, Y.M., and Blobel, G. (1999). Structure of the nuclear transport complex karyopherin-beta2-Ran x GppNHp. *Nature* *399*, 230–237.
17. Chook, Y.M., and Blobel, G. (2001). Karyopherins and nuclear import. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *11*, 703–715.

18. Christophe, D., Christophe-Hobertus, C., and Pichon, B. (2000). Nuclear targeting of proteins: how many different signals? *Cell. Signal* 12, 337–341.
19. Cingolani, G., Petosa, C., Weis, K., and Müller, C.W. (1999). Structure of importin-beta bound to the IBB domain of importin-alpha. *Nature* 399, 221–229.
20. Clarke, P.R., and Zhang, C. (2008). Spatial and temporal coordination of mitosis by Ran GTPase. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 9, 464–477.
21. Clever, M., Mimura, Y., Funakoshi, T., and Imamoto, N. (2013). Regulation and coordination of nuclear envelope and nuclear pore complex assembly. *Nucleus* 4, 105–114.
22. Conti, E., and Kuriyan, J. (2000). Crystallographic analysis of the specific yet versatile recognition of distinct nuclear localization signals by karyopherin alpha. *Structure* 8, 329–338.
23. Conti, E., Uy, M., Leighton, L., Blobel, G., and Kuriyan, J. (1998). Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin alpha. *Cell* 94, 193–204.
24. Conti, E., Müller, C.W., and Stewart, M. (2006). Karyopherin flexibility in nucleocytoplasmic transport. *Curr. Opin. Struct. Biol* 16, 237–244.
25. Corona, D.F., Längst, G., Clapier, C.R., Bonte, E.J., Ferrari, S., Tamkun, J.W., and Becker, P.B. (1999). ISWI is an ATP-dependent nucleosome remodeling factor. *Mol. Cell* 3, 239–245.
26. Dasso, M. (2002). The Ran GTPase: theme and variations. *Curr. Biol* 12, R502–508.
27. Dasso, M. (2008). Emerging roles of the SUMO pathway in mitosis. *Cell Div* 3, 5.
28. Dechat, T., Adam, S.A., and Goldman, R.D. (2009). Nuclear lamins and chromatin: when structure meets function. *Adv. Enzyme Regul.* 49, 157–166.
29. Dingwall, C., and Laskey, R.A. (1991). Nuclear targeting sequences--a consensus? *Trends Biochem. Sci* 16, 478–481.
30. Dix, C.I., and Raff, J.W. (2007). *Drosophila* Spd-2 recruits PCM to the sperm centriole, but is dispensable for centriole duplication. *Curr. Biol.* 17, 1759–1764.
31. Van Eeden, F., and St Johnston, D. (1999). The polarisation of the anterior-posterior and dorsal-ventral axes during *Drosophila* oogenesis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9, 396–404.
32. Erdélyi, M., Máthé, E., and Szabad, J. (1997). Genetic and developmental analysis of mutant Ketel alleles that identify the *Drosophila* importin-beta homologue. *Acta. Biol. Hung* 48, 323–338.
33. Fanara, P., Hodel, M.R., Corbett, A.H., and Hodel, A.E. (2000). Quantitative analysis of nuclear localization signal (NLS)-importin alpha interaction through fluorescence depolarization. Evidence for auto-inhibitory regulation of NLS binding. *J. Biol. Chem* 275, 21218–21223.
34. Fang, X., Chen, T., Tran, K., and Parker, C.S. (2001). Developmental regulation of the heat shock response by nuclear transport factor karyopherin-alpha3. *Development* 128, 3349–3358.
35. Di Fiore, B., Ciciarello, M., and Lavia, P. (2004). Mitotic functions of the Ran GTPase network: the importance of being in the right place at the right time. *Cell Cycle* 3, 305–313.
36. Fischer, U., Huber, J., Boelens, W.C., Mattaj, I.W., and Lührmann, R. (1995). The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell* 82, 475–483.
37. Fleig, U., Salus, S.S., Karig, I., and Sazer, S. (2000). The fission yeast ran GTPase is required for microtubule integrity. *J. Cell Biol* 151, 1101–1111.

38. Fontes, M.R., Teh, T., and Kobe, B. (2000). Structural basis of recognition of monopartite and bipartite nuclear localization sequences by mammalian importin- α . *J. Mol. Biol.* 297, 1183–1194.
39. Frasch, M., Glover, D.M., and Saumweber, H. (1986). Nuclear antigens follow different pathways into daughter nuclei during mitosis in early *Drosophila* embryos. *J. Cell. Sci.* 82, 155–172.
40. Fried, H., and Kutay, U. (2003). Nucleocytoplasmic transport: taking an inventory. *Cell. Mol. Life Sci.* 60, 1659–1688.
41. Fukuhara, N., Fernandez, E., Ebert, J., Conti, E., and Svergun, D. (2004). Conformational variability of nucleo-cytoplasmic transport factors. *J. Biol. Chem.* 279, 2176–2181.
42. Geles, K.G., and Adam, S.A. (2001). Germline and developmental roles of the nuclear transport factor importin α 3 in *C. elegans*. *Development* 128, 1817–1830.
43. Geles, K. G., Johnson, J. J., Jong S. and Adam, S. A. (2002). A role for *Caenorhabditis elegans* importin IMA-2 in germ line and embryonic mitosis. *Mol. Biol. of the Cell* 13, 3138-3147
44. Giarrè, M., Török, I., Schmitt, R., Gorjánác, M., Kiss, I., and Mechler, B.M. (2002). Patterns of importin- α expression during *Drosophila* spermatogenesis. *J. Struct. Biol.* 140, 279–290.
45. Gilchrist, D., Mykytka, B., and Rexach, M. (2002). Accelerating the rate of disassembly of karyopherin.cargo complexes. *J. Biol. Chem.* 277, 18161–18172.
46. Goldfarb, D.S., Corbett, A.H., Mason, D.A., Harreman, M.T., and Adam, S.A. (2004). Importin α : a multipurpose nuclear-transport receptor. *Trends Cell Biol.* 14, 505–514.
47. Gorjánác, M., Adám, G., Török, I., Mechler, B.M., Szlanka, T., and Kiss, I. (2002). Importin- α 2 is critically required for the assembly of ring canals during *Drosophila* oogenesis. *Dev. Biol.* 251, 271–282.
48. Gorjánác, M., Török, I., Pomozi, I., Garab, G., Szlanka, T., Kiss, I., and Mechler, B.M. (2006). Domains of Importin- α 2 required for ring canal assembly during *Drosophila* oogenesis. *J. Struct. Biol.* 154, 27–41.
49. Görlich, D. (1998). Transport into and out of the cell nucleus. *EMBO J* 17, 2721–2727.
50. Görlich, D., and Kutay, U. (1999). Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15, 607–660.
51. Görlich, D., Prehn, S., Laskey, R.A., and Hartmann, E. (1994). Isolation of a protein that is essential for the first step of nuclear protein import. *Cell* 79, 767–778.
52. Görlich, D., Kostka, S., Kraft, R., Dingwall, C., Laskey, R.A., Hartmann, E., and Prehn, S. (1995). Two different subunits of importin cooperate to recognize nuclear localization signals and bind them to the nuclear envelope. *Curr. Biol.* 5, 383–392.
53. Görlich, D., Panté, N., Kutay, U., Aebi, U., and Bischoff, F.R. (1996). Identification of different roles for RanGDP and RanGTP in nuclear protein import. *EMBO J* 15, 5584–5594.
54. Gruss, O.J., Carazo-Salas, R.E., Schatz, C.A., Guarguaglini, G., Kast, J., Wilm, M., Le Bot, N., Vernos, I., Karsenti, E., and Mattaj, I.W. (2001). Ran induces spindle assembly by reversing the inhibitory effect of importin α on TPX2 activity. *Cell* 104, 83–93.
55. Guarguaglini, G., Renzi, L., D'Ottavio, F., Di Fiore, B., Casenghi, M., Cundari, E., and Lavia, P. (2000). Regulated Ran-binding protein 1 activity is required for organization and function of the mitotic spindle in mammalian cells in vivo. *Cell Growth Differ.* 11, 455–465.

-
56. Harel, A., Zlotkin, E., Nainudel-Epszteyn, S., Feinstein, N., Fisher, P.A., and Gruenbaum, Y. (1989). Persistence of major nuclear envelope antigens in an envelope-like structure during mitosis in *Drosophila melanogaster* embryos. *J. Cell. Sci* 94 (Pt 3), 463–470.
57. Harreman, M.T., Hodel, M.R., Fanara, P., Hodel, A.E., and Corbett, A.H. (2003). The auto-inhibitory function of importin alpha is essential in vivo. *J. Biol. Chem* 278, 5854–5863.
58. Herold, A., Truant, R., Wiegand, H., and Cullen, B.R. (1998). Determination of the functional domain organization of the importin alpha nuclear import factor. *J. Cell Biol* 143, 309–318.
59. Hetzer, M., Bilbao-Cortés, D., Walther, T.C., Gruss, O.J., and Mattaj, I.W. (2000). GTP hydrolysis by Ran is required for nuclear envelope assembly. *Mol. Cell* 5, 1013–1024.
60. Heuer, J.G., Li, K., and Kaufman, T.C. (1995). The *Drosophila* homeotic target gene centrosomin (*cnn*) encodes a novel centrosomal protein with leucine zippers and maps to a genomic region required for midgut morphogenesis. *Development* 121, 3861–3876.
61. Hinchcliffe, E.H., and Sluder, G. (2001). “It takes two to tango”: understanding how centrosome duplication is regulated throughout the cell cycle. *Genes Dev.* 15, 1167–1181.
62. Hogarth, C.A., Calanni, S., Jans, D.A., and Loveland, K.L. (2006). Importin alpha mRNAs have distinct expression profiles during spermatogenesis. *Dev. Dyn* 235, 253–262.
63. Hood, J.K., and Silver, P.A. (1998). Cse1p is required for export of Srp1p/importin-alpha from the nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem* 273, 35142–35146.
64. Huber, A.H., Nelson, W.J., and Weis, W.I. (1997). Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin. *Cell* 90, 871–882.
65. Hutten, S., Flotho, A., Melchior, F., and Kehlenbach, R.H. (2008). The Nup358-RanGAP complex is required for efficient importin alpha/beta-dependent nuclear import. *Mol. Biol. Cell* 19, 2300–2310.
66. Imamoto, N., Shimamoto, T., Kose, S., Takao, T., Tachibana, T., Matsubae, M., Sekimoto, T., Shimonishi, Y., and Yoneda, Y. (1995). The nuclear pore-targeting complex binds to nuclear pores after association with a karyophile. *FEBS Lett* 368, 415–419.
67. Jans, D.A., Xiao, C.Y., and Lam, M.H. (2000). Nuclear targeting signal recognition: a key control point in nuclear transport? *Bioessays* 22, 532–544.
68. Jeong, S.Y., Rose, A., Joseph, J., Dasso, M., and Meier, I. (2005). Plant-specific mitotic targeting of RanGAP requires a functional WPP domain. *Plant J* 42, 270–282.
69. Joseph, J., Liu, S.-T., Jablonski, S.A., Yen, T.J., and Dasso, M. (2004). The RanGAP1-RanBP2 complex is essential for microtubule-kinetochore interactions in vivo. *Curr. Biol* 14, 611–617.
70. Kalab, P., and Heald, R. (2008). The RanGTP gradient - a GPS for the mitotic spindle. *J. Cell. Sci* 121, 1577–1586.
71. Kaláb, P., Pralle, A., Isacoff, E.Y., Heald, R., and Weis, K. (2006). Analysis of a RanGTP-regulated gradient in mitotic somatic cells. *Nature* 440, 697–701.
72. Kellogg, D.R., and Alberts, B.M. (1992). Purification of a multiprotein complex containing centrosomal proteins from the *Drosophila* embryo by chromatography with low-affinity polyclonal antibodies. *Mol. Biol. Cell* 3, 1–11.
73. Khodjakov, A., Cole, R.W., Oakley, B.R., and Rieder, C.L. (2000). Centrosome-independent mitotic spindle formation in vertebrates. *Curr. Biol* 10, 59–67.
74. King, M.C., Lusk, C.P., and Blobel, G. (2006). Karyopherin-mediated import of integral inner nuclear membrane proteins. *Nature* 442, 1003–1007.

75. Kirschner, M., and Mitchison, T. (1986). Beyond self-assembly: from microtubules to morphogenesis. *Cell* 45, 329–342.
76. Kisurina-Evgenieva, O., Mack, G., Du, Q., Macara, I., Khodjakov, A., and Compton, D.A. (2004). Multiple mechanisms regulate NuMA dynamics at spindle poles. *J. Cell. Sci* 117, 6391–6400.
77. Klebe, C., Bischoff, F.R., Ponstingl, H., and Wittinghofer, A. (1995). Interaction of the nuclear GTP-binding protein Ran with its regulatory proteins RCC1 and RanGAP1. *Biochemistry* 34, 639–647.
78. Kobe, B. (1999). Autoinhibition by an internal nuclear localization signal revealed by the crystal structure of mammalian importin alpha. *Nat. Struct. Biol* 6, 388–397.
79. Koerner, C., Guan, T., Gerace, L., and Cingolani, G. (2003). Synergy of silent and hot spot mutations in importin beta reveals a dynamic mechanism for recognition of a nuclear localization signal. *J. Biol. Chem* 278, 16216–16221.
80. Köhler, M., Ansieau, S., Prehn, S., Leutz, A., Haller, H., and Hartmann, E. (1997). Cloning of two novel human importin-alpha subunits and analysis of the expression pattern of the importin-alpha protein family. *FEBS Lett* 417, 104–108.
81. Köhler, M., Speck, C., Christiansen, M., Bischoff, F.R., Prehn, S., Haller, H., Görlich, D., and Hartmann, E. (1999). Evidence for distinct substrate specificities of importin alpha family members in nuclear protein import. *Mol. Cell. Biol* 19, 7782–7791.
82. Kutay, U., Bischoff, F.R., Kostka, S., Kraft, R., and Görlich, D. (1997). Export of importin alpha from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor. *Cell* 90, 1061–1071.
83. Lee, S.J., Matsuura, Y., Liu, S.M., and Stewart, M. (2005). Structural basis for nuclear import complex dissociation by RanGTP. *Nature* 435, 693–696.
84. Lenz-Böhme, B., Wismar, J., Fuchs, S., Reifegerste, R., Buchner, E., Betz, H., and Schmitt, B. (1997). Insertional mutation of the *Drosophila* nuclear lamin Dm0 gene results in defective nuclear envelopes, clustering of nuclear pore complexes, and accumulation of annulate lamellae. *J. Cell Biol.* 137, 1001–1016.
85. Li, H.-Y., and Zheng, Y. (2004). Phosphorylation of RCC1 in mitosis is essential for producing a high RanGTP concentration on chromosomes and for spindle assembly in mammalian cells. *Genes Dev* 18, 512–527.
86. Lippai, M., Tirián, L., Boros, I., Mihály, J., Erdélyi, M., Belec, I., Máthé, E., Pósai, J., Nagy, A., Udvardy, A., et al. (2000). The Ketel gene encodes a *Drosophila* homologue of importin-beta. *Genetics* 156, 1889–1900.
87. Loeb, J.D., Schlenstedt, G., Pellman, D., Kornitzer, D., Silver, P.A., and Fink, G.R. (1995). The yeast nuclear import receptor is required for mitosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 92, 7647–7651.
88. Mahajan, R., Delphin, C., Guan, T., Gerace, L., and Melchior, F. (1997). A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell* 88, 97–107.
89. Mahajan-Miklos, S., and Cooley, L. (1994). Intercellular cytoplasm transport during *Drosophila* oogenesis. *Dev. Biol* 165, 336–351.
90. Malik, H.S., Eickbush, T.H., and Goldfarb, D.S. (1997). Evolutionary specialization of the nuclear targeting apparatus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 94, 13738–13742.
91. Mason, D.A., and Goldfarb, D.S. (2009). The nuclear transport machinery as a regulator of *Drosophila* development. *Semin. Cell Dev. Biol* 20, 582–589.
92. Mason, D.A., Fleming, R.J., and Goldfarb, D.S. (2002). *Drosophila melanogaster* importin alpha1 and alpha3 can replace importin alpha2 during spermatogenesis but not oogenesis. *Genetics* 161, 157–170.

-
93. Mason, D.A., Máthé, E., Fleming, R.J., and Goldfarb, D.S. (2003). The *Drosophila melanogaster* importin alpha3 locus encodes an essential gene required for the development of both larval and adult tissues. *Genetics* 165, 1943–1958.
94. Máthé, E., Bates, H., Huikeshoven, H., Deák, P., Glover, D.M., and Cotterill, S. (2000). Importin-alpha3 is required at multiple stages of *Drosophila* development and has a role in the completion of oogenesis. *Dev. Biol.* 223, 307–322.
95. Matsuura, Y., and Stewart, M. (2004). Structural basis for the assembly of a nuclear export complex. *Nature* 432, 872–877.
96. Matsuura, Y., Lange, A., Harreman, M.T., Corbett, A.H., and Stewart, M. (2003). Structural basis for Nup2p function in cargo release and karyopherin recycling in nuclear import. *EMBO J* 22, 5358–5369.
97. Mattaj, I.W. (2004). Sorting out the nuclear envelope from the endoplasmic reticulum. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 65–69.
98. Mattout, A., Goldberg, M., Tzur, Y., Margalit, A., and Gruenbaum, Y. (2007). Specific and conserved sequences in *D. melanogaster* and *C. elegans* lamins and histone H2A mediate the attachment of lamins to chromosomes. *J. Cell. Sci.* 120, 77–85.
99. McIntosh, J.R., Grishchuk, E.L., and West, R.R. (2002). Chromosome-microtubule interactions during mitosis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18, 193–219.
100. Miyamoto, Y., Loveland, K.L., and Yoneda, Y. (2012). Nuclear importin α and its physiological importance. *Commun Integr Biol* 5, 220–222.
101. Moir, R.D., Donaldson, A.D., and Stewart, M. (1991). Expression in *Escherichia coli* of human lamins A and C: influence of head and tail domains on assembly properties and paracrystal formation. *J. Cell. Sci* 99 (Pt 2), 363–372.
102. Moore, W., Zhang, C., and Clarke, P.R. (2002). Targeting of RCC1 to chromosomes is required for proper mitotic spindle assembly in human cells. *Curr. Biol* 12, 1442–1447.
103. Morgan-Lappe, S.E., Tucker, L.A., Huang, X., Zhang, Q., Sarthy, A.V., Zakula, D., Verneti, L., Schurdak, M., Wang, J., and Fesik, S.W. (2007). Identification of Ras-related nuclear protein, targeting protein for xenopus kinesin-like protein 2, and stearyl-CoA desaturase 1 as promising cancer targets from an RNAi-based screen. *Cancer Res.* 67, 4390–4398.
104. Moroianu, J., Blobel, G., and Radu, A. (1996a). The binding site of karyopherin alpha for karyopherin beta overlaps with a nuclear localization sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 93, 6572–6576.
105. Moroianu, J., Blobel, G., and Radu, A. (1996b). Nuclear protein import: Ran-GTP dissociates the karyopherin alphabeta heterodimer by displacing alpha from an overlapping binding site on beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 93, 7059–7062.
106. Mühlhäusser, P., and Kutay, U. (2007). An in vitro nuclear disassembly system reveals a role for the RanGTPase system and microtubule-dependent steps in nuclear envelope breakdown. *J. Cell Biol.* 178, 595–610.
107. Nachury, M.V., Maresca, T.J., Salmon, W.C., Waterman-Storer, C.M., Heald, R., and Weis, K. (2001). Importin beta is a mitotic target of the small GTPase Ran in spindle assembly. *Cell* 104, 95–106.
108. Nemergut, M.E., Mizzen, C.A., Stukenberg, T., Allis, C.D., and Macara, I.G. (2001). Chromatin docking and exchange activity enhancement of RCC1 by histones H2A and H2B. *Science* 292, 1540–1543.
109. Oegema, K., Whitfield, W.G., and Alberts, B. (1995). The cell cycle-dependent localization of the CP190 centrosomal protein is determined by the coordinate action of two separable domains. *J. Cell Biol.* 131, 1261–1273.

- 110.Oegema, K., Marshall, W.F., Sedat, J.W., and Alberts, B.M. (1997). Two proteins that cycle asynchronously between centrosomes and nuclear structures: *Drosophila* CP60 and CP190. *J. Cell. Sci. 110 (Pt 14)*, 1573–1583.
- 111.Paddy, M.R., Saumweber, H., Agard, D.A., and Sedat, J.W. (1996). Time-resolved, in vivo studies of mitotic spindle formation and nuclear lamina breakdown in *Drosophila* early embryos. *J. Cell. Sci 109 (Pt 3)*, 591–607.
- 112.Pay, A., Resch, K., Frohnmeier, H., Fejes, E., Nagy, F., and Nick, P. (2002). Plant RanGAPs are localized at the nuclear envelope in interphase and associated with microtubules in mitotic cells. *Plant J 30*, 699–709.
- 113.Peel, N., Stevens, N.R., Basto, R., and Raff, J.W. (2007). Overexpressing centriole-replication proteins in vivo induces centriole overduplication and de novo formation. *Curr. Biol. 17*, 834–843.
- 114.Phadnis N, Hsieh E, Malik HS. (2012). Birth, death, and replacement of karyopherins in *Drosophila*. *Mol Biol Evol. 29*, (5)1429-40.
- 115.Quensel, C., Friedrich, B., Sommer, T., Hartmann, E., and Kohler, M. (2004). In vivo analysis of importin alpha proteins reveals cellular proliferation inhibition and substrate specificity. *Mol. Cell. Biol 24*, 10246–10255.
- 116.Raemaekers, T., Ribbeck, K., Beaudouin, J., Annaert, W., Van Camp, M., Stockmans, I., Smets, N., Bouillon, R., Ellenberg, J., and Carmeliet, G. (2003). NuSAP, a novel microtubule-associated protein involved in mitotic spindle organization. *J. Cell Biol 162*, 1017–1029.
- 117.Ratan, R., Mason, D.A., Sinnot, B., Goldfarb, D.S., and Fleming, R.J. (2008a). *Drosophila* importin alpha1 performs paralog-specific functions essential for gametogenesis. *Genetics 178*, 839–850.
- 118.Ratan, R., Mason, D.A., Sinnot, B., Goldfarb, D.S., and Fleming, R.J. (2008b). *Drosophila* importin alpha1 performs paralog-specific functions essential for gametogenesis. *Genetics 178*, 839–850.
- 119.Ren, M., Drivas, G., D'Eustachio, P., and Rush, M.G. (1993). Ran/TC4: a small nuclear GTP-binding protein that regulates DNA synthesis. *J. Cell Biol 120*, 313–323.
- 120.Rhodes, D.R., Yu, J., Shanker, K., Deshpande, N., Varambally, R., Ghosh, D., Barrette, T., Pandey, A., and Chinnaiyan, A.M. (2004). Large-scale meta-analysis of cancer microarray data identifies common transcriptional profiles of neoplastic transformation and progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101*, 9309–9314.
- 121.Ribbeck, K., Raemaekers, T., Carmeliet, G., and Mattaj, I.W. (2007). A role for NuSAP in linking microtubules to mitotic chromosomes. *Curr. Biol 17*, 230–236.
- 122.Riparbelli, M.G., and Callaini, G. (2008). *Drosophila* parthenogenesis: a tool to decipher centrosomal vs acentrosomal spindle assembly pathways. *Exp. Cell Res 314*, 1617–1625.
- 123.Robinson, D.N., Cant, K., and Cooley, L. (1994). Morphogenesis of *Drosophila* ovarian ring canals. *Development 120*, 2015–2025.
- 124.Rodrigues-Martins, A., Riparbelli, M., Callaini, G., Glover, D.M., and Bettencourt-Dias, M. (2007). Revisiting the role of the mother centriole in centriole biogenesis. *Science 316*, 1046–1050.
- 125.Rose, A., and Meier, I. (2001). A domain unique to plant RanGAP is responsible for its targeting to the plant nuclear rim. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 98*, 15377–15382.
- 126.Ryan, K.J., McCaffery, J.M., and Wente, S.R. (2003). The Ran GTPase cycle is required for yeast nuclear pore complex assembly. *J. Cell Biol 160*, 1041–1053.
- 127.Salina, D., Enarson, P., Rattner, J.B., and Burke, B. (2003). Nup358 integrates nuclear envelope breakdown with kinetochore assembly. *J. Cell Biol 162*, 991–1001.

128. Sato, M., and Toda, T. (2007). Alp7/TACC is a crucial target in Ran-GTPase-dependent spindle formation in fission yeast. *Nature* 447, 334–337.
129. Schatz, C.A., Santarella, R., Hoenger, A., Karsenti, E., Mattaj, I.W., Gruss, O.J., and Carazo-Salas, R.E. (2003). Importin alpha-regulated nucleation of microtubules by TPX2. *EMBO J* 22, 2060–2070.
130. Scherf, U., Pastan, I., Willingham, M.C., and Brinkmann, U. (1996). The human CAS protein which is homologous to the CSE1 yeast chromosome segregation gene product is associated with microtubules and mitotic spindle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 2670–2674.
131. Seewald, M.J., Körner, C., Wittinghofer, A., and Vetter, I.R. (2002). RanGAP mediates GTP hydrolysis without an arginine finger. *Nature* 415, 662–666.
132. Siriaco, G., Deuring, R., Chioda, M., Becker, P.B., and Tamkun, J.W. (2009). Drosophila ISWI regulates the association of histone H1 with interphase chromosomes in vivo. *Genetics* 182, 661–669.
133. Tekotte, H., Berdnik, D., Török, T., Buszczak, M., Jones, L.M., Cooley, L., Knoblich, J.A., and Davis, I. (2002). Dcas is required for importin-alpha3 nuclear export and mechano-sensory organ cell fate specification in Drosophila. *Dev. Biol* 244, 396–406.
134. Timinszky, G., Tirián, L., Nagy, F.T., Tóth, G., Perczel, A., Kiss-László, Z., Boros, I., Clarke, P.R., and Szabad, J. (2002). The importin-beta P446L dominant-negative mutant protein loses RanGTP binding ability and blocks the formation of intact nuclear envelope. *J. Cell. Sci* 115, 1675–1687.
135. Timney, B.L., Tetenbaum-Novatt, J., Agate, D.S., Williams, R., Zhang, W., Chait, B.T., and Rout, M.P. (2006). Simple kinetic relationships and nonspecific competition govern nuclear import rates in vivo. *J. Cell Biol* 175, 579–593.
136. Ting, C.-Y., Herman, T., Yonekura, S., Gao, S., Wang, J., Serpe, M., O'Connor, M.B., Zipursky, S.L., and Lee, C.-H. (2007). Tiling of r7 axons in the Drosophila visual system is mediated both by transduction of an activin signal to the nucleus and by mutual repulsion. *Neuron* 56, 793–806.
137. Tirián, L., Puro, J., Erdélyi, M., Boros, I., Papp, B., Lippai, M., and Szabad, J. (2000). The Ketel(D) dominant-negative mutations identify maternal function of the Drosophila importin-beta gene required for cleavage nuclei formation. *Genetics* 156, 1901–1912.
138. Tirián, L., Timinszky, G., and Szabad, J. (2003). P446L-importin-beta inhibits nuclear envelope assembly by sequestering nuclear envelope assembly factors to the microtubules. *Eur. J. Cell Biol* 82, 351–359.
139. Török, I., Strand, D., Schmitt, R., Tick, G., Török, T., Kiss, I., and Mechler, B.M. (1995). The overgrown hematopoietic organs-31 tumor suppressor gene of Drosophila encodes an Importin-like protein accumulating in the nucleus at the onset of mitosis. *J. Cell Biol* 129, 1473–1489.
140. Tran, E. J. and Went, S. R. (2006). Dynamic nuclear pore complexes: life on the edge. *Cell* 125, 1041–1053.
141. Trieselmann, N., and Wilde, A. (2002). Ran localizes around the microtubule spindle in vivo during mitosis in Drosophila embryos. *Curr. Biol* 12, 1124–1129.
142. Tsou, A.-P., Yang, C.-W., Huang, C.-Y.F., Yu, R.C.-T., Lee, Y.-C.G., Chang, C.-W., Chen, B.-R., Chung, Y.-F., Fann, M.-J., Chi, C.-W., et al. (2003). Identification of a novel cell cycle regulated gene, HURP, overexpressed in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 22, 298–307.
143. Vetter, I.R., Arndt, A., Kutay, U., Görlich, D., and Wittinghofer, A. (1999). Structural view of the Ran-Importin beta interaction at 2.3 Å resolution. *Cell* 97, 635–646.

144. Villanyi, Z., Papp, B., Szikora, S., Boros, I., and Szabad, J. (2008). The DRE motif is a key component in the expression regulation of the importin-beta encoding Ketel gene in *Drosophila*. *Mech. Dev* *125*, 822–831.
145. Walczak, C.E., and Heald, R. (2008). Mechanisms of mitotic spindle assembly and function. *Int. Rev. Cytol* *265*, 111–158.
146. Walker, D.L., Wang, D., Jin, Y., Rath, U., Wang, Y., Johansen, J., and Johansen, K.M. (2000). Skeletor, a novel chromosomal protein that redistributes during mitosis provides evidence for the formation of a spindle matrix. *J. Cell Biol* *151*, 1401–1412.
147. Walther, T.C., Fornerod, M., Pickersgill, H., Goldberg, M., Allen, T.D., and Mattaj, I.W. (2001). The nucleoporin Nup153 is required for nuclear pore basket formation, nuclear pore complex anchoring and import of a subset of nuclear proteins. *EMBO J* *20*, 5703–5714.
148. Weis, K. (2007). The nuclear pore complex: oily spaghetti or gummy bear? *Cell* *130*, 405–407.
149. Wilde, A., and Zheng, Y. (1999). Stimulation of microtubule aster formation and spindle assembly by the small GTPase Ran. *Science* *284*, 1359–1362.
150. Wong, J., and Fang, G. (2006). HURP controls spindle dynamics to promote proper interkinetochore tension and efficient kinetochore capture. *J. Cell Biol* *173*, 879–891.
151. Yokoyama, H., Rybina, S., Santarella-Mellwig, R., Mattaj, I.W., and Karsenti, E. (2009). ISWI is a RanGTP-dependent MAP required for chromosome segregation. *J. Cell Biol* *187*, 813–829.
152. Zhang, C., and Clarke, P.R. (2000). Chromatin-independent nuclear envelope assembly induced by Ran GTPase in *Xenopus* egg extracts. *Science* *288*, 1429–1432.
153. Zhang, G., Breuer, M., Förster, A., Egger-Adam, D., and Wodarz, A. (2009). Mars, a *Drosophila* protein related to vertebrate HURP, is required for the attachment of centrosomes to the mitotic spindle during syncytial nuclear divisions. *J. Cell. Sci* *122*, 535–545.
154. Zhang, X., Ems-McClung, S.C., and Walczak, C.E. (2008). Aurora A phosphorylates MCAK to control ran-dependent spindle bipolarity. *Mol. Biol. Cell* *19*, 2752–2765.
155. Zhao, Q., Brkljacic, J., and Meier, I. (2008). Two distinct interacting classes of nuclear envelope-associated coiled-coil proteins are required for the tissue-specific nuclear envelope targeting of *Arabidopsis* RanGAP. *Plant Cell* *20*, 1639–1651.