

# Miként szabályozott az importin- $\beta$ -át kódoló *Ketel* gén expressziója?

Ph.D. értekezés tézisek

Villányi Zoltán

Biokémia, Biofizika és Sejtbiológia program

**SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM**  
**ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR**  
**ORVOSI BIOLÓGIAI INTÉZET**

Szeged, 2008.

Szakvezető: Szabad János

## BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

Az egymásnak látszólag ellentmondó kísérleti eredmények mögötti talányok a felfedezés örömeivel kecsegtetik a kutató és rendszerező embert. Amennyiben nem emberi mulasztás áll a mérések háttérében, az ellentmondásos eredmények a tudomány számára még felderítetlen területekre világítanak rá. Az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) importin- $\beta$ -át kódoló *Ketel* génjével kapcsolatos látszólag ellentmondásos kísérleti eredmények nyomán haladtam az ismeretlenbe, az előttem haladók precíz és lelkiismeretes munkájának megnyugtató tudatában.

A „Szabad-műhely” munkatársai mutatták meg először a világon, hogy a *Ketel* gén terméke, az importin- $\beta$ , nélkülözhetetlen az embriógenezis legelején, az első osztódás során (Lippai et al., 2000; Tirián et al., 2000). Az importin- $\beta$ -ról a tudomány azt tudta, hogy a sejtmagi fehérje import fontos komponense. Az importin- $\beta$ -val kapcsolatos eredményei is hozzájárultak Günter Blobel Nobel-díjához 1999-ben. A Szabad-műhely genetikai és sejtbiológiai megközelítése nyomán az importin- $\beta$  új funkcióira derült fény: azon túl, hogy a sejtmagi lokalizációs szignált tartalmazó fehérjéket juttat a sejtmagba, az importin- $\beta$  részt vesz a sejtmaghártya összeszerelődésében is (Tirián et al., 2000; Timinszky et al., 2002). Sőt, az importin- $\beta$  egy további funkciójára is elsőként mutattak rá: szerepe van a mikrotubulusok

stabilizálásában is (Lippai et al., 2000; Tirián et al., 2003).

A *Ketel* génnel kapcsolatos kutatások során olyan különös jelenségekre figyeltek fel a Szabad-műhely munkatársai, amelyek megértésén négy évet dolgoztam, és miközben sokat tanultam, a rejtélyes jelenségek végére jártam. Ph.D. értekezésem azokat az eredményeket foglalja össze, amelyek nyomán fényt derítettünk a *Ketel* gén expressziójával kapcsolatos furcsaságokra. Íme, a korábban nem értett, magyarázatra váró jelenségek:

1. Riportergének, valamint anti-importin- $\beta$  használata alapján arra derült fény, hogy az importin- $\beta$  képződését kódoló *Ketel* gén csak a diploid sejtekben expresszálódik, a nem osztódó, politén lárvális sejtekben nem (Lippai et al., 2000; Tirián et al., 2000). A megfigyelés érthetetlen, tudva, hogy a *Drosophilának* csak egyetlen importin- $\beta$ -t kódoló génje van (*Ketel*), és biztosra vehető, hogy a roppant intenzív anyagcserét folytató lárvális sejtekben importálódnak fehérje molekulák a sejtmagba. Hogyan? Egy eddig ismeretlen úton? Vagy importin- $\beta$ -val eleddig ismeretlen módon?

2. Azok a zigóták, amelyeknek nincs funkcióképes *Ketel* génje (amelyek homo-, vagy hemizigóták egy *ketel*<sup>null</sup> allélra) a második lárvastádium végén elpusztulnak, két nappal a lárvaállapot vége előtt. A jelenség érthetetlen, hiszen a lárvális élet befejezéséhez nincs szükség

azokra a diploid sejtekre, amelyekben a *Ketel* gén expresszálódik, ám kellenek azok a lárvális sejtek, amelyekben a *Ketel* gén nem expresszálódik (Szabad and Bryant, 1982). Vajon mi a különös jelenség magyarázata?

3. Azoknak a sejteknek tökéletes az életképessége, amelyek mitotikus rekombináció nyomán képződnek, és nincs bennük funkcióképes *Ketel* gén. Miként élhetnek, osztódhatnak és differenciálódhatnak azok a diploid sejtek, amelyekben nem képződnek importin- $\beta$  molekulák?

4. Milyen DNS szekvenciák, a hozzájuk kapcsolódó mely transzkripciós faktorok, és miként szabályozzák a *Ketel* gén expresszióját az egyedfejlődés különféle stádiumaiban?

A kérdések megválaszolására a genetika, a sejt- és a molekuláris biológia eszköztárát használtuk. A klasszikus gúnderek használatán alapuló fókuszálási eljárással (Bryant and Zornetzer, 1973) megállapítottuk, hogy a *Ketel* gén funkciójára nagyon sok sejtben van szükség (Villányi et al. 2008a). Majd *ketel*<sup>null</sup> hemizigóta hátéren a Gal4/UAS rendszerrel (Brand and Perrimon, 1993; Duffy, 2002) szövetspecifikusan expresszáztattuk a *Ketel* gént, „menekítettük” a letalitást, és állapítottuk meg, hogy a *Ketel* gén funkciójára az epidermisz prekursor sejtekben van szükség. A Gal4/UAS és az RNS-

interferencia módszerének (Dietzl et al., 2007) kombinálásával megkerestük azokat a sejteket, amelyek nem nélkülözhetik az importin- $\beta$  funkcióját. Egy új megközelítéssel, GFP-vel jelölt importin- $\beta$  alkalmazásával meghatároztuk az importin- $\beta$  élettartamát.

Megállapítottuk, hogy az importin- $\beta$  alighanem az a fehérjeféleség, amely élettartama a leghosszabb a sejtekben. A *Ketel* gén promóterének analízise során megkerestük és azonosítottuk azokat a szekvenciákat, amelyek meghatározzák a gén jellegzetes expresszió-mintázatát (Villányi et al., 2008b). Megállapítottuk, hogy a lárvális sejtekben azok a hosszú életű importin- $\beta$  molekulák végzik a sejtmagi fehérje importot, amelyeknek egyik része anyai eredetű, a továbbiak pedig a blasztoderma stádiumot követően abban a rövid időszakban képződnek, amely során a *Ketel* gén minden sejtben expresszálódik. A *Ketel* különleges expressziós viselkedése ésszerű. Intenzíven expresszálódik azokban a diploid sejtekben, amelyekben az importin- $\beta$  mindhárom funkciójára szükség van: sejtmagi fehérje import, a magorsó képződése, valamint a sejtmaghártya összeszerelődése. Ám nem expresszálódik azokban a lárvális sejtekben, amelyek nem osztódnak, amelyekben az importin- $\beta$  molekuláknak csak a sejtmagi fehérje importot kell megvalósítaniuk. Ez utóbbi feladatot az a néhány, ám roppant hatékonyan funkcionáló molekula is el tudja látni, amelyek részben anyai eredetűek, részben pedig a gasztruláció elején képződnek.

## ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A kísérleti körülmények a következők voltak:

- A muslica vonalak fenntartását, a keresztezéseket, a peték gyűjtését, ill. az élő embriók injektálását standard körülmények között, 25°C-on végeztük.
- A DNS izolálás, a klónozás, PCR reakciók, a szekvenálás, valamint a gélshift kísérletek során jól bevált módszereket használtunk.
- Az *in silico* promóter analízist számítógéppel, a TRES (<http://bioportal.bic.nus.edu.sg/tres/>) szoftverrel készítettük öt *Drosophila* faj (*melanogaster*, *simulans*, *sechellia*, *yakuba* és *erecta*) megfelelő genom szekvenciáinak összehasonlításával. A szekvenciák a Flybase honlapjáról származtak ([www.flybase.org](http://www.flybase.org)).
- A kísérleteinkben felhasznált *Ketel*<sup>GFP</sup> allélt együttműködő partnerünk, Alain Debec készítette. A Gal4 driver transzgénikus törzseket a Bloomingtoni *Drosophila* gyűjteményből szereztük be, kivéve a *distalless*-Gal4-et, ami Steven M. Cohen ajándéka volt. A *Ketel*-RNSi törzset Barry Dickson gyűjteményéből kaptuk. Az ép *Ketel* gént tartalmazó transzgént Lippai Mónika és Tirián László, a *UAS-Ketel* gént Timinszky Gyula készítette. A hiszton-RFP törzset Stefan Heidmanntól kaptuk.
- A GFP-importin- $\beta$  zöld fluoreszcenciáját konfokális mikroszkóppal készített optikai metszetek sorozatával követtük nyomon (Olympus

SV1000).

- A *LacZ* riportergén expressziójának nyomon követését embriókban és a petefészkekben standard módszerek szerint végeztük. A harmadik stádiumú lárvákat a fixálószerrel felfújtuk, majd egy szemészollóval felhasítottuk. A  $\beta$ -galaktozidáz kimutatása a kipreparált szervekben standard festési eljárással történt.

## EREDMÉNYEK

Kutatási eredményeink a következő pontokban foglalhatók össze:

1. Az anyai eredetű GFP-importin- $\beta$  molekulák az utódokban a harmadik lárvastádium végéig kimutathatók. Tudomásunk szerint a GFP-importin- $\beta$  molekulák a leghosszabb életű fehérjék, amelyet eddig élő *Drosophila* sejtekben kimutattak.
2. Az apai eredetű *Ketel* allél a gasztruláció kezdetén kezd expresszálni, az embrió minden sejtjében.
3. A GFP-importin- $\beta$  egyértelműen megmutatta, hogy az importin- $\beta$  jelen van a politén lárvális szövetekben is, bár csak roppant csekély koncentrációban.
4. A gúnander-analízissel, valamint a *ketel*<sup>*null*</sup> háttéren, különféle szövetspecifikusan kifejezett Gal4 fehérjékkel expresszáltatott UAS-*Ketel* génnel, továbbá a UAS-*Ketel*-RNSi-vel végzett fókuszálás eredményeként megtudtuk, hogy a gasztruláció során minden sejtben bekapcsoló *Ketel* génexpresszió

nélkülözhetetlen az ektodermális eredetű sejtekben. Továbbá azt is, hogy a mezodermális és entodermális eredetű sejtek életéhez elegendők az anyai eredetű, valamint a gasztruláció kezdetén képződött importin- $\beta$  molekulák.

5. Az *in silico* promóteranalízis számos, konzervált transzkripció faktor kötőhelyet mutatott meg. A *Ketel* gén anyai, embrionális és szövetspecifikus expressziójában szerepet játszó kötőhelyeket gél-shift kísérletekkel, valamint riportergénnel azonosítottuk. A következő transzkripció faktorok kötőhelyeinek szerepére derült fény: CFDD (Common Regulatory Factor for DNA Replication), DREF (DNA replication-related element binding factor), CF2-II (Chorion Factor 2).
6. Megmutattuk, hogy a DRE motívum szerepe alapvető a *Ketel* génnel kapcsolatos anyai hatás létrejöttében, valamint a génexpresszió szabályozásában a korai embriógeneszis során, az embrió minden sejtjében.
7. Valószínűsítettük, hogy a diploid sejtekben egy CF2-II kötőhely szabályozza a *Ketel* gén expresszióját.

## KÖVETKEZTETÉSEK

Kísérleteink rávilágítottak arra, hogy

- (i) az importin- $\beta$  fehérje egyedülállóan hosszú életű. Az importin- $\beta$  hosszú élete és perduranciája magyarázza meg azt, hogy a diploid sejtek klónjai *Ketel* gén nélkül is képesek élni, funkcionálni és differenciálódni. Mivel a hosszú élettartam az importin- $\beta$  fehérjének, és nem pedig az mRNS-nek köszönhető érthető, hogy génextpresszió és mRNS híján miért nem lehetett korábban sem a *Ketel* promóterrel meghajtott *LacZ* riporter génekkel, sem pedig *in situ* hibridizációval génextpressziót kimutatni a lárvális politén sejtekben.
- (ii) A zigotikus *Ketel* gén expressziója először a gasztruláció kezdetén következik be, és az embrió minden sejtjében. A politén sejtekben azért nem expresszálódik a *Ketel* gén, mert az anyai eredetű, valamint a gasztruláció kezdetén minden sejtben képződő hosszú élettartamú importin- $\beta$  elegendő mennyiségben van jelen a lárvális sejtek ép funkciójához. Világossá vált az is, hogy a funkcióképes *Ketel* gént nem tartalmazó lárvák azért pusztulnak el 2. lárvá stádium végén, mert a lárvális élet szempontjából létfontosságú sejtjeik nem kapják meg azt a szükséges importin- $\beta$  mennyiséget, amit az anyai hatás mellett a gasztruláció kezdetén bekapcsoló *Ketel* génextpresszió biztosít. Ezek a lárvák az anyai eredetű importin- $\beta$ -nak köszönhetik

rövidke életüket.

- (iii) Az importin- $\beta$  fehérje a diploid és a politén sejtekben egyaránt jelen van. Igaz, a politén sejtekben jóval kisebb koncentrációban, mint a diploid sejtekben. Ami érthető, hiszen a lárvális sejtekben az importin- $\beta$ -nak csak a sejtmagi fehérje import funkciójára van szükség. Nincsen tehát felfedezésre váró alternatív sejtmagi fehérje import útvonal *Drosophila melanogaster*ben.
- (iv) A promóter analízis eredményei rámutattak, hogy a *Ketel* gén korai embrionális expressziójában és az anyai hatásban is, ugyanazon DRE motívumhoz kötődő DREF transzkripciós faktor játssza a főszerepet a különböző CFDD kötőhelyekhez kötődő CFDD fehérjékkel kölcsönhatva. A diploid sejtekben a CF2-II felismerőhely jelenléte nélkülözhetetlen a *Ketel* gén expressziójához.

**Összefoglalva:** kutatásaink megválaszolták a *Ketel* gén expressziója körül kialakult ellentmondásokat. Kiderült, hogy a furcsaságok hátterében az importin- $\beta$  rendkívül hosszú élettartama állt. Továbbá felderítettük azt a mechanizmust, amely a *Ketel* gén expresszióját szabályozza. Azonosítottuk azokat a szekvenciákat és transzkripciós faktorokat, amelyek a *Ketel* gén anyai, korai embrionális és szövet specifikus expressziójának szabályozását vezénylik.

## IRODALOM

Brand, A.H. and Perrimon, N. (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401-15.

Bryant, P.J., and M. Zornetzer (1973) Mosaic analysis of lethal mutations in *Drosophila*. *Genetics* **75**, 623-637.

Dietzl, G., Chen, D., Schnorrer, F., Su, K.C., Barinova, Y., Fellner, M., Gasser, B., Kinsey, K., Oettel, S., Scheiblaue, S., Couto, A., Marra, V., Keleman, K. and Dickson, B.J. (2007) A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature* **448**, 151-6.

Duffy, J.B. (2002) GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis* **34**, 1-15.

Lippai, M., Tirian, L., Boros, I., Mihaly, J., Erdelyi, M., Belec, I., Mathe, E., Posfai, J., Nagy, A., Udvardy, A., Paraskeva, E., Gorlich, D. and Szabad, J. (2000) The *Ketel* gene encodes a *Drosophila* homologue of importin- $\beta$ . *Genetics* **156**, 1889-900.

Szabad, J. and Bryant, P.J. (1982) The mode of action of "discless" mutations in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* **93**, 240-56.

Timinszky, G., Tirian, L., Nagy, F.T., Toth, G., Perczel, A., Kiss-Laszlo, 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**, 1675-87.

Tirian, L., Puro, J., Erdelyi, M., Boros, I., Papp, B., Lippai, M. and Szabad, J. (2000) The *KetelD* dominant-negative mutations identify maternal function of the *Drosophila* importin- $\beta$  gene required for

cleavage nuclei formation. *Genetics* **156**, 1901-12.

Villanyi, Z., Debec, A., Timinszky, G., Tirian, L. and Szabad, J. (2008a) Long persistence of importin-beta explains extended survival of cells and zygotes that lack the encoding gene. *Mech Dev* **125**, 196-206.

Villanyi, Z., Papp, B., Szikora, S., Boros, I. and Szabad, J. (2008b) The DRE motif is a key component in the expression regulation of the importin- $\beta$  encoding *Ketel* gene in *Drosophila*. *Mechanisms of Development*, közlés alatt.

## AZ ÉRTEKEZÉS PILLÉRJEIKÉNT SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

Villányi Zoltán és Szabad János, A genetikai információ kibontása. *Természet Világa* **138**, 493-497, 2007.

Zoltán Villányi, Alain Debec, Gyula Timinszky, László Tirián and János Szabad, Long persistence of importin- $\beta$  explains extended survival of cells and zygotes that lack the encoding gene. *Mechanisms of Development* **125**, 196-206, 2008.

Zoltán Villányi, Bernadett Papp, Szilárd Szikora, Imre Boros and János Szabad, The DRE motif is a key component in the expression regulation of the importin- $\beta$  encoding *Ketel* gene in *Drosophila*. *Mechanisms of Development*, közlés alatt.

## FÜGGETLEN KÖZLEMÉNY

Zoltán Villányi, István Gyurján, Viktor Stéger, László Orosz, Plaque-based competitive hybridization. *Journal of Biomolecular Screening* **13**(1), 80-4, 2008.

## ELŐADÁSOK KONFERENCIÁKON

Szabad, J., Tirián, L., Timinszky, Gy. and Villányi, Z. Where and when is importin- $\beta$  function indispensable? 19<sup>th</sup> European Drosophila Research Conference, Eger, Hungary 2005, p. 31.

Villányi, Z., Gáspár, I., Puskás, L., Szabad, J., Importin- $\beta$ , a sejtek energiatermelésének alfája. Genetikai Műhelyek Magyarországon Konferencia, MTA Szegedi Biológiai Központ, Szeged 2006.

Villányi, Z., Gáspár, I., Szikora, Sz., Zvara, Á., Puskás, L. és Szabad, J. Importin- $\beta$  és a mitokondriumok biogeneze. VII. Magyar Genetikai Kongresszus és XVI. Sejt és Fejlődésbiológiai Napok, Balatonfüred 2007, p. 59.

## POSZTEREK

Villányi, Z., Papp, B., Boros, I. and Szabad, J. How is expression of the Drosophila importin- $\beta$  gene regulated? 19th European Drosophila Research Conference, Eger, Hungary 2005, p. 148.

Villányi, Z., Papp, B., Debec, A., Gáspár, I., Szikora, Sz., Boros, I. and Szabad, J. How is expression of the Drosophila importin- $\beta$  gene regulated? The Functional Organization of the Cell Nucleus EMBO Workshop, Prague 2006, p. 79.

Villányi, Z., Gáspár, I., Szikora, S., Puskás, L. and Szabad, J. Lack of importin- $\beta$  reveals novel features of mitochondrion biogenesis. 20th European Drosophila Research Conference, Vienna, Austria 2007, p. 181.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálás vagyok Szabad Jánosnak, akinek szakmai támogatása és biztatása nagymértékben hozzájárult az eredmények megszületéséhez. Szerencsésnek érzem magam, hogy személyesen tőle tanulhattam genetikát, sejtbiológiát és molekuláris biológiát, hogy az általa teremtett nemzetközi tekintélynek örvendő műhelyben dolgozhattam. Ezúton szeretném kifejezni köszönetemet Boros Imrének, akihez a promóteranalízist illető kérdésekben bármikor fordulhattam és laboratóriumában az irányítása alatt a gél-shift technikát megtanulhattam. Külön köszönetet szeretnék mondani mindazoknak, akikkel együtt dolgoztam a feladványok megfejtésén: Papp Bernadettnek, Alain Debecnek és Szikora Szilárdnak. Segítőkétségükért és szakmai útmutatásukért köszönetemet fejezem ki kutatócsoportunk korábbi és jelenlegi tagjainak: Tirián Lászlónak, Timinszky Gyulának, Gáspár Imrének, Seprényi Györgynek, Ördög Baláznak és Tombác Dórának. Köszönet a sok izgalmas eszmecseréért: Boldogkői Zsoltnak, Belec Istvánnak, Venkei Zsoltnak, Szalontai Tamásnak, Lippai Mónikának, Sarkadi Zsuzsának, Kerényi Farkasnak, Tóth Juditnak és Mészáros Lídiának. Odaadó munkájukért és a kellemes légkörért szeretnék köszönetet mondani Teleki Gabriellának, Kissné Aninak, Kisapátné Margónak, Révész Katinak, Piroska Néninek és Lajos bácsinak. Köszönöm feleségemnek, kislányomnak, szüleimnek és nővéremnek a támogatásukat, a

kiegyensúlyozott munkához háttérrel biztosító nyugodt családi légkört.

Az értekezés alapját képező kísérletek a Magyar Tudományos Akadémia Anyai Hatás és Embriógenézis Kutatócsoport, három Magyar Tudományos Kutatási Alapból: OTKA T5537, OTKA 032540 és OTKA NI69180, külföldi forrásból Agency for Research Fund Management and Research Exploitation 3.2.1-2004-04-0411/3.0, an ECO-NET grant (ACI BCMS 2004-2007) from the French "Ministère des Affaires Etrangères" és a Szegedi Tudományegyetem Ph.D. Hallgatói Képzési Programjának anyagi támogatásával készültek.