

Ph.D. értekezés tézisei

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

Virágh Eszter Erika

Témavezető: Dr. Kiss István
MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Biológia Doktori Iskola
Szegedi Tudományegyetem
2013.

1. Bevezetés

A magasabb rendű szervezetekben a makromolekulák sejtmagi szállítását a Ran kismolekulájú GTP-áz szabályozásán keresztül az importinok végzik. A citoplazmában az Imp- α közvetíti az NLS szekvenciával rendelkező célfehérjék és az Imp- β közötti kapcsolatot, majd a hármas komplex a sejtmagba jutva RanGTP jelenlétében disszociál. Az utóbbi évek kutatásai alapján körvonalazódott, hogy az Imp- α/β komplex a sejtosztódási folyamatok térbeli- és időbeli koordinálásában ugyancsak részt vesz, mégpedig az osztódási orsót megszervező fehérjék (NLS-SAF és -MAP) aktivitásának szabályozásán keresztül. A szabályozási mechanizmus az eukarióta élőlényekben az élesztőtől az emberig evolúciósan konzervált.

Az ecetmuslica egy *imp- β* és három *imp- α* génnel rendelkezik. Az *imp- β ^{Ketel}* és *imp- α 3* nélkülözhetetlen a szomatikus sejtek sejtmagi transzportjában. Az *imp- α 1* a spermatogenezisben, az *imp- α 2* a petesejt fejlődése során lát el, a másik két *imp- α* paralóg által nem helyettesíthető specifikus feladatot. Az eddigi elképzelések szerint, az Imp- α fehérjék specifikus feladatai főként az ivarsejt képződés sajátos igényeinek ellátása miatt különültek el. A homozigóta *imp- α 2^{D14}* null mutánsok felnőtt egyedé 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. Az *imp- α 2* kis NLS-kötő régióját érintő, vagy az Imp- β kötésért felelős, IBB doménjét kiejtő mutáns transz gének kifejeztetése normális morfológiájú, érett petét eredményez, viszont a lerakott petékből nem fejlődnek embriók. Ez az eredmény felvetette annak lehetőségét, hogy az importinok mitózisban betöltött szerepét *in vivo* vizsgáljuk meg *Drosophila melanogaster*-ben.

2. Célkitűzések

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-α2/Imp-β^{Ketel} komplex funkcióit az *ecetmuslica* korai embrionális osztódásai során.

1. Az *imp-α2*^{D14} és az *imp-β* recesszív allélok genetikai analízise.
2. Az *imp-α2*^{D14}/*imp-β*^{KetRE34} interakció molekuláris genetikai és biokémiai hátterének feltárása DNS szekvenálással, homológ modellezéssel és pull down kísérletekkel.
3. Az *imp-α2* paralóg specifikus szerepének igazolása genetikai interakciós kísérletekkel és immunocitológia segítségével.
4. Az *imp-α2* mutáns transzgének embrionális fenotípusának vizsgálata.
5. Az Imp-α2 NLS függő mitotikus szabályozásának igazolása genetikai és sejtbiológiai kísérletekkel.
6. Az Imp-α2/Imp-β^{Ketel} komplex funkcióinak feltárása sejtbiológiai módszerekkel.

3. Alkalmazott módszerek

1. Interakciós genetikai analízis
2. Embrió életképességi teszt

3. Embrió-fixálási módszerek és immunohisztokémiás festések
4. DNS technikák (szekvenálás, klónozás, *in vitro* mutagenézis)
5. Fehérje expresszió
6. GST pull down és western blot
7. Fehérje homológ modellezés
8. Konfokális mikroszkópia
9. Képfeldolgozó szoftverek alkalmazása

4. Eredmények

1. Munkánk az *imp- α 2* gén és az *imp- β* Drosophila ortológja, az *imp- β ^{Ketel}* gén közötti genetikai kölcsönhatás vizsgálatával kezdődött. Az *imp- α 2* gén *imp- α 2^{D14}*-es null allélja, és hat recesszív *imp- β ^{Ketel}* allél (*imp- β ^{KetRP13}*, *imp- β ^{KetRX13}* és *imp- β ^{KetRE34}* – a domináns nősténysteril *imp- β ^{KetD}* revertánsai –, illetve *imp- β ^{Ketc02473}*, *imp- β ^{Kete02657}* és *imp- β ^{Kete03750}* – *piggyBac* inszerciók) különböző kombinációit hordozó transzheterozigóta anyáktól származó embriók fejlődését követtük nyomon. A fenti kombinációk közül egyedül az *imp- α 2^{D14}/imp- β ^{KetRE34}* eredményezett embrióletalitást, amelyet a vad *imp- α 2* és a vad típusú *imp- β ^{Ketel}* transzgének kifejeztetése egyaránt menekített, jelezvén, hogy az Imp- α 2 és Imp- β ^{Ketel} fehérjék koordinált együttműködése kritikus a muslica korai embrionális fejlődésében.
2. Az *imp- β ^{KetRE34}* allélban azonosítottunk egy második mutációt, a D725N helyettesítést, amely az Imp- β ^{Ketel} Imp- α 2-kötő doménjében található. Az Imp- β ^{Ketel} fehérje *in silico* módszerekkel történő vizsgálata

szerint az $\text{Imp-}\beta^{\text{KetD725N}}$ és vad $\text{Imp-}\beta^{\text{Ketel}}$ fehérje az $\text{imp-}\alpha 2$ IBB doménjét ugyanolyan erősen köti, amit az $\text{Imp-}\alpha 2$ kötődését kimutató pull down kísérlettel is alátámasztottunk. Ugyanakkor, az N725 aminosav olyan, új, molekulán belüli, szerkezetmódosító kötések alakít ki, amelyek feltehetően javítanak az $\text{Imp-}\beta^{\text{KetD}}$ rendellenesen nyitott konformációján, ezáltal csökkentve a domináns nősténysteril $\text{Imp-}\beta^{\text{KetD}}$ fehérje mérgező hatását. Az $\text{Imp-}\beta^{\text{KetRE34}}$ szerkezeti módosulása ugyanakkor, nem állítja vissza teljesen a vad típusú $\text{Imp-}\beta^{\text{Ketel}}$ molekulára jellemző fehérje kötési flexibilitást, amint arra a RanGTP és RanGDP fehérjékhez történő megemelkedett kötési hajlandósága is rávilágít. Feltehetően ez az oka az $\text{imp-}\beta^{\text{KetRE34}}$ 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 $\text{imp-}\beta^{\text{KetRE34}}$ antimorf fenotípusát.

3. Az $\text{imp-}\alpha 2$, az $\text{imp-}\alpha 1$ és az $\text{imp-}\alpha 3$ klasszikus funkcióvesztéses alléljainak $\text{imp-}\beta^{\text{KetRE34}}$ -el transzheterozigóta kombinációja vagy mindhárom $\text{imp-}\alpha$ paralóg $\text{imp-}\beta^{\text{KetRE34}}$ háttéren történő, ovárium-specifikus RNS csendesítése esetén, csak az $\text{imp-}\alpha 2^{\text{D14}}/\text{imp-}\beta^{\text{KetRE34}}$ és $\text{imp-}\alpha 2\text{i}/\text{imp-}\beta^{\text{KetRE34}}$ kombináció okozott embrió-letalitást. Továbbá, az $\text{imp-}\alpha 2^{\text{D14}}/\text{imp-}\beta^{\text{KetRE34}}$ allélkombináció erős embrióletális fenotípusát, az azonos szinten és mintázatban kifejeztetett, $\text{UTR}^A\text{imp-}\alpha$ transz gének közül, kizárólag az $\text{UTR}^A\text{imp-}\alpha 2$ menekítette. Az $\text{Imp-}\alpha 2$ 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 $\text{imp-}\alpha 2$ génjének paralóg-specifikus szerepére az embrió korai fejlődési szakaszában a szinkron magosztódások

során

4. A mutáns $imp-\alpha 2$ ($imp-\alpha 2^{NLSB^-}$, $imp-\alpha 2^{SNLSB^-}$, $imp-\alpha 2^{AIBB}$, $imp-\alpha 2^{CASB^-}$) transzgénének analízisét $imp-\alpha 2^{D14}/imp-\beta^{Kete1}$ null érzékenyített háttéren végeztük, többféle recesszív $imp-\beta^{Kete1}$ allélt ($imp-\beta^{KetRX13}$, $imp-\beta^{KetRP13}$, $imp-\beta^{Kete02473}$, $imp-\beta^{Kete02657}$, $imp-\beta^{Kete03750}$) is kipróbálva. Az $imp-\alpha 2$ NLSB és SNLSB doménjeinek inaktiválása az $imp-\beta^{Kete1}$ gén csökkentett dóziséval párosulva embrió letalitást okozott. Kimutattuk az $imp-\alpha 2^{NLSB^-}$ transzgén antimorf hatását is $imp-\alpha 2^{D14}/+$ heterozigóta háttéren, amit az $imp-\beta^{Kete1}$ 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 $imp-\alpha 2^{D14}/imp-\beta^{Kete1}$ null háttéren nem volt hatása az embriók fejlődésére, ami azzal magyarázható, hogy az IBB doménjét nélkülöző Imp- $\alpha 2$ nem tud az Imp- β^{Kete1} fehérjéhez kötődni, míg a másik három, intakt IBB doménnel rendelkező Imp- $\alpha 2$ mutáns fehérje képes fizikailag kapcsolatba lépni az Imp- β^{Kete1} -lel. Az Imp- $\alpha 2$ fehérje zárt konformációját stabilizáló CASB domén hiányában a nyitott konformációt biztosító Imp- $\alpha 2^{CASB^-}/Imp-\beta^{Kete1}$ komplexek továbbra is ki tudnak alakulni, és így továbbra is megkötik az NLS-mitotikus faktorokat, lehetővé téve az embrió normális fejlődését.
5. A dolgozatomban leírt genetikai kölcsönhatások, melyeket egyrésről az $imp-\alpha 2^{D14}$ és $imp-\beta^{KetRE34}$, másrésről az $imp-\alpha 2^{NLSB^-}$ vagy $imp-\alpha 2^{SNLSB^-}$ és $imp-\beta^{Kete02473}$ között figyeltünk meg, rávilágítanak arra, hogy az Imp- $\alpha 2/Imp-\beta^{Kete1}$ funkcionális komplex mennyiségének egy kritikus küszöbérték felett kell maradni a korai embrió-genezis osztódásai során. Míg az $imp-\beta^{Kete10}$ heterozigóta háttéren kifejeztetett $imp-\alpha 2^{NLSB^-}$ vagy $imp-\alpha 2^{SNLSB^-}$ allélok a funkcionális komplex mennyiségét csökkentik,

addig az $imp-\beta^{KetRE34}$, ahogy az a Ran-kötést bemutató pull down kísérletből és az interakciós mitotikus fenotípusokból kiderült, az NLS-fehérje/Imp- α 2/Imp- β^{Ketel} hármas komplex stabilitásával teszi ugyanezt.

6. Az $imp-\alpha 2^{D14}/imp-\beta^{KetRE34}$ és $imp-\alpha 2^{D14}/imp-\beta^{Ketc02473}$; *nos-Gal4-imp-\alpha 2^{NLSB-}* nöstények 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. 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 orsóknál, amelyek csökkent mennyiségű kromatint tartalmaztak. Feltételezzük, hogy az elégséges mennyiségű, funkcionális Imp- α 2/Imp- β^{Ketel} komplex hiánya, olyan mitotikus faktorok túlzott aktivitását okozza, amelyek túlzott MT-növekedést idéznek elő, mivel kikerülnek a citoplazmás gátlás alól.
7. A sejtmaghártya rendellenes megszerveződését a hozzákapcsolódó lamin eloszlása rajzolta ki. Az $imp-\alpha 2^{D14}/imp-\beta^{KetRE34}$ és $imp-\alpha 2^{D14}/imp-\beta^{Ketc02473}$; *nos-Gal4-imp-\alpha 2^{NLSB-}* nöstények 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 orsókban 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 fehérje Imp- α 2 általi, NLS-függő immun-precipitációja további bizonyíték erre a feltételezésre.

8. 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- β ^{Ketc02473}*; *nos-Gal4-imp- α 2^{NLSB}*-mutáns nőtények 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.

5. Összefoglalás

1. Az Imp- $\alpha 2$ és Imp- β^{Kete1} összehangolt együttműködése szükséges a muslica embrió korai fejlődéséhez.
2. Az *imp- $\alpha 2$* mitotikus szerepét, az *imp- $\alpha 1$* és *imp- $\alpha 3$* gén nem tudja helyettesíteni a muslica embrió szinciciális osztódásai során.
3. Az Imp- $\alpha 2$ az osztódási orsókon sejtciklus függő dinamikus eloszlást mutat.
4. A különböző mitotikus faktorok regulációja az Imp- $\alpha 2$ NLSB-doménjének közvetítésén keresztül érvényesül.
5. Az anyai eredetű Imp- $\alpha 2$ és Imp- β^{Kete1} funkcionális komplexek elégséges mennyisége esszenciális a muslica embriófejlődésének korai osztódásai során.
6. Az Imp- $\alpha 2$ /Imp- β^{Kete1} komplex szabályozza:
 - a mikrotubulusok polimerizációjáért felelős faktorok aktivitását
 - a kromatin kondenzációját
 - a sejtmaghártya lebomlásának/újra-formálódásának mechanizmusát
 - a centroszómák biogenezisét és dinamikáját.

6. Közlemények

Az értekezés alapjául szolgáló közlemény:

Virágh E, Gorjánác M, Török I, Eichhorn T, Kallakuri S, Szlanka T, Kiss I, Mechler BM. Specific Cooperation Between Imp- α 2 and Imp- β /Ketel in Spindle Assembly During *Drosophila* Early Nuclear Divisions. *G3* (Bethesda). 2012 Jan;2(1):1-14.

IF: a számszerű Impact Factor 2013. júliusban lesz látható

Egyéb közlemények:

Willemsen M. H, Nijhof B., Fenckova M., Nillesen W. M., Bongers E M., Castells-Nobau A., Asztalos L., **Virágh E**. van Bon BW, Tezel E., Veltman J.A., Brunner H.G, de Vries B.B., de Ligt J., Yntema H. G, van Bokhoven H., Isidor B., Le Caignec C., Lorino E., Asztalos Z., Koolen D.A., Vissers L.E., Schenck A., Kleefstra T. *GATAD2B* loss-of-function mutations cause a recognizable syndrome with intellectual disability and are associated with learning deficits and synaptic undergrowth in *Drosophila*. *Journal of Medical Genetics*, accepted: 2013. Apr 20.

IF: 6,365

van Bon BW, Oortveld MA, Nijtmans LG, Fenckova M, Nijhof B, Besseling J, Vos M, Kramer JM, de Leeuw N, Castells-Nobau A, Asztalos L, **Virágh E**, Ruiter M, Hofmann F, Eshuis L, Collavin L, Huynen MA, Asztalos Z, Verstreken P, Rodenburg RJ, Smeitink JA, de Vries BB, Schenck A. CEP89 is required for mitochondrial metabolism and neuronal function in man and fly. *Hum Mol Genet*. 2013 Apr 10. [Epub ahead of print]

IF: 7,636

D. Chen, A. Ahlford, F. Schnorrer, I. Kalchhauser, M. Fellner, **E. Virágh**, I. Kiss, A.-C. Syvänen, and B. J. Dickson. High-resolution high-throughput SNP mapping in *Drosophila melanogaster*. (2008) *Nature Methods* (4):323-9.

IF: 13.651

D. Hattori, E. Demir, H. W. Kim, **E. Virágh**, S. L. Zipursky and B. J. Dickson *Dscam* diversity is essential for neuronal wiring and self-recognition. (2007) *Nature* 449, 223-227.

IF: 28,751

T. Szlanka, L. Haracska, I. Kiss, P. Deák, E. Kurucz, I. Andó, **E. Virágh** and A. Udvardy. Deletion of proteasomal subunit S5a/Rpn10/p54 causes lethality, multiple mitotic defects and overexpression of proteasomal genes in *Drosophila melanogaster*. (2003) J Cell Sci. 116 (Pt 6): 1023-33.
IF: 7,250

I. Kiss, A. Fodor, T. Timár, S. Hosztafi, P. Sebök, T. Török, **E. Virágh** and M. Berényi. (1988) Biological activity of precocene analogues on *Locusta migratoria*. Experientia 44, 790-792.
IF: 1,147

Összesített IF: 64,8