

**Az Importin-alpha 2 fehérje új funkciójának azonosítása a
Drosophila melanogaster petefejlődése során**

Ph.D. értekezés

Készítette: Gorjánáczy Mátyás

Témavezető: Dr. Kiss István

MTA Szegedi Biológiai Központ
Genetikai Intézet

Szeged, 2003

TARTALOMJEGYZÉK

<u>1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS</u>	4
1.1. <u>AZ IMPORTIN FEHÉRJÉK FUNKCIÓI</u>	4
1.2. <u>AZ IMPORTIN FEHÉRJÉK MOLEKULÁRIS KÖLCSÖNHATÁSAINAK ALAPJA</u>	10
1.3. <u>A <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> PETEFEJLŐDÉSÉNEK RÖVID ÁTTEKINTÉSE</u>	13
1.4. <u>A <i>DROSOPHILA</i> PETEKAMRÁINAK GYŰRŰCSATORNÁI</u>	16
<u>2. CÉLKITŰZÉS</u>	21
<u>3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK</u>	22
3.1. <u>A <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> TÖRZSEK</u>	22
3.2. <u>AZ OVÁRIUMOK IMMUNOHISZTOKÉMIÁS FESTÉSE</u>	22
3.3. <u>AZ OVÁRIUMOK β-GALAKTOZIDÁZ FESTÉSE</u>	24
3.4. <u>AZ EMBRIÓK DNS FESTÉSE</u>	24
3.5. <u>A PETÉK KORION BURKÁNAK PREPARÁLÁSA</u>	25
3.6. <u>A PÁSZTÁZÓ ELEKTRON MIKROSKÓPIA</u>	25
3.7. <u>AZ IMPORTIN-$\alpha 2$ GÉN <i>IN VITRO</i> MUTAGENEZISE</u>	25
3.8. <u>AZ IMPORTIN-$\alpha 2$ FEHÉRJE MYC- ÉS PROTEIN A-JELÖLÉSE</u>	27
3.9. <u>AZ IMPORTIN-$\alpha 2$ FEHÉRJEKOMPLEXEK TISZTÍTÁSA</u>	28
3.10. <u>A COOMASSIE KÉK GÉLFESTÉS</u>	29
3.11. <u>A KO-IMMUNOPRECIPITÁCIÓ</u>	29
3.12. <u>AZ <i>IN VITRO</i> MIKROFILAMENTUM KÖTÉS</u>	30
3.13. <u>A WESTERN BLOT</u>	31
<u>4. EREDMÉNYEK</u>	32
4.1. <u>AZ IMPORTIN-$\alpha 2$ FEHÉRJE NEM HALMOZÓDIK FEL A <i>DROSOPHILA</i> PETEKAMRÁINAK SEJTMAGJAIBAN</u>	32
4.2. <u>AZ IMPORTIN-$\alpha 2$ FEHÉRJE KÖLCSÖNHAT A <i>DROSOPHILA</i> PETEKAMRÁK KORTIKÁLIS AKTIN SEJTVÁZÁVAL</u>	34
4.3. <u>AZ IMPORTIN-$\alpha 2$ GÉN INAKTIVÁLÁSA STERILITÁST EREDMÉNYEZ</u>	38
4.4. <u>AZ IMPORTIN-$\alpha 2$ FEHÉRJE SZÜKSÉGES A <i>DROSOPHILA</i> PETEFEJLŐDÉSÉHEZ</u>	38
4.5. <u>AZ IMPORTIN-$\alpha 2^{D14}$ PETEKAMRÁK GYŰRŰCSATORNÁI BESZŰKÜLTEK</u>	40
4.6. <u>A KELCH FEHÉRJE HIÁNYZIK AZ IMPORTIN-$\alpha 2^{D14}$ GYŰRŰCSATORNÁIBÓL</u>	42
4.7. <u>AZ IMPORTIN-$\alpha 2^{D14}$ ÉS A KELCH^{DEI} GYŰRŰCSATORNÁK AKTINKÖTEGEI RENDEZETLENEN</u>	43
4.8. <u>AZ IMPORTIN-$\alpha 2$ FEHÉRJE FUNKCIÓJÁNAK ELEMZÉSE <i>IN VITRO</i> ELŐÁLLÍTOTT ALLÉLEKKEL</u>	45
4.9. <u>AZ IMPORTIN-$\alpha 2$ FEHÉRJE CITOPLAZMÁS JELENLÉTE SZÜKSÉGES A NORMÁLIS PETEFEJLŐDÉSHEZ</u>	49
4.10. <u>AZ IMPORTIN-$\alpha 2$ FEHÉRJE KOMPLEXET KÉPEZ A KELCH FEHÉRJÉVEL</u>	51
4.11. <u>AZ IMPORTIN-$\alpha 2$ GÉN DOMINÁNS NEGATÍV ALLÉLJA</u>	56
4.12. <u>A DOMINÁNS NEGATÍV ALLÉL A CSÍRAVONAL EREDETŰ SEJTEK ÉLETKÉPESSÉGÉT ÉRINTI</u>	58
4.13. <u>A DOMINÁNS NEGATÍV ALLÉL SEJTHALÁLT IDÉZ ELŐ</u>	61

<u>5. EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA</u>	64
<u>6. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA</u>	65
<u>6.1. IMPORTIN-α2 ÉS A SEJTMAGI TRANSZPORT</u>	65
<u>6.2. IMPORTIN-α2 ÉS A GYŰRŰCSATORNÁK</u>	67
<u>6.3. IMPORTIN-α2 ÉS A SEJTHALÁL</u>	75
<u>7. SUMMARY</u>	77
<u>8. FÜGGELÉK</u>	82
<u>8.1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE</u>	82
<u>9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS</u>	84
<u>10. IRODALOMJEGYZÉK</u>	85
<u>11. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE</u>	100

1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1.1. Az Importin fehérjék funkciói

Az eukarióta sejtek kompartmentalizációja szükségessé tette az egyes kompartmentek közötti molekula transzportot. Mivel a legtöbb fehérje a citoplazmában képződik, a membránnal határolt kompartmentek speciális, szignál-közvetített transzport rendszereket fejlesztettek ki, hogy az egyes fehérjék szállítását biztosítsák. Míg a mitokondrium a kloroplasztisz és az endoplazmatikus retikulum esetében ez csupán egyirányú molekula importot jelent, addig a sejtmagi transzport folyamat egy annál sokkal összetettebb kétirányú folyamat (Schatz és Dobberstein, 1996; Mattaj és Englmeier, 1998). A citoplazmában szintetizált sejtmagi fehérjéknek a sejtmagba kell jutniuk, míg a sejtmagban képződött RNS-ek túlnyomó része a citoplazmába szállítódik. Becslések szerint ezek a folyamatok közel 1 millió molekula szállítását jelentik egy emlős sejtben percenként (Görllich és Mattaj, 1996).

Az eukarióták kromoszómáit kettős magmembránok határolódnak el a citoplazmától. A külső magmembrán az endoplazmatikus retikulum közvetlen folytatása és azzal szerkezetében és működésében is rokon, ezzel szemben a belső magmembrán attól teljes mértékben eltérő, jellegzetes molekulahálózattal rendelkező struktúra (Holaska és mtsai., 2002). A belső magmembránban számos transzmembrán és membrán-kötött fehérje foglal helyet és ezek gazdag intermolekuláris kölcsönhatásaik révén (a kromatin fehérjéivel és a magmembránt belülről szegélyező lamin hálózattal) biztosítják az interfázisos sejtmag stabil szerkezetének megőrzését (Goldman és mtsai., 2002).

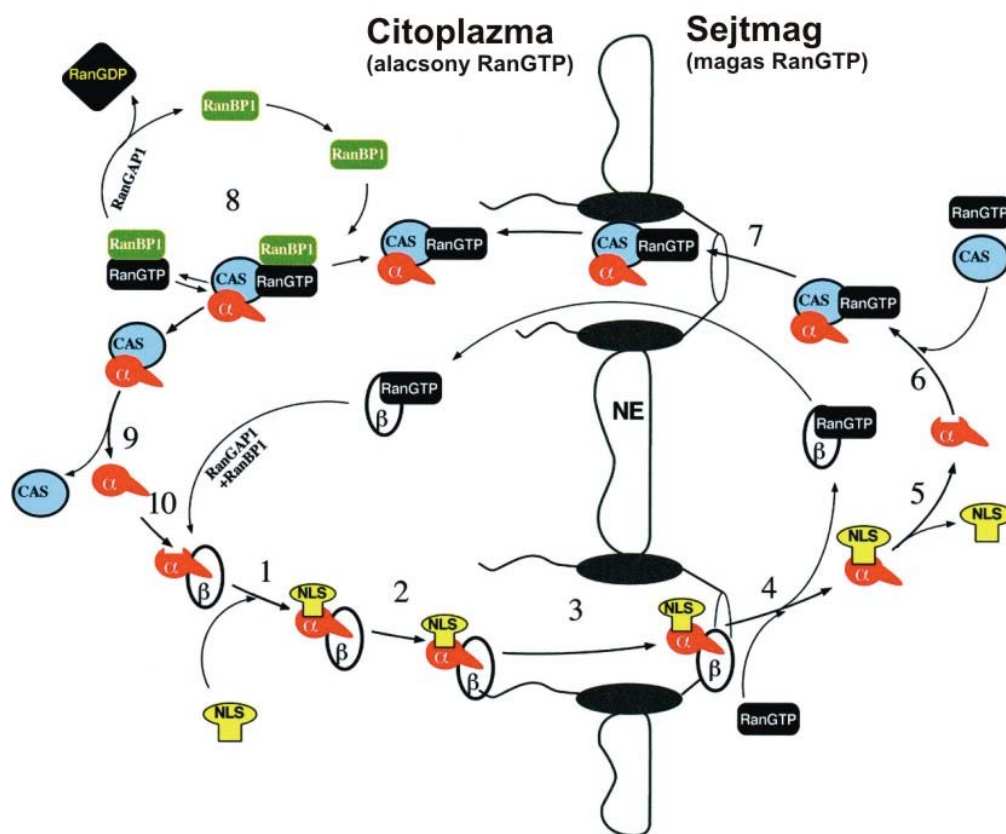
A magmembránt hengerszerű nukleáris póruskomplexek (NPK) járók át, melyek az élővilág egyik legnagyobb molekuláris szerveződése (élesztőben ~60 MDa, gerincesekben 125 MDa méretűek). A NPK-eket 50-100 különböző, nukleoporinnak (Nup) nevezett fehérje alkotja, melyek mindegyike legalább nyolc példányban fordul elő egy póruskomplexeen belül (Stoffler és mtsai., 1999; Vasu és Forbes, 2001). A NPK-ek képezik a magmembrán egyetlen olyan csatornáját, amin keresztül a molekulák közlekedhetnek, és amin keresztül a sejtmagi molekulák szállítása végbemegy. Elvileg minden 9 nm-nél kisebb molekula (ami

közelítőleg egy 60 kDa méretű globuláris fehérjének felel meg) szabad diffúzióval képes lenne átjutni a NPK csatornáin. Gyakorlatilag azonban csak néhány fehérje képes erre, míg az RNS-ek közül egyik sem. Ez a sejtmagi transzport magasfokú szelektivitását (Ribbeck és Görlich, 2002) és aktív, szignál-közvetített természetét igazolja. Ahhoz, hogy valamelyik fehérje bejuthasson a sejtmagba, nukleáris lokalizációs szignállal (NLS) kell rendelkeznie. Ezek főleg bázikus aminosavakból álló szekvenciák, melyek lehetnek egytagúak, mint amilyen a simian virus 40 (SV40) T-antigénjének klasszikus NLS szekvenciája (PKKKRKV), vagy kéttagúak ahol két erősen bázikus aminosav csoportot 10-12 aminosav hosszú szakasz választ el egymástól (Christophe és mtsai., 2000).

A sejtmagi transzport receptor molekulái az Importinok (Imp), vagy más néven a Karioferinek (Kap). Az első receptor molekula, amit ebben a transzport folyamatban azonosítottak az Importin- α (Imp- α) volt (Görlich és mtsai., 1994). Ezután szinte egyidőben több független laboratóriumban azonosították a következő receptormolekulát, az Importin- β 1-et (Imp- β 1), amit sztöchiometrikus arányban tisztítottak az Imp- α -val (Görlich és mtsai., 1995; Imamoto és mtsai., 1995; Radu és mtsai., 1995). Az NLS-függő nukleáris import első lépéseként az Imp- α /Imp- β 1 heterodimer a citoplazmában megkötöti az NLS szekvenciát tartalmazó célfehérjét (1. ábra). Az Imp- α az N-terminálisán levő Imp- β -kötő doménnel (IBB) először az Imp- β 1-hez kötődik (Görlich és mtsai., 1996a), és majd csak ezután lesz képes az NLS felismerésére és megkötésére. Az NLS/Imp- α /Imp- β 1 heterotrimer komplexet valójában az Imp- β 1 viszi át a sejtmagba több fenilalanin és glicin (FG)-gazdag nukleoporinnal kölcsönhatva (Görlich és mtsai., 1996b). Miután az import komplex a sejtmagba került, az Imp- β 1-hez közvetlenül RanGTP, a nukleáris transzport egyik fő irányító molekulája, kapcsolódik és ez az Imp- β 1 leválásához vezet (Rexach és Blobel, 1995; Görlich és mtsai., 1996c). Az Imp- α ezután már csak nagyon alacsony affinitással képes kötődni az NLS-hez, így a célfehérje felszabadul a nukleoplazmában (Kobe, 1999).

A nukleáris transzport folyamatának központi szabályzófehérjéje a Ras családba tartozó kis molekulású GTPáz, a Ran fehérje (1. ábra). A Ran, hasonlóan a többi GTPáz fehérjéhez, GTP- és GDP-kötött formákban létezik. A sejtmagban főleg GTP-kötött, míg a citoplazmában főleg GDP-kötött formában van jelen. Ezért az asszimetriáért a Ran regulátorainak asszimetrikus eloszlása a

felelős. Az RCC1 fehérje, a Ran GDP-GTP cserélő faktora, egy kromatinhoz kötött sejtmagi fehérje (Nemergut és mtsai., 2001), ami állandóan magas RanGTP koncentrációt tart fenn az interfázisos sejtek kromoszómái körül (Bischoff és Ponstingl, 1991). A Ran fehérjének önmagában csak nagyon alacsony GTPáz aktivitása van. Azonban a NPK-ek citoplazmatikus fonalain lokalizált fehérjék, mint amilyenek a Ran-kötő fehérje 1 és 2 (RanBP1 és 2) illetve a Ran GTPáz aktiváló fehérje a RanGAP1, több ezerszeresére képesek növelni a Ran fehérje GTPáz aktivitását (Bischoff és mtsai., 1994). Így ezek a fehérjék egy állandóan magas RanGDP koncentrációt tartanak fenn a citoplazmában. A fentiekben leírt módon létrejött RanGTP koncentráció grádiens (legmagasabb RanGTP koncentrációval a sejtmagban és legalacsonyabbal a citoplazmában) megszabja nemcsak a sejtmagi import de a sejtmagi export irányát is (lásd az alábbiakban).



1. ábra. Az Importin- α fehérje transzport ciklusának sematikus ábrája (Görllich, 1998). (1) Az NLS-függő sejtmagi import kezdeti lépéseként az Imp- α /Imp- β heterodimer megkötí a célfehérje NLS szekvenciáját, majd a heterotrimer az Imp- β fehérjén keresztül a NPK-ek citoplazmatikus fonalaihoz kapcsolódik (2) és bejut a sejtmagba (3). A magas sejtmagi RanGTP koncentráció az Imp- β leválásához vezet (4) és ennek következtében az Imp- α elengedi a célfehérjét (5). Az Imp- α fehérje reciklizációját a CAS fehérje RanGTP-kötött formája közvetíti (6,7). A RanGTP/CAS/Imp- α heterotrimer komplexben levő RanGTP RanGDP-vé hidrolizál (8) ami az export komplex

széteséséhez vezet (8,9). A citoplazmába visszakerült Imp- α és Imp- β fehérjék ezután egy újabb import ciklusban vehetnek részt (10).

Az NLS/Imp- α /Imp- β 1 heterotrimer komplexet a sejtmagban az Imp- β 1-hez kapcsolódó RanGTP felbontja (1. ábra). Az NLS-hordozó célfehérje felszabadulása után mind a két receptormolekula reciklizálódik a citoplazmába, hogy egy újabb import ciklusban vehessenek részt. Az Importinok reciklizációja azonban eltérő módon történik. Az Imp- β 1 RanGTP kötött formában önmaga is képes visszajutni a citoplazmába, de az Imp- α egy speciális nukleáris export receptort igényel. Ez a receptor a CAS fehérje, ami valójában egy Imp- β homológ, és RanGTP kötött formában képes megkötni illetve kivinni az Imp- α fehérjét a citoplazmába (Kutay és mtsai., 1997). A NPK-ek citoplazmás fonalain helyet foglaló RanBP1 és 2 valamint a RanGAP1 fehérjék megkötik a reciklizált receptorkomplexeket és aktiválják a Ran GTP hidrolízisét. Így, a GDP-kötött Ran a továbbiakban már nem képes sem az Imp- β 1-hez sem pedig a CAS fehérjéhez kötődni, aminek következtében mind az Imp- β 1 mind az Imp- α felszabadul a citoplazmába és egy újabb nukleáris import ciklust közvetíthet. Ez volt az Importinok szerepéről és a klasszikus NLS által közvetített nukleáris importról alkotott első elképzelés (1. ábra) (Görlich, 1998).

A további kutatások azonban hamar rávilágítottak arra is, hogy a nukleáris transzport, beleértve az importot és az exportot, egy ennél jóval összetettebb és bonyolultabb folyamat. Tisztázódott, hogy az Imp α /Imp β 1 heterodimer komplex adaptor molekulája az Imp- α csak a klasszikus, lizinben gazdag bázikus aminosavakból álló egytagú vagy kéttagú NLS szekvenciákat köt meg. Ugyanakkor az argin gazdag bázikus NLS szekvenciákat az Imp- β fehérje az adaptor Imp- α nélkül is képes megkötni. Ennek egyik jól jellemzett példája a humán I-sejtes leukémia vírus 1 (HTLV-1) illetve a humán immunodeficiencia vírus 1 (HIV-1) Rex illetve Rev fehérjéin található hosszú NLS szekvenciák, melyeket az Imp- β 1 egyedül köt meg és szállít a sejtmagba (Kubota és mtsai., 1989; Palmeri és Malim, 1999). Egy újabb, csak Imp- β homológok által felismert és megkötött NLS szekvenciát fedeztek fel és részletesen jellemeztek. Ez a glicinben gazdag M9 nevű szekvencia, amely a klasszikus NLS-től teljes mértékben eltérően, bázikus aminosavakat nem tartalmaz (Siomi és Dreyfuss, 1995). Ilyen szekvenciát már több heterogén nukleáris ribonukleoproteinben (hnRNP) találtak, amelyekről

bebizonyosodott, hogy egy új transzport receptor, az Imp- β homológ Transzportin fehérje ismer fel (Pollard és mtsai., 1996; Fridell és mtsai., 1997).

Sok életfontosságú fehérjét nem csak egy, hanem több Imp- β együttes transzport mechanizmusa szállítja a sejtmagba. A hiszton H1 fehérjét például kettő (Jäkel és mtsai., 1999), míg a hiszton H2A és a H2B fehérjéket négy Imp- β homológ egyfajta molekuláris hálózata importálja a sejtmagba (Mosammaparast és mtsai., 2001). Ezen kívül több riboszómális fehérjéről (rpL23a, rpS7 és rpL5) egyértelműen kimutatták, hogy négy különböző Imp- β sokkal hatékonyabban viszi be azokat együtt a sejtmagba, mint külön-külön (Jäkel és Görlich, 1998). Az általános észrevétel tehát az volt, hogy a fentiekben részletezett Imp α /Imp β 1 heterodimer a nukleáris importnak csak egy kisebb és valószínűleg speciálisabb részét végzi. Míg az olyan fehérjék, amelyek konstitutív módon importálódnak illetve ingáznak a citoplazma és a sejtmag között, Imp- β molekulák által közvetített úton jutnak be.

Az Imp- β homológ fehérjék között nemcsak a nukleáris importot, de az exportot közvetítő fehérjék is vannak. Számos fehérje, riboszómális alegység illetve RNS folyamatosan kikerül a sejtmagból, ami a nukleáris importhoz hasonlóan, egy ugyancsak aktív, szignál- és receptor-közvetített folyamat. Az ezidáig legjobban jellemzett nukleáris export szignál (NES) a HIV-1 Rev fehérjéjének leucinban gazdag NES szekvenciája (Fischer és mtsai., 1995). Ezen NES szekvenciák specifikus receptor molekulája az Imp- β homológ Crm1 fehérje (Fernerod és mtsai., 1997). Ezidáig már több ilyen jellegű export receptort írtak le (Lipowsky és mtsai., 2000; Kutay és mtsai., 1998), melyek mindegyikére érvényes, hogy csak RanGTP kötött módon képesek ellátni a célfehérjék exportját. A citoplazmába érve, a fentiekben már részletesen leírt módon a Ran GTP GDP-vé hidrolizál, ami a célfehérjék felszabadulásához vezet. Ugyan leírtak már olyan esetet is, ahol az export receptor nem egy Imp- β , hanem egy Imp- α fehérje volt (Görlich és mtsai., 1996b), azonban ez inkább kivétel számba menő eset, mint az Imp- α fehérjék egy újabb általános funkciója.

Végül vannak olyan Imp- β homológ fehérjék is, melyek egyben import és export receptorok is. Ilyen például az Importin13 nevű fehérje, amely a citoplazmában megköti és importálja az emberi Mago Nashi fehérjét. A sejtmagba érve, a magas RanGTP koncentráció felbontja az import komplexet. A RanGTP-

kötött Importin13 ezután specifikusan megköti a transzlációs rendszer egyik komponensét, az eukarióta transzlációs iniciációs faktor 1A fehérjét (eIF1A) és majd azt exportálja. A citoplazmába érve az Importin13 fehérjén levő RanGTP RanGDP-vé hidrolizál, ami az export komplex széteséséhez vezet és így az eIF1A fehérje a citoplazmában felszabadul (Mingot és mtsai., 2001).

Ezenkívül léteznek olyan alternatív nukleáris transzportfolyamatok is, amelyek Importin- illetve Ran-függetlenek. Ilyen például az U1A és U2B” szplájszoszóma fehérjék importja (Hetzer és Mattaj, 2000), az Importin fehérjékkel rokon β -catenin importja (Fagotto és mtsai., 1998), illetve az mRNS-ek exportja (Nakielny és Dreyfuss, 1999).

Az utóbbi néhány évben az Importin fehérjék két új, a sejtmagi transzporttól eltérő funkcióját is leírták, nevezetesen a metazoa sejtek mikrotubulusainak képződésében illetve a magmembránok összeszerelődésében betöltött szerepüket. A metazoa sejtek interfázisból a mitózisba vagy a meózisba történő átmenete során a mikrotubuláris hálózat és a magmembrán szerkezete drámaian megváltozik. Az interfázisos mikrotubulus hálózat helyén kétpólusú osztódási orsó képződik (Hyman és Karsenti, 1998). A metafázis során a magmembrán is lebomlik (Burke és Ellenberg, 2002), lehetővé téve az orsó mikrotubulusai és a kromoszómák kinetochorjai közötti kölcsönhatást.

Több csoport szinte egyidőben írta le, hogy a sejtmagi transzport fő szabályzó molekulája a Ran, kulcsfontosságú szerepet játszik a mikrotubulusok polimerizációjának szabályozásában is. Kísérleteikben sejtmagmentes, mitótikus *Xenopus* petekivonatot használtak. Megállapították, hogy a petekivonat RanGTP szintjének csökkentése, illetve az olyan mutáns Ran fehérje hozzáadása ami csak GDP-kötött formában létezik (T24N), a mikrotubulusok polimerizációjának gátlásához vezet (Carazo-Salas és mtsai., 1999; Kalab és mtsai., 1999; Ohba és mtsai., 1999; Wilde és Zheng, 1999). Ez azt jelenti, hogy a mikrotubulusok polimerizációjához a Ran fehérje GTP-kötött formája szükséges. Újabban az is kiderült, hogy a RanGTP a mikrotubulus polimerizáció szabályozását, hasonlóan a nukleáris transzporthoz, Importin fehérjéken keresztül érvényesíti. Az Imp- α és - β fehérjék megkötik és inaktív állapotban tartják az NLS tartalmú mikrotubulus-kötő TPX2 és NuMA fehérjéket (Nachury és mtsai., 2001; Gruss és mtsai., 2001; Wiese és mtsai., 2001). A magmembrán lebomlása után, ezek az inhibítor komplexek szabadon megközelíthetik a kromoszómákat, ahol a kromoszómákon lokalizált

RCC1 fehérje egy állandóan magas RanGTP koncentrációt tart fent. A RanGTP a fentiekben már részletesen leírt módon felbontja az TPX2/Imp- α /Imp- β vagy NuMA heterotrimer komplexeket, és így a felszabaduló TPX2 és NuMA fehérjék megfelelő időben és helyen aktiválják a kromatin körüli mikrotubulusok polimerizációját. Ezekből a kísérletekből egyértelműen kiderül, hogy az Importin fehérjék nemcsak a sejtmagi transzportban vesznek részt, de aktív szerepük lehet a mikrotubulusok polimerizációjának szabályozásában is.

A mitózis végén a mitotikus orsó lebomlik a mikrotubulusok visszatérnek az interfázisra jellemző állapotukba és az egyes utódsejtek kromatinja körül újraképződik a magmembrán. Habár a magmembrán újrászerveződésének pontos molekuláris folyamata ezidáig ismeretlen, annyi bizonyos, hogy ezt a folyamatot is a RanGTP fehérje szabályozza. Több *in vitro* és *in vivo* eredmény azt látszik alátámasztani, hogy a RanGTP legalább részben az Imp- α és Imp- β fehérjéken keresztül szabályozza a sejtmagmembrán újrászerveződését (Timinszky és mtsai., 2002; Zhang és mtsai., 2002; Bamba és mtsai., 2002; Askjaer és mtsai., 2002; Geles és mtsai., 2002).

1.2. Az Importin fehérjék molekuláris kölcsönhatásainak alapja

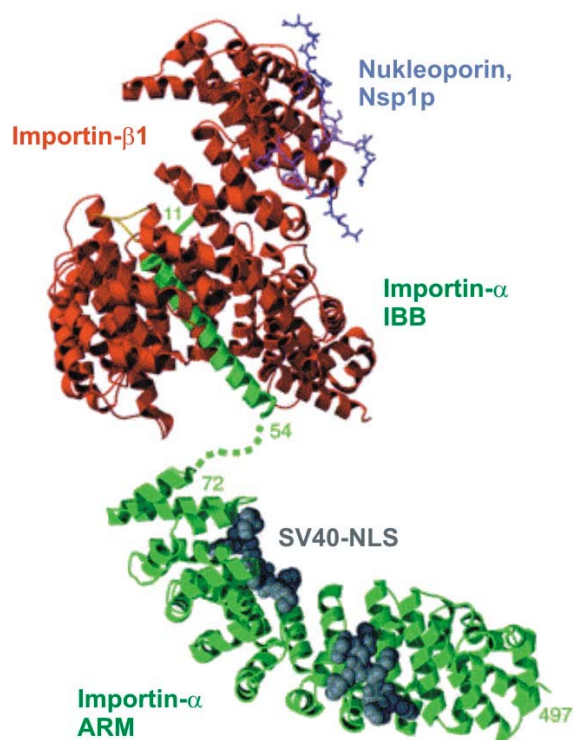
Míg az élesztőben (*Saccharomyces cerevisiae*) csak egyetlen Imp- α -t kódoló gén (Srp1) van, addig a gerinces élőlényekben már több, akár nyolc Imp- α -t kódoló gén is megtalálható. Filogenetikai vizsgálatok megállapították, hogy az *imp- α* gének túlnyomó többsége három alcsaládba, az $\alpha 1$, $\alpha 2$ és az $\alpha 3$ alcsaládba sorolhatóak (Köhler és mtsai., 1997; Köhler és mtsai., 1999; Malik és mtsai., 1997; Mason és mtsai., 2002). Érdekes, hogy az élesztőknek és a növényeknek csak az $\alpha 1$ alcsaládba tartozó képviselőjük van, míg a többi többsejtű élőlény mind a három alcsalád legalább egy képviselőjével rendelkezik. Az emberi genom például négy *importin- $\alpha 1$* , egy *importin- $\alpha 2$* és három *importin- $\alpha 3$* homológgal bír (Venter és mtsai., 2001).

Az még nem teljesen világos, hogy miért alakult ki több Imp- α -t kódoló gén, de mivel ez főleg a többsejtűekre jellemző tulajdonság, feltételezhető, hogy szerepük lehet a szövetek specializálódásában illetve az egyedfejlődésben. Ezzel egybehangzóan, több munka arról számolt be, hogy az *imp- $\alpha 1$* , *- $\alpha 2$* és az *- $\alpha 3$* alcsaládba tartozó gének szövet-specifikus kifejeződési mintázatot mutatnak

(Prieve és mtsai., 1996; Nadler és mtsai., 1997; Tsuji és mtsai., 1997; Kamei et al, 1999; Köhler és mtsai., 1999). Az is nyilvánvaló, hogy az egyes Imp- α fehérjék többféle NLS szekvenciát képesek felismerni és megkötni, amiben meglehetősen nagy mértékű átfedést mutatnak egymással (Nadler és mtsai., 1997; Miyamoto és mtsai., 1997; Prieve és mtsai., 1998). Azonban szinte minden egyes Imp- α -nak létezik olyan preferált szubsztrátja is, amelynek kizárólagos receptora, és amelyet más Imp- α nem, vagy csak nagyon kis affinitással köt meg. Például csak az Imp- α 3 képes megkötni az RCC1 fehérjét (Köhler és mtsai., 1999) és a RanBP3 fehérjét (Welch és mtsai., 1999), míg a Stat 1 transzkripciósfaktort csak az Imp- α 1 köti (Sekimoto és mtsai., 1997).

Az Imp- α és Imp- β fehérjék egymáshoz igen hasonló, rokon eredetű ismétlődő szekvenciákból épülnek fel (Andrade és mtsai., 2001). Az Imp- α fehérje legnagyobb részét kitevő ARM nevű ismétlődést először a *Drosophila* szelvény-polaritási géntermékében, az Armadillo fehérjében írták le (Riggelman és mtsai., 1989). Jellemzője, hogy egyetlen ARM ismétlődést három hélix alkot, a H1, H2 és a H3, melyek minden esetben úgy szerveződnek, hogy a H3 hélix a fehérje belső, igen konzervált, konkáv felszínét alkotja (Huber és mtsai., 1997; Conti és mtsai., 1998). Ez az Imp- α fehérje ligandum-kötő felszíne. Az Imp- β fehérjékre jellemző HEAT ismétlődést először négy, egymástól igen eltérő fehérjében írták le. Ezt az ismétlődést, szemben a rokon eredetű ARM-al, csak két hélix (az A és B hélix) alkotja (Andrade és Bork, 1995).

Az Imp- α fehérje szerkezetét tekintve három fő részre osztható, az N- és C-terminális hidrofób, valamint a középső 8-10 ARM ismétlődésből álló hidrophil részre. Az ARM ismétlődéseken két csoportba osztva találhatóak az NLS-kötésért felelős oldalláncok (2. ábra). Az N-terminálisához közelebb eső 2.-4. ARM ismétlődések H3 hélicei alakítják ki a nagy NLS-kötő domaint, míg a C-terminálisához közelebb eső 6.-7. ARM ismétlődések ugyanazon hélicei a kis NLS-kötő domaint. Az NLS kötést közvetlenül a konzervált WxxxN motívum végzi. Az aszparagin (N) oldalláncok hidrogén-hid kölcsönhatást, míg a triptofán (W) oldalláncok hidrofób és van der Waals kölcsönhatást létesítenek az NLS bázikus aminosavakkal (Conti és mtsai., 1998; Conti és Kuriyan, 2000; Fontes és mtsai., 2000; Chook és Blobel, 2001).



2. ábra. Az Importin- α fehérje NLS kötése (Chook és Blobel, 2001). Az Imp- α fehérje (zöld) N-terminálisának mintegy 40 aminosav hosszúságú szakaszát (IBB) az Imp- β fehérje (piros) specifikusan megköti. Ez teszi lehetővé azt, hogy az ARM ismétlődésekben helyet foglaló kis és nagy NLS-kötő oldalláncok a célfehérje NLS szekvenciáját (szürke) felismerjék és megkössék.

Az Imp- α és annak szubsztrát fehérjei közötti kölcsönhatást az Imp- β 1 fehérje azáltal képes szabályozni, hogy az Imp- α /Imp- β 1 heterodimer komplexben az Imp- α NLS-kötését szignifikánsan megnöveli (Fanara és mtsai., 2000). Az Imp- α N-terminálisán levő mintegy 40, főleg bázikus aminosav, az Imp- β 1 savas, ligandum-kötő felszínéhez kötődik (2. ábra) (Görlich és mtsai., 1996a; Weise és mtsai., 1996; Precipalle és mtsai., 1997; Cingolani és mtsai., 1999). Ez az úgynevezett Importin-beta kötő domain, vagy másnéven az IBB (Importin- β -binding) domén. Amikor az Imp- β 1 megköti az Imp- α IBB doménjét, azt olyan szerkezeti állapotba hozza, hogy a szubsztrát fehérjék NLS szekvenciáját képes lesz felismerni és megkötni (2. ábra). Az Imp- β 1 hiányában a meglehetősen hajlékony N-terminális szakasz visszahajlik a saját nagy NLS-kötő doménje fölé és a receptor fehérjét auto-inhibíciós állapotba hozza (Kobe, 1999; Fanara és mtsai., 2000). Moroiianu és munkatársai mutatták ki először azt, hogy az Imp- α N-terminális szakaszán levő endogén NLS szekvenciáját a saját nagy NLS-kötő doménje, Imp- β 1 távollétében, képes megkötni (Moroiianu és mtsai., 1996). Ilyen

állapotban az Imp- α általában nem, vagy csak nagyon kis affinitással köti a szubsztrát fehérjét. Ezért az is érthető, hogy miért esik szét az NLS/Imp- α /Imp- β 1 heterotrimer komplex akkor, ha az a sejtmagba ér, illetve ha az a mitózis során a kromoszómák közelébe kerül, és a RanGTP-vel találkozik. Ekkor ugyanis a RanGTP hozzákötődik az Imp- β 1-hez és annak leválását idézi elő. Így az Imp- α flexibilis N-terminálisán levő saját NLS szekvenciája leszorítja a szubsztrát fehérje NLS-ét, ami annak felszabadulásához vezet (Kobe, 1999).

A *Drosophila melanogaster* genomban három *importin- α* -t kódoló gén található, melyek mindegyike egy-egy képviselője a három alcsalád valamelyikének (Török, és mtsai., 1995; Kussel és Frasch, 1995; Dockendorff és mtsai., 1999; Máthé és mtsai., 2000; Adams és mtsai., 2000; Mason és mtsai., 2002; Giarre és mtsai., 2002). Ezen felül a *Drosophila*-ban egy negyedik, nem-konvencionális *importin- α* kódoló gén is található (fehérjeazonosító száma g7295403), amelyről azonban nem lehet biztosan tudni, hogy valójában képes-e Importin- α fehérjeként működni és NLS szekvenciát megkötni vagy sem. A laboratóriumunk a *Drosophila* Importin- α 2 fehérjének a petefejlődésben betöltött speciális szerepének vizsgálatával foglalkozik, ezért fontosnak tartom az eredményeink tárgyalása előtt röviden ismertetni a *Drosophila* petefejlődésének legfontosabb lépéseit (Saffman és Lasko, 1999; Matova és Cooley, 2001).

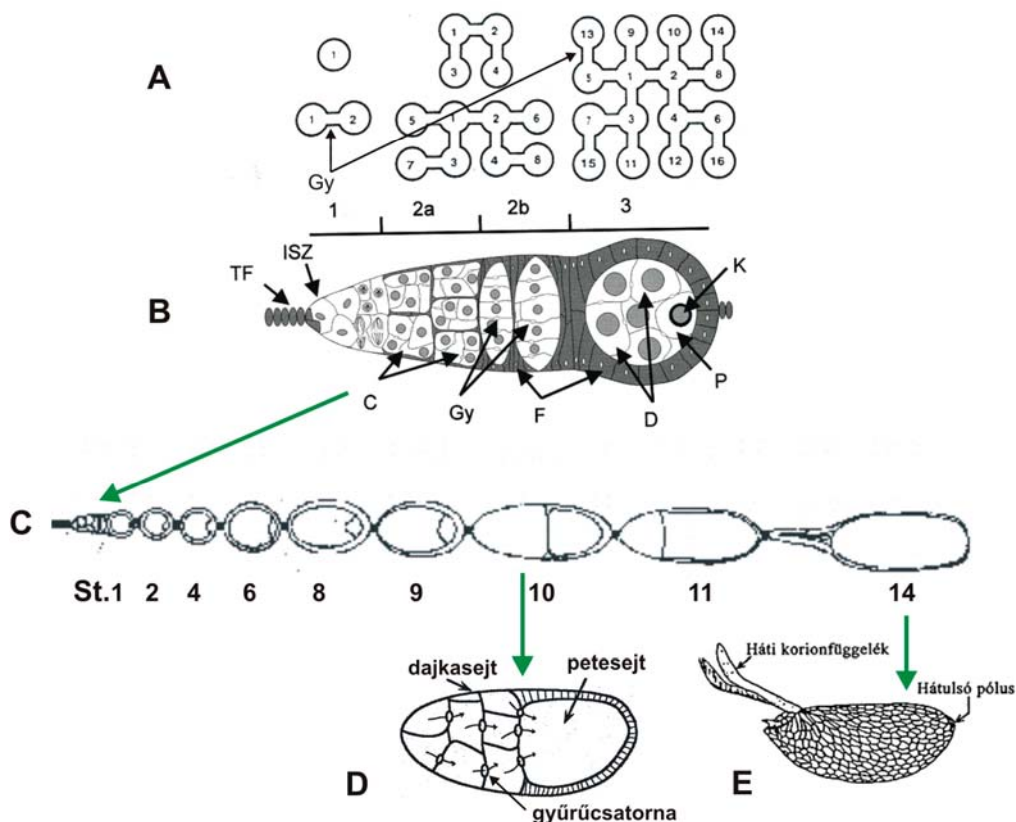
1.3. A *Drosophila melanogaster* petefejlődésének rövid áttekintése

A *Drosophila* petefészek egy olyan páros szerv, amit egyenként 14-18, a petefejlődés funkcionális egységének tekinthető petecső alkot. Minden egyes petecső csúcsi részén található az őscsírasejteket és a testi őssejteket magába foglaló germárium (3. ábra) (Wieschaus és Szabad, 1979; Lin és Spradling, 1993; Deng és Lin, 2001). A germárium három részre tagolható: az 1. régióra, amelyben a két-három mitótikusan aktív őscsírasejt található, a 2. régióra, ahol a csíravonal eredetű ciszták differenciálódnak és ezenkívül a testi őssejtek találhatóak, valamint a 3. régióra, ahol az újonnan kialakult petekamrák foglalnak helyet (3. ábra B).

A *Drosophila* petefejlődése –a többi rovaréhoz és más magasabbrendű élőlényhez hasonlóan– az őscsírasejtek osztódásával kezdődik. Ezt a folyamatot két jelrendszer is szabályozza. Az egyik a germárium csúcsi részén elhelyezkedő terminális filamentum testi sejtjeiből származó külső jel, míg a másik az

őscsírasejtek belső faktoraiból adódó jel (Deng és Lin, 2001). A belső kontrol fontos részét képezi az úgynevezett spektroszóma, ami vezikulumokban, riboszómákban, mitokondriumokban valamint citoszkeletális fehérjékben gazdag citoplazmatikus sejtszerv (Lin és mtsai., 1994). A spektroszóma az őscsírasejtekben mindig asszimetrikusan helyezkedik el azok apikális részén a terminális filamentumok közvetlen szomszédságában. A spektroszóma kulcsfontosságú szerepet tölt be a mitótikus orsó egyik pólusának kihorgonyzásában, és így megszabja az első mitótikus osztódás irányát. Ezen osztódás során az osztódási betüremkedés még csak időlegesen stabilizálódik. Az asszimetrikus osztódás végeredménye a spektroszómát hordozó és a terminális filamentumhoz közelebb eső leány őscsírasejt, és a távolabbi cisztoblaszt (Lin és Spradling, 1997; Deng és Lin, 1997).

Miután a cisztoblaszt kialakult, az további négy aszimetrikus osztódáson megy keresztül, amit részleges citokinézis követ. Ennek eredményeként egy 16-sejtes csíravonal eredetű ciszta alakul ki (3. ábra A). A ciszta sejtjei az osztódási betüremkedésből származó stabilizált csatornákon, az úgynevezett gyűrűcsatornákon keresztül citoplazmatikus kapcsolatban maradnak egymással (Robinson és Cooley, 1996). A ciszta két sejtje mindig 4, kettő sejtje 3, négy sejtje 2 és nyolc sejtje csupán 1 gyűrűcsatornát tartalmaz. A ciszta fontos citoplazmatikus sejtszerve a spektroszóma eredetű fuzóma (Knowles és Cooley, 1994). Összetételüket és funkciójukat tekintve is meglehetősen nagy közöttük a hasonlóság (de Cuevas és mtsai., 1997; Deng és Lin, 2001). Azonban a fuzóma azon kívül, hogy az osztódások során a mitótikus orsók egyik pólusának kihorgonyozásával befolyásolja a további osztódások asszimetriáját valamint azok szinkronitását, aktív szerepet játszik az osztódási betüremkedések stabilizálásában is (Lin és Spradling, 1995; Lin és Spradling, 1997; Deng és Lin, 1997). Minden egyes osztódás során, az osztódási betüremkedéseket újonnan képződött fuzóma járja át, ami utána egybeolvad a már előzőleg kialakult és a többi gyűrűcsatornát átjáró fuzóma anyaggal (de Cuevas és Spradling, 1998). Ezáltal egy erősen elágazó intercelluláris organellum jön létre. A mitózis végén, mikor a 16-sejtes csíravonal eredetű ciszta kialakul, a fuzóma teljes mértékben lebomlik. Így, a stabilizált osztódási betüremkedések a ciszta egyes sejtjei között zajló információcserének illetve anyagtranszportnak közvetítőcsatornáivá válhatnak.



3. ábra. A petefejlődés áttekintése. (A) A cisztoblaszt négy nem-teljes mitotikus osztódásának eredményeként létrejön a gyűrűcsatornákon (Gy) keresztül összekapcsolt 16-sejtes csíravonal ciszt. (B) A germárium sematikus rajza. TF=terminális filament sejtei, ISZ=ivarsejt eredetű szemsejt, vagy másnéven az őscsírasejt, C=ciszták, Gy=gyűrűcsatornák, F=folikuláris sejtek, D=dajkasejtek, P=petesejt, K=karioszóma. Az 1, 2a, 2b és a 3 a germárium egyes régióit jelöli. Szürke színűek a testi eredetű sejtek, míg fehér színűek az ivarsejt eredetű sejtek. (C) A petefejlődés egyes stádiumainak (St.) sematikus rajza. (D) Egy 10. stádiumban levő petekamra. (E) Egy érett *Drosophila* pete rajza.

Miután a ciszta kialakult és az a germárium 3. régiója irányában mozdult, egy testi sejtekből álló úgynevezett follikuláris sejtréteg veszi körül, kialakítva ezzel az első stádiumú petekamrát. Időközben a ciszta két, egyenként 4-4 gyűrűcsatornát hordozó sejtje közül az egyikben aktiválódik a mikrotubulus organizáló központ (MTOC), ami egy polarizált mikrotubulus hálózatot hoz létre a gyűrűcsatornákon keresztül, összekapcsolva a ciszta mind a 16 sejtjét (Theurkauf és mtsai., 1992). Ezen mikrotubulusok mentén a kinezin és a dinein motorfehérjék idővel számos mRNS-el és fehérjével látják el a MTOC-ot hordozó sejtet, meghatározva, hogy belőle petesejt, míg a többi sejtéből dajkasejt differenciálódjék (Deng és Lin, 2001). A dajkasejtek magja politenizálódik és bennük erős transzkripció indul el azzal a céllal, hogy a transzkripcionálisan szinte teljesen inaktiválódott petesejtet táplálják. Miután a petekamra kialakult, a petesejt annak

poszteriorális részére kerül, meghatározva ezzel a petekamra és egyben az elkövetkezendő embrió anterorális-poszteriorális tengelyét (Deng és Bownes, 1998; van Eeden és St Johnston, 1999). A polarizált petekamrák azután elhagyják a germáriumot, és a petecső poszteriorális részén, az úgynevezett vitelláriumban fejlődnek tovább 14 jól meghatározott morfológiai stádiumon keresztül (3. ábra C).

A petesejt mérete a 2. stádiumtól egészen a 6. stádiumig azonos marad a dajkasejtek méretével, azonban a 7. stádiumtól kezdve jelentős méretgyarapodásnak indul. Ez részben a zsírtest és a follikuláris sejtek által termelt nagymennyiségű szik (yolk) fehérjék endocitózisával, részben pedig a dajkasejtekből a petesejtbe irányuló anyag transzporttal magyarázható. A 10. stádiumban a petesejt a petekamra egész poszteriorális felét betölti (3. ábra D). Számos, a leendő embrió szimmetriatengelyeit meghatározó morfogén molekula ebben a stádiumban már asszimmetrikus elhelyezkedésű (Deng és Bownes, 1998; van Eeden és St Johnston, 1999). A 10. stádium végétől kezdődően a dajkasejtek magmembránja permeabilizálódik és azok teljes citoplazmája a gyűrűcsatornákon keresztül átkerül a petesejtbe, egy érett petét eredményezve (3. ábra E) (Mahajan-Miklos és Cooley, 1994). Az egyes petecsövek a fejlődés különböző stádiumaiban levő petekamrák lineáris sorozatát foglalják magukba.

A 14. stádiumban elkezdődik a meiotikus orsó képződése és a petesejt a meiózis I metafázisában várja a megtermékenyítést (Carpenter, 1975). A megtermékenyítés után a petesejt befejezi a meiózist. A négy anyai eredetű haploid sejtmag közül háromból sarki test míg egyből a női ősmag alakul ki.

1.4. A *Drosophila* petekamráinak gyűrűcsatornái

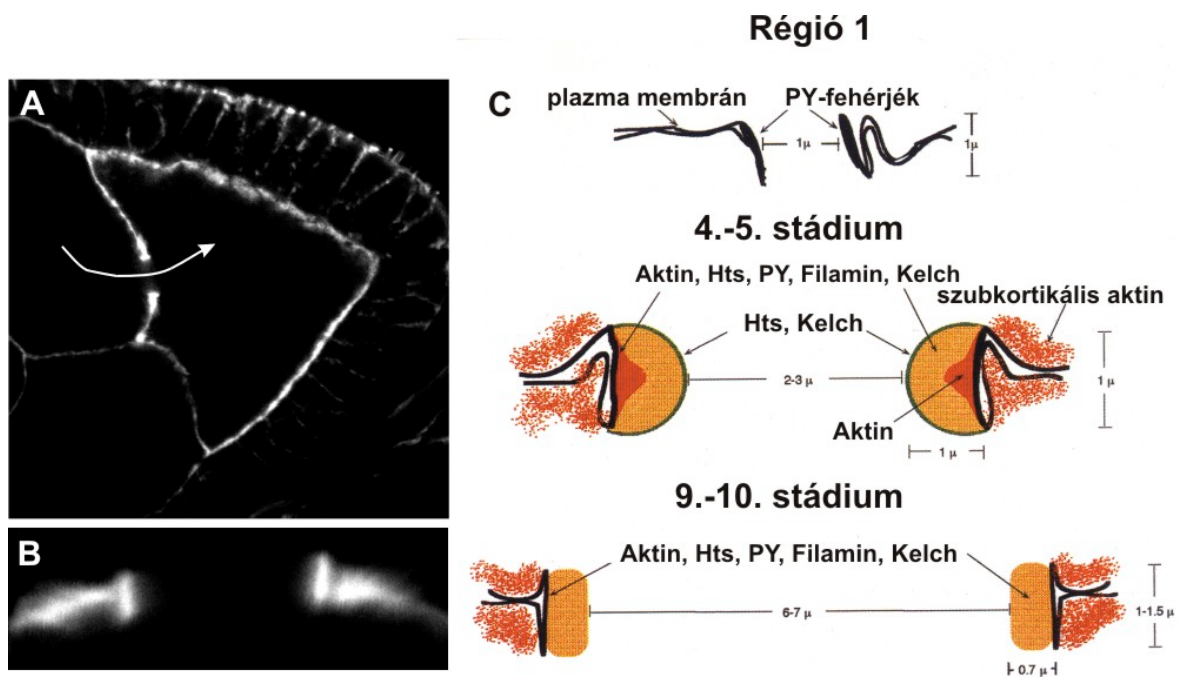
A dajkasejtekben szintetizált mRNS-ek és fehérjék valamint azok bizonyos citoplazmatikus organelumai (pl. mitokondriumok, riboszómák) stabil sejtek közötti csatornákon az úgynevezett gyűrűcsatornákon keresztül szállítódnak a fejlődő petesejtbe (4. ábra). A gyűrűcsatornák az egyes mitotikus osztódások során stabilizálódott osztódási betüremkedésekből alakulnak ki, így azok nemcsak a csíravonal eredetű sejtek sajátosságai lehetnek, de testi sejtekben is előfordulhatnak. A korai elektronmikroszkópos tanulmányok kisebb méretű gyűrűcsatornákat írtak le különböző rovarfajokban (Van Ruiten és Sprey, 1974; Meola és mtsai., 1977; Ramamurty és Engels, 1977; Fiil, 1978), így a *Drosophila*

(Poodry és Schneiderman, 1970; Giorgi, 1978) imaginális diszkuszaiban, a petekamrák follikuláris sejtjeiben illetve átmenetileg a sejtes blasztoderma embrionális sejtjeiben.

A legtöbb élőlény hím illetve női ivarsejtjei fejlődésük bizonyos szakaszát közös eredetű cisztákban töltik (Gondos, 1973; Robinson és Cooley, 1996). A hímivarsejtek fejlődése során a ciszták egyes sejtjeit összekapcsoló gyűrűcsatornák az osztódások szinkronizálásának megtartása mellett az eltérő haploid genommal rendelkező utódsejtek közötti egyenletes RNS és fehérje eloszlásban is fontos szerepet játszanak. A petesejt fejlődése során a gyűrűcsatornák lehetővé teszik a pete feltöltését olyan anyagokkal, melyek az embrió fejlődéséhez és a megfelelő szimmetria tengelyek kialakításához szükségesek (Rongo és Lehmann, 1996; Van Eeden és St Johnston, 1999; Deng és Bownes, 1998).

A gyűrűcsatornák eredetét a plazmamembrán osztódási betüremkedését okozó, az összehúzódnáshoz képes kontrakciós gyűrűre vezetik vissza (4. ábra C) (Schroeder és mtsai., 1990; Satterwhite és Pollard, 1992). Az összes állati sejt osztódását kísérő citokinézist ez az aktin és miozin II alapú gyűrű végzi. Ezidáig számos fehérjét azonosítottak a *Drosophila* kontrakciós gyűrűjében. Ilyen az aktin-kötő Anillin (Field és Alberts, 1995), a Peanut (Neufeld és Rubin, 1994) illetve az élesztő Septin homológ Sep1 és Sep2 fehérjék (Sanders és Field, 1994; Longtine és mtsai., 1996). Ezeket a fehérjéket az összes ezidáig vizsgált osztódási betüremkedésekben megfigyelték (Neufeld és Rubin, 1994; Fares és mtsai., 1995). Azonban az osztódási betüremkedés stabilizálása során ezen fehérjék egy része elvész, és helyüket más, a gyűrűcsatorna kialakításában fontos szerepet játszó fehérjék veszik át.

Az első fehérjék amelyek az ovárium újonnan kialakult gyűrűcsatornáiban megjelennek, a kontrakciós gyűrűből visszamaradt Anillin (de Cuevas és Spradling, 1998), a kinezin-szerű Pavarotti (Pav-KLP) (Minestrini és mtsai., 2002), valamint az Orbit/Mast fehérje (Máthé és mtsai., 2003). Az Anillin az őscsírasejt és a cisztoblaszt közötti átmeneti gyűrűcsatornában, illetve rövid ideig a fejlődő ciszta valamennyi gyűrűcsatornájában megfigyelhető. Mennyisége az 1. stádiumban lépő petekamrák gyűrűcsatornáiban drámaian lecsökken és a 2. stádiumra már csak nagyon gyengén mutatható ki (Field és Alberts, 1995; de Cuevas és Spradling, 1998).



4. ábra. A gyűrűcsatornák kialakulása és szerkezete. (A) A petefejlődés 9. stádiumában levő petekamra aktin sejtvezát megfestettük. Jól látható a dajkasejtek és a petesejt közötti egyik gyűrűcsatorna keresztmetszeti képe. Ezen keresztül történik a dajkasejtekből a petesejtbe irányuló anyag transzport. (B) Ugyanezen gyűrűcsatorna kinagyított képe látható (A és B saját felvétel). (C) Az osztódási betüremkedések stabilizálódásával alakulnak ki a gyűrűcsatornák. Különböző fehérjék, a fejlődés jól meghatározott időpontjaiban felhalmozódnak az osztódási betüremkedés belső felszínén.

A korai elektronmikroszkópos vizsgálatok arról számoltak be, hogy a gyűrűcsatornák egy elektrodenz, a plazmamembránhoz kapcsolt külső szegélyből, illetve egy kevésbé elektrodenz belső szegélyből állnak (Koch és King, 1969; Mahowald, 1971). Ez a megfigyelés a gyűrűcsatornákat alkotó komponensek eltérő elrendeződésére utal. Az osztódási betüremkedés gyűrűcsatornává történő átalakulása a külső szegéllyel kezdődik. A legkorábbi immunhisztokémia segítségével végzett kísérletek is arról számolnak be, hogy a külső szegélyt bizonyos glükoproteinek alkotják (Koch és King, 1969). Újabban kiderült, hogy az egyik ilyen glükoprotein a citoplazmatikus membránvezikulákon is megtalálható Mucin-D fehérje (Krameroval és Kramerov, 1999). Ez a fehérje a germárium 1. régiójában a cisztoblaszt legelső osztódásai során jelenik meg az osztódási betüremkedésekben. Feltételezhetően szerepe lehet a kontrakciós gyűrű gyűrűcsatornává történő átalakulásában, illetve számos gyűrűcsatorna komponensnek a plazmamembránhoz történő kihorgonyzásában.

Miután a gyűrűcsatornák stabilizálódtak, számos más fehérje kezd bennük felhalmozódni, kialakítva egy olyan összetett gyűrűt, ami a fejlődés egyes stádiumai során méretnövekedésre is képes (4. ábra C). A következő fehérjék amelyek a gyűrűcsatornában megjelennek a foszfortirozin (PY) epitópokat tartalmazó fehérjék csoportja (Robinson és mtsai., 1994). A PY-epitópok már a harmadik mitotikus osztódás után megfigyelhetők a gyűrűcsatornák belső szegélyében, de jelenlétük csak a negyedik mitotikus osztódás végére válik szembetűnővé. A legtöbb PY-epitóp tartalmú fehérje az ugyancsak gyűrűcsatorna komponens Src64 és Tec29 tirozin kináz szubsztrátja (Roullet és mtsai., 1998; Guarnieri és mtsai., 1998; Dodson és mtsai., 1998; Cooley, 1998).

Miután a cisztoblaszt osztódása befejeződött és az a germárium 2. régiójába került, az F-aktin (Warn és mtsai., 1985; Theurkauf és mtsai., 1992; Robinson és mtsai., 1994), a Hu-li tai shao (Hts-RC, azaz a Hts fehérje gyűrűcsatornákra specifikus formája) (Yue és Spradling, 1992; Robinson és mtsai., 1994) és a *cheerio* gén által kódolt Filamin (Robinson és mtsai., 1997; Li és mtsai., 1999; Sokol és Cooley, 1999) fehérjék is megjelennek a stabilizált gyűrűcsatornában, egy kifejezett aktin-gazdag gyűrűt képezve (4. ábra). Mivel a *hts* és a *cheerio*¹ mutáns petekamrák gyűrűcsatornáiból az aktin-kötegek hiányoznak valószínűsíthető, hogy a Hts-RC (Yue és Spradling, 1992) és a Filamin (Robinson és mtsai., 1997) fehérjék közös funkciója lehet az aktin felhalmozása és annak stabilizálása a gyűrűcsatornában. A Filamin képes a gyűrűcsatornák aktin kötegeit különböző transzmembrán fehérjékkel összekapcsolni (Weihing és mtsai., 1985), így fontos szerepe van a gyűrűcsatornák aktin kötegeinek kihorgonyzásában a plazmamembránhoz (Sokol és Cooley, 1999). A germárium 3. régiójában a már kialakult 1. stádiumos petekamra gyűrűcsatornáiban utolsóként lokalizálódik a Kelch fehérje (Xue és Cooley, 1993; Robinson és mtsai., 1994). A Kelch fehérje nem szükséges a gyűrűcsatornák kialakulásához, viszont fontos szerepet játszik azok növekedésében valamint a belső szegély szerveződésében (Robinson és mtsai., 1994; Robinson és Cooley, 1997b; Robinson és Cooley, 1997c; Kelso és mtsai., 2002).

A gyűrűcsatornák dinamikus struktúrák, melyek az egyes stádiumok során növekedésre képesek (4. ábra C) (Robinson és mtsai., 1994; Tilney és mtsai., 1996a). A gyűrűcsatornák méretének növekedésével párhuzamosan a bipoláris

aktin filamentumok száma is növekszik (Tilney és mtsai., 1996b; Robinson és Cooley, 1997a), amelyek polimerizálását az ugyancsak gyűrűcsatorna komponens Arp2/3 fehérje komplex végzi (Hudson és Cooley, 2002; Zallen és mtsai., 2002). Az osztódási betüremkedés stabilizálódásának idején átmérőjük még csak 0.5 és 1 μm között van, 4. stádiumra már 4 μm míg végül a 11. stádiumban már 10 μm az átmérőjük. Így szemben a gap junction-nal (Paul, 1995), amin keresztül csak kis molekulák és az 1-2 kDa-nál kisebb fehérjék mehetnek át, a gyűrűcsatornákon méretüknél fogva sokkal nagyobb molekulák, sőt organelumok is áthaladhatnak.

2. CÉLKITŰZÉS

A *Drosophila melanogaster* három *importin- α* fehérjét kódoló génnel rendelkezik, melyeknek fő funkciója a sejtmagi transzport folyamatok közvetítése. A *Drosophila* Importin- α 2 fehérjéről korábban bemutatták, hogy az minden osztódó szövet sejtjeiben a korai profázis idején bemegy a sejtmagokba (Török és mtsai., 1995; Kussel és Frasch, 1995). Ezen észrevétel alapján feltételezték, hogy az Importin- α 2 fehérje sejtciklus-függő sejtmagi importot végez. Kísérleteinkkel vizsgálni kívántuk az Importin- α 2 fehérje sejtmagi importban betöltött szerepét a *Drosophila* petefejlődése során. Várakozásainkkal ellentétben azonban azt találtuk, hogy a petefejlődés során az Importin- α 2 fehérje nem vesz részt az általános sejtmagi importban. Az utobbi néhány évben számos munka arról számolt be, hogy az Importin fehérjék a sejtmagi transzporttól eltérő, más életfolyamatok aktív résztvevői is lehetnek. Értekezésem a *Drosophila* Importin- α 2 fehérjéjének egy új és váratlan funkciójának felismeréséről és annak részletes genetikai illetve biokémiai elemzéséről szól. Dolgozatomban bemutatom, hogy az Importin- α 2 fehérje miként játszik fontos szerepet a *Drosophila* petefejlődése során és miként szabályozza az ováriumok gyűrűcsatornáinak normális kialakulását. Biokémiai megközelítést alkalmazva bemutatom, hogy az Importin- α 2 fehérje mely oldalláncai szükségesek ehhez a funkcióhoz. Továbbá leírom az Importin- α fehérjék elsőként azonosított domináns negatív hatású allélját és annak *in vivo* hatását. Dolgozatom az eddig megszokott megközelítésekkel ellentétben egy fehérje részletes jellemzéséből kiindulva vezet el annak funkcióihoz.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. A *Drosophila melanogaster* törzsek

A *Drosophila* törzseket az általánosan használt kukoricaliszt-élesztő alapú muslica táptalajon tartottuk. Keresztezéseinket 25 °C-on végeztük. Vad típusú kontrollként a legtöbb esetben az *Oregon-R* törzset használtuk, az ettől eltérő kontroll törzseket az adott kísérletnél feltüntettük. A kísérleteink során alkalmazott egyéb törzsek: *imp-α2^{D14}* (Gorjánác és mtsai., 2002), *kelch^{DE1}* (Xue és Cooley, 1993), *P{lacZ}es 79* (Cooley és mtsai., 1992), *GFP* és *NLS-GFP* (Davis és mtsai., 1995) és a *GFP-Pav-KLP* (Minestrini és mtsai., 2002).

Az *importin-α2* K9 vad típusú cDNS-t (Török és mtsai., 1995) és az abból előállított *in vitro* mutáns változatokat pUASp2 P-elem alapú transzformáló vektor (Rorth, 1998) *NotI* és *KpnI* klónozóhelyekre építettük be. A 6-kb méretű genomikus fragmentumot, ami a teljes *imp-α2* gént tartalmazta, pCaSpeR-4 P-elem alapú transzformáló vektor *EcoRI* klónozóhelyére építettük be. Ezeket a vektorokat Δ2-3 helper plazmid segítségével, standard körülményeket használva *w¹¹¹⁸* szinciciális blasztoderma stádiumban lévő embriókba transzformáltuk (Voie és Cohen, 1998). Az így előállított pUASp-*Imp-α2*, pUASp-ΔIBB, pUASp-S37A, pUASp-S56A, pUASp-S98A, pUASp-3xSA, pUASp-ΔNLSB, pUASp-ΔMNLSB, pUASp-ΔSNLSB, pUASp-ΔDIM és a pUASp-ΔCASB transzgéneket *imp-α2^{D14}* háttérhez kereszteztük. A transzgének kifejeztetésére az ugyancsak *imp-α2^{D14}* háttérhez keresztezett csíravonal specifikus nanosGal4:VP16 (Van Doren és mtsai., 1998) és a follikuláris sejt specifikus P(GawB)T155-Gal4 (Duffy és mtsai., 1998) enhancer csapda vonalakat használtuk. A transzgének szemben történő kifejeztetéshez sev-Gal4 és ey-Gal4 törzseket használtunk.

3.2. Az ováriumok immunohisztokémiás festése

Az ováriumokat *Drosophila* Ringer oldatban boncoltuk, majd 30-60 percig 4%-os paraformaldehidet tartalmazó PEM pufferben (100 mM Pipes, pH 6.9, 1 mM EGTA, 1 mM MgSO₄) és ugyanilyen térfogatú n-heptánban fixáltuk. Az ováriumokat háromszor mostuk 10 percig 50 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl és 0.5% NP-40 (nonylphenyl-polyethylene glycol) detergenst tartalmazó oldatban,

majd 1.5% BSA-t és 250 mM NaCl-ot tartalmazó PBT-ben (0.1% TritonX-100+PBS=140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10.1 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KaH₂PO₄, pH 7.4) 4 °C-on gyűjtöttük. A fixált ováriumokat 2-4 órán keresztül blokkoló oldatban (1.5% BSA-t, 5% Kecse Normál Szérumot tartalmazó PBT-ben) blokkoltuk, majd az elsődleges ellenanyagokkal ugyanebben az oldatban hígítva 4 °C-on 16 órán keresztül inkubáltuk (1. Táblázat).

ellenanyag	hígítás	irodalom és forrás
anti-Imp- α 2 poliklonális	1:50	Török és mtsai., 1995
anti-Imp- α 1 poliklonális	1:50	Giarre és mtsai., 2002
anti-Imp- α 3 poliklonális	1:50	Máthé és mtsai., 2000
anti-Ketel poliklonális	1:300	Lippai és mtsai., 2000
anti-Cheerio poliklonális	1:1000	Sokol és Cooley, 1999
anti-Src64 poliklonális	1:1000	Dodson és mtsai., 1998
anti-Prod poliklonális	1:500	Török és mtsai., 1997
anti-Vasa poliklonális	1:1000	Bernard M. Mechler
anti-foszfotirozin monoklonális	2 μ g/ml	BD, Biosciences, San Diego
anti-Lamin monoklonális	1:10	H. Saumweber
anti-Kelch 1B hibridóma felülűsző	1:1	Xue és Cooley, 1993
anti-Hts-RC hibridóma felülűsző	1:1	Robinson és mtsai., 1994
anti- α -Spectrin hibridóma felülűsző	1:1	Dubreuil és mtsai., 1989
anti-c-Myc (9E10) monoklonális	1 μ g/ml	Santa Cruz Biotechnology
anti-Myc (A-14) poliklonális	1 μ g/ml	Santa Cruz Biotechnology

1. Táblázat. Az immunohisztokémiás festések során használt elsődleges ellenanyagok és azok hígításainak összefoglalása.

A nem kötött elsődleges ellenanyagokat háromszor 2 órás mosással (1.5% BSA-t tartalmazó PBT-ben) távolítottuk el, majd az ováriumokat 4 °C-on 16 órán keresztül blokkoló oldatban újra blokkoltuk. Ezután az ováriumokat ugyancsak blokkoló oldatban hígított (1:200) Cy2-, Cy3-, Cy5- és FITC-jelölt megfelelő másodlagos ellenanyagokkal (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) szobahőmérsékleten 2 óráig inkubáltuk. A meg nem kötött másodlagos ellenanyagokat négyszer 30 perces PBT-s mosással távolítottuk el. Aktinfestéshez Rhodamine-jelölt Phalloidine-t (Molecular Probes) vagy Alexa 488 Fluor Phalloidine-t (Molecular Probes) használtunk. Az aktin sejtváz lebontásához a vad típusú ováriumokat 10 μ mol/ml Cytochalasin D-t (Sigma) tartalmazó Schneider médiumban inkubáltuk szobahőmérsékleten 1 órán keresztül. Az ováriumokat

DNS festés előtt 2 óráig PBS-ben feloldott RNáz-al (500 µg/ml) kezeltük, majd szobahőmérsékleten PBS-ben 1:5000-ben hígított TOTO-3 (Molecular Probes) illetve 1:1000-ben hígított TO-PRO3 (Molecular Probes) festékekkel 30 percig inkubáltuk. Ezután az ováriumokat 4 °C-on 16 órán keresztül PBT-ben mostuk. Az immunofestések végén az ováriumokat Vectashield médiumban (Vector Laboratories) ágyasztuk be és a kész preparátumokat Leitz fluoreszcens mikroszkóppal (Leica) illetve Zeiss lézersugár-pásztázó (Carl Zeiss, LSM 410) mikroszkóppal vizsgáltuk. Az anizotrópia méréseket Pomozi István doktori értekezésében (2002, ELTE-TTK) leírtak alapján végeztük el, differenciál-polarizációs lézersugár-pásztázó mikroszkópot használva (DP-LSM).

3.3. Az ováriumok β -galaktozidáz festése

Az ováriumokat Drosophila EBR oldatban (130 mM NaCl, 5mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 10 mM Hepes, pH 6.9) boncoltuk majd 100 µl devitellinizáló oldatban (6% formaldehid, 16.7 mM $\text{H}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, pH 6.8, 75 mM KCl, 25 mM NaCl, 3.3 mM MgCl_2) és 600 µl n-heptánnal 10 percig forgatva fixáltuk. A fixálás után az ováriumokat háromszor 1 óráig EBR-ben mostuk, majd 37 °C-on 16 órán keresztül festettük 0.2% X-gal-t tartalmazó festő oldatban (10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH 7.2, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl_2 , 3.1 mM $\text{K}_4[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]$, 3.1 mM $\text{K}_3[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]$, 0.3% TritonX-100]. A festés után az ováriumokat 50% glycerolt tartalmazó PBS oldatban ágyasztuk be és fénymikroszkóppal (Zeiss Axioscope) vizsgáltuk.

3.4. Az embriók DNS festése

A 0-2 órás petéket Ringer oldatban gyűjtöttük, majd kétszeresen hígított Chlorax hypóban áztattuk a chorion burok eltávolítása céljából. A dekorionizált petéket PBS-ben mostuk, majd n-heptán:PEM:formaldehid 10:9:10 arányú oldatában erős ráztatás mellett 30 percig fixáltuk. Az also, vizes fázis eltávolítása után ugyanolyan térfogatú -80 °C-os metanolt adtunk hozzá és a petéket tovább ráztuk. Ezzel a belső vitellin membránt távolítottuk el és a devitellinizált embriók az oldat aljára süllyedtek. Az embriókat -80 °C-os metanollal mostuk, majd PBS-ben rehidratáltuk és PBT-ben gyűjtöttük. Az embriók DNS festését 1 µg/ml PBT-ben hígított DAPI (4',6-diamidion-2-phenylindole) festékekkel végeztük 1 órán keresztül szobahőmérsékleten. A festés után háromszor 30 percig PBT-ben mostuk az

embriókat, majd Vectashield médiumban (Vector Laboratories) ágyasztuk be és Leitz fluoreszcens mikroszkóppal (Leica) vizsgáltuk.

3.5. A peték korion burkának preparálása

Vad típusú és mutáns nőtény legyeket aktív szénnel színezett kemény agar táptalajon (22.5 gr agar, 25 gr cukor, 750 ml vízben főzve és 250 ml almaszörppel kiegészítve) petéztették, majd a petéket tárgylemezen Hoyer's médium:tejsav 1:1 arányú keverékében 1 napig 60 °C-on kezeltük. A preparátumokat sötét látóterű illetve fázis kontraszt mikroszkóppal vizsgáltuk.

3.6. A pásztázó elektron mikroszkópia

A 2-3 napos legyeket –20 °C-on lefagyasztottuk, 16 órán keresztül 4 °C-on PBS-ben és 2%-os glutáraldehidben fixáltuk, majd háromszor 20 percig PBS-ben mostuk. Ezután a legyeket etanol grádiens sorozatban (30, 50, 70, 95 és 100%), illetve etanol:aceton (3:1, 1:1 és 1:3) megfelelő keverékeiben 30-30 percig inkubáltuk. A dehidratálás utolsó lépéseiként 1:1 arányú hexamethyl-disilazane (HMDS, Sigma) és aceton keverékben, majd tiszta acetonban 30-30 percig inkubáltuk a legyeket. Szárításukat szűrőpapíron végeztük, majd pásztázó elektron mikroszkóp (SEM) rézermékbe ágyasztuk a legyeket és ~10 nm vastagságú arannyal bevontuk őket. A preparátumokat Philips SEM 505 készülékkel vizsgáltuk.

3.7. Az *importin-α2* gén *in vitro* mutagenézise

Az *importin-α2* gén *in vitro* mutagenézisét a QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) segítségével végeztük el. A 2521 bp méretű vad típusú *importin-α2* K9 cDNS-t (Török és mtsai., 1995) a Bluescript II SK (+/-) vektor *EcoRI* klónozó helyére építettük be és ezt használtuk templátként a mutagenézis során.

Az *in vitro* mutagenézishez komplementer oligonukleotid primer párokat használtunk, melyek közül csak a szensz primerek szekvenciáit írom le, vastagon szedve a bevezetett mutációk helyeit. Az S37A mutáció előállításához az: 5' CATCGAGCTGCGCAAGGCCAAAAAGGAG 3', az S56A mutáció előállításához az: 5' GAGGATCTAACGGCGCCGCTCAAAGAG 3', az S98A mutáció

előállításához az: 5' CAAGATGCTC**GCT**CGGGAACGCAATC 3' oligonukleotidokat használtuk. A 3xSA mutánst a fenti három primer pár egymás utáni használatával állítottuk elő. A Δ NLSB mutáns előállítását öt primer pár egymás utáni mutagenizáló ciklusaival állítottuk elő, melyek a következők voltak. A nagy NLS-kötő domainban levő W¹³⁵ és az N¹³⁹ mutagenezéséhez az: 5' GAGGCCGCT**GCGG**CGCTTACC**GCC**ATCGCCTCTG 3', W¹⁷⁷ és az N¹⁸¹ mutagenezéséhez az: 5' GCAGGCAGTC**GCGG**CTCTGGG**GCC**ATTGCCGGCG 3', W²²⁰ és az N²²⁴ mutagenezéséhez az: 5' CAACATCGTC**GCG**-CTGATGTCC**GCC**CTGTGCCG 3' oligonukleotidokat használtuk, míg a kis NLS-kötő domainban levő W³⁴⁶ és az N³⁵⁰ mutagenezéséhez az: 5' GGAGGCTGCC**GCG**ACGGTCAGC**GCC**ATCACAGCAGC 3', W³⁸⁸ és az N³⁹² mutagenezéséhez az: 5' GAGGCTGCC**GCGG**CGGTGACAG**GCC**ACCACGACATC 3' oligonukleotidokat használtuk. A nagy NLS-kötő domainban levő három mutagenizáló primer pár egymás utáni mutagenizáló PCR ciklusaival állítottuk elő a Δ MNLSB mutánst. A Δ SNLSB mutánst a kis NLS-kötő domainban levő két primer pár egymás utáni mutagenizáló PCR ciklusaival állítottuk elő. A Δ DIM mutánst négy primer pár egymás utáni mutagenizáló ciklusaival állítottuk elő. Ezek a következők voltak. Az R²²⁷ mutagenizációját az: 5' CAACCTGTGCG**GCAA**ACAAGAATCCATCG 3', az Y²⁶⁶ mutagenizációját az: 5' GGGCTTTGTCC**GCCG**TCACGGACGACG 3', az R³⁰⁴ mutagenizációját az: 5' GCCCGCCCTG**GCC**AGCGTTGGCAAC 3', az Y⁴⁷⁵ mutagenizációját az: 5' CGAGGAGGTC**GCCA**AGAAGGCCTACGCC 3' oligonukleotidokkal végeztük el. A Δ CASB mutáns előállítását egy primer párral végeztük el, ami a következő volt: 5' GGAGATGGGCGCT**GCAGCCGCGGCGGCA**ACTCTGCAGC 3'. Minden egyes mutáció az adott aminosavat alaninra cseréli. A Δ IBB mutánsban *SphI* restrikciós endonukleáz segítségével a vad típusú Importin- α 2 fehérje 25. aminosavától egészen a 90. aminosavig tartó belső deléciót állítottunk elő, ami teljes mértékben kiejtette a fehérje IBB domainját.

A mutagenizáló reakciókhoz 5-30 ng DNS templátot, 125-125 ng mutagenizáló primer párt, 0.2 mM dNTP keveréket és 2.5 U/ μ l PfuTurboTM DNS polimeráz II-öt használtunk. 18 PCR ciklus után a metilált templát DNS-t *DpnI* endonukleázzal emésztettük, majd a mutagenizált DNS-t Epicurian Coli XL1-Blue szuperkompetens sejtekbe (Stratagene) transzformáltuk. Az általunk előidézett

mutációkat T7 Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit és a T7 Sequenase v2.0 7-deaza-dGTP Sequencing Kit (mindkettő: Amersham Pharmacia Biotech) segítségével megszekvenáltuk és megbizonyosodtunk arról, hogy a tervezett helyen kívül más helyen nem történt mutáció. Végül a mutagenizált klónokat *in vitro* transzlációval is ellenőriztük (TNT Coupled Reticulocyte Lysate Systems, Promega). A jónak bizonyult mutáns klónokból *NotI* és *KpnI* fragmentumokat izoláltunk és azokat a pUASp2 transzformáló vektor ugyanezen klónozóhelyeire inszertáltuk.

3.8. Az Importin- α 2 fehérje Myc- és ProteinA-jelölése

A vad típusú és az összes *in vitro* mutáns Importin- α 2 fehérje Myc (EQKLISEEDLN) jelöléséhez PCR-el (Exp. High Fidelity PCR Syst., Roche) felamplifikáltuk az *importin- α 2* cDNS-eket. A PCR reakciók során használt 5' primerbe (5' GGAAGATCTCACACATTTTCATCGCAGCAGCAAACAT 3') *BglII* hasító helyet míg a 3' primerbe (3' GGGTTCCGAGGGCTCCCACCGATGTGCAAGCTTAAGGCC 5') *EcoRI* hasító helyet építettünk be. Továbbá a 3' primert úgy terveztük meg, hogy az Importin- α 2 fehérje stop kodonja (TAA) hiányozzék a fragmentumról, mert az Importin- α 2 fehérje C-terminálisára terveztük fuzionáltatni a Myc epitópot. Az 5' primer tervezésénél figyelembe vettük azt is, hogy az *importin- α 2* cDNS-ek 5' nem-transzlálódó régiója és annak riboszóma-kötő szekvenciája rajta legyen a konstrukción. Az egyes PCR reakciók után a fragmenteket *BglII* restrikciós endonukleázzal meghasítottuk, a túlnyúló véget tompa véggé alakítottuk (PCR Polishing Kit, Stratagene) és a fragmenteket megtisztítottuk (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen). Végül a cDNS-ek 3' végén levő *EcoRI* helyen is meghasítottuk a fragmenteket. A Myc-jelölésre használt pSK β Glo11xmyc (Jürgen A. Knoblich önzetlen hozzájárulásával) vektort *NcoI* restrikciós endonukleázzal felnyitottuk, a túlnyúló véget tompa véggé alakítottuk, majd *EcoRI* restrikciós endonukleázzal is meghasítottuk. A linearizált vektor végeit defoszforiláltuk és az előzőekben leírt módon előkészített *importin- α 2* cDNS-eket ezekre a klónozóhelyekre beépítettük (Rapid DNA Ligation Kit, Roche). Így az *importin- α 2* cDNS-ekkel egyenként 9-9 db myc epitópot frame-be klónoztuk. A konstrukciókat *in vitro* transzláltuk (TNT Coupled Reticulocyte Lysate Systems, Promega) és Western blot segítségével anti-c-Myc (9E10) monoklonális

ellenanyaggal ellenőriztük. Miután megbizonyosodtunk arról, hogy a Myc epitópok erősen megjelennek az Importin- α 2 fehérjén, *NotI* és *KpnI* hasításokkal izoláltuk a myc-jelölt *importin- α 2* cDNS fragmentumokat és azokat pUASp2 transzformáló vektor ugyanezen klónozóhelyeire építettük.

A *Staphylococcus aureus* ProteinA fehérje két IgG-kötő doménjét (zz) vad típusú, valamint a Δ NLSB és a Δ IBB mutáns Importin- α 2 fehérjék C-terminálisához fúzionáltuk. Az *importin- α 2* cDNS-eket PCR-el történő felamplifikálásukban az 5' primert (5' ATAAGAATGCGGCCGCCACACATTTCATCGCAGCAGCAAAC 3') *NotI* hasítóhellyel míg a 3' primert (5' CCCAAGCTTGAACGTGTAGC-CACCCTCGGGAGCC 3') *HindIII* hasítóhellyel láttuk el. *NotI* és *HindIII* restrikciós endonukleázokkal meghasítottuk a PCR fragmentumokat, majd a pBluescript II SK (+/-) vektor ugyanezen klónozóhelyeire építettük. Ezt követően a pBS1479-TAP-tag (Rigaut és mtsai., 1999; Puig és mtsai., 2001) vektorból PCR reakcióval felamplifikáltuk a zz domént. A PCR reakcióban használt 5' primert (5' CCCAAGCTTAAAACCGCGGCTCTTGCGCAACACG 3') *HindIII* hasítóhellyel míg a 3' primert (5' CGGGGTACCTTATCAGGTTGACTTCCCCGCGGAATT 3') *KpnI* hasítóhellyel láttuk el és a tisztított PCR fragmentumot *HindIII* és *KpnI* restrikciós endonukleázokkal meghasítottuk. Az *importin- α 2* cDNS-eket tartalmazó pBluescript II SK (+/-) vektorokat *HindIII* és *KpnI* restrikciós endonukleázokkal felnyitottuk, defoszforiláltuk, majd ligáltuk a fentiekben leírt módon előkészített zz fragmentumokkal. A konstrukciókat *in vitro* transzláltuk (TNT Coupled Reticulocyte Lysate Systems, Promega) és Western blot segítségével ellenőriztük a ProteinA jelölést. Miután megbizonyosodtunk arról, hogy a ProteinA epitópok megnyílvánulnak az Importin- α 2 fehérjéken, *NotI* és *KpnI* hasításokkal izoláltuk a zz-jelölt *importin- α 2* cDNS fragmentumokat és azokat pUASp2 transzformáló vektor ugyanezen klónozóhelyeire építettük.

3.9. Az Importin- α 2 fehérjekomplexek tisztítása

A kísérlet minden egyes lépését szigorúan jégen vagy 4 °C-on végeztük. Az Importin- α 2-*zz*, Δ NLSB-*zz* és a Δ IBB-*zz* fehérjéket vad típusú háttéren túltermelő nőstény legyek ováriumait PBS-ben boncoltuk és azokat folyékony nitrogénben gyűjtöttük. Tipusunként 1200-1200 db ováriumot 2 ml kötő pufferben (50mM Tris-

HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 20 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 5% glycerol, 0.1% NP-40, 0.5 mM PMSF és EDTA nélküli Proteáz Inhibítor Keverék, Roche) homogenizáltuk és 10 000 g-vel 20 percig centrifugáltuk. Az egyes felülúszók fehérje koncentrációit kiegyenlítettük, majd TLA-100.3 Beckman rotorban 100 000 g-vel 1 órán keresztül centrifugáltuk. Így állítottuk elő a nagy sebességű felülúszót. Ehhez a felülúszóhoz 50 µl, kötő pufferben equilibrált, humán IgG Sepharose-t (6 Fast Flow, Amersham Biosciences) adtunk és állandó lassú forgatással 16 órán keresztül inkubáltuk. A Sepharose gyöngyöket ülepítettük, majd kötő pufferben többszöri cserével 4 órán keresztül mostuk. Az IgG Sepharose-hoz kötött fehérjéket eluáló pufferrel (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2 M MgCl₂) oldottuk le, majd 95%-os isopropanol végkoncentrációval kicsaptuk a tisztított fehérjéket. A fehérjéket 12-, 10- és 7.5%-os SDS-PAGE géleken elválasztottuk, Coomassie kék festéssel megjelenítettük és MALDI tömegspektrometriás módszerrel (Shevchenko és mtsai., 1996; Shevchenko és mtsai., 1999) azonosítottuk.

3.10. A Coomassie kék gélfestés

Az SDS-PAGE fehérje géleket műanyag tálban fixáló oldatban (50% metanol, 10% ecetsav, 40% desztillált víz) lassú forgatás mellett 2 óráig fixáltuk. A fixáló oldat eltávolítása után Coomassie festő oldatot (50% metanol, 0.05% Coomassie brilliant blue R-250 (Bio-Rad), 10% ecetsav, 40% desztillált víz) helyeztünk a gélre és lassú forgatás mellett 4 óráig festettünk. A festőoldat eltávolítása után a gél fixáló oldattal átöblítettük, majd a festéktelenítő oldattal (5% metanol, 7% ecetsav, 88% desztillált víz) 2 óráig erősebben rázattuk. Ezután többszöri cserével addig mostuk festéktelenítő oldatban a géleket, amíg a fehérje sávok meg nem jelentek rajtuk. A gélek 4 °C-on és 2%-os ecetsavban akár több hónapig is eltárolhatók. Ezen festési eljárás érzékenységének alsó határa 0.3-1 µg fehérje/sávban van.

3.11. A ko-immunoprecipitáció

A kísérlet minden egyes lépését jégen vagy 4 °C-on végeztük. A GFP és az NLS-GFP fehérjéket túltermelő 1-3 napos legyek ováriumait jégen PBS-ben gyűjtöttük és a biokémiai kísérlet idejéig folyékony nitrogénben tároltuk. 50-50 db ováriumot 500 µl immunoprecipitációs pufferben (IPB: 20 mM Hepes, pH 7.2, 100

mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 0.5 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.5% Triton X-100, 0.1% NP-40 és Proteáz Inhibitor Keverék, Sigma) jégen homogenizáltuk és a sejttermelékét 4 °C-on 10 000 g-s centrifugálással távolítottuk el. A centrifugálás utáni felülúszót 20 µl protein G-agarózzal (Boehringer Mannheim) 1 órán keresztül előtisztítottuk. Miután centrifugálással eltávolítottuk az agarózt, 10 µg anti-GFP monoklonális ellenanyagot (Boehringer Mannheim) illetve 50 µl egér szérumot adtunk az oldatokhoz és 5 órán keresztül forgatva inkubáltuk. Ezután az ellenanyagokat 40 µl protein G-agaróz hozzáadásával és centrifugálással üleptítettük, majd egyszer 20 mM Hepes (pH 7.2), 300 mM NaCl és 0.1% Triton X-100-at tartalmazó oldattal, illetve kétszer IPB-ben mostuk. A megkötött fehérjéket SDS-mintapufferben forralással eluáltuk és 10%-os SDS-PAGE gélen elválasztottuk.

3.12. Az *in vitro* mikrofilamentum kötés

A kísérlet minden egyes lépését jégen vagy 4 °C-on végeztük. A vad típusú Oregon-R valamint a mutáns Δ NLSB, Δ IBB és a Δ CASB nőstény legyek ováriumait PBS-ben boncoltuk és azokat folyékony nitrogénen gyűjtöttük. Egy kísérlet során típusonként 1400-1400 db ováriumot használtunk. A vad típusú ováriumokból 250 mM sucrose és proteáz inhibitor keveréket (Sigma) tartalmazó sejtmag izoláló pufferben (15 mM Tris-HCl, pH 7.4, 60 mM KCl, 15 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM DTT, 0.1 mM EGTA) homogenizátumot készítettünk, majd a sejtmagvakat 1500 g-vel üleptítettük. A mutáns ováriumokból –mivel ezek a mutáns fehérjék mind sejtmagi lokalizáltságúak voltak- szolubilis sejtmag frakciót (25 mM Hepes, pH 7.6, 100 mM KCl, 12.5 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 400 mM K-glutamát, 20% glycerol, Kamakaka és mtsai., 1991) állítottunk elő és 12 000 g-vel centrifugáltuk. A fentiek szerint előállított ovárium kivonatokat TLA-100.3 Beckman rotorban 250 000 g-vel 1.5 órán keresztül centrifugáltuk, majd a nagy sebességű felülúszókat aktin stabilizáló pufferben (5 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2 mM MgCl₂, 50 mM KCl) 16 órán keresztül dializáltuk. A dialízálás után az extraktumot 180 000 g-vel 1.5 órán keresztül újra centrifugáltuk, majd a fehérjék koncentrációit kiegyenlítettük (1.3 mg/ml). Az F-aktin kötő kísérlethez (Smith és Raikhel, 1998) az Actin Binding Protein Biochem Kit-et (Cytoskeleton) használtuk. Az F-aktint (1 mg/ml) 2 mM MgCl₂, 50 mM KCl és 1 mM ATP jelenlétében 23 °C-on 1 óráig polimerizáltuk (23 µM), majd az ovárium kivonatokban 15 µM végkoncentrációig

hígítottuk. Az egyes reakciókhoz adott szintetikus NLS oligopeptid (GYGPKKRKVED) végkoncentrációja 200 μ M volt. 30 perces inkubálási idő elteltével a reakciókat 900 μ l 10%-os glycerol párnára (5 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl + glycerol 10%-ig) ülepítettük és 1.5 órán keresztül TLS-55 Beckman rotorral 135 000 g-vel centrifugáltuk. A csapadékban megjelent fehérjéket 10%-os SDS-PAGE gélen választottuk el.

3.13. A Western blot

Az SDS-PAGE géleken levő fehérjéket 0.8 mA/cm² állandó áramerősséggel Immobilon-P polyvinylidenfluoride (PVDF) membránra (Millipore Corp.) elektrotranszferáltuk. Az elsődleges ellenanyagokat blokkoló (PBS, 0.2% blokkoló reagens, 0.1% Tween 20) és mosó (PBS, 0.1% Tween 20) pufferek 1:1 arányú keverékében az alábbiak szerint hígítottuk: anti-Importin- α 2 poliklonális ellenanyagot 1:1000 (Török és mtsai., 1995), anti-Importin- α 1 poliklonális ellenanyagot 1:1000 (Giarrè és mtsai., 2002), anti-Importin- α 3 poliklonális ellenanyagot 1:1000 (Máthé és mtsai., 2000), anti-Ketel poliklonális ellenanyagot 1:500 (Lippai és mtsai., 2000), anti-P40 poliklonális ellenanyagot 1:15 000 (Török és mtsai., 1999), anti-Kelch 1B hibridóma felülűszó 1:10, anti-aktin hibridóma felülűszó 1:10 és az anti-GFP monoklonális ellenanyagot 0.6 μ g/ml koncentrációban használtuk. Az alkalikus foszfatázzal konjugált másodlagos ellenanyagokat (Serva Feinbiochemica) 1:20 000 hígításban használtuk.

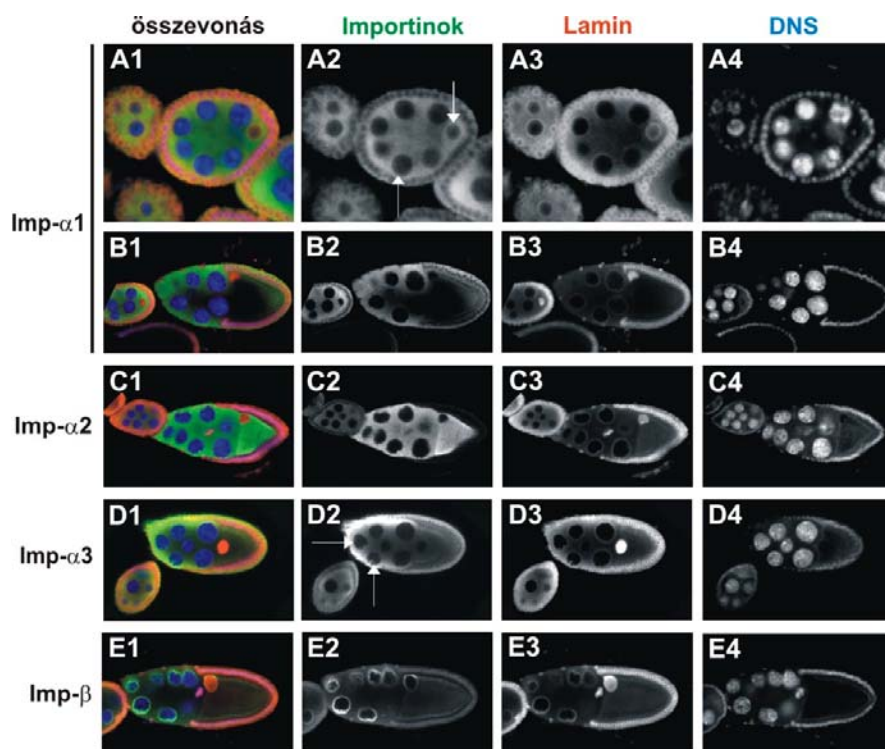
4. EREDMÉNYEK

4.1. Az Importin- α 2 fehérje nem halmozódik fel a *Drosophila* petekamráinak sejtmagjaiban

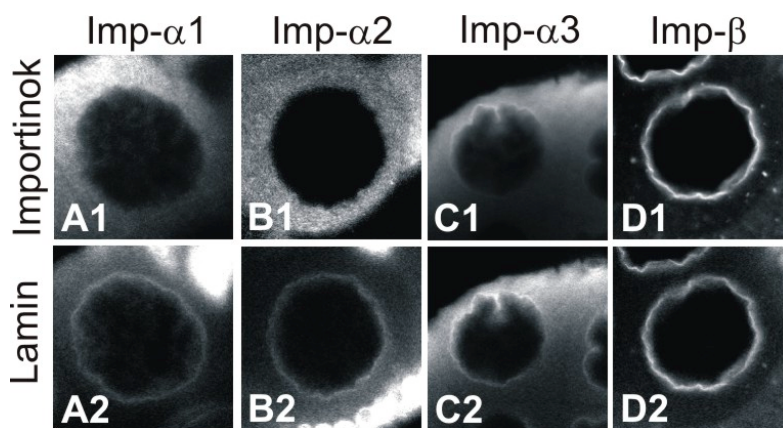
A *Drosophila* mindhárom Importin- α fehérjéje (Török és mtsai., 1995; Máthé és mtsai., 2000; Giarrè és mtsai., 2002), valamint az Importin- β 1 homológ Ketel fehérje (Lippai és mtsai., 2000) is kifejeződik a petefejlődés során. Ezen fehérjék ellen termeltetett specifikus ellenanyagok segítségével megvizsgáltuk sejten belüli eloszlásukat a petefejlődés során (5. ábra). Előzetes munkákból ismeretes volt az a tény (lásd az Irodalmi áttekintést), hogy a sejtmagi transzportot végző fehérjék dinamikus egyensúlyi állapotban a sejtmagmembránhoz kapcsolnak illetve a sejtmagban felhalmozódhatnak. Ezért a *Drosophila* Importin fehérjéinek a petefejlődés során mutatott sejten belüli eloszlása fontos adatot szolgálhat azok funkciójáról. Kísérleteink során a sejtmagok festésére TOTO-3 nevű DNS-festéket míg a magmembránok megjelenítésére anti-Lamin ellenanyagot használtunk.

A *Drosophila* petefejlődése során a sejtmagi transzportrendszer komponensei közül a legkifejezettebb sejtmagmembrán kötődést mutató fehérje, az Importin- β 1 homológ Ketel bizonyult (5. ábra E1-E4, 6. ábra D1, D2). A korábbi megfigyelésekkel (Lippai és mtsai., 2000) megegyezően mi is azt találtuk, hogy a Ketel fehérje a petekamra minden sejtjének magmembránján erősen felhalmozódik. Ez a Ketel fehérje aktív sejtmagi transzportban történő részvételére utal.

Máthé és munkatársai megfigyelték, hogy a petefejlődés legkorábbi stádiumaitól kezdődően az Importin- α 3 fehérje is erősen felhalmozódik a petekamra sejtjeinek magmembránján (Máthé és mtsai., 2000). Megfigyeléseik szerint a 7. és a 10. stádium között az Importin- α 3 már nemcsak a magmembránhoz kötődik, de a sejtmagokban is felhalmozódik. Ugyanazokat a körülményeket és ellenanyagot használva (Máthé Endre önzetlen hozzájárulásával), mi nem tudtuk megerősíteni a fenti megfigyeléseket. Észrevételeink szerint az Importin- α 3 fehérje csak gyenge sejtmagmembrán asszociációt mutatott, és a petefejlődés egyik stádiumában sem töltötte ki a dajkasejtek vagy a petesejt



5. ábra. A *Drosophila melanogaster* sejtmagi transzportjáért felelős Importin fehérjék (zöld) eloszlása a petekamrákban. Az Importin- $\alpha 1$ (A2,B2), Importin- $\alpha 2$ (C2), Importin- $\alpha 3$ (D2) és az Importin- $\beta 1$ homológ Ketel (E2) fehérjék sejten belüli eloszlásának vizsgálatára a vad típusú petekamrákat anti-Lamin ellenanyaggal (piros) és DNS festéssel (kék) is festettük. (E1-E4) Fontos megjegyezni, hogy míg az Importin- $\beta 1$ fehérje erős magmembrán felhalmozódást mutat, (A1-D4) addig az Importin- α fehérjék főként citoplazmás eloszlásúak. A nyilak a gyenge magmembrán felhalmozódást jelölik.



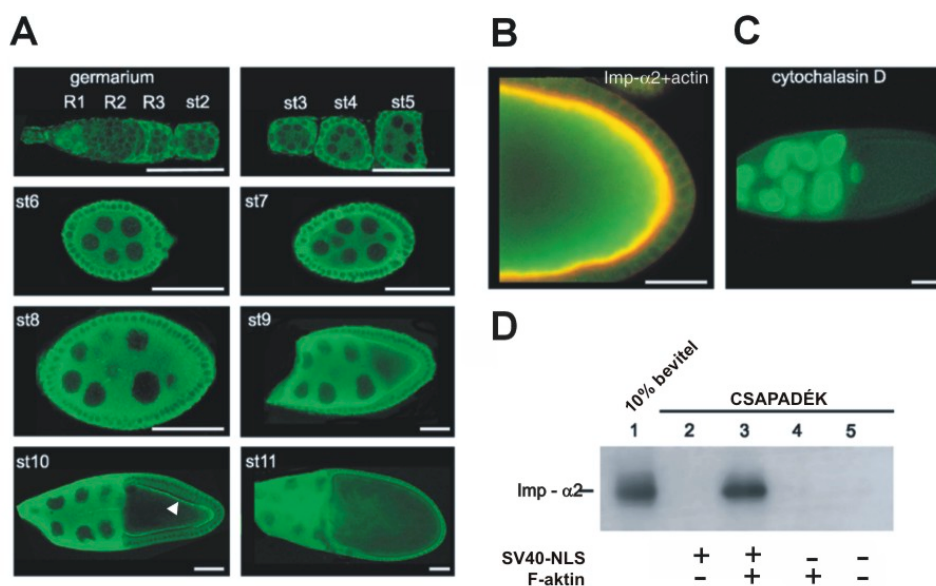
6. ábra. A *Drosophila* Importin fehérjéinek eloszlása a sejtmag körül. Vad típusú petekamrákat anti-Importin- $\alpha 1$ (A1), anti-Importin- $\alpha 2$ (B1), anti-Importin- $\alpha 3$ (C1) és az anti-Importin- $\beta 1$ (D1) (felső sor), valamint az anti-Lamin (alsó sor) ellenanyagokkal festettük. 9.-10. stádiumban levő petekamrák dajkasejtjeinek egy-egy sejtmagját nagyítottuk ki. Az Importin- $\beta 1$ (D1,D2) a Lamin fehérjével azonos helyen fordul elő, míg az Importin- α fehérjék közül csak az - $\alpha 3$ (C1,C2) mutatott egyértelmű felhalmozódást a magmembránon. Az Importin- $\alpha 2$ (B1,B2) fehérje hiánya a magmembránról a legszembevetőbb.

sejtmagjait (5.ábra D1-D4, 6.ábra C1,C2). Megfigyeléseink a korábbiakkal összhangban, azt az elképzelést erősítik, miszerint az Importin- α 3 a *Drosophila* petefejlődése során aktív résztvevője a sejtmagi transzportnak. A *Drosophila* másik két Importin- α fehérjéje még nagyobb eltérést mutatott a várt sejten belüli eloszlásukban. Az Importin- α 1 fehérje sejtmagmembránhoz történő kötődése csak a petefejlődés korai stádiumaiban volt észlelhető, míg a későbbiekben már nem találtunk hasonló felhalmozódást (5. ábra A1-B4, 6.ábra A1,A2). Az Importin- α 2 fehérjét, szemben az Importin- α 1 és - α 3 fehérjékkel, a petefejlődés egyik stádiumában sem tudtuk kimutatni sem a sejtmagmembránon sem pedig a sejtmagban (5. ábra C1-C4, 6. ábra B1,B2). Ez a megfigyelés arra enged következtetni, hogy a petefejlődés során az Importin- α 2 fehérje nem vesz részt az általános sejtmagi transzportban, de természetesen nem is zárja ki annak a lehetőségét, hogy kevés számú fehérje transzportreceptora legyen.

4.2. Az Importin- α 2 fehérje kölcsönhat a *Drosophila* petekamrák kortikális aktin sejtvázával

A *Drosophila* petefejlődése során az Importin- α 2 fehérje a transzporrendszer többi komponensétől a leginkább eltérő sejten belüli eloszlást mutatott. Ezért egy poliklonális anti-Importin- α 2 ellenanyag segítségével részletesen megvizsgáltuk az Importin- α 2 fehérje petefejlődés során mutatott eloszlását (7. ábra A). Az Imp- α 2 a germárium 1. régiójában lévő őscsírasejtekben erősebben, míg germárium 2. régiójában osztódó cisztoblasztokban gyengébben fejeződik ki. Egészen az 5. stádiumig az Importin- α 2 a follikuláris sejtekben erősebben kifejeződik mint a csíravonal sejtekben. A 6. stádiumtól kezdve azonban már a csíravonal eredetű sejtekben is megnő a kifejeződés szintje, ami a petefejlődés végéig meg is marad. A 11. stádiumtól kezdődően, a dajkasejtek teljes citoplazmájának "átpumpálásával" az Importin- α 2 szintje is jelentősen megnő a petesejtben.

Az Importin- α 2 a petefejlődés minden egyes stádiumában főként a citoplazmában fordul elő és különböző festési vagy fixálási eljárásokkal sem mutatható ki a sejtmagmembránon.



7. ábra. Az Importin- α 2 fehérje sejten belüli eloszlása. (A) A vad típusú petekamrákat anti-Importin α 2 poliklonális ellenanyaggal festettük. Az Importin- α 2 fehérje (zöld) a petefejlődés minden stádiumában a citoplazmában fordul elő. A 9. stádiumtól kezdődően erősen felhalmozódik a petekamrák kortikális részén (nyíl). (B) Egy 10. stádiumos petekamrában az Importin- α 2 (zöld) és kortikális aktin (piros) eloszlása látható. Az Importin- α 2 fehérje kolokalizált az F-aktinnal (sárga). (C) A vad típusú petekamrák aktin vázát cytochalasine D kezeléssel depolimerizáltuk. Ennek hatására az Importin- α 2 fehérje felhalmozódott a dajkasejtek és a petesejt sejtmagjaiban. A fehér mércevonala hossza 50 μ m. (D) Az Importin- α 2 fehérje SV40-NLS jelenlétében együtt ülepedik az *in vitro* polimerizált F-aktinnal. A vad típusú ovárium kivonathoz (1. oszlop) csak SV40-NLS-t adtunk (2. oszlop), vagy csak *in vitro* polimerizált F-aktint adtunk (4. oszlop), vagy mindkettőt együtt adtuk (3. oszlop). Kontrollként az 5. oszlopban nem használtunk semmiféle reagenst. Ezeket a reakciókat 10%-os glycerol párnára vittük, majd 150 000 g-vel üleptettük. Az Importin- α 2 csak az SV40-NLS jelenlétében ülepedett együtt az F-aktinnal. A Western blot előhívását anti-Importin- α 2 ellenanyaggal végeztük.

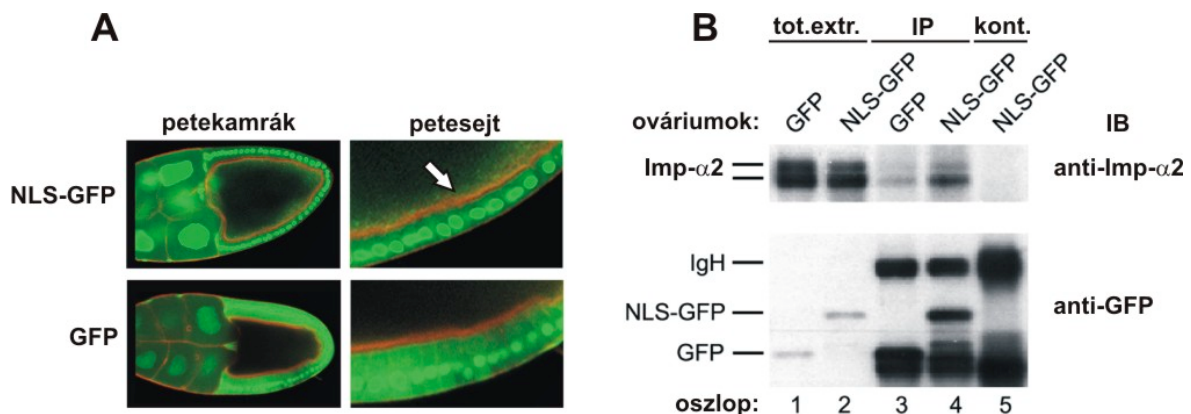
Azonban a csíravonal eredetű sejtek citoplazmájában egy jellegzetes eloszlására lettünk figyelmesek. A petekamrákat Importin- α 2 és F-aktin kettős festésével azt találtuk, hogy az Importin- α 2 a petefejlődés 9. stádiumától kezdődően erősen felhalmozódik a dajkasejtek, de még inkább a petesejt kortikális aktin sejtvezén (7. ábra A,B).

Az Importin- α 2 és a kortikális aktinváz közötti lehetséges kölcsönhatás további vizsgálatára vad típusú ováriumokat boncoltunk ki és azokat 1 órán keresztül 10 mM cytochalasin D-vel inkubáltuk. A cytochalasin D a szubkortikális F-aktin hálózat felbomlását idézte elő, ami nagyon befolyásolta az Importin- α 2 eloszlását (7. ábra B,C). Azt találtuk, hogy az Importin- α 2 fehérje elvesztette jellegzetes szubkortikális kihorgonyozását és egyenletesen oszlott el a csíravonal eredetű sejtek citoplazmájában. Ezzel egyidőben az Importin- α 2 fehérje nagy mennyiségben halmozódott fel a dajkasejtek és a petesejt sejtmagjaiban (7. ábra

C). Ezzel szemben a mikrotubulusok depolimerizációját előidéző ágensekkel (pl., colchicine, colcemide) végzett hasonló kezelések nem változtatták meg az Importin- α 2 fehérje sejten belüli eloszlását (be nem mutatott eredményeink alapján). Ezek az eredmények arra engedtek következtetni, hogy az Importin- α 2 fehérjének a dinamikus egyensúlyban tapasztalható citoplazmatikus eloszlásában a kortikális F-aktin sejtvázház lényeges szerepet játszik.

Az Importin- α 2 és az F-aktin közötti kölcsönhatás természetének részletes elemzésére egy *in vitro* mikrofilamentum-kötő kísérletet végeztünk (7 ábra D). Vad típusú ováriumokból nagy sebességű (150 000 g) citoplazmatikus felülúszót állítottunk elő. Ehhez a felülúszóhoz az SV40-NLS peptid jelenlétében illetve annak hiányában *in vitro* polimerizált F-aktint adtunk. Rövid inkubálási idő után ezeket a reakciókat 10%-os glycerol párnára vittük és az F-aktin szálakat nagy sebességgel (150 000 g) üleptítettük. Minden egyes F-aktinhoz kötődő fehérje, együtt ülepedett az F-aktinnal. Ezeket a fehérjéket SDS-PAGE gélen elválasztottuk és Western-blot segítségével vizsgáltuk. Azt találtuk, hogy SV40-NLS peptid jelenlétében az Importin- α 2 fehérje együtt ülepedett az F-aktinnal, míg az NLS-peptid távollétében ilyen kölcsönhatást nem tapasztaltunk. Ez az *in vitro* kísérlet azt bizonyította, hogy az Importin- α 2 fehérje NLS jelenlétében képes F-aktinhoz kötődni. Azonban vajon ez közvetlen vagy közvetett kölcsönhatás révén valósul-e meg, még nem ismeretes.

Mivel az Importin- α 2 fehérje mikrofilamentumokhoz kötődése NLS-függő folyamat, megvizsgáltuk, hogy NLS-peptidet tartalmazó egyéb riporter molekulák miként oszlanak el a petekamrán belül, és eloszlásuk hasonlít-e az Importin- α 2 fehérje eloszlásához. A kérdés megválaszolásához olyan transzgénikus légy törzseket használtuk, amelyek az ováriumukban NLS-peptidet tartalmazó zölden fluoreszkáló riporter fehérjét (NLS-GFP), illetve az NLS-t nem tartalmazó GFP riporter fehérjét termelték (8. ábra A). Mindkét riporter fehérje, a GFP és az NLS-GFP is, kis méretük és bázikus természetüknél fogva felhalmozódnak a petekamrák sejtmagjaiban. Az NLS-GFP molekula, az Importin- α 2 fehérjéhez hasonló módon, a petesejt kortikális aktinvázán halmozódik fel, míg az NLS-peptidet nem tartalmazó GFP nem mutatott ilyen jellegű elhelyezkedést. Ezért megállapítható, hogy az NLS-peptid jelenléte szükséges a riporter fehérje kortikális vázhoz történő kötődéséhez.



8. ábra. A GFP riportermolekula NLS-függő felhalmozódása a petesejt szubkortikális részén. (A) A vad típusú peték szubkortikális részén csak az NLS-t tartalmazó GFP (zöld) molekulák képesek felhalmozódni (nyíl). Az aktinváz festését rhodamine phalloidin-el végeztük el (piros). (B) Az Importin- α 2 fehérje koimmunoprecipitációja NLS-GFP-vel. Az immunoprecipitációt (IP) GFP illetve NLS-GFP riporter fehérjéket túltermelő ováriumok kivonataiból készítettük monoklonális anti-GFP ellenanyagot használva. A Western blot előhívásához anti-Imp- α 2 (felső panel) és anti-GFP (alsó panel) ellenanyagokat használtunk. Teljes extraktum a GFP (1. oszlop) illetve az NLS-GFP (2.oszlop) túltermelő ováriumokból, GFP-immunokomplex a GFP-t (3. oszlop) illetve az NLS-GFP-t (4. oszlop) túltermelő ováriumok extraktumaiból. Az immunoprecipitáció specifitásának igazolására egér preimmunsérumot használtuk kontrolként (5. oszlop).

Annak eldöntésére, hogy vajon az NLS-GFP riporter fehérje és az Importin- α 2 fehérje között létezik-e tényleges kölcsönhatás vagy sem, koimmunoprecipitációs kísérletet végeztünk (8. ábra B). A GFP illetve az NLS-GFP riporter fehérjéket túltermelő ováriumokból citoplazmatikus kivonatot készítettünk. Ezekből a kivonatokból monoklonális anti-GFP ellenanyag segítségével kicsaptuk a GFP illetve az NLS-GFP fehérjéket. Az Importin- α 2 fehérje csak az NLS-peptidet tartalmazó GFP molekulával együtt csapódott ki, míg az NLS-peptidet nem tartalmazóval nem. Ez azt jelenti, hogy az Importin- α 2 fehérje és az NLS-GFP riporter fehérje *in vivo* állapotban a petesejt aktin sejtvázában nemcsak együtt található, de közöttük tényleges kölcsönhatás is létezik. Így az is elképzelhető, hogy az Importin- α 2 fehérje *in vivo* más NLS-peptidet tartalmazó fehérjéket is képes megkötni és azokkal együtt kikötődni a kortikális F-aktin sejtvázhhoz.

4.3. Az *importin- α 2* gén inaktiválása sterilitást eredményez

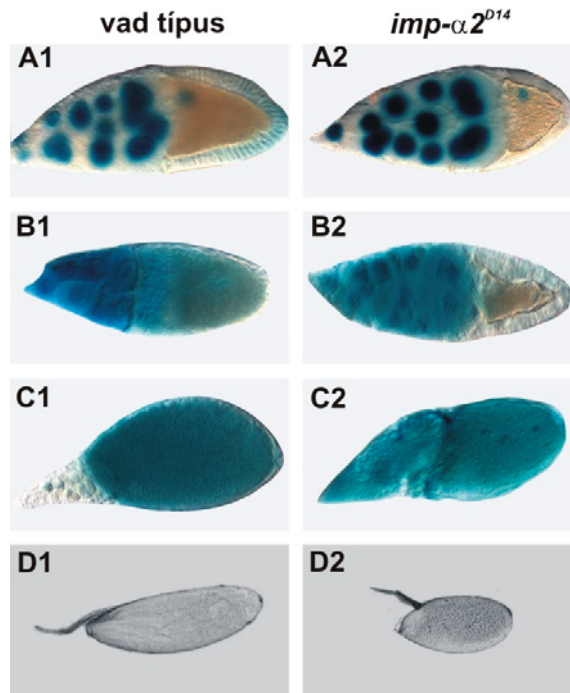
Az *importin- α 2* gén *Drosophila* homológját P-elem mutagenézis során azonosították (Török és mtsai., 1993). A P-elem remobilizációjával és annak pontatlan kivágódásával létrehozott *importin- α 2* deléciók, az *imp- α 2^{D3}* és *imp- α 2^{D14}*, null mutánsként viselkednek, és róluk fehérje nem képződik (Török és mtsai., 1995). Homozigóta állapotban mindkét allél részleges hím- (~75%) illetve teljes nőstény-sterilitást eredményezett (Gorjánácsh és mtsai., 2002; Giarrè és mtsai., 2002). Miután mindkét null allél hasonlóképpen viselkedett, a további vizsgálatainkban már csak az *imp- α 2^{D14}*, vagy röviden a *D14* allélt használtuk.

A *D14* homozigóta legyek egyedfejlődése teljes mértékben normális volt jelezvén, hogy az *Importin- α 2* fehérje valószínűleg nem játszik létfontosságú szerepet az általános sejtmagi importban. Ellenkező esetben ugyanis hiánya az *importin- α 3* mutánsokhoz hasonlóan letális fenotípust kellene hogy eredményezzen (Máthé és mtsai., 2000).

4.4. Az *Importin- α 2* fehérje szükséges a *Drosophila* petefejlődéséhez

A homozigóta *D14* nőstény legyek sterilek voltak és csak nagyon ritkán raktak petéket. Részletesebben megvizsgálva a mutáns legyek ováriumait azt találtuk, hogy a *D14* ováriumokban nagyon sok kis méretű degenerált pete van, amelyek eltömítik a petevezetékét. A ritkán lerakott peték jóval kisebbek a vad típusú petéknél, jellegzetesen megrövidült és összenolvadt dorzális függelékekkel (9. ábra D2). Ez egy jellegzetes fenotípusa azon mutánsok csoportjának, melyek a dajkasejtekből a petesejtbe irányuló késői anyag transzportot, az úgynevezett "dumpingot" érintik. Ezért közös néven ebben a folyamatban hibás mutánsokat "dumpless" mutánsoknak hívjuk.

A dumping anyag transzport folyamatának vizsgálatára egy olyan enhancer csapda vonalat (es79) használtunk, amely az N-terminálisán NLS-peptidet hordozó β -galaktozidáz riporter molekulát (NLS- β Gal) csírvonal specifikusan termel (9. ábra).



9. ábra. A dajkasejtekből a petesejtbe irányuló citoplazma transzport hibás a homozigóta mutáns *D14* petekamrákban. A *P_{lacZ}es79* enhancer csapda csíravonal specifikusan termeli a β -galaktozidáz enzimet a vad típusú (A1,B1,C1,D1) és a homozigóta mutáns *D14* (A2,B2,C2,D2) háttéren. A petekamrák β -galaktozidáz aktivitását a petefejlődés különböző stádiumaiban vizsgáltuk. A lelassult anyagtranszport következménye, hogy a *D14* nőstény legyek kis méretű petéket raknak (D2).

A vad típusú ováriumokban a petefejlődés 10. stádiumáig β -galaktozidáz aktivitást csak a csíravonal eredetű petesejt és a dajkasejtek sejtmagjaiban tudtunk kimutatni (9. ábra A1). A 10. és 11. stádium között, mikor is a dajkasejtek sejtmagmembránja permeabilizálódik, a β -galaktozidáz aktivitás megjelenik a dajkasejtek citoplazmájában is (9. ábra B1). Ezt követően a dajkasejtek citoplazmája és vele együtt a β -galaktozidáz aktivitás is átkerül a petesejtbe. A transzport folyamat végére, a 13. stádiumban már nem marad β -galaktozidáz aktivitás a degenerált dajkasejtekben (9. ábra C1). A homozigóta *D14* petekamrákban, a vad típusúakhoz hasonlóan, a 10. stádiumig csak a csíravonal eredetű sejtek magjaiban mutatható ki a β -galaktozidáz aktivitás (9. ábra A2). Ez egyben azt is jelenti, hogy az NLS riportermolekula az Importin- $\alpha 2$ fehérje teljes hiánya mellett is képes bejutni a sejtmagba. A 10. stádium végére a *D14* petekamrák dajkasejtjeinek citoplazmájában is megjelenik a β -galaktozidáz aktivitás, de a dajkasejtek citoplazmájának a petesejtbe történő átáramlása jelentős mértékben redukálódik (9. ábra B2). A petefejlődés legkésőbbi

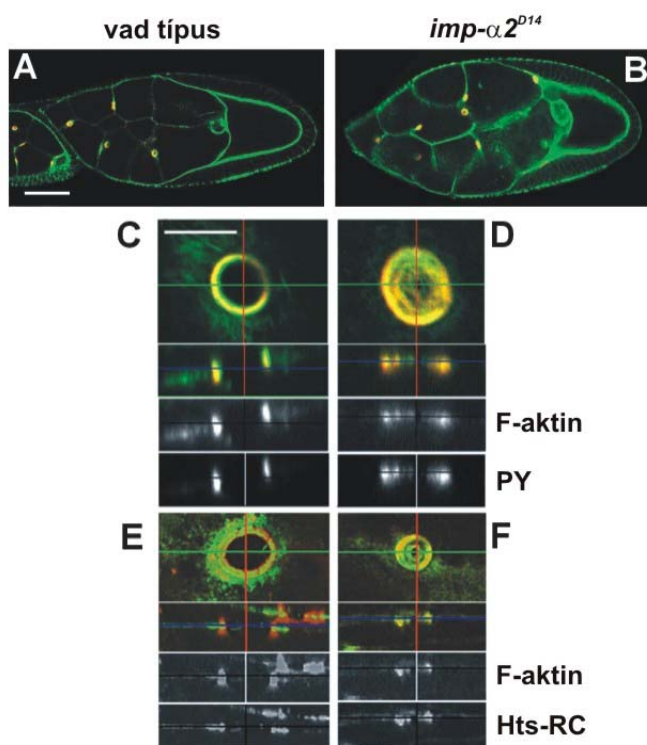
stádiumaiban is még jelentős citoplazma mennyiséget és β -galaktozidáz aktivitást találtunk a *D14* dajkasejtekben (9. ábra C2). Ez azt jelenti, hogy az *importin- α 2* gén inaktiválása a dajkasejtekből a petesejtbe irányuló anyag transzport gátlását eredményezi.

Bizonyítani kívántuk, hogy a dumpless fenotípust ténylegesen az Importin- α 2 fehérje hiánya idézi elő, ezért a vad típusú *importin- α 2* gént hordozó genomikus fragmentummal transzgénikus törzset állítottunk elő. Ez a transzgén tökéletesen menekítette a fentiekben leírt *D14* mutáns dumpless fenotípust. Viszont ez nem válaszolta meg azt a kérdést, hogy az Importin- α 2 fehérje funkciójára a csíravonal eredetű sejtekben, vagy a testi eredetű follikuláris sejtekben van-e szükség. Ennek a problémának a megválaszolásához UAS-imp- α 2 transzgénikus törzset használtunk, ahol az *importin- α 2* gén cDNS-e UAS elem szabályozása alatt áll. Az UAS-imp- α 2 cDNS-t specifikus Gal4 driverek segítségével tetszés szerinti helyen és időben képesek vagyunk kifejeztetni. Csíravonal-specifikus nanos-Gal4 (Rorth, 1998) drivert használva, az UAS-imp- α 2 transzgén teljes mértékben megszüntette a *D14* mutáns fenotípust. Azonban a testi eredetű follikuláris sejtekben működő P(GawB)T155-Gal4 drivert használva azonban nem tapasztaltunk semmiféle változást a *D14* deléció okozta fenotípusban. Ezek szerint az Importin- α 2 fehérje a csíravonal eredetű sejtekben és nem a testi eredetű follikuláris sejtekben fejti ki hatását.

4.5. Az *importin- α 2^{D14}* petekamrák gyűrűcsatornái beszűkültek

A 10. stádiumtól kezdődően a *Drosophila* petekamrák sejtváza jelentős változásokon megy keresztül. A dajkasejtek plazmamembránja és magmembránja között aktin gerendák alakulnak ki (Gutzeit, 1986), melyek a dajkasejtekből a petesejtbe irányuló anyag transzport során a dajkasejtek sejtmagjait távoltartják a gyűrűcsatornáktól. Több olyan gén mutációja (*chickadee*, *singed* és *quail*), amelyek ezen aktin gerendák kialakulását megakadályozzák azt okozzák, hogy a dajkasejtek magjai elzárják a gyűrűcsatornákat. Ennek eredményeként dumpless fenotípusú, kisméretű peték képződnek. Mivel ezek a gének, az *importin- α 2* génhez hasonlóan, mind aktin-kötő fehérjéket kódolnak, mi is megvizsgáltuk a *D14* mutáns petekamrák aktin gerendáinak kialakulását. F-aktin és DNS kettős festésével azt találtuk, hogy a mutáns *D14* petekamrákban a vad típusú

petekamrákhoz hasonló módon alakultak ki az aktin gerendák (be nem mutatott eredmények). Ez az eredmény felvetette annak a lehetőségét, hogy a *D14* peték dumpless fenotípusáért a gyűrűcsatornák hibás szerkezete a felelős.



10. ábra. A vad típusú és a *D14* mutáns peték gyűrűcsatornáinak szerkezete. A vad típusú (A,C,E) és a *D14* (B,D,F) mutáns petekamrák aktin (zöld) és PY-epitóp (piros) (C,D) kettősfestése illetve aktin (zöld) és Hts (piros) (E,F) kettősfestése látható. Az aktin filamentumok a többi fehérjével egyetemben éles gyűrűvé szerveződnek a vad típusú gyűrűcsatornában, míg a *D14* gyűrűcsatornák laza aktin kötegei a hozzájuk kapcsolódó többi fehérjével belógnak a gyűrűcsatornák belső járataiba. A fehér mércevonala hossza 50 μm (A,B) és 10 μm (C-F).

A homozigóta mutáns *D14* petekamrák gyűrűcsatornáinak nagy felbontású vizsgálatához kettős festést végeztünk F-aktin-ra illetve további két, ugyancsak gyűrűcsatorna komponensre, a PY és a Hts-RC fehérjékre (10. ábra). A vad típusú és a *D14* gyűrűcsatornákat összehasonlítva azt találtuk, hogy a *D14* gyűrűcsatornák belső járata jelentős mértékben beszűkült. A vad típusú gyűrűcsatornák aktin kötegei a hozzájuk kapcsolódó PY és Hts-RC fehérjékkel együtt tömör gyűrűt alkotnak (10. ábra A,C,E), ezzel szemben a *D14* gyűrűcsatornák ugyanezen komponensei (F-aktin, PY, Hts-RC) elzárják a gyűrűcsatornák járatát, megakadályozva ezzel a dajkasejtekből a petesejtbe irányuló masszív anyagtranszportot (10. ábra B,D,F). A *D14* gyűrűcsatornák elzáródásának fő oka a belső szegélyük hibás szerveződése. A gyűrűcsatornák

belső szegélyének belógó aktin kötegei gyakran további kisebb gyűrűket képeznek, melyek szoros kapcsolatban maradnak a külső gyűrűvel. Az Importin- $\alpha 2$ fehérje hiánya tehát a gyűrűcsatornák abnormális szerveződését eredményezi, utalva arra, hogy az Importin- $\alpha 2$ fehérje nem a gyűrűcsatornák kialakulásában hanem azok normális szerkezetének fenntartásában játszik fontos szerepet. Mindezek ellenére semmilyen festési illetve fixálási körülmény alkalmazásának sem tudtuk kimutatni az Importin- $\alpha 2$ fehérjét a gyűrűcsatornáknakban. Így valószínűsíthető, hogy az Importin- $\alpha 2$ fehérje nem közvetlen hanem közvetett úton fejti ki hatását a gyűrűcsatornák szerkezetére.

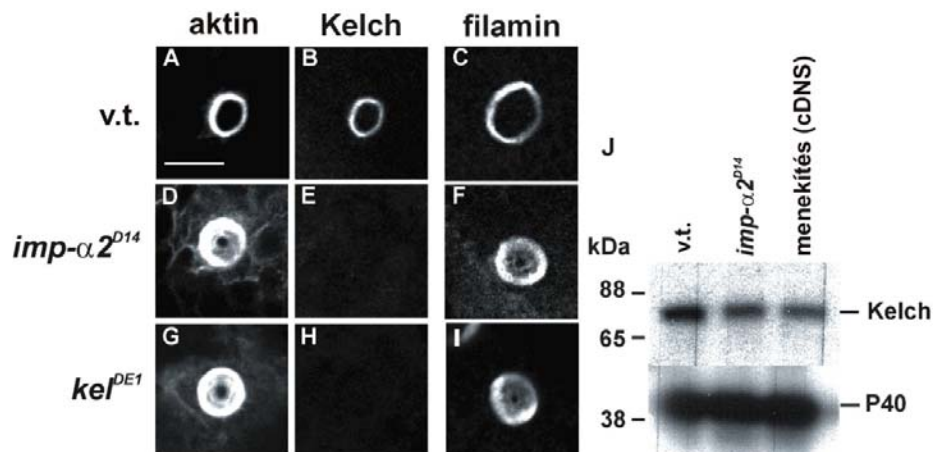
Egy további észrevételünk a *D14* mutáns petekamrák aktin szerkezetére vonatkozóan az volt, hogy az Importin- $\alpha 2$ hiánya a kortikális aktin sejtváza fellazulásához illetve annak megvastagodásához vezetett (10. ábra B). Ez arra utal, hogy az Importin- $\alpha 2$ fehérje nemcsak a gyűrűcsatornák, de a kortikális sejtváza F-aktin szerkezetére is hatással van.

4.6. A Kelch fehérje hiányzik az *importin- $\alpha 2^{D14}$* gyűrűcsatornáiból

A *D14* mutáns gyűrűcsatornák fenotípusával teljes mértékben megegyező szerkezeti elváltozásokat írtak le a *kel^{DE1}* null mutáns gyűrűcsatornáiban is (Robinson és mtsai., 1994). A *kelch* gén egy olyan gyűrűcsatorna fehérjét kódol, amely a petefejlődés 1. stádiumában halmozódik fel a gyűrűcsatornák belső szegélyében és feladata az F-aktin szálak kötegekbe rendezése. A gyűrűcsatornák vázát képező F-aktin kihorgonyozását a plazmamembránhoz a *cheerio* gén által kódolt Filamin fehérje végzi. Mivel a *D14* mutáns gyűrűcsatornák F-aktin szerkezete hibás, specifikus ellenanyagok segítségével megvizsgáltuk a Kelch és a Filamin fehérjék eloszlását a vad típusú illetve a *D14* mutáns gyűrűcsatornáknakban (11. ábra A-I).

A vad típusú gyűrűcsatornák (11. ábra A,B,C) hasonló szerkezetet mutatnak aktin, Kelch és Filamin festéssel egyaránt. Ezzel szemben a *D14* gyűrűcsatornák (11. ábra D,E,F) Filamin eloszlása, az előzőekben bemutatott PY és Hts-RC fehérjékhez hasonlóan (10. ábra D,F), egybeesik az F-aktinnal. A *kel^{DE1}* mutáns gyűrűcsatornák (11. ábra G,H,I) az összes eddig vizsgált fehérjére (F-aktin, PY, Hts-RC és Filamin) ugyanolyan eloszlást mutattak mint a *D14* mutáns gyűrűcsatornák. Ezért megvizsgáltuk, hogy a Kelch fehérje jelen van-e a *D14*

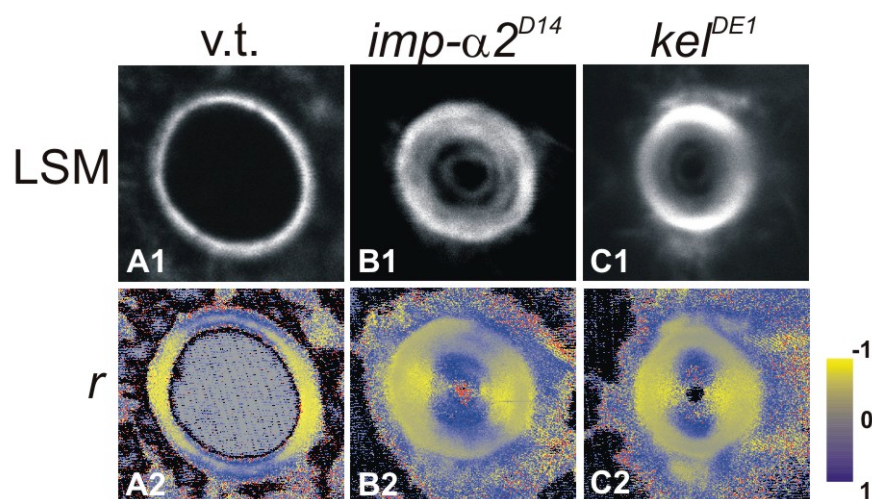
gyűrűcsatornáknak (11. ábra E). Várakozásainknak megfelelően Kelch fehérjét nem tudtunk kimutatni a *D14* mutáns gyűrűcsatornákból. Western-blot analízis segítségével azonban kimutattuk, hogy a Kelch fehérje normális szinten fejeződik ki a *D14* mutáns petekamrákban (11. ábra J). Ez azt jelenti, hogy az Importin- α 2 fehérje nem a Kelch fehérje expresszióját, hanem annak a gyűrűcsatornába történő felhalmozódását szabályozza.



11. ábra. A Kelch fehérje hiányzik a homozigóta mutáns *D14* gyűrűcsatornákból. A gyűrűcsatornákat aktin és Kelch kettős festése (A,B,D,E,G,H) illetve Filamin festése (C,F,I) látható. Az *imp-α2^{D14}* (D-F) és a *kel^{DE1}* (G-I) mutáns gyűrűcsatornák aktin kötegei abnormálisan belógnak a gyűrűcsatornák belsejébe. A Kelch fehérje, ami a gyűrűcsatornák normális kialakulásáért felelős, hiányzik a *D14* mutáns gyűrűcsatornákból. A fehér mércevonala 10 μ m. (J) Western blot segítségével kimutattuk, hogy a Kelch fehérje normálisan megnyílvánul a *D14* mutáns petekamrákban is. A Western blot előhívásához anti-Kelch és anti-P40 ellenanyagokat használtunk.

4.7. Az *importin-α2^{D14}* és a *kelch^{DE1}* gyűrűcsatornák aktinkötegei rendezetlenek

A gyűrűcsatornák F-aktin szálainak rendezettségét differenciál-polarizációs lézersugár-pásztázó mikroszkóppal (DP-LSM), a Zeiss LSM 410 modellnek Garab Győző és munkatársai által az MTA-SzBK-ban továbbfejlesztett változatával vizsgáltuk (Pomozsi István doktori értekezése, 2002). Ezzel a módszerrel a fluoreszcenciának nem csak az intenzitása, de többféle polarizációs paramétere is mérhető. A DP-LSM-mel az intenzitás képpel együtt az anizotrópia (*r*) eloszlását is megmértük, ami az emissziós dipólusok térbeli elhelyezkedéséről ad információt (12. ábra).



12. ábra. A vad típusú és mutáns gyűrűcsatornák aktin kötegeinek elrendeződését anizotrópia (r) mérésel vizsgáltuk meg. A vad típusú (A1,A2) és a mutáns $imp-\alpha 2^{D14}$ (B1,B2) és a kel^{DE1} (C1,C2) gyűrűcsatornákat Alexa 488 Phalloidine festékkel aktinra festettük, depolarizált 488 nm hullámhosszúságú lézersugárral gerjesztettük, majd ez emissziós dipólusok intenzitást (A1,B1,C1) és az anizotrópia (r) eloszlását (A2,B2,C2) megmértük. Kék színű a gyűrűcsatorna azon része ahol az ábra vízszintes síkjához képest inkább vízszintes dipólusok ($r+1$) emitálnak, sárga ahol inkább függőleges ($r-1$) és szürke ($r\sim 0$) ahol az emissziós dipólusok polarizálatlanok.

Vad típusú (12. ábra A1,A2) illetve a mutáns $D14$ (12. ábra B1,B2) és kel^{DE1} (12. ábra C1,C2) gyűrűcsatornákat az F-aktin szálakba interkalálódó Alexa 488 Fluor Phalloidine festékkel festettük. A preparátumokat 488 nm hullámhosszúságú depolarizált lézersugárral gerjesztettük és a gyűrűcsatornákról LSM képeket készítettünk. Azonban ezek a képek azon felül, hogy a gyűrűcsatornák aktin vázát bemutatják, nem árulnak el semmit azok irányultságáról illetve rendezettségéről. A gyűrűcsatornákat polarizálatlan lézersugárral gerjesztettük és anizotrópia (r) méréseket végeztünk azzal a céllal, hogy az emissziós dipólusok elhelyezkedését illetve azok egymáshoz viszonyított orientációját meghatározzuk. Ugyanis a kísérletünk során használt F-aktin festék irányspecifikusan kötődik az aktinszálakhoz, így az általa emitált dipólusok iránya hűen tükrözi a gyűrűcsatornát alkotó F-aktin szálak irányultságát és azok rendezettségét. Az anizotrópia mérését az ábra vízszintes síkjához képest végeztük (az emittált fény terjedése merőleges a lap síkjára), a mintázatokon a kék árnyalatok a pozitív értékeket (inkább vízszintes emissziós dipólusok), a sárga árnyalatok a negatív értékeket kódolják (inkább függőleges állású dipólusok). A kék és sárga közötti átmenetet, ahol $r\sim 0$, az ábrán szürkével jelöltük, ugyanis ekkor az emissziós dipólusok vagy 45° -ban állnak, vagy az adott pontból az

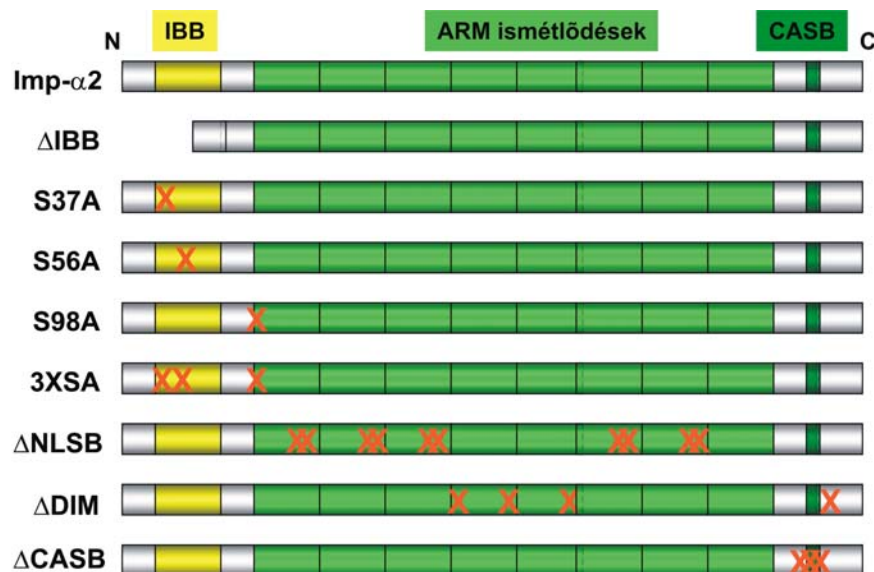
emisszió polarizálatlan (az emissziós dipólusok rendezetlenek, nincs specifikus irányuk).

A vad típusú gyűrűcsatornán végzett anizotrópiás (r) mérések a gyűrűcsatornát négy részre osztották (12. ábra A2). A gyűrű két oldalán sárga, míg fent és lent kék színű jeleket detektáltunk, a sárga és kék régiók között az átmenet, a szürkén keresztül, folyamatos volt. Ez arra utal, hogy a vad típusú gyűrűcsatorna aktin kötegei szorosan egymás mellett álló, koncentrikusan rendezett F-aktin szálakból állnak. Azonban a *D14* (12. ábra B2) és a *kel^{DE1}* (12. ábra C2) mutáns gyűrűcsatornában nem tapasztaltunk hasonló színbeli felosztást. A mutáns gyűrűcsatornák ehelyett szürkék voltak jelezvén, hogy bennük az F-aktin szálak nem képeznek szabályos koncentrikus struktúrát, hanem azok több irányba rendezetlenül helyezkednek el. A gyűrűcsatornák külső és belső szegélye egyaránt rendezetlen volt. Kismértékű rendezetlenségre utaló jelet azonban a vad típusú gyűrűcsatornák belsejében is találtunk. Ez összefüggésbe hozható a gyűrűcsatornák növekedésével együttjáró aktin szerkezetének változásával is.

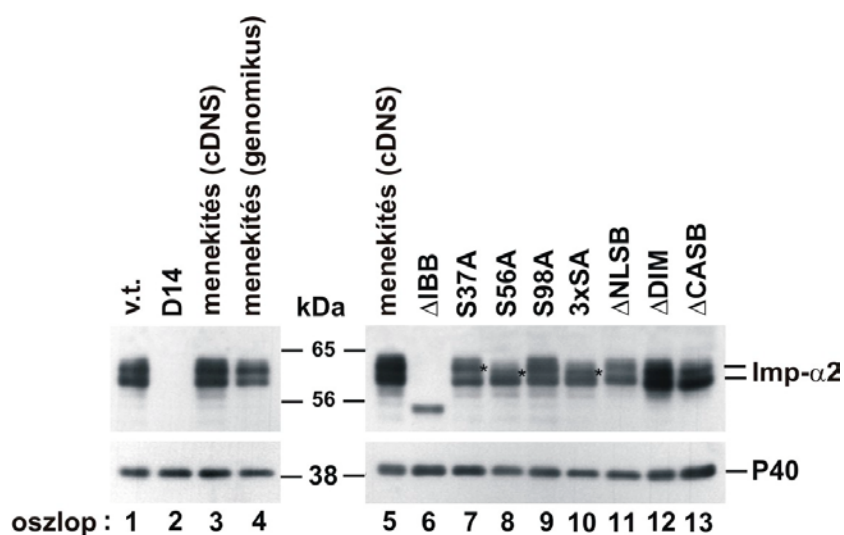
Sajnos az ellenanyagok festéseknél használt másodlagos ellenanyagok fluorofórijainak véletlenszerű eloszlása nem teszi lehetővé a gyűrűcsatornák többi komponensének hasonló vizsgálatát. Azonban az adott fehérjék GFP jelölése kaput nyithat az ilyen típusú vizsgálatok kibővítése felé.

4.8. Az Importin- α 2 fehérje funkciójának elemzése *in vitro* előállított allélekkel

Annak vizsgálatára, hogy az Importin- α 2 fehérje miként vesz részt a gyűrűcsatornák szervezésében és miként szabályozza a Kelch fehérje felhalmozódását a gyűrűcsatornában *in vitro* mutagenézissel új *importin- α 2* alléleket állítottunk elő. A mutagenézis során gondosan kiválasztott funkcionális oldalláncokat céloztunk meg és a kiválasztott aminosavakat alaninra cseréltük (13. ábra). Minden egyes mutáns és vad típusú *importin- α 2* cDNS-t UASp vektorba klónoztuk és azokkal transzgénikus törzseket állítottunk elő. A mutációk hatását *D14* mutáns háttéren nanos-Gal4 (Rorth, 1998) csíravonal specifikus driver segítségével vizsgáltuk. Így ezen legyek csíravonal eredetű sejtjeiben csakis az általunk bevitt Importin- α 2 fehérje képződött.



13. ábra. Az Importin- α 2 fehérje *in vitro* mutagezise. Az Importin- α 2 fehérje N-terminális szakaszán levő bázikus aminosavból álló Importin- β kötő domént (IBB) enzim hasítással távolítottuk el ezért ezt az allélt Δ IBB-nek neveztük el. A három lehetséges foszforilációs szerin oldalláncot alaninra cseréltük és a mutációkat helyüktől függően S37A, S56A és S98A-nak neveztük el. Az NLS kötést (NLSB) közvetlenül felelős aszparagin és triptofán oldalláncokat alaninra cseréltük és ezt a mutáns allélt Δ NLSB-nek neveztük el. Ugyancsak alaninra cseréltük a dimerizációért felelős aminosavakat is, amit ennek megfelelően Δ DIM-nek neveztünk el. Végül a CAS fehérje kötésében (CASB) szerepet játszó aminosavakat is alaninra cseréltük és ezt az allélt Δ CASB-nek neveztük el. Piros X a mutációk helyeit jelzi.



14. ábra. A vad típusú és a mutáns Importin- α 2 fehérjék képződése az ováriumban. Vad típusú (3., 5. oszlop) és a mutáns (6.-13. oszlop) *importin- α 2* cDNS-eket legyekbe transzformáltuk, majd csírávonal specifikus Gal4 driver segítségével *imp- α 2^{D14}* (2. oszlop) null mutáns háttéren expresszáltuk. Az 1. oszlop az endogén Importin- α 2 szintet, míg a 4. oszlop egy genomikus fragmentről származó expressziós szintet mutatja. Csillaggal jelöltük az Importin- α 2 fehérje azon migrációs izoformáját, amely az S37A mutációval kapcsolatos. A Western blottot Importin- α 2-re és a felviteli kontrollként használt P40 fehérjére festettük.

Western-blot segítségével megvizsgáltuk az egyes transzgének kifejeződésének mértékét és mindegyik allél esetében kiválasztottunk egy-egy olyan független beépülést ami az endogén Importin- α 2 fehérjeszinthez inkább hasonló kifejeződést mutatott (14. ábra). A továbbiakban már főleg ezekkel a törzsekkel dolgoztunk.

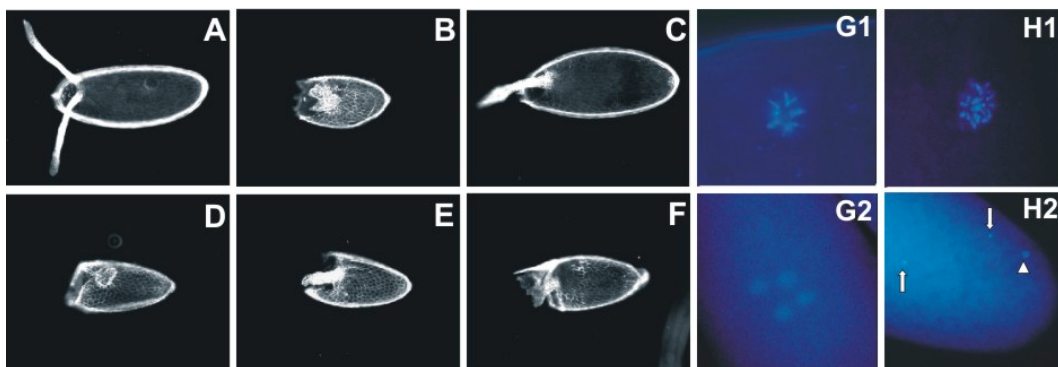
Az előzőekben már beszámoltam arról, hogy a vad típusú *importin- α 2* cDNS transzgén egyetlen kópiája elégséges ahhoz, hogy a *D14* deléción okozta fenotípust tökéletesen menekítse és a legyek fertilitását helyreállítsa. Az új mutáns allélek azonban menekítőképességük alapján két csoportba oszthatók.

allélek	nőstény fertilitás	peterakás		kikelés	
		nőstények száma	pete/nőstény/nap	peték száma	%
vad típus	fertilis	15	14.0	680	88,7
<i>imp-α2^{D14}</i>	steril	24	1.2	88	0
v.t. cDNS	fertilis	11	13.6	860	88,2
S37A	steril	10	12.2	490	31,5
S56A	steril	9	12.4	643	3,5
S98A	steril	12	13.0	392	6,7
3xSA	steril	12	10.9	766	9,2
ΔDIM	steril	10	13.1	>800	0
ΔIBB	steril	23	12.0	830	0
ΔNLSB	steril	46	1.6	227	0
ΔCASB	steril	45	1.0	146	0

2. Táblázat. Az *in vitro* mutagenézissel előállított mutáns Importin- α 2 fehérjék funkcionális vizsgálata. Az összes vad típusú és mutáns *importin- α 2* cDNS-t *imp- α 2^{D14}* háttéren csíravonal specifikus nanos-Gal4 driverrel hajtottuk meg. A nőstény legyek peterakási gyakoriságát illetve a lerakott peték kikelési gyakoriságát vizsgáltuk. Ezek alapján a mutánsokat két csoportra osztottuk. Az egyik csoportba tartoztak azok a mutánsok, amelyek normális petéket raktak, jelezvén, hogy a mutáció nem befolyásolta az Importin- α 2 funkcióját a petefejlődés során. A másik csoportba tartoznak azok a mutánsok, amelyek dumpless fenotípusú petéket raktak, jelezvén, hogy az ezekben a mutánsokban elrontott oldalláncok fontosak a petefejlődés során.

A mutánsok első csoportját képezték a foszforilációs mutánsok (S37A, S56A, S98A, 3xSA) és a dimerizációs mutáns (Δ DIM), melyek tökéletesen menekítették a *D14* legyek hibás petefejlődését. A peterakási gyakoriság (2. Táblázat) és a peték alakja (15. ábra) is arról tanúskodik, hogy a *Drosophila*

petefejlődése során ezek az oldalláncok nem játszanak fontos szerepet. Az embrió fejlődése során viszont fontos szerepük lehet, ugyanis ezek a mutációk az embrió fejlődését a legkorábbi szakaszban állítják meg. A peték DNS festésével megállapítottuk (15. ábra G1-H2), hogy a mutáns petékben a vad típusú petékhez hasonló módon normálisan befejeződik a meiózis. Kialakul a sarki test illetve a női ősmag is, azonban a pete vagy ritkán termékenyül meg, vagy ha megtermékenyül is a női és hím ősmagvak elsodródnak egymástól és a legtöbb esetben nem fúzionálnak. Az embriók egy része kis gyakorisággal azonban fejlődésnek indul és eléri a lárva állapotot (2. Táblázat).



15. ábra. Az *in vitro* mutagenézissel előállított mutánsok petéinek fenotípusa. (A) A *D14/D14*; UAS-imp- α 2/nos-Gal4, (B) *D14/D14*; UAS-imp- α 2/+, (C) *D14/D14*; UAS- Δ IBB/nos-Gal4, (D) *D14/D14*; UAS- Δ NLSB/nos-Gal4, (E) *D14/D14*; UAS- Δ CASB/nos-Gal4 és a (F) *ke^{DE1}/ke^{DE1}* nőstény legyek által lerakott peték. A mutánsok első csoportjába tartozók vad típusú petéket raktak. A (G1,G2) vad típusú és a mutánsok első csoportba tartozó (H1,H2) 3xSA nőstények petéit DNS festékekkel festettük. A G1 és H1 képen a sarki testek láthatóak. A G2 képen a vad típusú embrió második osztódása során létrejött négy sejtmag látható. A H2 képen a nyilak a két ősmagvat, a háromszög a sarki testet jelzi.

A második csoportba tartoznak azok a mutánsok, amelyekben az Importin- β kötésért (Δ IBB), az NLS kötésért (Δ NLSB) és a CAS fehérje kötéséért (Δ CASB) felelős aminosavakat cseréltük ki alaninra. Ezek a mutánsok nem képesek a *D14* legyek hibás petefejlődésének tökéletes menekítésére, jelezvén, hogy ezek a domének fontos szerepet játszanak az Importin- α 2 fehérje petefejlődésben betöltött funkciójában. Ezek közül is a Δ NLSB és a Δ CASB mutánsok hatása a legerősebb, hiszen a peterakási gyakoriságukban (2. Táblázat) és a ritkán lerakott peték alakjában is teljes mértékben megegyeztek a *D14* mutáns esetében tapasztaltakkal (15. ábra B,D,E). A Δ IBB mutáns hasonló, de ennél valamivel gyengébb fenotípust mutatott. A peterakási gyakorisága megközelítette a

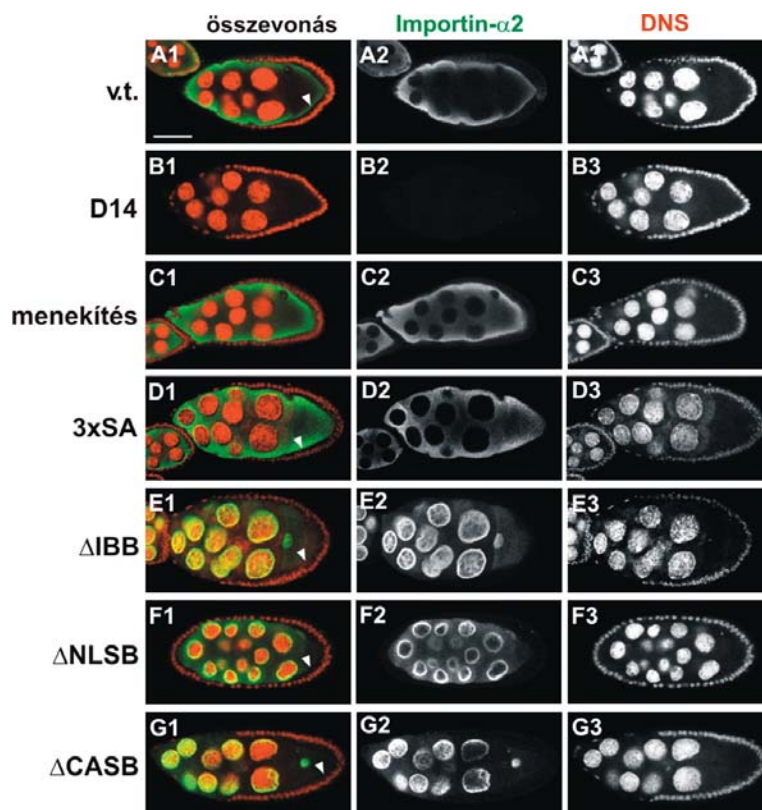
foszforilációs mutánsoknál tapasztalt gyakoriságot, viszont a peték alakja 14%-ban vad típusúnak és 86%-ban mutánsnak bizonyult. Habár a mutáns peték mérete majdnem mindig eléri a vad típusú peték méretét, dorzális függelékeik részlegesen összeolvadnak (15. ábra C). Ez arra utal, hogy az Importin- β kötő domén is fontos szerepet játszik a *Drosophila* petefejlődés során.

Ezek a vizsgálatok azt is jelzik, hogy az Importin- α 2 fehérje általunk felfedezett új funkciójához az Importin- β -kötő és az NLS-kötő domének fontosak. Ezek a domének az Importin- α fehérjék ezidáig leírt funkcióiban (a sejtmagi transzport a mikrotubulusok polimerizációja és a sejtmagmembrán összeszerelődés) úgyszintén fontosnak bizonyultak.

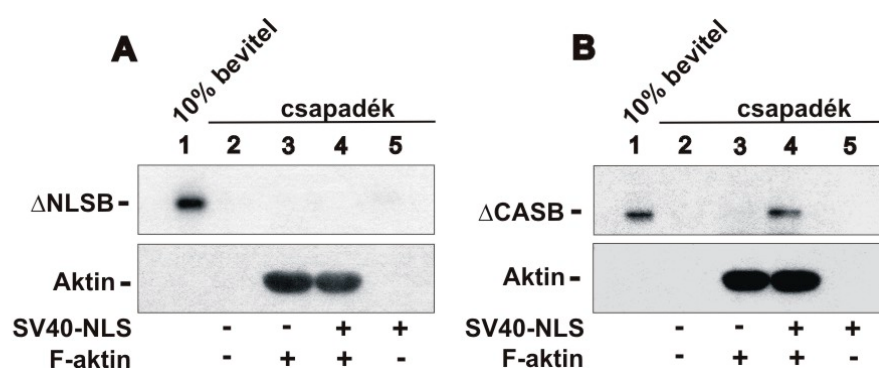
4.9. Az Importin- α 2 fehérje citoplazmás jelenléte szükséges a normális petefejlődéshez

Miután a különböző mutáns Importin- α 2 fehérjék egy része nem képes helyreállítani a *D14* legyek petefejlődését, kíváncsiak voltunk azok sejten belüli eloszlásukra. Poliklonális anti-Importin- α 2 ellenanyagot használva megállapítottuk, hogy a *D14* háttéren kifejeződő vad típusú Importin- α 2 fehérje az endogén Importin- α 2 fehérjével teljes mértékben megegyező eloszlást mutatott (16. ábra C1-C3). Hasonló eloszlást figyeltünk meg mindazon mutáns Importin- α 2 fehérjék esetében is, melyek képesek voltak menekíteni a *D14* peték dumpless fenotípusát (16. ábra D1-D3). Ezért megállapítható, hogy sem az átlunk mutagenézissel módosított foszforilációs oldalláncok, sem pedig a dimerizációs aminosavak nem befolyásolják az Importin- α 2 fehérje sejten belüli eloszlását és annak a petefejlődés során kifejtett funkcióját.

Azonban mindazok a mutánsok (Δ IBB, Δ NLSB és Δ CASB), melyek nem tudták menekíteni a *D14* peték dumpless fenotípusát, a vad típusú Importin- α 2 fehérjéhez képest jelentős mértékű sejten belüli eloszlás változást mutattak. A Δ CASB mutánsban azokat az aminosavakat cseréltük ki alaninra, melyek az Importin- α fehérjék sejtmagi export receptorának a CAS fehérjének a megkötéséért felelősek (Tekotte és mtsai., 2002). Ezért az Importin- α 2 fehérje érthető módon a sejtmagokban marad (16. ábra G1-G3). Ez egyben azt is jelenti, hogy az Importin- α 2 fehérje a petefejlődés során biztosan bemegy a sejtmagba.



16. ábra. A különböző mutáns Importin- $\alpha 2$ fehérjék sejten belüli eloszlása a petekamrákban. A *D14* null mutáns háttérén (B1-B3) csírvonal specifikus driverrel meghajtott vad típusú (C1-C3) és mutáns (D1-G3) Importin- $\alpha 2$ fehérjéket poliklonális anti-Importin- $\alpha 2$ ellenanyaggal festettük (zöld). A DNS festésére TOTO3 DNS festéket használtunk (piros). A háromszögek a ΔIBB , $\Delta NLSB$ és a $\Delta CASB$ mutáns fehérjék hiányát jelzik a kortikális aktinvázon. A mércevonala hossza 50 μm .

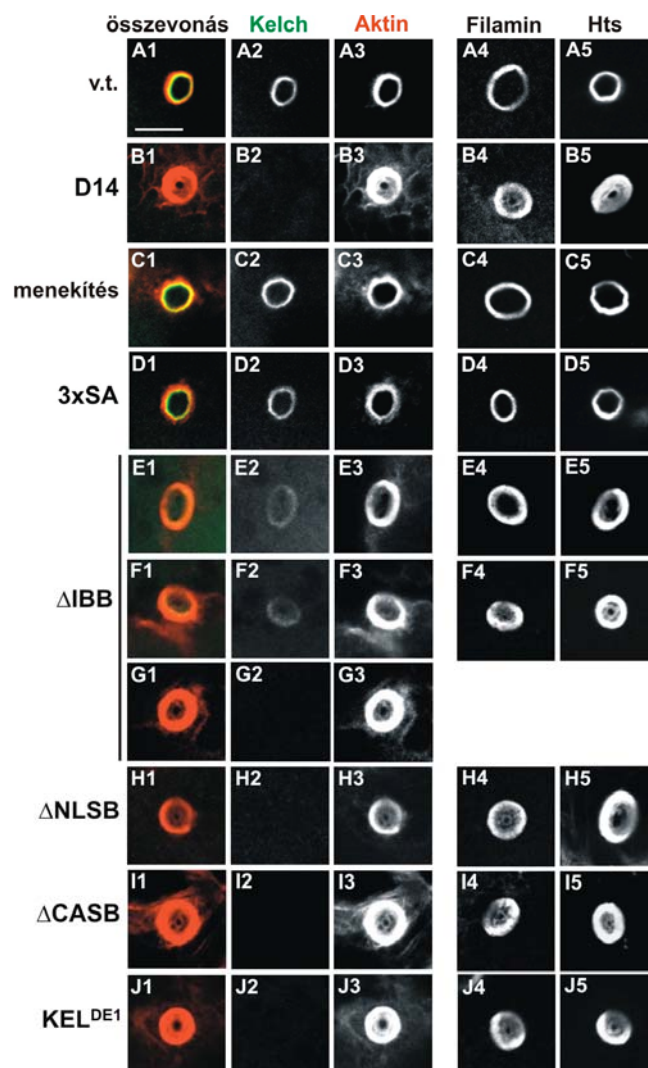


17. ábra. A mutáns Importin- $\alpha 2$ fehérjék F-aktin kötésének *in vitro* vizsgálata. *D14* háttérén a $\Delta NLSB$ (A) és a $\Delta CASB$ (B) mutáns fehérjéket termelő ováriumok extraktumaihoz (1. oszlop) *in vitro* polimerizált F-aktint (3. oszlop), NLS oligopeptidet (5. oszlop), vagy mindkettőt (4. oszlop) vagy egyiket sem (2. oszlop) adtuk hozzá, majd 10%-os glicerol párnára vittük. 150 000 g-vel az F-aktint üleptettük és megvizsgáltuk mely mutáns Importin- $\alpha 2$ fehérje képes NLS jelenlétében az aktinnal együtt ülepedni. A Western blot előhívásához anti-Importin- $\alpha 2$ (felső panelek) és anti-aktin (alsó panelek) ellenanyagokat használtunk.

A Δ IBB (16. ábra E1-E3) és a Δ NLSB (16. ábra F1-F3) mutáns Importin- α 2 fehérjék is a sejtmagmembránon illetve a sejtmagokban halmozódnak fel. Több közlemény arról számol be, hogy az Importin- β megkötésére nem képes Importin- α fehérjék (Δ IBB) csak nagyon alacsony affinitással tudnak NLS peptidet kötni (Hodel és mtsai., 2001). Ez magyarázhatja azt is, hogy miért veszíti el a Δ IBB mutáns fehérje a kortikális aktinvázhoz történő kihorgonyzódás képességét. A Δ IBB mutáns fehérjével szemben a Δ NLSB fehérje egyáltalán nem képes NLS kötésére. Ezt támasztja alá az *in vitro* F-aktin kötő képesség vizsgálatára végzett kísérlet is (17. ábra). A Δ NLSB mutáns fehérjét túltermelő ovárium kivonathoz SV40-NLS peptid jelenlétében hiába adtunk *in vitro* polimerizált F-aktint, a mutáns fehérje nem volt képes megkötni az NLS szekvenciát és így az F-aktinhoz sem tudott kötődni (17. ábra A). Ezzel szemben az ugyancsak a sejtmagban felhalmozódó Δ CASB fehérje *in vitro* képes NLS jelenlétében az F-aktinhoz kötődni (17. ábra B). Ez azt jelenti, hogy a Δ CASB fehérje elvileg képes lenne a szubkortikális aktinvázhoz kötődni, de a sejtmagi "becsapdázása" miatt gyakorlatilag teljes mértékben eltűnik a citoplazmából és a kortikális aktinvázról. Így a fenti kísérletekből világosan látszik, hogy az Importin- α 2 fehérje funkciója szempontjából fontos annak citoplazmás jelenléte is.

4.10. Az Importin- α 2 fehérje komplexet képez a Kelch fehérjével

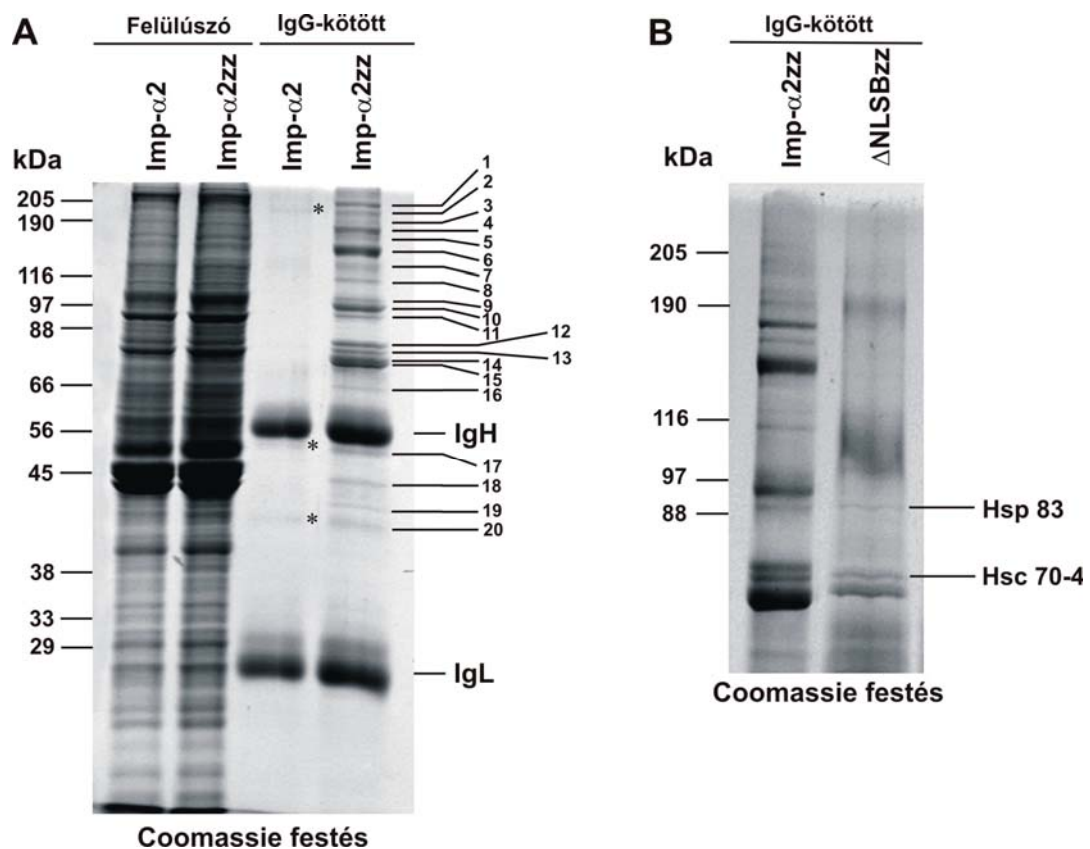
A Δ IBB, Δ NLSB és a Δ CASB mutáns peték dumpless fenotípusa (15. ábra) arra utal, hogy az ezekben a mutánsokban érintett domének fontos szerepet játszhatnak a gyűrűcsatornák szerkezetének fenntartásában illetve a Kelch fehérje normális felhalmozódásában a gyűrűcsatornában. Ezért monoklonális anti-Kelch ellenanyag segítségével megvizsgáltuk a Kelch fehérje eloszlását az *in vitro* mutagenézissel előállított mutánsok gyűrűcsatornáiban (18. ábra). Várározásainknak megfelelően azt találtuk, hogy az S37A, S56A, S98A, 3xSA és a Δ DIM mutáns petekamrák gyűrűcsatornáiban normális fenotípusúak és bennük a Kelch fehérje is normálisan felhalmozódik (18. ábra D1-D5). A két legerősebb fenotípust mutató Δ NLSB (18. ábra H1-H5) és Δ CASB (18. ábra I1-I5) mutáns gyűrűcsatornáiban azonban a Kelch fehérje nem kimutatható. Ez a *D14* gyűrűcsatornákkal teljes mértékben megegyező mutáns fenotípust eredményez.



18. ábra. Az *in vitro* mutagenézissel előállított új *importin- α 2* allélek hatása a gyűrűcsatornák szerkezetére. *D14* háttéren vad típusú (C1-C5) és a mutáns Importin- α 2 fehérjéket (D1-I5) kifejező ováriumokban kettős festéssel megfestettük az aktint (piros) (A2,B2,C2,D2,E2,F2,G2,H2,I2,J2) és a Kelch fehérjét (zöld) (A3,B3,C3,D3,E3,F3,G3,H3,I3,J3). A Filamin (A4,B4,C4,D4,E4,F4,G4,H4,I4,J4) és a Hts (A5,B5,C5,D5,E5,F5,G5,H5,I5,J5) festést külön-külön végeztük el.

A Δ IBB petekamrák gyűrűcsatornáinak egy részében nagyon gyengén, de ki tudtuk mutatni a Kelch fehérje jelenlétét. Ebben a mutánsban 73%-ban (18. ábra F1-G3) *D14*-szerű és 27%-ban (18. ábra E1-E5) csak gyengén beszűkült mutáns gyűrűcsatornák figyelhetők meg. Ezzel megmagyarázható, miért mutatnak csupán gyenge dumpless fenotípust a Δ IBB mutáns peték (15. ábra C). Miután ismeretes az a tény is, hogy a Δ IBB fehérje csak kis affinitással képes az NLS peptidet megkötni, a Δ IBB mutáns gyűrűcsatornáknál tapasztalt gyenge Kelch fehérje felhalmozódás felveti annak a lehetőségét, hogy az Importin- α 2 fehérje NLS közvetítésén keresztül szabályozza a Kelch fehérje felhalmozódását a

gyűrűcsatornában. Ennek vizsgálatára Importin- α 2 fehérje komplexeket tisztítottunk ováriumokból.



19. ábra. Az Importin- α 2 fehérje az ováriumban legalább 20 másik fehérjével komplexet képez. Vad típusú (A,B), és mutáns Δ NLSB (B) Importin- α 2 fehérjét ProteinA (zz) epitóppal jelöltük és vad típusú háttérén csírvonal specifikus Gal4 driver segítségével az ováriumokban fejeztettük ki. Ezekből az ováriumokból kivonatot készítettünk és IgG-Sepharose hozzáadásával, az IgG-hez kötött ProteinA-val jelölt Importin- α 2 fehérjét a hozzájuk kapcsolódó többi fehérjével együtt tisztítottuk. 12%-os (A) és 10%-os (B) SDS-PAGE géleken Coomassie festéssel jelenítettük meg a tisztított fehérjét. Az azonosított fehérjék a 3. Táblázatban tekinthetők meg. Csillaggal jelöltük az aspecifikusan tisztított fehérje sávokat.

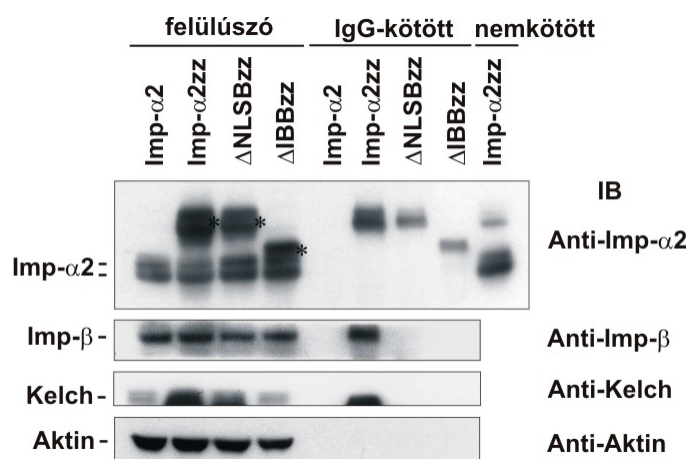
A vad típusú, valamint a Δ IBB és a Δ NLSB mutáns Importin- α 2 fehérjét ProteinA epitóppal láttuk el és azokat ováriumokban túltermeltettük. Miután meggyőződünk arról, hogy a ProteinA epitóp nem zavarja meg az Importin- α 2 fehérje normális működését, a fenti ováriumok kivonataiból nagy sebességű (100 000 g) felülúszót készítettünk. IgG-Sepharose hozzáadásával ProteinA epitópon keresztül kitisztítottuk az Importin- α 2 fehérje kölcsönható partnereit majd azokat MALDI tömegspektrometriás analízis révén azonosítottuk (19. ábra) (Shevchenko és mtsai., 1996).

sáv	Mw	név
1	220	CG4453, nukleoporin
	224	CG8103-PA, Mi-2
2	191	CG11375
	158	CG12819-PA
3	121	centroszóma asszociált fehérje
4	129-133	Brahma asszociált fehérje, 155 kDa
5	130-132	CG14712
	131	Brahma asszociált fehérje 155 kDa
	129	moira
	110	CG7003
	105	CG7752
6	107	CG7843
	120	transzkripció regulátor dre4
	118	ISWI fehérje
	108	csíravonal transzkripció faktor 1, Gnf1
7	127	DDB1
8	79	Brahma asszociált fehérje 111 kDa
9	89	transzlációs endoplazmatikus reikulum ATPáz Ter94
10	100	Importin-beta (Ketel)
11	85	TXBP181-like, CG2072
12	71	lamin prekursor
13	58	Importin-alpha2-zz
	71	Heat shock 70 kDa
	71	lamin
14	58	Importin-alpha2-zz
15	58	Brahma asszociált fehérje 60 kDa
16	46	CG8863
	50	Ef1 alpha 48D géntermék
17	42	Snf5-related 1
	42	aktin-87E
18	36-41	Bc:LD06837 géntermék
	39	CG8722
19	40	CG12233

3. Táblázat. Az Importin- α 2 fehérjekomplex tagjai. A táblázatban a 19. ábrán bemutatott és megszámozott fehérje sávok MALDI-val azonosított fehérjeit mutatja. Egy fehérje sávon belül gyakran több hasonló méretű fehérjét is azonosítottunk. Érdekes észrevétel, hogy az azonosított fehérjék közül nagyon sok a kromatin remodellingben résztvevő fehérje.

A vad típusú Importin- α 2 fehérje legalább 20 másik fehérjével alkot komplexet az ováriumban (19. ábra A,B, 3. Táblázat), míg a Δ IBB és a Δ NLSB mutáns Importin- α 2 fehérjék csupán néhány fehérjével (19. ábra B). Ilyen fehérjék például a Hsp 83 és a Hsc 70-4 (19. ábra B), amelyek valószínűleg a Δ IBB és a Δ NLSB mutáns Importin- α 2 fehérjék szerkezetének fentartása végett kapcsolódnak hozzájuk. Azonban a többi fehérje, amivel az Importin- α 2 *in vivo*

komplexet alkot nem képez hasonló komplexet a Δ IBB és a Δ NLSB mutáns Importin- α 2 fehérjékkel. Ez egyben azt is jelenti, hogy az Importin- α 2 fehérje molekuláris kölcsönhatásainak túlnyomó többségéhez az NLS kötésben szerepet játszó domének szükségesek.

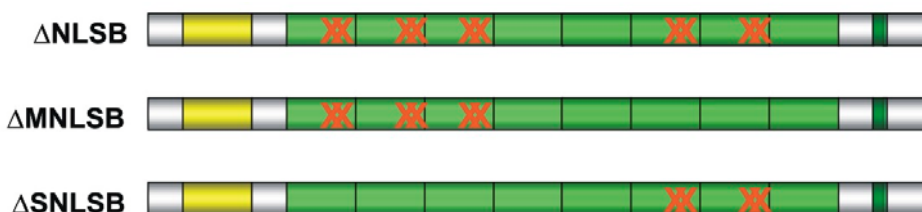


20. ábra. A tisztított Importin- α 2 fehérjekomplexek vizsgálata Western blot segítségével. A vad típusú és mutáns Δ NLSB és Δ IBB ProteinA (zz)-jelölt Importin- α 2 fehérjéket IgG-Sepharose segítségével tisztítottuk (felső panel). Csillaggal jelöltük a vad típusú háttéren kifejeztetett ProteinA-jelölt fehérjéket. Specifikus ellenanyagok segítségével (anti-Importin- α 2, anti-Importin- β , anti-Kelch és anti-Aktin) megvizsgáltunk néhány, az Importin- α 2 fehérjéhez kapcsolódó más fehérjét. Az aktin nincsen jelen az Importin- α 2 komplexekben, mert a nagyfordulatszámú felülűszóban már csak monomer formában fordul elő (alsó panel).

Annak vizsgálatára, hogy vajon az Importin- α 2 fehérje képes-e komplexet képezni a Kelch fehérjével és így szabályozni annak felhalmozódását a gyűrűcsatornában, részletesebb elemzésnek vetettük alá a kitisztított fehérjekomplexeket. Monoklonális anti-Kelch ellenanyag segítségével Western-blot alkalmazásával kimutattuk (20. ábra), hogy a vad típusú Importin- α 2 fehérje valóban komplexet képez a Kelch fehérjével. Ezzel szemben a Δ IBB és a Δ NLSB mutáns Importin- α 2 fehérjék nem voltak képesek hasonló komplexek képzésére (20. ábra). Ez egybevág az előző megfigyeléseinkel, miszerint az Importin- α 2 fehérje NLS szekvencián keresztül szabályozza a Kelch fehérje felhalmozódását a gyűrűcsatornában. Ennek ellenére a Kelch fehérje nem rendelkezik klasszikus NLS szekvenciával, csupán néhány bázikus aminosavakból álló szakasszal. Így könnyen elképzelhető, hogy az Importin- α 2 és a Kelch fehérje közötti kölcsönhatás egy harmadik, NLS tartalmú fehérjén keresztül valósul meg.

4.11. Az *importin- α 2* gén domináns negatív allélja

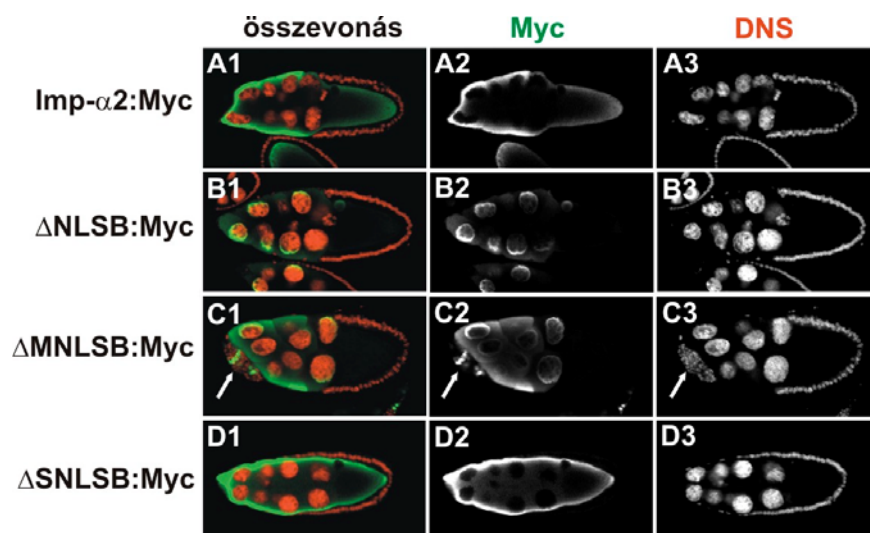
Az Importin- α fehérjék NLS-kötésért felelős konzervált WxxxN motívumai két doménba, egy nagy és egy kis NLS-kötő doménba szerveződnek (részletezve az Irodalmi áttekintés fejezetben). A Δ NLSB mutánsban mindkét domén NLS kötésért felelős triprofán (W) és aszparagin (N) aminosavait alaninra cseréltük. Mivel az Importin- α 2 és a Kelch fehérjék közötti interakció NLS szekvencián keresztül valósul meg, fontosnak tartottuk részletesebben megvizsgálni az Importin- α 2 fehérje NLS kötésért felelős oldalláncait. Ezért két újabb mutánst állítottunk elő, melyekben külön-külön csak a nagy (Δ MNLSB, M=major) illetve csak a kis (Δ SNLSB, S=small) NLS-kötő domént mutagenizáltuk (21. ábra). Az előzőekhez hasonlóan ezeket a mutációkat is *D14* háttéren vizsgáltuk. Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a Δ SNLSB mutáns tökéletesen menekíti a *D14* legyek hibás petefejlődését, vad típusú petéket eredményezve. Azonban ezekben a látszólag normális petékben sosem indul el az embrió fejlődése. Ezzel szemben a Δ MNLSB nem képes a *D14* legyek hibás petefejlődését menekíteni. Ez azt jelenti, hogy az Importin- α 2 fehérjének a pefejlődésben betöltött funkciója szempontjából csak a nagy NLS-kötő domain játszik kritikus szerepet.



21. ábra. Az Importin- α 2 fehérje nagy és kis NLS-kötő doménjének elválasztása. A Δ NLSB mutánsban mindkét NLS-kötő domént egyszerre mutagenizáltuk, a Δ MNLSB mutánsban csak a nagy, míg a Δ SNLSB mutánsban csak a kis NLS-kötő domént rontottuk el. A mutációs pontokat piros X jelzi.

A Δ MNLSB mutáns további vizsgálatával megállapítottuk azt is, hogy ennek a mutációnak erős domináns negatív hatása van (vad típusú és *D14* háttéren egyaránt). Csíravonal specifikus nanos-Gal4 driver segítségével termeltetett Δ MNLSB fehérje az ováriumok csíravonal sejtjeinek teljes hiányához vezet. Ezen érdekes megfigyelés további vizsgálata érdekében Myc epitóppal jelöltük meg a domináns negatív Δ MNLSB fehérjét. Miután megbizonyosodtunk arról, hogy a

petefejlődés során az Importin- α 2 fehérje funkcióját nem zavarja a Myc epitóp, vad típusú háttéren megvizsgáltuk a Δ MNLSB:Myc fehérje sejten belüli eloszlását (22. ábra). Hasonlóan a Δ NLSB:Myc fehérjéhez a Δ MNLSB:Myc fehérje is a csíravonal eredetű sejtek sejtmagmembránjain halmozódott fel, míg a petefejlődés tökéletes menekítésére képes Δ SNLSB:Myc fehérje a vad típusú Importin- α 2:Myc fehérje eloszlását követte (22. ábra).



22. ábra. Az NLS-kötésért felelős domének elrontása befolyásolja az Importin- α 2 fehérje sejten belüli eloszlását. Myc epitóppal jelölt (zöld) vad típusú (A1-A3) és mutáns Δ NLSB (B1-B3), Δ MNLSB (C1-C3) és Δ SNLSB (D1-D3) fehérjéket vad típusú háttéren nos-Gal4 driver segítségével fejeztettük ki. A DNS festésére TO-PRO3 DNS festéket használtunk (piros). A nyíl a domináns negatív hatás által előidézett kisméretű germáriumot mutatja, amiből további petekamrák már nem differenciálódnak.

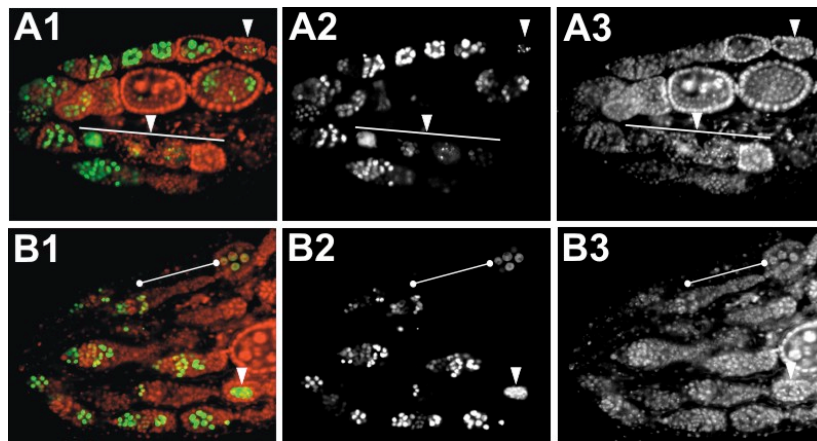
Ez felvetette annak a lehetőségét, hogy a sejtmagmembránon illetve a sejtmagokban felhalmozódó többi mutáns Importin- α 2 fehérjének is lehet hasonló hatása. Ezért megvizsgáltuk, hogy az általunk készített többi *in vitro* mutagenézissel előállított mutáns Importin- α 2 fehérjék közül van-e másoknak is hasonló domináns negatív hatása. Azt találtuk, hogy egyedül a Δ NLSB mutáns mutatott 14,6%-os domináns negatív hatást. Azonban ez is csupán mozaikos csíravonal hiányos ováriumokat eredményezett, melyekben csupán az egyik oldali ovárium mutatott mutáns fenotípust. Ez azt jelenti, hogy a Δ NLSB és a Δ MNLSB mutánsok közötti hasonlóságot jelentő nagy NLS-kötő domain mutációja kitüntetett szerepet játszik a domináns negatív hatás kialakításában. Azonban a két mutáns közötti különbséget jelentő kis NLS-kötő domain megléte ezt a hatást jelentős

mértékben képes erősíteni. Végül a vad típusú Importin- α 2 fehérjének a lehetséges domináns negatív hatását is megvizsgáltuk úgy, hogy azt erősen túltermeltettük az ováriumokban. Azt találtuk, hogy három UAS-importin- α 2 transzgen és két nanos-Gal4 driver együttes jelenléte sem tudott semmiféle észlelhető domináns negatív hatást eredményezni.

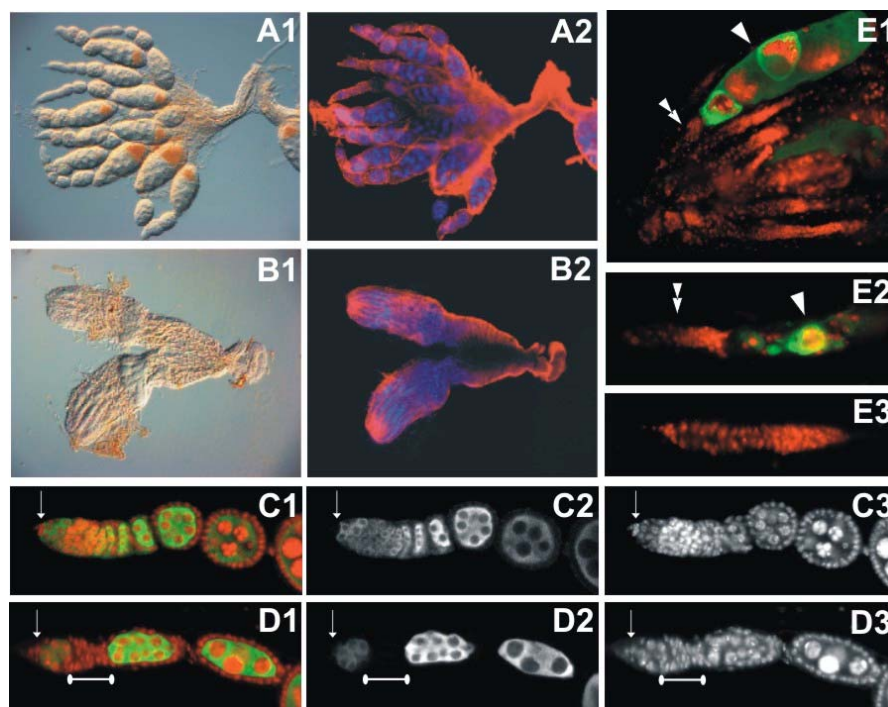
4.12. A domináns negatív allél a csíravonal eredetű sejtek életképességét érinti

A frissen kikelt Δ MNLSB legyek ováriumainak 50%-ában már a kikelés pillanatában nincsen normális petekamra (24. ábra B1,B2). A legyek másik felének ováriumaiiban viszont a kikelésük után számított első hét végéig még megfigyelhető néhány petekamra, melyek ritkán ugyan, de képesek normális alakú petékké differenciálódni. Ezekben az ováriumokban az utolsóként kialakult petekamrák csúcsán kis méretű üres germáriumok láthatóak, amelyekből további petekamrák már nem differenciálódnak, annak ellenére, hogy bennük a Δ MNLSB:Myc fehérje jelenléte még jelzi a csíravonal eredetű sejtek meglétét (22. ábra C1-C3). Az 1-2 hetes ováriumokban már nagyon gyakoriak az olyan petekamrákkal, melyek csíravonal eredetű sejtjei az elhalás jeleit mutatták (23. ábra A1-B3). A kikelés utáni 20. napon már gyakorlatilag egyetlen mutáns ováriumban sem találunk csíravonal eredetű sejtet.

Annak vizsgálatára, hogyan és miért ürülnek ki a csíravonal eredetű sejtek a Δ MNLSB ováriumokból, fiatal 1-2 napos ováriumokat gyűjtöttünk. A csíravonal eredetű sejtek specifikus megjelenítésére anti-Vasa (24. ábra) és anti-Orb (be nem mutatott eredmények) ellenanyagokat használtunk. A frissen kikelt Δ MNLSB legyek felének germáriumaiiban a kikelés pillanatában még vannak őscsírasejteket. Belőlük azonban a néhány normálisan kialakult ciszta után már csak ritkán alakult ki újabb ciszta, vagyis a Δ MNLSB germáriumok (24. ábra D1-D3), a vad típushoz képest (24. ábra C1-C3), kevesebb számú osztódó cisztoblasztot tartalmaznak. Ezért a Δ MNLSB germáriumok 2. és 3. régiója sokkal üresebbnek tűnik, mint a vad típusú germáriumok ugyanezen régiói.



23. ábra. A Δ MNLSB mutáns Importin- α 2 fehérje domináns negatív hatása az ováriumokban. A Myc-jelölt Δ MNLSB (A1-B3) fehérjét (zöld) nos-Gal4 driver segítségével fejeztettük ki. A DNS piros színben látható. A háromszögekkel az elhaló petekamrákat jelöltük. A pontban végződő vonal egy küresedett petecsövet mutat.

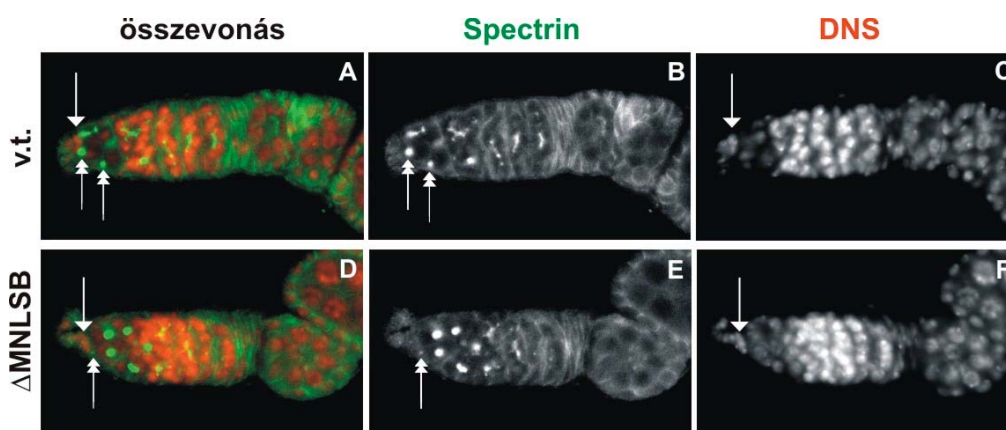


24. ábra. A Δ MNLSB domináns negatív Importin- α 2 fehérje a csíravonal eredetű sejtek pusztulását idézi elő. Vad típusú háttéren kifejeztettük a vad típusú Importin- α 2 fehérjét (A1,A2) valamint a Δ MNLSB mutáns fehérjét (B1,B2). Az 1-2 napos ováriumokat aktinra (piros) és DNS-re (kék) festettük (A2,B2). Az A1 és B1 képeket Nomarski optikával készítettük. Vasa festéssel (zöld) a vad típusú (C1-C3) és mutáns Δ MNLSB (D1-D3) germáriumok csíravonal eredetű sejtjeit festettük. C1-D3-ig a nyílak a terminális filamentumok bazális sejtjeinek pozícióját mutatják. A pontban végződő vonal a germárium üres részét mutatja. Az E1 és E2 képeken Vasa festéssel (zöld) a Δ MNLSB mutáns ováriumok utolsóként észlelhető csíravonal eredetű abnormális cisztái láthatóak (háromszög), melyek után a petecsöveget sok kis méretű testi eredetű sejt tölti ki (kettős háromszög) (E3). A DNS piros színnel jelölt.

Ez az észrevétel azt jelzi, hogy a domináns negatív allél a ciszták korai fejlődését érinti.

Ezt erősíti meg az a megfigyelés is, miszerint az utolsó csíravonal eredetű sejt, amit Vasa festéssel még azonosítani tudtunk, már nem tudja befejezni a négy mitotikus osztódást és így egy abnormalis alakú és méretű, az elhalás jeleit mutató, csíravonal cisztává differenciálódik (24. ábra E1,E2). Végül a 3. hét végére már az összes csíravonal eredetű sejt eltűnik a petecsövekből és helyüket sok apró testi eredetű sejt tölti ki (24. ábra E3).

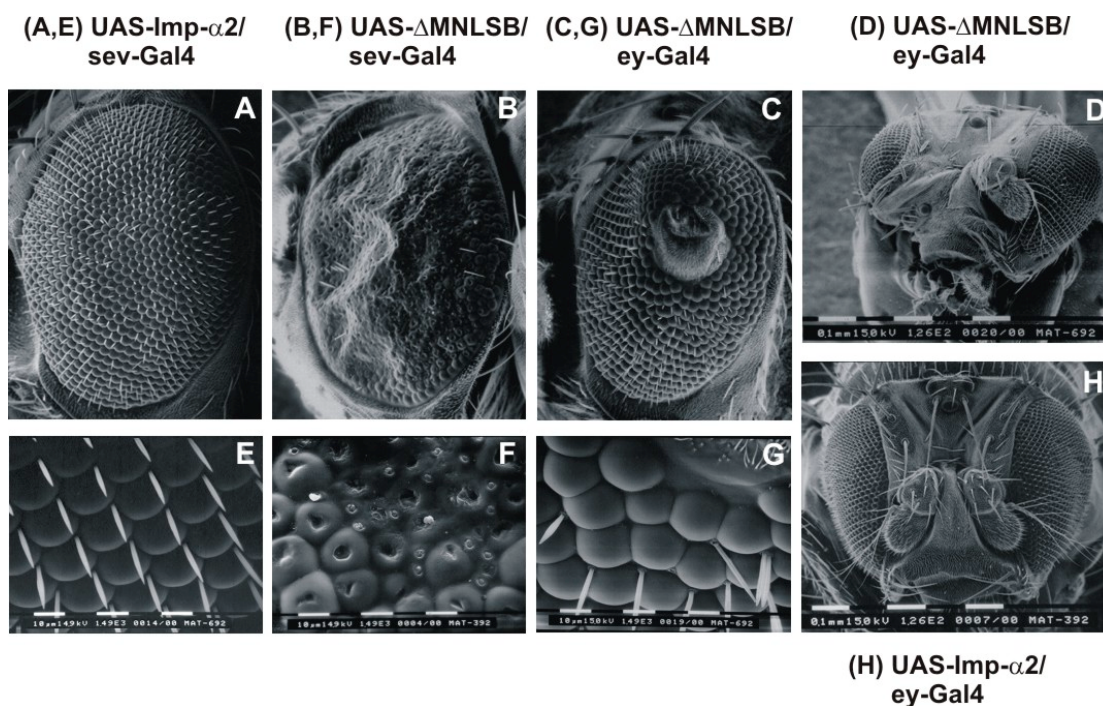
Az őscsírasejtek egyik jellegzetes citoplazmatikus sejt szerve a számos sejt váz alkotórészt, köztük a Spectrint is, magába foglaló spektroszóma. A spektroszómák az őscsírasejtek apikális részén találhatók szorosan kapcsolódva azok plazmamembránjához a terminális filamentumok bazális sejtjeinek közvetlen szomszédságában (25. ábra A-C) (Lin és Spradling, 1993). A ciszta utódsejtjeit összekapcsoló fuzóma is jelentős mennyiségű Spectrin fehérjét halmoz fel (Lin és mtsai., 1994). A Δ MNLSB őscsírasejtjeinek részletesebb vizsgálata céljából megvizsgáltuk a Spectrin eloszlását ezekben a mutáns germáriumokban (25. ábra). Azt találtuk, hogy a vad típusú őscsírasejtekhez (25. ábra A-C) képest a Δ MNLSB őscsírasejtjei (25. ábra D-F) csak nagyon kis méretű spektroszómát tartalmaznak a terminális filamentumok bazális sejtjeinek közvetlen szomszédságában. Ez azt jelenti, hogy a Δ MNLSB mutáns germáriumokban az őscsírasejtek kialakulnak ugyan, de azok nem teljesen normálisak.



25. ábra. Az őscsírasejtek vizsgálata. 2-3 napos vad típusú (A-C) és mutáns Δ MNLSB (D-F) germáriumokat Spectrin fehérjére (zöld) és DNS-re (piros) festettük. Az egyfejtű nyilak a terminális filamentumok bazális sejtjeinek pozícióját, míg a kétfejtű nyilak a spektroszómákat jelzik.

4.13. A domináns negatív allél sejthalált idéz elő

A fenti eredményeink felvetették annak a lehetőségét, hogy a domináns negatív Δ MNLSB fehérje a sejtek életképességét érinti. Ezért megvizsgáltuk, hogy a Δ MNLSB mutáns fehérje okoz-e domináns negatív hatást más olyan szövetben is, ahol az Importin- α 2 fehérje eredetileg is megnyilvánul. Ennek vizsgálatára különböző driverek (sev-Gal4, ey-Gal4) segítségével szövetspecifikusan a szem-antenna diszkuszkokban fejeztettük ki a Δ MNLSB fehérjét (26. ábra).



26. ábra. A Δ MNLSB domináns negatív hatásának vizsgálata *Drosophila* szemekben. A szemeket kis (A,B,C,D,H) illetve nagy nagyításon (E,F,G) vizsgáltuk. Vad típusú háttérén a vad típusú Importin- α 2 fehérje túlermelletése sev-Gal4 (A,E), vagy ey-Gal4 (H) driver segítségével nem idézett elő észlelhető elváltozást. Viszont a Δ MNLSB domináns negatív hatású Importin- α 2 fehérje kifejeztetése sev-Gal4 driver (B,F) segítségével az ommatídiumok R7/R8 receptor sejtjeinek pusztulásához vezet. Az ey-Gal4 drivert (C,G,D) használva a Δ MNLSB domináns negatív hatású fehérje a szem-antenna diszkuszkokban sejthalált idézett elő, ami a csápok és szemek redukciójában nyilvánul meg (D).

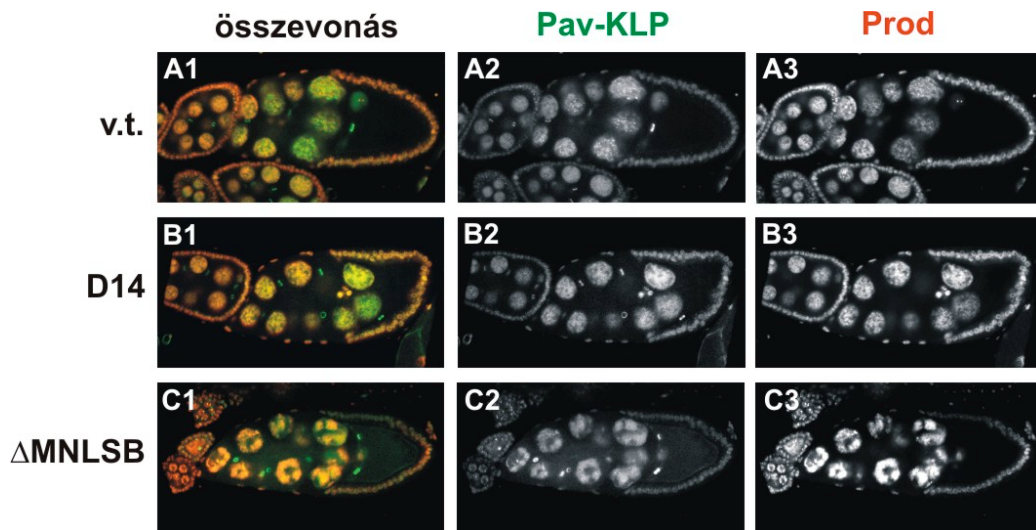
Az ommatídiumok 7. és 8. fotoreceptor sejtjeiben (R7/R8) működő sev-Gal4 driver segítségével túlermellettük a vad típusú Importin- α 2 fehérjét (26. ábra A,E), azonban ez semmilyen észlelhető hatást nem okozott. A Δ MNLSB fehérje túlermelése ugyanezen driverrel durva szemű fenotípust idézett elő (26. ábra B,F). Az ommatídiumok közepén lévő R7/R8 fotoreceptorok elhalása következtében az ommatídiumok közepe üresnek tűnt, kráterszerűen bemélyedő

formát eredményezve. A Δ MNLSB fehérje túltermelése egy másik driverrel, az ey-Gal4-el, ugyancsak jelentős elváltozásokat eredményezett (26. ábra C,G,D). A szem-antenna diszkuszkok jelentős sejt pusztulása olyan átalakulásokat idézett elő, mint például a gyakori szem és csáp redukció (26. ábra D) illetve a sejtek elhalását követő regeneráció során a szemekből kinövő csáp (26. ábra C,G). A vad típusú fehérje túltermelése ezen driverrel sem mutatott negatív hatást (26. ábra H). Ezek az eredmények azt bizonyítják, hogy a Δ MNLSB fehérje domináns negatív hatása sejthalált okoz. Miután ez a hatás minden olyan szövetben előidézhető ahol a Δ MNLSB fehérjét túltermeltük, felmerült annak a lehetősége, hogy a domináns negatív hatás valamilyen általános molekuláris mechanizmust érint.

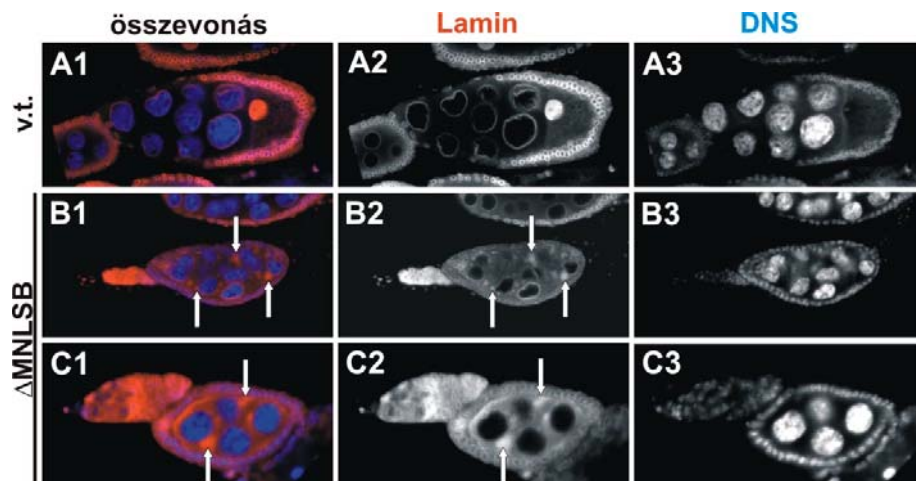
Az Importin- α fehérjék IBB doménjükön belül egy endogén NLS peptidet hordoznak, ami egyben autoinhibíciós doménként is funkcionál. Az Importin- β fehérje távollétében az IBB domén egyfajta hurkot képezve visszahajlik a saját nagy NLS-kötő doménje fölé ami megköti a saját NLS peptidét. Ilyen állapotban az Importin- α fehérje nem képes más fehérjék NLS szekvenciáinak a megkötésére. A saját NLS peptid megkötését csak az Importin- β fehérje tudja megakadályozni azáltal, hogy az Importin- α fehérje IBB doménjét megköti és ezáltal lefedi a saját NLS peptidét. Így egyuttal lehetővé teszi, hogy az Importin- α más fehérjék NLS peptidét megkösse. Elképzelésünk szerint a Δ MNLSB fehérje egy autoinhibícióra nem képes fehérje, ami számos NLS peptiddel rendelkező fehérje és az Importin- β fehérje állandó megkötésével gátolja azok funkcióit. Így merült fel annak a lehetősége is, hogy a Δ MNLSB fehérje esetleg az általános sejtmagi importot gátolja. Ezért megvizsgáltuk a különböző sejtmagi fehérjék (Pav-KLP, Prod, stb.) sejten belüli eloszlását a Δ MNLSB mutáns petekamrákban (27. ábra). Azt találtuk, hogy mindegyikük a vad típusú petekamrákban tapasztaltakkal megegyező módon, képesek bemenni a sejtmagba. Így megállapítható, hogy a Δ MNLSB fehérje nem gátolja az általános sejtmagi importot.

A sejtek elhalásának egyik lehetséges következményeként Lamin aggregátumokat találtunk a Δ MNLSB mutáns csíravonal cisztákban (28. ábra B1-C3). Miután ismert az a tény, hogy a *Caenorhabditis elegans* Importin- α 2 fehérjéje aktív szerepet játszik a sejtmagmembránok összeszerelődésében (Askjaer és mtsai., 2002; Geles és mtsai., 2002), felmerült annak a lehetősége is, hogy a

Δ MNLSB mutáns cisztákban talált Lamin aggregátumok nem a sejthalál következménye, hanem éppen annak kiváltó oka. Így elképzelhető, hogy a *Drosophila* Importin- α 2 fehérje is szerepet játszhat a sejtmagmembrán összeszerelődésében és hogy a domináns negatív fehérje ezt a folyamatot gátolja az egyes sejtosztódásokat követően.



27. ábra. A sejtmagi import normálisan működik a Δ MNLSB mutáns petekamrákban. Két sejtmagi fehérjét a Pav-KLP (zöld) (A2,B2,C2) és a Prod (piros) (A3,B3,C3) fehérjéket riportermolekulákként használtuk annak vizsgálatára, hogy a Δ MNLSB mutáns petekamrákban miként működik az általános sejtmagi import. Mindkét riportermolekula a Δ MNLSB mutáns petekamrákban (C1-C3) a vad típusú (A1-A3) és a *D14* (B1-B3) mutáns petekamrákban tapasztaltakhoz hasonlóan, normálisan felhalmozódik a sejtmagokban.



28. ábra. A Δ MNLSB mutáns petekamrák magmembránja nem alakul ki normálisan. A vad típusú (A1-A3) és mutáns Δ MNLSB (B1-C3) Importin- α 2 fehérjéket vad típusú háttérrel nos-Gal4 driverrel fejeztettük ki. A petekamrákat Laminra (piros) és DNS-re (kék) festettük. Nyilakkal a Δ MNLSB mutáns petekamrákban látható Lamin aggregátumokat jelöltük.

5. EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

Dolgozatomban a *Drosophila* Importin- α 2 fehérje egy új és váratlan funkcióját írtam le a petefejlődés során.

Az Importin- α 2 fehérje, szemben a sejtmagi transzport rendszer többi alkotóelemével, nem halmozódik fel a petekamra sejteinek magmembránján illetve sejtmagjaiban. Dinamikus egyensúlyi állapotban főleg citoplazmatikus eloszlást mutat és NLS-függő módon kihorgonyozódik a kortikális aktinvázhoz.

Az *importin- α 2^{D14}* null mutáns részletes jellemzésével megállapítottuk, hogy az Importin- α 2 fehérje fontos szerepet játszik a dajkasejtekből a petesejtbe irányuló anyag transzport folyamatban. Az Importin- α 2 fehérje hiánya a gyűrűcsatornák járatainak beszűküléséhez vezet.

Immunohisztokémiás kísérletekkel megállapítottuk, hogy az Importin- α 2 fehérje nem struktúrális alkotórésze a gyűrűcsatornáknak és azok szerkezetét közvetett úton befolyásolja. Kimutattuk, hogy az Importin- α 2 fehérje befolyásolja a gyűrűcsatorna komponens Kelch fehérje felhalmozódását a gyűrűcsatornáknak.

Immunoprecipitáció alkalmazásával igazoltuk, hogy az Importin- α 2 fehérje komplexet képez a Kelch fehérjével és így szabályozza annak felhalmozódását a gyűrűcsatornáknak.

Az *in vitro* előállított *importin- α 2* mutáns allélek részletes jellemzésével megállapítottuk, hogy az Importin- α 2 és a Kelch fehérjék közötti kölcsönhatás NLS-függő. Ugyanezen mutánsok segítségével azt is megállapítottuk, hogy az Importin- α 2 fehérje citoplazmatikus jelenléte szükséges funkciójának betöltéséhez.

Az Importin- α 2 fehérje NLS-kötő doménjének részletes elemzésével megállapítottuk, hogy az új citoplazmatikus funkcióhoz az Importin- α 2 fehérje nagy NLS-kötő doménje a fontos.

Az Importin- α 2 fehérje nagy NLS-kötő doménjének mutációja domináns negatív hatást idéz elő. Csírvonal eredetű sejtekben túltermeltetve, csírvonal hiányos ováriumok képződnek. Bármely más osztódó szövetben túltermeltetve ez a mutáns fehérje sejthalált idéz elő. Feltételezéseink szerint a nagy NLS-kötő domén elrontása egy általános molekuláris hatásmechanizmust érint.

6. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

6.1. Importin- α 2 és a sejtmagi transzport

Az interfázisos sejtekben az Importin- α fehérjék legfontosabb funkciója a sejtmagi anyagtranszport közvetítése. Azonban a hímivarsejtek fejlődése és az embrióonális sejtosztódások során azt tapasztalták, hogy az Importin- α 2 fehérje csak sejtciklus-függő módon végez sejtmagi importot (Török, és mtsai., 1995; Kussel és Frasch, 1995; Mason és mtsai., 2002; Giarrè és mtsai., 2002). Az osztódások korai profázisában jelenik meg a sejtmagokban és a mitózis végére már eltűnik a sejtmagokból. Ez arra utal, hogy az Importin- α 2 fehérje fontos szerepet játszhat olyan molekulák importjában amelyek a sejtosztódáshoz fontosak. Ilyenek lehetnek bizonyos ciklinek illetve olyan egyéb molekulák, amelyek a mitotikus mikrotubulusok kialakításában játszanak fontos szerepet. Az Importin- α 2 fehérje sejtmagi importban betöltött szerepét *in vitro* kísérletek is bizonyítják (Dirk Görlich és Török István, személyes közlés). Permeabilizált sejtekben az *in vitro* szintetizált vad típusú Importin- α 2 fehérje képes az NLS tartalmú riporter molekulák sejtmagi importjára, míg a Δ IBB mutáns Importin- α 2 fehérje erre nem képes. Ez közvetlenül igazolja, hogy az Importin- α 2 fehérje, hasonlóan a többi Importin fehérjéhez, potenciálisan képes a sejtmagi import közvetítésére.

A sejtmagi importot végző fehérjék jellegzetessége, hogy a dinamikus egyensúlyi állapotban a sejtmagmembránon illetve a sejtmagban felhalmozódnak. Ez két dologgal magyarázható. Egyrészt azzal, hogy a transzportfolyamat legidőigényesebb lépésének a számos Nukleoporin fehérjével történő kölcsönhatás és a NPK-eken keresztüli átjutás számít. Másrészt viszont, amikor az importkomplex bejut a sejtmagba, az lekötődve marad a NPK-ek belső kosárszerű részéhez, illetve a reciklizáció után a NPK-ek citoplazmatikus filamentjein. Ezért immunohisztokémiás módszerekkel ezek a fehérjék a sejtmagmembránon illetve a sejtmagban mutathatók ki. Azonban a *Drosophila* petekamráin belül, a dajkasejtekben és a petesejtben is azt találtuk, hogy az Importin- α 2 fehérje citoplazmatikus eloszlást mutat, észrevehető felhalmozódás nélkül a sejtmagokban illetve a sejtmagmembránokon. Alaposabban

megvizsgáltuk a germárium 2. régiójának osztódó cisztoblasztjait is, de ott sem találtunk semmiféle felhalmozódást a sejtmagmembránokon. A Δ CASB mutáns Importin- α 2 fehérje azonban már a petefejlődés legkorábbi stádiumaitól kezdődően felhalmozódik a sejtmagokban jelezvén, hogy az Importin- α 2 fehérje valamilyen alacsony szinten de mégis részt vesz a sejtmagi importban. A sejtmagi importban való részvételt erősíti az a megfigyelés is, hogy az Importin- α 2 fehérje kölcsönható partnereinek tisztítása során számos NPK komponenst illetve sejtmagi fehérjét azonosítottunk. Összességében tehát megállapíthatjuk, hogy az Importin- α 2 fehérje minden valószínűség szerint részt vesz a *Drosophila* petefejlődése során a sejtmagi transzportban, azonban ez valószínűleg csak speciális és kevés számú molekula sejtmagi importját jelenti. Ezt támasztja alá az a megfigyelés is, miszerint az Importin- α 2 null mutációja csupán sterilitást eredményez, míg az általános sejtmagi importban bizonyítottan résztvevő Importin- α 3 null mutációja letális (Máthé és mtsai., 2000).

A következő kérdésünk az volt, hogy vajon mi szabályozhatja az Importin- α 2 fehérje sejtmagi importját és annak nagy mennyiségű citoplazmatikus jelenlétét a petefejlődés során. Erre a kérdésre a választ a petekamrák F-aktin sejtvázáinak vizsgálata adta meg. Abban az esetben ugyanis, amikor a vad típusú petekamrák aktin vázát cytochalazin D-vel lebontottuk, az Importin- α 2 fehérje eltűnt a citoplazmából és felhalmozódott a csíravonal eredetű sejtek sejtmagjaiban. Az Importin- α 2 mutáns fehérjék sejten belüli eloszlásának, valamint mikrofilament-kötő képességének vizsgálatával igazoltuk, hogy az Importin- α 2 fehérje NLS-függő módon kötődik a kortikális aktin vázhoz. Így a kortikális aktin váz az Importin- α 2 fehérje sejtmagi importjának fő szabályzója. Ez azonban nem csupán az Importin- α 2 fehérjére érvényes, ugyanis hasonló NLS-függő F-aktin kötést tapasztaltunk az Importin- α 1 és - α 3, valamint a *ketel* gén által kódolt Importin- β 1 fehérje esetében is (be nem mutatott eredményeink alapján). Ez viszont azt jelentheti, hogy a kortikális aktin váz a sejtmagi transzportfolyamatok általános szabályozója lehet a *Drosophila* petefejlődése során. Ezért érdekes lenne általánosságban is megvizsgálni, hogy vajon a többi sejttypusban milyen szerepet játszik az aktinváz a sejtmagi transzport folyamatok szabályozásában illetve az NLS-alapú fehérjekomplexek kialakulásában.

Az *in vitro* előállított mutáns Importin- α 2 fehérjék menekítőképességének vizsgálata feltárta számunkra azt, hogy az Importin- α 2 fehérje citoplazmás jelenléte szükséges annak funkciójának ellátásához. Ugyanis amennyiben a sejtmagból történő reciklizációért felelős domaint elrontottuk (Δ CASB), az Importin- α 2 fehérje kiürült a citoplazmából és nem volt képes ellátni funkcióját. Ez az észrevétel, valamint a vad típusú fehérje magas citoplazmatikus jelenléte arra utal, hogy az Importin- α 2 fehérjének kell, hogy legyen egy citoplazmatikus funkciója is.

6.2. Importin- α 2 és a gyűrűcsatornák

Az Importin- α 2 fehérje hiánya nem csökkenti a legyek életképességét, viszont teljes nőstény sterilítást és részleges (~75%-os) hím sterilítást okoz (Gorjánácz és mtsai., 2002; Mason és mtsai., 2002; Giarre és mtsai., 2002). A *D14* null mutáns nőstény legyek kisméretű petéi arra utalnak, hogy a nőstény sterilitás oka a dajkasejtekből a petesejtbe irányuló anyag transzport akadályoztatásában lehet. Ez a transzport folyamat kétféle mechanizmus révén valósul meg: egy korai szelektív és egy későbbi nem-szelektív anyagáramlás révén (Mahajan-Miklos és Cooley, 1994; Theurkauf, 1994; Cooley és Theurkauf, 1994). A korai szelektív transzport folyamatot a petesejtből a gyűrűcsatornákon keresztül a dajkasejtbe átnyúló polarizált mikrotubulus hálózat teszi lehetővé (Pokrywka és Stephenson, 1991). Ezen mikrotubulusok mentén mozgó motorfehérjék számos, a dajkasejtben képződött mRNS-t és fehérjét szállítanak a petesejtbe.

Vizsgálataink szerint a *D14* homozigóta mutáns petekamrák abnormális gyűrűcsatornái nemcsak a későbbi nem-szelektív, de a korai szelektív anyagtranszportot is megzavarják. A dajkasejtben képződött morfogén molekulák, mint amilyen a *bicoid* és az *oskar* mRNS ugyan normálisan átkerülnek a petesejtbe, azonban azok nem mindegyike képes normálisan lokalizálódni a petesejt meghatározott részén (be nem mutatott eredményeink alapján). Míg a *bicoid* (Frohnhofer és Nüsslein-Volhard, 1986) és a *gurken* (Neuman-Silberberg és Schüpbach, 1993) mRNS-ek a vad típusú petesejthez hasonlóan a *D14* petesejtben is az anteriorális illetve az antero-dorzális sarokban halmozódnak fel, addig az *oskar* (Ephrussi és mtsai., 1991) mRNS hiányzik a *D14* petesejt

posteriorális részéről. Ugyanez érvényes egy másik morfogén molekulára a Mago nashi (Newmark és Boswell, 1994) fehérjére is, amely szintén hiányzik a *D14* petesejt posteriorális részéről. Ennek egyik magyarázata lehetne az is, hogy az Importin- α 2 fehérje hiánya a petesejt kortikális aktin vázában abnormális megvastagodáshoz vezet. Ez ugyanis elviekben előidézhethetné a kortikális aktinvázhoz kikötődő morfogén molekulák elmozdulását illetve hiányát a petesejt poszterior részéről (Jankovics és mtsai., 2002). Azonban a *kelch*^{DE1} null mutánsban, ami egy kizárólag a gyűrűcsatornában megfigyelhető fehérjét kódol, úgyszintén azt találtuk, hogy az *oskar* mRNS abnormális lokalizációt mutatott. Az esetek 91,5 %-ában az *oskar* mRNS abnormálisan, míg 8,5 %-ában normálisan, a petesejt posteriorális részén helyezkedett el. Ugyanakkor a *kelch*^{DE1} mutánsban a petesejt kortikális aktin váza nem szenvedett semmiféle hasonló, a *D14* petesejtben tapasztalt elváltozást (be nem mutatott megfigyeléseink szerint; Xue és Cooley, 1993). Ezek az észrevételek két dologra is magyarázatot adhatnak. Egyrészt arra, hogy a *D14* petesejtben a morfogén molekulák abnormális lokalizációjáért nem a kortikális aktin váz hibája a felelős, hanem a gyűrűcsatorna beszűkülése és a korai szelektív transzport folyamat akadályoztatása. Máskülönben ugyanis nem tapasztalnánk abnormális *oskar* mRNS lokalizációt a *kelch*^{DE1} mutáns petesejtben. Elképzeléseink szerint a *D14* és a *kelch*^{DE1} mutáns petekamrában számos olyan molekula, amely a morfogének normális lokalizációjáért felelősek nem kerülnek át kellő mennyiségben a petesejtbe, előidézve ezzel azok hibás lokalizációját. Másrészt viszont ezek a megfigyelések megerősítik, hogy a *D14* petesejtben tapasztalt kortikális aktinváz fellazulása nem a dajkasejtekből a petesejtbe irányuló transzport folyamat hibájának tudható be, hanem inkább az Importin- α 2 fehérje hiányának a kortikális aktinvázról. Ellenkező esetben ugyanis a *kelch*^{DE1} mutáns petekamrában is hasonló kortikáli aktin váz fellazulást kellene tapasztalnunk.

A későbbi nem-szelektív transzportfolyamat során a 11. stádiumtól kezdve a petekamrák dajkasejtjei apoptózissal elhalnak (Foley és Cooley, 1998; Chao és Nagoshi, 1999; Nezis et al, 2000), és azok teljes anyagtartalma a szubkortikális aktinháló és a hozzá kapcsolódó nem-izom jellegű miozin II motorfehérjék összehúzódnás révén átkerül a petesejtbe (Cooley és mtsai., 1992; Theurkauf és

mtsai., 1992; Wheatley és mtsai., 1995; Edwards és Kiehart, 1996). Ezért ezt a folyamatot gyakran dumping-nak nevezik.

A dajkasejtekből a petesejtbe irányuló nem-szelektív anyag transzportot három különböző mutáns típus zavarhatja meg, kis méretű, dumpless fenotípusú petéket eredményezve. Az egyik csoportba tartoznak azok a mutációk, amelyek a 10. stádiumban megakadályozzák a dajkasejtek plazmamembránja és azok magmembránja közötti aktin-gerendák kialakulását. Ezek a citoplazmatikus aktin-gerendák ugyanis fontos szerepet játszanak a dumping során a dajkasejtek sejtmagjainak távoltartásában azok gyűrűcsatornáitól (Warn és mtsai., 1985; Gutzeit és mtsai., 1986). Ezért ezen gerendák kialakulásáért felelős aktin-kötő fehérjéket kódoló *singed* (Cant és mtsai., 1994), *quail* (Mahajan-Miklos és Cooley, 1994) és a *chikadee* (Cooley és mtsai., 1992) gének mutációi a dajkasejtek sejtmagjainak elsodródásához és a gyűrűcsatornák járatainak eltömítéséhez vezetnek. A második mutáns csoportba tartozik a *spagetti-squash* gén mutációja (Jordan és Karess, 1997), ami a miozin II könnyű láncát érinti, meggátolva ezzel az aktin-miozin sejtvázat a megfelelő mechanikai erő kifejtésében és a dajkasejtek plazmájának átkerülésében a petesejtbe. A harmadik mutáns csoportba a gyűrűcsatornák kialakulásáért és normális szerkezetük fenntartásáért felelős gének mutációi alkotják. Ezért ebbe a csoportba főként a gyűrűcsatorna komponenseket kódoló gének mutációi tartoznak.

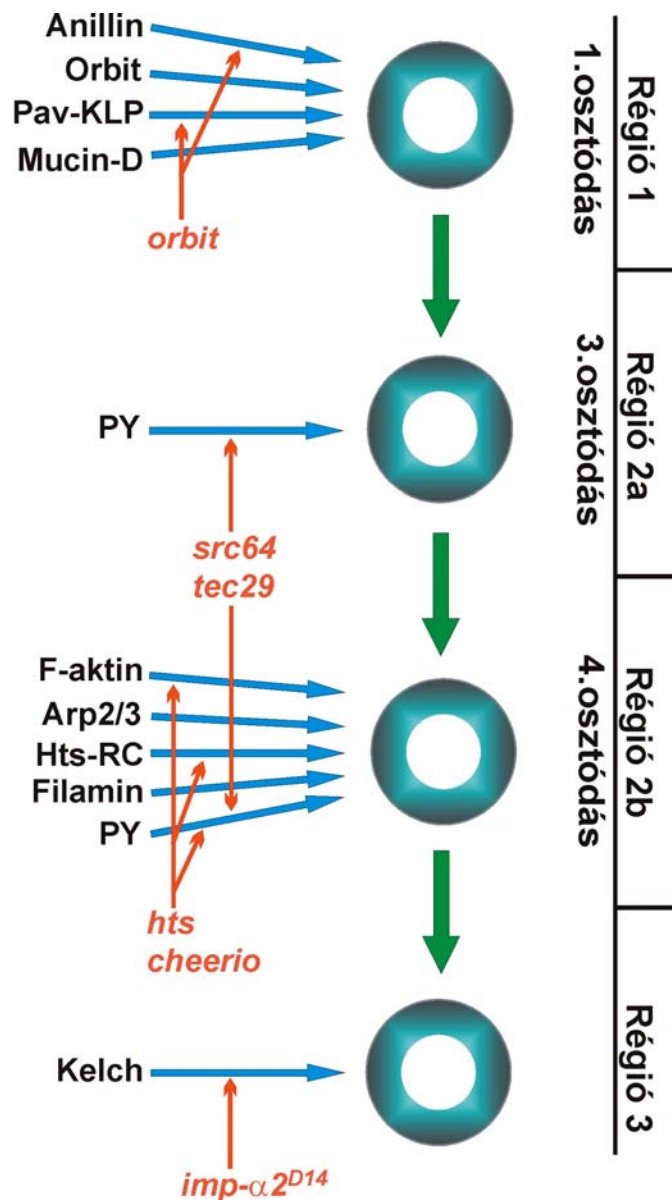
A *D14* homozigóta mutáns petekamrák vizsgálata során megállapítottuk, hogy azokban csupán a gyűrűcsatornák szerveződése hibás, míg a citoplazmatikus aktin-gerendák és az aktin-miozin rendszer normálisan kialakul. Megfigyeléseink szerint a *D14* mutáns gyűrűcsatornák belső járata erősen beszűkül és így fizikailag meggátolja a dajkasejtekből a petesejtbe irányuló korai szelektív és a későbbi nem-szelektív anyag transzportot.

A *Drosophila* petekamrák gyűrűcsatornáit az osztódási betüremkedések stabilizálódása révén alakulnak ki. A legelső fehérjék amelyek a gyűrűcsatornák kialakulása során megjelennek az osztódási betüremkedésekben a kontrakciós gyűrűből visszamaradt Anillin (Field és Alberts, 1995; de Cuevas és Spradling, 1998), Orbit (Máthé és mtsai., 2002) és a Pav-KLP fehérjék (Minestrini és mtsai., 2001) (29. ábra). Ezért ezek a fehérjék már az őscsírasejtek osztódása során a még nem stabilizált osztódási betüremkedésekben is megfigyelhetők. A cisztoblasztok első osztódása után létrejön a csíravonal eredetű ciszták első

stabilizált gyűrűcsatornája. Ezen csatornában először a Mucin-D glükoprotein halmozódik fel és feladata az osztódási betüremkedések stabilizálása (Krameroval és Kramerov, 1999). A ciszták harmadik osztódása után PY-epitópokat tartalmazó fehérjék jelennek meg a gyűrűcsatornában, de jelenlétük csak a negyedik osztódásra válik igazán nyilvánvalóvá (29. ábra) (Robinson és mtsai., 1994). Ezen fehérjék túlnyomó többsége szubsztrátja a petekamrák kortikális aktinvázán és a gyűrűcsatornák külső szegélyén megfigyelhető Src64 nevű tirozin kináz fehérjének (Dodson és mtsai., 1998). Az Src64 és a Tec29 tirozin kináz gének mutációi nőstény sterilitást eredményeznek és megakadályozzák a dajkasejtekből a petesejtbe irányuló anyag transzportot. Ezen mutáns petekamrák gyűrűcsatornáiban a PY-epitópok mennyisége drámain lecsökken és a gyűrűcsatornák kis méretűek maradnak. Minden más ezidáig vizsgált fehérje jelen van ezekben a gyűrűcsatornában. Így valószínű, hogy az Src64 és a Tec29 kinázok általi tirozin foszforiláció a gyűrűcsatornák növekedéséhez és azok méretének fentartásához szükséges, de nem fontos a gyűrűcsatornák kialakulásához (Roulier és mtsai., 1998; Guarnieri és mtsai., 1998; Dodson és mtsai., 1998). Mivel az *src64* mutáns gyűrűcsatornákból a Tec29 fehérje hiányzik, és a *tec29* mutáns gyűrűcsatornákból az Src64 fehérje nem, valószínűsíthető, hogy az Src64 kináz a Tec29 kináz előtt fejt ki hatását.

A ciszta negyedik osztódását követően a germárium 2. régiójában egyszerre több fehérje is megjelenik a gyűrűcsatornában (29. ábra). Ezek a fehérjék közé tartozik az F-aktin (Warn és mtsai., 1985; Theurkauf és mtsai., 1992; Robinson és mtsai., 1994), az aktin polimerizálását végző Arp2/3 komplex (Hudson és Cooley, 2002), az aktin-kötő Hts-RC (Yue és Spradling, 1992; Robinson és mtsai., 1994) és a szintén aktin-kötő Filamin (Robinson és mtsai., 1997; Li és mtsai., 1999; Sokol és Cooley, 1999). A Filamin fehérjét kódoló *cheerio*, valamint a *hts* mutáns petekamrák gyűrűcsatornáiban ugyan kialakulnak, azonban azok belső szegélye teljes mértékben hiányzik. Mindkét mutáns gyűrűcsatornáiban a negyedik osztódás előtt megjelenő fehérjék, mint például az Anillin vagy a Mucin-D, normálisan felhalmozódnak. Azonban azok a fehérjék amelyek velük egyidőben, a ciszta negyedik osztódása során kezdenek megjelenni a gyűrűcsatornában, csak átmenetileg és nagyon kis mennyiségben figyelhetők meg. Így ezekben a mutáns gyűrűcsatornában az F-aktin, a Hts-RC és a PY-epitópok a későbbi stádiumokban már nem mutathatóak ki. Ez egyben azt

is jelenti, hogy a Filamin és a Hts-RC a fenti fehérjék megtartására hat. Érdekes megfigyelésnek számít az is, miszerint a *hts* mutánsban a Filamin normális lokalizációt mutat, míg a *cheerio* mutáns gyűrűcsatornákból a Hts-RC fehérje hiányzik. Eszerint a Filamin a Hts-RC fehérje előtt hat. A jelenlegi elképzelés szerint a Filamin fehérje fontos szerepet játszhat a gyűrűcsatorna plazmamembránján levő glükoproteinek illetve a gyűrűcsatorna F-aktin kötegeinek kereszttekötésében.



29. ábra. A *Drosophila* ovárium csíravonal eredetű sejtjeire jellemző gyűrűcsatornák kialakulásának sematikus ábrája. A kép jobb oldalán a germárium egyes régióit tüntettem fel. Kék nyilak azt mutatják, hogy az adott gyűrűcsatorna komponens mikor jelenik meg a gyűrűcsatornában. A piros nyilak és a dőlthetűs mutációk azt jelzik, hogy az adott mutáció mely fehérjék felhalmozódását gátolja a gyűrűcsatornában.

Ezért a Filamin hiánya a gyűrűcsatornák belső szegélyében levő aktinváz és a hozzá kapcsolódó különböző aktin-kötő fehérjék elvesztésével jár együtt.

Ismereteink szerint a gyűrűcsatornában utolsóként megjelenő fehérje az úgyszintén aktin-kötő Kelch fehérje (29. ábra) (Robinson és mtsai., 1994; Robinson és mtsai., 1997). Ez a fehérje fontos szerepet játszik a gyűrűcsatornák aktin szálainak kötegekbe rendezésében, ezért hiánya azok rendezetlenségéhez vezet. Hasonlóan rendezetlen aktin struktúrát találtunk a *D14* mutáns gyűrűcsatornában is. Ezekben a (*D14* és *kelch*^{DE1}) mutáns gyűrűcsatornában minden ezidáig megvizsgált gyűrűcsatorna komponens jelen volt, azonban azok minden esetben kolokalizáltak a gyűrűcsatornák belső járatába nyúló rendezetlen aktin szálakkal. Miután a *kelch*^{DE1} null mutáns gyűrűcsatornái teljes mértékben megegyeztek a *D14* null mutáns gyűrűcsatornáival, megvizsgáltuk, hogy a Kelch fehérje miként oszlik el a *D14* mutáns petekamrákban. Azt találtuk, hogy a *D14* gyűrűcsatornákból a Kelch fehérje hiányzott, azonban maga a fehérje jelen volt a *D14* petekamrák citoplazmájában. Ez azt jelenti, hogy az Importin- α 2 fehérje a Kelch fehérje előtt hat, valamint azt, hogy az Importin- α 2 fehérje szükséges ahhoz, hogy a Kelch fehérje normálisan felhalmozódjon a gyűrűcsatornában. Immunohisztokémiás kísérleteink során azonban az Importin- α 2 fehérjét nem tudtuk kimutatni a gyűrűcsatornában. Ez még természetesen nem jelenti azt, hogy átmenetileg kevés számú Importin- α 2 fehérje ne fordulhatna elő a gyűrűcsatornában, azonban ennél sokkal valószínűbb, hogy az Importin- α 2 fehérje közvetett úton befolyásolja azok szerkezetét.

Elképzeléseink szerint az Importin- α 2 fehérje ezt a funkcióját kétféle úton végezheti. Egyrészt komplexet képezhet a Kelch fehérjével és így módon szabályozhatja annak megjelenését a gyűrűcsatornában. Másrészt viszont az Importin- α 2 fehérje egy harmadik, ezidáig ismeretlen fehérje megjelenését is szabályozhatja a gyűrűcsatornában.

Az *in vitro* eredmények szerint a Kelch fehérje nem-specifikus módon kötődik az aktin szálakhoz, míg *in vivo* a Kelch fehérje csak és kizárólag a gyűrűcsatornák aktin vázán figyelhető meg (Robinson és Cooley, 1997c; Kelso és mtsai., 2002). Ez felveti annak a lehetőségét, hogy a Kelch fehérje kötődését a gyűrűcsatornák aktin vázához egy harmadik, ezidáig azonosítatlan fehérje

szabályozza. Ezért elképzelhetőnek tartjuk, hogy az Importin- α 2 fehérje erre az ismeretlen fehérjére gyakorolt hatása révén szabályozza a Kelch fehérje felhalmozódását a gyűrűcsatornában.

A legújabb felfedezések szerint a Kelch fehérje 627. aminosavának foszforilációja (Y^{627}) kritikus a gyűrűcsatorna aktin-kötegeinek szervezésében és az *in vitro* F-aktin kötésben (Kelso és mtsai., 2002). A Y^{627} éppen a Kelch fehérje aktin-kötő doménjében helyezkedik el és foszforilációja jelentős mértékben csökkenti a Kelch fehérje aktin-kötő képességét. Ugyanakkor a nem-foszforilált forma erősebb aktinkötése azt igazolja, hogy a Kelch fehérje dinamikus foszforilációja illetve defoszforilációja aktív szerepet játszhat a gyűrűcsatorna aktin-kötegeinek keresztkötésében valamint azok növekedésében. Míg a genetikai eredmények alapján ismeretes, hogy a Kelch fehérje foszforilációját az Src64 tirozin kináz végzi (Kelso és mtsai., 2002), addig semmit sem lehet tudni a defoszforilálását végző foszfatáz enzimről. Ezidáig csak egy olyan foszfatázt írtak le, amelynek hatása volt a gyűrűcsatorna szerkezetére, de ezen gén mutációja sem vezetett a *kelch*^{DE1} vagy a *D14* mutáns gyűrűcsatorna hasonló fenotípusához és nem befolyásolta a Kelch fehérje megjelenését a gyűrűcsatornában (Tan és mtsai., 2002). Elképzelhetőnek tartjuk azonban azt, hogy az Importin- α 2 fehérje egy ezidáig ismeretlen foszfatáz szabályozása révén képes befolyásolni a Kelch fehérje foszforilációs állapotát és annak felhalmozódását a gyűrűcsatornában. Ezen elképzelésünk vizsgálatát kétdimenziós gél-elektroforézissel kívánjuk elvégezni, hogy ily módon meghatározzuk a *D14* mutáns gyűrűcsatorna foszforilált illetve nem-foszforilált Kelch formáinak arányát. Ez a kísérlet döntő bizonyítékot szolgáltathat az Importin- α 2 fehérje gyűrűcsatornákra gyakorolt hatásának felderítésében.

Biokémiai kísérleteink során *Drosophila* ováriumokból Importin- α 2 fehérje komplexeket tisztítottunk és kimutattuk, hogy a Kelch fehérje az Importin- α 2 fehérjével komplexet képez. Mivel azonban a Δ IBB és a Δ NLSB mutáns Importin- α 2 fehérjék nem voltak képesek a Kelch fehérje megkötésére, feltételezzük, hogy a két fehérje közötti kölcsönhatás NLS peptiden keresztül valósul meg. Azonban a Kelch fehérjében nincs klasszikus NLS csupán néhány bázikus aminosavból álló sziget, ami csak elviekben funkcionálhatna NLS-ként. Az Importin- α 2 fehérje NLS-kötő domainjének további boncolásával azt is megállapítottuk, hogy az Importin- α 2

fehérje kis NLS-kötő doménje nem fontos ehhez a kölcsönhatáshoz. Azonban az Importin- α 2 fehérje nagy NLS-kötő doménje, várakozásainknak megfelelően, kitüntetett szerepet játszik ebben a funkcióban. Érdekes továbbá az a megfigyelés, hogy a Kelch fehérje KREP doménje, amely szükséges és egyben elégséges feltétele a Kelch fehérje gyűrűcsatornában való lokalizációjához, nagyszámú bázikus oldalláncot tartalmaz (Robinson és Cooley, 1997). Ez a Kelch fehérje bázikus szigeteinek NLS-ként való viselkedését és az Importin- α 2 és a Kelch fehérjék közötti közvetlen kölcsönhatást támogathatja. Ezen kölcsönhatás igazolása céljából GST lecsapásos kísérletet tervezünk végezni.

A fenti eredményeink azt igazolják, hogy az Importin- α 2 fehérjének van egy új citoplazmatikus funkciója, amelyet mechanisztikusan hasonló módon végez, mint ahogyan az Importin fehérjék a sejtmagi transzportot, a mikrotubulusok polimerizálását illetve a magmembránok összeszerelését közvetítik. Nem ismeretes még számunkra, hogy az Importin- α 2 fehérje, az előzőekkel megegyező módon, RanGTP fehérje szabályozó hatásán keresztül végzi-e a Kelch fehérje felhalmozódását a gyűrűcsatornában. Azonban az mindenféleképpen érdekes, hogy a korai petefejlődés során, ugyan ritkán, de ki tudtuk mutatni az Importin- β 1 (Ketel) fehérjét a gyűrűcsatornákból (be nem mutatott megfigyeléseink alapján).

A hím ivarsejtek gyűrűcsatornáinak összetételüket és méretüket tekintve is nagy mértékben eltérnek az ovárium gyűrűcsatornáitól. A hím ivarsejtek fejlődése során 4 mitotikus osztódást 2 meiotikus osztódás követ, melyekre mind jellemző a nem-teljes citokinézis, létrehozva egy 64 sejtből és 63 gyűrűcsatornából álló poszt-meiotikus cisztát. Ezekre a gyűrűcsatornákra jellemző, hogy megtalálhatóak bennük a kontrakciós gyűrűből származó (Anillin, Peanut, Setin1 és Septin2) fehérjék, valamint néhány PY-epitóppal rendelkező fehérje is, de szemben az ovárium gyűrűcsatornáival, nem halmoznak fel F-aktint, Hts-RC vagy Kelch fehérjéket (Hime és mtsai., 1996). Ezért nyilvánvaló, hogy a *D14* homozigóta legyek hím sterilítása a nőstény sterilitástól eltérő módon alakul ki. Valószínű, hogy a spermatogenezis során, az aktív sejtciklus-függő sejtmagi importot végző Importin- α 2 fehérje hiánya, ezen import folyamat elmaradása révén vezet el a *D14* legyek hím sterilitásához.

6.3. Importin- α 2 és a sejthalál

Az Importin- α 2 és a Kelch fehérjék közötti NLS-alapú kölcsönhatás részletesebb vizsgálata céljából különválasztottuk az Importin- α 2 fehérje nagy (MNLSB) illetve kis NLS-kötő (SNLSB) domainjét. Ezen mutánsok vizsgálatai során észrevettük, hogy az Importin- α 2 fehérje nagy NLS-kötő doménjének elrontása (Δ MNLSB), homozigóta *D14* és vad típusú háttéren egyaránt domináns negatív hatást idézett elő. Ezt a hatást vad típusú Importin- α 2 fehérje túltermeltetésével nem tudtuk helyreállítani. A Δ MNLSB mutáns fehérjét tetszés szerint kiválasztott osztódó szövetben kifejeztetve azok elhalásához vezetett. Ez egyben azt is jelentette, hogy a domináns negatív hatás molekuláris hatásmechanizmusa valószínűleg minden szövettípusban hasonló módon érvényesül.

Minden Importin- α fehérje flexibilis IBB doménjén belül megtalálható egy endogén NLS, ami Importin- β fehérje hiányában visszahajlik a saját nagy NLS-kötő doménje fölé. Ilyen állapotban az Importin- α fehérje nem képes más fehérjék NLS-ét megkötni (Kobe, 1999; Catimel és mtsai., 2001), ezért az endogén NLS-t gyakran autoinhibíciós doménként is szokás emlegetni. A Δ MNLSB mutáns Importin- α 2 fehérjében mi éppen ezen autoinhibíciós funkcióért is felelős NLS-kötő aminosavakat változtattuk meg. Így valószínűnek tartjuk azt, hogy a Δ MNLSB fehérje domináns negatív hatását az idézi elő, hogy a fehérje nem képes az autoinhibícióra és ezért irreverzibilis módon, a még funkcióképes kis NLS-kötő doménjén keresztül, megköt és funkcióképtelenné tesz más fehérjéket. Amennyiben a nagy NLS-kötő domén mellett a kis NLS-kötő domént is elrontottuk (Δ NLSB), úgy a mutáns Importin- α 2 fehérje domináns negatív hatása jelentősen lecsökkent. Abban az esetben viszont, amikor az Importin- α 2 fehérje teljes IBB doménjét eltávolítottuk (Δ IBB), a mutáns Importin- α 2 fehérjének egyáltalán nem volt domináns negatív hatása. Ez azt jelenti, hogy a domináns negatív hatás kifejtéséhez szükséges az Importin- β 1 fehérje megkötése.

A *Drosophila importin- β 1* gén domináns negatív hatású mutációi (*ketel^D*) szintén mérgező hatásúak a sejtekre (Erdélyi és mtsai., 1997; Tirián és mtsai., 2000; Timinszky et al, 2002). A Ketel^D fehérje meggátolja az egyes sejtosztódások

utáni új magmembránok kialakulását, de sem a sejtmagi transzportot, sem pedig a mikrotubulusok kialakulását nem befolyásolja. A Δ MNLSB mutáns fehérje által előidézett citoplazmatikus Lamin aggregátumok arra utalnak, hogy a domináns negatív hatás a magmembránok normális kialakulását is érintheti. Annak eldöntésére, hogy ez következménye-e a sejthalálnak, vagy éppen annak előidézője további kísérleteket igényel.

Ezidáig még nem ismeretes számunkra, hogy milyen fehérjéket inaktívál és ezzel mely életfolyamatokat érint a Δ MNLSB mutáns fehérje. Viszont elképzelhetőnek tartjuk azt, hogy a Δ MNLSB mutáns Importin- α 2 fehérje olyan fehérjéket inaktíváljon, amelyeket a vad típusú Importin- α 2 fehérje *in vivo* megköt. Miután a Δ MNLSB fehérje a sejtek magmembránján halmozódik fel elképzelhető, hogy ilyen fehérje valamilyen Nukleoporin vagy esetleg a Lamin lehet. Ezen fehérjék NLS szekvenciáihoz irreverzibilis módon kapcsolódó Δ MNLSB mutáns fehérje meggátolhatja az általános sejtmagi importot. Ezt az elképzelésünket támogatta az is, hogy a vad típusú Importin- α 2 fehérje kölcsönható partnerei között számos Nukleoporint és Lamint valamint Lamin prekursor fehérjét azonosítottunk (19. ábra, 3. Táblázat). Azonban vizsgálataink azt igazolták, hogy a domináns negatív hatás nem befolyásolja az általános sejtmagi transzportot, ezzel erősen valószínűsítve egy másfajta hatást. Érdekes észrevétel, hogy a vad típusú Importin- α 2 fehérje kölcsönható partnerei között számos kromatin remodellingben résztvevő fehérjét azonosítottunk. Ilyenek például a Brahma asszociált fehérjék a moira az ISWI az SnF5 vagy a CG11375 nevű géntermék. Ezeknek a fehérjéknek aktív szerepük van a kromatin fellazulásában és így inaktíválásuk eredményezhet egy az álltalunk is tapasztalt sejthalált. Azonban ennek vizsgálatára további biokémiai kísérleteket tervezünk elvégezni. Tetszés szerint kiválasztott extraktumokból *in vitro* termeltetett Δ MNLSB fehérjével tisztítani és azonosítani szeretnénk a kölcsönható fehérje partnereket. Ez fontos információkkal szolgálhat az Importin- α 2 fehérje molekuláris hatásmechanizmusáról és elősegítheti a sejtmagi importtól eltérő, újabb funkciójának feltárását.

7. SUMMARY

In eucaryotic cells the macromolecular transport between the nucleus and the cytoplasm is a selective signal- and receptor-mediated process (for reviews, see Mattaj and Englmeier, 1998; Ohno és mtsai., 1998; Jans és mtsai., 2000; Chook and Blobel, 2001; Kuersten és mtsai., 2001; Holaska és mtsai., 2002; Weis, 2002;). In the cytoplasm, the Importin- α adapter protein recognizes the nuclear localization signal (NLS) peptide of the cargo proteins and in a heterotrimeric complex with Importin- β they translocate into the nucleus. The high nuclear concentration of the Ran-GTP dissociates this complex and then the transport receptors are recycled. However, it was recently found that the Importin proteins and Ran exert other functions as well, not related with nucleocytoplasmic transport. *In vitro* studies show that Ran-GTP elicits spontaneous microtubule polymerization and spindle assembly in cell-free *Xenopus* egg extracts (Carazo-Salas és mtsai., 1999; Kalab és mtsai., 1999; Wilde és Zheng, 1999; Zhang és mtsai., 1999). Recently, the effect of Ran was found to be mediated by Importin- α and - β , which can bind to and inhibit the function of the microtubule-associated TPX2 and NuMA proteins (Gruss és mtsai., 2001; Nachury és mtsai., 2001; Wiese és mtsai., 2001). TPX2 and NuMA become released from the Importins by Ran-GTP and can thus promote spindle and centriole formation. Similar interaction may explain the involvement of Importins and Ran in nuclear envelope assembly following mitosis (Hetzer és mtsai., 2000; Askjaer és mtsai., 2002; Bamba és mtsai., 2002). In this way, Importin- α , Importin- β and Ran participates in three distinct processes mechanistically in the same way.

We have examined the function of *Drosophila* Importin- $\alpha 2$ protein during oogenesis (Gorjánác és mtsai., 2002) and spermatogenesis (Giarre és mtsai., 2002). We have found that during spermatogenesis Importin- $\alpha 2$ showed a cell cycle-dependent nuclear accumulation that was similar to the previously described distribution during early embryogenesis (Török és mtsai., 1995). This may indicate that during both spermatogenesis and embryogenesis Importin- $\alpha 2$ participates in the nuclear import of cell cycle-specific molecules. However, during oogenesis Importin- $\alpha 2$ remains cytoplasmic in steady-state, in contrast to the nuclear accumulation of other Importins, suggesting a possible cytoplasmic function. Here

I report on the critical role played by Importin- $\alpha 2$ during *Drosophila* egg chamber development and describe a novel, entirely cytoplasmic function distinct from the nuclear transport.

A characteristic of gametogenesis in *Drosophila* is that sperm and oocyte develop within a cyst of cells (for reviews, see de Cuevas és mtsai., 1997; Pepling és mtsai., 1999; Deng and Lin, 2001). These are derived from a cystoblast that undergoes four rounds of mitosis with incomplete cytokinesis to produce 16 cells interconnected through 15 cytoplasmic bridges called ring canals. The ring canals are built around the remnants of the cleavage furrow and contain several of its molecular components such as F-actin, Anillin, Filamin or Kelch (for reviews, see Mahajan-Miklos and Cooley, 1994; Robinson and Cooley, 1996; Robinson and Coolay, 1997a). In oogenesis, one cell differentiates as oocyte and the remaining 15 cells become the highly polyploid nurse cells that are synthetically active and contribute cytoplasm to the oocyte. The process of this transfer can be divided into two phase. The first phase that take place up to stage 10 of egg chamber development, is characterized by a slow and selective transfer of RNA transcripts and proteins, resulting more particular in the deposition of embryonic determinants. Then, from stage 10 a second non-selective phase of transfer results in a rapid discharge (dumping) of the cytoplasmic content of the nurse cells into the oocyte, leaving behind the nuclei in the apoptotic nurse cell remnants.

We have established an intrinsic deletion in the *Drosophila importin- $\alpha 2$* (*imp- $\alpha 2^{D14}$*) gene and have found that it causes partial male and full female sterility. Examination of *imp- $\alpha 2^{D14}$* ovaries showed that egg development was retarded producing smaller eggs than the normal. This phenotype is a characteristic of dumpless mutations in which the transfer of nurse cells cytoplasm into the oocyte is incomplete. In the known dumpless mutants, the failure in this transport may be explained by three distinct defects in which in each case the actin cytoskeleton is involved (Robinson and Coolay, 1997a). This promed us to investigate the distribution of F-actin in wild type and mutant *imp- $\alpha 2^{D14}$* egg chambers. Phenotypic analysis reveals, that the block of this transport in *imp- $\alpha 2^{D14}$* egg chambers is result of the partially occluded ring canals. In *imp- $\alpha 2^{D14}$* mutant ring canals the actin filaments and all of the proteins bound to the actin (Filamin, Hts-RC, Pav-KLP, PY-epitopes, etc.) extend into the lumen of the ring

canals, whereas wild type ring canals formed a compact ring. These data indicate that the Importin- α 2 function is involved in the assembly of functional ring canals. Despite it, we were unable to detect any trace of this protein in association with wild type ring canals indicating, that Importin- α 2 may affect the ring canal assembly indirectly, without being a component of it. A very similar mutant ring canal structure could be observed in *kelch*^{DE1} null mutant egg chambers (Robinson és mtsai., 1994; Robinson and Cooley, 1997b). However, Kelch protein is a stable constituent of the wild type ring canals and is responsible for the dynamic cross-linking of the ring canals' actin filaments. To determine whether Kelch or any other known ring canal components involved in ring canal assembly were missing from *imp- α 2*^{D14} mutant ring canals, we performed the immunostaining of these proteins in wild type, *imp- α 2*^{D14} and *kelch*^{DE1} mutant egg chambers. These examinations revealed that no Kelch protein could be detected in neither *imp- α 2*^{D14} nor *kelch*^{DE1} mutant ring canals, although Western blot analysis showed that Kelch protein was normally expressed in *imp- α 2*^{D14} egg chambers. We can thus infer that the organisation of actin filaments and associated proteins in the ring canals depends on Kelch association with these structures. These data show, that Kelch is a downstream target of Importin- α 2 and that Importin- α 2 plays a role in the proper targeting of Kelch to the ring canals.

To elucidate this novel function of Importin- α 2 and to determine the domains indispensable for ring canal assembly, we performed an *in vitro* site-directed mutagenesis of the *importin- α 2* gene. Mainly based on the crystallographic analysis made on yeast Importin- α protein (Conti és mtsai., 1998), we targeted the Importin- β binding domain (IBB), NLS-binding domain, CAS-binding domain and some putative phosphorylation residues of Importin- α 2 protein. The mutant constructs were transformed into the flies and their effect was investigated on *imp- α 2*^{D14} null mutant background. We found that the IBB domain and the residues necessary for NLS-binding were also important for the *Drosophila* oogenesis and for the deposition of Kelch protein to the ring canal. This observation suggests that Importin- α 2 protein may function in ring canal assembly mechanistically in the same way as the Importin- α proteins participate in the nucleocytoplasmic transport, microtubule assembly or nuclear envelope assembly, mentioned above.

To get a better idea on how Importin- α 2 protein participates in ring canal assembly, we performed a complex purification by overexpressing ProteinA-tagged wild type and mutant Importin- α 2 proteins in *Drosophila* ovaries. Among the numerous isolated proteins we found that Importin- α 2 formed a complex with the Kelch protein. However, the mutant forms of Importin- α 2 proteins, in which the IBB domain and the NLS-binding residues were targeted, could not make the complex with Kelch protein. These observations strongly indicate, that the interaction between Importin- α 2 and Kelch depends on NLS binding. Since Kelch protein has no NLS sequence (only a stretch of basic residues), we can envisage that Importin- α 2 transports Kelch to the ring canals through an intermediary of an unknown component.

The *in vitro* generated mutant, where the CAS-binding residues (responsible for the recyclization of Importin- α protein from nucleus) were targeted, was trapped into the nuclei and completely depleted from the cytoplasm of each cells of egg chambers. This observation unequivocally verify that during oogenesis Importin- α 2 protein takes part in nucleocytoplasmic transport. However, the intact nuclear import of NLS-reporter proteins (NLS-GFP, NLS- β Gal, Pav-KLP, etc.) on *imp- α 2^{D14}* mutant background, moreover the subcellular distribution of Importin- α 2 suggest that this protein is not responsible for the bulk nuclear transport during oogenesis, but may be involved in nuclear import of some specific factors. Another characteristic of Importin- α 2 cytoplasmic localisation is its cortical colocalisation with F-actin. To characterise their relationship we depolymerised the cortical actin filaments of egg chambers and found that it caused a dramatic redistribution of Importin- α 2 protein. Importin- α 2 accumulated in the nuclei of nurse cells and oocyte, suggesting that F-actin may regulate the nuclear import of this protein. Furthermore, we found that the F-actin binding is dependent on NLS-binding and that it is common in the case of other Importins. This indicates that F-actin network may serve as a major organisator of the nuclear transport during *Drosophila* oogenesis.

It was previously describe, that the Importin- α proteins contain two NLS-binding sites: a major and a small one (Conti és mtsai., 1998). In the absence of Importin- β the major NLS-binding site serve as an auto-inhibition domain, too. The

endogenous NLS sequence of Importin- α proteins is bound by this major NLS-binding site preventing the interaction with other NLS sequences.

Since the interaction between Importin- α 2 and Kelch depends on NLS sequence, we made a further dissection of the NLS-binding domains of Importin- α 2 protein. When only the small NLS-binding domain was targeted, the Importin- α 2 did not lose its function during oogenesis. However, when only the major NLS-binding site was modified, the Importin- α 2 lost its function. This suggests that for the function of Importin- α 2 during oogenesis only the major NLS-binding site is critical. Additionally, this mutant had a very strong dominant negative effect. Overexpressing in germ cells or in other proliferating tissues it caused cell lethality. We believe that a possible explanation for it is that this mutant protein lost its ability for the auto-inhibition and that through its still functional small NLS-binding domain it may irreversibly bind and prevent the function of some other proteins. To prove it we are planning some further biochemical experiments.

In my Ph.D. thesis I describe a novel function of Importin- α 2 played during *Drosophila* oogenesis. I presented that in this function Importin- α 2 uses the same domains and mechanistically function in a similar manner as the Importin proteins function in the previously described functions. By a set of *in vitro* mutants of *importin- α 2* gene I made a detailed description of the function of Importin- α 2 protein and found the first dominant negative allele of this gene.

8. FÜGGELÉK

8.1. Rövidítések jegyzéke

NPK: (nuclear pore complex) sejtmagi póruskomplex

Nup: Nukleoporin fehérjék, a sejtmagi póruskomplexeket felépítő fehérjék általános elnevezése

RCC1: a Ran fehérje guanin nukleotid cserélő faktora

RanBP: Ran-GTP-kötő fehérje

RanGAP1: a Ran fehérje GTPáz aktiváló faktora

CAS: az Importin-alpha fehérjék export receptora

Imp: Importin fehérjék rövidítése, másnéven Karyopherin (Kap) fehérjék

ARM: armadillo ismétlődő szekvencia, az Importin-alpha fehérjékre jellemző

HEAT: ismétlődő szekvencia, az Importin-beta fehérjékre jellemző

NLS: (nuclear localization sequences) a fehérjék sejtmagi lokalizációs jele

NES: (nuclear export sequences) a fehérjék sejtmagi export jele

IBB: (Importin-beta binding domain) az Importin-alpha fehérje Importin-beta kötő része

ΔIBB: az Importin-alpha fehérje csonkolt változata, amelyről hiányzik az Importin-beta kötő domain

S37A: az Importin-alpha2 egyik pontmutációjának neve ahol a 37. szerint alaninra cseréltük

S56A: az 56. szerint alaninra cseréltük

S98A: a 98. szerint alaninra cseréltük

3xSA: mindhárom fent említett szerint (37., 56. és a 98.) egyszerre cseréltük alaninra

ΔDIM: a dimerizációs aminosavakat cseréltük alaninra

ΔNLSB: az összes NLS-kötő (NLSB=NLS-binding) aminosavat alaninra cseréltük

ΔMNLSB: csak a nagy (M=major) NLS-kötő domén aminosavait cseréltük alaninra

ΔSNLSB: csak a kis (S=small) NLS-kötő domén aminosavait cseréltük alaninra

ΔCASB: a CAS fehérje kötéseért (CAS-binding) felelős aminosavakat alaninra cseréltük

D14: a *Drosophila importin-alpha2* gén deléciójának rövidítése

PY: foszforilált tirozin oldallánc

F-aktin: filamentózus aktin

Hts-RC: Hu-li tai shao nevű aktin-kötő fehérje gyűrűcsatornában (RC: ring canal)
megjelenő formája

GFP: zölden fluoreszkáló fehérje

LSM: (laser scanning microscope) lézersugár pásztázó mikroszkóp

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek Dr. Kiss Istvánnak, akinek csoportjában éveken keresztül dolgozhattam. Különös tekintettel meg szeretném köszönni minden tudományos segítségét és példamutató gondoskodását, amit a laboratóriumában eltöltött évek során tanúsított.

Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Bernard M. Mechlernek is, akinek a laboratóriumában 14 hónapon keresztül dolgozhattam. Hálás vagyok tanácsaiért és segítőkészségéért, amit munkám során nyújtott.

Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Török Istvánnak, akitől nemcsak modern biokémiai eljárásokat, de a molekuláris biológiai gondolkodást is elsajátítottam.

Köszönettel tartozom: Dr. Gausz Jánosnak, Dr. Erdélyi Miklósnak, Dr. Gyurkovics Henriknek, Dr. Török Tibornak, Dr. Ádám Gézának, Dr. Mihály Józsefnek és Dr. Sípos Lászlónak munkám során nyújtott kritikus észrevételeikért és tudományos tanácsaikért. Továbbá köszönöm munkatársaimnak: Virágh Erikának, Szlanka Tamásnak, Babarcziné Horváth Gabriellának, Kopp Máriának, Kissné Tóth Tündének, Bozsó Szilviának, Kovács Kornéliának, Velkeyné Krausz Ildikónak, Dr. Anne Joel-nek, Dr. Joachim Mahrold-nak, Dorothee Albrecht-nek és Rolf Schmitt-nek, hogy velük együtt dolgozhattam.

Köszönettel tartozom Dr. Garab Győzőnek, Dr. Menczel Lászlónak és Dr. Zsíros Ottónak készséges együttműködésükért. Különös tekintettel köszönöm Dr. Pomozi István lelkes együttműködését és a differenciál-polarizációs lézersugár pásztázó mikroszkóp kezelésének elsajátításában nyújtott segítségét.

Végül meg szeretném köszönni a szegedi Drosophila közösség minden tagjának, hogy munkámhoz motiváló légkört biztosítottak.

Köszönetemet szeretném kifejezni Szüleimnek, akik munkám során pótolhatatlan segítséget nyújtottak. Köszönöm Seres Szilviának, hogy munkámban szeretettel támogatott.

Ora at labora.

10. IRODALOMJEGYZÉK

Adams, M.D., és mtsai., (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, **287**: 2185-2195.

Andrade, M.A. és Brok, P. (1995). HEAT repeats in the Huntington's disease protein. *Nature Genet.*, **11**: 115-116.

Andrade, M.A., Petosa, C., O'Donoghue, S.I., Müller, C.W. és Brok P. (2001). Comparison of ARM and HEAT protein repeats. *J. Mol. Biol.*, **309**: 1-18.

Askjaer, P., Galy, V., Hannak, E. és Mattaj, I.W. (2002). Ran GTPase cycle and importins α and β are essential for spindle formation and nuclear envelope assembly in living *Caenorhabditis elegans* embryo. *Mol. Biol. Cell*, **13**: 4355-4370.

Bamba, C., Bobinec, Y., Fukuda, M. és Nishida, E. (2002). The GTPase Ran regulates chromosome positioning and nuclear envelope assembly *in vivo*. *Curr. Biol.*, **12**: 503-507.

Bischoff, F.R. és Ponsting, H. (1991). Catalysis of guanine nucleotide exchange on Ran by the mitotic regulator RCC1. *Nature*, **354**: 80-82.

Bischoff, F.R., Klebe, C., Kretschmer, J., Wittinghofer, A. és Ponstingl, H. (1994). RanGAP1 induces GTPase activity of nuclear ras-related Ran. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **91**: 2587-2591.

Burke, B. és Ellenberg, J. (2002). Remodelling the walls of the nucleus. *Mol. Cell Biol.*, **3**: 487-497.

Cant, K., Knowles, B.A., Mooseker, M.S. és Cooley, L. (1994). *Drosophila singed*, a fascin homolog, is required for actin bundle formation during oogenesis and bristle extension. *J. Cell Biol.*, **125**: 369-380.

Carazo-Salas, R.E., Guarguaglini, G., Gruss, O.J., Segref, A., Karsenti, E. és Mattaj, I.W. (1999). Generation of GTP-bound Ran by RCC1 is required for chromatin-induced mitotic spindle formation. *Nature*, **400**: 178-181.

Carpenter, A.C.T. (1975). Electron microscopy of meiosis in *Drosophila melanogaster* females. Structure, arrangement, and temporal change of the synaptonemal complex in wild type. *Chromosoma*, **51**: 157-182.

Catimel, B., Teh, T., Fontes, M.R.M., Jennings, I.G., Jans, D.A., Howlett, G.J., Nice, E.C. és Kobe, B. (2001). Biophysical characterization of interactions involving Importin- α during nuclear import. *J. Biol. Chem.*, **276**: 34189-34198.

Chao, S. és Nagoshi, R.N. (1999). Induction of apoptosis in germline and follicle layer of *Drosophila* egg chamber. *Mech. Dev.*, **88**: 159-172.

Chook, Y.M. és Blobel, G. (2001). Karyopherins and nuclear import. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **11**: 703-715.

Christophe, D., Christophe-Hobertus, C. és Pichon, B. (2000). Nuclear targeting of proteins: how many different signals?. *Cellular Sign.* **12**: 337-341.

Cingolani, G., Petosa, C., Weis, K. és Müller, C.W. (1999). Structure of importin- β bound to the IBB domain of importin- α . *Natura*, **399**:221-229.

Conti, E., Uy, M., Leighton, L., Blobel, G. és Kuriyan, J. (1998). Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin alpha. *Cell*, **94**: 193-204.

Conti, E. és Kuniyan, J. (2000). Crystallographic analysis of the specific yet versatiel recognition of distinct nuclear localization signal by Karyopherin alpha. *Structure Fold Des.*, **8**: 329-338.

Cooley, L., Verheyen, E. és Ayers, K. (1992). *chickadee* encodes a profilin required for intercellular cytoplasm transport during *Drosophila* oogenesis. *Cell*, **69**: 173-184.

Cooley, L. és Theurkauf, W.E. (1994). Cytoskeletal function during *Drosophila* oogenesis. *Science*, **266**: 590-696.

Cooley, L. (1998). *Drosophila* ring canal growth required Src and Tec kinases. *Cell*, **93**: 913-915.

Davis, I, Girdham, C.H. és O'Ferrell, P.H. (1995). A nuclear GFP that marks nuclei in living *Drosophila* embryo: Maternal supply overcomes a delay in the appearance of zygotic fluorescence. *Dev. Biol.*, **170**: 726-729.

De Cuevas, M., Lilly, M.A. és Spradling, A.C. (1997). Germline cyst formation in *Drosophila*. *Annu. Rev. Genet.* **31**: 405-428.

De Cuevas, M. és Spreadling, A. (1998). Morphogenesis of the *Drosophila* fusome and its implications for oocyte specification. *Development*, **125**: 2781-2789.

Deng, W. és Lin, H. (1997). Spectrosomes and fusomes anchor mitotic spindles during asymmetric germ cell divisions and facilitate the formation of a polarized microtubule array for oocyte specification in *Drosophila*. *Dev. Biol.*, **189**: 79-94.

Deng, W. és Bownes, M. (1998). Patterning and morphogenesis of the follicle cell epithelium during *Drosophila* oogenesis. *Int. J. Dev. Biol.*, **42**: 541-552.

Deng, W., és Lin, H. (2001). Assimetric germ cell division and oocyte determination during *Drosophila* oogenesis. *Int. Rev. Cyt.*, **203**: 93-138.

- Dockendorff, T., Tang, Z. és Jongens, T.A.** (1999). Cloning of karyopherin- $\alpha 3$ from *Drosophila* Through its interaction with the nuclear localization sequence of germ cell-less protein. *Biol Chem.*, **380**: 1263-1272.
- Dodson, G.S., Guarnieri, D.J. és Simon, M.A.** (1998). Src64 is required for ovarian ring canal morphogenesis during *Drosophila* oogenesis. *Development*, **125**: 2883-2892.
- Dubreuil, R.R., Byers, T.J., Sillman, A.L., Bar-Zvi, D., Goldstein, L.S. és Branton, D.** (1989). The complete sequence of *Drosophila* alpha-spectrin: conservation of structural domains between alpha-spectrins and alpha-actinin. *J. Cell Biol.*, **109**: 2197-2205.
- Duffy, J.B., Harrison, D.A. és Perrimon, N.** (1998). Identifying loci required for follicular patterning using directed mosaics. *Development*, **125**: 2263-2271.
- Edwards, K.A. és Kiehart, D.P.** (1996). *Drosophila* nonmuscle myosin II has multiple essential roles in imaginal disc and egg chamber morphogenesis. *Development*, **122**: 1499-1511.
- Ephrussi, A., Dickinson, L.K. és Lehmann, R.** (1991). oskar organizes the germ plasm and directs localisation of the posterior determinant nanos. *Cell*, **66**: 37-50.
- Erdélyi, M., Máthé, E. és Szabad, J.** (1997). Genetic and developmental analysis of mutant *ketel* alleles that identify the *Drosophila* importin- β homologue. *Acta Biol. Hung.*, **48**: 323-338.
- Fagotto, F., Gluck, U. és Gumbiner, B.M.** (1998). Nuclear localization signal-independent and importin/karyopherin-independent nuclear import of beta-catenin. *Curr. Biol.*, **8**: 181-190.
- Fanara, P., Hodel, M.R., Corbett A.H. és 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.
- Fares, H., Peifer, M. és Pringler, J.R.** (1995). Localization and possible functions of *Drosophila melanogaster* septins. *Mol. Biol. Cell*, **6**: 1843-1859.
- Field, C.M. és Alberts, B.M.** (1995). Anillin, a contractile ring protein that cycles from the nucleus to the cell cortex. *J. Cell Biol.*, **131**: 165-178.
- Fiil, A.** (1978). Follicle cell bridges in the mosquito ovary: syncytia formation and bridge morphology. *J. Cell Sci.*, **31**: 137-143.
- Fischer, U., Huber, J., Boelens, W.C., Mattaj, I.W. és Lührmann, R.** (1995). The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that access an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell*, **82**: 475-483.

Foley, K. és Cooley, L. (1998). Apoptosis in late stage *Drosophila* nurse cells does not require genes within the H99 deficiency. *Development*, **125**: 1075-1082.

Fontes, M.R., Teh, T. és Kobe, B. (2000). Structural basis of monopartite and bipartite nuclear localization sequences by mammalian importin- α . *J. Mol. Biol.*, **297**: 1183-1194.

Fornerod, M., Ohno, M., Yoshida, M. és Mattaj, I.W. (1997). CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell*, **90**: 1051-1060.

Fridell, R.A., Truant, R., Thorne, L., Benson, R.E. és Cullen, B.R. (1997). Nuclear import of hnRNP A1 is mediated by a novel cellular cofactor related to karyopherin- β . *J. Cell Biol.*, **110**: 1325-1331.

Frohnhofer, H.G., Lehmann, R. és Nüsslein-Volhard, C. (1986). Manipulating the anteroposterior pattern of the *Drosophila* embryo. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **Oct 97, Suppl.**: 169-179.

Geles, K.G., Johnson, J.J., Jong, S. és Adam, S.A. (2002). A role for *Caenorhabditis elegans* importin IMA-2 in germ line and embryonic mitosis. *Mol. Biol. Cell*, **13**: 3138-3147.

Giarrè, M., Török, I., Schmitt, R., Gorjánác, M., Kiss, I. és Mechler, B.M. (2002). Patterns of importin- α expression during *Drosophila* spermatogenesis. *J. Struct. Biol.*, **140**: 279-290.

Giorgi, F. (1978). Intercellular bridges in ovarian follicle cells of *Drosophila melanogaster*. *Cell Tiss. Res.*, **186**: 413-422.

Goldman, R.D., Gruenbaum, Y., Moir, R.D., Shumaker, D.K. és Spann, T.P. (2002). Nuclear lamins: building blocks of nuclear architecture. *Genes & Dev.*, **16**: 533-547.

Gondos, B. (1973). Intercellular bridges and mammalian germ cell differentiation. *Differentiation*, **1**: 177-182.

Gorjánác, M., Ádám, G., Török, I., Mechler, B.M., Szlanka, T. és Kiss, I. (2002). Importin- α 2 is critically required for the assembly of ring canals during *Drosophila* oogenesis. *Dev. Biol.*, **251**: 271-282.

Görlich, D., Prehn, S., Laskey, R.A. és Hartmann, E. (1994). Isolation of a protein that is essential for the first step of nuclear protein import. *Cell*, **79**: 767-778.

Görlich, D., Kostka, S., Kraft, R., Dingwall, C., Laskey, R.A., Hartmann, E. és 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.

Görlich, D., Henklein, P., Laskey, R.A. és Hartmann, E. (1996a). A 41 amino acid motif in importin α confers binding to importin β and hence transit into the nucleus. *EMBO J.*, **15**: 1810-1817.

Görlich, D., Kraft, R., Kostka, S., Vogel, F., Hartmann, E. Laskey, R.A., Mattaj, I.W. és Izauralde, E. (1996b). Importin provides a link between nuclear protein import and U snRNA export. *Cell*, **87**: 21-32.

Görlich, D., Panté, N., Kutay, U., Aebi, U. és Bischoff F.R. (1996c). Identification of different roles for RanGDP and RanGTP in nuclear protein import. *EMBO J.*, **15**: 5584-5594.

Görlich, D. (1998). Transport into and out of the cell nucleus. *EMBO J.*, **17**: 2721-2727.

Görlich, D. és Mattaj, I.W. (1996). Nucleocytoplasmic transport. *Science*, **271**: 1513-1518.

Gruss, O.J., Carazo-Salas, R.E., Schatz, C.A., Guarguaglini, G., Kast, J., Wilm, M., Bot, N.L., Vernos, I., Karsenti, E. és Mattaj, I.W. (2001). Ran induces spindle assembly by reversing the inhibitory effect of Importin α on TPX2 activity. *Cell*, **104**: 83-93.

Guarnieri, D.J., Dodson, G.S. és Simon, M.A. (1998). Src64 regulates the localization of a Tec-family kinase required for *Drosophila* ring canal growth. *Mol. Cell*, **1**: 831-840.

Gutzeit, H.O. (1986). The role of microfilaments in cytoplasmic streaming in *Drosophila* follicles. *J. Cell Sci.*, **80**: 159-169.

Hetzer, M. és Mattaj, I.W. (2000). An ATP-dependent, Ran-independent mechanism for nuclear import of the U1A and U2B" spliceosome proteins. *J. Cell Biol.*, **148**: 293-303.

Hetzer, M., Bilbao-Cortes, D., Walther, .C., Gruss, O.J. és Mattaj, I.W. (2000). GTP hydrolysis by Ran is required for nuclear envelope assembly. *Mol. Cell*, **5**: 1013-1024.

Hime, G.R., Brill, J.A., és Fuller, M.T. (1996). Assembly of ring canals in the male germ line from structural components of the contractil ring. *J. Cell Sci.*, **109**: 2779-2788.

Hodel, M.R., Corbett, A.H. és Hodel, A.E. (2001) Dissection of a nuclear localization signal. *J. Biol. Chem.*, **276**: 1317-1325.

Holaska, J.M., Wilson, K.L. és Mansharamani, M. (2002). The nuclear envelope, lamins and nuclear assembly. *Curr. Opin. in Cell Biol.*, **14**: 357-364.

Hudson, A.M. és Cooley, L. (2002). A subset of dynamic actin rearrangements in *Drosophila* requires the Arp2/3 complex. *J. Cell Biol.*, **156**: 677-687.

Huber, A.H., Nelson. W.J. és Weis, W.I. (1997). Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-cateini. *Cell*, **90**: 871-882.

Hyman, A. és Karsenti, E. (1998). The role of nucleation in patterning microtubule networks. *J. Cell Sci.*, **111**: 2077-2083.

Imamoto, N., Shimamoto, T., Kose, S., Takao, T., Tachibana, T., Matsubae, M., Sekimoto, T., Shimonishi, Y. és Yoneda, Y. (1995). The nuclear pore targeting complex binds to nuclear pores after association with a karyophile. *FEBS Lett.*, **368**: 415-419.

Jankovics, F., Sinka, R., Lukácsovics T. és Erdélyi M. (2002) MOESIN crosslinks actin and cell membrane in *Drosophila* oocytes and is required for OSKAR anchoring. *Curr. Biol.*, **12**: 2060-2065.

Jans, D.A., Xiao, C-Y. és Lam, M.H.C. (2000). Nuclear targeting signal recognition: a key control point in nuclear transport? *BioEssays*, **22**: 532-544.

Jäkel, S. és Görlich, D. (1998). Importin β , transportin, RanBP5 and RanBP7 mediate nuclear import of ribosomal proteins in mammalian cells. *EMBO J.*, **17**: 4491-4502.

Jäkel, S., Werner, A., Kutay, U., Bischoff, F.R., Schwamborn, K., Doenecke, D. és Görlich, D. (1999). The importin β /importin 7 heterodimer is a functional nuclear import receptor for hiszton H1. *EMBO J.*, **18**: 2411-2423.

Jordan, P és Karess, R. (1997). Myosin-light chain-activiting phosphorylation sites are required for oogenesis in *Drosophila*. *J. Cell Biol.*, **139**: 18-1819.

Kalab, P., Pu, R.T. és Dasso, M. (1999). The Ran GTPase regulates mitotic spindle assembly. *Curr. Biol.*, **9**: 481-484.

Kamakaka, R.T, Tyree, C.M. és Kadonaga, J.T. (1991). Accurate and efficient RNA polymerase II transcription with a soluble nuclear fraction derived from *Drosophila* embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**: 1024-1028.

Kamei, Y., Yuba, S., Nakayama, T. és Yoneda Y. (1999). Three distinct classes of the alpha-subunit of the nuclear pore-targeting complex (importin-alpha) are differentially expressed in adult mouse tissues. *J. Histochem. Cytochem.*, **47**: 363-372.

Kelso, R.J., Hudson, A.M. és Cooley, L. (2000). *Drosophila* Kelch regulates actin organization via Src64-dependent tyrosine phosphorylation. *J. Cell Biol.*, **156**: 703-713.

Knowles, B.A. és Cooley, L. (1994). The specialized cytoskeleton of *Drosophila* egg chamber. *Trend Genet.*, **10**: 235-241.

Kobe, B. (1999). Autoinhibition by an internal nuclear localization signal revealed by the crystal structure of mammalian importin α . *Nat. Struct. Biol.*, **6**: 388-397.

Koch E.A. és King, R.C. (1966). The origin and early differentiation of the egg chambers of *Drosophila melanogaster*. *J. Morph.*, **119**: 283-304.

Köhler, M., Ansieau, S., Prehn, S., Leutz, A., Haller, H. és Hartmann, E. (1997). Cloning of two novel human importin- α subunits and analysis of the expression pattern of the importin- α protein family. *FEBS Lett.*, **417**: 104-108.

Köhler, M., Speck, C., Christiansen, M., Bischoff, F.R., Prehn, S., Haller, H., Görlich, D. és Hartmann, E. (1999). Evidence for distinct substrate specificities of importin- α family members in nuclear protein import. *Mol. Cell. Biol.*, **19**: 7782-7791.

Kramerova, I.A. és Kramerov, A. (1999). Mucinoprotein is a universal constituent of stable intercellular bridges in *Drosophila melanogaster* germ line and somatic cells. *Dev. Dynam.*, **216**: 349-360.

Kubota, S., Siomi, H., Satoh, T., Endo, S.-I., Maki, M. és Hatanka, M. (1989). Functional similarity of HIV-1 *rev* and HTLV-1 *rex* proteins: identification of a new nuclear-targeting signal in *rev* protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **162**: 963-970.

Kurstein, S., Ohno, M. és Mattaj, I.W. (2001). Nucleocytoplasmic transport: Ran, beta and beyond. *Trends Cell Biol.*, **11**: 497-503.

Kussel, P., és Frasch, M. (1995). Pendulin, a *Drosophila* protein with cell cycle-dependent nuclear localization, is required for normal cell proliferation. *J. Cell Biol.*, **129**: 1491-1507.

Kutay, U., Bischoff, F.R., Kostka, S., Kraft, R. és Görlich, D. (1997). Export of importin α from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor. *Cell*, **90**: 1061-1071.

Kutay, U., Lipowsky, G., Izaurralde, E., Bischoff, F.R., Schwarzmaier, P., Hartmann, E. és Görlich, D. (1998). Identification of a tRNA specific nuclear export receptor. *Mol. Cell*, **1**: 359-369.

Li, M.G., Serr, M., Edwards, K., Ludmann, S., Yamamoto, D., Tilney, L.G., Field, C.M. és Hays, T.S. (1999). Filamin is required for ring canal assembly and actin organisation during *Drosophila* oogenesis. *J. Cell Biol.*, **146**: 1061-1074.

Lin, H. és Spradling, A. (1993). Germline stem cell division and egg chamber development in transplanted *Drosophila* germaria. *Dev. Biol.*, **159**: 140-152.

Lin, H., Yue, L. és Spradling, A.S. (1994). The *Drosophila* fusome, a germline-specific organelle, contains membrane skeletal proteins and functions in cyst formation. *Development*, **120**: 947-956.

Lin, H., Spradling, A.C. (1995). Fusome asymmetry and oocyte determination in *Drosophila*. *Dev. Genet.*, **16**: 6-12.

Lin, H. és Spradling, A.C. (1997). A novel group of pumilio mutations affects the asymmetric division of germline stem cell in the *Drosophila* ovary. *Development*, **124**: 2463-2476.

Lipowsky, G., Bischoff, F.R., Schwarzmaier, P., Kraft, R., Kostka, S., Hartmann, E., Kutay, U. és Görlich, D. (2000). Exportin 4: a mediator of a novel nuclear export pathway in higher eucaryotes. *EMBO J.*, **19**: 4362-4371.

Lippai, M., Tirián, I., Boros, I., Mihály, J., Erdélyi, M., Belec, I., Máthé, E., Pószai, J., Nagy, A., Udvardy, A., Paraskeva, E., Görlich, D. és Szabad, J. (2000) The *ketel* gene encodes a *Drosophila* homologue of Importin- β . *Genetics*, **156**:1889-1900.

Longtine, M.S., De Marini, D.J., Valencik, M.L., Al-Awar, O.S., Fares, H., De Virgilio, C. és Pringle, J.R. (1996). Septins: roles in cytokinesis and other processes. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **8**: 106-119.

Máthé, E., Bates, H., Huikeshoven, H., Deák, P., Glover, D.M. és Cotterill, S. (2000). Importin- α 3 is required at multiple stages of *Drosophila* development and has a role in the completion of oogenesis. *Dev. Biol.*, **223**: 307-322.

Máthé, E., Inoue, Y.H., Plifframan, W., Brown, G. és Glover, D.M. (2003). Orbit/Mast, the CLASP orthologue of *Drosophila*, is required for asymmetric stem cell and cystocyte division and development of the polarised microtubule network that interconnects oocyte and nurse cells during oogenesis. *Development*, **130**: 901-915.

Mahajan-Miklos, S. és Cooley, L. (1994). Intercellular cytoplasm transport during *Drosophila* oogenesis. *Dev. Biol.*, **165**: 336-351.

Mahowald, A.P. (1971). The formation of ring canals by cell furrows in *Drosophila*. *Z. Zellforsch.*, **118**: 162-167.

Malik, H.S., Eickbush, T. és Goldfarb, D.S. (1997). Evolutionary specialization of the nuclear targeting apparatus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**: 13738-13742.

Mason, D.A., Fleming, R.J. és Goldfarb, D.S. (2002). *Drosophila melanogaster* Importin α 1 and α 3 can replace Importin α 2 during spermatogenesis but not during oogenesis. *Genetics*, **161**: 157-170.

Matova, N. és Cooley, L. (2001). Comparative aspects of animal oogenesis. *Dev. Biol.*, **231**: 291-320.

Mattaj, I.W. és Englmeier, L. (1998). Nucleocytoplasmic transport: The soluble phase. *Annu. Rev. Biochem.*, **67**: 265-306.

Meola, S.M., Mollenhauer, H.H. és Thompson, J.M. (1977). Cytoplasmic bridges within the follicular epithelium of the ovarioles of two *Diptera*, *Aedes aegypti* and *Stomoxys calcitrans*. *J. Morph.*, **153**: 81-86.

Minestrini, G., Máthé, E. és Glover, D.M. (2001). Domains of the Pavarotti kinesin-like protein that direct its subcellular distribution: effects of mis-localisation on the tubulin and actin cytoskeleton during *Drosophila* oogenesis. *J. Cell Sci.*, **115**: 725-736.

Mingot, J.-M., Kostka, S., Kraft, R., Hartmann, E. és Görlich, D. (2001). Importin13: a novel mediator of nuclear import and export. *EMBO J.*, **20**: 3685-3694.

Miyamoto, Y., Inamoto, N., Sekimoto, T., Tachibana, T., Seki, T., Tada, S., Enomoto, T. és Yoneda, Y. (1997). Differential modes of nuclear localization signal (NLS) recognition by three distinct classes of NLS receptors. *J. Biol. Chem.*, **272**: 26375-26381.

Moroianu, J., Blobel, G. és Radu, A. (1996). The binding site of karyopherin alpha for karyopherin beta overlaps with a nuclear localization sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**: 6572-6576.

Mosammaparast, M., Jackson, K.R., Guo, Y., Brame, C.J., Shabanowitz, J., Hunt, D.F. és Pemberton, L.F. (2001). Nuclear import of histone H2A and H2B is mediated by a network of karyopherins. *J. Cell Biol.*, **153**: 251-262.

Nachury, M.V., Maresca, T.J., Salmon, W.C., Waterman-Storer, C.M., Heald, R. és Weis, K. (2001). Importin β is a mitotic target of the small GTPase Ran in spindle assembly. *Cell*, **104**: 95-106.

Nadler, S.G., Tritzschler, D., Haffar, O.K., Blake, J., Bruce, A.G. és Cleaveland, J.S. (1997). Differential expression and sequence-specific interaction of karyopherin alpha with nuclear localization sequences. *J. Biol. Chem.*, **272**: 4310-4315.

Nakielnny, S. és Dreyfuss, G. (1999). Transport of proteins and RNAs in and out of the nucleus. *Cell*, **99**: 677-690.

Nemergut, M.E., Mizzen, C.A., Stukenberg, T., Allis, C.D. és Macara, I.G. (2001). Chromatin docking and exchange activity enhancement of RCC1 by histones H2a and H2b. *Science*, **292**: 1540-1543.

Neufeld, T.P. és Rubin, G.R. (1994). The *Drosophila peanut* gene is required for cytokinesis and encodes a protein similar to yeast putative bud neck filament proteins. *Cell*, **77**: 371-379.

Neuman-Silberger, F.S. és Schüpbach, T. (1993) The *Drosophila* dorsoventral patterning gene *gurken* produces a dorsally localized RNA and encodes a TGF- α -like protein. *Cell*, **75**: 165-174.

Nezis, I.P., Stravopodis, D.J., Papassideri, I., Robert-Nicoud, M. és Margarits, L.H. (2000). Stage-specific apoptotic patterns during *Drosophila* oogenesis. *Eur J. Cell Biol.*, **79**: 610-620.

Newmark, P.A. és Boswell, R.E. (1994) The mago nashi locus encodes an essential product required for germ plasm assembly in *Drosophila*. *Development*, **120**: 1303-1313.

Ohba, T., Nakamura, M., Nishitani, H. és Nishimoto, T. (1999). Self-organisation of microtubule asters induced in *Xenopus* egg extracts by GTP-bound Ran. *Science*, **284**: 1356-1358.

Ohno, M., Fornerod, M. és Mattaj, I.W. (1998), Nucleocytoplasmic transport: The last 200 nanometers. *Cell*, **92**: 327-336.

Palmeri, D. és Malim, M.H. (1999). Importin β can mediate the nuclear import of an arginine-rich nuclear localization signal in the absence of importin α . *Mol. and Cell. Biol.*, **19**: 1218-1225.

Paul, D.L. (1995). New functions for gap junctions. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **7**:665-672.

Pepling, M.E., de Cuevas, M. és Spradling, A.C. (1999). Germline cysts: a conserved phase of germ cell development? *Trends Cell Biol.*, **9**: 257-262.

Pokrywka, N.J. és Stephenson, E.C. (1991). Microtubules mediate the localization of bicoid RNA during *Drosophila* oogenesis. *Development*, **113**: 55-66.

Pollard, V.W., Michael, W.M., Nakielnny, S., Siomi, M.C., Wang, F. és Dreyfuss, G. (1996). A novel receptor-mediated nuclear protein import pathway. *Cell*, **86**: 985-994.

Pomozi, I. (2002) Polarizációs mintázatok nagy és kis látószögű képalkotó polarimetriai mérése légköri és biológiai vonatkozásokkal. *ELTE-TTK, Biológiai Fizikai Tanszék, doktori értekezés.*

Poodry, C.A. és Schneidreman, H.A. (1970). Ultrastructure of the developing leg of *Drosophila melanogaster*. *Wilhelm Roux's Arch. Dev. Biol.*, **166**: 1-44.

Precipalle, P., Clarkson, W.D., Kent, H.M., Rhodes, D. és Stewart, M. (1997). Molecular interactions between the importin alpha/beta heterodimer and protein involved in vertebrate nuclear protein import. *J. Mol. Biol.*, **266**: 722-732.

Prieve, M.G., Guttridge, K., Munguia, J.E. és Waterman, M.L. (1996). The nuclear localization signal of lymphoid enhancer factor-1 is recognized by two differentially expressed Srp1-nuclear localization sequence receptor proteins. *J. Biol. Chem.*, **13**: 7654-7658.

- Prieve, M.G., Guttridge, K., Munguia, J. és Waterman, M.L.** (1998). Differential importin- α recognition and nuclear transport by nuclear localization signal within the high-mobility-group DNA binding domains of lymphoid enhancer factor 1 and T-cell factor 1. *Mol. Cell. Biol.*, **18**: 4819-4832.
- Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M. és Séraphin, B.** (2001). The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods*, **24**: 218-229.
- Ramamurty, P.S. és Engels, W.** (1977). Occurrence of intercellular bridges between follicle epithelial cells in the ovaries of *Apis mellifica* queens. *J. Cell Sci.*, **24**: 195-202.
- Radu, A., Blobel, G. és Moore, M.S.** (1995). Identification of a protein complex that is required for nuclear protein import and mediates docking of import substrates to distinct nucleoporins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **92**: 1769-1773.
- Rexach, M. és Blobel, G.** (1995). Protein import into nuclei: association and dissociation reactions involving transport substrate, transport factors, and nucleoporins. *Cell*, **83**: 683-692.
- Ribbeck, K. és Görlich, D.** (2002). The permeability barrier of nuclear pore complexes appears to operate via hydrophobic exclusion. *EMBO J.*, **21**: 2664-2671.
- Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M. és Seraphin, B.** (1999). A genetic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat. Biotechnol.*, **17**: 1030-1032.
- Rigleman, B., Wieschause, E. és Schedl, P.** (1989). Molecular analysis of the armadillo locus: uniformly distributed transcripts and a protein with novel internal repeats are associated with a *Drosophila* segment polarity gene. *Genes Dev.*, **3**: 96-113.
- Robinson, N.D., Cant, K. és Cooley, L.** (1994). Morphogenesis of *Drosophila* ovarian ring canals. *Development*, **120**: 2015-2025.
- Robinson, N.D. és Cooley, L.** (1996). Stable intercellular bridges in development: the cytoskeleton lining the tunnel. *Trend Cell Biol.*, **6**: 474-479.
- Robinson, N.D. és Cooley, L.** (1997a). Genetic analysis of the actin cytoskeleton in the *Drosophila* ovary. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **13**: 147-170.
- Robinson, N.D. és Cooley, L.** (1997b). Examination of the function of two Kelch proteins generated by stop codon suppression. *Development*, **124**: 1405-1417.
- Robinson, N.D. és Cooley, L.** (1997c). *Drosophila* Kelch is an oligomeric ring canal actin organizer. *J. Cell Biol.*, **138**: 799-810.

- Robinson, N.D., Smith-Leiker, T.A., Sokol, N.S., Hudson, A.M. és Cooley, L.** (1997). Formation of the *Drosophila* ovarian ring cannal inner rim depends on *cheerio*. *Genetics*, **145**: 1063-1072.
- Rongo, C. és Lehman, R.** (1996). Regulated synthesis, transport and assembly of the *Drosophila* germ plasm. *Trend Genet.*, **12**:102-109.
- Rorth, P.** (1998). GAL4 in the *Drosophila* female germline. *Mech. Dev.*, **78**: 113-118.
- Roulier, E.M., Panzer, S. és Beckendorf, S.K.** (1998). The Teck29 tyrosine kinase is required during *Drosophila* embryogenesis and interacts with Src64 in ring canal development. *Mol. Cell*, **1**: 819-829.
- Saffman, E.E. és Lasko, P.** (1999). Germline development in vertebrates and invertebrates. *Cell Mol. Life Sci.*, **55**: 1141-1163.
- Sanders, S.L. és Field, C.M.** (1994). Septins in common? *Curr. Biol.*, **4**: 907-910.
- Satterwhite, L.L. és Pollard T.D.** (1992). Cytokinesis. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **4**: 43-52.
- Schatz, G. és Dobberstein, B.** (1996). Common principles of protein translocation across membranes. *Science*, **271**: 1519-1526.
- Schroeder, T.E.** (1990). The contractile ring and furrowing in dividing cells. *Ann. NY Acad. Sci.*, **582**: 78-87.
- Sekimoto, T., Imamoto, N., Nakajima, K., Hirano, T. és Yoneda, Y.** (1997). Extracellular signal-dependent nuclear import of Stat1 is mediated by nuclear pore-targeting complex formation with NPI-1, but not Rch1. *EMBO J.*, **16**: 7067-7077.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. És Mann, M.** (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.*, **68**: 850-858.
- Shevchenko, A., Zachariae, W. és Shevchenko, A.** (1999). A strategy for the characterization of protein interaction networks by mass spectrometry. *Biochem. Soc. Trans.*, **27**: 549-554.
- Siomi, H. és Dreyfuss, G.** (1995). A nuclear localization domain in the hnRNP A1 protein. *J. Cell Biol.*, **129**: 551-560.
- Smith, H.M. és Raikhel, N.V.** (1998). Nuclear localization signal receptor importin alpha associates with the cytoskeleton. *Plant Cell*, **10**: 1791-1799.
- Sokol, N.S. és Cooley, L.** (1999). *Drosophila* filamin encodes by the *cheerio* locus is a component of ovarian ring canals. *Curr. Biol.*, **9**:1221-1230.

- Stoffler, D., Fahrenkrog, B. és Aebi, U.** (1999). The nuclear pore complex: from molecular architecture to functional dynamics. *Curr. Opin. in Cell Biol.*, **11**: 391-401.
- Tan, C., Stronach, B és Perrimon, N.** (2003). Roles of myosin phosphatase during *Drosophila* development. *Development*, **130**: 671-681.
- Tekotte, H., Berdnik, D., Török, T., Buszczak, M., Jones, L.M., Cooley, L., Knoblich, J.A. és Davis, I.** (2002). *Dcas* is required for importin- α 3 nuclear export and mechano-sensory organ cell fate specification in *Drosophila*. *Dev. Biol.*, **244**: 396-406.
- Theurkauf, W.E., Smiley, S., Wong, M.L. és Alberts, B.M.** (1992). Reorganisation of the cytoskeleton during *Drosophila* oogenesis: Implication for axes specification and intercellular transport. *Development*, **115**: 923-936.
- Theurkauf, W.E.** (1994). Microtubule and cytoplasm organisation during *Drosophila* oogenesis., *Dev. Biol.*, **165**: 352-360.
- Tilney, L.G., Tilney, M.S. és Guild, G.M.** (1996a). Formation of actin filament bundles in the ring canals of developing *Drosophila* follicles. *J. Cell Biol.*, **133**: 61-74.
- Tilney, L.G., Connelly, P., Smith, S. és Guild, G.M.** (1996b). F-actin bundles in *Drosophila* bristles are assembled from modules composed of short filaments. *J. Cell Biol.*, **135**: 1291-1308.
- Timinszky, Gy., Tirián, L., Nagy, F.T., Tóth, G., Perczel, A., Kiss-László, Zs., Boros, I., Clarke, P. és Szabad, J.** (2002). The importin- β P446L dominant-negative mutant protein loses RanGTP binding activity and blocks the formation of intact nuclear envelope. *J. Cell Sci.*, **115**: 1675-1687.
- Tirián, L., Puro, J., Erdélyi, M., Boros, I., Papp, B., Lippai, M. és 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.
- Török, I., Strand, D., Schmitt, R., Tick, G., Török, T., Kiss, I. és 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.
- Török, I., Herrmann-Horle, D., Kiss, I., Tick, G., Speer, G., Schmitt, R. és Mechler, B.M.** (1999). Down-regulation of RpS21, a putative translation initiation factor interacting with P40, produces viable minute imagoes and larval lethality with overgrown hematopoietic organs and imaginal discs. *Mol. Cell Biol.*, **19**: 2308-2321.

- Török, T., Tick, G., Alvarado, M. és Kiss, I.** (1993). P-lacW insertional mutagenesis on the second chromosome of *Drosophila melanogaster*: isolation of lethals with different overgrowth phenotypes. *Genetics*. **135**: 71-80.
- Török, T., Harvie, P.D., Buratovich, M. és Bryant, P.J.** (1997). The product of proliferation disrupter is concentrated at centrosomes and required for mitotic chromosome condensation and cell proliferation in *Drosophila*. *Genes Dev.*, **11**: 213-225.
- Tsuji, L., Takumi, T., Inamoto, N és Yoneda, Y.** (1997). Identification of novel homologues of mouse importin alpha, the alpha subunit of the nuclear pore-targeting complex, and their tissue-specific expression. *FEBS Lett.*, **416**: 30-34.
- Van Doren, M., Williamson, A.L. és Lehmann, R.** (1998). Regulation of zygotic gene expression in *Drosophila* primordial germ cells. *Curr. Biol.*, **8**:243-246.
- Van Eeden, F. és St Johnston, D.** (1999). The polarisation of the anterior-posterior and dorsal-ventral axes during *Drosophila* oogenesis. *Curr. Opin. Gene. Dev.*, **9**: 396-404.
- Van Ruiten, T.M. és Sprey, T.E.** (1974). The ultrastructure of the developing leg disc of *Calliphora erythrocephala*. *Z. Zellforsch*, **147**: 173-200.
- Vasu, S.K. és Forbes D.J.** (2001). Nuclear pores and nuclear assembly. *Curr. Opin. in Cell Biol.*, **13**: 363-375.
- Venter, J.C., és mtai.,** (2001). The sequence of the human genome. *Science*, **291**: 1304-1351.
- Voie, A.-M. és Cohen, S.** (1998). Germ-line transformation of *Drosophila melanogaster*. *Cell Biology*, **3**: 510-517.
- Warn, R.M., Gutzeit, H.O., Smith, L. és Warn, A.** (1985). F-actin rings are associated with ring canals of the *Drosophila* egg chamber. *Exp. Cell Res.*, **157**: 355-363.
- Weihing, R.R.** (1985) The filamins: proteins and functions. *Can. J. Biochem. Cell. Biol.*, **63**: 397-413.
- Weis, K. Ryder, U., és Lamond, A.I.** (1996). The conserved amino-terminal domain of hSRP1 alpha is essential for nuclear protein import. *EMBO J.*, **15**: 1818-1825.
- Weis, K.** (2002). Nucleocytoplasmic transport: cargo trafficking across the border. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **14**: 328-335.
- Welch, K., Franke, J., Köchler, M. és Macare, G.I.** (1999). RanBP3 contains an unusual nuclear localization signal that is imported preferentially by importin-alpha3. *Mol. Cell. Biol.* **19**: 8400-8411.

Wheatley, S., Kulkarni, S. és Karess R. (1995) *Drosophila* nonmuscle myosin II is required for rapid cytoplasmic transport during oogenesis and for axial nuclear migration in early embryos. *Development*, **121**: 1937-1946.

Wieschaus, E. és Szabad, J. (1979). The Development and function of the female germ line in *Drosophila melanogaster*: a cell lineage study. *Dev. Biol.*, **68**: 29-46.

Wiese, C., Wilde, A., Moore, M.S., Adam, S.A., Merdes, A. és Zheng, Y. (2001). Role of importin-beta incoupling Ran to downstream targets in microtubule assembly. *Science*, **291**: 653-656.

Wilde, A. és Zheng, Y. (1999). Stimulation of microtubule aster formation and spindle assembly by the small GTPase Ran. *Science*, **284**: 1359-1362.

Xue, F. és Cooley, L. (1993). Kelch encodes a component of intercellular bridges in *Drosophila* egg chambers. *Cell*, **72**: 681-693.

Yue, L. és Spradling, A. (1992). Hu-li tai shao, a gene required for ring canal formation during *Drosophila* oogenesis, encodes a homolog of adducin. *Genes Dev.*, **6**: 2443-2453.

Zallen, J.A., Cohen, Y., Hudson, A.M., Cooley, L., Wieschaus, E. és Schejter, E.D. (2002) SCAR is a primary regulator of Arp2/3-dependent morphological events in *Drosophila*. *J. Cell Biol.*, **156**: 689-701.

Zhang, C., Hughes, M. és Clark, P.R. (1999). Ran-GTP stabilises microtubule asters and inhibits nuclear assembly in *Xenopus* egg extracts. *J. Cell Sci.*, **112**: 2453-2461.

Zhang, C., Hutchins, J.R.A., Mühlhäusser, P., Kutay, U. és Clarke, P.R. (2002). Role of Importin- β in the control of nuclear envelope assembly by Ran. *Curr. Biol.*, **12**: 498-502.

11. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

1. Tibor Török, **Mátyás Gorjánác**, Peter J. Bryant and István Kiss (2000). Prod is a novel DNA-binding protein that binds to the 1,686 g/cm³ bp satellite repeat of *Drosophila melanogaster*. **Nucleic Acids Research** **28**: 3551-3557.
2. **Mátyás Gorjánác**, Géza Ádám, István Török, Bernard M. Mechler, Szlanka Tamás and István Kiss (2002). Importin- α 2 is critically required for the assembly of ring canals during *Drosophila* oogenesis. **Developmental Biology** **251**: 271-282.
3. Marianna Giarrè, István Török, Rolf Schmitt, **Mátyás Gorjánác**, István Kiss and Bernard M. Mechler (2002). Patterns of importin- α expression during *Drosophila* spermatogenesis. **Journal of Structural Biology** **140**: 279-290.