

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

Ph.D. értekezés

Készítette: Gorjánáczy Máttyás

Témavezető: Dr. Kiss István

MTA Szegedi Biológiai Központ
Genetikai Intézet

Szeged, 2003

Bevezetés

Az Importin- α fehérjék homológiájuk szerint három alcsaládba, az $\alpha 1$, $\alpha 2$ és az $\alpha 3$ alcsaládba sorolhatók. A *Drosophila melanogaster* genomban három *importin- α* -t kódoló gén van, melyek mindegyike egy-egy képviselője a három alcsalád valamelyikének.

Az interfázisos sejtekben az Importin- α fehérjék legfontosabb funkciója a sejtmagi anyag transzport közvetítése. Ebben a folyamatban az Importin- α fehérjék adapter szerepet töltenek be, mert specifikusan felismerik és megkötik a nukleáris lokalizációs szekvenciát (NLS) hordozó célfehérjéket, de azok importját csak az Importin- β fehérjékhez kapcsolt módon képesek közvetíteni. A sejtmagba érkezve a transzport komplex szétesik és az Importin fehérjék visszakerülnek a citoplazmába, hogy egy újabb import ciklusban vehessenek részt. Azonban az Importin fehérjék több, a sejtmagi importtól független folyamat aktív résztvevői is lehetnek. A legújabb felfedezések szerint részt vesznek az osztódási orsók mikrotubulusainak polimerizálásában, illetve az egyes sejtosztódásokat követő magmembránok összeszerelődésben. Vizsgálataink során a *Drosophila* Importin- $\alpha 2$ fehérjének egy új és váratlan szerepére világítottunk rá a petefejlődés során.

A *Drosophila* petefejlődésének kezdeti lépéseként az őscsírarsejtek asszimmetrikusan osztódnak, létrehozva egy újabb őscsírarsejtet és egy cisztoblasztot. A cisztoblaszt ezután további négy nem teljes mitotikus osztódáson megy keresztül és egy 16-sejtes cisztát eredményez. A ciszta sejtjei közötti citoplazmatikus csatornák, vagy másnéven a gyűrűcsatornák, az osztódási betüremkedések stabilizálódása révén alakulnak ki. Az osztódási betüremkedések stabilizálódását és a gyűrűcsatornák kialakulását a petefejlődés megfelelő stádiumaiban az

osztódási betüremkedésekben felhalmozódó fehérjék idézik elő. A gyűrűcsatornák egyik ilyen legfontosabb komponense az F-aktin. Az F-aktin szálakat az ugyancsak gyűrűcsatorna komponens Kelch fehérje kötegekbe rendezi. A kötegekbe rendezett aktint egy másik aktin-kötő fehérje, a Filamin kapcsolja az osztódási betüremkedések plazmamembránján levő más fehérjékhez, létrehozva ezzel egy stabil és tömör aktin alapú gyűrűt.

A legtöbb élőlény hím és női ivarsejtjei fejlődésük bizonyos szakaszát gyűrűcsatornákkal összekapcsolt közös eredetű cisztákban töltik. A hím ivarsejtek fejlődése során ezeknek a gyűrűcsatornáknak fontos szerepük van az osztódások szinkronitásának megtartásában és az eltérő haploid genomú utódsejtek közötti azonos RNS és fehérje eloszlásban. A petesejt fejlődése során viszont a gyűrűcsatornák lehetővé teszik a petesejt feltöltését olyan anyagokkal, amelyek az embrió fejlődéséhez és a megfelelő szimmetria tengelyek kialakításához szükségesek.

Értekezésem az Importin- α 2 fehérje új funkciójának azonosításáról és annak részletes genetikai és biokémiai jellemzéséről szól. Bemutatom, hogy az Importin- α 2 fehérje miként játszik fontos szerepet a *Drosophila* petekamrák gyűrűcsatornáinak normális kialakulásában. Megállapítom, hogy ehhez a funkcióhoz a Importin- α 2 fehérje mely doménjeit használná. A mikrotubulusok polimerizációjában valamint a sejtmag membránok összeszerelődésében játszott fontos szerepük után az általunk leírt gyűrűcsatorna összeszerelődésre gyakorolt hatás az Importin- α fehérjék harmadik olyan funkciója amely a sejtmagi importtól független folyamat.

Alkalmazott módszerek

- > *Drosophila melanogaster* tenyésztése, genetikai keresztezések és a transzgénikus törzsekkel történő menekítési kísérletek
- > Ivarvonal transzformálás *Drosophila*-ban
- > Peték korion burkának preparálása
- > Ováriumok és embriók immunohisztokémiás festése
- > Ováriumok β -galaktozidáz festése
- > DNS munka: az *importin- α 2* gén *in vitro* mutagenézise, az *importin- α 2* gén vad típusú és mutáns formáinak Myc- és ProteinA-jelölése, PCR, klónozás, szekvenálás
- > Fehérje munka: *in vitro* transzláció, ko-immunoprecipitáció, az Importin- α 2 fehérjekomplexek tisztítása, *in vitro* mikrofilamentum kötés, Western blot
- > Fluoreszcens mikroszkóp, lézersugár pásztázó mikroszkóp és differenciál-polarizációs lézersugár-pásztázó mikroszkóp használata.
- > Pásztázó elektron mikroszkópia

Eredmények és következtetések

Kísérleteink során a *Drosophila* Importin- α 2 fehérje funkcióját vizsgáltuk a csíravonal eredetű hím és női ivarsejtekben.

1. Immunohisztokémiás kísérleteink során megállapítottuk, hogy az Importin- α 2 fehérje a hím ivarsejtek fejlődése során sejt-ciklus függő módon a korai profázisban felhalmozódik a sejtmagokban. Hasonló sejten belüli eloszlást figyelték meg a korai

embriogenezis során valamint más osztódó szövetekben is. Ez arra utal, hogy ezekben a szövetekben az Importin- α 2 fehérje fontos szerepet játszhat olyan fehérjék sejtmagba vitelében amelyek a sejtosztódáshoz fontosak.

2. A petefejlődés során az Importin- α 2 fehérje, ellentétben a transzportrendszer többi komponensétől, nem halmozódik fel a sejtmagokban. Alaposan megvizsgáltuk az osztódó cisztoblasztokat is, de ott sem tudtuk kimutatni az Importin- α 2 fehérjét a sejtmagokban. Dinamikus egyensúlyi állapotban főleg citoplazmatikus eloszlást mutatott, jellegzetesen felhalmozódva a kortikális aktin vázon. Ezek az észrevételek arra utalnak, hogy a petefejlődés során az Importin- α 2 fehérje nem vesz részt az általános sejtmagi transzportban. Azonban ez még nem zárja ki annak a lehetőségét, hogy kevés számú fehérje speciális transzport receptora legyen.
3. Az Importin- α 2 fehérje erős citoplazmatikus felhalmozódása azzal magyarázható, hogy a fehérje a kortikális aktin vázhoz kötődik. Abban az esetben amikor aktin depolimerizáló vegyületekkel kezeltük a petekamrákat azt találtuk, hogy az Importin- α 2 fehérje kiürült a citoplazmából és felhalmozódott a sejtmagokban. Az F-aktin és az Importin- α 2 fehérje közötti kölcsönhatás vizsgálata során megállapítottuk, hogy az Importin- α 2 fehérje NLS-függő módon kapcsolódik az aktin filamentumokhoz. Ezt a megfigyelésünket *in vivo* is megerősítettük. Hasonló NLS-függő F-aktin kötést tapasztaltunk a sejtmagi transzport rendszer többi tagja esetében is. Ez arra enged következtetni, hogy az aktin

filamentumok fontos szerepet játszhatnak az általános sejtmagi transzport szabályozásában.

4. Laboratóriumunk egy P-elem mutagenézis során azonosította a *Drosophila importin- α 2* gént. A P-elem pontatlan kivágódásával létrehozott *importin- α 2^{D14}* deléción null mutánsként viselkedett és róla fehérje nem képződött. Az *importin- α 2^{D14}* homozigóta legyek életképesek voltak, azonban részleges hím- és teljes nőstény sterilítást eredményeztek. A nősténysterilitás abban nyilvánult meg, hogy a mutáns legyek petéi kis méretűek voltak, helyenként megrövidült és összeolvadt dorzális függelékekkel.
5. A mutáns peték fenotípusának részletes vizsgálata során megállapítottuk, hogy az *importin- α 2^{D14}* mutáns petekamrákban a gyűrűcsatornákon keresztül történő anyagtranszport hibás. Ezekben a mutáns petekamrákban a gyűrűcsatornák abnormálisan beszűkültek és rajtuk keresztül jelentős anyagtranszport nem történik. Az *importin- α 2^{D14}* homozigóta mutáns petekamrák gyűrűcsatornáinak fenotípusa teljes mértékben megegyezik a *kelch^{DE1}* homozigóta null mutáns gyűrűcsatorna fenotípusával. Immunohisztokémiás kísérleteink során megállapítottuk, hogy az *importin- α 2^{D14}* mutáns gyűrűcsatornákból csupán a Kelch nevű fehérje hiányzik. Ennek az aktin-kötő fehérjének fontos szerepe van a gyűrűcsatornák aktin filamentumainak kötegekbe rendeződésében. Ezért hiánya az *importin- α 2^{D14}* homozigóta mutáns gyűrűcsatornák aktin vázának rendezetlenségét okozza.

6. Kimutattuk, hogy habár a Kelch fehérje nem halmozódik fel az *importin- $\alpha 2^{D14}$* homozigóta mutáns gyűrűcsatornában, az mégis jelen van a mutáns petekamrákban. Ez azt jelenti, hogy az Importin- $\alpha 2$ fehérje nem a Kelch fehérje kifejeződését hanem annak felhalmozódását szabályozza a gyűrűcsatornában. Azonban az Importin- $\alpha 2$ fehérjét semmilyen festési eljárással sem tudtuk kimutatni a gyűrűcsatornában. Ezek az észrevételek azt igazolják, hogy az Importin- $\alpha 2$ fehérje a Kelch fehérje előtt hat és hogy ezt valamilyen közvetett úton végzi anélkül, hogy a gyűrűcsatornák része lenne.
7. Az Importin- $\alpha 2$ fehérje ezen funkciójának részletes vizsgálata céljából *in vitro* előállítottunk új *importin- $\alpha 2$* alléleket. A mutagenesis során gondosan kiválasztott lehetséges funkcionális oldalláncokat rontottunk el az *importin- $\alpha 2$* génben és azokat UAS-elem szabályozása alatt csíravonal-specifikus Gal4 driverrel fejeztettük ki az *importin- $\alpha 2^{D14}$* homozigóta mutáns genetikai háttéren. Ezáltal a legyek csíravonal eredetű sejtjeiben csak az általunk mutagenizált és kifejeztetett mutáns Importin- $\alpha 2$ fehérjék voltak jelen. Ez lehetővé teszi az adott funkcionális domén *in vivo* vizsgálatát. Ezek segítségével a következőket állapítottuk meg:
- > az Importin- $\alpha 2$ fehérje citoplazmatikus jelenléte szükséges a gyűrűcsatornák normális szerkezetének kialakulásához
 - > az Importin- $\alpha 2$ fehérje új citoplazmatikus funkciójához fontosak az NLS-kötő domének
 - > az Importin- $\alpha 2$ fehérje képes bejutni a sejtmagba a petefejlődés során is. Ez egyértelműen igazolja azt, hogy az

Importin- α 2 fehérje a petefejlődés során részt vesz a sejtmagi transzportban.

8. Biokémiai kísérletekkel igazoltuk, hogy az Importin- α 2 fehérje a gyűrűcsatorna komponens Kelch fehérjével komplexet képez. Kölcsönhatásuk NLS-függő, ugyanis az NLS peptid kötésére képtelen Importin- α 2 fehérje nem képes komplexet képezni a Kelch fehérjével és így az *importin- α 2^{D14}* mutáns fenotípus helyreállítására sem képes. Azonban a Kelch fehérjének nincs klasszikus NLS peptidje ami felveti annak a lehetőségét, hogy a közöttük tapasztalt kölcsönhatást egy harmadik, ezidáig még ismeretlen fehérje közvetíti.

9. Az Importin- α fehérjék NLS-kötő doménje két részből áll, egy kis és egy nagy NLS-kötő doménből. Az Importin- α 2 fehérje NLS-kötő doménjeinek részletes vizsgálata során megállapítottuk, hogy a nagy NLS-kötő domén elrontása domináns negatív hatást idéz elő. Különböző szövetekben kifejezve ez a mutáns fehérje sejthalált idéz elő. Csírvonal eredetű sejtekben kifejezve, azok elhalása miatt, csírvonal hiányos ováriumokat eredményez. Kísérleteink és az idevonatkozó szakirodalom részletes áttekintése után úgy gondoljuk, hogy a nagy NLS-kötésben hibás Importin- α 2 fehérje nem képes az autóinhibícióra és így a még funkcióképes kis NLS-kötő doménjén keresztül állandóan megkötve és funkcióképtelenné tesz más NLS peptidet tartalmazó fehérjéket.

10. Koimmunoprecipitációs kísérleteink során megállapítottuk, hogy az Importin- α 2 fehérje a *Drosophila* petefejlődése során legalább 20 másik fehérjével alkot komplexet. Érdekes, hogy közöttük számos olyan fehérje is megtalálható, amelyek a kromatin fellazulásában játszanak fontos szerepet. Így felmerül annak a lehetősége is, hogy a domináns negatív Importin- α 2 fehérje ezen fehérjék irreverzibilis megkötésén keresztül fejt ki hatását. Azonban ezen lehetőség megerősítése további vizsgálatokat igényel.

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.