



Balázs Anna

## Az importin-béta<sup>1</sup> szerepe a kromatin<sup>2</sup> szerveződésében

### Abstract

Kutatócsoportunk a *Ketel*<sup>D</sup> domináns nőstény steril<sup>3</sup> mutációval azonosította a muslica *Ketel* génjét. A *Ketel* gén az importin-béta *Drosophila* homológját kódolja. Az importin-béta a sejtmagi fehérje-import egyik komponense. Meglepő, hogy a *Ketel*<sup>D</sup> mutáns allélok tömörítik a kromatint, amint azt a pozíció effektus variegáció (PEV) alapján kimutattuk.

A PEV olyan genetikai „eszköz”, amely jelzi a kromatin állapotát és alkalmas olyan gének azonosítására, amely gének terméke a kromatint tömöríti, illetve lazítja.

Munkánk során olyan fehérjepartnereket keresünk, melyek másképp kötődnek a mutáns importin-bétához, mint a vad típusú importin-bétához, remélve, hogy lesz köztük olyan, amelynek szerepe van a kromatin szerveződésében. A jelöltek egyike a nucleosome assembly protein 1 (*Nap-1*), melyről ismert, hogy a kromatin szerkezet alap-egységének, a nucleosomának a képzésében játszik szerepet.

Kimutattuk, hogy a *Nap-1* gén duplikációja illetve deficienciája is módosítja a PEV-et, sőt, a *Nap-1* duplikáció illetve deficiencia módosítja a *Ketel* domináns allélok hatását is a PEV-re.

Eredményeink biztatóak: azonosítottuk a *Ketel* egyik kölcsönható partnerét, a *Nap-1*-et, amely a *Ketellel* együttműködve módosítja a kromatin szerkezetét.

### Fogalomtár:

1. Importin-béta: olyan fehérje, amely a sejtmagi fehérjeimportban játszik szerepet, illetve részt vesz a kromatin szerkezetének módosításában, kialakításában.

2. Kromatin: az örökítőanyag és a hozzá kapcsolódó fehérjék összessége. A fehérjék kettős szerepet töltenek be:
  1. biztosítják a DNS szerkezeti stabilitását (speciális módon feltekerceslik)
  2. szabályozzák a transzkripciót (a gének átírását)
  
3. Domináns nőstény steril mutáció:
  - a) Mutáció: lényegében a változás képessége. Az örökítőanyagban spontán vagy indukált módon bekövetkező maradandó változás, mely az élőlény valamely tulajdonságának megváltozásához vezethet. A mutációk képezik az élőlények változatosságának, végeredményben az evolúciónak az alapját.
  - b) Domináns mutáció: olyan mutáció, amely fenotípusa heterozigóta állapotban is kifejeződik.
  - c) Fenotípus: egy élőlény külső érzékelhető tulajdonságainak összessége.
  - d) Heterozigóta: egy gén különböző változatait, azaz alléljait hordozza.
  - e) Allél: az egy tulajdonságra vonatkozó gént változat. Diploid élőlények esetében, (azaz olyan élőlényekben, mint pl. a muslica, a gerincesek, így az ember is az egyed kétszeres kromoszómakészlettel rendelkezik, melyek egyike anyai, másik része pedig apai eredetű) egy tulajdonság (pl: szemszín) kifejeződéséért (min.) 2 allél felel, melyek egyike az anyától, másika pedig az apától származik. Egy adott tulajdonságra vonatkozó allél lehet domináns, vagy recesszív. A domináns allél elnyomja recesszív allél által hordozott tulajdonságváltozatot, tehát a fenotípusban a domináns allél által hordozott tulajdonság jelenik meg (pl. a barna szemszín domináns a kékkel szemben).
  - f) Nőstény steril mutáció: olyan mutáció, amely a női egyedek sterilizációját okozza, azok szaporodásra képtelenek.
  
4. Gén: az öröklődés és a genetikai funkció egysége, a DNS egy adott, jól definiálható szakasza.
5. *Drosophila Melanogaster*: közönséges muslica, a genetikai vizsgálatok ideális modellje, mert gyorsan szaporodik, könnyen tenyészíthető, genetikai megfigyelése pedig egyszerű, hiszen csupán négy kromoszómája van. A muslica géntérképe ismert, ami szintén nagy könnyebbséget jelent a DNS szakaszok azonosítása során.
6. Importin-béta *Drosophila* homológja: az importin-béta fehérje muslicában található formája.

7. Sejtmagi fehérjeimport: a sejtplazmából a sejtmagba irányuló fehérjetranszport. A fehérjék szállítását spec. molekulák (importin fehérjék, mint pl. az importin- $\beta$ ) végzik szintén speciális sejtmagpólus-komplexeken keresztül. A szállítandó fehérjét a sejtplazmában kötik meg egy jellegzetes szignál-molekula alapján, amely azt jelzi, hogy a fehérje helye a sejtmagban van. Minderre azért van szükség, mert a fehérjék szintézise a sejtplazmában történik, funkciójukat viszont egyesek épp a sejtmagban látják el. Például a kromatinhoz kötődnek és szabályozzák a gének átíródását. Mivel a sejtmagot a plazmától egy kettős membránréteg, a sejtmaghártya választja el, amelyen bár vannak apró „lyukak” a fehérjék számára nem átjárhatók, így az alagútként vagy átjáróként szolgáló sejtmagpólus-komplexre és a sejtmag importot folytató fehérjékre egyaránt szükség van. A transzport energiaigényét pedig további fehérjemolekulák szolgáltatják.
8. Pozíció effektus variegáció: olyan jelenség, mellyel a kromatin génátírásra gyakorolt hatását vizsgálhatjuk. (lásd alább)
9. Vad típusú importin- $\beta$ : normális fehérje funkcióját és szerkezetét tekintve. Mivel ez fordul elő legnagyobb gyakorisággal az élőlényekben, a természetben, ezért vad típusúnak nevezzük.
10. Mutáns importin- $\beta$ : a vad típustól eltérő változatok.
11. Nap-1: Nucleosoma assembly protein-1: nucleosomák összeszerelését végző fehérje.
  - a) nucleosoma: a DNS és a hozzá kapcsolódó ún. hisztonfehérjék által alkotott korong alakú komplexek. A Nap-1 sok más fehérjével együtt ennek a szerkezetnek a kialakítását végzi.
12. A gén duplikációja: ha egy gén két alléja közül az egyik kétszeresen van jelen, így összesen az adott gén nem kettő, hanem három allélját hordozza az élőlény. Emiatt a kódolt fehérje is nagyobb koncentrációban van jelen a sejtben.
13. A gén deficienciája: ha a gén két alléja közül az egyik hiányzik. Tehát csak egy géntípus van jelen, ami miatt a kódolt fehérje is kisebb mennyiségben van jelen.

## Az importin-béta szerepe a kromatin szerveződésben.

Tankönyvi adat, hogy az eukarióta sejtek örökítőanyaga jól szervezett struktúrák formájában van jelen a sejtmagban. Ez biztosítja a DNS szerkezeti stabilitását és szerepe van a génátírás szabályozásában is. Ez a struktúra a kromatin. A kromatin DNS-ből és a hozzá kapcsolódó fehérjékből áll. Fontos szerepet töltenek be a bázikus jellegű hiszton fehérjék, melyekre a DNS feltekeredik, így egy komplex, a nucleosoma jön létre. A DNS további nemhiszton fehérjékkel kapcsolódik, ezáltal tekercsek, szupertekercsek alakulnak ki, végül pedig létrejön egy „szuper-szuper” tekercs, a kromoszóma. A kromatin részt vesz a génátírás szabályozásában hiszen a laza kromatinszerkezet lehetővé teszi a transzkripciót, míg az erősen feltekereslődtött kromatin inaktíválja a géneket. A kromatin szerkezetváltozásait egy jól ismert módszerrel, a pozíció effektus variegációval vizsgáljuk: olyan legyeket készítünk, melyek egy speciális mutációt, inverziót hordoznak. Ez azt jelenti, hogy a DNS egy szakasza kivágódik majd megfordul és ellentétes irányba épül vissza. Ekkor előfordulhat az, hogy egy gén - jelen esetben a muslica white génje (mely a muslica piros szemszínéért felel) - közelébe heterokromatin (azaz erősen feltekereslődtött, átíródásra képtelen DNS szakasz) kerül. Egyes esetekben a heterokromatin ráterjed a white génre, tehát azt olyan mértékben feltekeri, hogy az átírása lehetetlenné válik. Ezek a szemkezdeménysejtek és utódsejtjeik a muslica szemében fehér foltként jelennek meg. Más esetben a heterokromatin nem terjed rá a white génre, így annak transzkripciója zavartalanul folyhat, ennek megfelelően ezek a szemkezdeménysejtek és utódsejtjeik a muslica szemében piros foltot eredményeznek. Végül olyan muslica szem alakul ki, ahol a piros és fehér foltok mozaikszerűen rendeződnek. Mivel a szemszínért a white gén és a heterokromatin egymáshoz viszonyított pozíciója felel, a jelenség neve pozíció effektus variegáció (PEV). A PEV-et számos módosító hatás érheti: a kromatint lazító mutációk eredményeként a white gén nagyobb gyakorisággal íródhat át az egyes szemkezdeménysejtekben, a muslica szemé az előbb ismertetett mozaikos szemhez képest bepirosodik. A kromatint tömörítő mutációk viszont a white gén átíródását gátolják, tehát a muslica szemé kifehéredik. Ha egy mutációnak a kromatinra gyakorolt hatását szeretnénk vizsgálni nem kell mást tenni, mint készíteni olyan muslicákat melyek az előbb ismertetett inverziót hordozzák majd keresztezéssel be kell vinni a vizsgálandó mutációt. Mint ahogy az előzőekben is láttuk, a kromatin szerkezetváltozását jól tükrözi a muslicák szemszínének pirossága vagy fehérsége, tehát nem kell mást tenni, mint a szemszín intenzitását vizsgálni.

Intézetünkben domináns nőstény steril mutációkkal foglalkozunk. Kíváncsiak voltunk, hogy van-e ezek között olyan, amely szintén hatással

van a PEV-re. Ezt megválaszolando kísérleteket folytattunk és kiderült, hogy valóban vannak ilyen mutációk. Ennek egyike a Ketel<sup>D</sup> nőstény steril mutáció, amely a kromatin szerkezetét tömöríti, ami a muslicák szemét kifehériti. A Ketel<sup>D</sup> mutáció az importin-béta génben következett be. Az importin-béta fehérje a sejtmagi fehérjeimport egyik főszereplője, fehérjét szállít a sejt plazmából a magba, a sejtmagpóluskomplexen keresztül anélkül, hogy ő maga ténylegesen a sejtmag belsejébe jutna. Tehát az importin-béta egy citoplazmatikus fehérje, és ahogy láttuk részt vesz a kromatin módosításában. Ez azért nagyon érdekes, mert az eddig megismert kromatin módosító fehérjék mind a sejtmagban vannak és a kromatinhoz kötődnek, az egyetlen kivétel az importin-béta. Felmerült az a kérdés, hogy hogyan befolyásolhatja mégis a kromatin állapotát. Ismert adat, hogy a heterokromatin a sejtmaghártya belső felszínéhez és a sejtmagpólus-komplexhez kötődik. Itt elvileg lehetőség van arra, hogy az importin-béta, miközben a sejtmag és a sejt plazma között ingázik kapcsolódjon a kromatinnal. Azt feltételeztük, hogy vannak olyan kromatin fehérjék, amelyek lehetővé teszik ezt a kapcsolatot. Hogy ezt bebizonyítsuk az affinitás kromatográfia módszerét alkalmaztuk (olyan fehérjét kerestünk, melyek a mutáns és vad importin-bétához eltérő módon kötődnek): egy-egy speciális oszlopra mutáns és vad importin-bétát kötöttünk, majd ezen a muslicasejtek extraktját (elfolyósított kivonatát) csorgattuk át. Ekkor egyes fehérjék az importin-bétához kötődtek. Ezeket lemostuk (leválasztottuk az importin-bétáról a köztük kialakult kémiai kötések bontásával.), majd gélelektroforézissel elkülönítettük (ez egy olyan eljárás, amely a fehérjét tömegük alapján választja szét), végül ezüstözéssel festettük, hogy láthatóvá váljanak. Ahogy vártuk, egyes fehérjék erősebben kötődtek a mutáns importin-bétához, mint a vad típusúhoz. Ezeket a fehérjéket a gélből izoláltuk, majd MALDI-TOF (matrix-associated-laser-dissorption-ionisation - time-of-flight) módszerrel azonosítottuk (ez egy olyan eljárás, ami a fehérjéket a peptidjeik (fehérjedarabkáik) tömege alapján képes azonosítani). Az azonosított fehérjék egyike a Nap-1 volt, amelyről kiderült, hogy egy már ismert protein, a nucleosomák összeszerelésében vesz részt. A gélelektroforézis sorá láthattuk, hogy a Nap-1 a mutáns importin-bétához jóval erősebben kötődik, mint a vad típusúhoz. Mindebből arra következtettünk, hogy a mutáns importin-béta kromatinra gyakorolt hatását a Nap-1-en keresztül fejti ki. Ahogyan az előzőekben már láttuk a kromatin szerkezetét a muslicák szemének festéktartalma tükrözi. Abból a célból, hogy a Nap-1 és az importin-béta fehérjék kromatinra gyakorolt együttes hatását vizsgáljuk, olyan muslicákat készítettünk keresztezésekkel, melyek hordozták a korábban bemutatott inverziót, illetve az importin-béta mutációját. Ezután a Nap-1 gén mennyiségét változtattuk duplikációval és deficienciával. Mindezen keresztezések során láthattuk hogyan befolyásolja a Nap-1 és a mutáns importin-béta a kromatin tömörségét a pozíció effektus variegáció,

ezáltal a white gén expresszióját, végső soron a muslicák szemének festéktartalmát. A szemek pigmenttartalmát fotometrálással (olyan eljárás, amely az egyes anyagok fényelnyelési tulajdonságait vizsgálja egy standardhoz viszonyítva) mértük. Ekkor azt láttuk, hogy azon legyek szemének festéktartalma igen alacsony, amelyek hordozták az importin-béta mutációját, az említett inverziót és a Nap-1 gén két kópiáját (ami a normális génmennyiség). Ezután olyan legyeket készítettünk, melyek az importin-béta mutáció és az inverzió mellett a Nap-1 gén deficienciáját is hordozták, ami azt jelenti, hogy a Nap-1 gén nem kettő, hanem csupán egy kópiában volt jelen. Ekkor természetesen a Nap-1 fehérjét is kisebb koncentrációban tartalmazták a sejtek. Azt tapasztaltuk, hogy ezen legyek szemének festéktartalma az első esethez képest csökkent. A szem kifehéredése pedig a kromatin tömörödésére utal. Olyan legyeket is vizsgáltunk, amelyek az importin-béta mutáción és az inverzióon kívül a Nap-1 gén duplikációját is hordozták, azaz három kópia Nap-1 gént tartalmaztak, ami miatt a Nap-1 fehérje mennyisége is megnőtt. Mindez azt eredményezte, hogy a legyek szemének pigmenttartalma jelentősen emelkedett. A bepirosodott szem pedig a kromatin lazulására utal. Mindezek alapján úgy tűnik megválaszolhatjuk azt a kérdést: hogyan befolyásolhatja egy citoplazmatikus fehérje azaz az importin-béta a kromatin szerkezetét. Valószínű, hogy az importin-béta a Nap-1-en keresztül képes kapcsolódni a kromatinhoz, ezáltal kivonja a forgalmóból a Nap-1-et és megakadályozza, hogy az a normális funkcióját betöltse: kialakítsa a normális nucleosoma szerkezetet és lazítsa a kromatint. A megfigyeléseinkből az alábbi következtetéseket vonhatjuk le: az importin-béta részt vesz a kromatinszerkezet felépítésében, illetve az importin-béta a Nap-1-hez kapcsolódik, ezáltal meggátolja annak kromatin-lazító hatását, végső soron a kromatint tömöríti.