

Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola
Szegedi Tudományegyetem

Ph.D. értekezés



A sejtmagi aktin funkciójának vizsgálata

Borkúti Péter

Témavezető: Dr. Vilmos Péter

2022.

Az értekezéshez kapcsolódó közlemények listája

- I. Borkúti, P., Kristó, I., Szabó, A., Bajusz, C., Kovács, Z., Réthi-Nagy, Z., Lipinszki, Z., Lukácsovich, T., Bogdan, S., & Vilmos, P. (2022). Parallel import mechanisms ensure the robust nuclear localization of actin in *Drosophila*. *Frontiers in Molecular Biosciences*. Közlésre elfogadva. <https://doi.org/10.3389/FMOLB.2022.963635>
IF: 6,113 (Q1)

- II. Bajusz, C., Kristó, I., Abonyi, C., Venit, T., Vedelek, V., Lukácsovich, T., Farkas, A., Borkúti, P., Kovács, Z., Bajusz, I., Marton, A., Vizler, C., Lipinszki, Z., Sinka, R., Percipalle, P., & Vilmos, P. (2021) The nuclear activity of the actin-binding Moesin protein is necessary for gene expression in *Drosophila*. *The FEBS Journal*, 288(16), 4812–4832. <https://doi.org/10.1111/FEBS.15779>
IF: 5,62 (Q1)

- III. Borkúti, P., Bajusz, I., Bajusz, C., Kristó, I., Kovács, Z., & Vilmos, P. (2019) Testing the biological significance of the nuclear localization of actin. *Biopolymers and Cell*, 35(3), 204–204. <https://doi.org/10.7124/BC.000A06>
IF: 0,218 (Q4)

Az értekezéshez kapcsolódó publikációk kumulatív impakt faktora: 11.951

Nem közvetlenül az értekezéshez kapcsolódó közlemények listája

- I. Bajusz, C., Borkúti, P., Kristó, I., Kovács, Z., Abonyi, C., & Vilmos, P. (2018) Nuclear actin: ancient clue to evolution in eukaryotes? *Histochemistry and Cell Biology*, 150(3), 235–244. <https://doi.org/10.1007/s00418-018-1693-6>
IF: 2,64 (Q1)

Rövidítések

ABPs – aktin kötő fehérjék
BDSC – Bloomington-i Drosophila Törzsközpont
BiFC – bimolekuláris fluoreszcens komplementáció
DGRC – Drosophila Genomics Resource Center
GFP – green fluorescent protein
IVTT – *in vitro* transzkripció és transzláció
LMB – leptomycin B
NES – nukleáris export szignál
NLS – nukleáris lokalizációs szignál
NPC – sejtmag pórus komplex
Pi – foszfát
P-TEFb – pozitív elongációs faktor b
PTM – poszttranszlációs módosítás
RNAPII – RNS polimeráz II
SUMO – kis ubikvitinszerű fehérje
YFP – Yellow fluorescent protein

1. BEVEZETÉS

1.1. Az aktin az egyik legősibb fehérje

Az aktint először Straub F. Brúnó izolálta 1942-ben Szegeden. Az eukarióta szervezetek egyik legnagyobb mennyiségben előforduló fehérjéje, evolúciósan erősen konzervált szerkezetű, és igen ősi eredetű. Legkorábbi formája már a baktériumok, archeák és eukarióták közös őseiben is megjelent. Szerkezetüket tekintve a prokarióta aktinszerű fehérjék (pl. MreB, FtsA és ParM), az eukarióta aktinszerű fehérjék (pl. ARP-k és HSP-k) és az eukarióta aktinok mind globuláris harmadlagos szerkezetet mutatnak, amely négy aldoménből áll. A domének között található mély hasadéknak ATP kötő szerepe van. A fehérjék közös funkcionális és szerkezeti tulajdonságaik alapján egyértelműen egy ősi és divergens aktin szuperfamilátust alkotnak.

A prokarióták sejtvázkuk szervezéséhez és fenntartásához az úgynevezett „egy-filamentum-egy-funkció” rendszert használják. A MreB például a sejt alakjának fenntartásában, illetve a sejtfa szintézisét végző fehérjekomplex tagjainak toborzásában részt vesz. A prokarióták egy másik figyelemre méltó aktinszerű fehérjéje az FtsA, amely elengedhetetlen a sejtosztódáskor aktív komplexek összeszereléséhez. A sejtosztódás során a bakteriális plazmidokat pedig a ParM nevű aktinszerű fehérje választja szét egymástól.

Ezzel szemben az eukarióták az aktin fehérjét használják olyan folyamatok során, mint a citoskeleton szerveződése, a sejtmozgás és az intracelluláris szállítás, csak hogy néhányat említsünk. Az eukarióta sejteknek nem szükséges az aktinszerű fehérjék mennyiségének magas szinten tartása; a számos funkcióspecifikus aktinvariáns nélkül is képes az aktin a biológiai folyamatok szélesebb skálájában részt venni.

Bár az aktin gének száma az eukarióta fajok között nagymértékben változó, az aktin evolúciója mégis „fagyott állapotban” van, a különböző eukarióta szervezetek aktin fehérjéje rendkívül konzervált. Az univerzális aktin rendszer létrejötte ugyanis egy magasabb szintű szabályozás kialakulásának az eredménye, amely lehetővé teszi az aktin nagyszámú egyedi funkcióinak fenntartását. A magasabb szintű szabályozást aktinkötő fehérjék serege biztosítja. Érdekes módon, az aktin szekvenciájával mutatott homológiájuk 15-70% közt változik.

1.2. Az aktin citoskeletonális fehérje

1.2.1. A G-aktin és F-aktin szerkezete

Az aktin az eukarióta sejtekben monomer, G-aktin, illetve polimerizált, F-aktin formában van jelen. Az emberben a monomer aktinnak 3 izoformája van: α -aktin (jelen van az izomsejtekben), β -aktin (jelen van a nem izomsejtekben) és γ -aktin (mind az izom-, mind a nem

izomsejtekben jelen van). Ezek az izoformák csak néhány aminosavban különböznek az N-terminális végükön, amely eltérés minden bizonnyal felelős az aktin izoformák funkcionális különbségeiért, ezáltal morfológiailag és citoarchitektúráisan eltérő sejteket eredményezve a gerincesekben. A *Drosophila melanogaster* esetében azonban a hat aktin izoforma aminosav szekvenciáinak különbségei nem játszanak semmilyen funkcionális szerepet.

Poszttranszlációs módosítások (PTM-ek) képesek befolyásolni az aktin működését. Ilyen PTM például a szumoiláció, acetiláció, metiláció vagy a riboziláció. Szumoiláció során a kis ubikvitinszerű fehérjék (SUMO) a célfehérjék konzervált szumoilációs motívumában lévő lizinekhez kovalensen kötődnek. Ez a módosítás legtöbbször gének transzkripciójának megváltozásához, fehérje-fehérje interakciók módosulásához, illetve a fehérjék kompartmentek közti transzlokációjához vezet. A humán aktinban a 68. és 284. pozícióban lévő lizinek szükségesek a fehérje szumoilációjához. Előbbi az aktin-SUMO kölcsönhatás stabilizálásáért felelős, míg az utóbbi blokkolja az aktin sejtmagi export szignáljának (NES) hozzáférhetőségét. Ezáltal a szumoiláció képes az aktin sejtmagi-citoplazmatikus transzlokációját közvetlenül is befolyásolni.

Az aktin első szerkezeti jellemzése óta már jól ismert, hogy a fehérje 375 aminosavból álló polipeptidlánca 4 aldomént alkot, amelyek a fehérje globuláris szerkezetét alakítják ki. Ezek a szubdomének méretük alapján kis és nagy alegységekre oszthatók. A polipeptidlánc ezek között a kis és nagy alegységek között áthaladva két hasadékot hoz létre. Az így kialakult felső hasadék képes ATP-t és Mg^{2+} iont kötni, míg az alsó hasadék az aktinkötő fehérjék kötőhelyeként szolgál.

Mint már említettük, az aktin a sejtekben G- vagy F-aktin formában van jelen. Az F-aktin képződése három-négy, G-aktinból álló nukleációs magról indul el. A növekvő filamentum poláris szerkezetű, mely az F-aktin végeinek eltérő növekedési sebességéből ered. A G-aktin filamentumba történő beépülése energiaigényes folyamat, mely során az ATP lassan ADP-vé és szervetlen foszfáttá (P_i) hidrolizál. Az ATP hidrolízise és a keletkezett ADP + P_i felszabadulása sokkal lassabb folyamat, mint az új monomerek beépülése. A filamentumok egyik vége többnyire ATP- vagy ADP + P_i -kötött, míg másik vége ADP-kötött állapotban van. Az előbbi, gyorsan növekvő véget szöges végnek, a filamentum ellentétes oldalán lévő, lassan növekedő végét pedig hegyes végnek nevezzük. A filamentum képződés rendkívül lassú és energiaigényes folyamat. A sejtekre jellemző gyors filamentum növekedés kizárólag az ABP-k szigorú szabályozása és közreműködése mellett érhető el.

1.2.2. Az aktin citoplazmatikus funkciói

A citoskeleton szervezése mellett számos más, sejten belüli folyamatban is részt vesz az aktin, mint például a plazmamembrán internalizáció, citokinézis és izomösszehúzódás. Az aktin működését ezekben a folyamatokban is számos ABP segíti és szabályozza. Plazmamembrán internalizáció során például különböző aktinkötő fehérjék segítik az aktin foltok kialakulását. Ezekről a foltokról polimerizálódó aktin filamentumok hatására fellépő mechanikai erők segítik az endocitotikus vezikulák kialakulását. A citokinézis és az izomösszehúzódások esetében az aktin különböző típusú miozin fehérjékkel együttműködve képes az aktin filamentumok hosszát megrövidíteni, ami az osztódó sejtek szétválását, vagy az izomösszehúzódások makroszkopikus mozgását eredményezi. Ez csak néhány egyszerű példa, amelyek szemléltetik, hogy milyen sok feladatot lát el az aktin az aktinkötő fehérjék segítségével a sejtekben.

1.3. A sejtmagi aktin

1.3.1. A sejtmagi aktin felfedezése és formái

A sejtmagi aktin létezésével kapcsolatos korai megfigyelések még eléggé ellentmondásosak voltak. A sejtmagi aktin első megfigyelése borjú csecsemőmirigy sejtek szubcelluláris frakciójában történt. Később az elektronmikroszkópia fejlődésével sikeresen figyeltek meg stresszhatásokra kialakuló fibrilláris aktin kötegeket a sejtmagban. Ma már vitathatatlan tény, hogy az aktin nemcsak jelen van a sejtmagban, hanem ott számos feladatot is ellát.

A sejttagon belül az aktinnak több formája is ismert. A sejtmagi monomer aktin megegyezik a citoplazmatikus G-aktinnal, azonban poszttranszlációs módosításai és kötőpartnerei még ma is ismeretlenek. A sejtmagi aktin oligomerek nem rendelkeznek filamentózus szerkezettel, de néhány kutatás sikeresen kapcsolt sejtmagi funkciókat ezen aktin formákhoz is. Egy további ismert forma a sejtmagi aktin pálcá. Eltérően a citoplazmatikus F-aktintól, ez a forma nem detektálható phalloidinnel. Ennek legvalószínűbb oka, hogy a sejtmagi aktin pálcákhoz nagy mennyiségben köt kofilin fehérje, ami megakadályozza a phalloidinnel történő festődését. Ennek a jelenségnek a ténye azt sugallja, hogy a sejtmagi aktin pálcák szerkezetileg nagy mértékben eltérnek a citoplazmatikus F-aktintól.

1.3.2. Az aktin sejtmagi-citoplazmatikus transzportja

Az aktin jelenléte a citoplazmában és a sejtmagban feltételez egy erősen szabályozott, aktív transzport mechanizmust, amely fenntartja a kompartmentek egymástól eltérő, stabil aktinszintjét. Ugyan az aktin méretét tekintve (42 kDa) az NPC-k passzív diffúziós gátja (40-60 kDa) alatt van, kísérletek bizonyítják, hogy a magpórus komplexeken mégis aktív transzport

révén jut keresztül. Az aktin nem rendelkezik klasszikus sejtmagi lokalizációs szignállal (NLS), azonban egyik kötőpartnere, a kofilin tartalmaz egy kéttagú, SV40-típusú NLS-t. Dopie és munkatársai kísérletesen bizonyították, hogy az aktin valóban a kofilinnel komplexben kerül a sejtmagba az Importin 9 nevű béta-importin segítségével.

Az aktív import mechanizmus megléte feltételezi, hogy a sejtmagi export folyamata is szigorúan szabályozott, aktív módon történik. Az aktin rendelkezik két felételezett NES motívummal, melyek leucinban és hidrofób aminosavakban gazdagok. Ezeket a NES motívumokat a CRM1 export fehérje képes felismerni. Leptomycin B (LMB) kezelés hatására, mely egy ismert CRM1 gátlószer, az aktin sejtmagi felhalmozódása és sejtmagi aktin pálcák képződése figyelhető meg *Drosophila* sejtekben. Ez arra a következtetésre vezetett, hogy a CRM1 az aktin fő nukleáris export faktora. Mivel az LMB kezelés önmagában is stresszhatást jelent a sejteknek, ezért az elmélet kritikusai az aktin magi felhalmozódását nem közvetlenül a CRM1 aktint exportáló mechanizmusával hozták összefüggésbe. Ezen túlmenően az is bizonyítást nyert, hogy a humán CRM1 fehérje nem ismeri fel az aktint, mint kiszállítandó fehérjét.

Ezzel szemben Stüven és munkatársai azt találták, hogy humán sejtekben az aktin-profilin komplex stabilan kötődik az Exportin 6 fehérjéhez a sejttagon belül. Az Exportin 6 hiányának hatására sejtmagi aktin felhalmozódás figyelhető meg, amelyet CRM1 túltermeléssel nem lehet megszüntetni. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a gerincesekben az Exportin 6-profilin-aktin komplex az aktin fő sejtmagi export útvonala.

1.3.3. A sejtmagi aktin funkciói

Napjainkban gyorsan bővül a sejtmagi aktin funkcióinak listája, mivel a fehérje majdnem minden alapvető sejtmagi folyamatban részt vesz. A legismertebb sejtmagi szerepeit olyan folyamatokban látja el, mint például a transzkripció szabályozása, a kromatin átrendeződés, DNS hibák javítása, mRNS szállítás, a sejtmag méretének és szerkezetének biztosítása, valamint az előmag kialakítása.

Biokémiai kísérletek tapasztalata alapján az aktin rendszerint együtt tisztul az RNS polimeráz II (RNAPII) komplexszel. A G-aktin képes a komplexhez toborozni a pozitív elongációs faktor b (P-TEFb) fehérjét, hogy az foszforiláción keresztül aktiválja az RNAPII-t. Emellett a sejtmagi aktin polimer formában is képes a sejtmagi miozinnal kölcsön hatva részt venni a transzkripcióban.

A sejtmagi aktin közvetve is szabályozhatja a transzkripció faktorok működését. A G-aktin képes például megkötni az MRTF-A transzkripció kofaktort a citoplazmában. Emiatt az

MRTF-A fehérje NLS-e nem lesz hozzáférhető, így nem tud bejutni a sejtmagba, ezzel gátolva együttműködését az SRF transzkripciós faktorról a sejtmagban. Szérumindukció esetén az aktin polimerizálódik, a G-aktin szintje gyorsan csökkenni kezd, és megszűnik az MRTF-A fehérje aktin általi gátlása. Ennek köszönhetően képes lesz bejutni a sejtmagba, és az SRF-fel kölcsönhatva ellátni transzkripciós aktiváló feladatát.

Átfogó kutatások rávilágítottak arra is, hogy az aktin részt vesz a kromatin szervezésének szabályozásában is. Az Ino80-Arp4/Aktin/Arp8 komplex rendelkezik a linker DNS-t érzékelő képességgel, és az aktin ATP-hidrolizáló aktivitása elengedhetetlen a kromatin átrendező komplexnek a DNS szál mentén történő elmozdulásához. Ez a három példa hivatott szemléltetni, mennyire sokrétű sejtmagi funkciókkal rendelkezik az aktin fehérje.

1.4. A *Drosophila melanogaster* mint modellrendszer a sejtmagi aktin vizsgálatához

A modell organizmus, melyet kutatásunkhoz használtunk a *Drosophila melanogaster*. Az aktin gének az *ecetmuslica* esetében is redundánsak és nagyfokú evolúciós konzerváltságot mutatnak. A hat, aktint kódoló génből kettőt (*Act5C* és *Act42A*) minden szövetben expresszálódnak, citoplazmatikus formának tekintenek, míg a többit (*Act57B*, *Act76B*, *Act87E* és *Act88F*) izomspecifikus formának. Az aktin sejten belüli szintjét autoregulációs folyamatok tartják fent. A magas G-aktin szint az aktint kódoló mRNS-ek degradációjához vezet, míg az alacsony monomer aktinszint, éppen ellenkezőleg fokozza az aktin mRNS-ének szintézisét.

A két citoplazmatikus *Act5C* és *Act42A* izoforma között mindössze két aminosav eltérés van, mely nem okoz semmilyen funkcionális változást a fehérjékben. Wagner és munkatársai ugyanakkor bizonyították, hogy az *Act5C* teljes hiánya letális, melyből következik, hogy funkciói nem redundánsak. Ennek ellenére a két izoforma fehérjekódoló szekvenciája helyettesíthető egymással, annak ellenére, hogy a szövetspecifikusságuk és relatív transzkript szintjük eltérő. Az *Act5C* mRNS szintje elsősorban a fejlődő agyban magas, míg az *Act42A* mRNS nagy mennyiségben fordul elő a gonádokban és a bél bizonyos szakaszainak sejtjeiben (Wagner et al., 2002). Ezek a tények arra utalnak, hogy a *Drosophila* citoplazmatikus aktinjainak egyedi funkcióit nem az elsődleges szerkezetben lévő különbségek okozzák, hanem a gének eltérő szabályozása.

A *Drosophila* aktin is jelen van a sejtmagban, és laborunk sikeresen kimutatta, hogy mind a hat izoforma mutat sejtmagi lokalizációt. Vizsgálataink tárgya az *Act5C* gén, mivel a gén szerkezete és szabályozása jól ismert, kis mérete alkalmassá teszi a molekuláris manipulációkra, hiánya pedig letalitást okoz.

2. CÉLKITŰZÉSEK

A sejtmagi aktin funkciók ma is kevésbé ismertek. Munkám célja a sejtmagi aktin biológiai jelentőségének jobb megismerése volt, magi lokalizációjának robusztusságát vizsgálva. Ennek érdekében egy moduláris genetikai rendszert hoztunk létre *Drosophila melanogaster*-ben, mely lehetővé teszi a vizsgálatot a szervezet szintjén. Rendszerünkkel a következő kérdésekre kerestük a válaszokat:

1. Egy extra NES motívum beépítésével lehetséges-e a sejtmagi aktinszint csökkentése?
2. Abban az esetben, ha igen, ez miként befolyásolja az állatok életképességét?
3. A már korábban leírt aktin szumoiláció képes-e csökkenteni a sejtmagi aktinszintet a *Drosophilában*?
4. A már leírt aktin importin, a RanBP9 teljes hiánya képes-e megszüntetni az aktin magi jelenlétét?
5. A RanBP9 teljes hiánya milyen hatással van az állatok életképességére?
6. A felsorolt hatások kombinálása miként befolyásolja az állatok életképességét?
7. Van-e a RanBP9 mellett más importfaktora az aktinnak az ecetmuslicában?

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. *Drosophila* törzsek és fenntartásuk

Minden *Drosophila* törzset és keresztezést standard táptalajon tartottunk fent, állandó 25 °C-on, kivéve, ha nincs másképp jelölve. A törzsek a Bloomington-i *Drosophila* Törzsközpontból (BDSC) vagy a Kyoto-i Törzsközpontból kerültek beszerzésre. A transzpozáztt termelő törzset Dr. Sinka Rita (Szegedi Tudományegyetem) biztosította számunkra. Az ecetmuslica embriók injektálását az SZBK *Drosophila* Injektáló Laboratóriuma végezte (SZBK, Szeged).

Az embrionális és lárvális letalítás vizsgálatához az *Act5C* null mutáns törzs fekete agaros táptalajra volt petéztetve. A petéztetés szinkronizálva volt, és 200 darab petét gyűjtöttünk genotípusonként. Az állatok egyedfejlődését 72 órán keresztül követtük nyomon.

3.2. Null mutánsok készítése

A DrosDel projekt instrukcióit követtük a törzsek beszerzése, a keresztezési sémák megtervezése és a kezelések során, hogy elkészítsük az *Act5C* null mutáns törzset.

A *RanBP9* gén eltávolításához, a 205564 törzsszámú, P-elemet hordozó állatokat kereszteztük 2. balanszer kromoszómás, transzpozáz enzimet expresszáló állatokhoz. A mutációt standard P-elem mediált mutagenézissel végeztük.

A mutáns vonalak molekuláris jellemzéséhez a Cold Spring Harbor Protocols módszere alapján genomi DNS-t izoláltunk. A mutáns vonalak validálása PCR reakcióval és szekvenálással történt. Az *Act5C* gén amplifikálásához az Act5CFup2 (5'-CCAGTTGCGGAGGAAATTCTC), Act5CRev2 (5'-ATGATGCGATTAAAGTGCCGT), és Pry4 (5'-CAATCATATCGCTGTCTCACTCA) primereket használtuk. A RanBP9 deléción töréspontjainak meghatározásához a RanBP9_Fw1 (5'-TTGTAAGTACTGAGCAGGCTTAACA) és RanBP9_Rev2 (5'-GGTTTGCATTCTAAAAGCCTCG) primer párokat használtuk. A PCR reakciókat a DreamTaq polimerázzal a gyári protokoll alapján végeztük, az amplitikonok szekvenálását a Eurofins Genomics TubeSeq szolgáltatása végezte számunkra.

3.3. Act5C fehérjét expresszáló transzgenikus törzsek készítése

Ahhoz, hogy elkészítsük az endogén promotere által szabályozott, módosított *Act5C* fehérjét termelő transzgéneket, Q5 High-Fidelity polimeráz segítségével amplifikáltuk az *Act5C* gén körüli, 7,2 Kbp méretű genomi szakaszt. A PCR reakcióhoz Gateway forward és reverz primereket használtunk. A NES és V5 epitóp tageket PCR reakció segítségével építettük be az *Act5C* gén start kodonja után közvetlenül, a következő primerek segítségével: 5'rev, 3'for, Actin-seq1, Actin-seq2, Bam-Mlu-Not-for, Bam-Mlu-Not-rev, Stop-for, Stop-rev, NESfor, NESrev, V5for, és V5rev (a primer szekvenciák megtalálhatóak a doktori dolgozatban).

A módosított *Act5C* fehérjét expresszáló genomi szakaszok pBluescript II SK vektorba lettek klónozva, majd onnan átklónoztuk pAttB *Drosophila* transzformáló vektorba BamHI és XhoI enzimek segítségével. A FLAG-taget kódoló dsDNS oligo a NES és V5 tagek után lett beépítve, egyedi MluI restriktív enzimmel. Az elkészült konstruktokat szekvenálással ellenőriztük, és a 2. kromoszómájukon, a 25C6 citológiai helyen attP integrációs helyet hordozó *Drosophila* embriókba injektáltattuk.

3.4. Menekítési kísérletek

Minden menekítési kísérlet 25 °C hőmérsékleten, normál *Drosophila* táptalajon volt elvégezve. A szükséges keresztezéseket standard *Drosophila* keresztezési elvek alapján terveztük meg és hajtottuk végre. A menekítési kísérlethez szükséges szűz nőstények null mutáns törzsekből voltak gyűjtve, míg a hímek a transzgenikus, ún. „menekítő” törzsekből. A különböző genotípusú hím utódok fenotipikus markerek alapján voltak kategorizálva.

3.5. Molekuláris klónozás és DNS konstruktok

3.5.1. Az Act5C-K285R-t expresszálo konstruktok klónozása

Azért, hogy az *Act5C* gén megfelelő méretű legyen, a mutagén PCR elvégzéséhez az *Act5C* genomi fragmentet FastDigest HindIII restriktációs enzimmal kivágtuk az *Act5C*-pAttB konstruktból. A fragmentet agaróz gélből izoláltuk és pBSK+ vektorba klónoztuk be. Az így elkészült konstrukton QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit segítségével elvégeztük a K285 szubsztitúciót. Az ehhez szükséges *Act5C_K285R_Fw* és *Act5C_K285R_Rev* primereket az Agilent QuickChange Primer Design online eszközével terveztük meg. Minden plazmidtisztítás High-Speed Plasmid Mini Kit-tel történt. Az *Act5C*-K285R-pBSK+ konstruktszekvenálása után a megfelelő fragmentet HindII enzimmal vágtuk ki. A fragment agaróz gélből történő izolálása után T4 DNS ligázzal készítettük el az *Act5C*-K285R-pAttB konstruktot. A szekvenálással ellenőrzött *Act5C*-K285R-pAttB konstruktot az SZBK *Drosophila* Injektáló Laboratóriuma injektálta a megfelelő genotípusú *Drosophila* törzsbe. Három független transzgenikus törzset hoztunk így létre.

Az S2R+ *Drosophila* sejt kultúráján végzett kísérletekhez *Act5C*-pAGW konstrukton végeztük el a K285 szubsztitúciót a fent leírt módszerekkel.

3.5.2. Az importin CDS-ek klónozása BiFC kísérletekhez, és az *Act5C* gén klónozása *in vitro* pull-down kísérletekhez Gateway klónozási módszerrel

Az importin jelöltek cDNS-éhez a *Drosophila* Genomics Resource Center (DGRC) Gold Collection gyűjteményéből jutottunk hozzá Gateway primerek és Q5 High-Fidelity polimerázzal történő amplifikálás segítségével.

Az „entry” klónokat Gateway BP clonase enzim segítségével hoztuk létre, és szekvenálással igazoltuk az importin jelöltek kódoló szekvenciájának helyes beépülését. Ezt követően a kódoló szekvenciákat tovább klónoztuk split-YFP tagelő vektorokba, Gateway LR Clonase II enzimmal. A kísérletekhez az aktin fehérjét N-terminálisan jelöltük a YFP N-terminális darabjával, még az importinokat mind N- és C-terminális oldalról is jelöltük a YFP fehérje C-terminális darabjával. Az aktin His-taggel történő jelöléséhez a polimerizálódni képtelen *Act5C*^{R63D} kódoló szekvenciát pET16b vektorba klónoztuk LR reakcióval.

3.6. Sejt kultúra módszerek

Az S2R+ *Drosophila* sejttenyésztést 25 °C-on tartottuk fenn 10% FBS szérummal és 1% antibiotikummal (Penicillin-Streptomycin) kiegészített Schneider médiumban. A sejtek

transzfektálását az Effectene Transfection Reagent Kit-tel végeztük, a gyártó utasításai szerint. Az élő sejtek mikroszkópos vizsgálatához 8×10^6 sejtet használtunk minden kísérletben.

Az importinok szűrővizsgálatához a “préda” és “zsákmány” fehérjéket expresszáló plazmidokat pMT-Gal4 vektorral együtt kotranszfektáltuk. A pMT-Gal4 plazmid biztosította a Gal4 expresszióját a rendszerben, egy indukálható metallothionein promoteren keresztül. A transzfekeciót követő második napon 1 mM végkoncentrációban réz-szulfátot adtunk a sejtekhez. Két óra réz-szulfáttal történő indukálás után a sejtenyészetek 3 ml friss médiumot kaptak, és a fehérje-fehérje interakciók meglétéét Zeiss LSM800 konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk.

3.7. Immunhisztokémia

Az immunfestések összes lépése szobahőmérsékleten volt elvégezve. A nyálmirigyek boncolásához az állatok a lárvális egyedfejlődés L3 stádiumáig fejlődtek. Ebben a stádiumban, 4%-os paraformaldehid-PBS oldatban kiboncoltuk a nyálmirigyeket. Ezután a nyálmirigyeket PBS oldatban átmostuk, majd PBT oldatban permeabilizáltuk 20 percen át. A mintákat PBT-N oldatban blokkoltuk 1 órán át. Ezt követően éjszakán át inkubáltuk anti-FLAG elsődleges ellenanyaggal őket $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on. Másnap háromszor 10 percig mostuk a mintákat PBT oldattal, majd PBS-ben oldott Alexa488-cal konjugált anti-egér másodlagos ellenanyaggal és DAPI ($0,2\text{ }\mu\text{l/ml}$) festékkel inkubáltuk sötétben, 1 órán át. Egy utolsó PBS-sel történő mosás után a nyálmirigyeket tárgylemezre helyeztük, és $20\text{ }\mu\text{l}$ Fluoromount-G médiumba beágyasztuk. A kész mintákat Olympus Fluoview FV1000 konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk.

3.8. Adatbázis használat, pixel intenzitás kvantifikálása és statisztikai kiértékelések

A fluoreszcens jel sejtmagi-citoplazmatikus arányát az Image J szoftverrel mértük le. A sejtmagban és citoplazmában lemerő területet kézzel jelöltük ki. Minden kísérletben, 3-6 egyedi nyálmirigyet vizsgáltunk, melyeknek legalább öt sejtjét lemerőttük. A középértékeket és szórásokat Microsoft Excel szoftverrel számoltuk ki, a statisztikai kiértékelést és a grafikonok elkészítését GraphPad Prism 9 szoftverrel végeztük.

3.9. *In vitro* pull-down kísérletek

3.9.1. Rekombináns fehérje tisztítás

A fehérje tisztításához, az Act5C^{R63D}-pET16b konstruktot *E. coli* SixPack kompetens sejtekbe transzformáltuk. Ezután egy egyedi transzformáns telepet 50 ml folyékony LB médiumba átolítottunk, és a kultúrát OD 0,6-0,8 sűrűségig növesztettük. A fehérje expresszióját

egy éjszakán át indukáltuk 0,5 mM IPTG-vel. Az indukált baktériumokat 10 ml lízis puffer + 1,5 ml EDTA mentes 7X PIC oldattal átmostuk és szonikálással lizáltuk. A sejtlizátumot 15 percig centrifugáltuk (10.000 x g) 4 °C-on. A HisPur Cobalt Resin gyöngyöket 2 ml lízis puffer + 0,5 mg/ml BSA oldattal mostuk 5 percen keresztül 4 °C-on, kétszer ismételve. A gyöngyöket ezután 5 percig 4 °C-on centrifugáltuk (500 x g). Ezt követően a kobalt gyöngyökhöz 10 ml sejtlizátumot adtunk, amihez előzetesen 50 µl BSA-t (100 mg/ml) adtunk. A kobalt gyöngy-sejtlizátum keverékét 2 órán keresztül, 4 °C-on forgattuk. Az inkubálást követően a gyöngyöket háromszor húsz percig mostuk 5 ml mosó pufferben, a mosási lépések közt pedig 5 percig centrifugáltuk (500 x g). Végül, a kobalt gyöngyökre kötött Act5C^{R63D} fehérje mintát 250 µl tároló pufferben felvettük és -20 °C-on tároltuk.

3.9.2. A zsákmány fehérjék *in vitro* transzkripciója és translációja (IVTT)

A ³⁵S jelölt importin jelöltek *in vitro* transzkripciója és translációja TNT Quick Transcription/Translation rendszerben történt, egy már bevett protokoll alapján. Csaliként tisztított His-Act5C^{R63D} fehérjét, negatív kontrollként pedig His-EGFP-FLAG fehérjét használtunk. Röviden összefoglalva, 15 µl térfogatú IVTT reakciónként 90 ng T7 promotor által szabályozott cDNS templátot (Tnpo-pOT2, Tnpo-SR-pOT2 RanBP9-pOT2, RanBP11-pOT2, Cadmus-pOT2, Ketel-pOT2, Msk-pHY22, Artemis-pHY22), 11 µl TNT Master Mix-et, 0,33 µl PCR enhanszert, 0,54 µl MBq ³⁵S-metionint, 0,33 µl U RNAsin-t és 0,33 µl 50x EDTA mentes proteáz inhibitor koktélt használtunk. A reakciókat 30 °C-on inkubáltuk egy órán keresztül, majd lecentrifugáltuk őket 4 °C-on (17.000 x g). A felülúszóból 0,25 µl-t inputként, pull-down kísérletenként pedig 7,3 µl-t használtunk.

3.9.3. *In vitro* His-pull down teszt és autoradiográfia

Az *in vitro* pull-down tesztek Kármán és munkatársai által leírtak alapján végeztük. A kobalt gyöngyökre kötött His-FLAG-EGFP és His-Act5C^{R63D} fehérjéket PDWB1 pufferrel átmostuk. Ezután az izotóppal jelölt zsákmány fehérjéket Binding pufferben felvettük, hozzáadtuk a kobalt gyöngyökhöz és másfél órán át inkubáltuk őket. Az inkubációt követően először PDWB1 pufferrel, majd PDW2 pufferrel 3-3 alkalommal mostuk a fehérjéket. Végül a gyöngyökhöz kötött fehérjéket 1x SDS Minta pufferben vettük fel, és öt percen keresztül forraltuk őket. A fehérjéket ezután 10%-os SDS-PAGE gélen szeparáltuk és PVDF membránra átblottoltuk. A membránt megszáradása után közvetlenül használtuk autoradiográfiához. Az autoradiográfiás filmre (Kodak, Biomax MS) történő expozíciót -80 °C-on végeztük Low energy transscreen (Kodak, Biomax LE) használatával.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A sejtmagi aktin funkcióinak vizsgálatához létrehozott genetikai rendszer

Az *Act5C* gén kisméretű, ezáltal könnyen kezelhető molekuláris kísérletekben, illetve funkcióvesztése letális fenotípust okoz. *Ecetmuslicá*ban azonban mind a hat aktint kódoló gén erősen konzervált, ezért a CRISPR/Cas9 rendszer nem alkalmas az *Act5C* gén *in vivo* manipulálására. Ennek okán, az *Act5C* gént *in vitro* módosítottuk, majd transzgénként beépítettük a genomba. Ezzel párhuzamosan az endogén *Act5C*-t eltávolítottuk, ezáltal megszüntetve az *Act5C* vad típusú funkcióit. A módosított *Act5C* fehérjét expresszáló transzgének segítségével vizsgáltuk a sejtmagi aktin szintjének változását.

4.2. Az *Act5C* null mutánsok készítése és molekuláris jellemzése

Elérhető *Act5C* null mutáns törzs hiányában, a DrosDel P-elem rendszerrel hoztunk létre valódi deléciós törzseket. A módszer segítségével két független null mutáns jelölt törzset készítettünk (*Act5C^{RS1}* és *Act5C^{RS2}*). Mindkét törzsben megfigyelhető volt a mutációk letális fenotípusa homo- és hemizigóta állapotban.

Az *Act5C* delécióit egy RS elemre specifikus forward és *Act5C*-re specifikus reverz PCR primer párral azonosítottuk. Az *Act5C^{RS1}* PCR amplifikálása során kapott termék szekvenálása kimutatta, hogy a törzs az *Act5C* amorf mutációját hordozza. A teljes *Act5C* kódoló régiót, illetve a gén 3' UTR-ének nagy részét sikerült eltávolítani. A továbbiakban erre a törzsre *Act5C* null-ként hivatkozunk.

4.3. Az *Act5C* null mutánsok fenotipikus jellemzése

4.3.1. Embrionális letalitás

Mivel az *Act5C* null mutáció erős letális fenotípust okoz, meg akartuk határozni, hogy a letalitás melyik egyedfejlődési stádiumban érvényesül. Megállapítottuk, hogy mindkét *Act5C* null mutáns törzs csak enyhe embrionális letalitást mutat, tehát az erős fenotípus az egyedfejlődés későbbi szakaszában lép fel.

4.3.2. Lárvális letalitás

Az *Act5C* deléciót FM7-GFP balanszer kromoszóma mellé kereszteltük, hogy el tudjuk különíteni a null mutáns lárvákat a heterozigóta és a vad típusú testvéreiktől. A kísérlet kimutatta, hogy az összes hemizigóta lárva egyedfejlődése megakadt az első lárvastádiumban, és a későbbiekben ezek az állatok kivétel nélkül elpusztulnak. A letalitás mellett megfigyeltük,

hogy a null mutáns állatok testmérete drasztikusan lecsökkent, illetve mozgásuk lassú és koordinálatlan a heterozigóta és vad típusú testvéreikhez képest.

4.4. *Act5C* transzgenikus törzsek készítése és ellenőrzése

4.4.1. Transzgén konstruktok készítése és transzgenikus törzsek megalapítása

A tagek *in vitro* kerültek beépítésre az *Act5C* start kodonja után közvetlenül. A módosított *Act5C*-t expresszáló transzgéneket pAttB transzformáló vektorba építettük. A konstruktokat attP dokkoló helyet hordozó embriókba injektáltattuk, majd megalapítottuk a transzgenikus *Drosophila* törzseket. Az *Act5C* génbe V5-, NES-, V5-FLAG- és NES-FLAG tageket építettünk be. A módosítás nélküli *Act5C*-t expresszáló transzgén vad típusú kontrollként szolgált. Az összes transzgénről történő kifejeződés az *Act5C* saját transzkripció szabályozásával történik.

4.4.2. *Act5C* transzgenikus törzsek ellenőrzése

A transzgenikus törzsek fehérje expressziójának ellenőrzéséhez a törzsekből lárvális nyálmirigyeket boncoltunk, és V5 vagy FLAG ellen termelt antitesttel immunfestettük azokat. Az immunfestett minták az *Act5C* vad típusú expressziós mintázatát és sejten belüli lokalizációját mutatták, amiből következik, hogy a fehérje expressziója és így nagy valószínűséggel funkciója is normális ezekben az állatokban.

A NES tag sejtmagi lokalizációs hatásának vizsgálatához kiszámoltuk a NES-FLAG-*Act5C* fluoreszcens jel sejtmagi-citoplazmatikus arányát, és azt hasonlítottuk a V5-FLAG-*Act5C*-t expresszáló törzsben mért értékhez. A kísérletsorozatból megállapítottuk, hogy az aktin NES motívummal való jelölése ugyan nem szünteti meg teljesen a fehérje sejtmagi jelenlétét, de jelentősen csökkenti azt (25%).

4.5. Az *Act5C* null mutáció letális fenotípusának menekítése módosított *Act5C* fehérje izoformát expresszáló transzgénekekkel

Az első menekítési kísérletünkben, az *Act5C* null mutáció letális fenotípusát módosítatlan (kontroll) és módosított *Act5C*-t expresszáló transzgenikus törzsekkel is menekítettük. A különböző genotípusú hím utódokat megszámláltuk és arányaikat egymáshoz viszonyítottuk. Várakozásaink ellenére, nem tudtunk megfigyelni semmilyen szignifikáns változást az *Act5C*, V5-*Act5C* és NES-*Act5C* fehérjével menekített hím utódok száma közt. Az eredmények kimutatták, hogy a sejtmagi aktin mennyiségének 25%-os csökkenése nem befolyásolja annak funkcióját. Ezen felül megállapítottuk, hogy a V5-tel jelölt *Act5C* fehérje a kontrollal

megegyező mértékben képes menekíteni a letális fenotípust, így a további kísérletekben ezt használtuk pozitív kontrollként.

4.6. A sejtmagi aktin szintjének csökkentése az Act5C K285 szumoilációs helyének elrontásával

A következőkben az Act5C szumoilációs helyének elrontásával kívántuk csökkenteni a sejtmagi aktin szintjét. Elkészítettünk GFP jelölt Act5C-K285R és NES-Act5C-K285R expresszálo konstruktokat. Ezekkel *Drosophila* S2R+ sejteket transzfektáltunk, és kiszámoltuk a sejtmagi-citoplazmatikus fluoreszcens jel arányát. Az eredmények nem mutattak szignifikáns különbségeket a vad típusú Act5C és a K285R pontmutáns változat között.

Ezzel párhuzamosan elkészítettünk Act5C-K285R expresszálo transzgenikus muslica törzseket is, melyekkel az *Act5C* null mutáció letális fenotípusát menekítettük. A menekítő kísérlet eredménye nem mutatott szignifikáns csökkenést a nem szumoilálható Act5C izoformával menekített hím utódok számában. Végeredményül tehát megállapíthatjuk, hogy a *Drosophila* aktin 285. lizinjének szumoilációja nem hat magi retenciós jelként.

4.7. A sejtmagi aktin szintjének csökkentése a RanBP9, aktin importin eltávolításával

Annak érdekében, hogy a sejtmagi aktin szintjét tovább csökkentsük, a RanBP9 (importin 9) fehérét kódoló gént P-elem ugrasztással töröltük. A null mutánsokat szekvenálással ellenőriztük. A homozigóta null mutánsok teljes sterilitást mutattak, további fenotípusok azonban nem voltak megfigyelhetők. A RanBP9 null mutáció sejtmagi aktinszintre gyakorolt hatásának vizsgálatához, a null mutációt bevittük a transzgenikus, Act5C formákat expresszálo törzsekbe. Ezután az állatok lárvális nyálmirigyét FLAG ellenanyaggal festettük, és a már bemutatott módon kiszámoltuk a sejtmagi-citoplazmás fluoresszencia itenzitások arányát. Heterozigóta *RanBP9* null mutációt hordozó háttéren nem volt megfigyelhető szignifikáns változás, azonban a homozigóta *RanBP9* null mutáns háttér 18%-kal csökkentette a sejtmagi aktin szintjét. Végeredményül megállapítottuk, hogy a RanBP9 hiánya nem képes teljesen kizárni az aktint a sejtmagból.

Ezt követően megvizsgáltuk, milyen hatással bír a *RanBP9* null mutáció és az aktin NES-sel való jelölésének kombinációja. Ehhez megalapítottunk egy *Act5C;RanBP9* kettős null mutáns törzset, melynek letális fenotípusát menekítettük a különbözőképpen jelölt aktin fehérjékkel. A kísérlet eredményéből megállapítottuk, hogy a *RanBP9* homozigóta null mutáció körülbelül 30%-kal csökkenti az életképességet. Ezzel szemben, a homozigóta *RanBP9* null

mutáns állatok menekítése NES-Act5C fehérjével drasztikusan, ~70%-kal csökkentette az utódok életképességét.

Végeredményül megállapítottuk, hogy a sejtmagi aktin NES által kényszerített exportjának és a *RanBP9* null mutáció miatt fellépő csökkent sejtmagi importnak egymást erősítő hatása van a letalításra. Ez a hatás azonban továbbra sem képes az életképességet nullára csökkenteni, ami azt jelzi, hogy a sejtmagi aktinszint oly módon van fenntartva, amely hatékonyan ellensúlyozza a zavaró hatásokat. Fő megállapításunk továbbá, hogy a *RanBP9* fehérje nem kizárólagos sejtmagi import faktora az aktinnak.

4.8. Az Act5C új importinjainak azonosítása

4.8.1. *In Vitro* transzkripcióval kapcsolt translációs teszt

Annak érdekében, hogy új, az aktin sejtmagi lokalizációjáért felelős importinokat azonosítsunk, nyolc béta importint vizsgáltunk: Cadmus (*cdm*), Moleskin (*msk*), *RanBP9* (*Importin 9*), Artemis (*Arts*), Ketel (*Fs(2)Ket*), *RanBP11* (*Importin beta 11*), Transportin (*Tnpo*), és Transportin-Serine/Arginine rich (*Tnpo-SR*). Először egy *in vitro* IVTT tesztet végeztünk velük. Az importinokat ³⁵S-sel jelölt metioninnal, a polimerizálódni képtelen monomer aktint és az Act5C^{R63D} fehérjét pedig His epitóp taggel jelöltük. A pull-down kísérlet kimutatta, hogy a Cadmus, Moleskin, *RanBP11*, *Tnpo* és *Tnpo-SR* fehérjék képesek kötni a His jelölt monomer aktint, *in vitro*.

4.8.2. Bimolekuláris Fluoreszcens Komplementációs (BiFC) teszt

Az újonnan azonosított béta importinok és az aktin közötti kölcsönhatások megerősítése érdekében BiFC-alapú szűrést végeztünk tenyésztett *Drosophila* S2R+ sejtekben. Ehhez az Act5C fehérjét N-terminálisan jelöltük a YFP fluoreszcens fehérje N-terminális, csonkolt részével, az importin fehérjéket pedig mindkét végükön jelöltük a YFP C-terminális csonkolt részével. A Moleskin, Artemis, Cadmus, Ketel és *Tnpo-SR* fehérjék esetében sikerült pozitív fluoreszcens jelet megfigyelni, ami a csali és zsákmány fehérjék kölcsönhatására utal.

5. ÚJ EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

A módosított Act5C fehérjét (NES-, V5- és FLAG jelölt) expresszáló törzsek immunfestéssel történt validálása, és az *Act5C* null mutáció letális fenotípusának ezen törzsekkel történő menekítése megerősítette, hogy a NES motívum hatására jelentősen csökken a sejtmagi aktin szintje. Ez a csökkenés azonban nem volt hatással az állatok életképességére, és nem okozott semmilyen más fenotípust sem. Mivel az aktin szumoilációs helyének elrontása

nem fokozta a fehérje magi exportjának szintjét, megállapítottuk, hogy az aktin szumoilációja nem tekinthető erős retenciós szignálnak a *Drosophila melanogaster* esetében. Ezzel szemben a RanBP9 importin jelenlétének teljes megszüntetése szignifikánsan csökkentette a sejtmagi aktin szintjét, viszont életképesség romlást csak a NES-sel felszerelt aktinnal történő menekítés mellett tudtunk megfigyelni. Ez a csökkenés azonban továbbra sem volt 100%, ami a RanBP9 import útvonallal párhuzamosan működő, még nem ismert, import mechanizmusok létezését feltételezik. *In vitro* és *in vivo* szűrések segítségével sikeresen azonosítottunk négy, új β -importint, mely kölcsönhat az aktinnal.

Munkánk során létrehoztunk egy genetikai rendszert, ami alkalmas a sejtmagi aktin funkcióinak a szervezet szintjén történő vizsgálatára. Eredményeink közvetlen bizonyítékot szolgáltatnak arra, hogy az aktin sejtmagi jelenléte nagymértékben túlbiztosított, ezzel megerősítve a feltételezést, hogy a sejtmagi aktin biológiai funkciói esszenciálisak.

6. TÁMOGATÁS

A dolgozatban ismertetett munkát az NKFIH, Biológiai Nemzeti Laboratórium program (NKFIH-871-3/2020, Vilmos Péter), PD127968 (Maruzs-Kristó Ildikó) és a Dr. Rollin D. Hotchkiss Foundation (Borkúti Péter) támogatta.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném kifejezni mély és őszinte hálámat oktatómnak és témavezetőmnek, Dr. Vilmos Péternek, amiért lehetővé tette számomra, hogy a *Drosophila* sejtmagi aktin csoportban dolgozhassak, hogy segítette szakmai fejlődésemet, és hogy szakértelmével és lelkesedésével végig segített doktori képzésemen.

Szeretnék köszönetet mondani legközelebbi kollegáimnak, Dr. Maruzs-Kristó Ildikónak, Dr. Szabó Anikónak, Abonyi Csillának, Dr. Bajusz Csabának és Kovács Zoltánnak, hogy szakmai tanácsaikkal segítették fejlődésemet az évek során, és hogy mindig jó hangulatot teremtettek a laboratóriumban.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Erdélyi Miklósnak, hogy lehetőséget biztosított doktori képzésem elvégzésére a Szegedi Biológiai Kutatóközpont Genetika Intézetében, és az egész „*Drosophila* közösségnek” a kitartó támogatásukért és odadásukért.

Legmélyebb hálával tartozom szüleimnek, édesanyámnak, Podmaniczki Dórának és édesapámnak, Borkúti Zoltánnak, valamint családomnak az egész életemben nyújtott támogatásukért.

Nagyon hálás vagyok feleségemnek, Borkúti Lindának a végtelen szeretetért és támogatásáért, amely segített céljaim elérésében.

Végül, de nem utolsósorban szeretném megköszönni minden barátomnak a támogatást, különösen Viziné Mező Vivien Veronikának és Vizi Balázsnak.

TÁRSSZERZŐI LEMONDÓ NYILATKOZAT

Co-author certification

Alulírott Bajusz Csaba kijelentem, hogy Borkúti Péter PhD értekezésének tézispontjaiban bemutatott - közösen publikált - tudományos eredmények elérésében a pályázónak meghatározó szerepe volt, ezért ezeket a téziseket más, a PhD fokozat megszerzését célzó minősítési eljárásban nem használta fel, illetve nem kívánja felhasználni.

Szeged, 2022.08.26.

Bajusz Csaba

.....
szerző