

# **Az aktinkötő Moesin sejtmagi funkciójának vizsgálata**

Ph.D. értekezés tézisei

Szerző: Kristó Ildikó

Témavezető: Dr. Vilmos Péter, tudományos főmunkatárs

Magyar Tudományos Akadémia  
Szegedi Biológiai Kutatóközpont  
Genetikai Intézet

Szegedi Tudományegyetem  
Természettudományi és Informatikai Kar  
Biológia Doktori Iskola

2016.

Szeged

## **A kutatás előzményeinek rövid összefoglalása**

A Moesin az emlősökben is megtalálható, konzervált ERM fehérjecsaldba tartozik, melynek tagjai elsősorban a plazmamembrán fehérjék és az alatta szerveződő citoskeletális aktin hálózat között hoznak létre kapcsolatot. A strukturális szerep mellett a kihorgonyzott membránfehérjék természetétől függően az ERM fehérjék jelátviteli útvonalakban is részt vehetnek. Irodalmi adatok azonban arra utaltak, hogy az ERM fehérjék sejtekben betöltött szerepe nem korlátozódik a citoplazmára (Batchelor és mtsai., 2004; Bergquist és mtsai., 2001; Vilmos és mtsai., 2009).

Néhány évvel ezelőtt csoportunk azt a meglepő megfigyelést tette, hogy az eddig kizárólagosan citoplazmatikusként ismert, ERM családba tartozó *Drosophila* Moesin fehérje megtalálható a sejtmagban is (Vilmos és mtsai., 2009). Egy teljes genomra kiterjedő kötőpartner-analízis adatai szintén azt jelezték számunkra, hogy a Moesin sejtekben betöltött szerepe valószínűleg nem korlátozódik a sejt citoplazmájára. Ezt nagyon érdekesnek találtuk, mivel az utóbbi évtizedben a fehérjecsald fő kötőpartneréről, az aktinról is bebizonyosodott, hogy megtalálható a sejtmagban, ahol részt vesz több sejtmagi komplex működésében (Visa és Percipalle, 2010), a DNS hibajavításban (Belin és mtsai., 2015), a transzkripciós komplex összeszerelésében és működésében (Fomproix és Percipalle, 2004; Hofmann és mtsai., 2004; Hu és mtsai., 2004; Kukalev és mtsai., 2005; Obrdlik és Percipalle, 2011; Philimonenko és mtsai., 2004; Soderberg és mtsai., 2012; Yoo és mtsai., 2007), valamint a sejtmagi RNS szállítás (Percipalle és mtsai., 2002; Percipalle és mtsai., 2001) folyamataiban is. Megfigyelésünk jelentőségét tovább erősítette, hogy az utóbbi időben egyre több citoskeletális vázelemről, keresztkötő fehérjéről, valamint aktin motorfehérjéről is bizonyították, hogy a citoplazma mellett a sejtmagban is megtalálhatóak és ott funkcióval rendelkeznek (Simon és Wilson, 2011).

## Célkitűzések

Az utóbbi évtized egyik legizgalmasabb felfedezése a sejtbiológiában, hogy az eukarióta sejtmag szabályozott mennyiségű aktint tartalmaz. Ehhez a felismeréshez kapcsolódott laboratóriumunk megfigyelése, amely szerint a *Drosophila* egyik fontos, aktinkötő fehérjéje, a Moesin is jelen van a sejtmagban. Munkám során ennek a megfigyelésnek a részletes vizsgálatával foglalkoztam. A citoplazmában a Moesin elsősorban aktin polimerekhez horgonyoz további fehérjéket, azonban a hosszú polimer aktin jelenléte és funkciója a sejtmagban ma sem teljesen elfogadott és bizonyított. Így felmerült tehát a kérdés, hogy van-e a Moesin sejtmagi lokalizációjának biológiai jelentősége, van-e a fehérjének funkciója a sejtmagban. Ennek megválaszolására a Moesin sejtmagon belüli eloszlását, a lokalizáció mintázatát kívántuk meghatározni (1), továbbá célul tűztük ki a Moesin fehérje sejtmagi import és export folyamatainak vizsgálatát (2), valamint az ott betöltött funkció/funkciók felderítését (3). Dolgozatomban ezeket a kérdéseket vizsgáló kísérleteinket, valamint az eredményekből levonható következtetéseket mutatom be.

## Az alkalmazott módszerek

Munkánk során a *Drosophila melanogaster*t vagy ecetmuslicát használtuk modellszervezetként. A harmadik stádiumú lárvák nyálmirigysejtjeiben található nagyméretű politén sejtmagok alkalmas eszközt biztosítottak a sejtmagon belüli, valamint a kromoszómákon történő lokalizációs vizsgálatokhoz. Ehhez a különböző transzgenikus vagy mutáns törzsek keresztezésével létrehoztuk a megfelelő genotípusokat, majd a kiboncolt nyálmirigyeken élő videomikroszkópiát és FRAP kísérletet vagy pedig fixálást követő immunfestést végeztünk. Ezek segítségével tanulmányoztuk a triptolid, ekdizon hormon és hősök kezeléseket hatását a Moesin sejtmagon belüli eloszlására, illetve mennyiségére. A kromoszómális vizsgálatokhoz nyálmirigy óriáskromoszóma preparátumokat készítettünk, melyeken immunfestést hajtottunk végre.

Bizonyos kísérletekhez emellett S2R+ *Drosophila* embrionális sejt kultúra sejtet is felhasználtunk, mely nagy hatékonyságú transzfektálhatósága miatt megfelelő eszközt biztosított tranziens fehérje expresszióhoz, valamint az RNS interferenciás vizsgálatokhoz. A sejteken szintén vizsgáltuk a hősök kezelés hatását a Moesin sejtmagi mennyiségére. A különböző kezeléseket után a sejteket fixáltuk, majd immunfestést végeztünk.

A transzgenikus muslica törzsek létrehozásához, illetve a sejt kultúra sejtekben történő fehérje termeltetéshez szükséges DNS konstrukciók elkészítéséhez hagyományos klónozási módszereket, valamint a Gateway rekombinációs technikát alkalmaztuk.

A lárvális nyálmirigyekben, illetve az S2R+ sejtekben immunfestési vizsgálatokban megfigyelt eredményeinket sejt kultúra sejtekből izolált fehérjemintákon koimmunprecipitáció és Western-blot segítségével biokémiaiailag is megerősítettük.

## Eredmények és következtetések

1, A Moesin lokalizációs vizsgálata során megállapítottuk, hogy az endogén, valamint a különböző epitópokkal jelölt fehérje formák egymással megegyező mintázatban lokalizálnak a sejt magban, mely jól mutatja, hogy az általunk használt jelölő epitópok nem befolyásolják a Moesin fehérje sejtben belüli eloszlását. A Moesin jelen volt a sejt magmembránon, a kromoszómák között a nukleoplazmában, sávos mintázatban a kromoszómákon, valamint időnként a magvacskában is.

2, A Moesin sejt magi jelenlétének dinamikáját vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy nincs jelentős Moesin fehérje kicserélődés nyugalmi állapotú sejtekben a sejt mag és a citoplazma között. Ha azonban olyan külső ingert, kezelést alkalmazunk a sejteken, melyek számos sejt magon belüli folyamat indukcióját okozzák (kromatin átrendeződések, transzkripció aktivitás emelkedés), akkor a Moesin nagy mennyiségben felhalmozódott a sejt magban. Ilyen stimulus volt a hőstressz és az ecdizon vedlési hormonnal történő kezelés. Ez tehát azt bizonyítja, hogy bár nyugalmi állapotú, interfázisos sejt magokban nincs jelentős import, bizonyos külső hatásokkal mégis indukálható a Moesin aktív, szabályozott sejt magi transzportja. Az interfázisos sejt magon belüli kötődés vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy ha a Moesin-GFP-t tartalmazó sejt mag egy kis területét rövid idő alatt kifakítottuk, a teljes sejt mag elvesztette a fluoreszcens intenzitását. Ebből arra következtethetünk, hogy a fakítás ideje alatt az összes Moesin fehérje kicserélődik a sejt magon belül, vagyis ott a fehérje kötődése rendkívül dinamikus.

3, A Moesin sejt magi transzport mechanizmusának részletes vizsgálatához egy RNS interferencia alapú szűrővizsgálatot hajtottunk végre S2R+ *Drosophila* sejteken. Eredményül azt kaptuk, hogy amennyiben a *nup98* nukleoporin gént, illetve annak közvetlen kölcsönható partnerét, a *rae1* gént lecsendesítettük, akkor a Moesin nagy mennyiségben felhalmozódott a sejt magban. Ez azt jelentheti, hogy ezek a fehérjék részt vehetnek a Moesin aktív sejt magi export folyamatában, vagy pedig a Moesin ezekkel a fehérjékkel közös funkcióval

rendelkezhet, a megfigyelt fenotípus pedig ennek következtében alakul ki. A későbbi kísérleti eredményeink a második elképzelést támasztották alá.

4, A Moesin fehérjében azonosítottunk egy funkcionális, konzervált sejtmagi lokalizációs szignál szekvenciát, mely szükséges a Moesin aktív sejtmagi importjához.

5, A Moesin kromoszómális lokalizációjának részletesebb vizsgálata során azt találtuk, hogy a fehérje komplementer festődést mutat a zárt szerkezetű, tömör kromatint jelölő DAPI festéssel, tehát a Moesin a lazább szerkezetű, nyitott konformációjú kromatinhoz kapcsolódik. Emellett erős halmozódást mutatott a kromoszóma puffokban is, melyek extrém magas transzkripciós aktivitással rendelkező, nagymértékben fellazult szerkezetű eukromatikus régiók.

6, Az RNS-polimeráz II-nek a transzkripció iniciációjára, illetve elongációjára specifikus aktivált formáival történt összehasonlító immunfestési kísérletek eredményei alapján arra következtettünk, hogy a Moesin nem szükséges a transzkripció kezdeti, iniciációs lépéséhez. Egy meghatározott időintervallumban éppen aktiválódó, illetve terminálódó gének vizsgálata során pedig azt figyeltük meg, hogy a Moesin az egyre aktívabb régiókon van jelen, míg ahol a transzkripció terminálódik, ott a Moesin nem mutatható ki a kromoszómákon. Ezekben a kísérletekben azt is megfigyeltük, hogy a Moesin festődés kromoszómális intenzitása egyenes arányosságot mutat az elongációra specifikus RNS-polimeráz II forma jelölésével, vagyis a Moesin festődése a legintenzívebb RNS-átírás során a legerősebb. Ez alapján elmondható, hogy a Moesin nem vesz részt a transzkripció terminációban sem, és legvalószínűbben az elongáció fázisában, illetve az elongációhoz kapcsolható folyamatokban vehet részt, mint például az RNS molekulák érése, az intronok kivágódása vagy az mRNS molekulák citoplazmába történő kiszállítása.

7, A felsorolt lehetséges funkciók vizsgálatához a Moesin sejtmagban és a kromoszóma preparátumokon is mutatott pontszerű lokalizációját összehasonlítottuk az intronok kivágódásának helyszíneit jelző SC35 fehérje eloszlásával. Mivel nem találtunk átfedést a két festődés között, a Moesin valószínűleg nem vesz részt az intronok kivágódásának folyamatában. Ezt követően összehasonlítottuk a Moesin magi lokalizációs mintázatát az mRNS-ek exportjában résztvevő két fehérjével is: a Poli(A)-kötő (PABP) és a Rae1 fehérjékkel. Miután mindkét esetben nagymértékű átfedést tapasztaltunk a Moesin mintázatával, arra következtettünk, hogy a Moesin jelen van a képződő mRNS molekulákat a citoplazma felé szállító mRNS-fehérje komplexekben.

8, Ezután a Moesin mRNS exportban betöltött szerepét biokémiai módszerrel, fehérje koimmunprecipitációs kísérlet segítségével is megerősítettük, ahol a Moesin kölcsönhatást

mutatott az mRNS exportban résztvevő Rae1, Nup98 és PCID2 fehérjékkel S2R+ sejtekből izolált fehérje preparátumon.

9, Mivel a Moesin fehérjekötő FERM-doménje, illetve az aktinkötő doménje külön-külön is a sejtmagba, illetve a kromoszómákra lokalizált, ezért feltételezéseink szerint a Moesin a citoplazmatikus funkciójához hasonlóan a sejtmagban is keresztkötő funkcióval rendelkezhet, melynek során aktinhoz horgonyozhat további, például az mRNS exporthoz szükséges fehérjéket, és így az mRNP export komplexek összetartó elemeként működhet közre az mRNS exportban.

## **Összefoglalás és kitekintés**

Eredményeink alapján tehát elmondható, hogy a Moesin sejtekben betöltött szerepe nem korlátozódik a sejt citoplazmájára, a sejtmagnak is funkcionális komponense, ahová szabályozott transzport mechanizmus segítségével jut be, ott pedig egy új tagja lehet az átíró mRNS molekulákat a citoplazma felé szállító fehérje komplexnek. A Moesin fehérje metasztatikus folyamatokban betöltött szerepéről számos publikáció áll rendelkezésre az irodalomban. Túltermelődésével, illetve lecsökkent kifejeződésével hozzájárul patológiás elváltozások kialakulásához, melyeket a Moesin citoplazmatikus funkcióinak túlműködésével, illetve kiesésével magyaráznak. Vizsgálataink alapján azonban egyértelművé vált, hogy a Moesin nem csak a citoplazmában, hanem a sejtmagban is alapvető fontosságú folyamatokban vehet részt, mellyel pedig szintén hozzájárulhat a sejt megfelelő, fiziológias működéséhez, illetve a patológiás elváltozások létrejöttéhez. A Moesin fehérje sejtmagi funkciójának részletes vizsgálata tehát segíthet értelmezni a hibás működés során megfigyelhető változásokat, illetve teljesen új szemponttal egészítheti ki az ERM fehérjékkel kapcsolatos eddigi ismereteinket.

## Publikációs lista

MTMT azonosító: 10047471

Összesített impakt faktor: 13,583

### A dolgozat témájához kapcsolódó közlemények jegyzéke:

*Actin, actin-binding proteins, and actin-related proteins in the nucleus.*

**Kristó I**, Bajusz I, Bajusz Cs, Borkúti P, Vilmos P.

Histochem Cell Biol. 2016 Apr;145(4):373-88. doi: 10.1007/s00418-015-1400-9. Epub 2016 Feb 4.

PMID: 26847179, **IF: 3,054 (2015)**

*The actin-binding ERM protein Moesin directly regulates spindle assembly and function during mitosis.*

Vilmos P, **Kristó I**, Szikora S, Jankovics F, Lukácsovich T, Kari B, Erdélyi M.

Cell Biol Int. 2016 Jun;40(6):696-707. doi: 10.1002/cbin.10607. Epub 2016 Apr 6.

PMID: 27006187 **IF: 1,933 (2015)**

### Egyéb közlemények:

*Viability, longevity, and egg production of Drosophila melanogaster are regulated by the miR-282 microRNA.*

Vilmos P, Bujna A, Szuperák M, Havelda Z, Várallyay É, Szabad J, Kucerova L, Somogyi K, **Kristó I**, Lukácsovich T, Jankovics F, Henn L, Erdélyi M.

Genetics. 2013 Oct;195(2):469-80. doi: 10.1534/genetics.113.153585. Epub 2013 Jul 12.

PMID: 23852386 **IF: 4,866**

*Ecdysone induced gene expression is associated with acetylation of histone H3 lysine 23 in Drosophila melanogaster.*

Bodai L, Zsindely N, Gáspár R, **Kristó I**, Komonyi O, Boros IM.

PLoS One. 2012;7(7):e40565. doi: 10.1371/journal.pone.0040565. Epub 2012 Jul 10.

PMID: 22808194 **IF: 3,73**

## Konferencia előadások

### Magyar nyelvű

*Az Eip74EF és Eip75B ekdizon indukált gének szabályozásának vizsgálata*

Bodai László, Zsindely Nóra, Kristó Ildikó, Gáspár Renáta, Boros Imre

XII. Kolozsvári Biológus Napok, 2011. Április 8–10., Kolozsvár, Románia

*Az aktinkötő Moesin fehérje sejtmagi funkciójának vizsgálata*

Tavaszi Szél konferencia, 2014. Március 21-23, Debrecen

Kristó Ildikó, Vilmos Péter

*Egy aktinkötő, citoskeletális fehérje funkciója a sejtmagban*

XIV. Genetikai Műhelyek Magyarországon Minikonferencia, 2015. Szeptember 4., Szeged

Kristó Ildikó, Bajusz Csaba, Umesh Kumar Gautam, Maria Vartiainen, Vilmos Péter

### Angol nyelvű

*Nuclear function for a cytoskeletal actin binding protein*

Ildikó Kristó, Péter Vilmos and Miklós Erdélyi

Straub-napok, 2013. Május 29–30., Szeged

*Nuclear funktion for the actin binding cytoskeletal protein, Moesin*

Ildikó Kristó, Csaba Bajusz, Umesh Kumar Gautam, Joseph Dopie, Maria Vartiainen, Péter Vilmos

24<sup>th</sup> Wilhelm Bernhard Workshop on the Cell Nucleus, 2015. Augusztus 17-22., Bécs,

Ausztia



## **Társszerzői nyilatkozat I.**

Alulírott Dr. Vilmos Péter hozzájárulok, hogy Kristó Ildikó fokozatszerzési eljárásához felhasználja a „Vilmos et al., 2016: The actin-binding ERM protein Moesin directly regulates spindle assembly and function during mitosis” című közleményünkben foglalt eredményeinket, és egyúttal kijelentem, hogy ezeket az eredményeket nem használtam fel tudományos fokozat megszerzéséhez, és ezt a jövőben sem teszem meg.

.....

Dr. Vilmos Péter

Kelt: Szeged, 2016.07.13.

## **Nyilatkozat II.**

Alulírott, Dr. Vilmos Péter, kijelentem, hogy a közleményben (Kristó et al, 2016) megjelent eredmények elérésében a jelölt, Kristó Ildikó jelentős szerepet vállalt. Kijelentem továbbá azt is, hogy más jelöltnek nem adok ki hasonló tartalmú nyilatkozatot azokról az eredményekről, melyeket a jelölt fokozatszerzésében felhasználott.

.....

Dr. Vilmos Péter, témavezető

Kelt: Szeged, 2016.07.13.