

# **A sejtmagi Moesin importjának és funkciójának vizsgálata**

Ph.D. értekezés tézisei

Bajusz Csaba

Témavezető: Dr. Vilmos Péter, tudományos főmunkatárs

Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Genetikai Intézet

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

Biológia Doktori Iskola

2020.

Szeged

## **A kutatás előzményeinek rövid összefoglalása**

Az ERM (Ezrin-Radixin-Moesin) fehérjék a sejtmembrán alatt húzódó, ún. kortikális aktinhálózat és a transzmembrán fehérjék közötti kölcsönhatások kialakításában vesznek részt, ezáltal fontos szerepet játszanak a T-sejt aktivációban, a limfociták migrációjában (Neetha mtsai 2013), továbbá jelátviteli útvonalakat befolyásolnak (Neisch és mstai., 2011). Az utóbbi években vált bizonyossá, hogy az ERM fehérjecsalád tagjai, más citoskeletális fehérjékhez hasonlóan megtalálhatók a sejtmagban is (Batchleor és mtsai., 2004; Vilmos és mtsai., 2009).

A csoportunkban korábban végzett munka során megállapították, hogy a *Drosophila melanogaster* egyetlen ERM fehérjéje, a Moesin megtalálható a sejtmagban is, illetve sejtosztódás során kolokalizál az aktin hálózattal a mitotikus orsó körül (Vilmos és mtsai., 2016). A laboratóriumunkban végzett vizsgálatok azt bizonyították, hogy a Moesin részt vesz az mRNS-ek sejtmagból történő kiszállításában. A Moesin ugyanis kolokalizál a Rae1 és pABP export fehérjékkel az mRNP komplexekben, valamint az mRNS exportban résztvevő

*nup98* és *rael* gének RNS interferenciával történő csendesítése, más mRNS export faktorokhoz hasonlóan, a Moesin sejtmagi halmozódásához vezet. További bizonyíték a Moesin fehérje mRNP komplexek szállításában betöltött szerepére, hogy a fehérje mennyiségének csökkentése mRNS felhalmozódást eredményez a vizsgált sejtek magjában (Kristó és mtsai., 2017).

Ugyanakkor az eddigi ismereteink a Moesin és egyéb citoskeletális fehérjék sejtmagi szerepéről főként biokémiai megközelítések eredményei, valamint a Bloomingtoni központból beszerezhető *Drosophila* törzsek nem alkalmasak a Moesin sejtmagi vizsgálatára, hiszen ezen transzgenikus vonalak esetében a citoplazmatikus funkciók is sérülnek. Úgy gondoljuk, hogy az általunk használt módszerek és létrehozott muslica vonalak alkalmazása lehetővé teszi a Moesin sejtmagi funkcióinak *in vivo* vizsgálatát.

### **Alkalmazott módszerek**

Munkánk során a Moesin sejtmagi importjának jellemzését S2R+ *Drosophila* embrionális sejt kultúra

sejtekkel végeztük, melyeken a különféle Moesin fehérje formák magi halmozódását vizsgáltuk *rael* RNS interferencia mellett.

A Moesin sejtmagi funkciójának pontosabb megismeréséhez a *Drosophila melanogaster*t használtuk modellszervezetként. A CRISPR-Cas9 rendszerrel előállított *moe*[NES] mutáns legyekben megjelenő sterilitás és fejlődési rendellenességek miatt a vizsgálataink nagy részét embriókon, illetve petefészkeken végeztük, melyeken élő mikroszkópos technikát, fixálás utáni immunfestést, valamint fluoreszcens *in situ* hibridizációt alkalmaztunk. A megfigyelt fenotípusok részletes jellemzéséhez transzgenikus és mutáns *Drosophila* törzseket használtunk.

A különféle DNS konstrukciók és transzgenikus *muslica* vonalak elkészítéséhez a hagyományos DNS klónozási technika mellett a SLIC (sequence and ligation independent cloning), Gateway és Gibson Assembly módszereket alkalmaztuk.

## Eredmények és következtetések

1. A sejtmagi transzport vizsgálata során bizonyítottuk, hogy a Moesin aktív importja egy konzervált, kéttagú nukleáris lokalizációs szignál (NLS) révén valósul meg (**K<sub>279</sub>R<sub>280</sub>ILALCMGNHELYMR<sub>294</sub>RRK<sub>297</sub>**).
2. Az NLS szekvencia közelében a 292. és 300. pozícióban elhelyezkedő, vélhetően foszforilálható tirozin (Y<sub>292</sub>) és treonin (T<sub>300</sub>) aminosavak szabályzó funkcióját vizsgáltuk oly módon, hogy lecseréltük azokat állandó foszforilációs állapotot biztosító aszparaginsavra, valamint nem foszforilálható alaninra. Eredményeink alapján kijelenthető, hogy egyik aminosav foszforilációs állapota sem befolyásolja a Moesin sejtmagi transzportját, azaz sem a tirozin, sem a treonin nem rendelkezik szabályzó funkcióval.
3. A Moesin aktivációs állapota és importja közötti kapcsolatot tanulmányozó kísérleteknél a konstitutívan aktívnek tekintett Moe-T<sub>559</sub>D, valamint az inaktívnek vélt Moe-T<sub>559</sub>A fehérjét használtuk. Ezekben a fehérje formákban az aktivációért felelős, 559. pozícióban található treonint lecseréltük állandó

foszforilációs állapotot utánzó aszparaginsavra, valamint nem foszforilálható alaninra. Az így létrehozott mutáns fehérjék sejtmagi transzportjának vizsgálata során megállapítottuk, hogy a Moe-T<sub>559</sub>A-GFP a vad típushoz közel hasonló arányban importálódott a sejtmagba, míg a Moe-T<sub>559</sub>D-GFP mutatta a legkisebb sejtmagi halmozódást. Ezek az eredmények rámutattak, hogy a Moesin főként inaktív formában alkalmas a sejtmagi importra. Ugyanakkor a Moe-T<sub>559</sub>D forma kisebb magi halmozódásának oka nem feltétlenül a gyengébb importképesség, hanem valószínűleg inkább az, hogy az aktivált Moesin és az aktin citoskeleton közötti erős kapcsolatok gátolják a magi transzportfolyamatot. A Moesin inaktív formában is lezajló importját megerősíti az a megfigyelésünk is, hogy a foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát (PIP<sub>2</sub>) kötésben gátolt, ezáltal aktiválódni képtelen Moe-KA forma a vad típusal megegyező módon képes a sejtmagban halmozódni.

4. A szakirodalomból ismert, hogy az általunk azonosított NLS egy feltételezett G-aktinkötő régió része, így

megvizsgáltuk a monomer aktin szintnek a Moesin importra gyakorolt hatását is. A kísérletekkel bizonyítottuk, hogy sem a Jasplakinolide kezeléssel csökkentett, sem a polimerizációra képtelen R<sub>63</sub>D aktin forma termelésével megnövelt G-aktin mennyiség nem befolyásolja a Moesin sejtmagi halmozódását. Vagyis az intracelluláris G- és F-aktin szintek arányának nincsen szabályzó szerepe a Moesin sejtmagi importjában. Ugyanakkor ezen kísérletekkel még nem zárható ki teljesen az, hogy az aktin részt vesz a Moesin sejtmagi transzportjának folyamatában.

5. A Moesin sejtmagi funkcióinak *in vivo* feltárására a CRISPR-Cas9 rendszerrel olyan mutáns *Drosophila* törzset állítottunk elő, melyekben a *moesin* gént egy nukleáris export szignállal (NES) láttuk el, így a MoeNES fehérje a sejtmagból történő folyamatos kiszállítása miatt nem képes ottani funkcióit ellátni. Ezzel vizsgálhatóvá válnak azok a változások, melyek a Moesin sejtmagi hiányából adódnak. A NES használata azért volt indokolt, mivel a Moesin NLS szekvenciájának törlésével a sejtmagi funkciók

tanulmányozásához szükséges közel Moesin-mentes állapotot nem lehet elérni.

6. A létrehozott mutáns legyek által mutatott fenotípusokat öröklődési hátterük szerint csoportosítottuk. A dominánsan öröklődő sterilitást, a tergitelváltozásokat, illetve részben az embrionális és lárvális letalitást az anyai hatás miatt megjelenő fenotípusok közé soroltuk, míg zigotikus eredetű problémák a hímek esetében azonosított csökkent mászóképeség és élethossz, továbbá a külső ivarszerv rotációja. Szintén zigotikus hátterű a *moe*[NES] hímeknél és nőstényeknél egyaránt megfigyelt csökkent hőtűrés és részben az embrionális, valamint lárvális letalítás. Ezen túlmenően, a *moe*[NES] lárvák nyálmirigyeinek magjában mRNS halmozódást mutattunk ki, mely a sejtmagi mRNS export sérülését jelzi.
7. Munkánk egy részében olyan vizsgálatokat is végeztünk, melyek választ adnak arra, hogy a megfigyelt fenotípusokat a NES jelenlétéből adódó sérült citoplazmatikus funkció vagy elmaradt aktiváció,



esetleg a CRM1 transzport útvonal túlterheltsége okozza-e. Mivel ismert az, hogy a Moesin részt vesz az aktin citoszkeleton kialakításában, és ezáltal az anyai hatású faktorok normális lokalizációjában, megvizsgáltuk az aktin citoszkeleton szerveződésének épségét, továbbá az anyai hatású faktorok eloszlását (*oskar* mRNS, Staufen és Vasa-GFP fehérje) és mennyiségét (Vasa-GFP fehérje) a *moe*[NES] anyák ováriumában. A kísérletek azt mutatták, hogy a mutáns legyekben az aktin citoszkeleton szerveződése normális, és az anyai hatású faktorok lokalizációja megfelelő. A *moe*[NES] nőstények embrióiban mért Vasa-GFP mennyisége, illetve eloszlása szintén megegyezett a vad típusú embriókban mért értékekkel. Mindezeket túl megállapítottuk azt is, hogy a MoeNES sejtmagi exportja során használta, a NES motívumot felismerő CRM1 útvonal nincs túlterhelve, megfelelően működik, valamint hogy a MoeNES fehérje aktivációja és lokalizációja a vad típusú Moesinnel megegyezik. Ezen eredmények alapján elmondható, hogy a MoeNES fehérje, hasonlóan a vad típusú Moesinhez, a citoplazmában ellátja feladatait,

következésképp a mutánsban megfigyelt fenotípusok mindegyike a Moesin sejtmagi hiánya miatt alakult ki.

8. Annak eldöntésére, hogy a *moe*[NES] állatokban leírt fenotípusok kialakításában szerepet játszhat-e a Moesin sejtmagi hiányából adódó sérült transzkripció vagy mRNS szállítás, megszekvenáltuk a mutáns nőstények petefészkeiből izolált teljes mRNS készletet. A szekvenálási adatok szerint a vizsgált 13000 gén közül 371 gén esetén emelkedett, míg 315 génnél csökkent a transzkripció szintje. A Flybase GO term adatbázisa alapján a megváltozott aktivitású gének nagy része az egyedfejlődésben, a transzkripcióban, valamint a környezeti stimulusokra adott válaszreakciókban vesz részt. A transzkripció szintjének emelkedését mutató gének között a megfelelő izomműködés kialakításához fontos géneket, mint például a *bt* (*bent*), *Mhc* (*Myosin heavy chain*), *Mlc1* (*Myosin alkali light chain 1*), *Mlc2* (*Myosin light chain 2*), *Neurochondrin*, *up* (*upheld*) azonosítottunk. A transzkripció szintjének csökkenését mutató gének között pedig hat hősokk gént találtunk (*hsp70Aa*, *hsp70Ab*, *hsp70Ba*, *hsp68*, *hsp26*, *hsp23*), melyek

felelősek lehetnek a csökkent hőtűrő képességért, valamint hozzájárulhatnak a sterilitás kialakulásához.

9. A csoportunkban végzett korábbi munka alapján a Moesin minden bizonnyal részt vesz a hősokk indukálta transzkripció folyamatában. Ezen eredményt erősíti meg az a megfigyelésünk, hogy a *moe*[NES] legyekben azonosított *hsp* gének csökkent transzkriptszintjei, valamint az ennek hatására kialakult hőérzékenység a Moesin sejtmagi hiányának a következtében alakul ki.

## **Összefoglalás és kitekintés**

A Moesin sejtmagi transzportjának tanulmányozása során megállapítottuk, hogy a Moesin egy szabályzott, kéttagú NLS révén képes a sejtmagba jutni. Az NLS azonosítása után a Moesin sejtmagi transzportjának további vizsgálatát tervezzük oly módon, hogy a fehérje importjában szerepet játszó transzportert azonosítjuk a jelöltekre tervezett RNS interferencia alkalmazásával. Korábbi munkánk során megállapításra került, hogy a Moesin az NLS szekvencia hiányában nem képes különféle hatásokra (hősokk, ekdizon, *rae1* illetve *nup98*

RNS interferencia) sejtmagi halmozódásra. Ennek megfelelően tervezzük olyan mutáns *Drosophila* vonal létrehozását, melyben a *moesin* génben az NLS szekvenciát kódoló régiót töröljük, és vizsgáljuk a mutánsokban megjelenő fenotípusokat, melyek feltehetően a Moesin csökkent sejtmagi jelenlétéből adódnak majd.

A Moesin sejtmagi funkciójának *in vivo* tanulmányozásához létrehozott *moe*[NES] mutáns *Drosophila* vonal vizsgálata során számos fenotípust megfigyeltünk. A későbbiekben ezek jellemzését és csoportosítását végeztük el, valamint vizsgáltuk a megjelenésük mögött meghúzódó okokat. A kapott eredmények alapján, a laboratóriumunkban korábban tett megfigyelésekkel összhangban megállapíthattuk, hogy a Moesin sejtmagi hiánya az mRNS szállítás, valamint a transzkripció hibájához vezet. Általunk korábban igazolt tény, hogy a Moesin hősokk kezelés hatására a transzkripcionálisan aktívvá váló hősokk géneken halmozódik, ezért úgy gondoljuk, hogy a *hsp* gének ideális jelöltek lehetnek a Moesin transzkripcióban betöltött szerepének részletes tanulmányozására.

A *moe*[NES] legyekben megfigyelt domináns sterilitás a NES motívum mellékhatása. Mivel domináns hatást a dimerizációs képesség megváltozása váltja ki, ezért a MoeNES fehérje molekuláris működésének pontosabb feltérképezésére a dimerképző tulajdonságait kell megvizsgálni, ami az úgynevezett micro scale thermophoresis (MST) mérésekkel végezhető el. Ezen vizsgálatokkal először kaphatunk majd képet a Moesin dimerként betöltött funkcióiról. Ugyanakkor a MoeNES citoplazmatikus funkcióinak tesztelése során nem találtunk bizonyítékot a fehérje citoplazmatikus működésének sérülésére, így joggal feltételezhető, hogy a megfigyelt domináns sterilitás kialakulása is a Moesin sejtmagi működésének, a sejtmagban kialakuló dimerek funkciójának sérüléséhez kapcsolható. A MoeNES fehérje dimerizációs vizsgálataival párhuzamosan folytatjuk a domináns sterilitást eredményező ivarsejt elvesztés okának további tanulmányozását. Elsősorban azt fogjuk vizsgálni, hogy a poláris sejtekben a Vasa marker fehérje eltűnése apoptózis vagy az identitás elvesztésének eredményeként alakul-e ki.

## Közlemények listája

MTMT azonosító: 10052993

Összesített impakt faktor: 16,856

A dolgozat témájához kapcsolódó közlemények:

Nuclear actin: ancient clue to evolution in eukaryotes?

**Bajusz Cs.**, Borkúti P, Kristó I, Kovács Z, Abonyi C, Vilmos P

Histochem Cell Biol. 2018 Sep;150(3), 235–244.

[doi.org/10.1007/s00418-018-1693-6](https://doi.org/10.1007/s00418-018-1693-6)

PMID: 30019087, **IF: 2,64 (2018)**

Characterization of the nuclear localization signal of the actin-binding Moesin protein.

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

Biopolymers and Cell 2019; 35(3):201.

<http://dx.doi.org/10.7124/bc.0009D2>

**IF: 0,3 (2018)**

Investigation the role in mRNA export of the actin binding protein, Moesin

Kristó I, **Bajusz Cs.**, Borkúti P, Kovács Z, Pettkó-Szandtner A, Vilmos P

Biopolym. Cell. 2019; 35(3):219-220.

<http://dx.doi.org/10.7124/bc.0009E9>

**IF: 0,3 (2018)**

Testing the biological significance of the nuclear localization of actin.

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

Biopolym. Cell. 2019; 35(3):204-204.  
<http://dx.doi.org/10.7124/bc.000A06>  
**IF: 0,3 (2018)**

The actin binding cytoskeletal protein Moesin is involved in nuclear mRNA export.

Kristó I, **Bajusz Cs**, Borsos B. N, Pankotai T, Dopie J, Jankovics F, Vartiainen M. K, Erdélyi, M, Vilmos P  
Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research 1864:10 pp. 1589-1604.,16 p.(2017)  
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.05.020>  
PMID:28554770, **IF: 2,68 (2017)**

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.  
<https://doi.org/10.1007/s00418-015-1400-9>  
PMID:26847179, **IF: 2,55 (2015)**

#### Egyéb közlemények:

Drosophila Atg9 regulates the actin cytoskeleton via interactions with profilin and Ena.

Kiss V, Jipa A, Varga K, Takáts S, Maruzs T, Lőrincz P, Simon-Vecsei Z, Szikora S, Földi I, **Bajusz Cs**, Tóth D, Vilmos P, Gáspár I, Ronchi P, Mihály J, Juhász G  
Cell Death Differ (2019) 27, p. 1677–1692(2020).  
<https://doi.org/10.1038/s41418-019-0452-0>  
PMID:31740789, **IF: 8,086 (2018/2019)**

## **Nyilatkozat I.**

Alulírott, Dr. Vilmos Péter, kijelentem, hogy a közleményben (Bajusz Cs et al, Histochem Cell Biol. 2018 Sep;150(3), 235–244.: Nuclear actin: ancient clue to evolution in eukaryotes?) megjelent eredmények elérésében a jelölt, Bajusz Csaba jelentős szerepet vállalt. Kijelentem továbbá azt is, hogy más jelöltnek nem adok ki hasonló tartalmú nyilatkozatot azokról az eredményekről, melyeket a jelölt fokozatszerzésében felhasznált.

.....

Dr. Vilmos Péter

Kelt: Szeged, 2020. 06. 30.



## **Társszerzői nyilatkozat II.**

Alulírott, Dr. Vilmos Péter, kijelentem, hogy a közleményben („Kristó I et al, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1864:10 pp. 1589-1604.,16 p.(2017): The actin binding cytoskeletal protein Moesin is involved in nuclear mRNA export.”) megjelent eredmények elérésében a jelölt, Bajusz Csaba jelentős szerepet vállalt. Kijelentem továbbá azt is, hogy más jelöltnek nem adok ki hasonló tartalmú nyilatkozatot azokról az eredményekről, melyeket a jelölt fokozatszerzésében felhasznált.

.....

Dr. Vilmos Péter

Kelt: Szeged, 2020. 06. 30.