

**Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola
Biokémia, Biofizika, Molekuláris és Sejtbiológia Program**

Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Doktori értekezés

**A *Drosophila moesin* fehérje sejtmagi
importdinamikájának és
-mechanizmusának vizsgálata**

Kovács Zoltán

Témavezető: Dr. Vilmos Péter, Ph.D.

HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Genetikai Intézet

2024.

PUBLIKÁCIÓK

A doktori értekezés témájához kapcsolódó publikációk

- I.** Kovács Z., Bajusz C., Szabó A., Borkúti P., Vedelek B., Benke R., Lipinszki Z., Kristó I., and Vilmos P. (2024) A bipartite NLS motif mediates the nuclear import of *Drosophila moesin*. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2024 Feb 21;12:1206067. <https://doi.org/10.3389/fcell.2024.1206067>
IF₂₀₂₃: 6.081, H-INDEK: 87, Q1
- II.** Borkúti P., Kristó I., Szabó A., Kovács Z. and Vilmos P. (2024) FERM domain-containing proteins are active components of the cell nucleus. *Life Science Alliance*. 7(4): e202302489. <https://doi.org/10.26508%2Flsa.202302489>
IF₂₀₂₃: 5.781, H-INDEK: 30, D1
- III.** Bajusz C., Kristó I., Abonyi C., Venit T., Vedelek V., Lukácsovich T., Farkas A., Borkúti P., Kovács Z., Bajusz I., Marton A., Vizler Cs, Lipinszki Z., Sinka R., Percipalle P. and 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>
IF₂₀₂₂: 4.739, H-INDEK: 222, Q1
- IV.** Bajusz C., Kristó I., Borkúti P., Kovács Z. & Vilmos P. (2019) Characterization of the nuclear localization signal of the actin-binding Moesin protein. *Biopolymers and Cell* 35(3):201. doi: <http://dx.doi.org/10.7124/bc.0009D2>
IF: 0.3, H-INDEK: 16, Q4

A doktori értekezéshez közvetlenül nem kapcsolódó publikációk

- V.** Bajusz C, Borkúti P, Kristó I, Kovács Z, Abonyi C, Vilmos P. (2018) Nuclear actin: ancient clue to evolution in eukaryotes? *Histochem Cell Biol*. 2018 Sep;150(3):235-244. doi: 10.1007/s00418-018-1693-6.
IF₂₀₁₇: 2.164, H-INDEK: 109, Q1

- VI.** 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*. *Front Mol Biosci*. 2022 Aug 19;9:963635. doi: 10.3389/fmolb.2022.963635.
IF₂₀₂₂: 6.113, **H-INDEX**: 61, **Q1**
- VII.** Kristó I, Borkúti P, **Kovács Z**, Szabó A, Szikora S, Vilmos P. Detection of Actin in Nuclear Protein Fraction Isolated from Adult *Drosophila* Ovary. *Methods Mol Biol*. 2023;2626:353-364. doi: 10.1007/978-1-0716-2970-3_19.
IF₂₀₂₂: 1.13, **H-INDEX**: 187, **Q3**
- VIII.** Szabó A, Borkúti P, **Kovács Z**, Kristó I, Abonyi C, Vilmos P. Measuring Transposable Element Activity in Adult *Drosophila* Ovaries. *Methods Mol Biol*. 2023;2626:309-321. doi: 10.1007/978-1-0716-2970-3_16.
IF₂₀₂₂: 1.13, **H-INDEX**: 187, **Q3**
- IX.** 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. doi: <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000A06>
IF₂₀₁₉: 0.3, **H-INDEX**: 16, **Q4**
- X.** Kristó I., Bajusz C., Borkúti P., **Kovács Z.**, Pettkó-Szandtner A., Vilmos P. (2019) Investigation the role in mRNA export of the actin binding protein, Moesin. *Biopolymers and Cell* 35(3):219. doi: <http://dx.doi.org/10.7124/bc.0009E9>
IF₂₀₁₉: 0.3, **H-INDEX**: 16, **Q4**

BEVEZETÉS

A sejtmagi transzport mechanizmusai

A ~60 kDa-nál nem nagyobb méretű makromolekulák, kismolekulák és ionok passzív diffúzióra képesek a magpórus komplexen (NPC) keresztül (Wang and Brattain, 2007). A 60 kDa-nál nagyobb móltömegű molekulák szabályozott sejtmagi transzport segítségével közlekedhetnek a sejtmag és a citoplazma között (Kaffman and O'Shea, 1999). A sejtmagi import folyamatának három fő lépése van: dokkolás, áthaladás a magpórus komplexen keresztül, és végül a szállítmány elengedése a sejtmagban. A sejtmagban a szállítmány-importin komplex szétesik és az importin visszaszállítódik a citoplazmába, ahol részt vesz a sejtmagi import további ciklusaiban (Kaffman and O'Shea, 1999). Az importin a szállítandó fehérje egy specifikus szekvenciáján, az úgynevezett nukleáris lokalizációs szignálon (NLS) keresztül ismeri fel a szállítmányát. A két legismertebb NLS-motívum a Simian virus 40 nagy T-antigén NLS (SV40 NLS) és a nukleoplazmin kéttagú NLS-e. Az utóbbi NLS két rövidebb bázikus aminosavcsoportból áll (2 ill. 4 aminosav), amelyeket egy 10 aminosav hosszúságú térkitöltő szekvencia választ el egymástól (Weis, 1998).

A sejtmagi exportfolyamat főbb lépéseit tekintve hasonló a sejtmagi importhoz. Először is a citoplazmába exportálandó szállítmányt egy szolubilis exportreceptor, az exportin egy sejtmagi export szignál (NES) segítségével felismeri. A szállítmány-exportin-Ran-GTP trimer komplex ezután a NPC-n keresztül a citoplazmába transzportálódik, ahol a komplex szétesik és a szállítmány felszabadul (Mattaj and Englmeier, 1998). A legismertebb sejtmagi export útvonal egy leucinban gazdag sejtmagi export jelet használ, amelyet a Crm1 (más néven Exportin1) sejtmagi export receptor ismer fel (Fornerod et al., 1997).

A sejten belüli fehérjelokalizáció szabályozása

Az NLS és NES szekvenciák a fehérjéket a sejtmagba illetve a citoplazmába irányítják, de a fehérjék sejten belüli lokalizációjának szabályozása további lehetőségeket is kínál a sejten belüli eloszlás finomhangolására. E szabályozási mechanizmusok közé tartozik a szállítmány poszttranszlációs módosítása, amely megakadályozhatja vagy elősegítheti a szállítmány-transzportin komplex kialakulását. Hasonlóképpen a transzportin aktivitása is módosítható úgy, hogy az befolyásolja a rakománnyal való komplexképzésre való képességét. Például a szállítmány-transzportin komplexet a transzportin kihorgonyozhatja egy citoplazmás komponenshez, megakadályozva a komplex és az NPC közötti kölcsönhatás kialakulását. A transzport szabályozásának másik lehetséges módja magának az NPC-nek a módosítása, ami szintén befolyásolhatja a transzportot (Kaffman and O'Shea, 1999; Hung and Link, 2011). A szállítmány sejten belüli lokalizációjának poszttranszlációs módosítással történő szabályozására példa az aktivált T-sejtek nukleáris faktorának (NF-AT) foszforilációval történő szabályozása. Normál körülmények között az NF-AT foszforilálódik, és ennek hatására a citoplazmában olyan konformációt vesz fel, amelyben a NES hozzáférhető, de az NLS nem. A T-sejt receptorok aktiválásának hatására a kalcineurin defoszforilálja, ami az NF-AT-ban olyan konformációs változást okoz, amely az NLS-t hozzáférhetővé teszi (Zhu and McKeon, 1999). A poszttranszlációs módosítások mellett a fehérjekomplexek kialakulása is egy lehetséges módja annak, hogy a sejtmagi

lokalizáció megvalósuljon vagy gátlódjon. A Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) esetében a kötőpartnerekkel kialakított kötés okozza a citoplazmában való visszatartást (Rothwarf et al., 1998). Az afrikai karmos béka, a *Xenopus laevis* nukleáris faktor 7 (Xnf7) fehérjéje egy anyai úton kifejeződő transzkripció faktor, amely az egyedfejlődés egy meghatározott fázisáig az oocita citoplazmájában marad. Ebben az esetben a citoplazmatikus visszatartást egy 22 aminosav hosszúságú citoplazmatikus retenciós domén (CRD) biztosítja (Li et al., 1994). A fehérjék citoplazmában való visszatartását számos kötőpartner vagy akár hőszokkfehérjék is végezhetik, de vannak olyan fehérjék is, amelyek kimondottan erre a tevékenységre specializálódtak. A 14-3-3 fehérjecsald tagjai például az evolúciósan konzervált szabályozó molekulák ilyen csoportját alkotják. Eddig több mint 200 molekuláról mutatták ki, hogy a 14-3-3 fehérjék szubsztrátjai (Fu et al., 2000).

Az ERM fehérjecsald

Az ERM fehérjecsaldnak három paralóga található meg a gerincesekben: az ezrin, a radixin és a moesin, míg a gerincteleneknek csak egy ERM fehérjéjük van. Az ERM-fehérjék nagyfokú szerkezeti hasonlóságot mutatnak egymással. Három különböző doménnel rendelkeznek, egy N-terminális, globuláris FERM doménnel, a C-terminálison található úgynevezett C-ERMAD (C-terminális ERM asszociációs domén) doménnel és egy rugalmas alfa-helikális doménnel, amely a kettőt összeköti. A FERM-domén, mint általános fehérjekötő domén számos membránfehérjével való kölcsönhatásért felelős. A C-terminális doménnek két fő funkciója van. Egyrészt az F-aktin kötésért felel, másrészt magának az ERM fehérjének a szabályozásában játszik szerepet, mivel a FERM doménhez inter- és intramolekulárisan is képes kapcsolódni (Fehon et al., 2010).

Az ERM-fehérjék az N- és C-terminális domének kölcsönhatása révén szabályozódnak, mivel zárt állapotukban, amikor a C-ERMAD a FERM-doménhez kötődik, az intramolekuláris kölcsönhatás elrejtja a FERM-domén felszínén lévő kötőhelyeket. A nyitott, aktív konformáció eléréséhez az ERM-eknek foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfátot (PIP2) kell kötniük a FERM-domén felszínén található specifikus kötőzsebben, ami a molekula részleges kinyílását okozza. Ebben a részlegesen nyitott állapotban a C-ERMAD-ban egy treonin oldallánc hozzáférhetővé válik és foszforilálódik a Slik kináz által, ami a molekula teljes és stabil kinyílását okozza (Nakamura et al., 1995; Fievet et al., 2004; Ben-Aissa et al., 2012).

ERM fehérjék a sejtmagban

Az újabb tudományos eredmények megjelenésével ma már egyértelmű, hogy a citoskeletális fehérjék többsége nemcsak a citoplazmában van jelen, ahol klasszikus, jól ismert feladataikat végzik, hanem a sejtmagban is. Ma már tudjuk, hogy az aktin, az egyik legismertebb citoskeletális fehérje fontos szerepet játszik a sejtmagban, mivel részt vesz az RNS-polimerázok és transzkripció faktorok, kromatin átrendező komplexek és hiszton-deacetilázok aktivitását szabályozó folyamatokban. A sejtmagi aktint olyan emberi betegségekkel is összefüggésbe hozták, mint a rák, a neurodegeneráció és miopátiák. Ma már az is ismert, hogy az aktin sejtmagi transzportja - alapvető sejtmagi funkciói miatt - egy szigorúan szabályozott, aktív folyamat (Dopie et al., 2012; Kelsch and Tootle, 2018).

Az aktinhoz hasonlóan az ERM-fehérjék is jelen vannak a sejtmagban. A jelenség legkorábbi megfigyelései közé tartozott, amikor az ezrin 55 kDa-os, endogén módon hasított fragmentumáról kimutatták, hogy emberi sejtekben a sejtmagba (pontosabban a sejtmagvacskába) lokalizálódik (Kaul et al., 1999), illetve amikor teljes hosszúságú ezrint figyeltek meg patkány Schwann-sejtek magjában (Melendez-Vasquez et al., 2001). Később a moesin humán limfociták sejtmagjában is kimutatták (Bergquist et al., 2001), valamint azt is igazolták, hogy az exogén módon termeltetett, GFP-vel jelölt radixin a sejtmagba lokalizálódik. Differenciális detergens extrakciós kísérletekkel kimutatták, hogy az ezrin és a moesin szorosan kapcsolódik bizonyos sejtmagi komponensekhez, ami tovább erősíti azt az elképzelést, hogy vannak olyan sejtmagi funkciók, amelyek miatt az ERM fehérjék a sejtmagban találhatóak (Batchelor et al., 2004).

A *Drosophila* ERM fehérje, a moesin a sejtmagban

A *Drosophila melanogaster*-ben az ERM családnak csak egyetlen képviselője van jelen, a *Drosophila* moesin fehérje. Gerinces homológjaihoz hasonlóan a *Drosophila* moesin is megtalálható a sejtmagban. Tenyésztett *Drosophila* S2 sejtekben és embriókban kimutatták, hogy a moesin az interfázisban a sejtmagba lokalizálódik, és a kromatinnal komplementer sejtmagi eloszlást mutat (Vilmos et al., 2009). Az ecetmuslicában végzett későbbi vizsgálatok további fényt derítettek a *Drosophila* moesin sejtmagi funkcióira. Az mRNS-ek sejtmagi exportjának blokkolásakor a moesin sejtmagi szintje megemelkedik. A *Drosophila* lárvális nyálmirigy politén kromoszómáinak felhasználásával kimutatták, hogy a moesin a kromoszóma puffokhoz (speciális eukromatikus régiók rendkívül magas transzkripcióval) lokalizál. Egy másik tanulmányban a szerzők igazolták, hogy a moesin az mRNS-ek sejtmagi exportjéért felelős mRNP komplexek alkotóeleme, ami arra utal, hogy a fehérje az mRNS-exportban is szerepet játszik (Kristó et al., 2017).

Mivel a moesin aktivitásának teljes hiánya a sejt számára letális, és mivel a fehérje bármilyen módosítása nemcsak a sejtmagi, hanem az alapvető citoplazmatikus funkciókat is befolyásolná, a szerzők az ecetmuslicában létrehozták a moesin egy olyan változatát, amelyet egy nukleáris export szignállal (NES) láttak el (Bajusz et al., 2021). A moesin-NES mutáns fehérjét expresszáló muslicák lassú fejlődést, csökkent élettartamot és mászóképességet mutattak, kevesebb petét raktak, valamint a hímeknél a nemi szervek rotálódtak. A csökkent sejtmagi moesinszint hatásait mRNS szekvenálással is megvizsgálták. A kísérlet során kiderült, hogy 371 gén expressziója nőtt, 315 géné pedig csökkent (Bajusz et al., 2021). Az upregulált gének között három fontos, fejlődést szabályozó is szerepelt: a *vasa*, a *Notch* és a *dpp*. Ez magyarázatot adhat a moesin-NES mutáns állatokban megfigyelt fejlődési rendellenességekre. A gének másik érdekes csoportja, amelyek expressziója a moesin-NES állatokban csökkent, a hősokkfehérjéket (HSP) kódoló gének voltak, nevezetesen a *hsp70Aa*, *hsp70Ab*, *hsp70Ba*, *hsp68*, *hsp26* és *hsp23*. Ez az eredmény összhangban van a korábban publikált eredményekkel (Kristó et al., 2017), ahol hősokk hatására a moesin a *Drosophila* lárvális nyálmirigyek politén kromoszómáin lévő hősokk puffokhoz lokalizálódott, ami arra utal, hogy a moesin szükséges a hősokk gének átírásához.

CÉLKITŰZÉSEK

Az aktinkötő, FERM-domént tartalmazó fehérjék jelenlétét a sejtmagban már évtizedekkel ezelőtt megfigyelték, és néhányuk esetében a sejtmagi funkciókat is kellő részletességgel leírták. Sejtmagi transzportjuk mechanizmusa és szabályozása azonban még a legjobban jellemzett fehérjék esetében is alig ismert. A sejtmagi transzport feltárása nagy segítséget jelenthet mind az adott fehérje sejtmagi funkciójának megértésében, mind pedig annak manipulációjában. Jelen tanulmányban a következő kérdésekre kerestük a választ:

1. Milyen dinamikával jut be a moesin a sejtmagba?
2. Ismert, hogy a moesin rendelkezik NLS szekvenciával. Mutat az NLS szekvencia evolúciós konzerváltságot? Elárulhat a konzerváltság egyéb tulajdonságokat, például a szekvencia szabályozására vonatkozóan?
3. Van szerepe foszforilációnak a moesin sejtmagi importjának szabályozásában?
4. Szabályozhatja a moesin importját a fehérje konformációs állapota?
5. Milyen egyéb mechanizmusok szabályozhatják a moesin sejtmagi importját?

EREDMÉNYEK

A moesin sejtmagi importja egy aktív, szabályozott folyamat

A *Drosophila moesin* fehérje sejtmagi importdinamikájának vizsgálatára sejtmagi FRAP kísérleteket végeztünk. Annak érdekében, hogy felmérjük a kísérlet során a nem kívánt, szkenelésből adódó fakulás mértékét, úgynevezett „vak FRAP” kísérleteket végeztünk, amelyek azt mutatták, hogy a kísérlet 40 perce alatt nem volt jelentős fakulás. A moesin sejtmagi importdinamikáját jellemző FRAP-görbét a GFP-vel jelölt aktinével hasonlítottuk össze, amely a moesin egyik fő kötőpartnere, és sejtmagi importjának dinamikája már ismert az irodalomból (Dopie et al., 2012). Az aktin FRAP görbéje igen dinamikus sejtmagi importra utal, míg a moesin esetében kapott görbe meglehetősen lapos, ami a fehérje lassú és egyenletes beáramlását jelzi a sejtmagba.

Ismert, hogy a moesin felhalmozódik a sejtmagban az mRNS-export blokkolásának eredményeként. Megvizsgáltuk az import dinamikáját ilyen körülmények között is, és azt találtuk, hogy az mRNS-export blokkolásával a moesin sejtmagi importja dinamikusabbá válik, azonban még mindig nem olyan erős, mint az aktiné. Ezen eredmények alapján a legvalószínűbb magyarázat az, hogy normál körülmények között a moesin sejtmagi importja erősen gátolt. Amikor az importot indukáljuk (az mRNS-export blokkolásával), ez a gátlás részben feloldódik. Ezek a kísérletek azt is megmutatták számunkra, hogy a moesin sejtmagi importja aktív, szabályozott folyamat, hiszen ha a fehérjére nagyobb mennyiségben van szükség a sejtmagban, akkor az import dinamikája fokozódhat.

A *Drosophila moesin* egy evolúciósan konzervált, kéttagú NLS-sel rendelkezik

A moesin fehérje NLS-ét korábban Kristó Ildikó, Bajusz Csaba és Szabó Anikó azonosították és jellemezték laboratóriumunkban. Összességében a négy prediktált NLS közül a 294-297-es pozíciókban található RRRK szekvencia bizonyult felelősnek a sejtmagi importért. A motívum az NLS szekvenciától 13 aminosav távolságra, a 279-280-as pozíciókban található KR aminosavak bevonásával kéttagúnak bizonyult (KR_{X13}RRRK). Az NLS aktivitását nem szabályozza a közelében lévő foszforilálható aminosavak (Y292 és T300) foszforilációs állapota, amint azt a nem foszforilálható (Y292A és T300A) és foszfomimetikus (Y292D és T300D, majd Y292E és T300E) aminosavcserek kimutatták.

Annak vizsgálatára, hogy az általunk a *Drosophila moesin*ben azonosított NLS megtalálható-e más fajok ERM fehérjéiben is, 18 különböző fajból származó, összesen 24 ERM fehérje szekvenciaillesztését végeztük el. Az elemzés kimutatta, hogy a moesinben azonosított kéttagú NLS evolúciósan erősen konzervált. Ez a konzerváltság nemcsak magára az NLS motívum két részére, hanem a köztük lévő távolságra is vonatkozik. Az NLS és az azt közvetlenül körülvevő régió nagyfokú evolúciós konzerváltsága arra utal, hogy az itt található aminosavak valóban fontosak az ERM fehérjék megfelelő működéséhez.

Sejtmagi import során a zárt konformáció a preferált

Az ERM fehérjék nyitott (aktív) vagy zárt (inaktív) konformációs állapotban léteznek a sejtben. A nyitott konformációt az 559-es pozícióban lévő treonin foszforilációja stabilizálja. Annak vizsgálatára, hogy a fehérje melyik konformációs formája lehet import-

kompetens, létrehoztuk a MoeT559D (aszparaginsavra cserélt 559-es treonin) és MoeT559A (alaninra cserélt 599-es treonin) pontmutánsokat, amelyeket az irodalomban már korábban leírtak (Polosello et al., 2002). Először azt vizsgáltuk a sejtek plazmamembránjánál végrehajtott FRAP kísérletekkel, hogy van-e valós különbség a két mutáns fehérje aktivitása között. Az állandóan aktív mutáns, a MoeT559D elsősorban a sejtkereghez lokalizálódott, és alacsonyabb kicserélődési rátát mutatott a fakítás után, ami arra utal, hogy erős molekuláris kölcsönhatásokat alakít ki a plazmamembrán közelében. Ezzel szemben az inaktív mutáns, a MoeT559A közel homogén eloszlást mutatott a citoplazmában, és a FRAP kísérletekben nagyobb volt a kicserélődési rátája, ami azt jelenti, hogy nem vesz részt erős fehérje-fehérje kölcsönhatásokban a plazmamembránnál. Ezek az eredmények megerősítették, hogy a két mutáns forma között valóban fennáll a várt működésbeli különbség.

Ezután a MoeT559 mutánsokkal sejtmagi import FRAP kísérleteket végeztünk. Az így kapott FRAP görbékből kiderült, hogy a két mutáns fehérje sejtmagi importdinamikája nagyon hasonló. Mindkét mutáns a vad típusú moesinhez hasonló import görbét mutat, ami a mutáns formák lassú és egyenletes beáramlását jelzi a sejtmagba. Ez arra utal, hogy mindkét forma a vad típusú fehérjéhez hasonlóan képes belépni a sejtmagba, és hogy a moesin NPC-n való áthaladásának dinamikáját nem maga a konformációja szabályozza.

A sejtmagi FRAP kísérlettel kapott eredményeket megerősítette a GFP-vel jelölt MoeT559D-t és a MoeT559A-t expresszáló sejtek immunfestése is. A moesin sejtmagi importjának *Rae1* RNSi általi indukcióját követően mindkét mutáns forma képes volt bejutni és felhalmozódni a sejtmagban, akárcsak a fehérje vad típusa. Az adatok számszerűsítése azonban azt mutatta, hogy az aktív mutáns a sejtmagi import indukciója után lényegesen kisebb mennyiségben van jelen a sejtmagban, mint az inaktív forma, ami arra utal, hogy a fehérje zárt konformációja preferált a sejtmagi import során.

Annak megerősítése vagy cáfolata érdekében, hogy a zárt konformáció a preferált sejtmagi import során, megvizsgáltuk, hogyan befolyásolja az importot a Slik kináz csendesítése, amely a *Drosophila* moesin T559-es aminosavat foszforilálja. A Slik RNSi kezelés önmagában megnövelte a moesin mennyiségét a sejtmagban, még a *Rae1* RNSi által kiváltott importindukció nélkül is. Ez az eredmény újabb bizonyítékot szolgáltat arra, hogy a moesin nem foszforilált formája van előnyben részesítve a sejtmagi import során.

Az F-aktin kötése nem szabályozza a moesin sejtmag importját

Annak vizsgálatára, hogy a moesin aktinkötő képessége szerepet játszik-e a fehérje sejtben belüli lokalizációjának szabályozásában, Moe-GFP-t termelő *Drosophila* S2R+ sejteket jasplakinoliddal kezeltünk. A jasplakinolid elősegíti az aktin polimerizációt, ezáltal csökkenti a monomer aktin mennyiségét a citoplazmában. A moesin sejtmagi importjának indukálására *Rae1* RNSi-t is alkalmaztunk. Azt találtuk, hogy az F-aktin mennyiségének növelése és ezzel egyidejűleg a rendelkezésre álló G-aktin szint csökkentése nem eredményez észrevehető változást a moesin sejtmagi importjában, a fehérje továbbra is képes felhalmozódni a sejtmagban az import indukcióját követően. Ez azt jelzi, hogy a monomer aktin nem akadályozza és nem is szükséges a moesin nukleáris transzlokációjához.

Egy következő kísérletben a szabad monomer aktin mennyiségét egy másik citoskeletális drog segítségével növeltük. A Latrunculin A nevű, szivacsok által termelt mérgeanyag megakadályozza az aktin polimerizációt és fokozza a depolimerizációt, ami a sejten lévő szabad G-aktin mennyiségének növekedését eredményezi. Az eredmények alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy az aktinhálózat depolimerizációja sincs hatással a fehérje sejtmagi importjára, ami egyúttal azt is jelenti, hogy nem az F-aktinhoz való kötődés gátolja az aktivált moesin sejtmagi importját.

A moesin rendelkezik egy citoplazmás retenciós szekvenciával

A szintén FERM domént tartalmazó fehérje, a merlin az ERM fehérjék közeli rokona. A *merlin* gén második exonja a FERM-domén egy rövid szekvenciáját kódolja, és erről leírták, hogy felelős a fehérje citoplazmatikus visszatartásáért (Kressel and Schmucker, 2002). Ennek az exonnak a deléciója esetén a mutáns fehérje jelentős mennyiségben képes a sejtmagba jutni. Összehasonlítottuk a humán merlin 2. exonját a *Drosophila* moesin megfelelő régiójával, és nagyfokú hasonlóságot találtunk, több azonos aminosavval. Ezért megvizsgáltuk, hogy a moesin rendelkezik-e aktív retenciós motívummal ebben a régióban (a továbbiakban: citoplazmás retenciós szignál vagy röviden CRS), amely felelős lehet a citoplazmában való visszatartásáért. E célból létrehoztunk egy Moe Δ CRS nevű deléciós mutánst, amelyben a moesin potenciális, 25 aminosav hosszú CRS-szekvenciájának közepéről 10 aminosavat töröltünk. Megállapítottuk, hogy a GFP-vel jelölt Moe Δ CRS mutáns fehérje sejtben belüli lokalizációja jelentősen eltér a vad típusú moesinétől. Érdekes módon a Moe Δ CRS elsősorban a plazmamembránhoz és a filopódiumokhoz lokalizálódik. A mutáns fehérje mennyisége a sejtmagban azonban nem különbözik jelentősen a vad típusától.

A CRS-nek a moesin sejtmagi importjának szabályozásában játszott szerepének vizsgálatára sejtmagi import FRAP kísérleteket végeztünk GFP-jelölt Moe Δ CRS-t expresszáló S2R⁺ sejteken. Azt találtuk, hogy az import dinamikája drámaian megváltozott akár a vad típushoz, akár bármely más, általunk eddig létrehozott és tesztelt mutáns fehérjeformához képest. A FRAP görbe azt mutatta, hogy a Moe Δ CRS mutáns rendkívül dinamikusán importálódik a sejtmagba.

Egy 25 aminosavas szekvencia felelős a *Drosophila* moesin citoplazmás retenciójáért

Az újonnan azonosított CRS szekvencia működésének további tanulmányozásához és jellemzéséhez olyan kísérleti rendszert terveztünk, amelyben egy kontroll fehérjét, a mag és a citoplazma között szabadon mozgó GFP-t különböző hosszúságú, a moesin CRS szekvenciájának bizonyos részeit tartalmazó peptidekkel jelöltünk. Három GFP fúziós konstruktot terveztünk és hoztunk létre (GFP-CoreCRS, GFP-CRS, GFP-Exon10), valamint két kontroll konstruktot (GFP és GFP-R60). Azt találtuk, hogy a CoreCRS szekvencia 10 aminosava nem volt képes gátolni a GFP sejtmagba való bejutását, míg a CRS (25 aminosav) és az Exon10 (60 aminosav, amely a teljes CRS-t tartalmazza) peptidek egyértelműen gátolták a GFP nukleáris lokalizációját. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a 25 aminosav hosszúságú CRS szekvencia elegendő a fehérje sejtmagi bejutásának megakadályozásához, és valószínűleg ez a szekvencia a felelős a vad típusú moesin citoplazmában való visszatartásáért is.

Annak további megerősítése érdekében, hogy a moesin CRS szekvenciája valóban működőképes, elemeztük az előző kísérletben használt néhány konstrukció sejtmagi importdinamikáját. A kontrollok, azaz a GFP és a GFP-R60 rendkívül dinamikus import FRAP görbét mutattak, ami szabad és akadálytalan sejtmagba való beáramlásra utal. Ezzel szemben a CRS szekvenciát tartalmazó GFP-Exon10 magi importdinamikáját egy minimális emelkedésű, lineáris FRAP görbe jellemzi, amely szinte teljesen megegyezik a vad típusú moesin import görbéjével.

A moesinen azonosított CRS szekvencia evolúciós konzerváltásgot mutat

A CRS evolúciós konzerváltóságának elemzése érdekében 12 fajban található összesen 21 darab, FERM domént tartalmazó fehérje szekvenciáját illesztettük. Az illesztés kimutatta, hogy valamennyi vizsgált fehérje CRS régiójában egy 22 aminosavból álló, erősen konzervált régió azonosítható. A 22 aminosavból öt azonos az összes elemzett szekvenciában, míg további nyolc pozícióban hasonló kémiai tulajdonságokkal rendelkező aminosavak találhatóak, és így hozzájárulnak a nagyfokú konzervációhoz. Ennek a 22 aminosavból álló rövid szakasznak a magas fokú konzerváltósága arra utal, hogy a CRS valóban fontos része lehet a FERM doménnek, mivel szerepet játszik a FERM domént tartalmazó fehérjék sejten belüli lokalizációjának szabályozásában.

EREDMÉNYEK ÉS KONKLÚZIÓK

A sejtmagi import FRAP technikával bebizonyítottuk, hogy a *Drosophila moesin* fehérje sejtmagi importja aktív, szabályozott folyamat. A sejtmagba való bejutáshoz a moesin egy kéttagú NLS szekvenciát használ, amelyet korábban a laboratóriumunkban azonosítottunk. A különböző fajokból származó fehérjék NLS szekvenciáinak többszörös illesztésével és összehasonlításával kimutattuk, hogy a moesinben azonosított NLS nagyfokú evolúciós konzerváltságot mutat.

Bár tudjuk, hogy a moesin rendelkezik egy funkcionális NLS-sel, a sejtek nyugalmi állapotában a fehérje főként a citoplazmába lokalizálódik, ami arra utal, hogy az NLS aktivitása gátolt, szabályozott. Az egyik lehetséges szabályozási mechanizmus szerint a fehérje magpóruson való átjutását a konformációja szabályozza. Azt találtuk, hogy a moesin nyitott és zárt formája egyaránt képes bejutni a sejtmagba, azonban úgy tűnik, hogy a sejtmagi importhoz az inaktív, zárt forma a preferált.

Ezután megvizsgáltuk, hogy az F-aktin kötése szerepet játszik-e a moesin sejtmagi importjának szabályozásában, és arra a következtetésre jutottunk, hogy a filamentáris és monomer aktin mennyiségének aránya a sejtben nincs jelentős hatással a moesin sejten belüli lokalizációjára.

Egy másik, szintén FERM domént tartalmazó fehérjében, a merlinben azonosítottak egy régiót, amely a fehérje citoplazmatikus visszatartásáért felelős. Amikor ezt a régiót összehasonlítottuk a moesin megfelelő szakaszával, nagyfokú hasonlóságot találtunk. Ennek a régióknak a funkcionalitását több módszerrel is vizsgáltuk. E kísérletek eredményei mind azt az elképzelést támasztották alá, hogy a moesin rendelkezik egy működőképes citoplazmatikus retenciós szekvenciával. Megvizsgáltuk ennek a CRS motívumnak a konzerváltságát is, és nagyfokú hasonlóságot találtunk az illesztett szekvenciák között, ami a CRS evolúciós konzerváltságára utal.

A disszertációban bemutatott eredmények alapján felállíthatunk egy modellt a moesin sejtmagi importjának szabályozására. Eszerint a sejtmagi import indukciója nélkül a moesin főként az interfázisos sejtek citoplazmájában található, mivel a fehérje sejtmagi importja erősen gátolt. Ez a gátlás több, egymással párhuzamosan működő mechanizmus révén valósul meg. Bizonyos esetekben azonban, mint például a sejt fokozott transzkripciós aktivitása, a moesin a sejtmagba szállítódik, ahol mennyisége viszonylag magas szintre emelkedik. Ezt a megnövekedett sejtmagi importaktivitást valószínűleg a moesin stressz által kiváltott felszabadulása okozza a CRS-t felismerő citoplazmás faktor kötődése alól, ezáltal a moesin NLS-e hozzáférhetővé válik az importin számára, amely végül a moesint a magpórus komplexen keresztül a sejtmagba szállítja.

TÁMOGATÁS

Ezt a munkát az NKFIH (Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal) támogatta a Nemzeti Biotechnológiai Laboratórium program 2022-2.1.1-NL-2022-00008 keretében.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném kifejezni legmélyebb hálámat témavezetőmnek, Dr. Vilmos Péternek, amiért végigkísért az ehhez a naphoz vezető utamon. Hálás vagyok mindazért a segítségért, amit az évek során mind szakmailag, mind emberileg kaptam tőle.

Rendkívül hálás vagyok Kristó Ildikónak, aki a mentorom volt az első években, és akitől rengeteget tanulhattam a labormunkáról és a tudományos hozzáállásról. Követendő és értékes példa volt számomra.

Köszönetem fejezem ki a Drosophila Sejtmagi Aktin Csoport minden tagjának, név szerint Kristó Ildikónak, Borkúti Péternek, Szabó Anikónak, Abonyi Csillának, Benke Rékának és Pákai Zsófiának az évek során nyújtott segítségükért. Továbbá hálás vagyok a csoport korábbi tagjainak is, különösen Bajusz Csabának.

Szeretnék köszönetet mondani az SZBK-ban működő Mikroszkópos Sejtanalízis Laboratórium minden jelenlegi és volt munkatársának, kiemelten Steinbach Gábornak, Valkonyné Kelemen Ildikónak és Ayaydin Ferhannak, amiért segítettek a mikroszkópos kísérletek tervezésében is kivitelezésében.

Hálás vagyok Hegedűs Zoltánnak (SZBK, Bioinformatikai Csoport) a statisztikai elemzésekhez nyújtott segítségéért és Steinbach Gábornak (SZBK, Mikroszkópos Sejtanalízis Laboratórium) amiért segített a disszertációban bemutatott FRAP adatok elemzésében.

Köszönöm szépen Csordás Gábornak (SZBK) és Villányi Zoltánnak (SZTE), hogy elvállalták a dolgozatom bírálását a házi védeésre és hogy észrevételeikkel, javaslataikkal és tanácsaikkal segítettek a doktori disszertációm minőségének javításában.

Ez a törekvés nem valósulhatott volna meg a családom feltétel nélküli szeretete és támogatása nélkül. Különösen hálás vagyok Édesanyámnak, Pintér Erikának és Nagymamámnak, Szalma Etelkának, aki általános és középiskolás éveim alatt mindig szakított időt és fáradtságot, hogy segítsen a tanulásban.

REFERENCIÁK

- Bajusz, C., Kristó, I., Abonyi, C., Venit, T., Vedelek, V., Lukácsovich, T., et al. (2021). The nuclear activity of the actin-binding Moesin protein is necessary for gene expression in *Drosophila*. *FEBS J.* 288, 4812–4832. doi: 10.1111/FEBS.15779.
- Batchelor, C. L., Woodward, A. M., and Crouch, D. H. (2004). Nuclear ERM (ezrin , radixin , moesin) proteins : regulation by cell density and nuclear import. 296, 208–222. doi: 10.1016/j.yexcr.2004.02.010.
- Ben-Aissa, K., Patino-Lopez, G., Belkina, N. V., Maniti, O., Rosales, T., Hao, J. J., et al. (2012). Activation of Moesin, a Protein That Links Actin Cytoskeleton to the Plasma Membrane, Occurs by Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) Binding Sequentially to Two Sites and Releasing an Autoinhibitory Linker. *J. Biol. Chem.* 287, 16311. doi: 10.1074/JBC.M111.304881.
- Bergquist, J., Gobom, J., Blomberg, A., Roepstorff, P., and Ekman, R. (2001). Identification of nuclei associated proteins by 2D-gel electrophoresis and mass spectrometry. *J. Neurosci. Methods* 109, 3–11. doi: 10.1016/S0165-0270(01)00395-8.
- Dopie, J., Skarp, K. P., Rajakylä, E. K., Tanhuanpää, K., and Vartiainen, M. K. (2012). Active maintenance of nuclear actin by importin 9 supports transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, E544–E552. doi: 10.1073/PNAS.1118880109/SUPPL_FILE/PNAS.1118880109_SI.PDF.
- Fehon, R. G., McClatchey, A. I., and Bretscher, A. (2010). Organizing the cell cortex: The role of ERM proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 276–287. doi: 10.1038/nrm2866.
- Fievet, B. T., Gautreau, A., Roy, C., Del Maestro, L., Mangeat, P., Louvard, D., et al. (2004). Phosphoinositide binding and phosphorylation act sequentially in the activation mechanism of ezrin. *J. Cell Biol.* 164, 653. doi: 10.1083/JCB.200307032.
- Fornerod, M., Ohno, M., Yoshida, M., and Mattaj, I. W. (1997). CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* 90, 1051–1060. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80371-2.
- Fu, H., Subramanian, R. R., and Masters, S. C. (2000). 14-3-3 P ROTEINS : Structure , Function , and Regulation.
- Hung, M., and Link, W. (2011). Protein localization in disease and therapy. doi: 10.1242/jcs.089110.
- Kaffman, A., and O’Shea, E. K. (1999). Regulation of Nuclear Localization: A Key to a Door. 291–339.
- Kaul, S. C., Kawai, R., Nomura, H., Mitsui, Y., Reddel, R. R., and Wadhwa, R. (1999). Identification of a 55-kDa ezrin-related protein that induces cytoskeletal changes and localizes to the nucleolus. *Exp. Cell Res.* 250, 51–61. doi: 10.1006/EXCR.1999.4491.
- Kelsch, D. J., and Tootle, T. L. (2018). Nuclear Actin: From Discovery to Function. *Anat. Rec.* 301, 1999–2013. doi: 10.1002/ar.23959.
- Kressel, M., and Schmucker, B. (2002). Nucleocytoplasmic transfer of the NF2 tumor suppressor protein merlin is regulated by exon 2 and a CRM-1 dependent nuclear export signal in exon 15. *Hum. Mol. Genet.* 11, 2269–2278. doi:

10.1093/hmg/11.19.2269.

- Kristó, I., Bajusz, C., Borsos, B. N., Pankotai, T., Dopie, J., Jankovics, F., et al. (2017). The actin binding cytoskeletal protein Moesin is involved in nuclear mRNA export. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1864, 1589–1604. doi: 10.1016/j.bbamcr.2017.05.020.
- Li, X., Shou, W., Kloc, M., Reddy, B. A., and E, D. (1994). Cytoplasmic Retention of Xenopus Nuclear Factor 7 before the Mid Blastula Transition Uses a Unique Anchoring Mechanism Involving a Retention Domain and Several Phosphorylation Sites. 124, 7–17.
- Mattaj, I. W., and Englmeier, L. (1998). Nucleocytoplasmic transport: The soluble phase. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 265–306. doi: 10.1146/annurev.biochem.67.1.265.
- Melendez-Vasquez, C. V., Rios, J. C., Zanazzi, G., Lambert, S., Bretscher, A., and Salzer, J. L. (2001). Nodes of Ranvier form in association with ezrin-radixin-moesin (ERM)-positive Schwann cell processes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 1235. doi: 10.1073/PNAS.98.3.1235.
- Nakamura, F., Amieva, M. R., and Furthmayr, H. (1995). Phosphorylation of threonine 558 in the carboxyl-terminal actin-binding domain of moesin by thrombin activation of human platelets. *J. Biol. Chem.* 270, 31377–31385. doi: 10.1074/jbc.270.52.31377.
- Polosello, C., Delon, I., Valenti, P., Ferrer, P., and Payre, F. (2002). Dmoesin controls actin-based cell shape and polarity during *Drosophila melanogaster* oogenesis. *Nat. Cell Biol.* 4, 782–789. doi: 10.1038/NCB856.
- Rothwarf, D. M., Zandi, E., Natoli, G., and Karin, M. (1998). IKK- γ is an essential regulatory subunit of the I κ B kinase complex. *Nature* 395, 297–300. doi: 10.1038/26261.
- Vilmos, P., Jankovics, F., Szathmári, M., Lukácsovich, T., Henn, L., and Erdélyi, M. (2009). Live imaging reveals that the *Drosophila* actin-binding ERM protein, moesin, co-localizes with the mitotic spindle. *Eur. J. Cell Biol.* 88, 609–619. doi: 10.1016/J.EJCB.2009.05.006.
- Wang, R., and Brattain, M. G. (2007). The maximal size of protein to diffuse through the nuclear pore is larger than 60 kDa. *FEBS Lett.* 581, 3164–3170. doi: 10.1016/j.febslet.2007.05.082.
- Weis, K. (1998). Importins and exportins: How to get in and out of the nucleus. *Trends Biochem. Sci.* 23, 185–189. doi: 10.1016/S0968-0004(98)01204-3.
- Zhu, J., and McKeon, F. (1999). NF-AT activation requires suppression of Crm1-dependent export by calcineurin. *Nature* 398, 256–260. doi: 10.1038/18473.