

MTA doktori értekezés tézisei

**A CITOSZKELETÁLIS MOESIN FEHÉRJE  
SEJTMAGI TRANSZPORTJA ÉS FUNKCIÓJA**

Dr. Vilmos Péter



HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont  
Genetikai Intézet

Szeged  
2026



## BEVEZETÉS

A sejtmagot már több mint 300 évvel ezelőtt Leeuwenhoek leírta, de rendkívüli összetettsége miatt ma is az egyik legkevésbé ismert sejtszerv. Az inside-out evolúciós modell szerint a sejtmag egy archea sejt maradványa, amely az évmilliók során kitüremkedéseivel lassan körbezárta a vele szimbiózisban élő baktériumokat, a későbbi mitokondriumot és kloroplasztiszt. Ehhez az archeának a citoszkeleton egyszerűbb formájára szüksége volt, így a sejtmag és a citoszkeleton evolúciója kölcsönösen függött egymástól, tehát párhuzamosan történt. Ezek után nem lehet meglepő, hogy a mai eukarióták sejtmagjában is jelen vannak a citoszkeleton elemei. Az utóbbi évek kutatásai áttörést hoztak ennek igazolásában az archea domén egy új törzsének, a Promethearchaeota egysejtűek felfedezésével, és megerősítették a párhuzamos fejlődés elméletét. A Promethearchaeota archeák osztályai közül a riboszómális fehérjék génjeinek filogenetikai elemzése alapján a Heimdallarcheia osztály annyira szorosan az eukarióták közelébe térképeződik, hogy igen nagy valószínűséggel ennek az osztálynak a képviselőjéből fejlődtek ki az eukarióták 2,7 milliárd évvel ezelőtt.

A citoszkeletális fehérjék közül az aktin a legősibb, legkonzerváltabb fehérje, amely már a prokarióták és eukarióták közös őseiben is jelen volt, s amely így nyilvánvalóan ősidők óta a sejtmagi struktúráknak is része lehetett. Az elmúlt két évtizedben végzett kutatások meggyőző bizonyítékot szolgáltatottak az aktin sejtmagi jelenlétére és az ott játszódó alapvető folyamatokban való részvételére. A sejtmagi aktinnal kapcsolatban ma már az is elfogadott tény, hogy a fehérje citoplazmatikus és sejtmagi készletei funkcionálisan kapcsolódnak egymáshoz és folyamatosan cserélődnek. Mai ismereteink szerint ezt az aktin aktív magi importja és exportja biztosítja, melyek transzportinok által végzett, szabályozott folyamatok. A sejtmagban az aktin monomer és polimer formában egyaránt jelen van, és mindkét forma alapvető magi események, így például a génátírás, DNS hibajavítás, kromatin átrendezés vagy a replikáció nélkülözhetetlen szereplője.

Az eukarióták az aktin sokoldalúságát, szemben a prokariótákkal, aktinkötő fehérjék segítségével terjesztették ki, így az eukarióta aktin sejtmagi aktivitását is aktinkötő fehérjék biztosítják, melyek közül a miozinok és forminok magi tevékenysége a legintenzívebben kutatott napjainkban. Az aktinkötő fehérjék egyik ősi és széles körben elterjedt csoportja az evolúciósan konzervált Ezrin-Radixin-Moesin (ERM) fehérjecsalád, amely a többsejtű állatokban (metazoákban) fordul elő, és amelynek *Drosophilában* meglévő egyetlen képviselője jelen értekezés tárgya. Az általánosan elfogadott nézet szerint az ERM fehérjék a citoplazmában működnek, ahol sejtmembrán fehérjéket horgonyoznak a membrán alatti,

kortikális aktinhálózathoz. Működésük általában nélkülözhetetlen a sejt vagy a szervezet számára, így hiányuk emberi betegségekkel is összeköthető, például daganatok progressziójával és áttétképzésével, immunhiányos állapottal, a cochleáris szőrsejtek sztereocíliáinak fenntartási zavara miatti halláscsökkenéssel, valamint podociták diszfunkciója és proteinuria okozta vesebetegségekkel. Mindezek miatt az ERM fehérjék kutatása az elmúlt három évtizedben folyamatos volt.

Az ERM fehérjék nyilvánvaló fontossága és régóta folyó vizsgálata ellenére a sejtmagi jelenlétük és tevékenységük alig ismert, noha nyilvánvalóan új távlatot nyithatna a szakterületen. Mindez annak ellenére van így, hogy az első megfigyelés arról, hogy egy ERM fehérje a sejtmagban is jelen lehet, már 25 évvel ezelőtt megtörtént az Ezrinnel kapcsolatban. Később proteomikai és immuncitokémiai vizsgálatok is kimutatták az emberi ERM fehérjék, valamint a *Drosophila* egyetlen ERM-jének a jelenlétét a magban. Az ERM fehérjék nagy családjáról, a FERM domént tartalmazó fehérjékről pedig laboratóriumunk írta le a közelmúltban, hogy néhány kivételtől eltekintve mindegyiküknél megfigyeltek sejtmagi lokalizációt, sőt többük esetében az NLS motívumot is azonosították már.

## A TUDOMÁNYOS PROBLÉMA

Értekezésemben az elmúlt másfél évtizedben elért eredményeink egy részét ismertetem. Ezek a sejtbiológia egy új és izgalmas megfigyelésének, az eukarióták citoszkeletális fehérjéinek a sejtmagban való jelenléte kapcsán felmerült alapvető kérdések megválaszolásához igyekeztek hozzájárulni. A terület három, egymással összefüggő, alapvető kérdésére összpontosítottunk. 1) A sejtvázelemek magi transzportja milyen mechanizmus(ok) és szabályozás révén valósulhat meg? 2) A sejtvázfehérjék magi működését (részben ezért) nem lehet meggyőzően szétválasztani az egyébként sokszor alapvetően fontos citoplazmás funkcióiktól. Ennek ellenére lehet-e valami módon közvetlen bizonyítékot szolgáltatni arra, hogy a sejtmagi jelenlétük fontos? 3) Ezidáig kevés kézzelfogható adat és mechanisztikus modell áll rendelkezésre a citoszkeletális fehérjék sejtmagi tevékenységéről. Mi lehet ezek sejtmagi funkciója?

Munkánkban egy ősi aktinkötő fehérje, a Moesin esetében próbáltunk választ adni ezekre a kérdésekre. A kísérletek kivitelezéséhez a *Drosophila melanogaster*t használtuk modellnek, és mivel a fehérje evolúciósan rendkívüli mértékben konzervált, így eredményeink minden bizonnyal általános tanulsággal is szolgálnak.

## EREDMÉNYEK

### 1. A MOESIN SEJTMAGI JELENLÉTE

A *Drosophila* Moesin az emlősök háromtagú Ezrin-Radixin-Moesin (ERM) fehérjecsaldájának egyedüli képviselője a muslicában. Minthogy az ERM fehérjék ráadásul nagyfokú konzerváltságot is mutatnak, így kutatásukra a funkcionális redundancia hiánya miatt a muslica régóta használt modellszervezet. Az ERM fehérjék, így a *Drosophila* Moesin is membránfehérjék lokalizációját és a sejtalak változásait segíti a citoplazmában. Észrevettük azonban, hogy a fejlődő, korai *Drosophila* embriókban a Moesin a kialakuló ivarsejtek magjában nagy mennyiségben észlelhető, és hogy ez a jelenség később, a cellularizációt követően a testi sejtekben is megfigyelhető. Ez az első olyan saját, ráadásul *in vivo* eredményünk volt, ami egyértelműen mutatta, hogy a fehérje a sejtmagban is jelen van.

#### **A *Drosophila* Moesin a sejtosztódás során**

Tekintve, hogy a korai *Drosophila* embrióban folyamatosan, nagy sebességgel zajlik a sejtosztódás, és hogy a testi sejtekben a Moesin sejtmagi eloszlása időnként orsószerű alakot mutatott, joggal merült fel, hogy ezek a sejtek valójában osztódnak, és hogy a nagyobb mennyiségű sejtmagi Moesin csak a mitózist megelőző pillanatot jelenti. Ezért ezt a jelenséget részletesebben is tanulmányozni kezdtük. Élőmikroszkópiás filmezés segítségével megállapítottuk, hogy a Moesin az interfázis során kis mennyiségben van jelen a sejtmagokban, azonban a sejtosztódás megindulásakor, a profázisban a magi szintje rendkívül gyorsan megnövekszik, majd a metafázisban együtt lokalizál a mitotikus orsóval. A mitózis végén, a telofázisban kialakuló utódsejtmagokba végül a kromatinhoz kötődve kerül be a fehérje. A további kísérleteink azt is igazolták, hogy a mitózisban a Moesin az aktinnal együtt már a mikrotubulus orsó létrejöttét megelőzően egy olyan szerkezetnek, az úgynevezett orsómátrixnak része, amely alapot biztosít a mikrotubulus orsó felépüléséhez, valamint hogy a Moesin ezen funkciójának hiánya mitotikus rendellenességekhez vezet.

#### **A *Drosophila* Moesin az interfázisos sejtmagban is jelen van**

Az interfázisos sejtmagban a Moesin eloszlása specifikus mintázatot mutat, és a mennyisége is szabályozott. A fehérje a kromoszómákon sávozott mintában található, míg a nukleoplazmában egyenletesen oszlik el, a magvacskából pedig néhány esettől eltekintve hiányzik. A transzkripció általános fokozódása, így például hő sokk, hormonindukció vagy az

mRNS export elakadása a Moesin sejtmagi mennyiségét látványosan megnöveli, ami a szabályozott importja mellett a lehetséges funkcióira, azaz a transzkripcióban és/vagy az mRNS exportban való részvételére utal.

## **2. A MOESIN SEJTMAGI FUNKCIÓJA**

### **A Moesin a kromoszómákon az aktív transzkripció helyein van jelen**

A *Drosophila* lárvák nyálmirigyének jól jellemzett, politén óriáskromoszómáit használva megállapítottuk, hogy a Moesin a kromoszómák lazán csomagolt, transzkripcióban aktív régióiban van jelen. Az ekdizon vedlési hormon vagy hőshock hatására aktiválódó gének a politén kromoszómákon rendkívül magas transzkripcióban aktivitású, speciális eukromatikus régiókat, úgynevezett kromoszómapuffokat alakítanak ki. Hormon- vagy hőshock-kezelés után a Moesin magas szintre halmozódik fel a megfelelő puff helyeken, újabb bizonyítékát adva ezzel a génátírásban való részvételére.

Az RNS-polimeráz II (Pol2) proteaszómális lebomlásával és a transzkripció komplexének következtében történő szétesésével együtt a Moesin is leválik a kromoszómákról, jelezve, hogy jelenléte a transzkripciótól függ. Az egyik hőshock génen, a *Hsp70Ab*-n elvégzett kromatin immunprecipitáció is azt mutatta, hogy a Moesin kötődik a kromatinhoz, és a kromatinhoz kötött mennyisége korrelál a gén aktivitásával, ami szintén azt igazolja, hogy a Moesin részt vesz a génkifejeződésben.

### **A Moesin nem vesz részt a génátírás elindításában vagy leállításában**

A Moesin kromoszómák mentén történő eloszlásának összehasonlítása a Pol2 iniciációra és elongációra jellemző aktív formáinak lokalizációs mintázatával azt bizonyította, hogy a Moesin eloszlása nem az iniciációval hanem az elongációval korrelál. Ezt megerősítette a bábozódásra készülő, késői harmadik stádiumos lárvák jól jellemzett transzkripció programját tükröző kromoszómapuff-képződési állapotok vizsgálata. Mindezek alapján megállapítható volt, hogy a Moesin nem vesz részt az iniciációban, de szerepet játszik az elongációban és/vagy az elongációval kapcsolt vagy azt követő transzkripció terminációban, pre-mRNS érésben vagy mRNS-exportban. Változatos technikákat alkalmazva a következőkben azt is kimutattuk, hogy a Moesin csendesítésének nincsen hatása a transzkripció aktivitására, a poliA farok hosszára, továbbá nem mutat kolokalizációt a sejtmagi splicing foltokkal. Vagyis közvetlenül nem vesz részt a transzkripcióban, a poliadenilációban és a splicing-ban sem.

## **A Moesin az mRNP komplexek része**

A kromoszómapreparátumokban a Moesin festés a kromatinon kívüli pöttyös mintázatot ad. Ezek a Moesin által jelölt apró foltok mRNP szemcséknek bizonyultak, melyek az mRNS feldolgozása és szállítása céljából, RNS-kötő fehérjék révén létrejövő dinamikus molekula komplexek. Minthogy az mRNS-export fehérjék hiánya a Moesin magi felhalmozódását okozza, mindez azt jelzi, hogy a sejtmagban a Moesin az mRNP komplexek új tagja, és ezáltal részt vesz az mRNS-exportban. Koimmunoprecipitációs kísérletsorozat feltárta a Moesinnek a Nup98, Rae1, PCID2, CG6694 és CG2685 nevű mRNS export faktorokkal való fizikai kölcsönhatását, így kijelenthető, hogy az mRNS exporttal szoros, fizikai kapcsolatban áll. Mivel a Moesin FERM doménje, melyből hiányzik az F-aktint kötő motívum, önállóan is képes az export faktorokkal való kapcsolatra, a sejttagon belüli lokalizációs mintázata pedig megegyezik a teljes hosszúságú fehérjével, ráadásul az aktin depolimerizálása nem befolyásolja a lokalizációját, ezért eléggé valószínű, hogy a Moesin nem csak az F-aktin kötése révén van jelen ezekben a komplexekben. Az, hogy a Moesin aktivitásának csökkenése a poliA mRNS-ek jelentős magi felhalmozódását eredményezi, újabb bizonyítékát adta, hogy a *Drosophila* ERM fehérje a sejtmagi mRNP-k tagjaként az mRNS export normális működéséhez szükséges.

## **A Moesin a Mediator komplex tagja**

A Moesin sejtmagi tevékenysége mögött meghúzódó molekuláris mechanizmus(ok) részletesebb megismerése érdekében új megközelítést alkalmaztunk, és a sejtmagi kötőpartnereit kívántuk azonosítani. Az azonosításkor a GFP-vel vagy HA-epitóppal jelölt, Moesin által lehúzott és LC-MS/MS analízissel meghatározott fehérjék között nagy számban szerepeltek azok, amelyekről már ismert, hogy részt vesznek az mRNS-érésben és exportban. A legjobb 50 találat jelentős része a kromatin átrendezés vagy az rRNS gének átírásának és a riboszóma biogenezisnek szereplője, ami azt jelzi, hogy annak ellenére, hogy a magvacskában csak időnként láttuk a Moesin jelenlétét, mégis szerepet játszhat ezekben a folyamatokban is. Ugyanebben a kísérletben a fent említett faktorok mellett a Mediator komplex szinte minden tagját lehúzta a Moesin. Összetételét és szerkezetét tekintve a Mediator egy erősen konzervált, több alegységből álló, nagyméretű fehérjekomplex az eukariótákban, amelynek egyik fő feladata, hogy elősegítse a pre-iniciációs komplex kialakulását. De ezen kívül fontos szerepet játszik a transzkripció elongációjában, terminációjában és a transzkripció utáni lépésekben is, például az mRNS-exportban, mindezek koordinálásával. Többféle, független módszer

alkalmazásával igazoltuk, hogy a Moesin a Mediator komplex tagjaival együtt lokalizál a kromoszómákon, és közvetlen fizikai kölcsönhatásba lép a Med15 és Med17 alegységekkel. A Med15 esetében *in vivo* kísérletek is megerősítették a közvetlen fizikai kölcsönhatást, amiből arra következtettünk, hogy a Moesin a Med15 farok alegységén keresztül alkotórésze a Mediator komplexnek.

### **A Moesin-Med15-Hsf komplex szükséges a megfelelő Hsp génexpresszióhoz**

Figyelembe véve a Moesin és a Med15 esetében megfigyelt fizikai kölcsönhatást és együttes lokalizációt a hősokk puffokban, megvizsgáltuk lehetséges szerepüket a hősokk gének transzkripciójában. Ismert volt, hogy az élesztő Heat Shock Factor 1 (Hsf1) fehérjéje közvetlenül kötődik a hősokk fehérjéket kódoló *Hsp* gének promóterében található, úgynevezett hősokk elem (HSE) régiókhöz és elősegíti a Mediator komplex HSE régiókhöz való csatlakozását azáltal, hogy közvetlenül köti a farokdomén Med15 alegységét. Ezért először igazoltuk, hogy a *Saccharomyces* esetében tapasztalt helyzethez hasonlóan a *Drosophila* Med15 és a Hsf1 *Drosophila* homológja, a Hsf is fizikai kölcsönhatásba lépnek. Ugyanakkor eredményeink arra utalnak, hogy a Med15 inkább a *Hsp* génkifejeződés alapvető működésének fenntartásában vesz részt, nem pedig a hősokkra adott válaszban.

Mivel a Moesin aktinkötő fehérje, ezért ezt követően arra kerestük a választ, hogy a Moesin-Med15-Hsf komplex tartalmaz-e aktint. Az aktin a magi komplexekben elsősorban monomer formában van jelen, ezért a kísérletekben az aktin polimerizálódásra nem képes pontmutáns formáját használtuk. Mind a Med15, mind a Hsf esetében igazolódott a monomer aktinnal való kapcsolat. Meglepetésünkre a Moesin is mutatott interakciót a G-aktinnal, jelezve, hogy az általános szemlélettel ellentétben az F-aktinon kívül képes az aktin monomer formáját is megkötni, amit egyébként a humán Ezrin esetében korábban már felvetettek. Aktin jelenlétét a Mediator komplexben még nem közölték, bár irodalmi adatok utalnak arra, hogy a polimerizált aktin kötődik a *Saccharomyces cerevisiae* és *Xenopus laevis* Mediator komplexéhez. Minthogy a Moesin, mint az ERM család tagja, elsősorban F-aktint kötő fehérjeként ismert, a kísérleteket megismételtük az aktin vad típusú, polimerizálható formájával is, és azt találtuk, hogy az oligomer forma mellett az aktin polimer formái is jelen lehetnek a Moesin-Med15-Hsf komplexben. Sőt, a Med15 esetében F-aktin hálózatra emlékeztető fluoreszcencia mintázat is megfigyelhető volt a sejtmagban, ami arra utal, hogy a Mediator komplex szoros kapcsolatban állhat a sejtmagi F-aktin hálózattal. Összefoglalásként megállapíthattuk, hogy a Moesin-Med15-Hsf együtt közös komplexet alkot

a *Hsp* gének átírását végző Mediator formában, és az aktin oligomer és polimer formái egyaránt jelen vannak a Moesin-Med15-Hsf komplexben. A Moesin jelenléte a hősokk gének szabályozó régióin a Med15-től függ, és ezek *in vivo* kölcsönhatása nagy valószínűséggel szerepet játszik a *Hsp* gének szabályozásában.

### **A Moesin kötődése a Mediator komplexhez evolúciósan konzervált**

Mivel a Med15-Hsf kölcsönhatás élesztő gombában is létezik, és a Moesin-Med15-Hsf komplex minden tagja evolúciósan erősen konzervált, megvizsgáltuk, hogy a Moesin és a Mediator komplex közötti kölcsönhatás specifikus-e a *Drosophilára*, vagy esetleg más fajokban is létezik. A humán ERM fehérjékkel és Med15-tel végzett vizsgálataink azt jelezték, hogy a Moesinnek a Med15 alegységen keresztüli kötődése a Mediator komplexhez evolúciósan konzervált jelenség.

### **3. A SEJTMAGI MOESIN ÉLETTANI JELENTŐSÉGE**

Ahhoz, hogy a Moesin sejtmagi tevékenységének mélyebb részleteit, és főleg, hogy annak biológiai jelentőségét megismerjük, egy olyan állatot hoztunk létre, amely a sejtmagi Moesinre „mutáns”, azaz Moesinmentes magokkal rendelkezik, míg közben a fehérje citoplazmatikus működése ép marad. Mivel a Moesin sejtmagból való kizárásához ismernünk kellett volna a sejtmagi importjának mechanizmusát, és célzottan a sejtmagban való gátlása vagy lebontása sem bizonyult lehetségesnek, ezért a fehérjét egy nukleáris exportjellel (NES) szereltük fel, amely biztosította a folyamatos eltávolítását a sejtmagból.

#### **A sejtmagi Moesin hiánya változatos fenotípusokat okoz**

A sejtmagi Moesinre „mutáns”, azaz Moesinmentes magokkal rendelkező állat létrehozásához a fehérjét *in situ* megjelöltük egy sejtmagi export szekvenciával (NES) a CRISPR-Cas9 technológia segítségével, és az X kromoszómán így létrejött mutáns gént *Moe<sup>NES</sup>*-nek neveztük. A Moesin teljes hiánya letalitást okoz a harmadik lárvastádiumban, ezzel szemben a *Moe<sup>NES</sup>* mutáns állatok életképesek, ami arra utal, hogy a fehérje citoplazmatikus funkciói legalább nagyrészt érintetlenek. Megerősítésként további kísérletekkel is igazoltuk, hogy a Moesin fehérje mennyisége, foszforiláció általi aktiválása és citoplazmatikus lokalizációja a mutáns állatokban normális. A *Moe<sup>NES</sup>* mutáns hímek és nőstények ugyan életképesek és termékenyek voltak, azonban számos fenotípust mutattak. Ezek közül a lassú fejlődés, csökkent élettartam, petetermelés és mászóképeség, valamint a

hímek nemi szervének elforgása zigotikus eredetűek voltak. A *Moe<sup>NES</sup>* nőtények F1 leszármazottaiban megjelent fenotípusok ugyanakkor anyai hatásúak, függetlenek az utód genotípusától. Ezek közül a látható fenotípusok a tergit fejlődési és pigmentációs hibái, extra szőrszálak, szárnyfejlődési rendellenességek, valamint sötét és rögös felületű szemek. Az anyai hatásra csökevényessé vált belső nemi szervek pedig sterilitást okoztak mind a hím, mind a nőstény utódok esetében.

### **A transzkriptomanalízis megváltozott génexpressziót tár fel a *Moe<sup>NES</sup>* mutánsokban**

Mivel a mutáns nőtények utódai változatos anyai hatású fenotípusokat mutattak, és a petefészkek rendkívül aktív génműködés helye, a *Moe<sup>NES</sup>* anyák petefészkein mRNS-Seq analízist végeztünk. A vizsgálat azt igazolta, hogy a *Moe<sup>NES</sup>* mutánsok fenotípusainak háttérében megváltozott génexpressziós mintázat áll. A vadtypushoz képest megközelítőleg ugyanannyi megváltozott expressziójú gén felül- (371) vagy alulszabályozott (315) a mutánsban. A felülszabályozott gének transzkripció változásai a citoplazmát, sejtmembránt és az extracelluláris mátrixot érintik, míg az alulszabályozott gének esetében a sejtmagi és sejtmag+citoplazmatikus gének a gyakoriak.

A felülszabályozott gének közül a fejlődés három kulcsfontosságú szabályozója, a *vasa*, a *Notch* és a *dpp* jelentős génexpressziós változást mutatott, ami önmagában is magyarázhatja a mutánsok fejlődési rendellenességeit és meddőségét. A felülszabályozott csoportban is azonosítottunk olyan géneket, amelyek a normál mozgási aktivitásért felelnek. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a fenotípusok mögött meghúzódó biológiai folyamatokat károsítják a *Moe<sup>NES</sup>* mutánsokban közvetlenül érintett génprogram változások.

### **A sejtmagi Moesin a hősokk gének transzkripciójához szükséges**

A *Moe<sup>NES</sup>* mutánsban alulszabályozott expressziójú gének legjobb találati között hat gén, köztük az általunk korábban már vizsgált *Hsp70Ab* kódoló hősokk-indukálható fehérje chaperonokat. Ennek megfelelően igazoltuk, hogy a Moesin sejtmagi funkciójának hiánya a *Moe<sup>NES</sup>* mutánsok csökkent hőstressz-tűrését okozza: magas és alacsony hőmérséklet egyaránt csökkenti a mutáns élethosszát. Ugyanakkor a hőstressz nincs hatással a mászási aktivitásra, vagyis a károsodott *Hsp* expresszió nem járul hozzá a mutáns mozgásszervi problémáihoz. Igazoltuk azt is, hogy a Moesin erőteljes jelenléte a hősokk által indukált kromozómapuffokban nem a puffszerkezet kialakításához szükséges, hanem közvetlenül a

hősokk gének működéséhez, ami pedig egybevág a Mediator komplex vizsgálata kapcsán tett megállapításunkkal.

#### **4. A MOESIN SEJTMAGI TRANSZPORTJA**

##### **A Moesin NLS-függő, szabályozott aktív importtal kerül a sejtmagba**

Az eddig ismertetett munkákkal párhuzamosan folyamatosan dolgoztunk a Moesin sejtmagi transzportmechanizmusának, elsősorban importjának megismerésén is. Az első eredményeink még ugyan arra utaltak, hogy a Moesin a mitózis során passzívan bezáródva kerül be a sejtmagba, azonban mivel a későbbi kísérleteink azt is igazolták, hogy a sejtmagban fel tud halmozódni, és hogy a funkciója az mRNA exporthoz köthető, egyértelművé vált, hogy szabályozott importjának is kell lennie. Így végül azonosítottunk egy kéttagú, klasszikus NLS szekvenciát ( $KR_{X13}RRRK_{297}$ ), amely felelős a fehérje sejtmagba jutásáért. A Moesin NLS szekvenciája mellett közvetlenül található tirozin (Y292) és treonin (T300) aminosavak foszforilációs állapota nincs hatással a sejtmagi importra, nem részei az NLS működésének.

##### **A sejtmagi import szabályozása**

Az ERM fehérjék aktivitása a citoplazmában a konformációjuk által szabályozódik. A fehérje kinyílását, így aktiválódását foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát (PIP2) kötődése indukálja, melyet egy C-terminális treonin (T<sub>559</sub> a *Drosophila* Moesinben) foszforilációja követ, ami stabilizálja a nyitott konformációt. Ugyan a korábbi kísérletekben az NLS részeként meghatározott  $KR_{279-280}$  motívumban lévő lizin az egyik PIP2 kötőhely tagja, de a  $KR_{279-280}$  hiánya nem a PIP2 hiánya miatt gátolja a magba szállítódást, hanem azért, mert az  $RRRK_{294-297}$  aminosavakkal együtt a sejtmagi importért felelős motívumot alkot, így tehát a Moesin NLS-e valóban kéttagú. Az, hogy a PIP2 kötődése nem szükséges az importhoz, felveti azt is, hogy a fehérje aktiválása sem szükséges a magba jutáshoz. Ezt egyértelműen igazolja, hogy a nem foszforilálható forma is a magba tud transzportálódni, míg a foszforilációért felelős kináz hiánya pedig megnövekedett importot okoz.

A nyílt, aktivált Moesin gyenge sejtmagi importja az aktin citoskeleton és a Moesin közötti kapcsolattal is magyarázható, amely gátolja a magba jutást. Azonban az F-aktin mennyiségétől független a Moesin importja, azaz nem a hozzá való kötődés gátolja az aktivált Moesin magba jutását. Ráadásul a Moesin csonka formája, amelyből hiányzik a C-terminális F-aktinkötő domén és így zárt konformációt sem tud kialakítani, nem tudott bejutni a sejtmagba az import indukálásakor, ami további bizonyítékot szolgáltat arra, hogy nem

egyszerűen az F-aktin tartja vissza a Moesint a citoplazmában, hanem a zárt konformáció szükséges az importhoz. Ez az eredmény egyébként összhangban van azzal a mások által már korábban leírt megfigyeléssel, hogy az ERM-ek legközelebbi rokona, a Merlin/NF2 is a zárt konformációjú állapotában jut be a sejtmagba.

### **Az NLS a környező régióval együtt evolúciósan erősen konzervált**

Az NLS-t körülvevő régió összehasonlítása meglepően magas konzerváltságot mutat ki a szivacsoktól az emberi ERM-ekig. Nem csak az NLS-motívum két része, hanem a köztük lévő távolság, valamint közvetlen környezetük, sőt az itt található két foszforilálható aminosav jelenléte és elhelyezkedése is minden vizsgált fehérjében azonos, ami megerősíti, hogy működőképes motívumról van szó. Érdekes módon az NLS-sel ellentétben az NLS2 motívum, amelyet korábban emberi sejtekben az importért felelősnek találtak, a kísérleteink szerint nem szükséges az importhoz, és csak gyenge konzerváltságot mutat, ezzel erősen kétségbe vonva a motívum működőképességét.

### **Az NLS önmagában nem elég a magi importhoz**

Az a megfigyelésünk, hogy az NLS önmagában gyengén működik, arra utalt, hogy az importhoz és sejtmagi felhalmozódáshoz más is szükséges. Ez felveti, hogy az NLS valójában térbeli, azaz a fehérje más részén levő motívum, aminosav, esetleg másodlagos módosítás az NLS-hez térben közel helyezkedik el és jelentősen megnöveli annak hatékonyságát. Ez annál is inkább valószínű, mert a korábbi eredményeink arra utaltak, hogy a Moesin zárt konformációja szükséges az importhoz.

### **Egy rendezetlen szerkezetű szakasz savas aminosavai is szükségesek az NLS működéséhez**

Ezért megvizsgáltuk a Moesin zárt állapotú térszerkezetét, és így azonosítottunk egy kb. 50 aminosavas rendezetlen régiót (IDR) a fehérjében, amely a zárt konformáció esetén térben az NLS közelébe kerül. Az IDR ugyan nem fázisszeparál, de más fajok ERM fehérjeinek teljesen más szekvenciájú IDR-je hatékonyan helyettesíteni tudja a magi import szempontjából, azaz tartalmaz valamit, ami konzervált és az NLS működéséhez szükséges. Az IDR-ben azonosított, kismértékű konzerváltságot mutató foszforilációs helyek, az STT<sub>463</sub> és az S<sub>490</sub> nem felelősek az importot segítő funkcióért, ellenben egy konzervált, savas

aminosavakból álló folt (EDENENEEEE<sub>482</sub>) szükséges ahhoz. Eredményünket támogatja egy korábbi közlemény is, amelyben az ERM fehérjékkel szoros rokonságot mutató humán P4.1 fehérje NLS motívumának hatékony működéséhez szükségesnek találtak egy tőle kb. 400 aminosavnyi távolságban levő, savas aminosavakból álló foltot (EED<sub>249</sub>) is.

### **Citoplazmatikus retenció is szabályozza az NLS működését**

Az IDR vizsgálatával párhuzamosan a Moesin sejtmagi importdinamikáját is elemeztük. Eszerint a fehérje egyenletes, ám igen kismértékű magba áramlást mutat, amit az import indukciója valamelyest intenzívebbé tesz, de az még így is jelentősen elmarad a GFP vagy az aktin dinamikus magi importjától. Ebből arra következtettünk, hogy a fehérje citoplazmában való visszatartásával is szabályozhatja valami a Moesin sejtmagba jutását.

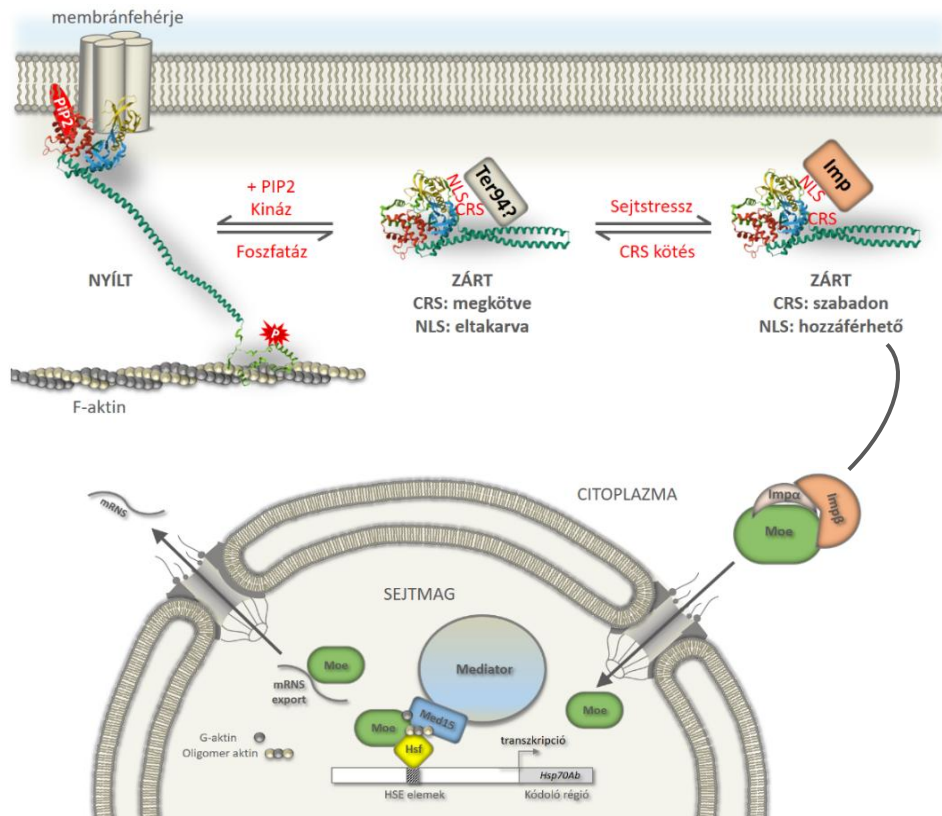
Az ERM fehérjék közeli rokonában, a Merlinben korábban leírt citoplazmatikus retencióért felelős motívum (CRS) nem csak a *Drosophila* Merlinben, hanem a Moesinben is megtalálható. Az ERM fehérjékben mutatott konzerváltság alapján a motívum 24 aminosav hosszúnak bizonyult, a térszerkezeti adatok alapján pedig az is nagyon valószínű, hogy a Moesin esetében a zárt konformációban a CRS az NLS-hez térben közel helyezkedik el. A motívum tíz központi aminosavának eltávolítása drámai módon változtatta meg a Moesin importdinamikáját, rendkívül erős magba áramlást figyelhettünk meg. A CRS ráadásul képes visszatartani a GFP-t a citoplazmában, ami közvetlen bizonyítékát adja a retenciók képességének.

Jelenlegi adataink alapján a CRS legvalószínűbb kötőpartnere, így a Moesin visszatartásért felelős egyik lehetséges faktor a Ter94 chaperon, amely valószínűleg a FERM domén CRS-t tartalmazó F1 lebenyének ubikvitinszerű szerkezetét ismeri fel. A Ter94 minden bizonnyal magának az F1 lebenyek a megkötésével képes az NLS eltakarására és ezáltal a Moesin citoplazmában való visszatartására.

## ÖSSZEFOGLALÁS

Az itt ismertetett munka legfontosabb eredménye a *Drosophila* ERM fehérje sejtmagi importja és tevékenysége mögötti molekuláris mechanizmusok felderítése, és ezek alapján a folyamatok modelljének megalkotása. Az interfázisos, nyugvó sejtek magja kis mennyiségű Moesint tartalmaz. A sejtosztódás megindulásakor ez a mennyiség hirtelen megnő, és a Moesin az aktinnal együtt már a mikrotubulus orsó létrejöttét megelőzően egy olyan szerkezetnek lesz része, amely alapot biztosít az orsó felépüléséhez. Az osztódás során a Moesin az orsó területén található, és jelenléte szükséges a szabályos orsóműködéshez. A sejtosztódás végén a kromoszómákhoz kapcsolódva, mintegy bekebeleződik az újonnan kialakuló sejtmagokba.

Az osztódások között, nyugalomban levő sejtekben a Moesin készletének egy része zárt konformációjú állapotban a citoplazmában található, ahol a CRS motívumot kötő partner, például a Ter94 chaperon tartja fogva, és ezzel az NLS-t is eltakarja. Ebből az állapotból kétféle módon kerülhet ki a fehérje. Egyrészt aktiválódhat és nyitott konformációban a sejtmembrán közelébe kerül, ahol membránfehérjéket horgonyoz az aktin hálózathoz. Másrészt viszont sejtstressz, például hő sokk vagy hormonindukció esetén a chaperon elengedi a Moesint, és ilyenkor az importin kötheti meg azt. Ez a kötődés a zárt konformációban történik és az importinnal való kapcsolatot a jelek szerint a Moesin IDR régiójának savas aminosavai stabilizálják. Az importin által megkötött, zárt konformációjú Moesin végül a sejtmagba szállítható. Mindezek alapján tehát a magi import dinamikájában a konformációs állapot és a CRS-t kötő chaperon aktivitása a döntő. Előbbit a PIP2 jelenléte és a fehérje foszforilációs állapota, tehát a kináz és foszfatáz aktivitások egyensúlya határozza meg, míg az utóbbit valószínűleg a chaperon rendelkezésre állása, esetleg aktiváltsága befolyásolja. Ezáltal tudja a sejt a citoplazmás és a sejtmagi Moesin mennyiségek, azaz végső soron a két funkciója közötti arányt az igényeihez igazítani.



### A citoskeletális Moesin fehérje sejtmagi transzportjának és funkciójának összefoglalása

A sejtmagba jutott Moesin a transzkripcióban, elsősorban a hőshock gének átírásában vesz részt, és a képződő mRNP részecskéknek is alkotórésze. A hőshock gének átírásában való közreműködésének alapja, hogy a Hsf a Hsp70Ab gén promóterének HSE régióihoz kötődik, és ez a kapcsolat a Mediator komplex farokrégiójának Med15 alegységét a promóterhez irányítja. A Moesin közvetlenül kötődik a Med15-höz és a Hsf-hez is, és a Moe–Med15–Hsf együtt egy olyan komplexet alkotnak, amely az aktin monomer és polimer formáihoz egyaránt képes kapcsolódni. Mivel az ERM-fehérjék elsősorban keresztkötő fehérjék, így jó eséllyel a Moesin molekuláris feladata a sejtmagban az lehet, hogy az aktin segítségével stabilizálja a Mediator–Hsf komplexet, ami pedig szükséges a hőshock gének megfelelő kifejeződéséhez. Ugyanakkor a Moesin általunk leírt szerepe az mRNS-exportban valószínűleg szintén hozzájárul a *Hsp* gének megfelelő szintű működéséhez. Az eredményeink alapján az is valószínű, hogy a Moesin–Med15–Hsf kölcsönhatás nemcsak hőshock géneken mehet végbe, hanem szerepet játszhat más gének, például a hormonindukció által szabályozott gének szabályozásában is. Eredményeink alapján az is valószínű, hogy a Moesin és a Mediator a poszttranszkripciós folyamatokban, például az mRNS szerkesztésében és exportjában is együttműködik.

A Moesin NLS-ének hatékony működéséhez a rendezetlen régiójának savas aminosavai is szükségesek. Az IDR-ek legismertebb, leggyakoribb funkciója a fázisszeparálásban való részvétel, azonban a Moesin IDR-je az eredményeink szerint nem fázisszeparál. A feladatával kapcsolatban a munkánk az IDR-nek egy másik, kevésbé magától értetődő feladatát tárták fel, ez pedig az importinnal való kapcsolat stabilizálása, illetve pontosabban szelektívvé tévése. Az NLS közelében levő felülethez ugyanis sok ismert partner, elsősorban membránfehérje képes kapcsolódni, azonban ezek csak a nyitott konformáció esetén kötődhetnek, a zárt konformáció pedig a jelek szerint inkább az importin megkötődését teszi lehetővé. A zárt konformációban az IDR a FERM domén közelébe kerül, így az IDR végső soron az egyéb partnerek kötését akadályozza, az importin kötődését pedig egyúttal segíti.

A Moesin citoplazmatikus visszatartásáért felelős fehérjeszakasz, a CRS mutációja következtében megfigyelhető rendkívül dinamikus sejtmagba áramlás alapján a CRS motívum központi vagy kizárólagos szerepe az import szabályozásában nyilvánvaló. A Ter94-gyel minden bizonnyal a CRS legfontosabb kötőpartnerét azonosítottuk, és ugyan a Moesinnel való fizikai kapcsolatának igazolása még nem történt meg, de a rendelkezésre álló adatok alapján ez eléggé valószínűnek látszik.

A Moesin importját szabályozó NLS és CRS a fehérje evolúciósan konzervált FERM doménjében található. Mint azt kimutattuk, a motívumok minden általunk megvizsgált ERM fehérjében felismerhetők, míg más, FERM domént tartalmazó fehérjékben az NLS-t csak az ERM családhoz közeli Merlin, míg a CRS-t a Merlin és P4.1 fehérjék hordozzák. A két motívum szűk körű konzerváltsága egyúttal jól példázza, hogy egy működési szempontból fontos fehérjedomén nagyfokú konzerváltsága ellenére is képes az evolúció során új tulajdonságokra szert tenni.

A FERM domén fehérjék sejtmagi jelenlétének és funkcióinak kutatása ezidáig nem volt középpontban. Ennek egyik nyilvánvaló oka, hogy a domináns és nélkülözhetetlen citoplazmás tevékenységük igencsak megnehezíti a sejtmagi működésük elkülönítését, és ezáltal a kutatását. Az általunk létrehozott *Moe<sup>NES</sup>* mutáns állat eddig egyedülálló megközelítése ennek a problémának a megoldására. De új tudományos eredmény az importot szabályozó NLS és CRS motívumok, a CRS mint új interakciós hely, a Med15, Hsf és Ter94 mint új interakciós partnerek megtalálása is. Rendezetlen szerkezetű régió azonosítása és vizsgálata egy ERM fehérjében, a rendezetlen régió magi importot befolyásoló funkciójának leírása szintén új eredménynek számít.

## AZ ÉRTEKEZÉSBEN BEMUTATOTT KÍSÉRLETEK SORÁN ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

### *Drosophila*-specifikus módszerek:

transzgenikus és mutáns törzsek létrehozása (transzpozonnal, rekombinációval és CRISPR-rel) és használata, élettani tesztek, fenotípus elemzés, menekítési kísérletek, politén kromoszóma vizsgálatok, embrióinjektálás

### Sejtenyésztés:

transziens és stabil transzfekció, indukált fehérjetermelés, RNSi, BiFC, drogkezelések, OptoDroplet esszé

### Molekuláris biológiai és biokémiai módszerek:

DNS klónozás (Gateway, Gibson, helyspecifikus mutagenézis, HiFi DNA assembly), PCR, RT-qPCR, élesztő kéthibrid  
Immunhisztokémia, Western-blot, dot-blot, BN-PAGE, FISH, fehérjetisztítás  
sejtfraekciókból, bakteriális fehérjetermelés, IVTT, ko-IP, kromatin IP

### Mikroszkópos módszerek:

FRAP, élőmikroszkópiás filmezés, kolokalizációs vizsgálatok, konfokális mikroszkópia, SEM

### Ellenanyag előállítása

### LC/MS-MS

### Transzkriptomika

### Informatikai és statisztikai módszerek:

normalitás eloszlás vizsgálata, páronkénti összehasonlítás, szekvencia analízisek (illesztések, motívum predikciók, térszekezet), Alphafold modellezés, GraphPad Prism, ImageJ

## Az értekezés alapját képező saját közlemények

\* levelező szerzőség

1. **Vilmos P\***, Jankovics F, Szathmári M, Lukácsovich T, Henn L, 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(10):609-19.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2009.05.006>
2. Kristó I, Bajusz I, Bajusz C, Borkúti P, **Vilmos P\*** (2016) Actin, actin-binding proteins, and actin-related proteins in the nucleus. Review paper. *Histochem Cell Biol.* 145(4):373-88.  
<https://doi.org/10.1007/s00418-015-1400-9>
3. **Vilmos P\***, Kristó I, Szikora S, Jankovics F, Lukácsovich T, Kari B, Erdélyi M (2016) The actin-binding ERM protein Moesin directly regulates spindle assembly and function during mitosis. *Cell Biol Int.* 40(6):696-707.  
<https://doi.org/doi:10.1002/cbin.10607>
4. Kristó I, Bajusz C, Borsos BN, Pankotai T, Dopie J, Jankovics F, Vartiainen MK, Erdélyi M, **Vilmos P\*** (2017) The actin binding cytoskeletal protein Moesin is involved in nuclear mRNA export. *Biochim Biophys Acta* 2017 Oct;1864(10):1589-1604.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.05.020>
5. Bajusz C, Borkúti P, Kristó I, Kovács Z, Abonyi C, **Vilmos P\*** (2018) Nuclear actin: ancient clue to evolution in eukaryotes? Review paper. *Histochem Cell Biol.* 2018 Sep;150(3):235-244.  
<https://doi.org/10.1007/s00418-018-1693-6>
6. 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>
7. 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.  
<https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.963635>
8. Kristó I, Borkúti P, Kovács Z, Szabó A, Szikora S, **Vilmos P\*** (2023) Detection of Actin in Nuclear Protein Fraction Isolated from Adult *Drosophila* Ovary. *Methods Mol Biol.* 2023;2626:353-364.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2970-3\\_19](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2970-3_19)
9. Szabó A, Borkúti P, Kovács Z, Kristó I, Abonyi C, **Vilmos P\*** (2023) Measuring Transposable Element Activity in Adult *Drosophila* Ovaries. *Methods Mol Biol.* 2023;2626:309-321.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2970-3\\_16](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2970-3_16)

10. Borkúti P, Kristó I, Szabó A, Kovács Z, **Vilmos P\*** (2024) FERM domain-containing proteins are active components of the cell nucleus. Review paper. *Life Science Alliance* 2024 Jan 31;7(4):e202302489.  
<https://doi.org/10.26508/lsa.202302489>
11. Kovács Z, Bajusz C, Szabó A, Borkúti P, Benke R, Lipinszki Z, Kristó I, **Vilmos P\*** (2024) A bipartite NLS motif mediates the nuclear import of *Drosophila* Moesin. *Front. Cell Dev. Biol.* 2024 Feb 21;12:1206067  
<https://doi.org/10.3389/fcell.2024.1206067>
12. Kristó I, Kovács Z, Szabó A, Borkúti P, Gráf A, Sánta ÁT, Pettkó-Szandtner A, Ábrahám E, Honti V, Lipinszki Z, **Vilmos P\*** (2024) Moesin contributes to heat shock gene response through direct binding to the Med15 subunit of the Mediator complex in the nucleus. *Open Biol.* 14:240110  
<https://doi.org/10.1098/rsob.240110>
13. Szabó A, Borkúti P, Kovács Z, Kristó I, **Vilmos P\*** (2025) Recent advances in nuclear actin research. Review paper. *Nucleus* 2025 May 4;16(1):2498643.  
<https://doi.org/10.1080/19491034.2025.2498643>

#### Könyvfejezet:

17. Jankovics F, Henn L, **Vilmos P\*** (2015) Intracellular Skeletal Structures in Eukaryotes. *Selected Topics from Contemporary Experimental Biology* 2:155-170.

#### Tudománymetriai összesítés

Referált folyóiratokban megjelent összes közlemény száma: 44

Összes hivatkozás száma: 1647

Független hivatkozások száma: 1389

Hirsch index: 16

Impakt faktorok összege: 190,702

A meghatározó (első/utolsó/levelező) szerzőként megjelentetett tudományos közlemények száma: 21

ebből folyóiratcikk: 20, könyvfejezet: 1

A meghatározó (első/utolsó) szerzőként megjelentetett tudományos közleményekből számított kumulatív impakt faktor: 59,532

A meghatározó (első/utolsó/levelező) szerzőként megjelentetett, Q1 besorolású tudományos közlemények száma: 13, ebből D1-es besorolású: 7

MTMT azonosító: 12468

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt köszönetet szeretnék mondani az általános és középiskolai biológia tanárainknak, köztük **Varga Tiborné Kassa Máriának, P. Buday Péter OFM-nek, Popovics Györgynek és Dr. Perendy Máriának**, és kiváló kémia tanáromnak, **Preczlik Lászlónak**; hálás vagyok a tőlük kapott ismeretekért. Önálló kutatóvá válásomban mérföldkőnek számítottak témavezetőim. Köszönöm **Andó Istvánnak, Larry Marshnak és Erdélyi Miklósnak** a sok éves közös munkát és irányítást. A jelen értekezésben tárgyalt eredményeket természetesen nem egyedül értem el, munkatársaim nélkül ez lehetetlen lett volna. Ezért köszönettel tartozom **Maruzs-Kristó Ildikónak, Bajusz Csabának, Borkúti Péternek, Vedelek-Szabó Anikónak, Kovács Zoltánnak** és minden, a laboratóriumban hosszabb-rövidebb ideig megfordult posztdokknak, szakdolgozónak és gyakornoknak a munkájukért. Lekötelezett vagyok a nagyszerű asszisztenseknek is, **Ugrainé Szathmári Margitnak, Velkeyné Krausz Ildikónak és Abonyi Csillának** a biztos háttér megteremtéséért. Munkám során sok szakmai és baráti segítséget kaptam **Jankovics Ferentől, Lipinszki Zoltántól, Blastyák Andrástól, Sinka Ritától** és a Genetikai intézetben a **Drosophilás csoportvezető** társaimtól.

Mindezen túl, megkülönböztetett köszönet jár családomnak. **Szüleimnek, feleségemnek, és három lányunknak.** Áldozatvállalásaik, türelmük és megértésük nélkül ez a munka nem készülhetett volna el.

Végezetül köszönöm a Szegedi Biológiai Kutatóközpont, a Magyar Tudományos Akadémia, az Országos Tudományos Kutatási Alap és a HUN-REN munkámhoz, kutatócsoportom működéséhez biztosított anyagi támogatását.

Szeged, 2025. december 22.