

SZAKMAI BESZÁMOLÓ

***Zárójelentés, OTKA K77840
Nyitrai Miklós***

Összefoglaló

Az aktin a sejtek működésében számos tekintetben játszik meghatározó szerepet. A monomer és filamentális formák egyensúlya, illetve szerkezeti módosulásai meghatározó jelentőségűek a sejtek alakjának megőrzésében, mozgásuknak és dinamikus környezeti alkalmazkodásuknak a megvalósításában. Ezt az egyensúlyt, és a vonatkozó konformációs módosulásokat is szigorúan szabályozzák olyan fehérjék, amelyek képesek kötődni az aktinhoz. Vizsgálatainkban - Az OTKA K77840 pályázat keretei között az eredeti terveinknek megfelelően - ezen fehérjék közül azokat a kölcsönhatásait tanulmányoztuk, amelyek az aktin filamentumok gyors felépülésében, vagy a filamentum képződés megakadályozásában játszanak kitüntetett szerepet. Kutatásaink eredményei információt szolgáltattak az aktinnak a forminokkal, miozinnal, tropomiozinnal, kofilinnel és twinfilinnel kialakított kölcsönhatásait illetően, és ugyancsak leírást adtak az ezen kölcsönhatások nyomán a fehérjékben kialakuló szerkezeti módosulásokról is. Vizsgálatainkban ugyanakkor fontos hangsúlyt tettünk olyan módszertani fejlesztések megvalósítására is, amelyek segítségével a vonatkozó fehérje-fehérje kapcsolatok hatékonyabban vizsgálhatók. Eredményeinket eddig tíz nemzetközi folyóiratban megjelent közleményben ismertettük, és további két kéziratunk áll elbírálás alatt.

A kutatás eredményeit összefoglaló, szabad szöveges, feltöltendő részletes jelentés

A projekt első évében végzett vizsgálatok

Kutatásaink során a fluoreszcencia kioltás módszerét alkalmazva meghatároztuk egy aktinhoz kapcsolt fluorofórnak az oldat felé mutatott hozzáférhetőségét különböző formin koncentrációk mellett. Az eredmények azt mutatták, hogy forminok jelenlétében az oldat felé mutatott hozzáférhetőség módosul. Ezzel párhuzamosan megváltozott a kioltó számára elérhető fluorofórok hányada is. Mindezen eredményeink összhangban vannak a korábbi megfigyeléseinkkel, amelyek szerint a forminok kötődésének hatására az aktin filamentumok dinamikai tulajdonságai megváltoznak (*J. Photochem. Photobiol. B*, 98(1), 7-11, 2009).

A debreceni társintézetünkben Bacsó Zsolttal együttműködve tanulmányoztuk, hogy hogyan változtatják meg egyes - a sejt- és molekuláris biológiában gyakran alkalmazott - detergensok az aktin polimerizációs tulajdonságait. A detergenseknek számottevő hatása volt az aktinnak ezen sajátosságára, ami koncentráció-függő módon jelentkezett. Megfigyeléseink felhívták arra a figyelmet, hogy az ilyen detergensekkel kezelt sejtekkel való munka során az eredmények értelmezésénél ezen nem kívánatos detergens hatásokat figyelembe kell venni (*Cytometry A.*, 77(5), 447-56, 2009).

Szegedi (Mihály József munkacsoportja) és párizsi (Marie-France Carlier munkacsoportja) együttműködve részletesen tanulmányoztuk és leírtuk egy speciális formin család (DAAM) in vitro és in vivo körülmények között mutatott funkcionális jellemzőit. Megállapítottuk, hogy ezen család tagjai számos közös tulajdonságot mutatnak más formin családok képviselőivel. Azt is megfigyeltük ugyanakkor, hogy a DAAM által elősegített aktin polimerizáció lassabb, mint a leggyorsabb ismert forminok estében tapasztalható. Eredményeinket nemzetközi folyóiratban jelentettük meg (*J. Biol. Chem.*, 285(17), 13154-69, 2010).

A projekt második évében végzett vizsgálatok

Megfigyeltük azt is, hogy egy aktin-kötő toxinok befolyással lehetnek az aktinnak a nukleotidokkal való kölcsönhatására. Tanulmányoztuk és leírtuk, hogyan módosítja a foszfát disszociációjának a sebességét a falloidin vagy a jasplakinolid kötődése. Ezen eredményeinket nemzetközi szaklapban közzétettük (*Eur. Biophys. J.*, 2010, 40(5):619-26).

Bugyi Beáta és Hild Gábor kollégáimmal, a Cytoskeleton c. nemzetközi folyóirat felkérésére, írtunk egy összefoglaló cikket az aktin monomerek és filamentumok dinamikai és konformációs állapotairól, illetve ezen állapotoknak és megváltozásuknak a biológiai, funkcionális jelentőségéről (*Cytoskeleton*, 2011, 67(10), 609-29).

A projekt harmadik évében végzett vizsgálatok

Az aktinnak a forminokkal, illetve további fontos aktin-kötő fehérjékkel való kölcsönhatását leírtuk, a tropomiozin és a miozin formin indukálta aktin filamentumokra gyakorolt hatását jellemeztük. Megállapítottuk, hogy ezen két fehérje megfordítja a formin által kiváltott konformációs hatásokat, az aktin filamentumokat kötődésük merevíti, és a kötésük után az aktin abba az állapotba kerül, amit formin mentes közegben is megfigyelhetünk. Ezen eredményeink kiegészítették és alátámasztották azt a modellünket, amelyben az aktin filamentumok szerkezetei és dinamikai módosulásai szabályozó szerepet töltenek be, és amelyben az aktin állapotát más aktin-kötő fehérjék szabályozzák. Eredményeinket nemzetközi folyóiratban jelentettük meg (*J. Biol. Chem.*, 287(38):31894-904, 2012).

Szerbiai kollaborációs partnerünkkel együttműködve megvizsgáltuk összetettebb fluoreszcencia emissziós tulajdonságokkal rendelkező fehérjék egyedi sajátosságait. Az eredmények alapján jellemeztük és csoportosítottuk ezeket a fehérjéket. Az eredményeket nemzetközi folyóiratban közzeltük (*J. Fluoresc.*, 23(3), 605-610, 2013).

A projekt negyedik évében végzett vizsgálatok

Számos olyan aktin monomer kötő fehérje van, amely a sejtekben meghatározó szerepet játszik az aktin monomerek és filamentumok között fennálló dinamikus egyensúly kialakításában és szabályozásában. Ezek közül vizsgáltuk a twinfilinnek, a profilinnek és a kofilinnek az aktin monomerekre gyakorolt hatásait. Fluoreszcencia kioltási, FRET és koszedimentációs kísérleteinkben korrelációkat mutattunk ki az egyes aktin kötő fehérjék funkciói és az aktinra gyakorolt hatásaik között (az eredményeket egy már elfogadott (*BBA Proteins and Proteomics*, 2013, *in press*), és egy további - jelenleg elbírálás alatt álló - közleményben ismertettük).

Tanulmányoztuk, hogy hogyan valósul meg az "IRSp53-Missing in Metastasis Domain", IMD, szabályozása az aktin és a megfelelően kiválasztott lipid összetételek vonatkozásában, függvényében. Az aktin és a lipidek között létrejövő kölcsönhatásokat fluoreszcencia spektroszkópiai módszerekkel (FRET, fluoreszcencia kioltás) tanulmányoztuk. Eredményeink megmutatták, hogy mind a két vonatkozó komponens változása szerepet játszik ezekben a szabályozási folyamatokban. Ezeket a megfigyeléseket folyóirat cikkben közöltük (*BBA Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2013, *in press*).

A forminoknak az aktinra gyakorolt szerkezetmódosító hatásait tovább vizsgáltuk, immár elektron paramágneses rezonancia módszerekkel. Először megvizsgáltuk, hogy hogyan lehet spektroszkópiai próbákat kapcsolni a forminokhoz. Kísérleteink akkor mutatták a legbiztosabb eredményeket, amikor kisméretű EPR szondákat alkalmaztunk. Ezek felhasználásával jellemeztük a formin konformációs állapotát aktin nélküli, illetve aktint kötő állapotában. Eredményeink összhangban voltak a fluoreszcencia spektroszkópiai módszerek alkalmazásával kapottakkal, és kiegészítették más időskálán jellemző mozgások leírásával azokat. A munkánk eredményeit folyóirat cikkben mutattuk be (*European Biophysics Journal*, 2013, *in press*).

Végeztünk a projekt második felében olyan sikeres kutatásokat is, amelyeknek az eredménye nemzetközi szaklapokban még nem jelent meg, de a leírásukra írt kéziratok jelenleg már elbírálás alatt állnak. A tropomizoin izoformák vizsgálatába nem-izom eredetű TmBr3 és Tm5 fehérjéknek aktinnal, és aktin nukleációs faktorokkal való kölcsönhatását tanulmányoztuk fluoreszcencia spektroszkópiai, koszedimentációs, és gyöngy alapú *in vitro* motilitás kísérletekben. Megállapítottuk, hogy a forminoknak és az Arp2/3-nak az aktin polimerizációjára gyakorolt hatása nagymértékben függött attól, hogy az aktin köt-e tropomiozint, és ha igen, melyik izoformát (az eredményeket ismertető kézirat jelenleg elbírálás alatt áll).

Spektroszkópiai vizsgálataink folytatásaként azt vizsgáltuk meg, hogy hogyan követhető nyomon az egyes triptofánt tartalmazó fehérjék denaturációs állapota fluoreszcencia élettartam mérések adatainak segítségével. A fluoreszcencia élettartamok félértékszélességét megvizsgálva korrelációt találtunk a fehérjék különböző kémiai denaturációra történő módosulásaival, és a módszernek ezt az előnyét így más vonatkozó mérésekben is alkalmazásra ajánlottuk (a vonatkozó kézirat jelenleg elbírálás alatt áll).

A korábbiakban más kutatócsoportok megmutatták, hogy az egyik nukleációs faktor család, a leiomodinok izom sejtekben az aktin filamentumok negatív végeihez lokalizálódnak. Ezen

megfigyelések ugyanakkor arra is engedtek következtetni, hogy a sejtek fejlődésének egyes fázisaiban a leiomodin a filamentumok mellett is megtalálható. Munkánk során igazoltuk, hogy a leiomodin viszonylag erős affinitással képes az aktin filamentumok oldalához kötődni. Ezen kötődés fiziológia jelentőségét tovább vizsgáljuk. Megfigyeltük azt is, hogy míg a teljes hosszúságú leiomodin az aktin polimerizációját gyorsítja, a C-terminális fragmentum ellentétes hatást vált ki. Ezen leiomodin-aktin kölcsönhatásoknak tanulmányoztuk az oldat ionerősségétől, valamint az aktuális magnézium koncentrációtól való függését is. A leiomodin hatásait leíró kísérleteink befejező fázisukban vannak, a vonatkozó kézirat előkészítését megkezdjük.

Ugyancsak folytattuk kutatásainkat a nukleáris aktin egyik fontos partner fehérjéjének, a miozin 16-nak a leírását illetően. A tervezett expresszálok közül megvalósítottuk az egyik speciális domén, az ankirin domén létrehozását. Ugyancsak folyamatban vannak a teljes hosszúságú miozin 16 előállítását célzó bakulovírus expresszálos rendszert alkalmazó preparálásaink is. Az ankirin domén vizsgálata során megállapítottuk, hogy képes lehet kötődni az aktin filamentumokhoz. Ezen megfigyelés részleteinek tisztázása, a molekuláris kölcsönhatások leírása, és a biológiai funkció meghatározása jelenleg is folyik kutatócsoportunkban.

Mіндеzen vizsgálataink és eredményeink összhangban vannak a pályázati anyagban bemutatott kutatási koncepcióval.