

SZAKMAI BESZÁMOLÓ – PROJEKT ZÁRÓ BESZÁMOLÓ

OTKA PD83648

Dr. Bugyi Beáta

Összefoglalás

A sejtek fehérje-vázrendszerének összehangolt egységében a funkcionálisan eltérő aktin hálózatok meghatározó szerepet játszanak az alapvető sejtfolymatok pontos térbeli és időbeli szabályozásában. Ezen mechanizmusok finom hangolásában fontos szerepük van a fehérjék különböző izoformáinak, azonban a háttérben álló molekuláris mechanizmusok még nem pontosan ismertek. A kutatási projektünkben elsőként a vizsgálatainkhoz alapvetően szükséges módszertani fejlesztéseket valósítottunk meg. A pályázat munkatervének megfelelően kutatásaink során az aktin sejtíváz felépítésében és működésében alapvető fehérjék: az aktin és a tropomiozin izoforma specifikus sajátságait vizsgáltuk. Tanulmányoztuk továbbá azt is, hogy miként befolyásolják az izoforma specifikus sajátságok az aktin-tropomiozin filamentális rendszernek a sejtíváz szabályozásában részt vevő más fehérjékkel kialakított kölcsönhatásait (nukleációs faktorok, miozin, ADF/cofilin). Kutatásaink eredményei az aktin és tropomiozin izoformák olyan izoforma specifikus sajátságait és kölcsönhatásait derítették fel, amelyek korábban nem voltak ismertek. Megítélésünk szerint eredményeink hozzájárultak e fehérjék sejtben belüli funkcióinak pontosabb megismeréséhez. A kutatási projekt eredményeit eddig négy nemzetközi folyóiratban megjelent közleményben ismertettük. A kutatási projekt keretein belül sikeres együttműködések tudunk kialakítani más kutatócsoportokkal is, meggyőződésünk, hogy ezek nem csupán a jelen projekt, de a jövőbeli kutatómunkánk során is hozzá fognak járulni a kutatásaink hatékony és sikeres megvalósításához. A kutatásaink során elért eredményeinket az alábbiakban részletezzük.

A kutatás eredményeit összefoglaló részletes jelentés

1. Kutatócsoportunk korábbi vizsgálatai rámutattak arra, hogy az aktin filamentumok képződését elősegítő nukleációs faktorok családjába tartozó forminok (mDia1) képesek konformációs módosulásokat is előidézni a filamentumban, mégpedig azok szerkezetét fellazítják (Bugyi et al., 2006). A jelen pályázathoz kapcsolódó kutatásainkban időfüggő valamint steady-state fluoreszcencia spektroszkópia módszerek alkalmazásával megvizsgáltuk, hogy milyen hatása van a vázizom tropomiozinok és miozinok (HMM) a spontán képződött, illetve a forminok által létrehozott vázizom aktin filamentumok konformációs dinamikájára. Eredményeink szerint sem a vázizom tropomiozin, sem pedig a HMM nem befolyásolja a spontán képződött aktin filamentumok konformációs dinamikáját. Azonban, mindkét fehérje képes stabilizálni az mDia1 formin által fellazított aktin filamentum szerkezetet. A HMM-nek ezt a tulajdonságát ez idáig még nem írták le. A részletes vizsgálatok megmutatták, hogy ugyan a HMM és a vázizom tropomiozin hasonló mértékben képes stabilizálni az mDia1 formin által fellazított filamentum szerkezetet, a hatás hátterében eltérő mechanizmusok állnak. Míg a HMM hatására bekövetkező stabilizálás a kötéssel egy időben történik, addig a vázizom tropomiozin esetén a stabilizáció a komplex formálást követően valósul meg.

Vonatkozó publikáció: Ujfalusi Z., Kovács M., Nagy T. N., Barkó Sz., Hild G., Lukács A., Nyitrai M., **Bugyi B.***
Myosin and Tropomyosin Stabilize the Conformation of Formin-Nucleated Actin Filaments. *Journal of Biological Chemistry* 2012
(* levelező szerző)

2. A nemizom tropomiozin izoformák (TMBR3 és TM5NM1) fiziko-kémiai sajátosságainak vizsgálata érdekében elsőként kidolgoztuk az előállításukhoz szükséges módszereket. A kutatásaink során megvizsgáltuk, hogy ezen nemizom tropomiozin izoformák sajátosságai eltérnek-e a részleteiben is jól ismert vázizom eredetű izoforma tulajdonságaitól. Ultracentrifugáláson és gélelektroforézisen alapuló koszedimentációs módszer segítségével leírtuk a tropomiozin izoformák aktin filamentumokhoz való kötődését. Eredményeink szerint a nemizom eredetű tropomiozin izoformák gyengébb affinitással kötődnek az aktin filamentumokhoz, mint a vázizom eredetű izoforma. Azt is megmutattuk, hogy a tropomiozin-aktin kötés ionerősség függő: magasabb ionerősségen gyengébb a kölcsönhatás. Fluoreszcencia spektroszkópiai módszerekre épülő vizsgálatokkal megmutattuk, hogy a TMBR3 és TM5NM1 jelentősen nem befolyásolja a spontán filamentum képződés kinetikáját, ellentétben a vázizom tropomiozinnal. Megmutattuk azt is, hogy a vizsgált tropomiozinok izoforma specifikusan gátolják az aktin filamentumok lebomlását: a vázizom tropomiozinnal szemben a TMBR3 és TM5NM1 kevésbé stabilizálja az aktin filamentumokat.

A sejtekben az aktin filamentumok képződését nukleációs faktorok katalizálják. Ezek közül az Arp2/3 fehérjekomplex nélkülözhetetlen a membrán közeli lamellipodium dinamikus felépüléséért (Bugyi and Carlier, 2010). Korábbi vizsgálataink megmutatták, hogy a vázizom tropomiozin izoforma gátolja az Arp2/3 komplex aktivitását, amelynek hátterében az áll, hogy a vázizom tropomiozin izoforma kötőhelye átfed az Arp2/3 komplex kötőhelyével (Bugyi et al., 2010; Rouiller et al., 2008). A jelen kutatómunkánk során fluoreszcencia spektroszkópiai módszereken alapuló vizsgálatokkal megmutattuk, hogy a tropomiozinok izoforma specifikus módon képesek befolyásolni az Arp2/3 komplex aktivitását: a TM5NM1 gátolja az Arp2/3 komplex által katalizált aktin filamentum képződést, hasonlóan a vázizom tropomiozinhoz, míg a

TMBr3 nincs hatással erre a folyamatra. Tudásunk szerint a TMBr3 ez idáig az egyetlen tropomiozin izoforma, amely nem gátolja az Arp2/3 komplex aktivitását. Ismeretes, hogy a tropomiozin izoformák eltérő kötőfelszínt foglalhatnak el az aktin filamentumon, vizsgálataink arra utalnak, hogy az aktin filamentumokon elfoglalt kötőhely a TM5NM1 esetében a vázizom tropomiozinhoz hasonló, még a TMBr3 esetén attól eltérő. Ezen eredményeink jó összhangban vannak és lehetséges magyarázatot adnak a sejten belül tett megfigyelésekre, melyek szerint a TMBr3 izoforma inkább a membrán közeli dinamikus aktin hálózatban, az Arp2/3 komplex által létrehozott lamellipodiumban lokalizálódik és elősegíti azok formálását. Ezzel szemben a TM5NM1 izoforma a stressz szálakhoz kötődik, valamint gátolja a lamellipodium kialakulását (Bryce et al., 2003).

Vonatkozó publikáció: Kis-Bicskei N., Vig A., Nyitrai M., **Bugyi B.***, Talián Cs. G.* **Purification of tropomyosin Br-3 and 5NM1 and characterization of their interactions with actin.** *Cytoskeleton* 2013
(* közös levelező szerzők)

3. Az aktinnak emlősökben hat izoformája létezik, amelyeket tradicionálisan izom, és nemizom csoportokba sorolhatunk. Bár az izoformák szekvenciálisan hasonlóak, azonban funkcionális szempontból rendkívül eltérő sajátságokat mutatnak. Az aktin izoformák fiziko-kémiai sajátságainak vizsgálata eddig elsősorban a vázizom eredetű izoformára (alfa) terjedt ki, ugyanis ez izomszövetből viszonylag egyszerűen és nagy mennyiségben kinyerhető. Az aktin esetében a nemizom izoformák (béta, gamma) izoforma homogén előállítására egyedül a baculovirus fehérje expressziós rendszer kínál lehetőséget. Kutatásaink során a PTE ÁOK Biofizikai Intézetében kialakítottunk és felszereltünk egy laboratóriumot a baculovirus rendszer alkalmazásához, valamint beállítottuk a béta-, és gamma-aktin izoformák előállításához szükséges protokollt. Megmutattuk, hogy az egyes aktin izoformák izoforma specifikus polimerizációs sajátságokat mutatnak. A filamentumok összeszerelődése a béta-aktin izoforma esetén volt a leggyorsabb, ezt az alfa, majd a gamma aktin izoforma követte. További eredményeink szerint az aktin az Arp2/3 komplex nukleációs faktorral izoforma specifikus kölcsönhatásokat alakít ki. Ennek eredményeképpen az Arp2/3 komplex a gamma-aktin polimerizációját képes a leginkább katalizálni, legkevesbé pedig a béta-aktin izoformáét. Ezek az eredményeink magyarázatot szolgálhatnak azon sejtbiológiai megfigyelésekre, melyek szerint a gamma-aktin a membrán közeli, Arp2/3 komplex által létrehozott lamellipodiumot építi fel, míg a béta-aktin a nem Arp2/3 komplex-specifikus stressz szálakat (Dugina et al., 2009). A vonatkozó eredményeink közzététele folyamatban van.

4. Az ADF-H (actin depolymerizing factor - homology) domén fehérjék családjába tartozó ADF/cofilin fehérjék az aktin citoskeleton dinamikájának szabályozásában vesznek részt. Kutatásaink során megvizsgáltuk, hogy milyen szerkezeti eltérések állhatnak az ADF/cofilin fehérjék egyes izoformái között megfigyelt funkcionális különbségek hátterében. Egy budapesti együttműködés keretében (Kalmár Lajos MTA Enzimológiai Intézet) azonosítottunk egy korábban nem ismert, izoforma specifikus szerkezeti elemet az ADF/cofilin fehérjékben. Ezen eredményeinket az *European Journal of Cell Biology* című folyóirat felkérésére az ADF-H fehérjék izoforma specifikus szerkezeti és funkcionális sajátságairól megírt összefoglaló tanulmányban tettük közzé.

Vonatkozó publikáció: Hild G., Kalmár L., Kardos R., Nyitrai M., **Bugyi B.*** **The other side of the coin: Functional and structural versatility of ADF/cofilins.** *European Journal of Cell Biology* 2014
(* levelező szerző)

5. Szegedi partnerünkkel (Mihály József, SZBK) együttműködve megmutattuk, hogy a forminok családjába tartozó DAAM alapvető szerepet játszik a szarkomer aktin filamentumainak összeszerelődésében és elrendezésében. Vizsgálataink szerint a DAAM képes katalizálni az izom eredetű aktin filamentumok összeszerelődésének mind a kezdeti nukleációs, mind pedig az elongációs fázisát. Ugyanakkor a DAAM képes elősegíteni a már létrejött rövid aktin filamentumok összeépülését is (ún. annealing) tropomiozin jelenlétében és nélküle is. Az in vitro és sejtbiológiai eredményeink arra utalnak, hogy a DAAM nem csupán nukleációs és elongációs faktorként katalizálja az aktin filamentumok kialakulását, hanem a polimerizáció kezdeti lépéseit követően, az annealing-re gyakorolt hatása révén az aktin filamentumok összeszerelődésének későbbi fázisait is elősegíti.

Vonatkozó publikáció: Molnár I., Migh E., Szikora Sz., Kalmár T., Orfanos Z., VéghG. A., Barkó Sz., **Bugyi B.**, Deák F., Kovács J., Juhász G., Váró Gy., Nyitrai M., Sparrow J., Mihály J.: DAAM is required for thin filament formation and sarcomerogenesis during muscle development in *Drosophila*., *PLOS Genetics*, 2014

Irodalomjegyzék

- Bryce, N.S., Schevzov, G., Ferguson, V., Percival, J.M., Lin, J.J., Matsumura, F., Bamburg, J.R., Jeffrey, P.L., Hardeman, E.C., Gunning, P., Weinberger, R.P., 2003. Specification of actin filament function and molecular composition by tropomyosin isoforms. *Mol Biol Cell* 14, 1002-1016.
- Bugyi, B., Carlier, M.F., 2010. Control of actin filament treadmilling in cell motility. *Annu Rev Biophys* 39, 449-470.
- Bugyi, B., Didry, D., Carlier, M.F., 2010. How tropomyosin regulates lamellipodial actin-based motility: a combined biochemical and reconstituted motility approach. *Embo J*.
- Bugyi, B., Papp, G., Hild, G., Lorinczy, D., Nevalainen, E.M., Lappalainen, P., Somogyi, B., Nyitrai, M., 2006. Formins regulate actin filament flexibility through long range allosteric interactions. *J Biol Chem* 281, 10727-10736.
- Dugina, V., Zwaenepoel, I., Gabbiani, G., Clement, S., Chaponnier, C., 2009. Beta and gamma-cytoplasmic actins display distinct distribution and functional diversity. *J Cell Sci* 122, 2980-2988.
- Rouiller, I., Xu, X.P., Amann, K.J., Egile, C., Nickell, S., Nicastro, D., Li, R., Pollard, T.D., Volkman, N., Hanein, D., 2008. The structural basis of actin filament branching by the Arp2/3 complex. *J Cell Biol* 180, 887-895.