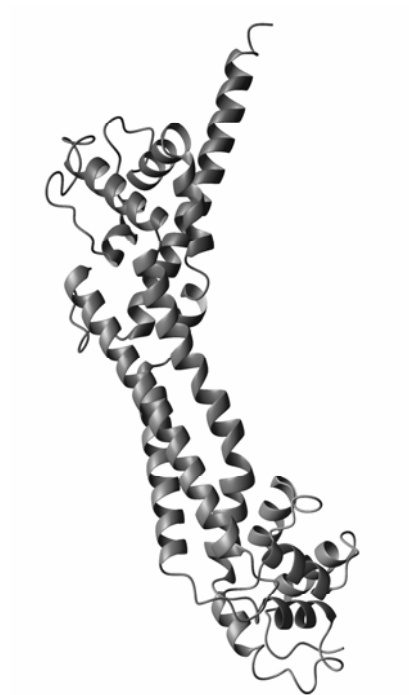


PHD ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

A forminok hatása az aktin filamentumok polimerizációs tulajdonságaira és dinamikai jellemzőire



BUGYI BEÁTA

Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Biofizikai Intézet

2006.

PhD ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

A forminok hatása az aktin filamentumok polimerizációs tulajdonságaira és dinamikai jellemzőire

Bugyi Beáta

Program: Biokémia és molekuláris biológia

Programvezető: Dr. Sümegi Balázs

Alprogram: B-130: Funkcionális fehérjedynamika vizsgálata biofizikai módszerekkel

Alprogramvezető: Dr. Somogyi Béla

Témavezetők: Dr. Somogyi Béla, Dr. Nyitrai Miklós



Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Biofizikai Intézet

2006.

Bevezetés

Az aktin citoszkeleton (a mikrofilamentum rendszer) az eukarióta sejtek citoplazmájában található fehérjehálózat felépítésében résztvevő, nagymértékben konzervált, filamentális szerkezetű sejtvázkomponens. A sejt alakjának és mechanikai ellenálló képességének biztosítása mellett a sejt dinamikus tulajdonságainak meghatározásában is alapvető szerepet játszik. A strukturálisan differenciált szerveződést mutató aktin filamentum hálózatok kialakításának hátterében az asszociált fehérjék diverzitása, azok térben és időben összehangolt működése, illetve a mikrofilamentumok polimerizációjával kapcsolatos molekuláris mechanizmusok állnak.

A mikrofilamentum rendszer fő alkotóeleme az aktin fehérje. Az aktin, a sejtben két formában, monomér (globuláris, G - aktin), illetve a monomérek összekapcsolódása során (polimerizáció) létrejövő polimer (filamentális, F - aktin) formában fordul elő. Az aktin monomér szerkezete két doménre osztható. A domének közötti hasadékokban találhatóak az elsődleges kation-, és nukleotid-kötő helyek. A kötött kétértékű kation fiziológiásan a Mg^{2+} , *in vitro* körülmények között pedig a Ca^{2+} . A nukleotid-kötő hely ATP-t, ADP.P_i-t vagy ADP-t tart kötve. Az aktin polimerizációja három fő szakaszra osztható. A nukleáció fázisában két aktin monomér összekapcsolódása során aktin dimérek, majd egy újabb monomér kapcsolódása révén aktin trimérek (nukleuszok) jönnek létre. Az elongáció szakaszában újabb monomérek épülnek a filamentumba, amely annak növekedéséhez vezet. Az utolsó fázisban egy dinamikus egyensúly, úgynevezett taposómalom (vagy „treadmilling”) áll be, amelynek során a kialakult filamentumok hossza már nem változik. Ebben az állapotban a filamentum mindkét végén végbemegy mind a monomérek asszociációja, mind a disszociációjuk. Ezekre a folyamatokra az egyes végeken eltérő kinetika jellemző, ennek következtében a filamentum szöges végén a monomérek asszociációja, a hegyes végén pedig a disszociációjuk a domináns folyamat. E folyamatokra jellemző disszociációs (k_-) és asszociációs (k_+) állandók hányadosaként mindkét vég esetén megadhatunk egy, az adott vég egyensúlyára jellemző, disszociációs egyensúlyi állandót, az ún. kritikus koncentrációt.

A taposómalom mechanizmus következtében a filamentumok egyensúlyi állapotára jellemző kritikus koncentráció a szöges és a hegyes vég dinamikáját jellemző kritikus koncentráció értékek közötti monomér koncentrációval lesz egyenlő, de úgy, hogy értéke számottevően közelebb van a szöges vég kritikus koncentrációjához.

A filamentumok „korát” egy belső óráként az ATP hidrolízise és a foszfát csoport disszociációja méri. Az előbbi folyamat gyorsabb, a monomérek filamentumba épülése után másodperceken belül bekövetkezik (0.3 s^{-1} (1)), míg az utóbbi sokkal lassabban megy végbe (0.002 s^{-1} (2)). A foszfát csoport disszociációját egy konformációs változás kíséri, amelynek következtében a filamentumok destabilizálódnak.

A sejtekben lejátszódó folyamatok során a különböző extra-, és intracelluláris stimulusok hatására az aktin citoskeleton gyors átrendeződése következik be. Ebben kulcsszerepet játszik az aktin filamentumok dinamikus polimerizációja, illetve depolimerizációja. A spontán aktin polimerizáció leglassabb lépése a nukleáció folyamata a dimérek, illetve a trimérek instabilitása miatt (3). A polimerizáció felgyorsítására a sejten belül különböző mechanizmusok léteznek, amelyek eredményeképpen a szabad szöges végek kialakulása felgyorsul, vagy a kialakuló végek száma megnő (2). A nukleációt gyorsító faktorok (forminok, Arp 2/3 komplex (4,5), spire(6,7)) a mikrofilamentum rendszer szabályozásában résztvevő fehérjék, amelyek az aktin filamentumok képződését a nukleáció elősegítésével gyorsítják. A nukleációs faktorok egyik családját alkotják a forminok. A formin fehérjéket az evolúció során nagymértékben konzervált régióik (ún. formin homológia domének: FH1, FH2 és FH3 domén (8)) alapján azonosíthatjuk. A forminok egy alcsaládját alkotják a „Diaphanous-related” forminok (Dia). Ezen fehérjék rendelkeznek még további doménekkal, amelyek a fehérje aktivitásának szabályozásában vesznek részt (9). Az FH2 domén meghatározó szerepet játszik az aktin filamentumokkal való kölcsönhatás kialakításában. A domén funkcionális formája a két FH2 domén összekapcsolódása során létrejövő FH2 dimér. A dimerizációban kulcsszerepet tölt be az FH2 domén N-terminálisán található, azt az FH1 doménnel összekötő flexibilis „linker” régió (10). Az FH2 dimér a nukleáció szakaszát elősegíti, míg a különböző fajokból származó FH2 domének az elongáció szakaszát részlegesen vagy teljesen gátolják (11,12).

Az FH2 domén N-terminálisán található a prolinban gazdag szekvenciákat tartalmazó, kevésbé konzervált formin homológia 1 domén (FH1), amely kötőhelyeket biztosít az aktin monomér-kötő fehérjének a profilinnak (8). Az FH1 doménhez kötött profilin az FH1FH2 által katalizált nukleációt még inkább elősegíti. Az FH1FH2 és a profilin együttes jelenlétében az elongáció sebessége is nagyobb a szabad szöges végek elongációs sebességéhez képest. Az FH1FH2 sajátja a processzivitás, amelynek eredményeképpen az elongáció során a polimerizáció előrehaladtával képes hosszú ideig a filamentumok szöges végén maradni (13,14).

Bár több modell is született a forminok molekuláris kölcsönhatásainak és működési mechanizmusának leírására a forminok hatásának háttérben álló pontos mechanizmus részletei még ma sem ismertek. A korábbi tanulmányok nem szolgáltak információval arról, hogy melyik a fehérjének az a legkisebb egysége, amely nélkülözhetetlen az aktin polimerizációs folyamatára kifejtett hatásának előidézéséhez. Azzal kapcsolatban sem voltak pontos ismeretek, hogy a forminok előidézik-e szerkezeti változásokat az aktin filamentumban. Túlnyomórészt ismeretlen volt az is, hogy képesek-e a forminok befolyásolni az aktin filamentumoknak más fehérjékkel kialakított kölcsönhatását. Nem volt ismert továbbá a formin fehérjék háromdimenziós atomi szerkezete sem.

Célkitűzések

Az egérben található mDia1 formin központi FH2 doménjének háromdimenziós atomi szerkezetének röntgen-krisztallográfiai módszerrel történő meghatározása, 2.6 Å-os felbontásban kollaborációs partnerünkkel (Prof. Alfred Wittinghoffer, Dr. Atsushi Shimada, Max Planck Institute Für Molekulare Physiologie, Dortmund, Németország) való együttműködés keretében történt. Ez volt az első ismert formin szerkezet. Vizsgálataink során az emlős (mmammalian) Dia forminok családjába tartozó, a központi FH2 domént (mDia1, mDia2 és mDia3), illetve az FH2 domént és annak az N-terminálisán található „linker” régiót is tartalmazó (mDia1 és mDia3) formin fragmentumokat tanulmányoztunk.

Munkánk középpontjában a forminok funkciója és szerkezeti sajátosságai közötti kapcsolatok pontosabb megismerése állt. Kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogy miként befolyásolják a forminok az aktin filamentumok polimerizációjának folyamatát, illetve az aktin filamentumok dinamikai tulajdonságait.

- Kísérleteink első fázisában arra kerestük a választ, hogy hogyan módosulnak az aktin polimerizációját, depolimerizációját és kritikus koncentrációját jellemző paraméterek a különböző, egérből származó mDia formin fragmentumok jelenlétében.
- Vizsgálni kívántuk továbbá azt is, hogy a formin fragmentumok mely régiói szükségesek a funkció betöltéséhez.
- A munkánk második felében arra kerestük a választ, hogy módosulnak-e az aktin filamentumok konformációs tulajdonságai az mDia1 fehérje központi FH2 doménjének, illetve ugyanezen fehérjének a „linker” régiót is tartalmazó fragmentumának jelenlétében.
- Tanulmányoztuk azt is, hogy milyen hatása van a forminok által az aktin filamentumokban előidézett konformációs állapotbeli változásnak a filamentumok funkcionális tulajdonságaira és más fehérjékkel való kölcsönhatásukra.

Alkalmazott módszerek

Fehérjék

Az aktint nyúl vázizomból preparáltuk (15,16). Az izolálás után az aktin puffer A-ban (4 mM TRIS - HCl (pH7.3), 0.2 mM ATP, 0.1 mM CaCl₂, 0.5 mM DTT) volt feloldva.

Az emlős (egér) mDia fehérjéket kódoló génszakaszt tartalmazó PGEX-4-T3 típusú plazmidot kollaborációs partnerünktől kaptuk (Prof. Alfred Wittinghoffer, Dr. Atsushi Shimada, Max Planck Institute Für Molekulare Physiologie, Dortmund, Németország). Az mDia fragmentumokat rekombináns GST-fúziós fehérje-expressziós rendszerben termeltettük meg, prokarióta sejtekben. A GST-mDia fehérjéket affinitás kromatográfias módszerrel, GSH-oszlopról történő trombinos hasítással választottuk el. Az eluátumot gélfiltrációs eljárással tisztítottuk. Az mDia fragmentumokat az expresszió és a tisztítás után -80°C-on, 50 mM TRIS - HCl-t (pH7.3), 50 mM NaCl-t, 5 mM DTT-t és 5 % glicerint tartalmazó pufferben tároltuk.

Ioncsere, polimerizálás

Az izolálás után az aktin monomér formában (G - aktin), Ca²⁺-mal telítve van. A kötött Ca²⁺-nak Mg²⁺-ra való kicserélése során az aktin monoméreket tartalmazó oldathoz 200 µM EGTA-t és 50 µM MgCl₂-ot adtunk (17). A kationcserét követően az aktin monomérek polimerizációját 10 mM KCl és 0.5 mM MgCl₂ hozzáadásával indítottuk el. A forminok hatásának ionerősségfüggésének vizsgálatokor alkalmazott további ionerősségek rendre 50 mM KCl és 1 mM MgCl₂, illetve 100 mM KCl és 2 mM MgCl₂ voltak. Az ionerősséget az ionok koncentrációjának (c_i) és töltésének (z_i) ismeretében az alábbi egyenlet alapján számoltuk:

$$[\text{ionerősség}] = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n c_i z_i^2 \quad (1)$$

Abban az esetben, ha a minta formin fragmentumot is tartalmazott, azt közvetlenül a polimerizációt megelőzően adtuk az oldathoz. Annak érdekében, hogy a formin fehérjék tárolópufferének hatását kizárjuk, a tárolópuffer térfogatát mind a formin fragmentumot tartalmazó, mind pedig a formin nélküli mintákban állandó (5 %-a a teljes térfogatnak) értéken tartottuk.

Az aktin fluoreszcens jelölése

A fluoreszcencia spektroszkópai vizsgálatok érdekében az aktin monoméren a 374-es pozícióban lévő cisztein aminosavat megfelelő fluorofórokkal jelöltük. A fluoreszcencia rezonancia energia transzfer (FRET) mérésekhez az IAEDANS – IAF jelölőpárt alkalmaztuk. Az aktin polimerizációs folyamatának vizsgálatára pirén-jódacetamidot használtunk.

Spektrofotometria

A vizsgált fehérjék, illetve az alkalmazott fluoreszcens jelölők koncentrációját a minták abszorpciója alapján határoztuk meg. Az abszorpciót Shimadzu UV-2100 típusú fotométerrel mértük. Az mDia fragmentumok koncentrációját a 6 M-os GuHCl-ban, 280 nm-en mért abszorpció értékei alapján számoltuk (18), az extinkciós koefficienseket az aminosav szekvenciák alapján a ProtParam segítségével határoztuk meg (<http://us.expasy.org/tools/>). Az ATP enzimatis hasítása során képződő szerves foszfát (P_i) mennyiségének, illetve az aktin filamentumokról való disszociáció kinetikájának vizsgálatára a Webb által kidolgozott módszert alkalmaztuk (19). A mérések során a minta abszorpciójának időbeli változását 360 nm-es hullámhosszon követtük nyomon.

„Steady – state” fluoreszcencia spektroszkópia

A „steady-state” fluoreszcencia vizsgálatokat termosztálható mintatartóval ellátott Perkin-Elmer LS50B típusú spektrofluoriméterrel végeztük. A hullámhosszat monokromátorral állítottuk a megfelelő értékre. A réseket mind az emissziós, mind pedig a gerjesztési oldalon 5 nm-re állítottuk. Munkánk során az aktin polimerizációs folyamatát jellemző paramétereket (elongációs, depolimerizációs sebesség) a pirén fluoreszcencia emissziójának időbeli változásából határoztuk meg. A kritikus koncentrációt különböző koncentrációjú aktin minták emissziós spektrumai alapján számoltuk. A hőmérsékletfüggő fluoreszcencia rezonancia energia transzfer méréseket 6 és 30°C között végeztük. A transzfer hatásfokát (E) a donor akceptor nélküli (F_D) és akceptor jelenlétében (F_{DA}) mért, az „inner filter” effektusra korrigált fluoreszcencia emissziójából számoltuk (20):

$$E = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D} \quad (2)$$

A FRET hőmérsékletfüggésének nyomon követésével lehetőség nyílik a fehérje eltérő flexibilitású és / vagy konformációs állapotú formái közötti különbség kimutatására. Az energia transzfer hatásfokának és a donor akceptor jelenlétében mért intenzitásának hányadosaként megadható az f' paraméter (21):

$$f' = \frac{E}{F_{DA}} \quad (3)$$

Az f' paraméter hőmérsékletprofilja a donor és akceptor molekula közötti fehérjemátrix flexibilitásáról szolgáltat információt (21,22). Annak érdekében, hogy a különböző mérések eredményeit összehasonlítsuk, meghatároztuk a normált f' értékeit is, mint az adott hőmérsékletre számolt f' paraméter értékeinek és a legkisebb hőmérsékletre (6°C) tartozó értéknek a hányadosa.

Koszedimentációs módszer

A különböző mDia fragmentumoknak az aktin filamentumokhoz való kötődését ultracentrifugáláson alapuló koszedimentációs módszer alkalmazásával vizsgáltuk. A mintákat 400,000 g-n, 30 percig, 20 °C-on centrifugáltuk Beckman Optima Max asztali ultracentrifugával (rotor: TLA-100). Az üledékek és a felülúszók fehérjetartalmát SDS-poliakrilamid gél (12.5 %) analízis alkalmazásával vizsgáltuk. Az egyes fehérjekomponensek sávjainak intenzitását a Syngene Bio-Imaging System gél dokumentációs és kiértékelő műszer segítségével határoztuk meg. Az affinitást (K_d) az alábbi egyenlet alapján számoltuk (23,24):

$$[A]_0 S^2 - ([A]_0 + [mDia]_0 + K_d)S + [mDia]_0 = 0 \quad (4)$$

ahol $[A]_0$ és $[mDia]_0$ jelöli rendre a mintában lévő teljes aktin, illetve formin koncentrációját, S pedig a kötött formin arányát, amit az üledékben található formin sáv és az aktin sáv intenzitásának hányadosaként kaptunk.

A kofilinnel végzett kísérleteinkben a felülúszóban található aktin koncentrációját a felülúszóban (B^{SN}) illetve az üledékben (B^P) található aktin sávok korrigált intenzitásai és a mintában található aktin koncentrációja (c_{aktin}) alapján határoztuk meg:

$$c_{aktin}^{SN} = \frac{B^{SN}}{B^{SN} + B^P} \cdot c_{aktin} \quad (5)$$

Differenciális pásztázó kalorimetriai kísérletek

Az aktin filamentumok termodinamikai tulajdonságait a differenciális pásztázó kalorimetria (DSC) módszerével vizsgáltuk. A kísérleteket SETARAM Micro DSC II kaloriméteren, 0 és 100°C közötti hőmérséklettartományon végeztük. A mérés során kapott denaturációs görbék egyes denaturációihoz tartozó kalorimetrikus entalpiaváltozás értékeket (ΔH) a denaturációs csúcsokra (T_m) illesztett Gauss-görbék területeinek arányaiból számítottuk ki.

A denaturáció entrópiaváltozását (ΔS) a denaturáció hőmérsékletére (T_m) számítva az alábbi képlettel kaptuk:

$$\Delta S = \frac{\Delta H}{T_m} \quad (6)$$

A Gibbs-féle szabadentalpia-változást a következő egyenlet alapján számítottuk ki $T = 22\text{ }^\circ\text{C}$ -ra:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (7)$$

Eredmények és következtetések

Az mDia fehérjék hatása az aktin polimerizációjára

Megmutattuk, hogy a különböző mDia forminok központi FH2 doménjeinek jelenlétében az aktin filamentumok elongációs, illetve depolimerizációs sebessége kisebb, a kritikus koncentráció értéke pedig megnövekszik, összehasonlítva ezen paramétereknek a spontán aktin polimerizációt jellemző értékeivel. Vizsgálataink szerint az mDia1 központi FH2 doménjében létrehozott pontmutációk gátolták a központi FH2 doménnek az aktin polimerizációs folyamatára kifejtett hatását. Eredményeink alapján mindhárom vizsgált formin fragmentum monomér formájú központi FH2 doménje a sapkafehérjékhez hasonló mechanizmus révén, a filamentumok szöges végével kialakított kölcsönhatás következtében, lassítja e vég polimerizációs dinamikáját. A forminban létrehozott mutációk hatásának vizsgálata során tapasztalt funkcióvesztés alapján arra következtethetünk, hogy az általunk vizsgált központi FH2 domén mindkét vége szerepet játszik az aktin filamentumokkal való kölcsönhatás kialakításában.

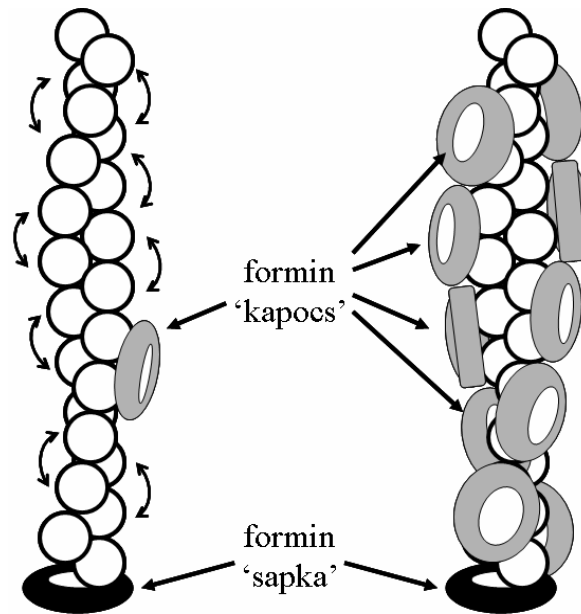
Ellentétes hatást figyeltünk meg a „linker” régiót is tartalmazó mDia1 és mDia3 fragmentumok esetén. Ezen domének feltételezhetően a nukleációs fázisban az aktin nukleuszok képződésének elősegítése révén gyorsítják a polimerizáció folyamatát. A hatásbeli különbségek hátterében a szerkezetbeli sajátosságok állnak. A „linker” régióval rendelkező fragmentumok ugyanis e régió révén képesek diméreket alkotni. A dimerizáció folyamata alapvetően szükséges az aktin polimerizációjának nukleációs fázisára kifejtett gyorsító hatásához.

Megmutattuk továbbá azt is, hogy a vizsgált mDia fehérjék kötnek az aktin filamentumok oldalához.

Az mDia fehérjék hatása az aktin filamentumok konformációjára

Az mDia1-FH2 dimér fragmentumának az aktin filamentumok dinamikai tulajdonságaira kifejtett hatását hőmérsékletfüggő FRET mérések segítségével kívántuk tanulmányozni. Kontroll kísérleteket végeztünk annak érdekében, hogy megvizsgáljuk a FRET módszere alkalmazható-e a formin aktin kölcsönhatás leírására. Eredményeink szerint sem a hőmérséklet, sem pedig a jelölők nem befolyásolták az mDia fragmentumok aktivitását, továbbá az alkalmazott kísérleti körülmények nem módosították az aktin kritikus koncentrációját. Ezek alapján a FRET módszere alkalmazhatónak bizonyult a forminok által kiváltott hatás leírására.

Megmutattuk, hogy a dimér mDia1-FH2 domén jelenlétében módosul az aktin filamentumok konformációja, ami a filamentumok flexibilitásának növekedésében nyilvánul meg. Alacsony koncentrációban jelen lévő dimér mDia1-FH2 fragmentum esetén a flexibilitás a formin koncentrációval együtt növekedett körülbelül 1 : 10 formin : aktin protomér koncentráció arányig, magasabb koncentráció értékek esetén a koncentráció növekedésével egyre kisebb hatást tapasztaltunk. A dimér mDia1-FH2 által előidézett hatás formin : aktin moláris protomér koncentráció aránytól való függése arra enged következtetni, hogy a hatás kiváltásában két mechanizmus játszik szerepet. Figyelembe véve, hogy a forminok mind az aktin filamentumok szöges végéhez (erősebb kötés), mind pedig azok oldalához (gyengébb kötés) képesek kötni (13,25), *jelen munka*) az mDia1-FH2 dimér által kiváltott szerkezeti módosulást a következő módon értelmezhetjük. A filamentumok szöges végéhez kötődő mDia1-FH2 dimér (formin sapka) hosszú hatótávolságú alloszterikus kölcsönhatások révén képes a filamentumok szerkezetét fellazítani, míg a filamentumok oldalához kapcsolódó mDia1-FH2 domének (formin kapsok) a filamentumok szerkezetét stabilizálják (*1. ábra*).



1. ábra: A dimér mDia1–FH2 fragmentum és az aktin filamentumok kölcsönhatását leíró modell sematikus ábrázolása. Az üres körök az aktin filamentumot alkotó protoméreket jelölik, a fekete, illetve a szürke ellipszisek a filamentumok szögcs végére, illetve azok oldalához kötődő formin diméreket jelölik. Az ábra bal oldali része az alacsony formin : aktin arány, a jobb oldali ábra pedig a magas formin : aktin arány esetén jellemző állapotot mutatja.

Vizsgálataink szerint a monomér FH2 fragmentum is előidézte az aktin filamentumok flexibilitásának növekedését. A filamentumok szerkezetében bekövetkezett fellazulás azonban kisebb mértékű volt, mint a dimér fragmentum esetén és az mDia1–FH2 dimér jelenlétében megfigyelt koncentrációfüggést sem tapasztaltuk. Így eredményeink alátámasztják az mDia1–FH2 dimér hatását leíró modellünket.

A formin aktin kölcsönhatás természete

A vizsgált forminoknak az aktin polimerizációs folyamatára és a filamentumok dinamikai tulajdonságaira kifejtett hatása ionerősségfüggést mutatott: magasabb ionerősségen kisebb hatást tapasztaltunk, mint alacsonyabb ionkoncentrációt alkalmazva. Hasonló ionerősségfüggést figyeltünk meg a forminoknak az aktin filamentumok oldalához való kötését jellemző affinitás értékeiben is.

Elképzeléseink szerint a magasabb ionerősségen megfigyelt kisebb hatást a forminok és az aktin között kialakuló kötés gyengülése eredményezi. Eredményeink alapján feltételezzük, hogy a formin – aktin kölcsönhatás kialakításában fontos szerepük lehet a két fehérje között kialakuló elektrosztatikus kölcsönhatásoknak is, és gyengébb kötés azért alakul ki magasabb ionerősségek mellett, mert az oldat hatása leárnyékolja a fehérje csoportok elektrosztatikus kölcsönhatásait.

Az mDia fehérjék hatása az aktin filamentumok funkcionális tulajdonságaira és a kofilinnel való kölcsönhatásukra

Vizsgálataink szerint a forminok hatására módosult konformációs állapotba került aktin filamentumok funkcionális tulajdonságai és más fehérjékkel való kölcsönhatásuk is megváltozott. A forminok jelenlétében flexibilisebb aktin filamentumok termodinamikai stabilitása lecsökkent és az aktin ATPáz enzim hatására során képződő foszfát csoport filamentumokról való disszociációjának sebessége megnőtt. Ezek alapján szoros korreláció áll fenn az aktin filamentumok flexibilitása és funkcionális tulajdonságai között.

A forminok által fellazított aktin filamentumoknak módosult a kofilinnel való kölcsönhatásuk is. Megmutattuk, hogy az mDia1-FH2 dimér által nukleált, flexibilisebb filamentumokat a kofilin hatékonyabban depolimerizálja.

Eredményeink biológiai jelentősége: egy lehetséges új mechanizmus az aktin citoskeleton szabályozásában

Az élő sejtekben előforduló aktin struktúrákat morfológiájuk és a sejten belüli elhelyezkedésük alapján csoportosíthatjuk. Az eltérő aktin képletek a sejt különböző funkcióiban játszanak szerepet. Számos megfigyelés utal arra, hogy az egyes képleteket alkotó aktin filamentumok más és más fehérjékkel vannak kapcsolatban (26,27). A munkánk eredményei alapján felállított hipotézis szerint a forminok kötődésük révén képesek megváltoztatni az aktin filamentumok konformációs állapotát. A forminok kötődésének hatására módosult konformációs állapotba került aktin filamentumoknak az egyes aktin-kötő fehérjékhez való affinitásuk megnő, más fehérjék kötésére mutatott affinitásuk lecsökken a módosítatlan filamentumok affinitásához képest. Ezen tulajdonságuk révén a forminok meghatározó szerepet játszhatnak az aktin és az aktin-kötő fehérjék között kialakuló szupramolekuláris kölcsönhatások szabályozásában.

A jelen munkánk során megalkotott hipotézis általános érvényű is lehet a citoskeletonális fehérjekomplexek szabályozásában. A nukleációs faktorok sajátosága, hogy az aktin-kötő fehérjék közül elsőként kerülnek kapcsolatba a keletkező filamentumokkal. A forminokkal végzett kísérleteink során tett megállapításainkat általánosítva elképzelhető, hogy a fehérje komplexek térbeli és időbeli kialakulásának szabályozásában meghatározó a nukleációs faktorok azon tulajdonsága, mely szerint az aktin filamentumokhoz való kötődésük révén képesek módosítani azok konformációját és így az aktin-kötő fehérjékhez való affinitásukat. Ennek révén az aktin filamentumok nem pusztán passzív szálak, hanem aktív résztvevőként - információ továbbítására alkalmas szabályozó csatornaként - vesznek részt a sejtek működése során végbemenő folyamatokban.

Összefoglalás

Munkánk során megállapítottuk, hogy:

- Az mDia fehérjék monomér formájú központi FH2 doménje, az aktin filamentumok szöges végéhez kötődve lassítja a filamentumok polimerizációját.
- Az mDia1 központi FH2 doménjében létrehozott mutációk vizsgálata során tapasztalt funkcióvesztés alapján az általunk vizsgált központi FH2 domén mindkét vége szerepet játszik az aktin filamentumokkal való kölcsönhatás kialakításában.
- Az FH2 domén amino-terminálisán található flexibilis „linker” régiót is tartalmazó mDia fragmentumok az aktin polimerizációs folyamatát gyorsítják a nukleációs fázis elősegítése révén.
- A hatásbeli különbségek hátterében a fehérjék szerkezetében megfigyelhető eltérések állnak. A flexibilis „linker” régiót tartalmazó domének ugyanis képesek összekapcsolódásuk során diméreket alkotni. A dimerizáció, illetve a dimerizáció létrejöttében alapvető szerepet játszó „linker” régió szükséges a fehérje *in vivo* funkciójának a betöltéséhez.
- A dimér mDia1-FH2 fragmentum jelenlétében módosulnak az aktin filamentumok dinamikai tulajdonságai. A filamentumok szöges végéhez kapcsolódó formin dimérek alloszterikus kölcsönhatások révén azok szerkezetét fellazítják, míg a filamentumok oldalához kapcsolódó formin dimérek stabilizáló hatást fejtenek ki.
- A dimér fragmentum hatására flexibilisebb konformációs állapotba került aktin filamentumok funkcionális sajátosságai is megváltoztak:
 - csökkent a filamentumok termodinamikai stabilitása,
 - megnőtt az aktin ATPáz enzimátikus hasítása során képződő foszfát filamentumokról való leválásának a sebessége,
 - valamint módosult a filamentumok kofilinnel való kölcsönhatása is.

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Bugyi B., G. Papp, G. Hild, D. Lőrinczy, EM. Nevalainen, P. Lappalainen, B. Somogyi, M. Nyitrai: Formins regulate actin filament flexibility through long-range allosteric interactions. *Journal of Biological Chemistry*, **281.**, 10727-10736, 2006. IF: 6.355

Shimada A., M. Nyitrai , IR. Vetter, D. Kuhlmann, B. Bugyi, S. Narumiya, MA. Geeves, A. Wittinghofer: The core FH2 domain of diaphanous-related formins is an elongated actin binding protein that inhibits polymerization. *Molecular Cell*, **4.**, 511-522, 2004. IF: 16.811

Az értekezéshez kapcsolódó előadások

Bugyi B., G. Papp, G. Hild, D. Lőrinczy, Z. Ujfalusi, Sz. Barkó, B. Somogyi and M. Nyitrai: Formins regulate actin filament flexibility through long-range allosteric interactions. 2006. június 15-17., EMBO/HHMI Central European Scientists Meeting, Dubrovnik, Horvátország.

Bugyi B., G. Papp, Z. Ujfalusi, Sz. Barkó, M. Nyitrai and B. Somogyi: Formin caps and cramps on actin filaments: A possible mechanism to regulate the formation of cytoskeletal protein complexes. 2005. szeptember 25-28., 8th International Symposium on Instrumental Analysis, Graz, Ausztria.

Az értekezéshez kapcsolódó poszterek

Bugyi B., G. Papp, Z. Ujfalusi, G. Hild, M. Nyitrai: The FH2 domain of Diaphanous Related formin mDia1 affects the dynamic properties of actin filaments. Meeting of International Research Scholars. 2005. június 22-25., Mérida, Mexikó.

Bugyi B., Papp G., Barkó Sz., Ujfalusi Z., Nyitrai M.: A formin homológ 2 domén hatása az aktin filamentumok dinamikájára. Magyar Biofizikai Társaság XXII. Kongresszusa, 2005. június 26-29., Debrecen.

Bugyi B., Kelemen F., Barna I., Nyitrai M.: A formin homológ 2 domén hatása az aktin polimerizációjára. XXXIV. Membrán-Transzport Konferencia, 2004. június 1-4., Sümeg.

Az értekezésben nem szereplő közlemények

Papp G.*, Bugyi B.*, Z. Ujfalusi, Sz. Barkó, G. Hild, B. Somogyi, M. Nyitrai: Conformational changes in actin filaments induced by formin binding to the barbed end. *Biophysical Journal*, 2006., in press. IF: 4.584

Halasi Sz., G. Papp, B. Bugyi, Sz. Barkó, J. Orbán, Z. Ujfalusi and B. Visegrády: The Effect of Pyrene Labelling on the Thermal Stability of Actin Filaments. *Thermochim. Acta*, **Vol. 445.**, 185 – 189, 2006. IF: 1.161

Bugyi B., G. Papp, Sz. Halasi, B. Visegrády: The effect of toxins on the thermal stability of actin filaments by differential scanning calorimetry. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, **Vol. 82.**, 275 – 279, 2005. IF: 1.478

Orbán J., Sz. Halasi, G. Papp, Sz. Barkó, B. Bugyi: Thermodynamic Characterisation of Different Actin Isoforms. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, **Vol. 82.**, 287 – 290, 2005. IF: 1.478

Papp G., B. Bugyi, Z. Ujfalusi., Sz. Halasi, J. Orbán: The Effect of pH on the Thermal Stability of Alpha-Actin Isoforms. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, **Vol. 82.**, 281 – 285, 2005. IF: 1.478

A cikkek összesített impakt faktora: 33.345

*: közös első szerzők

Irodalomjegyzék

1. Blanchoin, L., and Pollard, T. D. (2002) *Biochemistry* **41**(2), 597-602
2. Pollard, T. D., Blanchoin, L., and Mullins, R. D. (2000) *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **29**, 545-576
3. Pollard, T. D., and Cooper, J. A. (1986) *Annu Rev Biochem* **55**, 987-1035
4. Machesky, L. M., Atkinson, S. J., Ampe, C., Vandekerckhove, J., and Pollard, T. D. (1994) *J Cell Biol* **127**(1), 107-115
5. Higgs, H. N., and Pollard, T. D. (2001) *Annu Rev Biochem* **70**, 649-676
6. Baum, B., and Kunda, P. (2005) *Curr Biol* **15**(8), R305-308
7. Quinlan, M. E., Heuser, J. E., Kerkhoff, E., and Mullins, R. D. (2005) *Nature* **433**(7024), 382-388
8. Higgs, H. N. (2005) *Trends Biochem Sci* **30**(6), 342-353
9. Wallar, B. J., and Alberts, A. S. (2003) *Trends Cell Biol* **13**(8), 435-446
10. Xu, Y., Moseley, J. B., Sagot, I., Poy, F., Pellman, D., Goode, B. L., and Eck, M. J. (2004) *Cell* **116**(5), 711-723
11. Pruyne, D., Evangelista, M., Yang, C., Bi, E., Zigmond, S., Bretscher, A., and Boone, C. (2002) *Science* **297**(5581), 612-615
12. Kovar, D. R., Harris, E. S., Mahaffy, R., Higgs, H. N., and Pollard, T. D. (2006) *Cell* **124**(2), 423-435
13. Romero, S., Le Clainche, C., Didry, D., Egile, C., Pantaloni, D., and Carlier, M. F. (2004) *Cell* **119**(3), 419-429
14. Higashida, C., Miyoshi, T., Fujita, A., Ocegüera-Yanez, F., Monypenny, J., Andou, Y., Narumiya, S., and Watanabe, N. (2004) *Science* **303**(5666), 2007-2010
15. Feuer, G., Molnár, F., Pettkó, E., and Straub, F. B. (1948) *Hung. Acta Physiol.* **1**, 150-163
16. Spudich, J. A., and Watt, S. (1971) *J. Biol. Chem.* **246**(15), 4866-4871.
17. Strzelecka-Golaszewska, H., Moraczewska, J., Khaitline, S. Y., Mossakowska, M. (1993) *Eur J Biochem* **211**, 731-742
18. Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., and Gray, T. (1995) *Protein Science* **4**(11), 2411-2423
19. Webb, M. R. (1992) *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(11), 4884-4887
20. Lakowicz, J. R. (1983) *Principles of fluorescence spectroscopy*, Plenum Press, New York
21. Somogyi, B., Matkó, J., Papp, S., Hevessy, J., Welch, G. R., and Damjanovich, S. (1984) *Biochemistry* **23**, 3403-3411
22. Somogyi, B., Lakos, Z., Szarka, A., and Nyitrai, M. (2000) *J. Photochem. Photobiol. B* **59**(1-3), 26-32
23. Kurzawa, S. E., and Geeves, M. A. (1996) *J Muscle Res Cell Motil* **17**(6), 669-676
24. Nyitrai, M., Szent-Gyorgyi, A. G., and Geeves, M. A. (2003) *Biochem J* **370**(Pt 3), 839-848
25. Li, F., and Higgs, H. N. (2003) *Curr Biol* **13**(15), 1335-1340
26. Iida, K., and Yahara, I. (1999) *Genes Cells* **4**(1), 21-32
27. Pruyne, D. W., Schott, D. H., and Bretscher, A. (1998) *J Cell Biol* **143**(7), 1931-1945
28. Cooper, J. A., Walker, S. B., and Pollard, T. D. (1983) *J Muscle Res Cell Motil* **4**(2), 253-262