

# Tropomiozin és nehéz meromiozin hatása a formin által nukleált aktin filamentumok flexibilitására

**Ujfalusi Zoltán**

Témavezető: PROF. DR. NYITRAI MIKLÓS

Doktori iskola:	Interdiszciplináris Orvostudományok D93
Doktori iskola vezetője:	Prof. Dr. Sümegi Balázs
Program:	B-130; Funkcionális fehérjedinamika vizsgálata biofizikai módszerekkel
Programvezető:	Prof. Dr. Nyitrai Miklós

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar,

Biofizikai Intézet



2012

# 1 Általános bevezető

## 1.1 Aktin

Az aktin filamentumok számtalan folyamatban játszanak nélkülözhetetlen szerepet az eukarióta sejtekben, többek között a sejtek alakjának, polaritásának meghatározásában, sejtosztódásban, intracelluláris vezikulák transzportjában, stb. Ezen folyamatok legtöbbje úgynevezett aktin-kötő fehérjék segítségével megy végbe, melyek hatására az aktin filamentumok különbözőképpen rendeződnek. Az aktint egy fiatal biokémikus, Straub Ferenc Brúnó fedezte fel Szent-Györgyi laboratóriumában 1942-ben. (További információ: <http://actin.aok.pte.hu/archives/>)

Az aktin a mikrofilamentális hálózat fő alkotóeleme és 15%-át teszi ki a vázizmok teljes fehérjetartalmának. Molekulasúlya 42,3 kDa és 375 aminosav építi fel. Sejtekben két formában található meg, egyik a monomer, vagy globuláris forma (G-aktin), míg a másik a polimer, vagy filamentális forma (F-aktin). A filamentumok monomerekből épülnek fel, melyek nem-kovalens kötéssel rögzülnek egymáshoz. Az aktin polimerizációja három fő szakaszra bontható. Az első fázis a monomerek aktivációjával kezdődik, melyet a nukleáció követ. Nukleáció során két, majd három monomer összekapcsolódásával képződik a nukleusz. E lépés termodinamikailag kedvezőtlen mivolta magyarázza a keletkező dimerek és trimerek instabilitását. A polimerizáció következő lépése a diffúzió vezérelte elongáció, ahol a monomereknek a képződő filamentumba való beépülése dominál. Az utolsó fázisra a dinamikus egyensúly jellemző, melyben a filamentumok mindkét végén monomerek épülnek be és válnak is le róla különböző kinetikával. Az egyik végén főként a monomerek beépülése (asszociáció) dominál, míg a másik végén inkább leválásuk a filamentumról (disszociáció) a fő folyamat és mindeközben a filamentum hossza nem változik. Mondhatjuk, hogy a filamentumok polarizáltak, van egy dinamikusan növekvő pozitív végük és egy negatív végük, ahol a protomerek disszociációja a domináns folyamat. A filamentumok növekvő végén elhelyezkedő protomerek ATP-t kötnek, míg a rövidülő végén lévő protomerek ADP-t kötnek (mert az ATP elhidrolizál, mire a protomerek a negatív végre érnek).

## 1.2 Forminok szerepe az aktin regulációjának szabályozásában

A forminok az eukariótákban az evolúció során konzervált fehérjék, melyek egy erősen konzervált alegységük az ún. formin homológia domén 2 (FH2) jelenlétével azonosíthatók. Hatásaikat az aktin és mikrotubulus rendszereken keresztül fejtik ki, például meiózis, mitózis során, sejt polaritásának kialakításában, sejtmozgásokban, filopódiumok kialakításában, endocitózisokban, endoszómák mozgásában, embrionális fejlődés során, spermium akroszóma formáció kialakításában, stb.. A forminoknak az aktinra gyakorolt hatása igen erős, mindössze 5-200 nM formin mennyiség elegendő erőteljes nukleáció és/vagy elongáció létrehozásához *in vitro*. A forminok multidomén szerkezetű fehérjék, melyek állat- és növényfajok széles körében megtalálhatók és képviselőiket családokba rendezik.

Zigmond modelljének megfelelően az FH2 domén szükséges és elégséges feltétele az aktin nukleációjának és a dimerek stabilizálásának. Ez a nagyon gyors folyamat nem történhet az FH2 domének gyors kapcsolódásával és leválásával, hanem sokkal valószínűbb, hogy az FH2 a helyén marad és mintegy „sétál” a filamentum véggel, míg az növekszik. Így még védelmet is nyújthat sapkafehérjék ellen, miközben biztosítja újabb és újabb monomerek gyors beépülését.

A forminok a legnagyobb befolyást az aktin citoskeletonra gyakorolják és segítségükkel hosszú, elágazásmentes filamentumok jönnek létre.

## 1.3 Tropomiozin

A tropomiozinok (Tm) nagy családjába sok gén terméke tartozik, melyek egytől egyig a vékony filamentumok komponensei. A tropomiozinok az aktin filamentumok alfa-hélixének árkához kötődnek és nélkülözhetetlen szerepet töltenek be az izom-kontrakció szabályozásában. Nemizom sejtekben a tropomiozinok számos folyamat résztvevői, úgymint sejtosztódás, vezikula transzport, motilitás és morfogenezis. 1948-ban történt felfedezése óta az izomban betöltött szerepét több ízben is publikálták már, de a nem-izom sejtek tropomiozin izoformáinak pontos funkcióit és hatásmechanizmusát mind a mai napig homály fedi.

## **1.4 Miozin és nehéz meromiozin**

A miozin meghatározás az igen szerteágazó molekuláris motorok szuperfamilájára utal. Képesek aktin filamentumokat vagy más fehérjéket mozgatni/szállítani rögzített aktin filamentumok felszínén. A miozin szuperfamilád legkevesebb 35 különböző osztályra bontható. Kontraktilis aktivitásuk leginkább a differenciált izomszövetekben jellemző, de emellett nem-izom sejtekben is megfigyelték a különböző sejtszintű folyamatokban, mint pl. sejtosztódásban, sejt migrációban és sejt-sejt vagy sejt-mátrix adhéziókban betöltött szerepét.

A miozin II  $\alpha$ -kimerotripsinnel való emésztésével juthatunk legegyszerűbben nehéz meromiozinhoz (HMM), melyet oldhatósága miatt széles körben alkalmaznak a kísérletekben.

A nehéz meromiozinokat  $\alpha$ -helikális csavart-csavar (coiled-coil) szerkezetben dimerizálódott két motor domén alkotja.

## 2 Célkitűzések

Fluoreszcencia spektroszkópiás kísérletek már korábban bizonyították, hogy a formin fragmentumok képesek megnövelni az aktin filamentumok flexibilitását, miután azok pozitív végéhez kötődnek. Ezen kísérletes eredmények kiemelték a forminok által az aktin szerkezetében kiváltott intramolekuláris konformáció változás jelentőségét. A létrejött flexibilis aktin filamentumoknak feltehetőleg pontosan meghatározott biológiai szerepük van, mely adott intracelluláris körülmények között bizonyos feladatok elvégzésére teszi alkalmassá azokat. Célul tűztem ki, hogy találjak olyan aktin-kötő fehérjéket, melyek képesek befolyásolni ezt a formin indukálta flexibilitást.

Több aktin-kötő fehérje is képes befolyásolni a formin segítségével létrejött lazább szerkezetű aktin filamentumok konformációját. Ezen fehérjék egyike a tropomiozin, mely képes visszaállítani a formin indukálta konformációs változásokat és így módon stabilizálni az aktin filamentumot. A másik fehérje, a miozin, az egyik leggyakoribb aktin-kötő fehérje, mely szintén képes kötődni a formin által nukleált aktin struktúrákhoz a sejtekben. A miozinok aktin filamentumokhoz való kooperatív kötődése függ az adott miozin izoformától. Így, a miozinnak minden esélye megvan, hogy módosítsa a formin által indukált aktin filamentumok konformációs dinamikáját. Célul tűztük ki, hogy az alábbi kérdéseket megválaszoljuk:

- Hogyan befolyásolják a formin fragmentumok az aktin filamentumok struktúráját?
- Milyen hatással bír a tropomiozin az mDia1FH2 indukálta aktin filamentumok flexibilitására?
- Ionerősség-függő-e a tropomiozin hatás?
- Van-e a nehéz meromiozinnak a flexibilis aktin filamentumokra gyakorolt hatása?

## 3 Kísérleti módszerek

### **3.1 Fehérjék preparálása és tisztítása**

Az aktint, az mDia1FH2 formin fragmentumot, a tropomiozint és a nehéz meromiozint korábban leírt módszerek alapján készítettük.

### **3.2 Az aktin fluoreszcens jelölése**

Az aktint Miki és munkatársai protokolljai alapján jelöltük meg IAEDANS és IAF jelölőkkel a 374-es cisztein aminosavon.

### **3.3 Koszedimentációs vizsgálatok**

A formin aktinhoz való kötődésének vizsgálatához az aktint éjszakán át polimerizáltuk formin hiányában, ill. különböző koncentrációinak jelenlétében. Ezután a mintákat lecentrifugáltuk és a felülúszókat, valamint a pelleteket elkülönítve SDS-poliakrilamid géltre vittük fel. Futtatás után az adott sávokat Syngene Bio-Imaging rendszerrel analizáltuk.

### **3.4 Hőmérséklet-függő Förster-féle rezonancia energia transzfer (FRET) mérések**

A transzferhatásfok kiszámításához a donor jelölő (IAEDANS) fluoreszcencia intenzitását vettük fel az akceptor jelenlétében illetve hiányában. A FRET eredmények interpretációjára a normált  $f'$  paraméter hőmérséklet-függését használtuk. Ha a hőmérséklet-változás hatására nagyobb mértékben változik az  $f'$  paraméter, akkor az egy flexibilisebb fehérjemátrix jelenlétére utal.

### **3.5 Steady-state anizotrópia mérések**

IAEDANS-jelölt aktin filamentumokat tartalmazó mintáinkat síkban polarizált fényvel világítottuk meg és az emittált fluoreszcencia polarizációfokát analizáltuk. Az abszorpció és az emisszió közötti időintervallumban a molekulák ki tudnak mozdulni a polarizáció síkjából,

így az emittált fényük adott szögben depolarizálttá válik. Ez a szög attól függ, milyen mértékben mozdult el az adott molekula. Kisebb molekulák és flexibilis fehérjemátrixok gyorsabban mozognak és a depolarizáció szöge is nagyobb, mint a merevebb, rigidebb protein struktúrák esetén.

### **3.6 Steady-state fluoreszcencia kioltás kísérletek**

A kioltás során kapott primer adatokat a módosított Stern-Volmer egyenlettel (Lehrer egyenlet) értékeltük ki, mivel ez adott megbízható eredményeket abban az esetben is, amikor több fluorofór populációnk volt a mintákban, különböző hozzáférhetőségekkel.

### **3.7 Fluoreszcencia élettartam kioltás kísérletek**

A fluoreszcencia élettartam értékeket két-exponenciális lecsengés modell alkalmazásával, az illesztés pontosságát pedig  $\chi^2$ -próbával határoztunk meg. Az átlagos fluoreszcencia élettartamot diszkrét élettartam-eloszlásokból határoztuk meg.

### **3.8 Fluoreszcencia élettartam és emissziós anizotrópia lecsengés mérések**

Frissen készített glikogén oldatot használtunk referenciának, mivel ennek élettartama 0 ns. A fluorofór fluoreszcencia élettartamát nemlineáris legkisebb négyzetek analízisével határoztuk meg. Az átlag fluoreszcencia élettartamokat ( $\tau_{\text{aver}}$ ) diszkrét élettartam eloszlások eredményéből határoztuk meg. Az anizotrópia lecsengése exponenciálisok összegeként értelmezhető, így a kísérletesen meghatározott adatokra kettős exponenciális függvényt illesztettünk.

## 4 Új eredmények

1. Az mDia1FH2 formin fragmentum indukálta aktin filamentum szerkezetbeli átrendeződése fluoreszcencia emissziós anizotrópia módszerrel is kimutatható, a szerkezetbeli változás időbeni kialakulása jól nyomon követhető.
2. mDia1FH2 az alkalmazott ionerősség függvényében megváltoztatja az egyes aktin protomerek 1-es szubdoménjének konformációját.
3. A formin által fellazított aktin filamentum szerkezetét a tropomiozin stabilizálja, miközben az aktin filamentumhoz való affinitása nem változik. A tropomiozin és az aktin filamentumok interakciójára a kálium-ion koncentráció nincs hatással, míg a magnézium-ion koncentráció jelentősen befolyásolja azt.
4. Nehéz meromiozin stabilizálja a formint kötő, flexibilis aktin filamentumok szerkezetét.



## 5 Eredmények megbeszélése

### **5.1 Az mDia1-FH2 hatása az aktin filamentumok szerkezetére (fluoreszcencia kioltás)**

Először a formin bekötése által indukált konformációs változásokra próbáltunk fókuszálni. Ehhez steady-state és idő-függő fluoreszcencia kioltás módszerek alkalmazása bizonyult a leginformatívabb módszereknek vizsgálatainkhoz. Egy semleges kioltóval, akrilamiddal karakterizáltuk az aktin protomerekhez (Cisz-374) kovalensen kötött IAEDANS jelölő hozzáférhetőségét. Akrilamid hiányában az IAEDANS fluoreszcencia emissziójának intenzitása alacsonyabb volt formin jelenlétében, ami arra utal, hogy az FH2 domén kötése megváltoztatta az aktin 1-es alegységének mikrokörnyezetét.

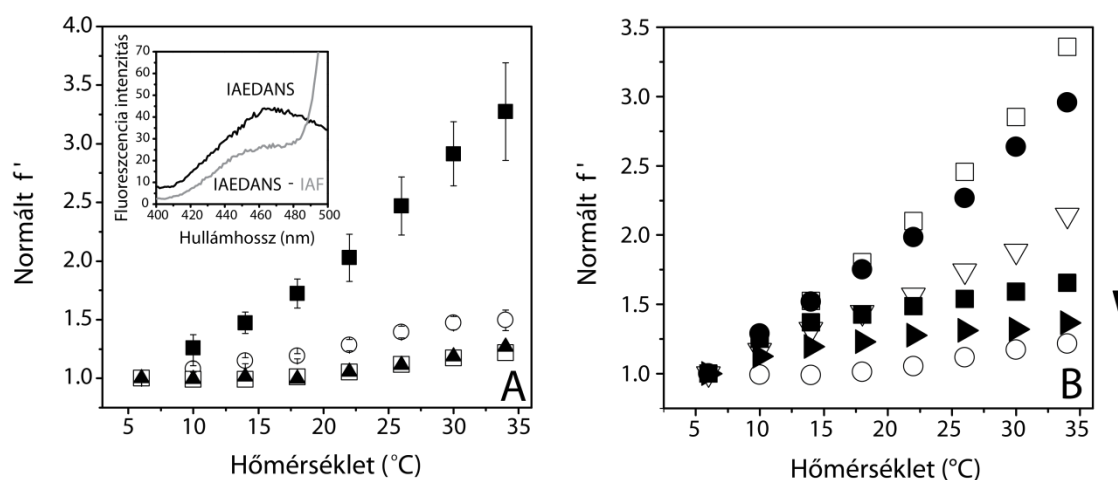
Lehrer-egyenlettel kiértékelve adatainkat, nagyobb  $K_{SV}$  értékeket kaptunk, amikor formin is jelen volt a mintákban. 500 nM mDia1FH2 koncentrációnál a  $K_{SV}$  értéke kb. háromszor nagyobb volt ( $6.2 \pm 0.1 \text{ M}^{-1}$ ), mint formin hiányában, és a hozzáférhető fluorofórok hányada ( $\alpha$ ) lecsökkent 71 %-ra. Hogy a megfigyelt hatást jobban megvizsgáljuk, megismételtük a kísérleteket különböző formin koncentrációk alkalmazásával. Az adatok szerint a formin fragmentnek az aktin konformációjára gyakorolt hatása erősen függ a formin : aktin koncentrációaránytól. A legnagyobb  $K_{SV}$  értéket 500 nM formin koncentrációnál figyeltük meg. E fölött a  $K_{SV}$  lecsökkent és 3  $\mu\text{M}$  formin koncentrációnál már ugyanazt az értéket mutatta ( $2.2 \pm 0.1 \text{ M}^{-1}$ ), mint a kezdeti, formin nem tartalmazó minták esetén ( $2.3 \pm 0.1 \text{ M}^{-1}$ ).

Tovább vizsgáltuk ezt a hatást magasabb ionerősség alkalmazásával is (50 mM KCl és 1 mM  $\text{MgCl}_2$ ), hogy lássuk, érzékeny-e a kioltás a só koncentrációra. A forminnak az aktin filamentumokra gyakorolt hatása függött az ionerősségtől.

Az így kapott  $K_{SV}$  értékek jól összevethetők idő-függő kioltásos eredményeinkkel, ezáltal bizonyosak lehetünk afelől, hogy a statikus kioltás hozzájárulása a teljes kioltási folyamathoz elhanyagolható.

## 5.2 A formin által indukált, megnövekedett flexibilitás visszaállítása I.

Szkeletális izom tropomiozinnak és nehéz meromiozinnak a formint-kötő aktin filamentumokra gyakorolt hatását steady-state és időfüggő fluoreszcencia vizsgálati módszerek alkalmazásával vizsgáltuk. Mivel a teljes miozin az általunk is alkalmazott relatív alacsony ionerőn precipitál, így miozin fragmentumokat használtunk vizsgálatainkhoz. Az első alkalmazott módszer ugyanaz a hőmérséklet-függő FRET módszer volt, mellyel régebben kimutattuk a forminnak az aktin filamentumokra gyakorolt flexibilitást növelő hatását. Most is e módszer használatával karakterizáltuk a tropomiozinnak és a nehéz meromiozinnak a formin-kötés által fellazított szerkezetű aktin filamentumok dinamikai tulajdonságait befolyásoló hatását (I. ábra).



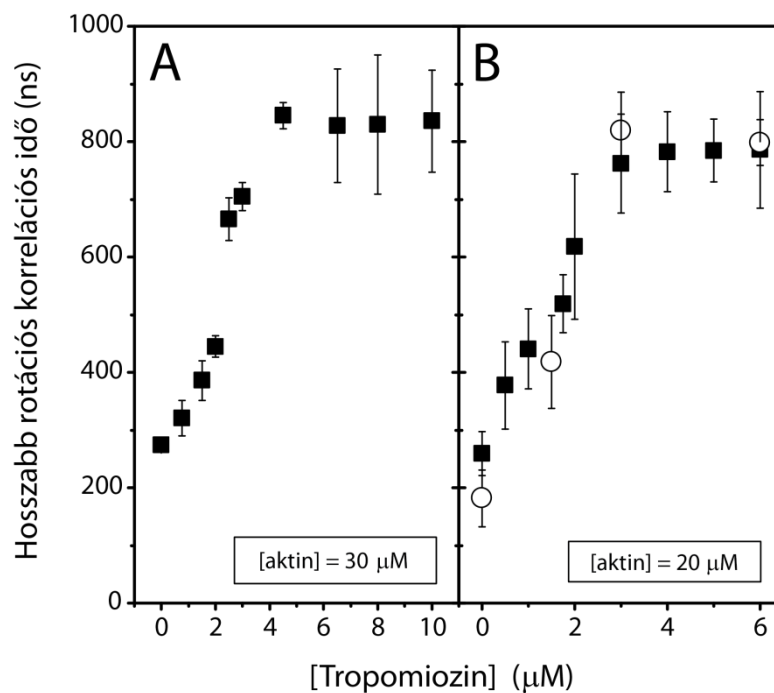
I. ábra – A normált transzferhatásfok (relatív  $f'$ , flexibilitás) aktin filamentumokon.

(A) Tropomiozin csökkenti a formint-kötő aktin filamentumok flexibilitását. A kísérleteket  $10 \mu\text{M}$  aktinnal végeztük aktin-kötő fehérjék hiányában (üres négyzetek), vagy  $500 \text{ nM}$  mDia1-FH2 jelenlétében (teli négyzetek). Tropomiozin ( $2 \mu\text{M}$ ) jelenlétében forminnal (üres körök) és formin nélkül (teli háromszögek) mért adatok szintén fel vannak tüntetve az ábrán. Az ábrán látható hibajelzések legalább három, egymástól független mérés hibáiból tevődnek össze. A belső kis ábra aktin-kötő fehérjék hiányában mutatja a donor molekula emissziójának fluoreszcencia intenzitását akceptor jelenlétében (IAEDANS-IAF) és a nélkül (IAEDANS).

(B) Nehéz meromiozin csökkenti a formint-kötő aktin filamentumok flexibilitását. A kísérleteket  $5 \mu\text{M}$  aktinnal végeztük aktin-kötő fehérjék hiányában (üres körök), vagy  $500 \text{ nM}$  mDia1-FH2 jelenlétében (üres négyzetek). Formin jelenlétében, különböző HMM koncentrációkon ( $1 \mu\text{M}$  (teli körök),  $3 \mu\text{M}$  (üres háromszögek),  $5 \mu\text{M}$  (teli négyzetek) vagy  $10 \mu\text{M}$  (teli háromszögek)) mért adatok szintén fel vannak tüntetve az ábrán. A nyíl az ábra jobb oldalán a növekvő HMM koncentráció irányát mutatja.

### 5.3 A formin által indukált, megnövekedett flexibilitás visszaállítása II.

FRET méréseink megerősítése végett anizotrópia lecsengés méréseket végeztünk. Ezt a módszert már több ízben is alkalmaztuk korábban az aktin dinamikai tulajdonságainak leírására. Kísérleteinket IAEDANS-jelölt aktin filamentumokkal végeztük. Az adatok kiértékelésénél két rotációs korrelációs időt kaptunk. A rövidebb rotációs korrelációs idő értéke 1-4 ns közé esett és nem mutatott formin-, tropomiozin- vagy nehéz meromiozin-függést. A hosszabb rotációs korrelációs idő értéke függött az alkalmazott formin koncentrációtól. Értéke  $\sim 700$ - $900$  ns formin hiányában, ami lecsökkent  $\sim 225$ - $250$  ns értékre  $500$  nM mDia1-FH2 jelenlétében (2. és 3. ábra). Ez a megfigyelés összhangban van előző eredményeinkkel, tehát a formin rugalmasabbá teszi az aktin filamentumokat. Tropomiozin jelenlétében a hosszú rotációs korrelációs idő megnőtt, ami azt mutatja, hogy a formint kötő aktin filamentumok flexibilitása jelentősen csökkent a tropomiozin koncentrációjának megfelelő mértékben.

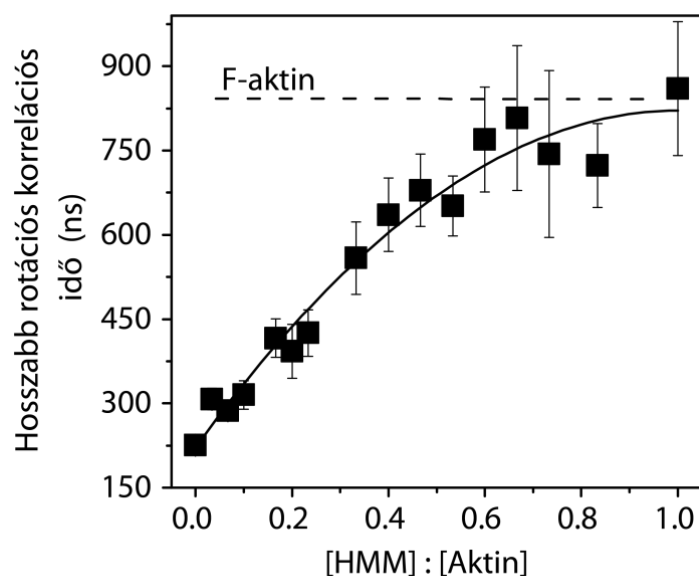


2. ábra – A tropomiozin koncentrációjának megfelelő mértékben befolyásolja a formin-kötött IAEDANS-aktin filamentumok rotációs korrelációs idejét. Az A panelen az aktin koncentrációja  $30 \mu\text{M}$  volt és az mDia1FH2 formin fragmentumé  $1.25 \mu\text{M}$ . A B panelen szintén a hosszabb rotációs korrelációs idő tropomiozin-függése látható, de itt az aktin koncentrációja  $20 \mu\text{M}$  és az mDia1FH2 formin fragmentumé  $500$  nM (teli négyzetek) vagy ez helyett kontrollként alkalmazott mDia1FH1FH2 formin fragmentumé szintén  $500$  nM (üres körök) volt. Az ábrán feltüntetett hibák legalább három független mérésből adódnak.

Koszedimentációs kísérleteket végeztünk annak kizárására, hogy a formin esetleg gyengítené a tropomiozin aktinra vonatkozó affinitását. A pelletekben lévő tropomiozin mennyisége nem függött a formin jelenlététől, így megbizonyosodhattunk arról, hogy az mDia1FH2 nem befolyásolja a Tm affinitását az aktinhoz.

Korábbi tanulmányok szerint a forminok aktin filamentumokra vonatkozó hatása függ az ionerősségtől, így megvizsgáltuk kálium és magnézium sók hatását a formin-kötött aktin és tropomiozin interakciójára. Fluoreszcencia anizotrópia lecsengés mérésével kimutattuk, hogy a Tm és az aktin közötti kapcsolat magnézium-függő. Tropomiozin aktinhoz való affinitása és a kapcsolódó asszociációs és disszociációs sebességi állandók függenek a magnézium koncentrációtól. Az affinitás érték magasabb, nagyobb  $MgCl_2$  koncentráció esetén ( $K_D = 2,4 \mu M$ , ha a magnézium koncentrációja  $0,5 \text{ mM}$  és  $K_D = 0,5 \mu M$ , ha  $2,5 \text{ mM}$  a  $MgCl_2$ ).

Megismételtük az anizotrópia lecsengés kísérleteket formint kötő aktin filamentumokkal, különböző koncentrációban hozzáadott HMM jelenlétében. (3. ábra).



3. ábra – A nehéz meromiozin koncentrációjának megfelelő mértékben befolyásolja a formin-kötött IAEDANS-aktin filamentumok rotációs korrelációs idejét. A szaggatott vonal az aktin filamentumokon mért rotációs korrelációs időt mutatja formin és HMM hiányában. Az aktin koncentrációja mindenhol  $30 \mu M$  és a forminé  $1,25 \mu M$ . Az ábrán feltüntetett hibák legalább három független mérésből adódnak.

A hosszabb rotációs korrelációs idő értéke emelkedik, minél nagyobb koncentrációban van jelen Tm vagy HMM. Tehát a formin-kötött aktin filamentumok szerkezete merevebbé válik Tm- ill. HMM-kötött állapotban.

### **5.4 A formin által indukált, megnövekedett flexibilitás visszaállítása III.**

Steady-state fluoreszcencia anizotrópia méréseink megerősítették előző eredményeinket. A steady-state anizotrópia adatok információt adnak a küvettában lévő kísérleti anyagunk flexibilitásáról. Minél magasabb az anizotrópia értéke, annál merevebb a protein mátrix. Ezeket a kísérleteket is IAEDANS-jelölt aktin filamentumokkal végeztük.

Amikor az aktin filamentumokat önmagukban vizsgáltuk, 0,25-0,26 fluoreszcencia anizotrópia értékeket kaptunk. Ha az aktint polimerizáló körülmények között 500 nM mDia1FH2 formin fragmentummal (minden esetben ez volt az alkalmazott formin koncentráció) inkubáltuk éjszakán át, akkor az anizotrópia lecsökkent 0,14-0,17 értékre, az inkubáció idejétől függően.

Ez a megfigyelés összeegyeztethető más módszerekkel kapott korábbi eredményeinkkel és megerősíti a tényt, hogy formin-kötés hatására a fehérje mátrix flexibilitása megnő.

Különböző koncentrációkban a fellazult szerkezetű aktin filamentumokhoz adott tropomiozin lassan elkezdte növelni az anizotrópia értékét, mely ~ 30 perc után elérte platóját ~ 0,25 körüli anizotrópia értéken.

Éjszakán át tartó inkubáció után a fellazult szerkezetű filamentumokhoz adott HMM (koncentrációjától függően) nagyon gyorsan visszaállította (platót 1 percen belül elérte) az anizotrópia értéket a 0,24-0,26 körüli, az aktin filamentumokra önmagukban jellemző értékre.

## 6 Összefoglalás

Fluoreszcencia kioltás kísérleteinkkel bebizonyítottuk, hogy a kioltó molekulák jobban hozzáférnek a formint kötő aktin filamentumok protomereikhez. Tehát formin hatására a kioltás mértéke megváltozott, ami azt mutatja, hogy a Cisz-374 aminosav körüli protein mátrixnak, tehát az aktin protomerek 1-es szubdoménjének konformációja átalakult. Ezek az intramolekuláris változások egyértelműen arra mutatnak, hogy formin kötés hatására az aktin protomerek 1-es szubdoménje flexibilisebbé válik.

Ezen eredmények megerősítik korábbi megfigyeléseinket arról, hogy a filamentumok szöges végéhez kapcsolódó formin fragmentum dimerek alloszterikus kölcsönhatások révén az aktin szerkezetét fellazítják.

Hőmérséklet-függő FRET, fluoreszcencia anizotrópia lecsengés és steady-state fluoreszcencia anizotrópia módszerek segítségével sikeresen megmutattuk, hogy a nehéz meromiozin képes stabilizálni a formin által fellazított aktin filamentumok szerkezetét.

E három spektroszkópai módszer segítségével arra is fényt derítettünk, hogy a dimer mDia1FH2 fragmentum bekötése által módosult dinamikai tulajdonságú aktin filamentumokra tekeredő tropomiozin is stabilizáló hatást fejt ki, így ellensúlyozza a forminok által kiváltott flexibilitás növekedést.

## 7 Következtetések

Ezen új eredmények kiemelik a forminok által létrehozott konformációs változások jelentőségét. Az mDial formin megváltoztatta az aktin protomerek 1-es alegységének konformációját. Valószínűsíthető, hogy az így létrejött flexibilis aktin filamentumoknak meghatározott biológiai céljaik vannak, melyek adott intracelluláris körülmények között teljessé válnak ki. Viszont adott helyzetekben, bizonyos funkciók ellátásához az aktin hálózatoknak mechanikailag stabil, rigid filamentumokra van szükségük, ezért a legvalószínűbb, hogy a szintén jelen lévő aktin-kötő fehérjék képesek a formin által fellazított aktin filamentum struktúrák stabilizálására.

Tropomiozin és nehéz meromiozin azon hatását vizsgáltuk, képesek-e visszastabilizálni az aktin filamentumok konformációját. A disszertációmban bemutatott eredmények alátámasztják e két fehérjének az aktin filamentumok konformációs dinamikájára gyakorolt központi szerepét. Szerintünk a formin hatására létrejött fellazult filamentumszerkezet egy igen gyors és különleges formin-indukálta aktin polimerizáció eredménye. Az aktin filamentum hálózatok normális működését egy rigidebb szerkezet valószínűleg sokkal jobban elősegíti, ezért elkerülhetetlen, hogy legyenek olyan molekuláris repair mechanizmusok (aktin-kötő fehérjék bekötésével), melyek képesek visszafordítani a forminok által katalizált megnövekedett flexibilitást. Tézisemben bemutatott eredményeim alapján mind a tropomiozin, mind a nehéz meromiozin betöltheti ezt a szabályozó szerepet. Közös tulajdonságuk, hogy kötésükkel kooperatívan befolyásolják az aktin filamentumok szerkezetét.

Jelen munkám jó alapot szolgáltat újabb kutatásokhoz is, melyek segítségével más aktin-kötő fehérjéket is azonosíthatunk, mint az aktin konformációját finomhangoló, szabályzó fehérjéket. Ezen fehérjék funkcióit együtt, egy komplex rendszerben kellene tanulmányozni, mely által fény derülhet egymásra gyakorolt (adott funkciót erősítő vagy éppen gyengítő) hatásaikra is és arra, hogy így együttesen milyen módon alakítják a sejtek aktin hálózatának konformációs dinamikáját. Ily módon betekintést nyerünk különböző folyamatokba, melyekben ezek a fehérjék egymással versenyezve alakítják ki illetve szervezik újra a citoskeleton.

## 8 Közlemények

### 8.1 Értékezés alapjául szolgáló közlemények

1. **The Effects of Formins on the Conformation of Subdomain 1 in Actin Filaments.** Ujfalusi, Z., Barkó, Sz., Hild, G., Nyitrai, M. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology* **98:(1)** pp. 7-11. (2010)

**IF: 1.871; Hivatkozások: 2**

2. **The effect of tropomyosin on formin-bound actin filaments.** Ujfalusi, Z., Vig, A., Hild, G., Nyitrai, M. *Biophysical Journal* **96:(1)** pp. 162-168. (2009)

**IF: 4.390; Hivatkozások: 2**

### 8.2 Értékezés témájában tartott konferencia előadások

1. **Aktin-kötő fehérjék hatása az aktin filamentumok flexibilitására.** Ujfalusi, Z., Vig, A., Nagy, N., Kovács, M., Hild, G. and Nyitrai, M., – előadás tartása a Magyar Biofizikai Társaság XXIII. kongresszusán (2009. augusztus 23-26., Pécs).

2. **The effect of actin binding proteins on the flexibility of formin-bound actin filaments.** Ujfalusi Z., Vig, A., Nagy, N., Kovács, M., Hild, G. and Nyitrai, M. – előadás tartása a Biológus doktoranduszok konferenciáján (2009. November 12-13., Pécs).

3. **The effect tropomyosin and heavy meromyosin on the flexibility of formin-bound actin filaments.** Ujfalusi, Z., Nyitrai, M. and Hild, G. – előadás tartása a 8<sup>th</sup> European Biophysics Congress Intracellular Fluorescence Spectroscopy szatellita konferenciáján (2011. augusztus 20-22., Pécs).



### 8.3 Egyéb közlemények

1. **Conformational Changes in Actin Filaments Induced by Formin Binding to the Barbed End.** Papp, G., Bugyi, B., **Ujfalusi, Z.**, Barkó, Sz., Hild, G., Somogyi, B., Nyitrai, M. *Biophysical Journal* **91:(7)** pp. 2564-2572. (2006)

**IF: 4.757; Hivatkozások: 6**

2. **The effect of pyrene labelling on the thermal stability of actin filaments.** Halasi, Sz., Papp, G., Bugyi, B., Barkó, Sz., Orbán, J., **Ujfalusi, Z.**, Visegrády, B. *Thermochimica Acta* (**445**) pp. 185-189. (2006)

**IF: 1.417; Hivatkozások: 2**

3. **The effect of pH on the thermal stability of alpha-actin isoforms.** Papp, G., Bugyi, B., **Ujfalusi, Z.**, Halasi, Sz., Orbán, J. *Thermochimica Acta* (**82**) pp. 281-285. (2005)

**IF: 1.230; Hivatkozások: 4**

Összesített impakt faktor: 13.665      Független hivatkozások száma: 16