

RÉSZLETES ZÁRÓJELENTÉS A K 60186 SZ. OTKA KUTATÁSI PÁLYÁZATHOZ

(Témavezető: Nyitrai Miklós)

A kutatások személyi és egyéb feltételei

Kutatásaink során a pályázat munkatervében leírt vizsgálatainkat valósítottuk meg. A költségtervtől jelentősen egyik pályázati évben sem térünk el, a futamidő leteltével pénzügyi maradvány vagy hiány nem keletkezett. A projekt során ugyanakkor módosult a kutatócsoport összetétele. A pályázati tervben szerepelt - Ujfalusi Zoltán és a témavezető mellett - Bugyi Beáta és Papp Gábor, mint a kutatócsoport fiatal kutató résztvevői. Bugyi Beáta a pályázat első felében témavezetésemmel megszerezte a Ph.D. fokozatát, és ezt követően három éves, a Marie-Curie Program által finanszírozott posztdoktorális tanulmányúra utazott Párizsba, Marie-France Carlier munkacsoportjába. Papp Gábor időközben állandó státuszt kapott a PTE TTK-án, és ennek megfelelően a kutatócsoportunk munkájából 2007 második felében kivált. Papp Gábor Ph.D. fokozatszerzési eljárása folyamatban van, ebben társ-témavezetőként működök közre. A két kutató kiválása miatt szükséges újabb fiatal munkatársakat bevonni a vizsgálatainkba. A kutatói összetétel megváltozása a projekt hatékony megvalósítását nem akadályozta.

Miozinok tanulmányozása

A projekt első felében kaptak helyet azon vizsgálataink, amelyeket korábbi témavezetőmmel, Michael A. Geeves-el közösen végeztünk. A miozin 18 jelenleg ismert 18 családja közül vizsgáltuk a különlegesnek számító, és számos pathológiai folyamat megvalósulásában részt vevő miozin XIV (*toxoplasma gondii*) kinetikai vizsgálatát végeztük el. A miozint Dominique Soldati svájci laboratóriumában izolálták. Tekintve, hogy a rendelkezésünkre álló fehérjemennyiség kicsi volt, a kísérleteket a flash-photolysis módszerének segítségével végeztük el. Eredményeinket a *J. Muscle Res. and Cell Motil.* c. nemzetközi folyóiratban közzétettük (*J. Muscle Res. and Cell Motil.*, 1-13, 2006).

Elvégeztük emlős izom miozinok összehasonlító leírását kinetikai módszerekkel. Több emlős faj (egér, patkány, nyúl, sertés) vázizmából izoláltunk egyedi izomrostokat, amelyek nagy valószínűséggel csak egyetlen miozin izoformát tartalmaztak. Minden rost esetében azonosítottuk a miozin izoformát, és ellenőriztük, hogy valóban csak egyetlen izoforma volt a rostban. A paviai (olaszországi) Roberto Bottinelli kutatócsoportja izolálta és karakterizálta a miozin izoformákat. Ezt követően a flash-photolysis módszerét alkalmazva meghatároztuk, hogy milyen kinetikával képes a bekötődő ATP ezeket a miozinokat disszociálni az aktin filamentumokról, illetve hogy milyen affinitással kötik ezek az izoformák az ADP-t. A kinetikai eredményeket az egyes izoformák vonatkozásában összevetettük (*J. Mol. Biol.*, **355(3)**, 432-442, 2006).

Ugyancsak tanulmányoztuk, hogy hogyan befolyásolja a miozin ATP-kötő zseb mellett található funkcionális domén módosítása a miozin kinetikai tulajdonságait. A miozinokat a san-diego-i Sandy Bernstein laboratóriumában, *Drosophyla melanogaster*-ből izolálták, a méréseket gyors-kinetikai módszerekkel végeztük el (*J. Mol. Biol.*, **368(4)**, 1051-66, 2007).

Az aktin kölcsönhatása nukleotidokkal

Az aktinnak működése során az egyik legfontosabb kölcsönható partnere az ATP, illetve az ATP hasításakor keletkező termékek. Munkánk során megvizsgáltuk, hogy hogyan hat kölcsön az aktin a különböző nukleotidokkal. Aktin izoforma függő különbségeket találtunk és írtunk le ezeknek a nukleotidoknak az aktinnal való kölcsönhatásában (*Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **368(3)**, 696-702, 2008).

A korábbi vizsgálataink során, más laboratóriumok eredményeivel összehangban, megmutattuk, hogy az aktin filamentumok kooperatív módon kötik a falloidint. A projekt keretei között megvizsgáltuk, hogy módosul-e az aktinnak ez a jellegzetes kooperatív tulajdonsága abban az esetben, ha a nukleotid-kötő helyen nem ATP vagy ADP, hanem nukleotid analógok vannak. Azt tapasztaltuk, hogy mind ADP.BeF_x, mind ADP.AIF₄ alkalmazása esetén az aktin elveszti a falloidin kooperatív kötésére való képességét. A falloidint ugyan megköti, de nem kooperatív módon (*Biochemistry*, **47(15)**, 4530-4, 2008).

Aktin-kötő fehérjék hatása az aktin monomerek szerkezetére

Tanulmányoztuk, hogy hogyan befolyásolja egyes aktin-monomer kötő fehérjék kötődése az aktin monomerek konformációs tulajdonságait. Kísérleteinkben fluoreszcencia spektroszkópiai, azon belül is steady-state és időfüggő fluoreszcencia kioltási módszereket alkalmaztunk, és a kofilin, illetve a profilin hatását mértük. Megállapítottuk, hogy a profilin kötődésének hatására a monomerek szerkezete lazább, míg a kofilin hatására merevebb lesz. Ezen megfigyeléseink összhangban voltak a két aktin-kötő fehérje korábban leírt, az aktinnak a nukleotidokkal való kölcsönhatására gyakorolt hatásával (*Biophys. J.*, in press).

Forminok hatása az aktin filamentumok szerkezetére

A projekt feladatainak a megvalósítása során a legnagyobb hangsúlyt az aktin filamentumoknak a forminokkal való kölcsönhatására fektettük. Az már a korábbi vizsgálatokból ismert volt, hogy az aktin filamentumok kétféleképpen képesek a forminokat megkötni. Egy nagyobb, néhány tíz nanomólos affinitású kötőhely található a filamentumok pozitív végén, míg gyengébben, néhány mikromólos affinitással kötő formin-kötő helyek vannak a filamentumok oldalain. Kutatásaink során steady-state és időfüggő fluoreszcencia spektroszkópiai módszereket alkalmazva azt vizsgáltuk, hogy módosítják-e az aktin filamentumokhoz kötődő forminok a filamentumok szerkezetét. Azt tapasztaltuk, hogy igen. A forminok hatása ugyanakkor függött a formin koncentrációtól, illetve pontosabban a formin és aktin koncentrációk arányától. Alacsony formin koncentrációkon a forminok kötődése a filamentumok szerkezetének fellazulását okozta. Ez a hatás 500nM formin koncentráció alatt bizonyult dominánsnak. Ezen koncentráció felett - az 1:1 formin:aktin koncentráció közelítésével - a filamentumok szerkezete elvesztette a forminok által alacsony koncentrációkon kialakított viszonylag nagy flexibilitását. Eredményeinket úgy értelmeztük, hogy a filamentumok végeihez kötődő forminok képesek a filamentumok szerkezetét fellazítani. Ez a hatás, a nagy affinitású kötés és a filamentumok végén lévő kis számú kötőhely miatt már alacsony formin koncentrációk alkalmazása esetén is erős. Megállapítottuk, hogy egyetlen formin dimer kötődése legalább 160 aktin protomer szerkezetét volt képes módosítani. A formin koncentráció növelésével a filamentumok oldalain lévő kötőhelyek is telítődtek. Az ide bekötődő forminok úgy viselkedtek, mint molekuláris ácskapcsok, és a szomszédos protomerek kölcsönhatását stabilizálták. Ennek eredményeként a filamentumok szerkezete is stabilizálódott. Mindezen eredményeink egyértelműen megmutatták, hogy a forminok képesek megváltoztatni az aktin filamentumok konformációs állapotát. Ezen hatásuk értelmezésünk szerint megteremti a molekuláris alapját

egy eddig nem ismert, az aktin nukleációs faktorok kötődésének hatására épülő, az intracelluláris fehérjekomplexek kialakulásában meghatározó jelentőségű szabályozási folyamat megvalósulásának (*J. Biol. Chem.*, **281(16)**, 10727-36, 2006 és *Biophys. J.*, **91(7)**, 2564-2572, 2006).

A forminok által az aktin filamentumban létrehozott változások további jellemzése érdekében konvencionális és szaturáció transzfer EPR („electron paramagnetic resonance”) méréseket is végeztünk. Ezek a mérések megmutatták, hogy a forminok által kiváltott hatások összetettek, és a protomerek egyes részeit nem egyforma mértékben érintik (*Biophys. J.*, in press).

A forminoknak az aktin filamentumokra gyakorolt hatását megismerve felvetődött a kérdés, hogy vajon ezek a konformációs változások csak a gyors polimerizáció szükségessége és létrejötte miatt alakulnak-e ki, vagy hordoznak biológiailag fontos információs, vagy betöltenek valamilyen funkciót. A kérdés megválaszolása érdekében először azt vizsgáltuk meg, hogy képes-e más aktin-kötő fehérje visszafordítani, módosítani a forminok által kiváltott hatásokat. Az egyik legszélesebb körben megtalálható, és funkciójában minden ismert esetben az aktinhoz asszociálódó fehérje a tropomiozin, ezért ennek a hatását tanulmányoztuk részletesebben. Megállapítottuk, hogy a tropomiozin kötődésével az aktin filamentumok szerkezetében a forminok által kiváltott konformációs módosulások megszűnnek, az aktin állapota flexibilitása hasonlóná válik ahhoz az állapothoz, amit forminok és tropomiozin nélkül tapasztalhatunk (*Biophys. J.*, in press).

Megítélésünk szerint a vizsgált tudományos problémák pontosan megfeleltek a pályázat tervezésekor leírtaknak. Eredményeink ugyanakkor megfelelő alapot szolgáltatnak az aktin citoskeleton működésének, azon belül a vonatkozó molekuláris szabályozási folyamatoknak a pontosabb megértését célzó további vizsgálatainkhoz.

Tisztelettel kérem a zárójelentésünk elfogadását.

Tisztelettel,

Nyitrai Miklós
témavezető

Pécs, 2009 február 18.