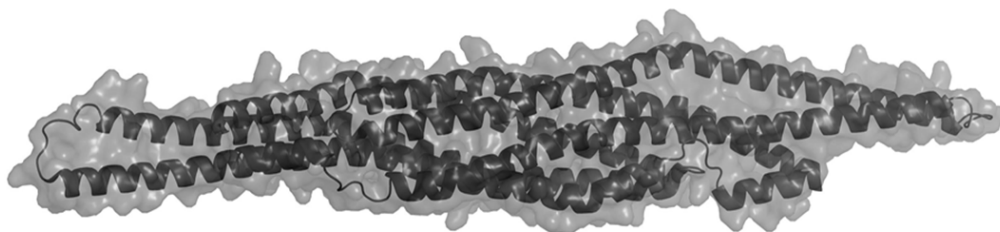


# Ph.D. ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

## Az IRSp53 fehérje szerepe a filopódium formálás folyamatában



FUTÓ KINGA

Pécsi Tudományegyetem  
Általános Orvostudományi Kar  
Biofizikai Intézet

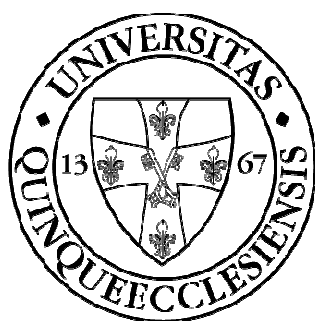
2014

# Ph.D. ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Az IRSp53 fehérje szerepe a filopódium formálás folyamatában

FUTÓ KINGA

Program: Interdiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola  
Doktori Program vezetője: Dr. Sümegi Balázs  
Alprogram (B-130): Funkcionális fehérjedinamika vizsgálata biofizikai  
módszerekkel  
Alprogramvezető: Dr. Nyitrai Miklós  
Témavezető: Dr. Visegrády Balázs



Pécsi Tudományegyetem  
Általános Orvostudományi Kar  
Biofizikai Intézet

2014



## Bevezetés

Az aktin citoskeleton a citoskeletális rendszer (sejtváz) egyik fő komponense, amely kulcsfontosságú sejtfolyamatokban játszik szerepet, mint például a sejtosztódás, a sejtadhézió, a sejtmigráció, vagy a fagocitózis. Az eukarióta sejtek felszíni képződményeiben is aktin tartalmú struktúrák figyelhetők meg, ilyenek például a sejtnyúlványok (lamellipódium, filopódium, felszíni fodrozódás), melyek a sejt és környezete, az extracelluláris mátrix illetve a sejt-sejt közötti kapcsolatokban játszanak szerepet. A sejtnyúlványok kialakulása összetett folyamat, amelynek háttérében az aktin polimerizációja valamint az aktinnal kapcsolatban álló állványozó fehérjék finoman szabályozott mechanizmusa áll [1].

A filopódiumok egyik fő állványozó fehérjéje az IRSp53/MIM fehérjecsald tagja, széleskörűen expresszálódik a különböző szövet és emlős sejtípusokban, különösen nagy mennyiségben azonban az idegsejtekben jelenik meg. A filopódiumok hosszú vékony átmeneti kitüremkedések a sejt felszínén, melyek általában kötegelt aktin filamentumokat tartalmaznak. Kialakításukban az általunk vizsgált IRSp53 (inzulin receptor szubsztrát fehérje) fehérjének fontos szerepe van. Az IRSp53 a filopódium belső felszínén a membránhoz kötődve stabilizálja annak szerkezetét, egyúttal kölcsönhatásban áll az aktin citoskeletonnal is [2-4]. Megfigyelték, hogyha az IRSp53-at kódoló gént egér modellekben kiütik (knock out), akkor az egerek tanulási folyamata, memóriája illetve szinaptikus plaszticitása károsodik. Bizonyos humán IRSp53 alléleket, olyan neurológiai problémákkal hoznak kapcsolatba, mint például a dendritikus tüske mennyiségének megváltozása, figyelemhiányos betegségek illetve hiperaktivitás [5].

Az IRSp53 funkciójának megértése szempontjából fontos volt a fehérje I-BAR (IRSp53/ MIM Homology Domain) [6] doménjének jellemzése. Ez a domén az N-terminális részen helyezkedik el, 250 aminosavból áll [7]. Az I-BAR domén önmagában képes a filopódiumok létrejöttét indukálni sejtekben, ezért munkánk során elsősorban az I-BAR domén funkciójának részletes leírására volt a célunk. A tisztított rekombináns I-BAR képes kötni illetve kötegelni az aktin filamentumokat *in vitro* megfigyelések szerint [6], valamint képes előidézni a membrán specifikus görbületét [8-10]. Korábbi eredmények azt mutatták, hogy az I-BAR a sejt perifériás részén lévő aktin filamentumok kötegelésével képes a filopódium formálásban részt venni. Későbbi munkák azt állapították meg, hogy a fehérje képes kötni és deformálni a membrán lipideket [7, 11-13]. Az IRSp53-I-BAR szerkezetére jellemző [12], hogy pozitív töltésű aminosavak koncentrálnak a fehérje disztális végén [7, 11-13],

melyeknek kulcsfontosságú szerepük van a negatív fejcsoporttal rendelkező membrán foszfolipidek megkötésében.

Kutatási témám a filopódiumok létrejöttének szabályozására irányul az aktin-membrán kölcsönhatásának, valamint ezen kölcsönhatást befolyásoló állványozó fehérjék (IRSp53/MIM fehérjecsalád) vizsgálatán keresztül. Noha a sejt felszíni nyúlványok széleskörben látnak el funkciókat, a filopódiumok fel- és leépülésének folyamata máig nem tisztázott. Jelenleg az irodalomban ellentmondó eredményeket találunk az IRSp53 membránkötésére illetve aktinnal való kölcsönhatására vonatkozólag a filopódiumok létrehozásának tekintetében. Nem volt olyan eredmény, amely részleteiben meghatározta volna az IRSp53-membrán kapcsolatát, megadva a kötést leíró biokémiai paramétereket (pl. egyensúlyi disszociációs állandó). Nem tisztázott továbbá, hogy milyen molekuláris kölcsönhatások állnak a membránkötés hátterében illetve az IRSp53 aktin citoszketonnal való kapcsolatát, szabályozó funkcióját is homály fedi, melyet munkám során tisztázni szeretnék. Az IRSp53 fehérjecsalád és az aktin citoszketon kölcsönhatásának, illetve ezek sejtmembránra gyakorolt hatásának ismerete elengedhetetlen a sejtkommunikáció megértéséhez.

## Célkitűzések

A munka során az alábbi célokat tűztük ki:

1. Az IRSp53-I-BAR fehérje membránkötő tulajdonságainak leírása, a vonatkozó egyensúlyi kötődési és kinetikai paraméterek számszerűsítése
2. Az I-BAR domén aktin-kötő tulajdonságainak jellemzése különböző ionerősségű oldatok alkalmazása esetén
3. A monomer, illetve a filamentális aktin hatásának vizsgálata az I-BAR-membrán kölcsönhatásra
4. Az I-BAR hatásának vizsgálata az aktin filamentum polimerizációjára
5. COS-7 sejtek morfológiai változásának nyomonkövetése I-BAR, illetve IRSp53 fehérjék túlexpresszállást követően
6. COS-7 sejtekben az aktin polimerizációs állapotának megváltoztatása, annak vizsgálata.

## Alkalmazott módszerek

### Fehérjék

Kísérleteinket nyúl vázizomból preparált  $\alpha$ -aktinnal végeztük, amelynek előállítása több lépésben zajlik. Az aktin izolálását aceton forgácsból végeztük Spudich és Watt módszere alapján [14]. A folyamat során az aktint A-pufferben oldottuk fel, amelynek összetétele: 2 mM TRIS/HCl (pH8.0), 0,2 mM ATP, 0,1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,005%  $\text{NaN}_3$ , 0,5 mM 2-merkaptoetanol vagy DTT.

pGEX4T2 plazmid tartalmazta az IRSp53-I-BAR domén DNS szekvenciáját, melyet metionin-auxotróf *E. coli* törzsbe transzformáltuk [12], majd tisztítottuk. Rendelkezésünkre állt az I-BAR egy mutáns variánsa, ahol pontmutációval a 4 lizin aminosav lett glutaminsavra cserélve (K142E, K143E, K146E, K147E), az ú.n. K4E-I-BAR [12], tisztítása megegyezett a vad típuséval. A GST-fúziós rekombináns I-BAR fehérjét affinitás kromatográfiás módszerrel (Pharmacia FPLC) tisztítottuk. Az I-BAR fehérjét trombinos hasítást követően eluáltuk. Tárolás előtt az IRSp53-I-BAR fehérjét a kívánt pufferbe átdializáltuk, és ezt követően folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, felhasználásig - 80 °C-on tároltuk.

### A vezikulák és micellák preparálása

A munka során a vezikulák előállításához a következő foszfolipideket használtuk: foszfatidilkolin (PC), foszfatidil-szerin (PS), L- $\alpha$ -foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát ( $\text{PIP}_2$ ). A lipidek marha agyból származtak, 99 % feletti tisztaságúak voltak (Avanti Polar Lipids, Alabama, USA). Ezen lipidek különböző arányából nagy unilamelláris vezikulákat (LUVET) hoztunk létre, extrúder segítségével. A liposzómákban a foszfolipidek a következő arányban voltak jelen: 100% PS, 100% PC vagy 70% PS és 30% PC (PS/PC (70/30)) kombinációjával. A liposzómák  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  foszfolipidet is tartalmaztak 4 illetve 15%-ban, 96 vagy 85% PC lipidekkel együtt ( $\text{PIP}_2$  /PC (4/96) vagy  $\text{PIP}_2$ /PC (15/85)).

Homogén  $\text{PIP}_2$  micellákat készítettünk 1 mg  $\text{PIP}_2$  0,5 ml deionizált vízben vagy a kívánt pufferben történő oldásával [15].

## **Az aktin és az IRSp53-I-BAR fluoreszcens jelölése, koncentráció-meghatározás**

A kutatás során olyan *in vitro* fluoreszcencia spektroszkópai méréseket is végeztünk, amelyekhez szükség volt a fehérjék fluoreszcens jelölésére.

Az aktinban (Cys374) és az I-BAR fehérjében (Cys137, 195, 202, 230) lévő cisztein aminosavakat (az I-BAR fehérjében ezek valamelyikét) IAEDANS ill. IAF fluorofórral jelöltük meg.

A jelölést követően meghatároztuk a fehérje koncentrációkat és a jelölési arányt. A koncentrációmérést Jasco V-660 típusú spektrofotométerrel végeztük.

## **„Steady-state” fluoreszcencia kísérletek**

A „steady-state” fluoreszcencia méréseket Horiba JobinYvon (Longjumeau, France) fluoriméterrel végeztük. Méréseinket termosztált mintatartóban, 22 °C-on végeztük. A kívánt hullámhosszakot monokromátor segítségével állítottuk be mind a gerjesztési, mind pedig az emissziós oldalon.

## **Förster-típusú Rezonancia Energia Transzfer (FRET) mérések**

Steady-state Förster-típusú Rezonancia Energia Transzfer (FRET) méréseket végeztünk a fluoreszcensen jelölt I-BAR és lipidek illetve aktin között. A kísérletekben az I-BAR koncentrációját fixen tartottuk, a LUVET illetve az aktin koncentrációt változtattuk. A FRET transzferhatásfok meghatározása a donor intenzitása alapján, a következő egyenlet felhasználásával történt:

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

ahol  $F_{DA}$  és  $F_D$  a donor fluoreszcencia intenzitását jelenti az akceptor jelenlétében és hiányában.

A kötési jellemzők illetve az egyensúlyi disszociációs konstans ( $K_d$ ) meghatározása volt a célunk, melynek meghatározása [16] a következő egyenlettel történt:

$$[PL]/[P] = (([P] + [L] + K_d) - (([P] + [L] + K_d)^2 - 4 * [P] * [L])^{0.5}) / (2 * [P]) \quad (2)$$



ahol [L] a teljes lipidkoncentráció (ez a kísérletek során változott), [PL] a lipidhez kötött I-BAR koncentrációja, [P] az I-BAR koncentrációja. A [PL]/[P] arány megadja a lipidekhez kötött I-BAR frakcióját. A kísérletben az I-BAR-hoz adott lipidek koncentrációját változtattuk és mértük a transzferhatásfokot.

### **Fluoreszcencia kioltási kísérletek**

A fluoreszcencia kioltási kísérleteket IAEDANS-I-BAR fehérjén végeztük, elektromos töltését tekintve semleges kioltó molekula (akrilamid) segítségével. A méréseket Horiba JobinYvon (Longjumeau, France) fluoriméterrel végeztük. A „steady-state” kioltási mérések során kapott eredményeket a klasszikus Stern-Volmer egyenlet felhasználásával értékeltük ki, mely a kioltás hatékonyságát jellemzi. A kiértékeléshez a következő egyenletet alkalmaztuk [17]:

$$F_0/F = 1 + K_{SV} * [Q] \quad (3a)$$

ahol  $F_0$  a minta fluoreszcencia intenzitása a kioltó molekula hiányában és  $F$  a minta fluoreszcencia intenzitása különböző kioltó koncentrációk esetén [Q].

A  $K_{SV}$  értékek az  $F_0 / F$  vs [Q] alapján ábrázolt görbékre illesztett egyenesek meredekségéből állapítottuk meg. A Stern-Volmer kioltási állandó ( $K_{SV}$ ) a bimolekuláris kioltási állandó ( $k_+$ ) és a fluorofór – kioltó hiányában mért – fluoreszcencia élettartamának ( $\tau_0$ ) szorzata:

$$K_{SV} = k_+ * \tau_0 \quad (3b)$$

### **„Steady-state” fluoreszcencia anizotrópia**

Kísérleteinkben IAEDANS-jelölt aktin monomerek „steady-state” fluoreszcencia anizotrópiáját mértük, IRSp53-I-BAR hiányában, illetve különböző koncentrációjú IRSp53-I-BAR jelenlétében.

Vizsgálatainkat Horiba JobinYvon (Longjumeau, France) fluoriméterrel végeztük, amely termosztálható mintatartóval rendelkezett. Méréseinket 22 °C-on végeztük. Az egyensúlyi disszociációs konstans ( $K_d$ ) meghatározása a következő egyenlettel történt [16]:

$$[PL]/[P] = (([P] + [L] + K_d) - (([P] + [L] + K_d)^2 - 4 * [P] * [L])^{0.5}) / (2 * [P]) \quad (4)$$

ahol [L] az I-BAR koncentráció (ez a kísérletek során változott), [PL] az IAEDANS-aktinhoz kötött I-BAR koncentrációja, [P] az IAEDANS-aktin koncentrációja.

### **TNS fluoreszcencia mérések**

A TNS fluorofór intenzitásának változásán követtük nyomon a folyamatot. A fluorofór érzékeny a külső környezet megváltozására, elsősorban a hidrofóbicitásra. A méréseket Horiba JobinYvon (Longjumeau, France) fluoriméterrel végeztük. A gerjesztési hullámhossz 360 nm volt, a fluoreszcencia emisszió detektálása 360-560 nm között történt.

### **Aktin polimerizációs kísérlet**

Pirén jelölt aktin monomerek segítségével vizsgáltuk az I-BAR aktin polimerizációra kifejtett hatását. A fluoreszcencia intenzitást változását mértük az idő függvényében, a gerjesztési hullámhossz 365 nm volt, a fluoreszcencia emissziót 405 nm-en detektáltuk. Ezután a kapott görbéket normáltuk. Az aktin filamentum növekedésének sebességi állandóját meghatároztuk a normált pirén intenzitás-görbék féltelítésben illesztett egyenesek meredekségéből. A polimerizáció sebességi állandójának kiszámításához a meredekség értékeket átszámoltuk s<sup>-1</sup> egységekre, ezt követően az I-BAR koncentráció függvényében ábrázoltuk.

### **Koszedimentációs vizsgálatok**

Koszedimentációs kísérlettel vizsgáltuk az IRSp53-I-BAR és az aktin filamentumok kölcsönhatását, a kísérlethez pirén-jelölt aktint használtunk. A méréseket Horiba JobinYvon (Longjumeau, France) fluoriméterrel végeztük. A gerjesztési hullámhossz 365 nm volt, a fluoreszcencia emisszió detektálása 405 nm-en történt. Ezután a mintákat ultracentrifugáltuk (Beckman: TLA 100 rotor, 80000 rpm, 20°C, 40 min), majd a pelletet és a felülúszót elválasztottuk egymástól és 12 %-os SDS-PAGE segítségével elemeztük azok fehérjetartalmát.

## **Statisztika**

A mérések során meghatározott átlagértékek mellett minden esetben az átlag standard hibáját (SEM) adtam meg. Egyes esetekben kétmintás t-próbával hasonlítottam össze az átlagértékeket 0,05 szignifikancia szint mellett. Az átlagértékek között tapasztalt szignifikáns különbségeket \*-al jelöltem.

## **Sejtek transzfektálása, fixálása**

EGFP-aktin, mCherry-I-BAR, mCherry-IRSp53 fehérjéket kódoló DNS szekvenciával transzfektáltunk COS-7 sejteket. A transzfektálást követően a mintákat fixáltuk.

A transzfekció sikerességét Olympus IX81 inverz fluoreszcens, illetve Zeiss LSM710 konfokális mikroszkóp segítségével vizsgáltuk.

A filopódium hosszeloszlás kiértékelése Fiji program [18] segítségével történt. A számításokhoz figyelembe vettük az objektív nagyítását (63x), majd a nagyítástól függően a pixel értékeket hosszúság értékekre kalibráltuk ( $0,106 \mu\text{m} / \text{pixel}$ , vagy  $9,434 \text{ pixel} / 1 \text{ unit}$  ( $\mu\text{m}$ )). Ezt követően a lemért filopódiumok hosszúságát  $\mu\text{m}$ -ben adtuk meg.

## Eredmények

### I-BAR-fosfolipid kölcsönhatás vizsgálata FRET módszerrel

Az *in vitro* FRET kísérletekben tehát IAEDANS-jelölt I-BAR és DiO-jelölt LUVET-ek segítségével tanulmányoztuk az IRSp53-I-BAR-membrán kapcsolatot. A kísérletek során az I-BAR-nak a lipidekhez való kötődését különböző lipid összetételek mellett vizsgáltuk. Ezek a következők voltak: PC, PS/PC (70/30), PS, PIP<sub>2</sub>/PC (4/96) vagy PIP<sub>2</sub>/PC (15/85). Megállapítottuk, hogy a FRET transzferhatásfok nő, ha növeljük a LUVET koncentrációt, ezzel jelezve, hogy egyre több és több donornak van akceptor párja a közvetlen környezetében.

Az IAEDANS-I-BAR és PIP<sub>2</sub>/PC (4/96) valamint PIP<sub>2</sub>/PC (15/85) LUVET-ek esetében kaptuk a legmagasabb FRET transzferhatásfok értéket. Ezt alapvetően két tényező befolyásolja: a donor és akceptor közötti távolság, valamint a fluorofórok relatív orientációja. Általánosságban megállapítható, hogy a negatívan töltött fejcsoporttal rendelkező lipidek (PS vagy PIP<sub>2</sub>-t tartalmazó lipidek) esetében nagyobb a transzferhatásfok, amelynek egyik magyarázata a kialakult fehérjekapcsolatok kisebb távolsága lehet. Ez utalhat a fehérjék lipidekhez való erősebb kötődésére, valamint ez a kialakult kötődés elektrosztatikus jellegét mutatja. Megjegyzendő azonban, hogy noha a kötődés feltehetően főként elektrosztatikus jellegű, a töltéssel nem rendelkező PC lipidek esetében is tapasztaltuk a transzferhatásfok-növekedést, ami az I-BAR, PC lipidekhez való kötődését igazolja. Összességében tehát megállapítható, hogy az I-BAR minden vizsgált lipid típushoz képes kötődni, valamint hogy a kötődés elektrosztatikus módon stabilizálódik.

### Fluoreszcencia kioltási kísérletek I-BAR domén fehérjén

„Steady-state” fluoreszcencia kioltási kísérleteket végeztünk az IAEDANS-I-BAR segítségével, nagy unilamelláris vezikulák hiányában és jelenlétében. A kapott eredményeket ábráztuk, az egyenesek meredekségéből meghatároztuk a Stern-Volmer kioltási állandót ( $K_{sv}$ ).

Az IAEDANS-I-BAR akrilamiddal történő kioltása esetében a legnagyobb  $K_{SV}$  értéket LUVET-ek hiányában kaptuk, ami azt jelenti, hogy a fluorofór a kioltó molekula számára jól hozzáférhető. A semleges PC LUVET-ek jelenlétében a  $K_{SV}$  értéke lecsökkent, jelezve az I-BAR-hoz kötött fluorofór korlátozott hozzáférhetőségét a kioltó számára. Ez az eredmény – a FRET kísérletek eredményével megegyezően – azt igazolja, hogy az I-BAR képes a PC lipidekhez kötődni. A PS lipidek jelenlétében a  $K_{SV}$  értéke, az előző esetekhez képest tovább csökkent, ami erősebb kötésre utal és a fluorofór további korlátozott hozzáférését eredményezi. Ez az eredmény szintén összhangban áll a FRET vizsgálatokkal, miszerint a foszfolipidekben megjelenő negatív töltések az I-BAR-foszfolipid kölcsönhatást stabilizálják.

### **Az I-BAR hatása micellák szerkezetére**

Kísérleteink során megvizsgáltuk, hogy az IRSp53-I-BAR domén vajon megbontja-e a micellák felszínének folytonosságát – azok hidrofób belsejébe penetrálva – a foszfolipid-kötés során. A mérések során használt TNS fluorofórral, korábbi tanulmányok azt mutatták be, hogy a hidrofób közegbe beépülve a TNS fluorofór molekula érzékeny a közeg hidrofóbicitásának a megváltozására [15]. Ebben a kísérletben I-BAR domént illetve micellákat használtunk, melyek erősen negatívan töltött  $PIP_2/PC$  (4/96) lipidekből álltak, és TNS fluoreszcens festékkel voltak jelölve. Vizsgálataink során azt találtuk, hogy az I-BAR fehérje képes kötni a micellák felszínéhez, de ez csak minimális változással jár a TNS-jelölt micellák jelintenzitásában. Ez a megfigyelés azt mutatja, hogy az I-BAR a  $PIP_2$  vagy PC lipidek fejcsoportjához kötődik ahelyett, hogy a micellák közepébe penetrálna. Bár az I-BAR nem növeli meg a TNS fluoreszcencia intenzitását, mégsem tudjuk kizárni a csekély penetráció lehetőségét a micellák membránlipidjeinek hidrofób régiójába.

## **Az aktin szerepe az I-BAR foszfolipid kötésében**

Eddigi megfigyelések szerint az I-BAR egyidejűleg áll kapcsolatban a membránnal és az aktin filamentális formájával. FRET méréseket végeztünk, hogy megvizsgáljuk a filamentális (F-aktin), illetve monomer aktin (G-aktin) hatását a már meglévő I-BAR-lipid kölcsönhatásra. A FRET transzferhatásfok G-aktin jelenlétében lecsökkent. Ez egyrészt utalhat arra, hogy az I-BAR-lipid komplex koncentrációja lecsökkent, másrészt jelentheti a kötődés erősségének csökkenését is. F-aktin jelenlétében a transzferhatásfok értéke nőtt, ami valószínűsíti, hogy további I-BAR-lipid komplex képződött aktin filamentumok jelenlétében, illetve azok átlagos távolsága csökkent. Ezek a megfigyelések azt sugallják, hogy az aktin monomereknek és filamentumoknak ellentétesen befolyásolják az I-BAR fehérje lipidszétését. Kísérleteink alapján feltételezzük továbbá, hogy a G- illetve F-aktin kötőhelyei az I-BAR különböző felszínein találhatóak (hiszen különböző hatást alakítani ki). Továbbá az is valószínűsíthető, hogy az I-BAR G-aktin kötőhelye – legalább részben – átfed a lipidszétő hellyel.

Az F- és G-aktin hatása további érdekes következtetésekre utalhat az I-BAR funkcióját tekintve. A filopodium felépülésében stabilizáló szerepet tölt be az I-BAR domén, aminek a membránhoz való kötődését az F-aktin jelenléte tovább növelheti. A filopodiumban megjelenő – esetlegesen már kötegelődött F-aktin – saját szerkezeti merevsége mellett így, az I-BAR-on keresztül, közvetett módon stabilizálhatja a filopodiumot. Ezzel ellentétes hatást fejthet ki a G-aktin jelenléte.

## **Az IRSp53-I-BAR filamentális, illetve monomer aktinnal való kapcsolata**

A G- illetve F-aktin hatására bekövetkező különbség az I-BAR tekintetében felveti a kérdést, hogy vajon az I-BAR milyen módon képes a polimer illetve monomer aktinhoz kötődni. Az I-BAR-aktin kapcsolat leírása céljából további FRET kísérleteket terveztünk, amelyet F-aktinnal, különböző ionerősség mellett végeztünk el (25 mM, ill. 100 mM KCl). Méréseink során IAEDANS fluorofórral jelölt I-BAR-t és IAF festékkel jelölt F-aktint használtunk. Mindkét esetben azt figyeltük meg, hogy az aktin koncentráció növekedésével megnőtt a transzferhatásfok értéke mindkét sókoncentráció mellett. Ez azt jelenti, hogy az I-BAR képes az F-aktinhoz kötődni, az I-BAR F-aktinhoz való kötődését a sókoncentráció számottevően nem befolyásolja.

A G-aktin és az I-BAR közti kapcsolat vizsgálható volt „steady-state” fluoreszcencia anizotrópia segítségével. A kísérlet során az IAEDANS-aktin monomerek anizotrópiáját mértük különböző koncentrációjú I-BAR jelenlétében és hiányában.

A jelölt aktin monomerek anizotrópiája nőtt, a növekvő I-BAR koncentrációval, amely a két fehérje közötti kötődést tükrözi.

Összességében megállapítottuk, hogy az I-BAR képes az aktin filamentális és monomer formájához egyaránt kötődni. Az I-BAR hasonló affinitással köt mind az aktin monomer, mind a filamentum formához.

### **Az IRSp53-I-BAR hatása az aktin filamentum polimerizációjára**

Az aktin/I-BAR arányát az aktin polimerizációs kísérletben 1:0 és 1:10 változtattuk. Azt tapasztaltuk, hogy az I-BAR alacsony koncentrációjának jelenlétében (1:1, 2,5:1 arány) az aktin polimerizációja gátolt. Ezzel együtt a polimerizáció hosszabb idő alatt, de teljesen végbemegy. Ezzel ellentétes hatást figyeltünk meg magas, 1:10 aktin-I-BAR arány esetén, amikor az I-BAR, polimerizációt gyorsító hatása jelentkezett.

Összegezve megállapítható, hogy az I-BAR koncentrációfüggő módon képes befolyásolni az aktin filamentum polimerizációját. További kérdésként merült fel az, hogy vajon az I-BAR ebben a mechanizmusban előidézheti-e az aktin nukleációját. A munkám további részében erre is választ kerestem.

### **Az IRSp53-I-BAR hatása az aktin nukleációra**

Az I-BAR domén hasonló affinitással képes monomer és filamentális aktinhoz is kötni, ezért megvizsgáltam, hogy vajon előidézi-e az aktin nukleációját. Eredményeink szerint az 1  $\mu\text{M}$  pirén-aktin és 1  $\mu\text{M}$  vagy kevesebb I-BAR koncentráció mellett a pirén jel-intenzitás csak kis mértékben változott meg. A pirén jel 2  $\mu\text{M}$  I-BAR esetén viszont nagymértékű változást eredményezett, ami ennél magasabb I-BAR koncentrációk mellett nem nőtt tovább jelentősen.

A pirén-aktin fluoreszcencia intenzitásának változásából következtethetünk az I-BAR/aktin sztöchiometriára is. A mérési pontok maximumértékéhez illesztett egyenes, valamint a görbe alacsony koncentrációkhoz tartozó értékeire (lineáris változás feltételezésével) illesztett egyenes metszéspontjából ez a sztöchiometria meghatározható.

Eredményeink szerint az I-BAR/aktin sztöchiometria 2:1-nek adódott. Annak ismeretében, hogy az I-BAR dimer fehérje az állapítható meg, hogy egy I-BAR dimer egy aktin protomerhez kötődik a filamentumban.

A mintát a fluoreszcenciás mérések után koszedimentációs esszével is megvizsgáltuk, majd SDS-page gél elektroforézissel analizáltuk. A koszedimentációs kísérletben F-aktin került a pelletbe a hozzá kötött fehérjékkel együtt, a G-aktin pedig a felülúszóban maradt. Az elektroforézissel szétválasztott fehérjék analízisével megállapítható, hogy a pelletben megjelenő F-aktin csak magasabb, 0,5  $\mu\text{M}$ -nál nagyobb I-BAR koncentráció mellett jelent meg. Alacsonyabb, 1  $\mu\text{M}$  alatti koncentrációknál az F-aktin a pelletben nem volt kimutatható.

### **IRSp53 valamint I-BAR fehérjék túlexpresszállása COS-7 sejtekben**

Az IRSp53 valamint I-BAR fehérjéket túlexpresszálltunk COS-7 sejt kultúrában és vizsgáltuk a sejteken létrejövő morfológiai változásokat, különös tekintettel a filopódiumok számára, hosszeloszlására. Ahhoz, hogy az aktin polimerizáció hatását is nyomon kövessük, a sejteket Latrunkulin B toxinnal kezeltük, ami gátolja az aktin monomerek nukleációját, ezáltal az aktin filamentumok leépülését eredményezik. A morfológiai változások megfigyelése inverz fluoreszcens, illetve konfokális mikroszkóppal történt.

A sejteken megjelenő filopódiumok számát tehát az I-BAR domén és IRSp53 fehérje nagymértékben megnöveli, több kiindulási ponton kezdeményezve a filopódiumok megjelenését. Az F-aktin jelenléte nem szükséges feltétele a filopódiumok jelenlétének, viszont annak hiányában a filopódiumok száma drasztikusan csökken.



## **Filopódium hosszeloszlás vizsgálata COS-7 sejtekben**

Kísérleteink további részében vizsgáltuk a különböző fehérjék (I-BAR, IRSp53, aktin) hatását a filopódiumok hosszeloszlására.

Az aktinnal túlexpresszált sejtek által létrehozott filopódiumok átlagosan 4,4  $\mu\text{m}$  hosszúnak adódtak. Az I-BAR fehérjét tartalmazó COS-7 sejtek esetében 3,1  $\mu\text{m}$ -esek voltak, míg az IRSp53 fehérje által létrehozott átlagos filopódiumhossz 5,0  $\mu\text{m}$  volt.

Az eredmények összehasonlításához az egyes esetekben meghatároztuk a kumulatív relatív gyakoriság értékeket. Az eloszlás az aktin illetve az IRSp53 fehérjéknél közelítőleg megegyezik, ezzel szemben az I-BAR domén esetében a hosszeloszlás kis mértékben a rövidebb filamentumok felé tolódik el. Az I-BAR túlexpresszállása tehát szignifikánsan megemeli a filopódiumok számát (több filopódium megjelenését inicializálva) és egyúttal a filopódiumok hosszának kismértékű csökkenését idézi elő. Eddigi megfigyeléseink szerint az I-BAR domén alapvetően a filopódiumok megjelenési helyének számát növeli, a hosszukat azonban nem befolyásolja.

## Összefoglalás

Kísérleteink során megállapítottuk, hogy:

1. az IRSp53-I-BAR hasonló affinitással köt a különböző foszfolipidekhez, a kötés erőssége azonban függ a lipid töltésétől (a negatívabbnál erősebb)
2. az IRSp53-I-BAR egyidejűleg áll kapcsolatban a membránnal és az aktinnal
3. az IRSp53-I-BAR képes az aktin monomer (G) és filamentális (F) formájához is hasonló affinitással kötni
4. F-aktin stabilizálja az I-BAR-membrán kölcsönhatást, G-aktin gyengíti
5. az IRSp53-I-BAR befolyásolja az aktin polimerizáció folyamatát
6. sejtekben az IRSp53 és az I-BAR domén túlexpressziója megemeli a sejtnyúlványok számát
7. Latrunkulin B kezelés hatására a filopódiumszám lecsökken.

## A kutatási eredmények biológiai jelentősége

A várt kutatási eredményeink egyrészt hozzájárulnak az aktin-citoszkeleton szerepének tisztázásához a filopódium kialakulás folyamatában, másrészt fontos részleteket szolgáltatnak a molekuláris mechanizmusról, eredményeink új fejezetet nyithatnak a filopódium formálás megértésében. Segítségükkel bővebb információt kapunk mind az aktin, mind az IRSp53 fehérje biológiai szerepéről is.

## Irodalomjegyzék

1. Pollard, T.D. and J.A. Cooper, *Actin, a central player in cell shape and movement*. Science, 2009. **326**(5957): p. 1208-12.
2. Oda, K., et al., *Identification of BAIAP2 (BAI-associated protein 2), a novel human homologue of hamster IRSp53, whose SH3 domain interacts with the cytoplasmic domain of BAI1*. Cytogenet Cell Genet, 1999. **84**(1-2): p. 75-82.
3. Okamumoho, Y. and M. Yamada, [*Cloning and characterization of cDNA for DRPLA interacting protein*]. Nippon Rinsho, 1999. **57**(4): p. 856-61.
4. Yeh, T.C., et al., *Characterization and cloning of a 58/53-kDa substrate of the insulin receptor tyrosine kinase*. J Biol Chem, 1996. **271**(6): p. 2921-8.
5. Zhao, H., A. Pykalainen, and P. Lappalainen, *I-BAR domain proteins: linking actin and plasma membrane dynamics*. Curr Opin Cell Biol, 2011. **23**(1): p. 14-21.
6. Yamagishi, A., et al., *A novel actin bundling/filopodium-forming domain conserved in insulin receptor tyrosine kinase substrate p53 and missing in metastasis protein*. J Biol Chem, 2004. **279**(15): p. 14929-36.
7. Lee, S.H., et al., *Structural basis for the actin-binding function of missing-in-metastasis*. Structure, 2007. **15**(2): p. 145-55.
8. Frost, A., P. De Camilli, and V.M. Unger, *F-BAR proteins join the BAR family fold*. Structure, 2007. **15**(7): p. 751-3.
9. Peter, B.J., et al., *BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure*. Science, 2004. **303**(5657): p. 495-9.
10. Shimada, A., et al., *Curved EFC/F-BAR-domain dimers are joined end to end into a filament for membrane invagination in endocytosis*. Cell, 2007. **129**(4): p. 761-72.
11. Mattila, P.K., et al., *Missing-in-metastasis and IRSp53 deform PI(4,5)P2-rich membranes by an inverse BAR domain-like mechanism*. J Cell Biol, 2007. **176**(7): p. 953-64.
12. Millard, T.H., et al., *Structural basis of filopodia formation induced by the IRSp53/MIM homology domain of human IRSp53*. EMBO J, 2005. **24**(2): p. 240-50.
13. Suetsugu, S., et al., *Optimization of WAVE2 complex-induced actin polymerization by membrane-bound IRSp53, PIP(3), and Rac*. J Cell Biol, 2006. **173**(4): p. 571-85.
14. Spudich, J.A. and S. Watt, *The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin*. J Biol Chem, 1971. **246**(15): p. 4866-71.
15. Machesky, L.M., P.J. Goldschmidt-Clermont, and T.D. Pollard, *The affinities of human platelet and Acanthamoeba profilin isoforms for polyphosphoinositides account for their relative abilities to inhibit phospholipase C*. Cell Regul, 1990. **1**(12): p. 937-50.
16. Pollard, T.D., *A guide to simple and informative binding assays*. Mol Biol Cell, 2010. **21**(23): p. 4061-7.
17. Lakowicz, J.R., *Quenching of fluorescence*. In *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, ed. J.R. Lakowicz. 1983: Plenum Press, New York. 257-301
18. Schindelin, J., et al., *Fiji: an open-source platform for biological-image analysis*. Nat Methods, 2012. **9**(7): p. 676-82.

## Közlemények

### Az értekezés alapjául szolgáló közlemény:

**Kinga Futó**, Emőke Bódis, Laura M. Machesky, Miklós Nyitrai, Balázs Visegrády: Membrane binding properties of IRSp53-missing in metastasis domain (I-BAR) protein. *Biochimica et Biophysica Acta Molecular Biology of Lipids*, 2013. **1831(11):1651-5**.  
IF: 4,134

### Egyéb közlemények:

Xinzi Yu, Tobias Zech, Laura McDonald, Esther Garcia Gonzalez, Ang Li, Iain Macpherson, Juliana Schwarz, Heather Spence, **Kinga Futó**, Paul Timpson, Colin Nixon, Yafeng Ma, Ines M. Anton, Balazs Visegrady, Robert H. Insall, Karin Oien, Karen Blyth, Jim C. Norman, and Laura M. Machesky: N-WASP coordinates the delivery and F-actin mediated capture of MT1-MMP at invasive pseudopods to drive matrix remodeling and cancer cell invasion. *Journal of Cell Biology*, 2012. **199(3):527-44**.

IF: 10,26

Összesített IF: 14, 394

### Az értekezés alapjául szolgáló konferencia előadások:

**Futó Kinga**, Visegrády Balázs: Az I-BAR domén szerepe a filopodium formálásban. 43. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2013

**Futó Kinga**: Az aktin szerepe az IRSp53 által indukált filopodium formálásban. A Magyar Anatómus Társaság, a Magyar Biofizikai Társaság, a Magyar Élettani Társaság, és a Magyar Mikrocirkulációs és Vaszkuláris Biológiai Társaság Vándorgyűlése, Debrecen, 2012

Balázs Visegrády, **Kinga Futó**, Laura M. Machesky: The role of the I-BAR domain in the filopodia formation. 8th European Biophysics Congress Satellite Conference, Pécs, 2011

Kardos Roland, Tóth Mónika, **Futó Kinga**, Elisa Nevalainen, Pekka Lappalainen, Nyitrai Miklós és Hild Gábor: Aktinkötő fehérjék hatása az aktin monomer dinamikai tulajdonságára. Magyar Biofizikai Társaság XXIII. Kongresszusa Pécs, 2009