

Ph.D. értekezés tézisei

A Sarcomere length short fehérje Wiskott-Aldrich szindróma homológ régió 2 doménjeinek aktivitásai az aktin dinamika szabályozásában

Tóth Mónika Ágnes

2019

Témavezető: Dr. Bugyi Beáta

Interdiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola D93

Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Sümegei Balázs†

Program: B-130/199 – Funkcionális fehérjedinamika vizsgálata biofizikai módszerekkel

Programvezető: Prof. Dr. Nyitrai Miklós



PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR

BEVEZETÉS

A szarkomerikus vékony filamentumok összeszerelődésének modellje

A harántcsíkolt izom alapvető kontraktilis egységei a szarkomerek. Szerkezetük és működésük viszonylag jól ismert, de a szarkomerogenezis folyamatáról, azon belül is az aktin alapú vékony filamentumok összeszerelődéséről tudományos ismereteink a mai napig hiányosak. A szarkomer összeszerelődésének több modellje is létezik. Egy viszonylag új tanulmány szerint az aktin filamentumokba való szerveződése alapján egy 3-fázisú modell feltételezhető [1]:

1. fázis: A szarkomer fejlődésének kezdeti szakaszában az aktin filamentumok 'robbanásszerű' *de novo* polimerizációja figyelhető meg. Ennek eredményeképpen homogén eloszlású, közel párhuzamos orientációjú mikrofilamentum raktár alakul ki.

2. fázis: A kialakuló szarkomerikus egységeken belül a *de novo* polimerizációt az aktin monomerek foltszerű asszociációja váltja fel. Az aktin beépülése mind a szöges (Z korongnál), mind pedig a hegyes végen (M vonal irányában) megfigyelhető, amely révén a filamentumok egyenletes hosszeloszlása alakul ki.

3. fázis: A késői szakaszokra az aktin beépülésének három különböző módja jellemző: a vékony filamentumok laterális hosszabbodása, a szarkomerek perifériás (transzverzális) vastagodása és a szöges vég dinamika (*turnover*).

A fentiek alapján a szarkomerikus vékony filamentumok összeszerelődése az *in vitro* spontán aktin filamentum szerveződési mechanizmusokat tükrözi: *de novo* nukleáció és elongáció, longitudinális vég-vég asszociáció (*annealing*), transzverzális oldal-oldal asszociáció (*bundling/crosslinking*). Érdekes módon ugyanakkor a vékony filamentumok hegyes végen történő hosszabbodása is megfigyelhető, ami ellentétes a nem-izom sejtekben és a tisztított fehérjerendszerekben az aktin filamentumokra általában jellemző szöges vég súlypontú növekedéssel.

A fejlődési állapotnak megfelelő fázisok szerkezeti és dinamikai sajátosságai jól elkülönülnek, de a háttérükben álló molekuláris mechanizmusok részleteiben nem ismertek.

Az aktin filamentumok kialakulását és dinamikáját szabályozó fehérjék a harántcsíkolt izom fejlődése során

A vékony filamentumok kialakulásának és szerveződésének módjai összetett mintázatot mutatnak a szarkomerogenezis során, ami alapján különböző aktinkötő fehérjék bonyolult, összehangolt működése feltételezhető [1-3].

A thymosin $\beta 4$ (T $\beta 4$) és a profilin monomerkötő fehérjék már az izomfejlődés korai szakaszaiban kifejeződnek gerincesek harántcsíkolt izmaiban [4, 5]. Biokémiai aktivitásaik

alapján ezek a fehérjék az aktin polimerizációjának negatív szabályozói; a szarkomer monomer raktárának fenntartásában lehet szerepük (szekvesztráció és nukleotid csere) [6].

A szarkomerikus aktin filamentumok dinamikus sajátságait több aktinkötő fehérjecsald koordinálja. A filamentumvégek dinamikáját sarkafehérjék korlátozzák [4, 5, 7]. A filamentumok szöges végét a Z korongnál a CapZ sarkázza, ami révén gátolja a filamentumok elongációját, ugyanakkor szerepe van a filamentumok szabályos regiszterbe való rendezésében is. A tropomodulin (Tmod) az aktin filamentumok hegyes végével (M vonal irányában) alakít ki kölcsönhatást, gátolva azok elongációját és depolimerizációját. A Tmod aktivitását a tropomiozinnal (Tpm) kialakított kölcsönhatása pozitívan befolyásolja. *In vitro* több olyan aktinkötő fehérjecsald is ismert, amelyek képesek elősegíteni a filamentumok képződését (*assembly promoting factors*, APFs); ezek a harántcsíkt izomban is kifejeződnek [3, 4, 8]. Az APF családba tartoznak a formin fehérjék (FHOD, FMNL, Dia, INF és DAAM) és a WH2 domén Leiomodin fehérje (Lmod). Biokémiai sajátságaik alapján adódott az attraktív elképzelés, mely szerint a forminok és a Leiomodin a szarkomerikus aktin filamentumok *de novo* nukleátorai lehetnek [8, 9], azonban e funkciójuk biológiai környezetben még nem bizonyított. Állatkísérletes vizsgálatok alapján inkább az aktin filamentumok szerkezeti rendezettségének kialakításában lehet szerepük, nem pedig a miofibrillogenezis kezdeti fázisaiban megfigyelhető *de novo* filamentum összeszerelődésben [10].

WH2 domén fehérjék

A WH2 (*Wiskott-Aldrich syndrome homology region 2*) domén egy rövid, néhány tíz (20 – 50) aminosavból álló aktinkötő régió [6, 11, 12]. A domén sajátsága egy központi konzervált LKKT/V aminosav mintázat. Ezt a domén N-terminálisán egy amfipatikus jellegű α -hélix, a C-terminális irányban pedig egy FxxxK aminosav mintájú szakasz veszi közre. A domén C-terminális változatos mind hossz, mind pedig összetétel tekintetében. A WH2 domének kötőpartner hiányában nem rendelkeznek másodlagos szerkezeti elemekkel, térbeli szerkezetük rendezetlen (*intrinsically disordered region*, IDR). A domén részleges *foldingja* a partnerfehérjével; az aktinnal kialakított kölcsönhatása révén valósulhat meg [13, 14]. Az aktin asszociált fehérjékben a WH2 domének előfordulhatnak izoláltan, tandem módon rendeződve (2 – 4 domén), vagy más típusú aktinkötő modulokkal övezve [10, 15]. A doménkörnyezettől függően a WH2 domén fehérjék mind az aktin monomerekkel, mind pedig a filamentumokkal kölcsönhathatnak; így a domének számától és aminosav összetételétől függő multifunkcionális sajátságokkal rendelkezhetnek. A WH2 domén fehérjecsald tagjai az izomműködésben is meghatározó szerepet játszanak; a vázizom szarkomerikus aktin filamentumainak összeszerelődésében és szerveződésében. A Leiomodin gerinces specifikus fehérje, míg a Sarcomere length short (SALS) *Drosophila melanogaster*-ben fordul elő [1, 9,

16, 17]. Bár *in vivo* vizsgálatok alapján a két fehérje hasonló funkcionális sajátosságokkal rendelkezik, genetikai kapcsolat közöttük nem ismert [1, 4, 8].

Leiomodin

A Leiomodin (Lmod1 – 3) izoformái a tropomodulin családdal rokon fehérjék. A harántcsíkolt izom specifikus Lmod2 és Lmod3 a szarkomerikus vékony filamentumok szerveződésében, azok hosszának szabályozásában játszik fontos szerepet [8]. A fehérje diszfunkciója több humán betegség hátterében áll (Lmod2: dilatált kardiomiopátia [18, 19], Lmod3: nemaline miopátia [16]). Az Lmod két aktin-, (ABS1, ABS2) és egy tropomiozinkötő (TMBS1) régió mellett a C-terminálisán egy prolin aminosavakban gazdag (*proline-rich domain*, PRD) szakaszt és egy WH2 domént tartalmaz. A PRD profilin kölcsönhatása nem ismert. Az Lmod az aktin filamentumok összeszerelődését katalizálja *in vitro* a *de novo* nukleációs aktivitása révén, ami az ABS2 és WH2 domének szinergikus hatásához köthető. A tropomiozin kötése a fehérje ezen aktivitásának pozitív szabályozója. Az Lmod biológiai funkciója hátterében álló molekuláris mechanizmusok részletei azonban még pontosan nem ismertek.

Sarcomere length short

A *Sarcomere length short (sals)* gént 2007-ben azonosították ecetmuslica primer izomsejtekben [17]. A SALS fehérjének két izoformája ismert; egy hosszú (935 as), izom specifikus (ISALS) és egy rövid (533 as), nem-izom szövetekben megtalálható izoforma (sSALS). A SALS gerinces ortológja nem ismert [4]. A hosszabb ISALS két WH2 doménnel (WH2-1: 399-416 as, WH2-2: 447-481 as) és azoktól N-terminális irányban egy prolinokban gazdag szakasszal (Pro) rendelkezik. A rövidebb sSALS a hosszú izoformának a C-terminális felét teszi ki egy WH2 doménnel. A fentiekén kívül más specifikus régiót/domént nem azonosítottak a fehérjében.

A SALS lokalizációját tekintve komplex mintázatot mutat; a fejlődő ecetmuslica lárvák izomszövetében a vékony filamentumok elongációja során azok hegyes végéhez asszociált, az adult állatokban miután a vékony filamentumok elérték a végleges hosszukat azonban jellemzően a Z korong környékére helyeződik át. A *sals* gén csendesítése már az embrionális korban letálisnak mutatkozott, ami a fehérje esszenciális funkcióra enged következtetni. A *sals* mutáció primer izomsejt kultúrában a szarkomerek rövidülését és számuk növekedését, vékonyabb miofibrillumokat és szakadozottabb izomrostokat eredményezett a vad típushoz képest. Míg a miozin II alapú vastag filamentumok szerveződésére nincs jelentős hatással. A *sals* mutáns embriók izmainak elektronmikroszkópiás vizsgálata nemaline miopátiára jellemző sötétebb foltokat tárt fel. A fehérje túltermelése (*Dmef2-Gal4, UAS-sals*) rendellenes harántcsíkolt mintázatot, valamint hosszabb szarkomerek kialakulását idézte elő. A fenotípus a *Tmod* csendesítésére is jellemző. A SALS mennyiségének csökkenése a *Tmod* túltermelés

hatását fokozta, ami a két fehérje genetikai kölcsönhatására és antagonisztikus funkciójára utal a vékony filamentumok összeszerelődése során. A *sals* gén temporálisan kontrollált csendesítése fiatal állatokban (50 h pete rakást követően) a vékony filamentumok hegyes végi hossznövekedését szignifikánsan gátolta, azonban a szarkomerek perifériás vastagodását nem befolyásolta [1].

Mindezek alapján a SALS a szarkomerikus aktin hálózatok fontos szabályozójaként közvetett módon befolyásolja a vékony filamentumok hegyes vég elongációját a szarkomer érése során. A fenti megfigyelések alapján felállított hipotézis szerint a SALS a vékony filamentumok hegyes végi elongációját segíti elő [17]. Mindazonáltal a SALS aktin kölcsönhatásai és azoknak a fehérje biológiai funkciójában betöltött szerepe nem tisztázott.

CÉLKITŰZÉSEK

A szarkomer szerkezeti sajátosságai viszonylag jól ismertek, azonban kialakulásának folyamata, a vékony filamentumok összeszerelődésének és szerveződésének háttérében álló komplex események és szabályozó fehérjék, illetve azok pontos működési mechanizmusa részleteiben nem tisztázott. A vékony filamentumok összeszerelődésük tekintetében szokatlan sajátsgot mutatnak, amennyiben az *in vitro* és nem-izom sejtekben domináns szöges vég növekedéssel szemben a hegyes vég dinamikája tűnik az elongáció vonatkozásában meghatározónak. Ebben a tekintetben a WH2 domén fehérjék, mint a humán Leiomodin és a *Drosophila* specifikus Sarcomere length short, fontos szerepet tölthetnek be a szarkomerikus aktin filamentumok dinamikai szabályozásában. Habár a két fehérje között genetikai rokonság nem ismert, biológiai aktivitásaik alapján funkcionális homológiát, valamint az aktinra gyakorolt hatásmechanizmusuk konzerváltságát sejthetünk.

A Ph.D. munkám során érdeklődésem középpontjában a SALS fehérje biológiai funkcióinak háttérében álló molekuláris mechanizmusok feltárása állt. A WH2 domén ismert aktinkötő motívum, ezért elsőként a SALS két WH2 doménjének és az aktin kölcsönhatásának *in vitro* biokémiai és biofizikai jellemzését tűztem ki célul. A SALS a WH2 doménjei mellett rendelkezik egy prolin-gazdag régióval, ami az aktinkötő profilinnal alakíthat ki kölcsönhatást, és befolyásolhatja a SALS aktin dinamikára kifejtett hatását *in vitro*. Így a WH2 domének jellemzése mellett munkám kiterjedt a prolin-gazdag régió szerepének vizsgálatára is.

A következő kérdésekre kerestem a választ:

- Hogyan hat kölcsön a SALS az aktinnal?
- Hogyan befolyásolja a SALS az aktin dinamikát?
- A WH2 domén tartalmú fehérjékhez hasonlóan a SALS esetében is megfigyelhetünk funkcionális sokszínűséget?
- Milyen szarkomerikus fehérjék befolyásolhatják a SALS működését?

A célkitűzések megvalósítására kutatásaim során a SALS WH2 doménjeit (SALS-WH2), valamint a prolin-gazdag régióját is tartalmazó fragmentumát (SALS-Pro-WH2) állítottam elő rekombináns úton, és azok aktin monomerekkel és filamentumokkal kialakított *in vitro* kölcsönhatásainak jellemzését végeztem el biokémiai és biofizikai módszerekkel.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A fehérjék előállítása és fluoreszcens módosítása

A SALS-WH2 (379 – 531 aminosav) és a SALS-Pro-WH2 (345 – 531 aminosav) konstruktok cDNS-ét pGEX-2T plazmidba klónozva együttműködő partnerünk (dr. Mihály József, MTA SZBK, Szeged) bocsátotta rendelkezésünkre. A fehérjéket GST (*Glutation S-Transzferáz*) fúziós fehérjeként *E. coli* BL21(DE3)pLysS (Novagen) sejtvonal alkalmazásával termeltettük és tisztítottuk. Az aktint és a tropomiozint nyúl vázizomból nyert acetoneforgácsból tisztítottuk [20-22]. A humán gelsolint (GSN), az egér profilin1 (profilin) és a nyúl vázizom miozin II fehérjéket korábban leírtak alapján preparáltuk [26, 27]. Az aktint pirén (Sigma-Aldrich), IAEDANS (Life technologies), IAF (Sigma-Aldrich) és Alexa488[®]NHS (Invitrogen); a tropomiozint Alexa568[®]C₅ maleimid (Invitrogen); a profilint Alexa568[®]C₅ maleimid (Invitrogen) fluorofórokkal standard eljárások alapján jelöltük [20, 23-25].

Fluoreszcencia spektroszkópai vizsgálatok

Steady-state fluoreszcencia emisszió és anizotrópia mérésekben vizsgáltuk a SALS WH2 doménjeinek aktin monomerekkel kialakított kölcsönhatását, IAEDANS, vagy Alexa488NHS jelölt G-aktint (1 μ M vagy 20 μ M) alkalmazva. A spontán polimerizáció megakadályozása érdekében az aktint (1 μ M vagy 20 μ M) Latrunculin A-val (4 μ M vagy 20 μ M) inkubáltuk. A SALS konstruktokat ezt követően adtuk a mintákhoz. A SALS és a tropomiozin (A568[®]C₅ maleimid-Tpm, 1 μ M) kölcsönhatását steady-state anizotrópia mérésekben, különböző ionerősségű környezetben vizsgáltuk (alacsony ionerősség: 10 mM NaCl, közepes ionerősség: 50 mM KCl + 10 mM NaCl, magas ionerősség: 100 mM KCl + 10 mM NaCl; a 10 mM NaCl a SALS tárolópufferének hozzájárulása). Az ionok közötti elektrosztatikus kölcsönhatás erősségét jellemző ionerősséget az ionok moláris koncentrációjának és töltésének ismeretében határoztuk meg. A SALS és a profilin (A568[®]C₅ maleimid-profilin, 1 μ M) kölcsönhatását steady-state anizotrópia mérésekben vizsgáltuk. A relatív fluoreszcencia emisszió és a maximum hullámhossz értékeit, valamint az anizotrópia értékeket a SALS (SALS-WH2 és SALS-Pro-WH2) koncentrációjának függvényében ábrázoltuk, az adatok kvantitatív elemzése során a SALS:G-aktin, illetve SALS:Tpm kölcsönhatást jellemző disszociációs egyensúlyi állandókat (K_D) határoztuk meg.

Fluoreszcencia rezonancia energia transzfer (FRET) méréseket végeztünk a SALS:G-aktin komplex sztöchiometriájának megállapítása érdekében. Donorként (D) IAEDANS (1 μ M), akceptorként (A) IAF (9 μ M) jelölt aktint használtunk. A donor és az akceptor közötti energiatranszfer hatásfokát G (monomer) és F pufferben (G puffer + 1 mM MgCl₂, 50 mM KCl, filamentum), valamint gelsolin (5 μ M; 1 GSN : 2 G-aktin), vagy SALS-WH2 (10 μ M)

jelenlétében határoztuk meg. A fluoreszcencia emissziót korigáltuk a minta önabszorpciójából származó *inner filter* effektusra.

A SALS konstruktok hatását az aktin monomer:filamentum egyensúlyra pirén jelölt aktin alkalmazásával többféle módon vizsgáltuk.

Az aktin polimerizáció kinetikai vizsgálata: Az aktin (2.5 μM , 5% pirén jelölt) polimerizációját 1 mM MgCl_2 és 50 mM KCl hozzáadásával indítottuk el SALS hiányában és jelenlétében. Az aktin filamentumok összeszerelődésének kinetikáját a pirén fluoreszcencia emissziójának időbeli változásán keresztül követtük nyomon. A kvantitatív elemzés érdekében a polimerizáció sebességét a pirén tranziens kezdeti szakaszára (0 – 500 s) illesztett egyenes meredekségéből határoztuk meg és ábrázoltuk a [SALS] függvényében. Az analízis során a féltelítési koncentrációt (IC_{50}) határoztuk meg [28]. A SALS konstruktok hatását az aktin filamentumok hegyes vég dinamikájára gelsolin:aktin magok (*seeds*, GA_2) alkalmazásán alapuló polimerizációs kísérletekben vizsgáltuk. A GA_2 komplex létrehozásához gelsolint (0.5 μM) és G-aktint (1.1 μM) inkubáltunk G pufferben CaCl_2 jelenlétében (2.5 mM) [23]. Az aktin monomerek (1.2 μM , 5% pirén jelölt) GA_2 magokhoz (33 nM) történő asszociációjának kinetikáját követtük nyomon SALS hiányában és különböző koncentrációi mellett.

Az aktin depolimerizáció kinetikai vizsgálata: Az aktin filamentumokat (1 μM , 50% pirén jelölt) 20 nM-ra hígítottuk a SALS különböző koncentrációi, gelsolin (0.1 és 0.5 μM), vagy Latrunculin A (20 μM) mellett. A Tpm jelenlétében végzett mérések során az aktin filamentumokat tropomiozinnal (4.5 μM) inkubáltuk (4 °C, éjszakán át) a SALS hozzáadását megelőzően. Az aktin filamentumok szétszerelődésének kinetikáját a fluoreszcencia emisszió csökkenésének időbeli nyomon követésével vizsgáltuk.

A kritikus koncentráció meghatározása: Aktint (5% pirén jelölt) polimerizáltunk növekvő koncentrációban SALS-WH2 hiányában és jelenlétében (0.5 μM és 1.5 μM), vagy gelsolin (0.01 μM) hozzáadását követően. A minták steady-state pirén fluoreszcencia emisszióját mértük és ábrázoltuk az [aktin] függvényében ($J(c)$ ábrázolás) [29]. A $J(c)$ ábrázolás karakterisztikus töréspontjához tartozó aktin koncentráció a steady-state 'nempolimerizált' aktin mennyiségének felel meg. Ez a steady-state szabad G-aktin (kritikus koncentráció, c_c) és a szabályozó fehérjék által kötött, szekvesztrált monomerek mennyiségének összegéből tevődik össze. Így, a kritikus koncentráció, a mintában lévő teljes [SALS-WH2], valamint a SALS-WH2:G-aktin komplex disszociációs egyensúlyi állandójának függvénye.

A monomer:filamentum arány steady-state vizsgálata: Aktint (2.5 μM , 50% pirén jelölt) polimerizáltuk phalloidin (2.5 μM), jasplakinolide (2.5 μM) vagy tropomiozin (6 μM) hiányában, illetve jelenlétében (4 °C, éjszakán át). Ezt követően a filamentumokat a SALS-

WH2 különböző koncentrációi mellett inkubáltuk (4 °C, éjszakán át), majd a steady-state pirén fluoreszcencia emissziót mértük és relatív értékeit ábrázoltuk a [SALS-WH2] függvényében.

Teljes belső visszaverődésen alapuló fluoreszcencia mikroszkópia (TIRFM)

A TIRFM vizsgálatok során Alexa488[®]NHS jelölt G-aktin (0.5 μM, 10% Alexa[®]NHS488 jelölt) polimerizációjának kinetikáját az egyedi filamentumok szintjén követtük nyomon SALS-WH2 hiányában és jelenlétében. A vizsgálatokhoz N-etilmaleimid (NEM) jelölt vázizom miozin II-vel funkcionált fedőlemezt alkalmaztunk, biztosítva az aktin filamentumoknak az evanescens mezőben való jelenlétét. Az aktin filamentumok növekedési sebességét határoztuk meg és ábrázoltuk a [SALS-WH2] függvényében, az adatokból a félteltési koncentrációt (IC₅₀) származtattuk.

Szedimentációs vizsgálatok

A SALS monomer:filamentum egyensúlyra gyakorolt hatását, valamint F-aktin kölcsönhatását ultracentrifugáláson alapuló koszedimentációs módszerrel vizsgáltuk; F-aktin (1, 1.5 és 2.5 μM) vagy phalloidin-F-aktin (1 μM) alkalmazásával. A minták ultracentrifugálását (300.000 g, 30 min, 20°C) követően az üledék és a felülúszó fehérjetartalmát SDS-PAGE analízissel vizsgáltuk. A felülúszóban (G-aktin) és pelletben (F-aktin) lévő aktin koncentrációját kalibrációs görbe segítségével határoztuk meg, majd ábrázoltuk a SALS koncentrációjának függvényében. Az adatsorra illesztett egyenes meredeksége függ a kritikus koncentrációtól, a mintában lévő teljes [SALS-WH2]-tól, valamint a SALS-WH2:G-aktin komplex disszociációs egyensúlyi állandójától.

EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

A SALS WH2 doménjei kölcsönhatnak az aktin monomerekkel

A steady-state fluoreszcencia emisszió és anizotrópia kísérleteink eredményei alapján a SALS-WH2 mikromolár alatti affinitással ($K_D \sim 0.23 - 0.4 \mu\text{M}$) köt az aktin monomerekhez. A SALS-WH2:G-aktin kölcsönhatást az aktin Cys³⁷⁴ aminosavához kapcsolt IAEDANS spektrális tulajdonságainak (fluoreszcencia emisszió csökkenése, maximum hullámhossz vöröseltolódása) szignifikáns változása kísérte. Ennek háttérében az állhat, hogy a WH2 domének kötődése a fluorofór lokális környezetét befolyásolja, ami az IAEDANS oldószer számára való elérhetőségét fokozza. Az Alexa488NHS jelölő alkalmazásakor a fluoreszcencia emisszió spektrális sajátságai nem változtak. Az Alexa488NHS a monomer Lys³²⁸-as aminosavához kapcsolódva távolabb esik a WH2 domének kötőhelyétől. A SALS-WH2:G-aktin komplex sztöchiometriája is függött az alkalmazott fluorofórtól (IAEDANS esetén 1 : 1, Alexa488NHS esetén 1 : 2). Az Alexa488NHS jelölő tehát alkalmasabb a WH2 domén:G-aktin kölcsönhatásra irányuló vizsgálatokban.

Megfigyeléseink arra engednek következtetni, hogy a SALS mindkét WH2 doménje kölcsönhat egy-egy aktin monomerrel. A SALS WH2 doménjei a WH2 doménekre jellemző 'klasszikus' – szerkezetvizsgálati módszerekkel meghatározott – módon kapcsolódhatnak az aktin monomerekhez; a domén N-terminális amfipatikus α -hélice a G-aktin S1 és S3 alegysége közötti hidrofób árokba ékelődik be [13, 14].

A SALS WH2 doménjei gátolják az aktin monomerek filamentumba épülését

A SALS fehérjével kapcsolatos *in vivo* vizsgálatok azt a hipotézist vetették fel, hogy a fehérje elősegíti a szarkomerikus vékony filamentumok elongációját a hegyes végen [1, 17]. A polimerizációs kinetikai vizsgálataink szerint a SALS-WH2 koncentrációfüggő módon gátolta a filamentumképződést; a féltelítési koncentráció $IC_{50} \sim 0.3 \mu\text{M}$ -nak adódott. A SALS-WH2 polimerizációra kifejtett hatását egyedi aktin filamentumokon TIRFM segítségével is megvizsgáltuk. A SALS-WH2 koncentrációfüggő módon gátolta a filamentumok elongációját; a féltelítési koncentráció $IC_{50} \sim 0.4 \mu\text{M}$ -nak adódott. Kvantitatív elemzést nem végeztünk, de a TIRFM felvételek arra utalnak, hogy a SALS-WH2 jelenlétében nem csak a filamentumok hossza változott, de számuk is csökkent. A fenti IC_{50} értékek közel azonosak a steady-state fluoreszcencia spektroszkópiai mérésekben meghatározott K_D értékkel, ami arra utal, hogy a SALS-WH2 polimerizációt gátló hatása a monomerekkel kialakított kölcsönhatásán alapul. Eredményeink arra engednek következtetni, hogy a SALS WH2 doménjei gátolják mind az aktin filamentumok nukleációját, mind pedig azok elongációját. A SALS-WH2 polimerizációt

gátló aktivitása így ellentétes a teljes hosszúságú fehérje feltételezett, filamentum összerelődést elősegítő aktivitásával.

A teljes hosszúságú SALS fehérje elemzése során leírták, hogy a gelsolin által – a szöges végen – sapkázott filamentumok összeszerelődését gátolja, ami a SALS és a filamentumok hegyes vége közötti kölcsönhatására utal [17]. A fluoreszcencia spektroszkópián alapuló kinetikai méréseinkben a polimerizációt gelsolin-aktin magokról indukáltuk. Eredményeink szerint a SALS-WH2 koncentrációfüggő módon gátolta a filamentumok hegyes vég polimerizációját is. Mindez arra utal, hogy a SALS izolált WH2 doménjei nem elégségesek a hegyes végen történő filamentum összeszerelődés elősegítéséhez.

A SALS WH2 doménjei szekvesztráló aktivitással bírnak

A SALS-WH2 polimerizációra kifejtett gátló hatása eredhet a monomerekkel kialakított kölcsönhatásán alapuló szekvesztráló aktivitásából és/vagy a filamentumokkal kialakított kölcsönhatásán alapuló szöges vég sapkázásból. A SALS-WH2 filamentumvég dinamikára kifejtett hatását kritikus koncentráció mérésekben vizsgáltuk. A SALS-WH2 hiányában a $J(c)$ ábrázolás töréspontja $c_c \sim 0.15 \mu\text{M}$ -nál jelent meg, ami a szöges vég dinamikáját jellemző kritikus koncentrációnak felel meg. Gelsolin jelenlétében a töréspont $c_c \sim 0.6 \mu\text{M}$ -ra tolódott, a hegyes vég dinamikáját jellemző kritikus koncentráció értékre. SALS-WH2 jelenlétében ($0.5 \mu\text{M}$ vagy $1.5 \mu\text{M}$) a $J(c)$ ábrázolás párhuzamosan futott a spontán dinamikát jellemző adatsorral, azonban a töréspontok rendre $\sim 0.3 \mu\text{M}$ -nak, illetve $\sim 0.8 \mu\text{M}$ -nak adódtak. Megfigyeléseink kvantitatív elemzése arra enged következtetni, hogy SALS-WH2 jelenlétében a 'nempolimerizált' aktin mennyiségének növekedését a fehérje szekvesztráló aktivitása és nem a szöges végek sapkázása magyarázza.

A koszedimentációs vizsgálataink eredménye is alátámasztotta a WH2 domének szekvesztráló aktivitását. Az üledékben lévő aktin (F-aktin) mennyisége csökkent, a felülúszóban lévő aktin (monomerek és/vagy kisebb oligomerek) mennyisége növekedett a SALS-WH2 koncentrációjának növelésével. A pelletben és a felülúszóban lévő aktin mennyiségét a [SALS-WH2] függvényében ábrázolva párhuzamos lefutású lineáris tendenciát figyeltünk meg az alkalmazott aktin koncentrációk esetében. Az illesztett egyenesek meredekségének abszolút értéke 0.36 ± 0.02 -nak adódott, ami összhangban van a SALS-WH2 szekvesztráló aktivitásával.

A SALS WH2 doménjei elősegítik az aktin filamentumok szétszerelődését

A depolimerizációs kinetikai kísérleteink eredményei egyértelműen arra utalnak, hogy a SALS-WH2 aktív módon képes elősegíteni a filamentumok szétszerelődését, a hatás mértéke alapján a *severing* (fragmentáló) aktivitásnak megfelelő hatékonysággal. A SALS-WH2 *severing* aktivitásának előfeltétele a filamentumok oldalához való kötése. A steady-state

fluoreszcencia spektroszkópiai kísérleteink során megfigyeltük, hogy a SALS-WH2 kötődik a phalloidin-, vagy a jasplakinolide-stabilizált aktin filamentumokhoz, de nem képes azok szétszerelődését elősegíteni. Ez lehetőséget adott a SALS-WH2 közvetlen filamentum oldalkötésének kvantitatív vizsgálatára. Koszedimentációs kísérletek során a phalloidin-stabilizált F-aktin jelenlétében a SALS-WH2 koncentrációfüggő módon megjelent a pelletben, ennek mennyisége magasabb volt ($\sim \mu\text{M}$), mint ami a filamentum végkötésnek tulajdonítható ($\sim \text{nM}$). Ez a SALS-WH2 filamentum oldalkötésére utal. A telítési görbe maximumához tartozó SALS-WH2:aktin arány ~ 0.5 -nek adódott. Ez az érték megegyezik a steady-state anizotrópia mérésekben megállapított 1 SALS-WH2 : 2 aktin sztöchiometriával, ami arra utal, hogy a SALS mindkét WH2 doménje kötődik az aktin filamentumok oldalához.

Mindezek alapján arra következettünk, hogy a SALS WH2 doménjei képesek közvetlenül az aktin filamentumok oldalához kötődni, ami révén elősegítik az aktin filamentumok szétszerelődését, tehát *severing* aktivitással bírhatnak.

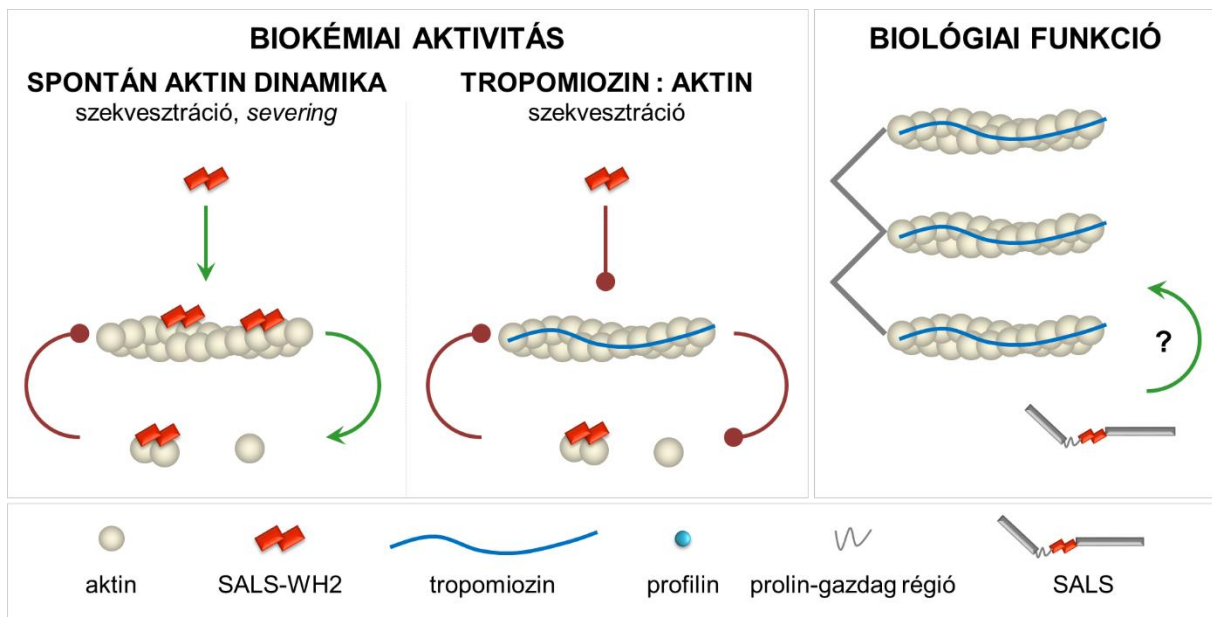
Aktinkötő fehérjék hatásai a SALS WH2 doménjeinek aktin aktivitásaira

A SALS más WH2 domén fehérjékhez hasonlóan (Arp2/3 aktivátorai, VASP, MIM, WIP, Cordon Bleu és a Leiomodin [30]) tartalmaz egy prolin-gazdag régiót a WH2 doménektől N-terminális irányban. A prolin-gazdag régió gyakori motívum aktinkötő fehérjékben, ami profilinnel biztosíthat kölcsönhatást és ez által a fehérje aktin dinamikára kifejtett hatását módosíthatja [23, 25, 27, 31-33]. A SALS prolin-gazdag régiójának vizsgálata érdekében a WH2 domének mellett a prolin-gazdag régiót is tartalmazó konstrukt (SALS-Pro-WH2) biokémiai aktivitásait tanulmányoztuk. Steady-state anizotrópia méréseink szerint a SALS prolin-gazdag szakasza nem képes profilint kötni és nem befolyásolja a WH2 domének aktivitását, sem profilin jelenlétében sem hiányában. Ez arra utal, hogy a SALS esetén a prolin-gazdag szakasz a fehérje flexibilis szerkezeti elemeként funkcionálhat.

Az F-aktin kanonikus szarkomerikus partner fehérje a tropomiozin gátolta a SALS-WH2 által mediált *severing* kinetikáját a hígítás indukálta depolimerizációs mérésekben. Ugyanakkor a steady-state pirén fluoreszcencia emisszió alapuló kísérleteinkben a monomerek mennyisége azonos volt, mind tropomiozin jelenlétében, mind annak hiányában. A phalloidinnal ellentétben a tropomiozin nem/kis mértékben befolyásolja filamentumvégek dinamikáját, így nincs hatással a szekvesztráció révén felhalmozódó monomerek mennyiségére [34, 35]. Ezek alapján a tropomiozin a SALS-WH2 szekvesztráló aktivitására nem, csak *severing* aktivitására lehet hatással. Összhangban ezzel, az F-aktin:Tpm komplex nagyfelbontású szerkezete alapján a tropomiozin filamentum oldalkötése sztérikus módon gátolhatja a SALS-WH2 F-aktin kötését és ez által *severing* aktivitását [36]. A steady-state anizotrópia vizsgálataink alapján a SALS kötődik a tropomiozinhoz. A komplex disszociációs egyensúlyi állandói a különböző ionerősségű környezetben SALS-WH2: $K_D = 1.1 \pm 0.2 \mu\text{M}$ (5

mM), $K_D = 41.3 \pm 7.7 \mu\text{M}$ (32 mM), $K_D > 100 \mu\text{M}$ (59 mM); SALS-Pro-WH2: $K_D = 0.7 \pm 0.4 \mu\text{M}$ (5 mM)–nak adódtak. Az ionerősség növelése a kötést szignifikánsan gyengítette, ami a kölcsönhatás elektrosztatikus jellegére utal. Eredményeink arra engednek következtetni, hogy a kötésben nem a WH2 domének, hanem a konstrukt más szekvenciareszletei meghatározóak. Érdekes megjegyezni, hogy a tropomiozinkötés a SALS és a Leiomodin közös sajátága [8, 9]. Az Lmod:Tpm kölcsönhatás az Lmod N-terminálisán található TMBS kötőhelyen keresztül valósul meg. Továbbá ismert, hogy a Lmod tropomiozin kötése a nukleációs aktivitását fokozza [8, 9].

Eredményeink alapján az izolált SALS-WH2 aktivitásai nem rekonstruálják a teljes hosszúságú fehérje aktin dinamikában tetten érhető hatásait (1. ábra) [1, 17]. Ez arra enged következtetni, hogy a SALS más régiói és/vagy más szarkomerikus elemek is nélkülözhetetlenek a fehérje megfelelő biológiai funkcióihoz. A kérdéskör vizsgálata a jövőbeli kutatómunkám célkitűzését alapozza meg. Ennek megvalósítása érdekében elkezdtem kidolgozni a teljes hosszúságú SALS fehérje rekombináns úton történő előállítására vonatkozó protokollt.



1. ábra A SALS izolált WH2 domének biokémiai aktivitásainak és a teljes hosszúságú fehérje feltételezett biológiai funkciójának sematikus ábrázolása.

A Ph.D. MUNKÁM SORÁN ELÉRT ÚJ EREDMÉNYEK

A SALS WH2 doménjei kölcsönhatnak mind az aktin monomerekkel, mind pedig a filamentumokkal. A szekvesztráló és severing aktivitásaik révén a monomer:filamentum arányt a monomer irányába tolják el.

- A SALS-WH2 a G-aktin kötés tekintetében a WH2 doménekre jellemző szerkezeti sajátosságokat követi.
- A SALS-WH2:G-aktin kölcsönhatást mikromolár alatti affinitás jellemzi.
- A SALS-WH2:G-aktin komplex sztöchiometriája 1 : 2, azaz a SALS mindkét WH2 doménje képes egy-egy aktin monomert megkötni.
- SALS-WH2 monomer kölcsönhatásának funkcionális következménye a szekvesztráló aktivitás, ami révén gátolja a monomerek filamentumba épülését, annak szöges és hegyes végén egyaránt.
- A SALS WH2 doménjei képesek kölcsönhatást kialakítani az aktin filamentumok oldalával.
- SALS-WH2 filamentum kölcsönhatásának funkcionális következménye a severing aktivitás, ami révén elősegíti az aktin filamentumok szétszerelődését.
- A SALS prolin-gazdag régiója nem képes proflint kötni és nem befolyásolja a WH2 domének aktin aktivitásait.
- A tropomiozin gátolja a SALS WH2 doménjeinek az aktin filamentumok szétszerelődésére kifejtett hatását.
- A SALS-WH2 kötődik a tropomiozinhoz, a kölcsönhatás elektrosztatikus természetű.

A SALS WH2 doménjeinek felderített biokémiai tulajdonságai nem rekonstruálják a teljes hosszúságú fehérjének a szarkomerikus vékony filamentumok dinamikájára kifejtett hatását. Így a SALS biológiai funkciója a WH2 domének aktivitásának finomhangolását feltételezi, amelyben a SALS további régiói, illetve más szarkomerikus fehérjék játszhatnak szerepet.

PUBLIKÁCIÓS LISTA

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Mónika Ágnes Tóth, Andrea Majoros, Andrea Teréz Vig, Ede Migh, Miklós Nyitrai, József Mihály, Beáta Bugyi: Biochemical Activities of the Wiskott-Aldrich Syndrome Homology Region 2 Domains of Sarcomere Length Short (SALS) Protein. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* **291**: pp. 667 - 680. (2016)

Impakt faktor: 4.573

Nyilvános idézők összesen: 12, Független: 7

Az értekezéshez kapcsolódó előadások

1. Tóth Mónika Ágnes, Bugyi Beáta, Nyitrai Miklós, Mihály József, Migh Ede: SALS, egy WH2 domén fehérje szerepe a szarkomer aktin hálózatában. *43. Membrán - Transzport konferencia*, Sümeg, 2013. 05. 21 - 24.
2. Tóth Mónika Ágnes, Bugyi Beáta, Nyitrai Miklós, Mihály József, Migh Ede: SALS, egy WH2 domén fehérje szerepe a szarkomer aktin hálózatában. *II. Interdiszciplináris Doktorandusz Konferencia*, Pécs, 2013. 05. 15 – 17.
3. Mónika Ágnes Tóth, Beáta Bugyi, Miklós Nyitrai, József Mihály, Ede Migh: SALS, a WH2-protein in sarcomeric actin assembly. *Novel Biophysical Approaches in the Investigation of the Cytoskeleton, The 27th European Cytoskeletal Forum Meeting*, Pécs, 2012. 11. 3 - 7.
4. Mónika Ágnes Tóth, Beáta Bugyi: SALS, a WH2-protein in sarcomeric actin assembly. *Summer school on Actin Dynamics*, Regensburg, Németország, 2012. 09. 29 – 10. 05.
5. Tóth Mónika Ágnes, Bugyi Beáta, Nyitrai Miklós, Mihály József, Migh Ede: A SALS szerepe a szarkomer aktin hálózatának szabályozásában. *A Magyar Élettani Társaság, a Magyar Anatómusok Társasága, a Magyar Biofizikai Társaság és a Magyar Mikrocirkulációs és Vaszkuláris Biológiai Társaság Kongresszusa*, Debrecen, 2012. 06. 10 - 13.

Az értekezéshez kapcsolódó poszterek

1. Mónika Ágnes Tóth, Péter Gaszler, Judit Viktória Fórizs, Andrea Teréz Vig, Ede Migh, József Mihály, Beáta Bugyi: Biochemical activities of the Wiskott-Aldrich syndrome homology region 2 domains of Sarcomere Length Short protein. *Annual Conference of the Hungarian Biochemical Society*, Szeged, 2016. 08. 28 - 31.
2. Mónika Ágnes Tóth, Péter Gaszler, Andrea Teréz Vig, Ede Migh, József Mihály, Beáta Bugyi: Biochemical activities of the Wiskott-Aldrich syndrome homology region 2 domains of Sarcomere Length Short protein. *European Cytoskeletal Forum*, Cambridge, UK, 2016. 06. 20 - 23.

3. Tóth Mónika Ágnes, Majoros Andrea, Mihály József, Migh Ede, Nyitrai Miklós, Bugyi Beáta: SALS, egy WH2 domén fehérje szerepe a szarkomer aktin hálózatában. *44. Membrán-Transzport konferencia*, Sümeg, 2014. 05. 20 - 23.
4. Mónika Ágnes Tóth, József Mihály, Ede Migh, Lajos Kalmár, Miklos Nyitrai, Beáta Bugyi: SALS, a WH2 domain protein in sarcomeric actin organization. *ASCB Annual Meeting*, New Orleans, USA, 2013. 12.14 - 18.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Shwartz, A., et al., *The Drosophila formin Fhos is a primary mediator of sarcomeric thin-filament array assembly*. Elife, 2016. **5**.
2. Bugyi, B., *Actin and actin binding proteins*, in *Muscle contraction: a Hungarian perspective*, M.S. Kellermayer, Editor. 2018, Semmelweis Publishers: Budapest.
3. Sanger, J.W., et al., *Assembly and Maintenance of Myofibrils in Striated Muscle*. Handb Exp Pharmacol, 2017. **235**: p. 39-75.
4. Ono, S., *Dynamic regulation of sarcomeric actin filaments in striated muscle*. Cytoskeleton (Hoboken), 2010. **67**(11): p. 677-92.
5. Henderson, C.A., et al., *Overview of the Muscle Cytoskeleton*. Compr Physiol, 2017. **7**(3): p. 891-944.
6. Renault, L., B. Bugyi, and M.F. Carlier, *Spire and Cordon-bleu: multifunctional regulators of actin dynamics*. Trends Cell Biol, 2008. **18**(10): p. 494-504.
7. Littlefield, R., A. Almenar-Queral, and V.M. Fowler, *Actin dynamics at pointed ends regulates thin filament length in striated muscle*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(6): p. 544-51.
8. Fowler, V.M. and R. Dominguez, *Tropomodulins and Leiomodins: Actin Pointed End Caps and Nucleators in Muscles*. Biophys J, 2017. **112**(9): p. 1742-1760.
9. Chereau, D., et al., *Leiomodin is an actin filament nucleator in muscle cells*. Science, 2008. **320**(5873): p. 239-43.
10. Dominguez, R., *The WH2 Domain and Actin Nucleation: Necessary but Insufficient*. Trends Biochem Sci, 2016. **41**(6): p. 478-490.
11. Paunola, E., P.K. Mattila, and P. Lappalainen, *WH2 domain: a small, versatile adapter for actin monomers*. FEBS Lett, 2002. **513**(1): p. 92-7.
12. Renault, L., C. Deville, and C. van Heijenoort, *Structural features and interfacial properties of WH2, beta-thymosin domains and other intrinsically disordered domains in the regulation of actin cytoskeleton dynamics*. Cytoskeleton (Hoboken), 2013. **70**(11): p. 686-705.
13. Hertzog, M., et al., *The beta-thymosin/WH2 domain; structural basis for the switch from inhibition to promotion of actin assembly*. Cell, 2004. **117**(5): p. 611-23.
14. Didry, D., et al., *How a single residue in individual beta-thymosin/WH2 domains controls their functions in actin assembly*. Embo j, 2012. **31**(4): p. 1000-13.
15. Husson, C., et al., *Multifunctionality of the beta-thymosin/WH2 module: G-actin sequestration, actin filament growth, nucleation, and severing*. Ann N Y Acad Sci, 2010. **1194**: p. 44-52.
16. Yuen, M., et al., *Leiomodin-3 dysfunction results in thin filament disorganization and nemaline myopathy*. J Clin Invest, 2014. **124**(11): p. 4693-708.
17. Bai, J., J.H. Hartwig, and N. Perrimon, *SALS, a WH2-domain-containing protein, promotes sarcomeric actin filament elongation from pointed ends during Drosophila muscle growth*. Dev Cell, 2007. **13**(6): p. 828-42.
18. Pappas, C.T., et al., *Knockout of Lmod2 results in shorter thin filaments followed by dilated cardiomyopathy and juvenile lethality*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(44): p. 13573-8.
19. Pappas, C.T., et al., *Cardiac-specific knockout of Lmod2 results in a severe reduction in myofilament force production and rapid cardiac failure*. J Mol Cell Cardiol, 2018. **122**: p. 88-97.
20. Bugyi, B., D. Didry, and M.F. Carlier, *How tropomyosin regulates lamellipodial actin-based motility: a combined biochemical and reconstituted motility approach*. Embo j, 2010. **29**(1): p. 14-26.
21. Eisenberg, E. and W.W. Kielley, *Troponin-tropomyosin complex. Column chromatographic separation and activity of the three, active troponin components with and without tropomyosin present*. J Biol Chem, 1974. **249**(15): p. 4742-8.

22. Smillie, L.B., *Preparation and identification of alpha- and beta-tropomyosins*. Methods Enzymol, 1982. **85 Pt B**: p. 234-41.
23. Barko, S., et al., *Characterization of the biochemical properties and biological function of the formin homology domains of Drosophila DAAM*. J Biol Chem, 2010. **285**(17): p. 13154-69.
24. Bugyi, B., et al., *Formins regulate actin filament flexibility through long range allosteric interactions*. J Biol Chem, 2006. **281**(16): p. 10727-36.
25. Vig, A.T., et al., *The activities of the C-terminal regions of the formin protein disheveled-associated activator of morphogenesis (DAAM) in actin dynamics*. J Biol Chem, 2017. **292**(33): p. 13566-13583.
26. Nag, S., et al., *Ca²⁺ binding by domain 2 plays a critical role in the activation and stabilization of gelsolin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(33): p. 13713-8.
27. Perelroizen, I., et al., *Interaction of profilin with G-actin and poly(L-proline)*. Biochemistry, 1994. **33**(28): p. 8472-8.
28. Hertzog, M. and M.F. Carrier, *Functional characterization of proteins regulating actin assembly*. Curr Protoc Cell Biol, 2005. **Chapter 13**: p. Unit 13.6.
29. Bugyi, B. and M.F. Carrier, *Control of actin filament treadmilling in cell motility*. Annu Rev Biophys, 2010. **39**: p. 449-70.
30. Carrier, M.F., et al., *Control of actin assembly by the WH2 domains and their multifunctional tandem repeats in Spire and Cordon-Bleu*. Int Rev Cell Mol Biol, 2011. **290**: p. 55-85.
31. Didry, D., M.F. Carrier, and D. Pantaloni, *Synergy between actin depolymerizing factor/cofilin and profilin in increasing actin filament turnover*. J Biol Chem, 1998. **273**(40): p. 25602-11.
32. Gutsche-Perelroizen, I., et al., *Filament assembly from profilin-actin*. J Biol Chem, 1999. **274**(10): p. 6234-43.
33. Romero, S., et al., *Formin is a processive motor that requires profilin to accelerate actin assembly and associated ATP hydrolysis*. Cell, 2004. **119**(3): p. 419-29.
34. Broschat, K.O., *Tropomyosin prevents depolymerization of actin filaments from the pointed end*. J Biol Chem, 1990. **265**(34): p. 21323-9.
35. Kis-Bicskei, N., et al., *Purification of tropomyosin Br-3 and 5NM1 and characterization of their interactions with actin*. Cytoskeleton (Hoboken), 2013. **70**(11): p. 755-65.
36. von der Ecken, J., et al., *Cryo-EM structure of a human cytoplasmic actomyosin complex at near-atomic resolution*. Nature, 2016. **534**(7609): p. 724-8.