

Povzetek

Aktivnost mnogih citosolnih proteinov je odvisna od koncentracije kalcija. Eden izmed pomembnih znotrajceličnih kalcij senzornih proteinov je α -aktinin-1, ki ima v celici več različnih vlog. Njegova glavna funkcija je prečno povezovanje aktinskih filamentov predvsem na mestih fokalne adhezije in v stresnih vlaknih. Znano je, da je prečno povezovanje aktinskih filamentov z α -aktininom-1 odvisno od kalcija, vendar je molekularni mehanizem še vedno slabo raziskan. Predmet naših raziskav je bil protein α -aktinin-1 s poudarkom na njegovih strukturnih in kalcij vezavnih lastnostih.

V skladu s tem smo v bakterijskih celicah *E. coli* pripravili celoten protein α -aktinin-1, polovični dimer in domeno CaM ter njene mutante z mutacijami v domnevnih kalcij vezavnih mestih. Z izotermno titracijsko kalorimetrijo (ITC) in masno spektroskopijo (ESI-MS) smo dokazali, da domena CaM α -aktinina-1 veže en kalcijev ion, in sicer v roko EF1 v N-končnem režnju. Določili smo disociacijsko konstanto interakcije domene CaM s kalcijem, katere vrednost je znašala $104,2 \pm 15,4 \mu\text{M}$.

V sodelovanju z raziskovalno skupino prof. dr. Janeza Plavca z Nacionalnega centra za NMR spektroskopijo visoke ločljivosti s Kemijskega inštituta v Ljubljani smo določili prvo tridimenzionalno strukturo celotne domene CaM, in sicer v prisotnosti in odsotnosti kalcija. Analiza strukturnih sprememb je pokazala, da vezava kalcija povzroči stabilizacijo konformacijsko zelo fleksibilne molekule. Stabilizacija je posledica omejene rotacije N- in C-končnega režnja domene CaM okrog povezovalca, ki ju povezuje med seboj.

Pripravili smo proteinske kristale polovičnega dimera v odsotnosti kalcija ter posneli set nativnih difrakcijskih podatkov do ločljivosti $3,63 \text{ \AA}$. Tridimenzionalne strukture nismo uspeli rešiti, saj je bila elektronska gostota v predelu celotne C-končne domene CaM zelo šibka. Predvidevamo, da je težava velika gibljivost domene CaM v odsotnosti kalcija, kar smo tudi dokazali z določitvijo njene strukture z uporabo metode NMR in potrdili z meritvami ozkokotnega rentgenskega sipanja (SAXS).

Z eksperimenti na človeški liniji osteosarkomskih celic U2OS smo v sodelovanju z raziskovalno skupino prof. dr. Tee Vallenius z Univerze v Helsinkih dokazali, da v celicah povezovanje F-aktinskih filamentov v dorzalnih stresnih vlaknih poteka z α -aktininom-1 in je uravnavano s kalcijem. Ob nizki znotrajcelični koncentraciji kalcija so F-aktinska vlakna z α -aktininom-1 povezana v svežnje, ob povečani koncentraciji kalcija pa le ta razpadejo na posamezna vlakna.

Ključne besede:

α -aktinin-1, kalcij, struktura, stabilizacija, kristalizacija, F-aktinska vlakna