

Válasz

a Prof. Dr. Bagyinka Csaba

a Szegedi Biológiai Kutatóközpont nyugalmazott tudományos tanácsadója

által készített opponensi véleményre

Tisztelt Professzor Úr!

Köszönöm, hogy elvállalta a doktori értekezésem bírálatát! Köszönöm az értekezésem gondos átnézésére szánt idejét, a véleményében megfogalmazott észrevételeket és konstruktív kritikát, ami lehetőséget adott arra, hogy új szempontokat is átgondoljak, és mélyebben foglalkozzam a dolgozatban tárgyalt kérdésekkel.

Az opponensi véleményben szereplő észrevételekre és kérdésekre az alábbiakban válaszolok.

Az egyszerűbb követhetőség érdekében válaszaimat közvetlenül az opponensi vélemény szövege (kék színnel kiemelve) után adtam meg.

Bízva a válaszaim pozitív elbírálásában, maradok tisztelettel:



Dr. Bugyi Beáta

Pécs, 2025. 09. 22.

Általános megjegyzések

Általános hiba, hogy a szerzők hibáznak a hibák megadásakor! Számértékek hibáinak megadásáról van szó. Ez itt is előfordul. Az első hiba, hogy nem adnak meg hibát (pl. 3. táblázat). Más alkalommal pedig rosszul adják meg a hibákat, ez a dolgozat szinte minden kísérlettel megállapított adatánál így van. Vegyük pl. a 11. táblázatot, ahol az IC50 értékeket adja meg a szerző. Itt szerepel egy 345.9 ± 27.60 érték. Ez egy hibás adat megadás. Azért hibás, mert ha a hibát század pontossággal (2 tizedes jegyre pontosan) meg tudja adni a szerző, akkor mi indokolja, hogy a mért értéket ennél sokkal pontatlanabban adja meg? Az miért nem 2 tizedes jegy pontos? A helyes érték megadás 350 ± 30 lenne. A kiszámolt (vagy számítógép, kalkulátor által megadott) hibát fel kell kerekíteni egy értékes számjegy értékre (nagyon kivételesen 2 számjegyre), majd a mért értéket úgy megadni, hogy az utolsó értékes jegye megegyezzen a hiba értékes számjegyével.

Az Opponens megjegyzése jogos, azt elfogadom. A dolgozatban a számértékek hibáinak megadásakor körültekintőbben kellett volna eljárni.

A dolgozat 3. táblázatában (9. oldal) szereplő adatok nem a saját méréseink eredményei, hanem a dolgozat [59] számú irodalmi hivatkozásának Figure 2. jelölésű ábrája alapján kerültek megadásra, amiben nem szerepeltek hibák [1]. Az egyértelműség miatt célszerű lett volna a forrásmegjelölést nemcsak a szövegben, hanem az ábraalíráásban is megtenni.

Sok ábrán szerepel a $\times s^{-1}$ egység. Ezt sokkal egyszerűbb lett volna /s-nek írni!

A $\times s^{-1}$ jelölést a publikációinknak megfelelően használtam a dolgozatban. A két jelölés matematikailag egyenértékű és mindkettő használata elfogadott a szakirodalomban.

Az ábrákon a „t.e.” mit jelent? Mert a „tetszőleges egység” helyett az „önkényes egységet” javasoltam volna.

Az ábrákon a „t.e.” rövidítés „tetszőleges egység”-et jelent, a rövidítés felsorolásra került a dolgozat „8. Függelék”, „Rövidítések és jelölések jegyzéke” részben (105. oldal). A kifejezést az angol nyelvű szakirodalomban használt „a.u.” „arbitrary unit” magyar megfelelőjeként használtam. A magyar nyelvű tudományos munkákból, PhD és MTA doktori értekezésekből tájékozódva úgy találtam, hogy mind a „tetszőleges egység”, mind pedig az „önkényes egység” használata előfordul és elfogadott.

Miért vannak a PhD megírása szerint csoportosítva a saját publikációk?

A dolgozat formai követelményeivel kapcsolatban előzetesen tájékozódtam. Az „MTA VIII. Biológiai Tudományok Osztályának a doktori eljárásra vonatkozó követelményei”¹ között nem találtam a dolgozat összeállítására vonatkozó formai szempontok kapcsán útmutatást (pl. terjedelem, fejezetek címe/sorrendje, közlemények feltüntetése, tézisek terjedelme...). A Doktori Tanács Titkárságának segítőként kollégái támpontként az „MTA Doktora címben részesültek”²

¹ [Az MTA VIII. Biológiai Tudományok Osztályának a doktori eljárásra vonatkozó követelményei | MTA](#)

² [MTA doktora címben részesültek \(2011-től\) | MTA](#)

menüpont alatt elérhető korábbi pályázatok formai sajátosságainak áttekintését javasolták. A dolgozatom összeállítását a korábbi pályázatok attekintve, azok formai megoldásaiból inspirálódva végeztem. Megjegyzendő, hogy ezek a pályázatok jelentős formai változatosságot mutatnak, például az oldalszám, a fejezetek sorrendje, valamint a publikációk felsorolásának módja tekintetében. A saját publikációk PhD dolgozat szerinti csoportosítása több korábbi pályázatban is megjelent. Én magam is logikusnak tartom ezt a szempontot az önállóan végzett kutatómunka elkülönítése érdekében.

Kérdéseim és konkrét megjegyzéseim

8. oldal: A szerző a legfelső bekezdésben alegységnek hívja a G-aktint az F-aktinban, a dolgozat későbbi részében meg monomernek. Szerintem a monomer a jobb kifejezés.

Az Opponens megjegyzése jogos. Az „alegység” a több polipeptidláncból álló fehérjék esetében értelmezett fogalom (pl. [2]). Az aktin monomer egy polipeptidláncból áll, a filamentumban lévő monomerek ebben az értelemben nem tekinthetők alegységeknek. A dolgozatban az „alegység” használata az F-aktinban lévő monomerekre az angol nyelvű szakirodalomban használt „*subunit*” kifejezés fordításából ered (pl. [3-6]). A magyar szakszókincsnek való megfelelés miatt ugyanakkor helyesebb lett volna a „monomer” kifejezés használata.

(lásd a jelen dokumentum 37. oldala)

Az „alegység” használatára vonatkozó kérdés az Opponens egy későbbi megjegyzésében is felmerül. Az egyszerűség kedvéért a választ itt adom meg mindkét kérdésre.

8. oldal: „Az aktin össze-, és szétszerelődési folyamatai és ATPáz aktivitása az alábbi ciklus szerint kapcsolódnak [39].” Ez egyszerűen csak a katalitikus ciklus leírása. Nincs minden egyes lépésnek külön ATPáz aktivitása!

8. oldal, az aktin ATPáz aktivitásának leírása: Ez egy autokatalitikus enzimreakciónak tűnik. Mekkora (hány G-aktint tartalmazó) F-aktinra van ehhez szükség? Elég, ha a reakció során csak két G-aktin kapcsolódik?

Az aktin polimerizációval összefüggő ATPáz aktivitása korai felfedezés, amit Straub F. Brunó és Feuer György írtak le először [7, 8]. Ugyanakkor a kapcsolódó mechanizmusok napjainkban is aktív kutatás tárgyát képezik [3, 9-11]. A polimerizációt kísérő szerkezeti változások - az aktin két nagy doménjének egymáshoz képesti rotációja és a molekula kilaposodása [10, 12, 13] - jelentősen, mintegy 42 000-szeresére növelik az aktin ATPáz aktivitását ($k_{\text{hidrolízis}}(\text{G-aktin}) \sim 7 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{hidrolízis}}(\text{F-aktin}) \sim 0.3 \text{ s}^{-1}$ [3, 14-17].

Az aktin ATPáz aktivitása és a polimerizáció közötti kapcsolat magyarázatára két fő modellt javasoltak (az irodalmi hivatkozásokat összegyűjtő munkák: [18, 19]):

(i) A véletlenszerű (random) modell szerint minden, a filamentumba épült monomeren azonos valószínűséggel történik az ATP hidrolízis, függetlenül a szomszédos monomerek nukleotid állapotától.

(ii) A vektoriális (szekvenciális) modell szerint a szomszédos monomerek nukleotid állapota befolyásolja a reakció sebességét, az ATP hidrolízis elsősorban az ATP és ADP-Pi tartalmú monomerek határán történik a filamentumban.

A filamentum sokaságon végzett *bulk* mérések nem szolgáltatnak egyértelmű kísérleti bizonyítékot a két modell közötti különbségtételre. A mikrofluidika módszere jelentett lényegi előrelépést, ami lehetővé teszi az egyedi filamentumokon végzett kinetikai vizsgálatokat és ezáltal a polimerizációt jellemző asszociációs és disszociációs sebességi állandók meghatározását különböző biokémiai környezetben [9]. A kísérleti eredmények a véletlenszerű modellel vannak összhangban és azt támasztják alá [3, 9].

Az autokatalízis jelenségének részletes ismerete és vizsgálata nem tartozik a szakterületemhez. Irodalmi források alapján egy reakció akkor tekinthető autokatalitikusnak, ha legalább az egyik termék elősegíti saját maga képződését, azaz katalizátorként viselkedik (autokatalizátor) [20]. Az autokatalizátor koncentrációjának időbeli változását ábrázolva szigmoid görbe figyelhető meg, amely a folyamat egyik jellemzője lehet. Ugyanakkor ez nem szükséges és nem elégséges feltétele az autokatalitikus mechanizmusnak [20]. Biológiai rendszerekben az autokatalízis többféle formája is előfordul, amelyek különböző mechanizmusokon alapulnak [20, 21]. Értelmezésem szerint az aktin ATPáz aktivitása akkor lenne autokatalitikus enzimreakció, ha a keletkező termékek elősegítenék további képződésüket. Az aktin esetében azonban közvetlenül nem a termékek, hanem a polimerizációval járó szerkezeti változások fokozzák az ATPáz aktivitást.

Nem ismerek olyan publikációt, amiben a nukleációs intermedierek (dimer és trimer) ATPáz aktivitását vizsgálták volna. A kísérleti megközelítés nem triviális, hiszen ezek az intermedierek instabilak ($k_{\text{disszociáció}} \sim 10^6\text{-}10^2 \text{ s}^{-1}$), így a koncentrációjuk rendkívül alacsony a polimerizáció során [3, 22]. A dimer forma például kovalens keresztkötéssel stabilizálható (pl. [23, 24]). A Korn labor korai munkája alapján a kovalensen keresztkötött aktin dimer ATPáz aktivitása körülbelül hétszerese a monomerének (Table III jelölésű táblázat: [24]). A publikációban nem szerepel adat

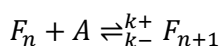
a mérés hibájára vagy az F-aktin ATPáz aktivitására vonatkozóan. Az sem tisztázott, hogy a keresztkötés milyen hatással van a fehérje szerkezetére és működésére. Mindazonáltal a dimer esetén mért hétszeres növekedés elenyészően kicsinek tűnik a fent ismertetett sebességi állandókhöz és a mintegy 42 000-szeres változáshoz képest.

9. oldal: „Egyensúlyban a monomer:filamentum arány állandó. Az egyensúlyi szabad G-aktin koncentráció a kritikus koncentráció (c_c),” Ha a c_c állandó (különben miért lenne a 3. táblázatban megadva), akkor ez a két mondat önellentmondást rejt magában. Ha az első mondat igaz, akkor a c_c nem lehet állandó, hanem függ a kezdeti G-aktin koncentrációtól. Mi valójában a c_c ?

Az Opponens észrevétele jogos. A hivatkozott mondat félreértelmezhető, egyértelműbb megfogalmazása szerencsésebb lett volna. A kritikus koncentráció (c_c), mint az egyensúlyi nem polimerizált, szabad aktin monomerek koncentrációja állandó, nem függ a kezdeti G-aktin koncentrációtól ($[A]$). Egyensúlyban a filamentumban lévő, polimerizált aktin koncentrációja függ $[A]$ -tól. Ha $[A]$ meghaladja a kritikus koncentrációt, akkor a filamentumban lévő, polimerizált aktin koncentrációja nullától különböző és lineárisan nő $[A]$ növelésével. Az egyensúlyi monomer:filamentum arány tehát függ $[A]$ -tól, ilyen tekintetben nem állandó. Ugyanakkor adott $[A]$ mellett egyensúlyban a monomer:filamentum arány állandó, bár folyamatos kicserélődés zajlik a monomer és filamentum készlet között, azok mennyisége nem változik. A dolgozatban szereplő állítás erre vonatkozik.

A kritikus koncentráció

A kritikus koncentráció (c_c) az egyensúlyi nem polimerizált, szabad aktin monomerek koncentrációja. A kifejezést eredetileg Oosawa Fumio és Asakura Sho javasolta a helikális polimerek tulajdonságainak vizsgálatával kapcsolatos munkájukban [25]. A monomerek filamentumvégekhez történő reverzibilis kötődését leíró reakcióséma és sebességi egyenlet [17, 26, 27]:



$$\frac{dF}{dt} = v = k_+[A][F] - k_-[F]$$

A: G-aktin

F_n : n db monomerből álló F-aktin

F_{n+1} : n+1 db monomerből álló F-aktin

k_+ : asszociációs sebességi állandó

k_- : disszociációs sebességi állandó

t: idő

dF/dt : a filamentumban lévő aktin mennyiségének változási sebessége

$[A]$: a monomerek koncentrációja

$[F]$: a filamentumvégek koncentrációja

Tekintsünk el egy pillanatra az aktin ATPáz aktivitásától; tegyük fel, hogy a disszociáció pontosan az asszociáció fordítottja, valamint a szöges és a hegyes vég ekvivalensek.

Az egyensúlyi állapotra:

$$v = 0 \rightarrow k_+[A][F] - k_-[F] = 0 \rightarrow \frac{[A][F]}{[F]} = \frac{k_-}{k_+}$$

Ebből adódik, hogy:

$$[A] = \frac{k_-}{k_+} \equiv c_c$$

- Az egyensúlyi nem polimerizált aktin monomerek koncentrációja a disszociációs és az asszociációs sebességi állandók hányadosa, a kritikus koncentráció.
- A kritikus koncentráció a monomerek filamentumvégekhez történő reverzibilis kötődését jellemző disszociációs egyensúlyi állandó [28, 29].
- Ha $[A] > c_c$, akkor a filamentumban lévő aktin mennyisége növekszik ($v > 0$; polimerizáció, összeszerelődés), ha $[A] < c_c$, akkor filamentumban lévő aktin mennyisége csökken ($v < 0$; depolimerizáció, szétszerelődés).
- A $v([A])$ függvény lineáris (1. ábra), a vízszintes tengellyel való metszéspontja adja a kritikus koncentrációt.

A szöges (b, *barbed*) és a hegyes (p, *pointed*) vég sebességi állandóit figyelembe véve az egyes végek kritikus koncentrációjára vonatkozó összefüggések:

$$\frac{k_-^b}{k_+^b} \equiv c_c^b$$

$$\frac{k_-^p}{k_+^p} \equiv c_c^p$$

A szöges és hegyes vég együttes dinamikáját jellemző kritikus koncentráció [26, 27]:

$$\frac{dF}{dt} = v = (k_+^b[A][F] - k_-^b[F]) + (k_+^p[A][F] - k_-^p[F]) = (k_+^b + k_+^p)[A][F] - (k_-^b + k_-^p)[F]$$

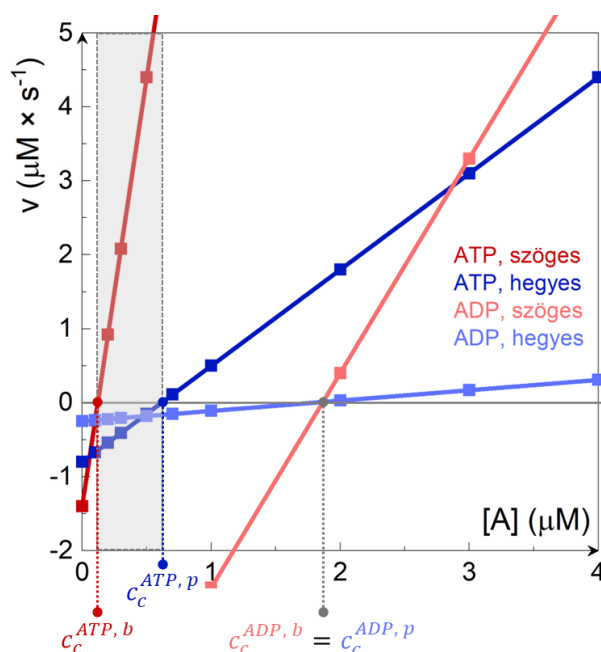
$$v = 0 \rightarrow (k_+^b + k_+^p)[A][F] - (k_-^b + k_-^p)[F] = 0$$

$$\frac{[A][F]}{[F]} = \frac{k_-^b + k_-^p}{k_+^b + k_+^p}$$

$$[A] = \frac{k_-^b + k_-^p}{k_+^b + k_+^p} \equiv c_c$$

Bár az aktin ATPáz aktivitásának figyelmen kívül hagyása jelentős egyszerűsítésnek tűnik, a fent bemutatott összefüggés kísérleteink szempontjából kielégítően alkalmazható. Ha az aktin ATPáz aktivitását is figyelembe vesszük, akkor a kritikus koncentráció az eltérő nukleotidállapotú monomerek filamentumvégekhez történő asszociációját és disszociációját jellemző sebességi állandók alapján származtatható. Az ATPáz aktivitás miatt a filamentumba épülő és az arról leváló monomer nukleotidállapota eltérhet, így a kritikus koncentráció nem feleltethető meg a disszociációs egyensúlyi állandónak. Az összefüggések teljesebb bemutatására hivatkozom Albrecht Wegner klasszikus munkáját [27] és egy közelmúltbeli tanulmányt [30].

A kritikus koncentráció kísérleti úton történő meghatározására példaként hivatkozom a saját kutatásainkhoz kapcsolódó publikációkat: Figure 5.F jelölésű ábra: [31]; Figure 4.A jelölésű ábra: [32].



1. ábra A filamentumban lévő aktin mennyiségének változási sebessége (v) a szöges (b, *barbed*) és a hegyes (p, *pointed*) végen, ATP-aktin (sötét színek) és ADP-aktin (halvány színek) esetén az aktin koncentráció függvényében ($[A]$). A sebességet a $v = k \cdot [A] - k$ összefüggés szerint határoztam meg a szöges és a hegyes vég kinetikai paramétereit felhasználva (dolgozat, 3. táblázat, 9. oldal). A $v([A])$ függvény vízszintes tengellyel való metszéspontja adja a kritikus koncentrációt (c_c). Az ábrát a [5] publikációkban közölt saját készítésű Figure 2.B jelölésű ábra nyomán készítettem. A *treadmilling*-nek megfelelő aktin koncentrációtartományt szürke téglalap jelöli (lásd 3. ábra).

11. oldal: „Az aktin hálózatok geometriai sajátosságai (pl. elágazó/egyenes, parallel/antiparallel orientáció, kötegelési távolság), az aktin filamentumok mechanikai sajátosságai (pl. rugalmas/merev, rugalmassági modulus, perzisztenciahossz) [63-67].” Ez a mondat teljesen értelmetlen, nincs állítmánya. Vagy azt akarja mondani, hogy a geometriai sajátságok azonosak a mechanikai sajátságokkal? Kétlem! Az ezután következő (1a) és (1b) sorok is értelmetlenek, nem lehet tudni, mit akar a szerző mondani!

12. oldal: Nem világos, a (2a), (2b), (2c) ami vagy felsorolás, vagy alcím, vagy bekezdések (???) mit is jelentenek.

A (2a) rész alatt a szerző összevegyíti az AA szekvenciát a mRNS szekvenciákkal, de a szándék értelmezhetetlen. Ha a kódoló génszekvenciában pontmutáció van, akkor az nem jelenik meg a fehérjében??

A (2b) sor mire vonatkozik?

A (2c) részben váratlanul megjelenik a tropomiozin, amiről eddig nem hallottunk, csak a 6. oldalon egy felsorolásban, mint aktin kötő fehérje (talán) ami valamiféle izoformákat alkot, de hogy ezek az izoformák az tropomiozinhoz tartoznak-e vagy az aktinhoz, s hogy miért van nekik azimutális pozíciójuk, azt csak találgathatjuk (sikertelenül ebben az olvasási fázisban).

A 3. alrész is teljesen értelmetlen, az olvasót semmiféle információval nem látja el.

Mindez „Az intracelluláris aktin hálózatok funkcionális polimorfizmusa” főcím alatt helyezkedik el, tehát az olvasó azt gondolná, hogy erre vonatkozik, de akkor a „polimorfizmus” hogyan kerül össze a „Biokémiai szabályokkal”? A polimorfizmusnak lennének biokémiai szabályai??

A dolgozat „Az intracelluláris aktin hálózatok funkcionális polimorfizmusa” című fejezete (10-12. oldal) és a 4. ábrája (11. oldal) foglalja össze röviden, vázlatpontokba szedve azokat a sejtszintű mechanizmusokat, amelyek az aktinkötő fehérjék szegregációjában (*sorting*) és az eltérő funkciójú aktin hálózatok kialakításában szerepet játszanak. A dolgozatban nem volt célom a mechanizmusok átfogó bemutatása, ezért azok ismertetése tömören, vázlatos formában történt. Ez a szakasz tulajdonképpen egy részletesebb ábramagyarázatként szolgál a 4. ábrához. Az opponensi észrevétel és kérdések nyomán az alábbi kiegészítésben törekszem a részletesebb kifejtésre. Az egyszerűbb áttekinthetőség kedvéért a dolgozat 4. ábráját is másolom a válaszban.

Kiegészítés az „Az intracelluláris aktin hálózatok funkcionális polimorfizmusa” fejezethez

Az aktin hálózatok molekuláris identitásának kialakításában és az aktinkötő fehérjék szegregációjában (*sorting*) több mechanizmus is szerepet játszhat [33]. Ezek a mechanizmusok nem egymást kizáró módon, hanem egymást kiegészítve és együttműködve járulnak hozzá a funkcionálisan eltérő filamentum-kompartmentek kialakításához.

1. Biomechanikai szabályok (2. ábra (1))

Az aktin hálózatok mechanikai jellemzőit a filamentumok geometriai szerveződése (pl. elágazó vagy egyenes lefutás, parallel vagy antiparallel orientáció, kötegelési távolság) és mechanikai tulajdonságai (pl. rugalmas vagy merev) határozzák meg. Az aktin hálózatok mechanikai sajátosságainak kialakításában szerepet játszanak az összeszerelő faktorok: az NPF:Arp2/3 komplex fehérjerendszer (2. ábra (1a)) és a formin fehérjecsalád (2. ábra (1b)) tagjai. A PhD munkám egyik meghatározó eredményeként leírtuk, hogy a forminok (pl. mDia1) komplex módon befolyásolják a filamentumok mechanikai tulajdonságait [34, 35]. Az ennek nyomán felállított hipotézisünk szerint az összeszerelő faktorok meghatározó szerepet játszanak az aktinkötő fehérjék

szegregációjában és ezáltal az aktin hálózatok funkcionális specializációjában. Az összeszerelő faktorok által vezérelt *sorting* mechanizmus azon alapul, hogy ezek a faktorok aktivitásuk természetéből adódóan elsőként lépnek kölcsönhatásba a képződő filamentumokkal. A filamentumok geometriai és mechanikai jellemzőin keresztül befolyásolhatják a további fehérje-fehérje kapcsolódásokat, így irányítva az aktinkötő fehérjék aktin hálózatokhoz való hozzárendelését és hozzájárulva azok funkcionális diverzitásának kialakításához. Ezt a *sorting* mechanizmust hasadó élesztőben, valamint tisztított fehérjerendszerekben végzett, egyedi filamentumok vizualizációján alapuló kísérletek is alátámasztják [36].

2. Filamentum identitás (2. ábra (2))

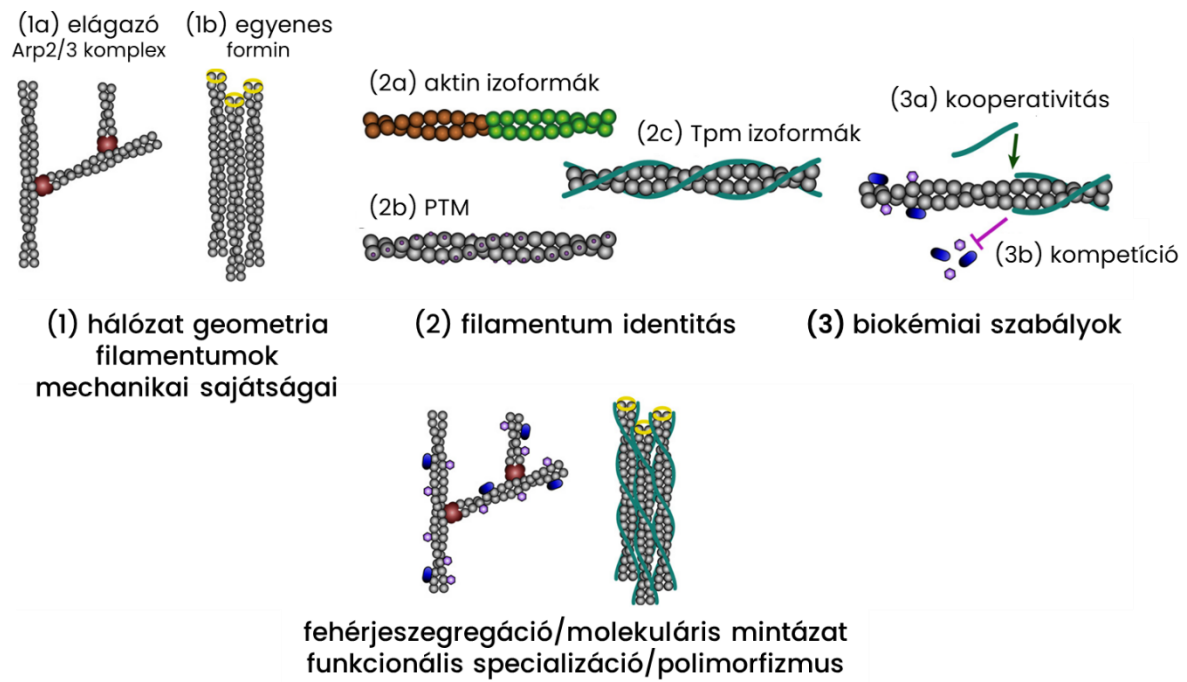
Az aktin hálózatok jellemzőit és aktinkötő fehérjékkel való kölcsönhatásait a filamentumok szerkezetében és felszíni tulajdonságaiban megjelenő árnyalt különbségek is befolyásolhatják [33].

Az eukarióta élővilág sokféleségében az aktin az egyik legkonzerváltabb fehérje. A sejtek a filamentumok diverzitását/eltérő identitását így az aktin fehérje különböző izoformáinak expressziójával (2. ábra (2a)) [37], illetve poszttranszlációs módosításaival (2. ábra (2b)) [38] biztosíthatják. Az aktin izoformáit különböző gének kódolják, ugyanakkor a fehérjék egymás és a fajok között is nagyfokú aminosav-szekvenciabeli hasonlóságot mutatnak (dolgozat, 102. oldal, F1. ábra). A nem-izom β -aktin és γ -aktin például mindösszesen 4 aminosavban tér el az N-terminálisukon. A két aktin izoforma mRNS kódoló szekvenciája azonban nagyobb mértékben, közel 13%-ban különbözik csendes (*silent*) mutációk miatt [39]. Ez a két aktin izoforma eltérő transzlációs dinamikáját és poszttranszlációs módosítását eredményezi; a β -aktin arginilálódik, míg a γ -aktin nem [40]. Az aktin izoformák szabályozása tehát eltérő módon történhet az mRNS kódoló szekvencián keresztül, ami hatással lehet a transzlációra, a poszttranszlációs módosításokra és ez által a funkcióra is.

Alternatív stratégiaként, a filamentumokhoz eltérő identitás rendelése specializált aktinkötő fehérjék révén is megvalósítható, anélkül, hogy magát az aktint módosítani kellene. Ilyen aktinkötő fehérje például a tropomiozin (Tpm) (2. ábra (2c)). Összehasonlító genomikai elemzés rámutatott arra, hogy az eukarióta fajokban az evolúció során az aktin izoformák száma csökkent (pl. humán nem-izom aktin izoformák száma = 2), míg a Tpm izoformák száma növekedett (humán nem-izom Tpm izoformák száma >20) [33]. A negatív korreláció alapot ad annak a feltételezésnek, hogy alacsonyabb rendű fajokban a különböző aktin izoformák szolgálnak eltérő szubsztrátként az aktinkötő fehérjék számára. Ezzel szemben magasabb rendű fajokban, ahol az aktin izoformák száma korlátozott, a különböző Tpm izoformákhoz való asszociációjuk révén jönnek létre funkcionálisan eltérő aktin szubsztrátok. A hipotézis szerint a Tpm izoformák kulcsszerepet játszanak az aktin sejtvázs funkcionális diverzifikációjának kialakításában [41]. A Tpm izoforma specifikus szabályozás szerkezeti alapját jelentheti, hogy a különböző Tpm izoformák kötődése és pozíciója a filamentumon eltérő [41-47].

3. Biokémiai szabályok (2. ábra (3))

Az aktinkötő fehérjék eloszlása az aktin hálózatokban a sejt összetett biokémiai egyensúlyának eredménye. Ebben számos különböző aktinkötő fehérjecsalád vesz részt, amelyek kooperatív (2. ábra (3a)) vagy kompetitív módon (2. ábra (3b)) kötődnek az aktinhoz ezáltal befolyásolva egymás kölcsönhatásait [36, 48, 49].



2. ábra Az aktin hálózatok funkcionális specializációjának mechanizmusai a dolgozatban bemutatott ábra szerint (4. ábra, 11. oldal).

12. oldal: „A vezető élen a lamellipodium, az aktin filamentumok polarizált dinamikája által vezérelt vékony, lemezszerű membránkitüremkedés a migráló sejtek egyik fémjele.” Váratlanul megjelenik a „vezető él” fogalma, amiről nem tudjuk micsoda.

Az Opponens megjegyzése jogos. A „vezető él” kifejezés nem került kifejtésre a dolgozatban. A „vezető él” (*leading edge*) a mozgó sejt haladási irányába eső „oldala”, ahol az aktin filamentumok polimerizációja és a kapcsolódó erő kifejtés membránkitüremkedéseket eredményez. A kifejezés használatára magyar nyelvű példaként említhető az alábbi tankönyv és PhD dolgozatok [50-53].

A „fémjele” sem igazán szerencsés kifejezés. Talán inkább jellegzetessége? Vagy a migráló sejteket fémjelzi?

Az Opponens megjegyzése jogos. A „fémjel” főnév helyett a „fémjelez” ige megfelelő alakjának használata lett volna helyes.

Ugyanakkor a lamellipodium meghatározása az „1. Lamellopodium” alfejezet előtt található. Miért nem az alfejezet elején?

A dolgozat „A sejt motilis sajátágaiban meghatározó citoszkéletális polimer rendszerek” fejezetének (12-13. oldal) bevezető szakaszában a sejtmozgásban szerepet játszó aktin alapú struktúrák – így a lamellipodium is – röviden, összefoglaló jelleggel kerülnek említésre. Ennek a bevezetőnek a célja a főbb struktúrák előzetes kontextusba helyezése volt. A részletes bemutatás és a funkcionális jellemzések ezt követően, tematikusan tagolt alfejezetekben kerülnek kifejtésre („1. Lamellipodium”, „2. Lamella”, „3. Filopodium”, „4. Az aktin és mikrotubulus sejtváza funkcionális koordinációja”).

13. oldal: „A lamellipodium egy gyors és a taposómalom egyensúlynak (*treadmilling*) megfelelően irányított dinamikájú hálózat [94, 95].” Szegény olvasót már megint egy újabb, ismeretlen fogalommal (*treadmilling*) zaklatják.

Az Opponens észrevétele jogos, a dolgozat nem tárgyalja a taposómalom-egyensúly (*treadmilling*) jelenségét. A *treadmilling* részletesebb kifejtése nem volt célom a dolgozatban. Ugyanakkor elfogadom, hogy annak átfogóbb bemutatása jobban szolgálhatta volna az olvasó számára a téma megértését. Az opponensi észrevétel nyomán az alábbi kiegészítésében törekszem a fogalom részletesebb bemutatására.

A taposómalom egyensúly (*treadmilling*)

A *treadmilling* jelenség eredete az aktin ATPáz aktivitásában keresendő. Az ATP-aktin polimerizációja esetében a filamentumok szöges (b, *barbed*) és hegyes (p, *pointed*) végének dinamikáját jellemző kritikus koncentrációk (c_c) eltérnek (dolgozat, 3. táblázat, 9. oldal), mégpedig úgy, hogy:

$$c_c^{ATP,b} < c_c^{ATP,p}$$

Ennek az aszimmetriának a következménye a *treadmilling*. A *treadmilling* egy meghatározott koncentrációtartományban figyelhető meg, amikor az aktin koncentrációja ($[A]$) a két vég kritikus koncentrációja között van (1. és 3. ábra, szürke téglalap), azaz:

$$c_c^{ATP,b} < [A] < c_c^{ATP,p}$$

A kritikus koncentráció értelmezésénél leírtak alapján³ ebben a koncentrációtartományban a szöges végen nettó polimerizáció (összeszerelődés, hosszabbodás), miközben a hegyes végen nettó depolimerizáció (szétszerelődés, rövidülés) zajlik. Ez a filamentum irányított, a szöges vég felé történő translációs mozgását eredményezi (3. ábra). Ha az aktin koncentráció éppen megegyezik a szöges és a hegyes vég együttes dinamikáját jellemző kritikus koncentrációval (c_c), akkor a szöges végen a növekedés sebessége (v_+^b) megegyezik a hegyes végen a rövidülés sebességével (v_-^p) (3. ábra):

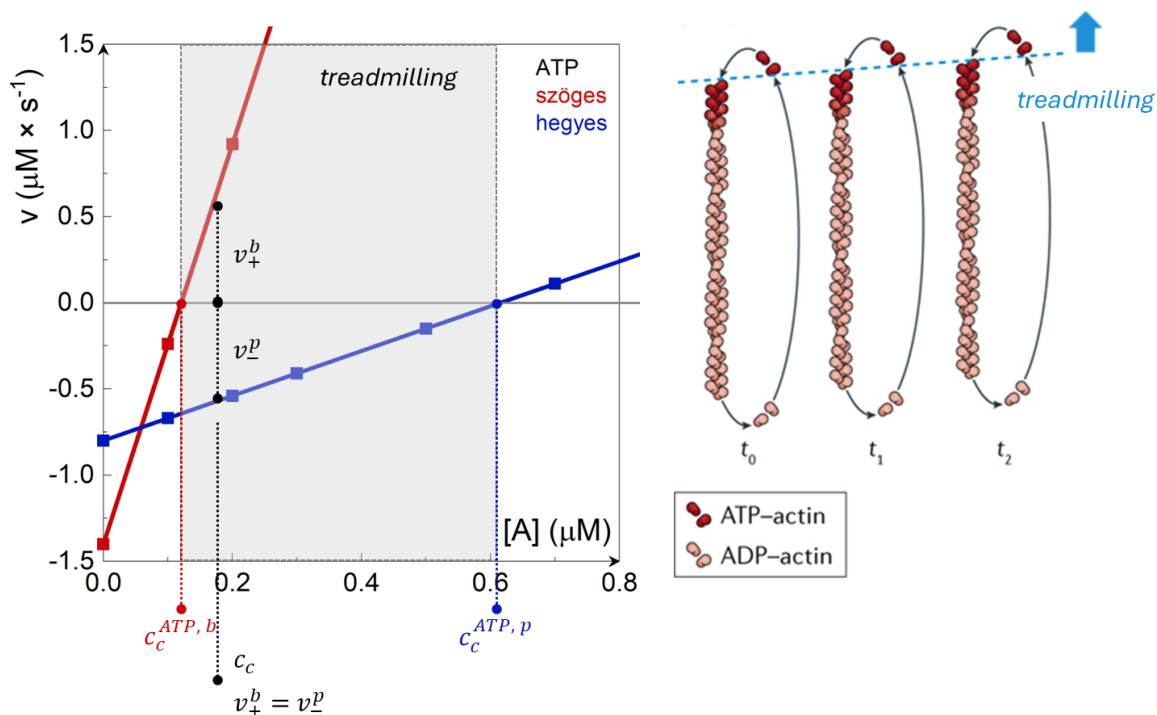
$$c_c = [A] \rightarrow v_+^b = v_-^p$$

Így a filamentum hossza állandó, miközben a két végén folyamatos asszociációs és disszociációs események történnek.

ADP-kötött aktin esetén a két vég kritikus koncentrációja megegyezik (dolgozat, 3. táblázat, 9. oldal), így a filamentum mindkét végen hosszabbodik vagy rövidül, *treadmilling* ebben az esetben nem figyelhető meg. A *treadmilling* mechanizmusának részletesebb leírására példaként az alábbi tanulmányt hivatkozom [18].

³ Lásd „A kritikus koncentráció” részt korábban.

A *treadmilling* jelenségét először Albrecht Wegner írta le (*head-to-tail assembly* [27]), majd sejtmentes rendszerekben, egyedi filamentumokon is igazolták [54]. A mechanizmus tetten érhető a lamellipodium dinamikájában [55, 56] és sikeresen rekonstruálták biomimetikus modell rendszerekben is [57-59]. A *treadmilling* az intracelluláris aktin hálózatok megújulásának (lebomlásának és újräpülésének, *turnover*) alapvető mechanizmusa [28]. Egyrészt lehetővé teszi a hálózatok átszerveződését és az aktintartalmuk újrahasznosítását anélkül, hogy a filamentumokat teljesen szét kellene szerelni. Másrészt biztosítja a filamentumok irányított elmozdulását a szöges vég irányába.



3. ábra (bal oldali panel) A filamentumban lévő aktin mennyiségének változási sebessége (v) a szöges (b, *barbed*) és a hegyes (p, *pointed*) végen, ATP-aktin esetén az aktin koncentráció függvényében ($[A]$). A *treadmilling*nek megfelelő koncentrációtartományt szürke téglalap jelöli. A sebességet a $v([A]) = k_+[A] - k_-$ összefüggés szerint határoztam meg a szöges és a hegyes vég kinetikai paramétereit felhasználva (dolgozat 3. táblázat, 9. oldal). A $v([A])$ függvény vízszintes tengellyel való metszéspontja adja a kritikus koncentrációt (c_c). Az ábrát a [5] publikációkban közölt saját készítésű Figure 2.B jelölésű ábra nyomán készítettem. (jobb oldali panel) A *treadmilling* ciklus sematikus ábrázolása. Az időbeli sorozat egy filamentum állapotát szemlélteti három egymást követő időpontban (t_0 , t_1 , t_2). A szaggatott kék vonal meredeksége a *treadmilling* sebességének felel meg. Az ábra forrása: [28].

13. oldal: Mi a különbség a filamentum, a lamella és a filopodium között? A leírásból csak annyi derül ki, hogy mennyiségi a különbség, de a lamella és a filopodium így is azonosnak tűnik.

A dolgozat „Az aktin szerkezeti sajátosságai” fejezete (6-8. oldal és 2. ábra) mutatja be az aktin filamentumok jellemzőit, a „1. Lamellipodium”, „2. Lamella” és „3. Filopodium” fejezetek (12-13. oldal és 5. ábra) tárgyalják a különböző aktin hálózatok sajátosságait. Az Opponens észrevétele nyomán az alábbiakban kiegészítő módon tisztázom a fogalmakat.

A filamentumok (F-aktin) az aktin monomerek polimerizációja révén jönnek létre. A filamentumok különböző hálózatokba szerveződhetnek, mint például a lamellipodium, a filopodium és a lamella. Ezek a struktúrák eltérő szerkezeti felépítéssel, dinamikai sajátosságokkal és molekuláris összetétellel rendelkeznek, és különböző funkciókat látnak el például a sejt vándorlás során vagy a környezeti jelek érzékelésében. A témát több összefoglaló tanulmány is tárgyalja: [59-62].

A lamellipodium sajátosságai viszonylag jól ismertek, míg a filopodium és a lamella eredete és kialakulásának mechanizmusai még nem teljesen tisztázottak. A lamellipodium elágazó filamentumokból álló, dendritikus hálózat. A filopodium és a lamella egyenes, elágazásoktól mentes filamentumokat tartalmaznak. Ugyanakkor a filopodium és a lamella nem azonos struktúrák. A filopodium a lamellipodium előtt található aktin hálózat, a sejtfelszínen kitüremkedő nyúlvány. A lamella a lamellipodium mögött, a sejttest irányában helyezkedik el. A filopodium egy vékony (hossz ~ 1-10 μm , átmérő ~ 0.1-0.3 μm), ujj-szerű, membránkitüremkedés, párhuzamos lefutású, keresztkötő fehérjék által kötegekbe rendezett filamentumokat (10-30) tartalmaz. A *konvergens elongáció* modell szerint a filopodium filamentumai a lamellipodium hálózatából erednek: a sapkafehérje disszociációját (*uncapping*) követően a filamentumok növekednek, majd kötegekbe rendeződnek. Alternatív mechanizmusként a filamentumhálózat *de novo* módon is kialakulhat a forminok általi nukleáció és processzív elongáció révén (*de novo nukleáció* modell). A filopodiumképződés során több, egymástól eltérő molekuláris mechanizmus működhet együtt, amelyek jelentősége sejttípusonként és élőlényenként változhat. A lamella egy széles (~ 10-15 μm), egyenes filamentumokból álló hálózat, ami a lamellipodium mögött, a sejttest irányában helyezkedik el. A lamella filamentumai származhatnak a lamellipodiumból az elágazások disszociációját követően vagy kialakulhatnak *de novo*, a forminok általi nukleáció és processzív elongáció révén.

A dolgozatban bemutatott eredmények az alábbiak szerint kapcsolódnak a kérdéskörhöz:

(i) filopodium

Eredményeink a filopodium kialakulásában a forminok szerepét hangsúlyozzák. A forminok antagonisztikus módon működnek együtt a sapkafehérjével és *de novo* nukleációs aktivitással rendelkeznek. Ezek az aktivitások összhangban állnak mind a konvergens elongáció, mind a *de novo* nukleáció modelljével.

(ii) lamella

Eredményeink a lamella kialakulásában a lamellipodiumból eredő önszerveződő, morfológiai és dinamikai gradienst mutató rendszer szerepét hangsúlyozzák. A mechanizmus szerint a tropomiozin és az NPF:Arp2/3 komplex, valamint a tropomiozin és az ADF kompetitív antagonisztikus hatásai elegendőnek bizonyulnak a lamellipodium és a lamella szegregációjához.

16. oldal: „*Milyen mechanizmusok határozzák meg az aktinkötő fehérjék szegregációját és ez által az aktin hálózatok molekuláris identitását és funkcionális sajátosságait?*” Eddig még nem esett szó a szegregációról.

A dolgozat „Az intracelluláris aktin hálózatok funkcionális polimorfizmusa” fejezete (10-12. oldal) és a 4. ábrája (11. oldal) foglalja össze röviden azokat a sejt szintű mechanizmusokat, amelyek az aktinkötő fehérjék szegregációjában (*sorting*) és az eltérő funkciójú aktin hálózatok kialakításában szerepet játszanak. A dolgozatban nem volt célom a mechanizmusok átfogó bemutatása, ezért azok ismertetése tömören, vázlatos formában történt.

19. oldal: „*1. Az aktinkötő fehérjék milyen aktivitásai állnak a tropomiozin protrúziós fenotípusának a hátterében?*” Ez a mondat értelmetlen. Eddig arról volt szó, hogy a tropomiozin egy aktinkötő fehérje. Másrészt a tropomiozinnak mióta van fenotípusa (ez utóbbi megfogalmazás aztán többször is visszatér)? Fenotípusa nem egy élőlénynek van?

Az Opponens észrevétele jogos, azt elfogadom. A „fenotípus” egy élő szervezet megfigyelhető tulajdonságainak összessége. A dolgozatban szereplő megfogalmazás; „a tropomiozin protrúziós fenotípusa” pontatlan és félreérthető lehet. Helyesebb lett volna olyan megfogalmazást használni, amely egyértelművé teszi, hogy nem a tropomiozinnak van fenotípusa, hanem a tropomiozin mikroinjektálását követően a sejtekben megfigyelhető morfológiai változások értelmezhetők fenotípusos válaszként.

20. oldal, 4. sor: Az Arp2/3 itt „katalizál”. A 12. oldalon a Lamellopodium alfejezet első sorában még csak inicializál. Most akkor melyik?? Egyáltalán mit csinál az Arp2/3? Ugyanebben a bekezdésben „pirén tranziens”-nek nevezi a fluoreszcencia időfüggését. Miért?

20. oldal 1. egyenlet: A Michaelis-Menten egyenlet egy, igencsak leegyszerűsített enzimreakcióra felírt egyenlet. Az Arp2/3 miért lenne enzim? Az alfejezet elején ugyan az Arp2/3 „katalizál”, de, a bíráló szerint, ez téves (lásd előző megjegyzés és a dolgozat 9. ábrája). De ha katalizálna is, akkor sem az skTpm lenne a szubsztrátja, hanem az aktin, ami még nem kötött a polimerhez (G-aktin). Másrészt, az eredeti MM egyenletben nem szerepel v_{min}. Milyen elvi alapon lett a v_{min} az egyenletbe beleírva?

21. oldal, 2. egyenlet: Itt a v_{min} már hiányzik, pedig elvileg ez az (1) egyenletből lenne származtatva. Hová lett?

Az alábbi megjegyzést is ide veszem

26. oldal, (4.1) és (4.2) egyenletek: A gyöngymozgás sebességének mi köze van a Michaelis-Menten kinetikához? Miért ezzel az egyenlettel kellett illeszteni? S honnan kerül bele a v_{min}?? S ha mégis MM kinetikák lennének, mi indokolja, hogy a két MM egyenlet különböző??

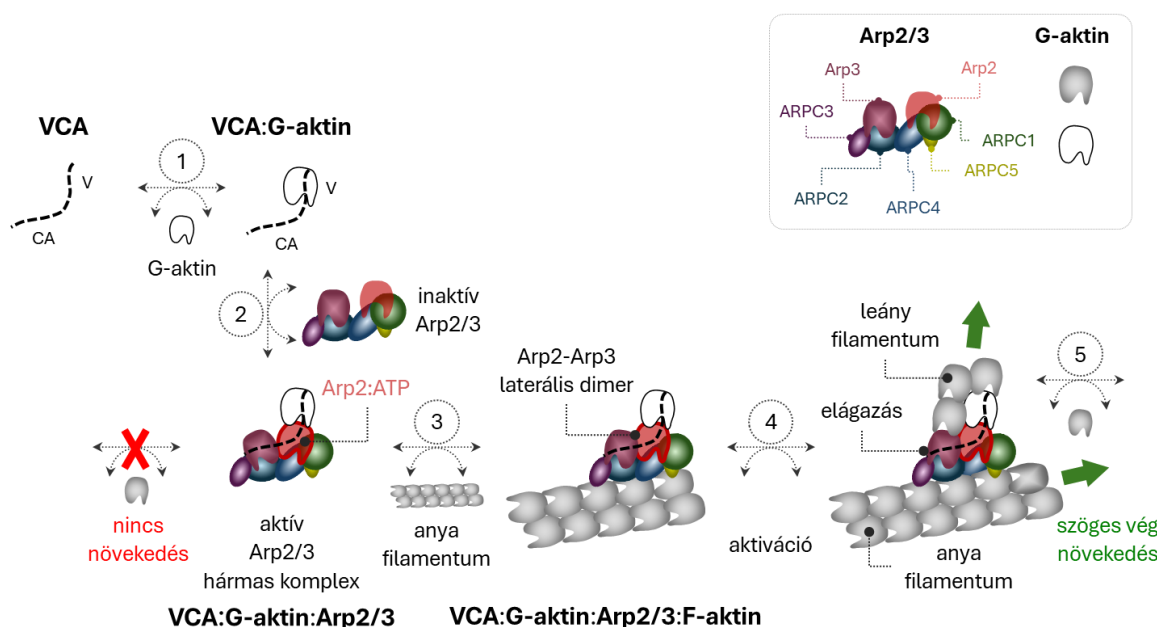
Az Opponens észrevétele jogos, azt elfogadom. Az Arp2/3 komplex működésének részletesebb bemutatása jobban szolgálhatta volna az olvasó számára a téma megértését. Köszönöm továbbá a kísérletes eredményeket leíró modellre vonatkozó megjegyzést is, ami lehetőséget adott arra, hogy újragondoljam és körültekintőbben értelmezzem a kérdéskört és az analízisünket.

Az Arp2/3 komplex működésével a dolgozat „A sejt motilis sajátságaiban meghatározó citoskeletális polimer rendszerek”, „1. Lamellipodium” (12. oldal) és „A lamellipodium szerkezeti, dinamikai és molekuláris sajátságait rekonstruáló biomimetikus modell” (22. oldal) fejezetei foglalkoznak. Az opponensi észrevételre reflektálva az alábbiakban kiegészítő módon törekszem az Arp2/3 komplex működésének átfogóbb bemutatására.

Az NPF⁴:Arp2/3 komplex fehérjerendszer az aktin filamentumok képződését (*de novo* nukleációját) segíti elő úgy, hogy egy meglévő (anya) filamentum oldaláról egy új (leány) filamentumot nukleál (*branching*) (4. ábra). Az NPF:Arp2/3 komplex által létrehozott filamentumhálózat karakterisztikus elágazó mintázatot mutat. A *branching* modelljére vonatkozóan az *Annual Reviews in Biophysics*-ben megjelent összefoglaló tanulmányunkat hivatkozom [5]. Szerkezeti és biokémiai vizsgálatok igazolták, hogy az Arp2/3 komplex önmagában inaktív. Aktivációja egy összetett, több lépésből álló folyamat, amiben számos tényező együttesen járul hozzá az elágazás kialakulásához [1, 5]. Ezek közé tartozik a nukleációt elősegítő faktor (pl. N-WASP, WAVE) VCA régiója⁴, a G-aktin, egy meglévő (anya) filamentum, az Arp2/3 komplex által kötött nukleotid, valamint szerkezeti átrendeződések. A *branching* folyamatának egyes lépéseire tartozó asszociációs és disszociációs sebességi állandók teljes körű meghatározása révén azonosítható a legvalószínűbb útvonal (4. ábra) [63]. A G-aktin az NPF WH2 doménjéhez (V), az Arp2/3 komplex az NPF CA doménjéhez kötődik. Így egy VCA:G-aktin:Arp2/3 hármas komplex jön

⁴ A dolgozatban definiáltam az NPF és VCA rövidítéseket (22. oldal). „A nukleációt elősegítő faktorok (**nucleation promoting factor**, NPF) közös sajátsága egy C-terminális **VCA régió**, ami egy aktinkötő Wiskott-Aldrich szindróma homológ domén 2 szakaszt (*Wiskott-Aldrich syndrome homology domain 2*, **WH2**, **V**), valamint az Arp2/3 komplex kötéséért felelős bázikus centrális (*central*, **C**) és savas (*acidic*, **A**) szegmenst tartalmaz.”

létre, ami még nem képes elágazás létrehozására. A hármas komplex az Arp2/3 komplex közvetítésével kapcsolódik egy meglévő (anya) filamentum oldalához. Az Arp2/3 komplex Arp2 és Arp3 alegységei a filamentum kis menetemelkedésű hélixét mimikálják (laterális, *short-pitch* dimer) és az NPF WH2 doménje által szállított G-aktinnal, mint harmadik monomerrel együtt egy trimert képeznek, ami nukleuszként alapot szolgáltat az új (leány) filamentum növekedéséhez. A *branching* folyamatában meghatározó továbbá az Arp2/3 komplex Arp2 és Arp3 alegységei által kötött ATP, valamint szerkezeti átrendeződések is. Egyrészt az Arp2 és Arp3 filamentumszerű konformációja, ami az Arp2/3 komplex anya filamentumhoz való kötődése során bekövetkező szerkezeti változások eredményeként alakul ki, másrészt az anya filamentum konformációváltozása, ami stabilizálja az elágazási csomópontot. A *branching* mechanizmusáról részletesebb képet adnak a közelmúltban publikált nagyfelbontású szerkezeti adatok, többek között tisztított fehérjéken végzett krio-elektronmikroszkópiai vizsgálatok [64-67] és fibroblasztok lamellipodiumjának krio-elektrontomográfiás vizsgálatai [68].



	reakció	k_+	k_-
1	VCA:G-aktin	$42.9 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	25.7s^{-1}
2	VCA:G-aktin:Arp2/3 komplex	$0.4 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	0.74s^{-1}
3	VCA:G-aktin:Arp2/3 komplex:F-aktin	$1.5 \times 10^{-4} \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$0.2 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$
4	aktiváció	0.15s^{-1}	-
5	szöges vég növekedés, elongáció	$11.6 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	1.4s^{-1}

4. ábra A elágazás kialakulásához (*branching*) vezető molekuláris események és kinetikai paramétereik. Az ábrát a [5] publikációban közölt saját készítésű Figure 3. jelölésű ábra nyomán készítettem. A táblázatban szereplő asszociációs és disszociációs sebességi állandók forrása: [69].

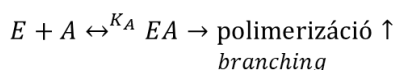
Az Arp2/3 komplex NPF aktivátorát egyes szakirodalmi források enzimszerű szabályozó fehérjeként írják le, mivel működése több szempontból is hasonlóságot mutat az enzimekével [5,

60, 70]. Az NPF „enzimként” működve szubsztrátként köti az Arp2/3 komplexet, a G-aktint és az any filamentumot és a ciklusa során egy elágazó filamentumot hoz létre (*branching*). A *branching* modellezésére a szakirodalomban található példák a Michaelis-Menten típusú megközelítés alkalmazására [71-73]. Az enzimek definíció szerint kémiai reakciókat katalizálnak [2, 74]. A klasszikus értelmezés szerint az NPF nem tekinthető valódi enzimnek. Továbbá az NPF-Arp2/3 komplex rendszer működése és a *branching* folyamata összetettebb, mint a Michaelis-Menten kinetikai modell által leírt enzim-szubsztrát kölcsönhatás.

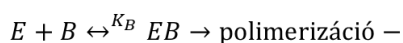
A tropomiozin (skTpm) Arp2/3 komplex által létrehozott filamentumelágazások dinamikájára gyakorolt hatását a fehérje-ligandum kötődés keretében írhatjuk le [2, 75, 76]. A dolgozatban alkalmazott matematikai leírásmód és összefüggések összhangban vannak ezzel a megközelítéssel, utalás történik erre a vonatkozó publikációm „Materials and Methods” részében [77]. A dolgozatban sajnálatos módon tévesen jelenik meg a Michaelis-Menten modell használatára való hivatkozás, az nem tükrözi az alkalmazott elméleti keretet. A két megközelítés formalizmusa hasonló; az enzimkinetikai modell egy része, ami az enzim és a szubsztrát közötti kölcsönhatást, illetve az enzim-szubsztrát komplex kialakulását írja le a fehérje-ligandum kötődési modell alapján értelmezhető [76]. A dolgozatban alkalmazott modell részletesebb és körültekintőbb bemutatása indokolt lett volna; úgy vélem, hogy ezáltal elkerülhető lett volna a téves hivatkozás. Az opponensi észrevételre reagálva az alábbiakban kiegészítő és tisztázó módon ismeretem az analízis főbb pontjait.

Az Arp2/3 komplex és a tropomiozin (skTpm) aktin polimerizációra gyakorolt hatásait a kompetitív (versengő) kötődési séma szerint írhatjuk le (5. ábra) [2, 75]. A modell alapján az aktivált Arp2/3 komplex és az skTpm egymással versengve kötődnek az aktin filamentumokhoz. Ez a kötődési verseny határozza meg a polimerizáció sebességét: az Arp2/3 komplex a *branching* révén fokozza a sebességet (5. ábra ↑), míg az skTpm a spontán polimerizációra jellemző sebességet (5. ábra –) tartja fenn (Supplemental Figure 1. jelölésű ábra: [77]).

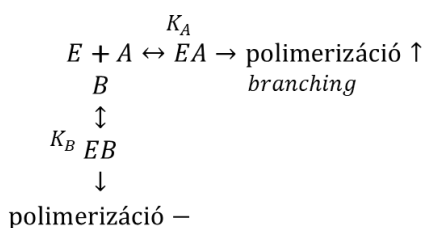
Arp2/3:aktin kötődés



skTpm:aktin kötődés



Arp2/3-skTpm kompetitív kötődés



5. ábra Az Arp2/3 komplex és az skTpm aktin kölcsönhatásai.

Az ábrán és a szövegben használt jelölések magyarázata:

E = aktin, A = Arp2/3 komplex, B = skTpm

EA: Arp2/3:aktin komplex, K_A : az Arp2/3:aktin komplex disszociációs egyensúlyi állandója

EB: skTpm:aktin komplex, K_B : az skTpm:aktin komplex disszociációs egyensúlyi állandója

[]: moláris koncentráció

E, A, B: szabadállapotú fehérje

EA, EB: komplexben lévő fehérje

E_0 , A_0 , B_0 : összes fehérje

Feltételezzük, hogy a fehérje koncentrációja jóval kisebb, mint a ligandumé. Ezért a komplex képződése nem csökkenti jelentősen a szabad ligandum koncentrációját, nincs ligandum depléció. Így a szabad ligandum koncentrációja jó közelítéssel azonosnak tekinthető a hozzáadott összes ligandum koncentrációjával [2, 76].

(i) fluoreszcencia spektroszkópai kísérletek

A kompetitív kötődési modell alapján a dolgozat 7. ábráján (20. oldal) és 8. ábráján (22. oldal) bemutatott kísérleti adatok illesztése az alábbi megfontolások és matematikai összefüggések alapján végezhető el.

A dolgozat 7. ábráján bemutatott kísérletben Arp2/3 komplexet ($[A]$ = állandó) tartalmazó rendszert titráltam tropomiozinnal ($[B]$). A $v([B])$ függvény meghatározása céljából az skTpm kötött hányadára vonatkozó összefüggés az alábbi formában írható fel (dolgozat, 9. egyenlet, 81. oldal):

$$\frac{v - v_{\min}}{v_{\min} - v_{\max}} = \frac{[EB]}{[E_0]} = \frac{[B]}{K + [B]}$$

v : a polimerizáció sebessége egy tetszőleges skTpm koncentráción

$v_{\min}$: a polimerizáció sebessége telítési skTpm koncentráción

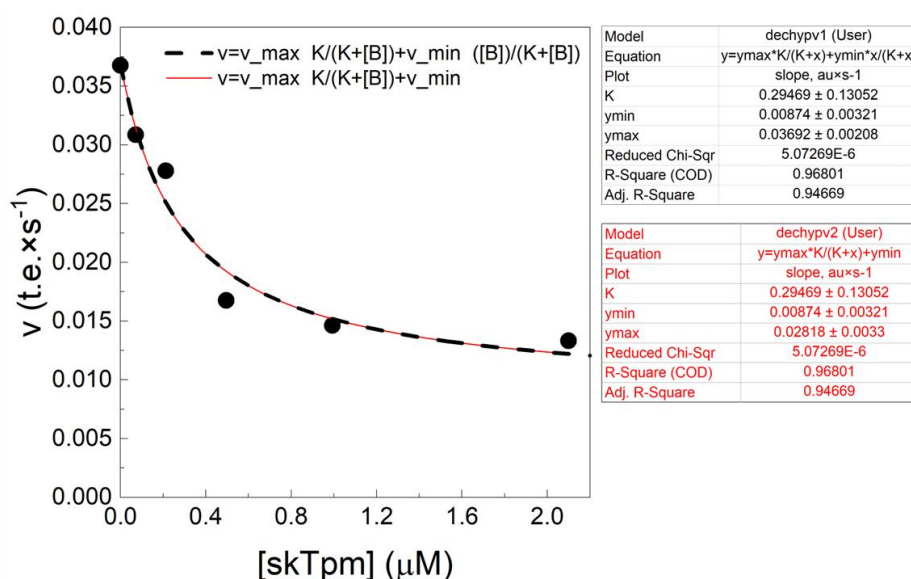
$v_{\max}$: a polimerizáció sebessége skTpm hiányában

$K = K_B(1 + \frac{[A]}{K_A})$: látszólagos disszociációs egyensúlyi állandó

Átrendezéssel adódik a $v([B])$ függvény a dolgozat 7. ábrájának jobb oldali paneljén bemutatott adatsor illesztésére:

$$v = v_{\max} \frac{K}{K + [B]} + v_{\min} \frac{[B]}{K + [B]}$$

A dolgozat 1. egyenlete (20. oldal) a második tag vonatkozásában eltér. A két összefüggés $[B]/(K+[B]) \sim 1$ esetén lenne ekvivalens, ami $[B] \gg K$ közelítéssel adódik. Ez az adatok illesztésében és a dolgozat következtetéseiben lényegi eltérést nem eredményez (6. ábra).



6. ábra A dolgozat 7. ábrájának jobb oldali paneljén bemutatott adatsor illesztése.

fekete szaggatott vonal: a dolgozat 1. egyenlete szerinti illesztés

piros vonal: a $v = v_{max} \frac{K}{K+[B]} + v_{min} \frac{[B]}{K+[B]}$ egyenlet szerinti illesztés

A dolgozat 8. ábrájának bal oldali paneljén bemutatott kísérletben tropomiozint ($[B]$ = állandó) tartalmazó rendszert titráltam Arp2/3 komplexszel ($[A]$). A méréseket több különböző skTpm koncentráción is elvégeztem. A $v([A])$ függvény meghatározása céljából az Arp2/3 komplex kötött hányadára vonatkozó összefüggés az alábbi formában írható fel (dolgozat, 9. egyenlet, 81. oldal):

$$\frac{v - v_{min}}{v_{max} - v_{min}} = \frac{[EA]}{[E_0]} = \frac{[A]}{K + [A]}$$

v : a polimerizáció sebessége egy tetszőleges Arp2/3 komplex koncentráción

v_{max} : a polimerizáció sebessége telítési Arp2/3 komplex koncentráción

v_{min} : a polimerizáció sebessége Arp2/3 komplex hiányában

$K = K_A(1 + \frac{[B]}{K_B})$: látszólagos disszociációs egyensúlyi állandó

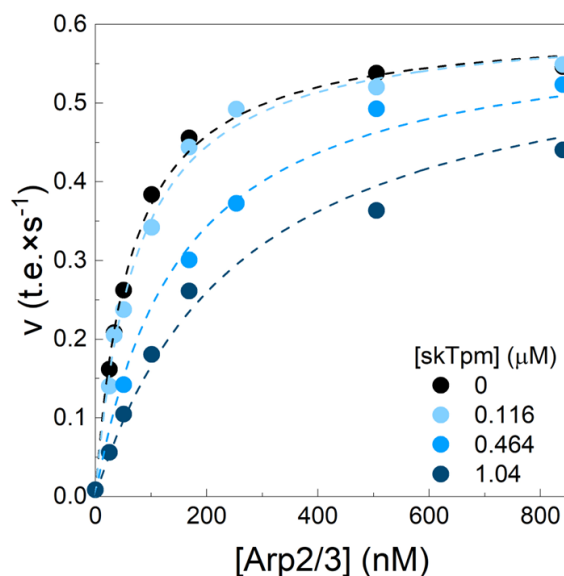
A kísérletekben alkalmazott körülmények mellett az Arp2/3 komplex jelenlétében a polimerizációs sebesség (v) értékei a következő tartományba estek: $v_{min} \sim 0.009 \text{ t.e} \times \text{s}^{-1}$ - $v_{max} \sim 0.6 \text{ t.e} \times \text{s}^{-1}$ és jellemzően meghaladták a v_{min} értéket (7. ábra). Ennek alapján a $v \gg v_{min}$ és $v_{max} \gg v_{min}$ közelítést alkalmaztuk és a v_{min} tagot elhanyagoltuk. A v_{min} elhanyagolása az adatok illesztésében és a dolgozat következtetéseiben lényegi eltérést nem eredményez (7. ábra).

$$\frac{v}{v_{max}} = \frac{[A]}{K + [A]}$$

Átrendezéssel adódik a kettős-reciprok ($1/v$, $1/[A]$) ábrázolásnak megfelelő függvény a dolgozat 8. ábrájának bal oldali paneljén bemutatott adatsor illesztésére:

$$\frac{1}{v} = \frac{K}{v_{max}} \frac{1}{[A]} + \frac{1}{v_{max}}$$

Ez a dolgozat 2. egyenletének (21. oldal) megfelelő összefüggés. Sajnos a dolgozat 2. egyenletében elírás található; a tropomiozin koncentrációja szerepel benne, holott az Arp2/3 komplex koncentrációját kellett volna feltüntetni. Ez egyértelműen következik a dolgozat 8. ábrájának bal oldali paneljén (22. oldal) bemutatott adatokból.



7. ábra A dolgozat 8. ábrájának bal oldali paneljén bemutatott adatsor $v([Arp2/3])$ függvény szerinti ábrázolása. A szaggatott vonalak a $v = v_{max} \frac{[A]}{K+[A]} + v_{min} \frac{K}{K+[A]}$ egyenlet szerinti illesztést mutatják.

(ii) biomimetikus motilitás kísérletek

Az aktin hálózatok polimerizációja által hajtott mozgások értelmezésére a szakirodalom két egymást kiegészítő elméleti megközelítést is javasol; (i) mikroszkopikus értelmezés: elasztikus-pányvázott kilincskerék modell („racsní”), valamint (ii) mezoszkopikus értelmezés: elasztikus aktin gél („csúzli”) [78-80]. Emellett egy, a két megközelítést ötvöző hibrid modell is kidolgozásra került [81]. A modellek alapján kvantitatív összefüggések származtathatók az aktin polimerizációja által hajtott mozgások sebességére, ami komplex módon függ a rendszer jellemzőitől (a témát átfogóan bemutató doktori disszertáció: [78]). A modellek egzakt matematikai összefüggéseinek alkalmazása túlmutat a munkánk célkitűzésein. Egyszerűsített leírásként a fluoreszcencia spektroszkópiai kísérletekben alkalmazott megfontolások alapján végeztük el az adataink illesztését.

****** (lásd a jelen dokumentum 27. oldala)

Az aktin hálózatok polimerizációja által hajtott mozgások leírására szolgáló modelleket az Opponens egy későbbi megjegyzése nyomán részletesebb is bemutatom.

A dolgozat 11. ábrájának C paneljén (25. oldal) bemutatott kísérletben Arp2/3 komplexet ($[A]$ = állandó) tartalmazó biomimetikus rendszert titráltam tropomiozinnal ($[B]$), alacsony ($d = 6$ nm) és magas ($d = 3$ nm) N-WASP gyöngyfelszíni sűrűség esetén. A $v([B])$ függvény meghatározása céljából az skTpm kötött hányadára vonatkozó összefüggés az alábbi formában írható fel (dolgozat, 9. egyenlet, 81. oldal).

d = 6 nm esetre

$$\frac{v - v_{max}}{v_{min} - v_{max}} = \frac{[EB]}{[E_0]} = \frac{[B]}{K + [B]}$$

v : a gyöngymozgás sebessége egy tetszőleges skTpm koncentráción

$v_{\min}$: a gyöngymozgás sebessége telítési skTpm koncentráción

$v_{\max}$: a gyöngymozgás sebessége skTpm hiányában

$K = K_B(1 + \frac{[A]}{K_A})$: látszólagos disszociációs egyensúlyi állandó

Átrendezéssel adódik a $v([B])$ függvény a dolgozat 11. ábrájának C paneljén bemutatott „d = 6 nm” adatsor illesztésére:

$$v = v_{\max} \frac{K}{K + [B]} + v_{\min} \frac{[B]}{K + [B]}$$

d = 3 nm esetre

$$\frac{v - v_{\min}}{v_{\max} - v_{\min}} = \frac{[EB]}{[E_0]} = \frac{[B]}{K + [B]}$$

v : a gyöngymozgás sebessége egy tetszőleges skTpm koncentráción

$v_{\max}$: a gyöngymozgás sebessége telítési skTpm koncentráción

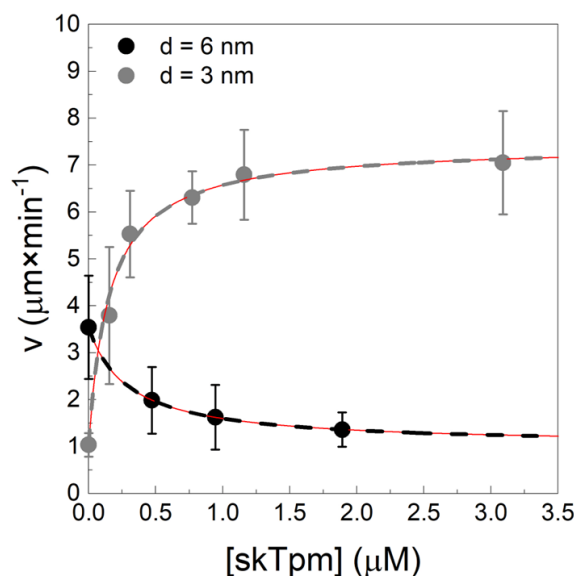
$v_{\min}$: a gyöngymozgás sebessége skTpm hiányában

$K = K_B(1 + \frac{[A]}{K_A})$: látszólagos disszociációs egyensúlyi állandó

Átrendezéssel adódik a $v([B])$ függvény a dolgozat 11. ábrájának C paneljén bemutatott „d = 3 nm” adatsor illesztésére:

$$v = v_{\max} \frac{[B]}{K + [B]} + v_{\min} \frac{K}{K + [B]}$$

A dolgozat 4.1. és 4.2 egyenletei (26. oldal) a második tag vonatkozásában eltérnek. Az eltérés a 4.1. egyenlet esetén a $[B]/(K+[B]) \sim 1$, $[B] \gg K$, a 4.2. egyenlet esetén pedig a $v_{\max} \gg v_{\min}$ feltételezésből adódik. Ez az adatok illesztésében és a dolgozat következtetéseiben lényegi eltérést nem eredményez (8. ábra).



8. ábra A dolgozat 11. ábrájának C paneljén bemutatott adatsor illesztése.

fekete/szürke szaggatott vonal: a dolgozatban szereplő 4.1 és 4.2 egyenletek szerinti illesztés

piros vonal: a fent bemutatott egyenletek szerinti illesztés

A fenti modell a legegyszerűbb megközelítést alkalmazza a fehérje-ligandum kölcsönhatás leírására; a fehérje egyetlen specifikus kötőhellyel rendelkezik a ligandum számára [2, 75]. A Tpm esetén ez egyszerűsítés [82]. A Tpm esetén a molekulák párhuzamos dimerként tekerceslődnék össze egy szuperhélixet (*coiled-coil*) alkotva. A Tpm dimer hét szomszédos monomerhez kötődik a filamentum nagy menetemelkedésű hélice mentén egy 385 Å hosszú szakaszon. Az egyedi Tpm molekulák kis affinitással kötődnek a filamentumhoz ($K_a \sim 10^3 \text{ M}^{-1}$). A Tpm affinitása nagyságrendekkel növekszik, amikor a szomszédos Tpm dimerek a közöttük kialakuló kollektív kölcsönhatás, az N-, és C-terminális végek közötti vég-vég kapcsolódás (*head-to-tail*) révén egy folytonos, hézagmentes láncot képeznek a filamentum mentén ($K_a \sim 10^6 \text{ M}^{-1}$). A Tpm F-aktin kötődése pozitív kooperativitást mutat. A kölcsönhatás pontosabb leírásához a kooperatív kötődési modellnek megfelelő Hill-egyenletet alkalmazhatjuk [2, 83-85]:

$$\frac{[EB]}{[E_0]} = \frac{[B]^n}{K + [B]^n}$$

n: Hill-együttható

K: disszociációs egyensúlyi állandó

A vázizom eredetű tropomiozinnal kapcsolatos eredményeinket közlő eredeti publikációban [77] nem vettük figyelembe a Tpm F-aktin kötődésének kooperatív természetét, a dolgozatban céltom az ott alkalmazott megközelítés bemutatása volt.

Az Opponens észrevétele jogos; a „pirén tranzienst” kifejezés helyett megfelelőbb lett volna a „pirén fluoreszcencia emisszió időfüggése” kifejezés használata.

21. oldal: „Az ellentmondást feloldja, hogy abban a munkában lényegesen alacsonyabb Arp2/3 komplex koncentráción történtek a mérések (10-60 nM).” Szemben melyik munkával? Mert a dolgozat 7. ábráján az Arp2/3 koncentráció 50 nM-nak van megadva, ami a bíráló szerint beleesik a megadott (s alacsonyabbnak minősített) 10-60 nM koncentrációtartományba.

Az Opponens által idézett mondatban a dolgozat [55] számú irodalmi hivatkozásának Figure 3. jelzésű ábráján közölt adatokat és kísérleti körülményeket [86] vettem össze a dolgozat 8. ábráján (22. oldal) bemutatott saját kísérletes eredményeimmel, nem a 7. ábrán szereplő adatokra hivatkozok. Az [55] számú irodalmi hivatkozás Figure 3. jelzésű ábráján az Arp2/3 komplex koncentrációja 10, 20, 40 és 60 nM volt. A dolgozat 8. ábráján az [Arp2/3] reciprok értékei szereplenek. Ennek megfelelően a kísérleteimben alkalmazott Arp2/3 koncentrációk az alábbiak voltak: [Arp2/3] ~ 25, 33, 50, 101, 168, 253, 505 és 840 nM.

22. oldal „A lamellipodium szerkezeti, dinamikai és molekuláris sajátosságait rekonstruáló biomimetikus modell” alfejezet: A bíráló a dolgozatból sajnos nem értette meg, hogy a mikrogöngyök miért mozognak egyenletes sebességgel a rendszerben, s az a gyanúja, hogy a mozgás létrejöttét a jelölt sem érti. Ezt a megértést a 9. és a 10. ábra sem segítette. Egyik ábra sem értelmezhető. Némely jel nincs elmagyarázva, vagy olyan kicsi, hogy nem jól látható. A 9. ábra egyes részeinek kapcsolata homályos, a feliratok semmitmondóak, a folyamatot nem magyarázzák. Homályos továbbá, hogy a göngyfelszínnek miért csak az egyik pólusán alakul ki aktin hálózat, miért nem a göngy teljes felszínén. Ezt is el kellene magyarázni!

41. oldal: Nem a göngyök aktivitását, hanem a göngyök mozgását figyelte meg.

43. oldal: A 23. ábra majdnem teljesen ugyanaz, mint a 9. ábra, csak lamellipodium szerű aktin hálózat helyett filopodium szerű aktin hálózat van az ábrán a göngyökhöz kötve. A 23. ábra viszont ugyanúgy érthetetlen, mint a 9. ábra. Amennyiben a piros fél ellipszisek jelzik a forminokat, akkor kérdés, hogy a forminok az egyes filamentumokhoz vagy a filopodiumokhoz (lamellákhoz???), mint egészhez kötődnek-e? Az ábrán egy eddig nem ismert fogalom a „csóva” is megjelenik.

Az Opponens észrevételét elfogadom. A nagyobb méretű és részletesebb jelöléssel ellátott ábrák jobban szolgálhatták volna az olvasó számára az értelmezést. A dolgozatban szereplő 9. ábra (23. oldal) és 23. ábra (43. oldal) korábbi publikációkban megjelent saját készítésű ábráimon alapulnak (Figure 1. jelölésű ábra: [59], Figure 4. jelölésű ábra: [5]). Az eredeti ábrákat a dolgozatban továbbfejlesztettem; kiegészítettem azokat az oldat fehérjerendszerét bemutató sematikus résszel („biokémiai környezet”), valamint a göngyről és az aktin hálózatról készült fáziskontraszt és fluoreszcencia mikroszkópiai felvételekkel („mezoszkópikus sajátosságok”). A dolgozat 10. ábrája (24. oldal) az Alex Mogilner és George Oster által jegyzett publikációban közölt ábra adaptációja (Figure 1. jelölésű ábra, dolgozat [116] számú irodalmi hivatkozása).

Az Opponens azon észrevételét is elfogadom, hogy a biomimetikus módszertan részletesebb bemutatása jobban szolgálhatta volna az olvasó számára a téma megértését. A dolgozatban a módszertan alapelveinek és a molekuláris kölcsönhatások értelmezése szempontjából releváns elemeinek az ismertetésére törekedtem. A biomimetikus megközelítés teljes körű, minden aspektusára (biológiai, fizikai és matematikai) kiterjedő leírása interdiszciplináris eszköztárat igényel, ami több esetben túlmutat a szakterületemen. Ezeket az aspektusokat több kiváló összefoglaló tanulmány tárgyalja; a teljesség igénye nélkül a tématerület alábbi publikációira hivatkozom: [78-80, 87]. Az opponensi észrevételre reflektálva az alábbi kiegészítésében törekszem a módszertan részletesebb bemutatására.

****** (lásd a jelen dokumentum 23. oldala)

Az aktin hálózatok polimerizációja által hajtott mozgások

Az aktin hálózatok polimerizációja által hajtott mozgások értelmezésére a szakirodalom két egymást kiegészítő elméleti megközelítést is javasol; (i) mikroszkópikus értelmezés: elasztikus-pányvázott kilincskerék modell („racsni”), valamint (ii) mezoszkópikus értelmezés: elasztikus aktin gél („csúzli”) [78-80]. Emellett egy, a két megközelítést ötvöző hibrid modell is kidolgozásra került [81].

(i) mikroszkópikus értelmezés: elasztikus-pányvázott kilincskerék modell

(„racsni”, dolgozat, 10. ábra, 24. oldal)

Ez a megközelítés az aktin hálózatot alkotó *egyedi filamentumok* polimerizációja és mechanikai sajátosságai alapján értelmezi az erő kifejtését és a mozgást (a dolgozat [116], [117] és [118] számú irodalmi hivatkozásai). A modell főbb elemei a dolgozat 23-24. oldalán és a 10. ábrán (24. oldal) kerültek bemutatásra. Törekedtem azoknak a részleteknek a kiemelésére, amik a megfigyeléseink és a tropomiozin hatásainak értelmezése szempontjából lényegesek.

(ii) mezoszkopikus értelmezés: rugalmas aktin gél

(„csúzli”, 9. ábra)

Ez a megközelítés az aktin hálózatot *kollektív filamentum sokaságként*, folytonos közegként feltételezi és annak rugalmas tulajdonságai alapján értelmezi az erő kifejtését és a mozgást [79, 87]. A modell szerint a gyöngyfelszínen, mint nukleáló felületen történő polimerizáció a filamentumhálózatnak, mint folytonos, rugalmas közegnek a deformációját idézi elő: az újonnan keletkező aktin réteg elmozdítja és deformálja a korábban létrejött rétegeket, ami nyomán mechanikai feszültség ébred az aktin hálózatban. Ez szimmetriatörést idéz elő és a gyöngyök mozgását eredményezi.

A modell szerint az Arp2/3 komplex aktivátorával bevont gyöngyök esetén a szimmetriatörés és a mozgás az alábbi szekvencia szerint következik be (9. ábra, 10. ábra).

(1) *gömbszimmetrikus aktin hálózat kialakulása* (9. ábra (1))

A funkcionális gyöngyfelszínen az aktin hálózat, mint egy burok egyenletesen, gömbszimmetrikusan alakul ki és növekszik a gyöngy körül. A gyöngyfelszínen újonnan keletkező aktin réteg deformálja a korábbi rétegeket (9. ábra (1)), a különböző árnyalatú piros színek az aktin rétegek keletkezési sorrendjét jelölik (sötét = új, világos = régi)). A deformáció következtében mechanikai feszültség ébred az aktin hálózatban (9. ábra (1)), kék nyíl = normál (radiális) feszültség, fekete nyíl = tangenciális (nyíró) feszültség).

(2) *az aktin hálózat spontán szimmetriatörése* (9. ábra (2))

Lokális inhomogenitás következtében az aktin réteg vastagsága csökkenhet. A tangenciális feszültség okán az aktin hálózat a külső felszínén lokálisan elvékonyodhat, „repedés” alakul ki, ami a gyöngy felszínéig terjed. Ez a szimmetriatörés kezdetét jelzi.

(3) *aszimmetrikus, csóvaszerű aktin hálózat kialakulása* (9. ábra (3))

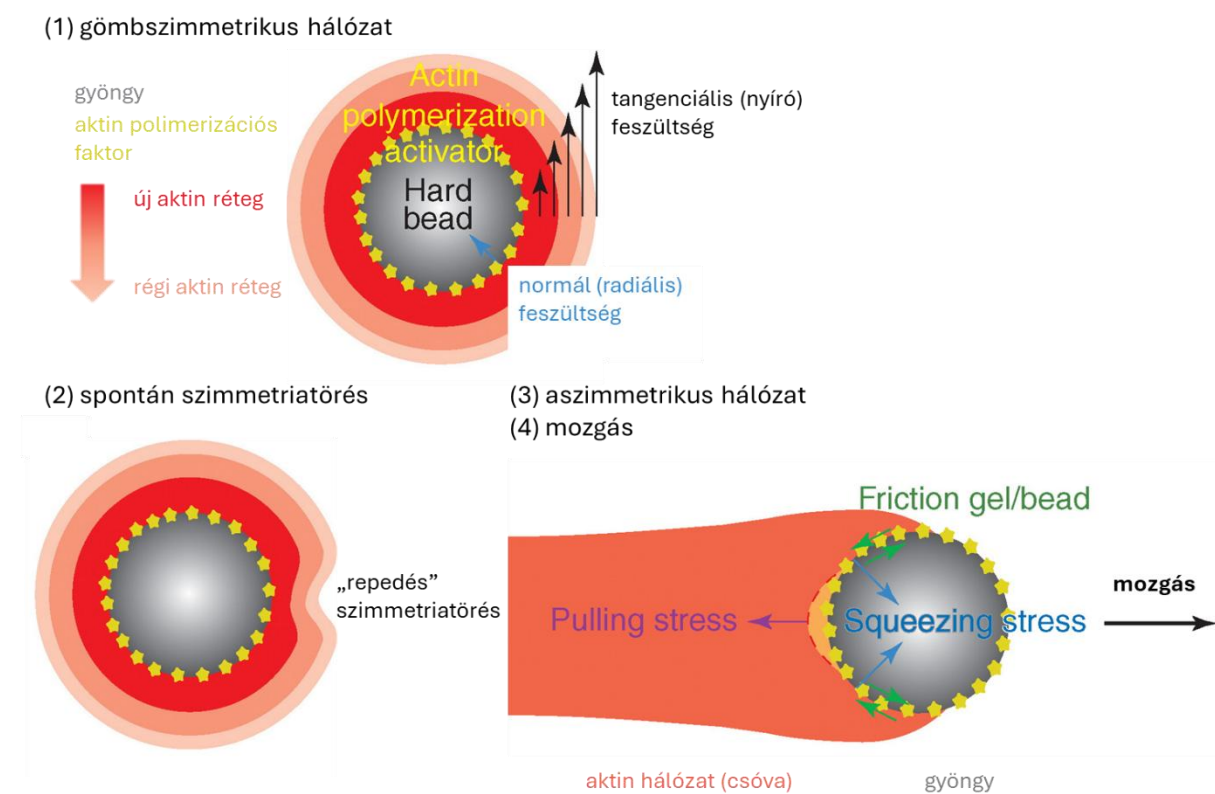
Az aktin gél spontán szimmetriatörése révén a hálózat aszimmetrikussá válik. A repedés következtében az aktin hálózat polarizálódik és egy csóvaszerű (üstökösszerű) struktúra alakul ki a gyöngy „repedéssel” átellenes oldalán.

(4) *a gyöngy mozgása* (9. ábra (4))

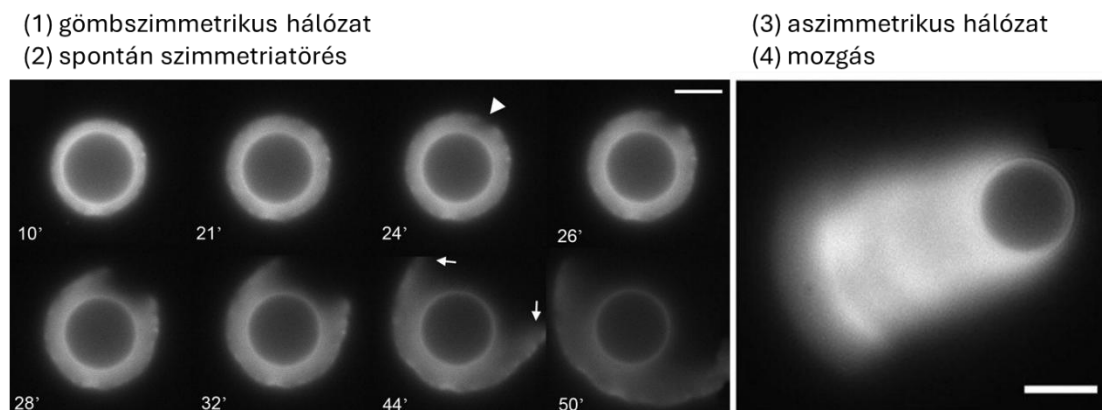
A gyöngy mozgását az aktin hálózatban, mint rugalmas gélben ébredő mechanikai feszültség és az aktin hálózat:gyöngyfelszín határfelületen fellépő súrlódás miatti erőhatások határozzák meg [80, 88].

Az NPF:Arp2/3 komplex rendszer sajátossága, hogy kölcsönhatása a nukleált filamentummal tranziens; az erő kifejtését a disszociált, szabad filamentumvég termikus fluktuációi által vezérelt növekedése biztosítja. Ebben a modellben a filamentum úgy növekszik, hogy a szöges vége szabadon fluktuál a gyöngyfelszín vagy a membrán közelében. A formin működési mechanizmusa ettől eltér: a formin egy filamentumvéggel lép kölcsönhatásba, és processzív tulajdonságának köszönhetően több monomerasszociációs és -disszociációs eseményen keresztül kapcsolatban marad azzal (processzív végkövető fehérje). A formin vezérelt polimerizációhoz kapcsolódó

erőkifejtést leíró modell részletes bemutatása megtalálható például az alábbi publikációkban: [89, 90].



9. ábra Az aktin hálózatban, mint elasztikus aktin gélben ébredő mechanikai feszültség és következményei: szimmetriatörés és gyöngymozgás – sematikus ábra. Az ábra a [79] publikáció a Figure 1. jelzésű ábrája alapján készült. A részletes magyarázatot a szövegben adtam meg.

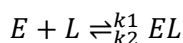


10. ábra Az aktin hálózatban, mint elasztikus aktin gélben ébredő mechanikai feszültség és következményei: szimmetriatörés és gyöngymozgás - biomimetikus modell, fluoreszcencia mikroszkópiai felvételek. (bal oldali panel) A gyöngyök által létrehozott aktin hálózat szimmetrikus, burokszerű megjelenése a gyöngy körül és a hálózat spontán szimmetriatörése (kezdeté $t = 24'$ -nál, nyíl jelzi). (jobb oldali panel) Az aktin hálózat aszimmetrikus, csóvaszerű megjelenése és a gyöngy egyenletes mozgása. Az ábra a [91] publikáció Figure 1. jelzésű ábrája alapján készült.

29. oldal, (5) egyenlet: Ez az egyenlet miből következik?

A dolgozat 5. egyenletét (29. oldal) a reverzibilis fehérje-ligandum kölcsönhatás modellje alapján származtattam. A levezetés során alkalmazott megfontolások megtalálható például a következő publikációkban: [92-95]. A lényegi pontokat az alábbiakban mutatom be. A mennyiségi elemzés során feltételeztem, hogy a jelölt fehérje fluoreszcencia intenzitása arányos a koncentrációjával.

A fehérje (E) és a ligandum (L) reverzibilis kötődését leíró reakcióséma és sebességi egyenlet:



$$\frac{d[EL]}{dt} = k_1[L][E] - k_2[EL]$$

Jelölések:

E: aktin, L: skTpm

k_1 : asszociációs sebességi állandó

k_2 : disszociációs sebességi állandó

t: idő

[]: moláris koncentráció

E, L: szabadállapotú fehérje/ligandum

EL: komplexben szereplő fehérje/ligandum

E_0 , L_0 : összes fehérje/ligandum

A $[EL](t)$ függvény a sebességi egyenlet, mint közönséges differenciálegyenlet megoldásaként áll elő, az alábbi megfontolások felhasználásával:

- A tömegmegmaradásra vonatkozó összefüggés szerint:
 $[E_0] = [E] + [EL]$
- Feltételezzük, hogy a fehérje koncentrációja ($[E_0]$) jóval kisebb, mint a ligandumé ($[L_0]$). Ezért a komplex képződése nem csökkenti jelentősen a szabad ligandum koncentrációját ($[L]$), nincs ligandum deplécio. A szabad ligandum koncentrációja jó közelítéssel azonosnak tekinthető a hozzáadott összes ligandum koncentrációjával [2, 76]: $[L_0] = [L] + [EL] \sim [L]$. Így $[L]$ -t időben állandónak tekintjük.
- A kezdeti feltétel szerint:
 $t = 0$ esetén $[EL](t) = 0$

$$[EL](t) = \frac{[E_0][L]k_1}{[L]k_1 + k_2} (1 - \exp(-([L]k_1 + k_2)t))$$

Vezessük be az $Y = \frac{[E_0][L]k_1}{[L]k_1 + k_2}$, $k_{obs} = [L]k_1 + k_2$ jelöléseket, a háttérfluoreszcencia korrekciójára vonatkozó y_0 offset tagot, valamint a $k_{obs} = \frac{\ln 2}{t_{1/2}} \sim \frac{1}{t_{1/2}}$ összefüggést ($t_{1/2}$: felezési idő [92, 95]).

A megoldás az alábbi alakban írható fel [95]:

$$[EL](t) = y_0 + Y \left(1 - \exp\left(-\frac{t}{t_{1/2}}\right) \right)$$

Az időt az aktin hálózat hosszán (l) keresztül mérve, a gyöngy egyenletes ($v = \text{állandó}$) mozgására vonatkozó kinematikai összefüggés szerint: $v = \frac{l}{t} \rightarrow l = vt$. Ennek alapján jutunk a dolgozatban használt összefüggéshez

$$[EL](l) = y_0 + Y \left(1 - \exp \left(-\frac{l}{l_{\frac{1}{2}}} \right) \right)$$

36-38. oldalak: Mindent megtudunk a formin fehérjecsaládról, csak azt nem, hogy mi az élettani szerepe, mit csinál, mi célt szolgál. Annyit azért megtudunk, hogy a forminok konzervatív FH1-FH2 modulja aktin polimerázként működik. De maga a formin mit csinál? Ugyanezt? Vagy mást is? Mindez bocsánatos lenne, ha arról értesülnénk, hogy esetleg erről nincs még információ, s éppen ebben a dolgozatban vizsgáljuk, hogy mi célt is szolgálhat. De ez sincs kijelentve. Honnan származik az a hipotézis, (valójában a dolgozatban ez egy hipotézis előtti kijelentés) hogy „A DAAM meghatározó szereppel bírhat az aktin sejtvez szabályozásában, azonban a fehérje ezen funkciójának fiziko-kémiai hátterét nem vizsgálták”

A hipotézisünket megalapozó tudományos eredmények elsősorban az együttműködő partnerünk, Mihály József kutatócsoportja (Szegedi Biológiai Kutatóközpont) által *Drosophila* modellrendszerben végzett *in vivo* vizsgálatokból származnak. A DAAM élettani szerepére vonatkozó ismereteket a dolgozat „A Dishevelled-associated activator of morphogenesis formin” fejezete (37-38. oldal) foglalja össze a dolgozat [132], [133], [135] és [142] számú irodalmi hivatkozásai alapján. Az *in vivo* vizsgálatok célja a DAAM kifejeződési mintázatának és funkcióinak genetikai módszerekkel történő feltérképezése volt. A dolgozatban hivatkozott publikációkat és azok főbb megállapításait az egyszerűbb követhetőség érdekében az alábbiakban is bemutatom.

	lokalizáció	funkció
[132] [142]	trachearendszer apikális aktin kötegek	a légcsőrendszer belső felszínét borító kutikula fejlődése; a kutikula bordamintázat kialakításához szükséges apikálisan elhelyezkedő aktin váz (aktin kábelek) kialakítása
[135]	szívizom, harántcsíkt izom szarkomerikus vékony filamentumok	szarkomerikus vékony filamentumok összeszerelődése; a filamentumok hosszának és rendezettségének kialakítása
[133]	központi idegrendszer aktin gazdag filopodialis nyúlványok	embrionális és felnőtt központi idegrendszeri axonok növekedése; a növekedési kúp perifériális régiójában elhelyezkedő filopodiumok képződése

[132]. Matussek, T., et al., *The Drosophila formin DAAM regulates the tracheal cuticle pattern through organizing the actin cytoskeleton*. Development, 2006. **133**(5): p. 957-66.

[133]. Matussek, T., et al., *Formin proteins of the DAAM subfamily play a role during axon growth*. J Neurosci, 2008. **28**(49): p. 13310-9.

[135]. Molnar, I., et al., *DAAM is required for thin filament formation and Sarcomerogenesis during muscle development in Drosophila*. PLoS Genet, 2014. **10**(2): p. e1004166.

[142]. Barkó, 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.

Az *in vivo* eredmények alapján egyértelmű, hogy a DAAM meghatározó az aktin sejtvez szabályozásában, ezt fogalmaztuk meg hipotézisünkben. Tekintettel arra, hogy ezt a fontos és biológiai szempontból érdekes fehérjét korábban nem, vagy csak korlátozottan jellemezték fiziko-kémiai szempontból, célul tűztük ki a DAAM és az aktin közötti kölcsönhatás molekuláris szintű jellemzését. A forminok *in vitro* sajátosságai mellett több esetben ismert a fehérjék klinikai relevanciája is (dolgozat 8. táblázat, 36. oldal). Az viszont nem tisztázott, hogy a forminok működése milyen molekuláris mechanizmusokon és útvonalakon keresztül kapcsolódik az egyes betegségekhez, ebben milyen szerepe van az aktinhoz kapcsolódó funkcióknak és az FH1-FH2 modulnak. A kérdéskör egy jelenleg kevésbé feltárt és vizsgált terület, ami egy különálló kutatási irány és tanulmány alapját jelentheti.

37. oldal: A 18. ábrán nem szerepel DAD jelű domén. A D jelű lenne az?

A séma egyébként annyira egyszerűsített, hogy a bíráló nem érti, hogyan aktiválódik a fehérje? Talán az „inaktív”-nak jelölt ábrarész két felrajzolt fragmentje a bal oldalukon hurokban összeér? De ha így lenne, miért nem így van rajzolva? S ha nem így van, akkor hogyan?

Az Opponens megjegyzése jogos. A 18. ábrán (37. oldal) a DAD doménnek a „D” jelű szakasz felel meg. Az ábraalírásból sajnos kimaradt a „D” jelölés magyarázata. A 18. ábrán nem volt céлом a Drf forminok szabályozására vonatkozó molekuláris részletek bemutatása, az ebben a tekintetben szándékosan egyszerűsített. Az Opponens észrevétele nyomán az alábbi kiegészítésben törekszem a Drf formin alcsalád aktivációs mechanizmusának részletesebb bemutatására.

Teljes hosszúságú Drf formin inaktív-aktív állapotának atomi felbontású szerkezete nem ismert. Ugyanakkor elérhető a teljes hosszúságú, inaktív mDia1 formin alacsony felbontású szerkezete (24 Å; [96]), valamint több izolált formin domén (pl. FH2, DID, DD, DAD) és komplexeik (pl. FH2:aktin, DID:DD:DAD) nagyfelbontású szerkezeti adatai is ismertek röntgendiffrakció és krio-elektronmikroszkópiai vizsgálatok alapján [97-100]. A Drf forminok inaktív-aktív állapotának szabályozására vonatkozó modell ezekre a szerkezeti adatokra épül.

(i) inaktív állapot: DID:DAD autoinhibíciós komplex

A Drf formin inaktív állapotát az N-terminális DID és a C-terminális DAD doménje közötti intramolekuláris kölcsönhatás tartja fent (11. ábra).

(ii) aktív állapot: Rho GTPáz-függő aktiváció

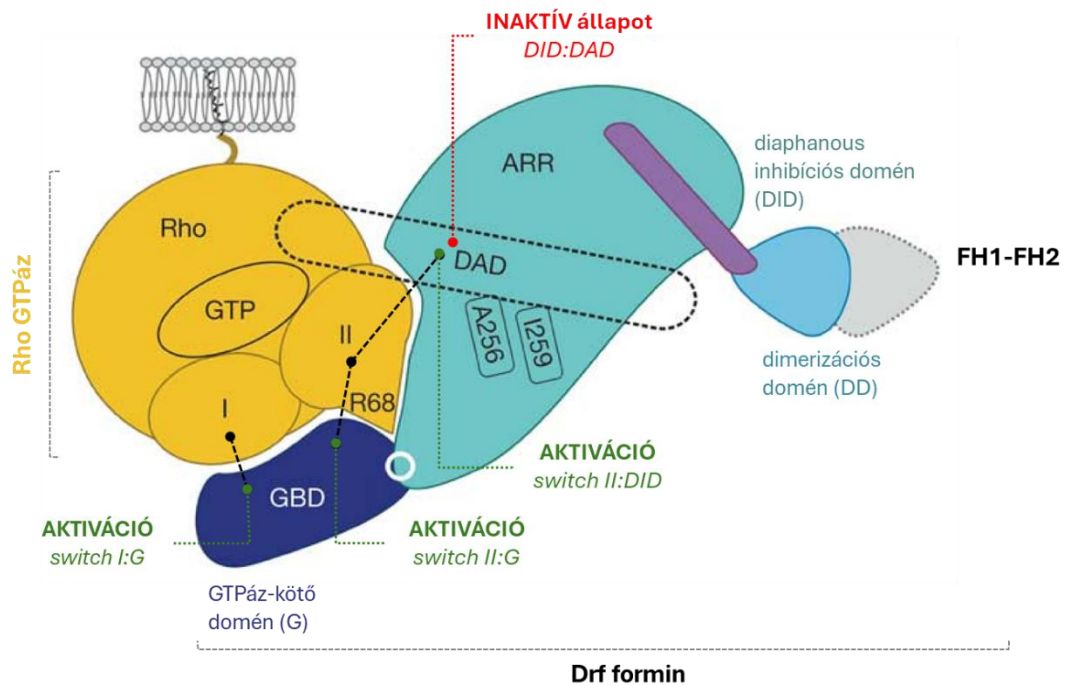
A Drf forminokat a Rho szupercsaládba tartozó kis GTPázok aktiválják ([101], a Rho GTPázokat és formin effektorait a publikáció Table I jelzésű táblázata mutatja be). Az aktiváció a Rho GTPáz és a formin N-terminálisa közötti intermolekuláris kölcsönhatás révén valósul meg (11. ábra). A Rho GTPáz *switch* I régiója a formin GTPáz-kötő doménjéhez, míg a *switch* II régió a GTPáz-kötő domén mellett a DID doménhez is kötődik. Az aktiváció kétlépcsős modellje szerint elsőként a Rho GTPáz kis affinitással kötődik a formin autoinhibíciós komplexhez a GTPáz-kötő doménen keresztül. A Rho GTPáz és a DAD domén kötőhelye részlegesen átfed a DID doménen. Így a Rho GTPáz kötése szterikusan ütközik a DAD-dal, ami a DAD disszociációját és a Rho GTPáz:formin affinitásának növekedését eredményezi.

Fontos megjegyezni, hogy a Rho GTPázok csak részlegesen aktiválják a forminokat, ami más celluláris faktorok szerepére hívja fel a figyelmet [96, 101, 102].

(iii) további szabályozási útvonalak

- Az anillin fehérje az mDia2 N-terminálisához kötődve gátolhatja annak DAD doménnel való kölcsönhatását, így a formin aktív állapotát stabilizálhatja [103].
- Az általunk is vizsgált Flightless-I az mDia1 és a DAAM C-terminális DAD doménjéhez kötődve befolyásolja a forminok aktivitását [104, 105].
- Az FH2 doménnel hat kölcsön a Dia-interacting protein 1 (DIP-1, [106]) és az általános formin kismolekula inhibitor az SMIFH2 (*small molecule inhibitor* FH2, [107]). A DIP és a SMIFH2 az aktivitás negatív szabályozóiként gátolják a formin közvetített aktin polimerizációt.

- A forminok funkcionális formája dimer. A forminok két ponton dimerizálódnak a formin homológia 2 (FH2:FH2) és a dimerizációs doménen (DD:DD) keresztül.



11. ábra A Drf forminok Rho GTPáz általi szabályozásának modellje. Az ábra a [99] publikáció Figure 4. jelölésű ábrája alapján készült. Az ábra magyarázatát a szövegben adtam meg. A modell az alábbi szerkezeti adatokon alapul: mDia1 N-terminális:DAD komplex (PDB 2F31 [100]), mDia1 N-terminális:aktív RhoC komplex (PDB 1Z2C [99]), mDia1 DID:DD komplex (PDB 2BNX [98]).

38. oldal: „Munkánk során a DAAM rekombináns úton előállított, natív, trunkált és mutációt hordozó fragmentumait vizsgáltuk *in vitro*.” Mi az a „trunkált fragmentum”??

A „trunkált” kifejezés az angol „truncated” szó fordításából ered. Az Opponens által kifogásolt „trunkált fragmentum” helyett szerencsésebb lett volna a magyar tudományos szakszókincshez jobban illeszkedő kifejezés, pl. a „csonkolt változat” vagy a „csonkolt forma” használata.

39. oldal: Mi az oka, hogy az FH1 fragmentumot önmagában nem vizsgálták meg, ha az FH2-t igen?

A DAAM izolált FH1 doménjének vizsgálata negatív kontrollként szolgálhatott volna a DAAM domének aktinnal való kölcsönhatásának feltérképezése során (FH1-FH2, FH1 és FH2 domének összehasonlítása), illetve közvetlen módon igazolhatta volna a profilinnal való interakciót. A projekt tervezésekor azonban – figyelembe véve az elérhető humán, pénzügyi és időbeli erőforrásokat – úgy döntöttünk, hogy ebbe az irányba nem indítjuk el a vizsgálatainkat. Az elvégzett kísérleteink alapján ezekre a kérdésekre közvetett módon vontunk le következtetéseket.

43. oldal: „Ugyanakkor eredményeink egyértelműen alátámasztják, hogy a DAAM DID és DAD-CT régiói egy viszonylag nagy affinitású ($KD \sim 1 \text{ nM}$ - 10 nM) kölcsönhatást alakítanak ki, ami az FH2 domén aktin aktivitásának negatív szabályozója, azaz igazolják a DAAM Drf természetét.” A 8. táblázatban a DAAM eleve Drf formának van definiálva. Szerencsésebb lenne az „igazolják” helyett a „megerősítik” kifejezést használni.

Az Opponens észrevételét elfogadom és egyetértek vele, pontosabb lett volna az „igazolják” helyett a „megerősítik” kifejezés használata. A dolgozat 8. táblázata (36. oldal) a humán formin fehérjékre vonatkozó irodalmi adatokat foglalja össze. A szekvenciahasonlóság és *in vivo* vizsgálatok alapján [108, 109] feltételezhető volt, hogy a *Drosophila* DAAM is Drf típusú formin. A DID és DAD domének közötti közvetlen kölcsönhatásra, valamint az affinitás meghatározására vonatkozóan a munkánkat [31] megelőzően nem álltak rendelkezésre kísérletes adatok az irodalomban.

46. oldal, 27. ábra: „A DAAM konstruktok aktin aktivitásainak összehasonlító vizsgálata: egyedi polimeren végzett TIRFM tanulmányok.” értelmetlen mondat. Mi az az „aktin aktivitás” ami a DAAM konstruktoknak van? Az aktin aktivitás az $\text{ATP} \rightarrow \text{ADP} + \text{Pi}$ reakció katalizálása (jelen dolgozat 8. oldal), ennek semmi köze a bíráló szerint a „DAAM konstruktokhoz”. A konstruktok helyett is jobb lenne egy magyar kifejezés! Talán jobb lenne: „A DAAM fragmentumok hatása az aktin polimerizációra” cím, vagy valami hasonló!

Az Opponens észrevételét elfogadom az „aktivitás” és „konstruktok” kifejezések használatára vonatkozóan. Az Opponens a bírálatában megjegyzi, hogy „...az aktivitás az egy foglalt kifejezés. Aktivitása katalizátoroknak van...”. Az „aktivitás” kifejezés a biológiai és biokémiai kontextusban olyan összefüggésekben használatos, mint például „enzimaktivitás”, „katalitikus aktivitás” vagy „ATPáz aktivitás” [2]. A DAAM esetében az „aktin aktivitás” kifejezés a fehérjének a filamentumok képződésére (*de novo* nukleáció) és növekedésére (elongáció) kifejtett hatására vonatkozik [110]. A „konstrukt” helyett a magyar szakszókincshez való illeszkedés miatt helyesebb lett volna a „fragmentum” használata.

46. oldal: „Az α/β heterodimer sapkafehérje (capping protein, CP) nagy affinitással ($K_D \sim 0.1-1$ nM) kötődik a filamentumvégekhez és gátolja az alegységek asszociációját és disszociációját [151].” Ez a capping protein mindkét véget egyformán zárja le? A megadott [151]-es hivatkozásban ugyanis csak a szöges vég lezárását írják, ezért a bíráló véleménye szerint inkább csak a polimerizációt gátolja.

Egyébként milyen alegységekről esik itt szó?

Az α/β heterodimer sapkafehérje (capping protein, CP) az aktin filamentumok szöges végét zárja le, a hegyes véghez nem kötődik. A hegyes véget (specifikusan) kötő sapkafehérje a tropomodulin (Tmod) [111]. A sapkafehérje a szöges véghez való kötődése révén gátolja a monomerek asszociációját és disszociációját is. A dolgozat [151] számú irodalmi hivatkozása szerint: „Capping protein (CP), a ubiquitous α/β heterodimer in eukaryotes, tightly caps ($K_d \sim 0.1-1$ nM) the barbed end of the actin filament (the end favored for polymerization), preventing actin subunit addition and loss [2]” [112], továbbá: „Capping protein (CP) binds the fast growing barbed end of the actin filament and regulates actin assembly by blocking the addition and loss of actin subunits” [113].

(lásd a jelen dokumentum 4. oldala)

Az „alegység” kifejezés az F-aktinban lévő G-aktinra vonatkozik. Az „alegység” használatára vonatkozó kérdés az Opponens egy korábbi megjegyzésében is felmerül. Az egyszerűség kedvéért a választ ott adom meg mindkét kérdésre.

66. oldal: „A Flightless-I aktin kölcsönhatása és aktivitása kalciumfüggetlen és a GH13 doménekhez köthető”. A GH13 jelölés (és a GH16, GH46 jelölések is) a GH1 GH2, stb. jelölések után félrevezető. Célszerűbb lett volna a GH(1-3).

Az irodalomban a gelsolin homológ domének jelölésére nincs konszenzusos rendszer, többféle rövidítés is előfordul (pl. G, GH, GLD). A teljesség igénye nélkül néhány példát felsoroltam az alábbiakban. Az egységes jelölés hiányában a dolgozatban a munkacsoportunk által használt, a publikációinkban is követett elnevezéseket alkalmaztam. A dolgozat 40. ábrája (66. oldal) egyértelműen definiálja a GH16, GH13 és GH46 jelöléseket a Fli-I GH doménjeinek vonatkozásában.

jelölés	irodalmi hivatkozás
G1-G3	[6, 114, 115]
G4-6	[116]
GH1-GH3	[117]
GH1-3	[104, 118]
GLD	[119, 120]

66. oldal 40. ábra: A HsGSN miért van balra kizárva az ábra tetején? Nem jobbra kellene, hogy fedésben legyen a DmFLI-1-el? Az aminosav szekvencia is ezt sugallja, mert GSN szekvenciák 1-től, az FLI szekvenciák meg 460-470 között kezdődnek. Mi az „Mm” jelölés és ez a szekvencia miért került be az analízisbe? Az ábraaláírás szinte olvashatatlan a sok rövidítés és zárójelezés miatt. Talán táblázatos formában olvashatóbb lenne. Több jelölés feloldása nem szerepel az ábraaláírásban.

Az Opponens formai észrevételét elfogadom, szerencsésebb lett volna a *Hs* GSN és a *Dm* Flightless-I doménszerkezetének ábrázolását úgy igazítani, hogy a gelsolin homológ doméneket tartalmazó szakaszok kezdőpozíciója egymáshoz illeszkedjen.

Az „Mm” rövidítés a *Mus musculus*-ra (házi egér) utal. A dolgozat 40. ábrájának (66. oldal) aláírásából ennek a rövidítésnek a magyarázata sajnos kimaradt. Ugyanakkor a rövidítések jegyzékében (105. oldal) megtalálható. A munkánk során a Flightless-I fehérje *Drosophila* változatát vizsgáltuk. A humán fehérjével való hasonlóságok és különbségek elemzése logikusan adódik. Az egér Flightless-I fehérjét kísérletesen nem vizsgáltuk. Ugyanakkor az irodalomban több olyan tanulmány is elérhető, ami egér modellben vizsgálja a Flightless-I szerepét például a sebgyógyulásban és kapcsolódó kórképekben (epidermolízis bullóza) [121-124]. Ezért tartottuk relevánsnak az egér fehérjét is bevonni az összehasonlító elemzésbe.

70. oldal: „A pirén aktin alapú kinetikai vizsgálatainkban a Fli-I viszonylag nagy koncentrációban ($[FliI] > \sim 100 \text{ nM}$) elősegítette a polimerizációt. Ez kisebb affinitású kölcsönhatást feltételez, aminek funkcionális kimenetele a filamentumok fragmentációja (severing) és/vagy a de novo nukleáció lehet.” Ez az okfejtés így nem érthető. Mi az ami „kisebb affinitású kölcsönhatást” feltételez? Az, hogy az Fli-I elősegítette a polimerizációt? Akkor miért fragmentálódna a filamentum? Nem arról van szó, hogy mivel CSAK nagy koncentrációban segítette elő a polimerizációt ezért kicsi az affinitás? (Egyébként minél „kisebb” az az affinitás?) S mit jelent a „funkcionális kimenetele” kifejezés? Minek a funkciójáról van itt szó? S a „kisebb affinitásból” miért következik a fragmentáció és/vagy a de novo nukleáció?? Arról már nem is beszélve, hogy mit jelent a „pirén aktin alapú” kifejezés, de ehhez a trehány kifejezéshez az olvasó eddig jutva a dolgozatban talán már hozzászólt, s tudja, mit akar ezen érteni a szerző, holott mint kifejezésnek nincs sok értelme.

A dolgozat „A Flightless-I multifunkcionális sajátosságokkal bír az aktin dinamika szabályozásában”, „A Flightless-I gátolja az aktin filamentumok szöges vég növekedését: sapkázó (*capping*) aktivitás” és „A Flightless-I elősegíti a nukleációs intermedierek kialakulását: *de novo* nukleációs aktivitás” fejezetei (68-71. oldal) egy gondolatmenetet részét képezik, így egy tematikai egységet alkotnak. Az első fejezet bemutatja a *bulk* filamentum sokaságon végzett fluoreszcencia spektroszkópai méréseinket, amik rámutatnak a Flightless-I kétfázisú hatására. Az ezt követő két fejezet ennek nyomán, az egyedi filamentumokon végzett TIRFM kísérletek eredményeit tárgyalja, amelyek célja a Flightless-I kétfázisú hatásának hátterében álló aktivitások azonosítása volt.

Az Opponens által kiemelt mondat a második fejezetben található, annak értelmezése a megelőző és követő részek kontextusában válik teljessé. Az opponensi észrevételt ugyanakkor elfogadom; a hivatkozott fejezet részletesebb kifejtése jobban szolgálhatta volna az olvasó számára a gondolatmenet követhetőségét. Ennek megfelelően az alábbi kiegészítéseket teszem az okfejtés részletesebb bemutatására.

A dolgozatban bemutatott *bulk* filamentum sokaságon végzett fluoreszcencia spektroszkópai méréseink alapján (42. ábra, 68. oldal) „a Fli-I GH16/GH13 hatása kétfázisú: alacsonyabb koncentráción ($[Fli-I] < 10 \text{ nM}$) a polimerizáció gátlása, míg magasabb koncentráción ($[Fli-I] > 25 \text{ nM}$) annak elősegítése volt megfigyelhető”. Az affinitások közötti relációra a koncentrációtartományok összehasonlítása alapján következtettünk: a polimerizáció gátlását eredményező Flightless-I:aktin kölcsönhatás nagyobb affinitású, míg a polimerizáció fokozását eredményező Flightless-I:aktin kölcsönhatás kisebb affinitású. A Flightless-I az aktin monomerekhez és filamentumokhoz is kötődhet, a kölcsönhatás függvényében a polimerizációt gátló/elősegítő hatás hátterében különböző aktivitások állnak. Ezekre utal a „funkcionális kimenetele” kifejezés. Az aktinkötő fehérjék aktin kölcsönhatásait és a kapcsolódó aktivitásokat az alábbi táblázatban foglaltam össze (1. táblázat) a [125] publikációban megjelent saját készítésű Figure 1. jelölésű ábra alapján.

aktin kölsönhatás	hatás a polimerizációra	aktivitás	megjegyzés a spontán polimerizációhoz képest
G-aktin	pozitív elősegítő	<i>de novo</i> nukleáció	a filamentumok képződésének elősegítése révén több elongációra képes filamentum keletkezik [F]↑
F-aktin oldalkötés		fragmentáció <i>severing</i>	a filamentumok darabolása révén több elongációra képes filamentum keletkezik [F]↑
G-aktin	negatív gátló	szekvesztráció	a monomer kötése révén annak filamentumba épülése gátolt [A]↓
F-aktin végekötés		sapkázás <i>capping</i>	a filamentumvég kötése révén a monomerek filamentumba épülése gátolt [F]↓

1. táblázat Az aktinkötő fehérjék aktin kölcsönhatásai és a kapcsolódó aktivitások. A *bulk* filamentum sokaságon végzett mérésekben a polimerizációs sebesség az alábbi összefüggés szerint adódik. A dolgozat 12. egyenlete (86. oldal) az összefüggés egy filamentumra vonatkozó változata.

$$v = k_+[A][F] - k_-[F]$$

[A]: G-aktin koncentráció

[F]: filamentumvég koncentráció

k_+ : asszociációs sebességi állandó

k_- : disszociációs sebességi állandó

A „pirén aktin alapú” kifejezés olyan kísérletet jelöl, amiben az N-(1-pirén)-jódacetamiddal jelölt aktin fluoreszcencia emissziójának időbeli változása alapján vizsgáltuk az aktin és az aktinkötő fehérjék kölcsönhatásait. A kifejezés használatának célja a technikai részletek egyszerűsített megjelölése volt. Az irodalomban ugyanakkor nincs egységes terminológia, többféle elnevezés is előfordul. A dolgozat „Kinetikai vizsgálatok” részében (84-85. oldal) részletesen bemutatom a módszertan háttérét és a kísérleti megfontolásokat. Ezek segítik és támogatják a használt kifejezés értelmezését. Természetesen más rövid jelölés/megnevezés is alkalmazható lett volna.

70. oldal, 44. ábra: A $t=-1$ és $t=5$ kettéosztás, jelölés zavaró, mert nem érthető. A $t=-1$ egyszerűen a kontrollt jelöli, a $t=5$ pedig magát a hatást, amit a GSN, illetve az Fli-I fragmentumok hozzáadása után 5 perccel mértek. Miért kell ennyire bonyolultan jelölni?

A bulk és a TIRF mérésekben az aktin koncentrációk között 10-szeres különbség van, ugyanakkor a többi koncentráció azonos. A steady-state mérésben viszont az aktin a bulkhoz képest 400-szoros, az Fli-I pedig ~8-szoros mennyiségben van jelen. Tehát az aktin/Fli-I arány minden mérésben más. Miért lehet ezeket mégis összehasonlítani?

A dolgozat 44. ábrája (70. oldal) a publikációnkban közölt ábra alapján készült (a dolgozat [194] számú irodalmi hivatkozásának Figure 6. D jelölésű ábrája).

Az ábrán bemutatott kísérletekben két kontroll körülmény is értelmezhető:

- (i) a „ $t = -1$ ” jelölésű: a filamentumok szétszerelődésének indukálása előtti állapot,
- (ii) az „aktin” jelölésű: a GSN/Flightless-I fehérjét tartalmazó puffer hozzáadása után 5 perccel fennálló állapot.

A két kontroll egyértelmű megkülönböztetése érdekében az ábra jelöléseiben az időpontokat is feltüntettük. Természetesen más, szintén egyértelmű jelölési mód is alkalmazható lett volna.

A dolgozat 44. ábráján (70. oldal) bemutatott mérésekben a Flightless-I hatását vizsgáltuk a filamentumok szétszerelődésére *bulk* fluoreszcencia spektroszkópai és TIRFM kísérletekben (fragmentáció vizsgálata), illetve a filamentumok egyensúlyi számát határoztuk meg TIRFM mérésekben (*de novo* nukleáció vizsgálata). A kísérletekben alkalmazott fehérjekoncentráció megválasztásánál több szempontot vettünk figyelembe:

- (i) a szétszerelődés vizsgálatához a filamentumokat a szöges vég kritikus koncentrációja alá kell hígítani,
- (ii) ha a Flightless-I rendelkezik fragmentáló aktivitással, az magasabb Flightless-I koncentrációkon ($[Fli-I] > 25 \text{ nM}$) várható (dolgozat, 42. ábra, 68. oldal),
- (iii) ha a Flightless-I rendelkezik nukleációs aktivitással az monomerkötést feltételez, a Fli-I:G-aktin komplex disszociációs egyensúlyi állandója $K_d \sim 500\text{-}600 \text{ nM}$ (dolgozat, 41. ábra, 67. oldal).

Az aktin:Fli-I arány a kísérletekben eltérő volt. Ez egyrészt a vizsgálati módszertanok és vizsgált aktivitások különbözőségéből adódott, másrészt abból, hogy a kísérletek kvalitatív jellegűek voltak. Célunk a Flightless-I fragmentációt és nukleációt elősegítő hatásainak kimutatása volt, nem törekedtünk a különböző aktivitások kvantitatív összehasonlítására.

71. oldal: „Az aktin polimerizáció kompetens formája intracelluláris környezetben a G-aktin profilinnal alkotott komplexe.” Mit jelent az, hogy „kompetens formája”?

A „kompetens forma” kifejezés az aktin olyan formájára utal, ami képes polimerizációra, filamentumokba szerveződni. A kifejezést az angol nyelvű szakirodalomban használt „polymerization competent” magyar megfelelőjeként használtam [126]. A sejtekben a nem polimerizált aktin koncentrációja megközelítőleg 25-100 μM [3], ami nagyságrendekkel meghaladja a kritikus koncentrációt ($c_c \sim 0.1\text{-}0.6 \mu\text{M}$, [1]. Ez a polimerizációnak kedvező körülmény kontroll nélküli, filamentumképződéshez vezet, ami az aktin sejtvázs szerveződése és a sejt működése szempontjából nem célravezető. Az intracelluláris környezetben a filamentumok összeszerelődésének térbeli és időbeli szabályozása kell megvalósuljon. A szabályozást egyrészt aktin monomerkötő fehérjék biztosítják [3, 28]. Meghatározó ebben a profilin és a thymosin- $\beta 4$ (T $\beta 4$) fehérje, amelyek viszonylag nagy mennyiségben fordulnak elő ($\sim 100 \mu\text{M}$) és G-aktin affinitásuk nagyságrendje $K_d \sim 0.1\text{-}1 \mu\text{M}$ [3]. A sejt aktin monomer készletének jelentős része a profilin vagy a T $\beta 4$ fehérjével alkot komplexet. A T $\beta 4$ szekvesztrálja a G-aktint, azaz gátolja a monomerek filamentumba szerveződését. A profilin gátolja a nukleációt és a monomerek hegyes végen történő filamentumba épülését, ugyanakkor támogatja azok szöges végen történő asszociációját. Ilyen módon a profilin:G-aktin komplex polimerizációra képes és az *in vivo* összeszerelődésben az aktin meghatározó formájának tekinthető [3, 28, 102, 127].

84. oldal: „A mérések során a pirén jelölt aktin a teljes aktin koncentrációjának 2-5% (összeszerelődés), illetve 50% (szétszerelődés) volt, ami nem befolyásolta szignifikánsan a filamentumok spontán össze-, és szétszerelődésének kinetikáját.” Honnan lehet tudni, hogy a kinetikát nem befolyásolta?

A fluoreszcencia spektroszkópai kísérletekben a pirén jelölt aktin mennyiségének beállítása az általunk végzett kontroll mérések és irodalmi adatok alapján történt. A kinetikai méréseinkben a pirén jelölt aktin aránya az *in vitro* aktin kutatással foglalkozó laborok esetén rutinszerűen alkalmazott körülménynek felelnek meg [128-130]. A jelölt aktin arányának validálását az alábbiak szerint végezhetjük el.

(i) bulk filamentum sokaságon történő mérések, fluoreszcencia spektroszkópai kísérletek

A jelöletlen aktin össze-, és szétszerelődésének kinetikája fényszórásméréssel követhető nyomon [27, 129] és összevethető a különböző koncentrációjú pirén jelölt aktint tartalmazó minták mérési adataival. A monomerek filamentumba épülését jellemző asszociációs sebességi állandó ($k_+^{szöges\ vég}$, $k_+^{hegyes\ vég}$) fluoreszcencia spektroszkópai kísérletekben meghatározható a szöges vég kötő gelsolin fehérje (gelsolin:aktin seed $\rightarrow k_+^{hegyes\ vég}$) vagy a hegyes vég kötő spektrin fehérje (spektrin:aktin seed $\rightarrow k_+^{szöges\ vég}$) alkalmazásával. A különböző koncentrációjú pirén jelölt aktint tartalmazó minták esetén meghatározott k_+ értéket az irodalmi adatokkal vetjük össze (dolgozat, 3. táblázat, 9. oldal). Példaként hivatkozom az általam végzett és publikált kísérleteket: Figure 3. C, D és Figure 4. C, D jelölésű ábrák, Table 1. jelölésű táblázat a [131] publikációban.

(ii) egyedi aktin filamentumokon történő mérések, TIRFM kísérletek

Az egyedi aktin filamentumok növekedésének, hosszváltozásának alapján meghatározható a monomerek filamentumba épülését jellemző asszociációs sebességi állandó ($k_+^{szöges\ vég}$). A szükséges megfontolásokat a dolgozat „Az aktin filamentumok de novo nukleációjának és elongációjának vizsgálata” fejezete (86. oldal, 12. egyenlet) mutatja be. A különböző koncentrációjú pirén jelölt aktint tartalmazó minták esetén meghatározott k_+ értéket az irodalmi adatokkal vetjük össze (dolgozat, 3. táblázat, 9. oldal). Példaként hivatkozom a dolgozatban bemutatott vizsgálatokat: 21. ábra, 40. oldal és 43. ábra, 69. oldal.

84. oldal: „A G-aktin (2.5 μ M, 2-5% pirén jelölt) polimerizációját 1 mM MgCl₂ és 50 mM KCl hozzáadásával indukáltuk.” Ez azt jelenti, hogy a fluoreszcencia mérésekben a t=0 a sók hozzáadása volt? Eddig erről nem esett szó, a 9. oldalon éppen ellenkezőleg azt olvastuk, hogy: „Az aktin sejtmintes környezetben és aktinkötő fehérjék hiányában is képes filamentumokba és filamentumokból álló magasabb rendű struktúrákba szerveződni (3. ábra).” Sóról, sókról nem esik szó! Ha így van, akkor minek kellene a sók?

Az Opponens által hivatkozott mondat „Az aktin sejtmintes környezetben és aktinkötő fehérjék hiányában is képes filamentumokba és filamentumokból álló magasabb rendű struktúrákba szerveződni (3. ábra).” „Az aktin önszerveződésének mechanizmusai” fejezet (9. oldal) bevezető mondata. A következő mondat utal a sók szerepére: „Az aktin filamentumok kialakulása megfelelő biokémiai környezetben (pl. ionerősség, aktin koncentráció) spontán módon végbemegy.” A sók szerepének részletesebb kifejtése nem volt célom a dolgozatban. Az opponensi észrevétel nyomán az alábbi kiegészítést teszem a kérdéskör kapcsán; példaként kiváló összefoglaló tanulmányokat hivatkozok: [29, 132, 133].

Az ionok, sók szerepe sokrétű az aktin szerkezeti és funkcionális tulajdonságainak kialakításában. Az aktin többféle kationkötőhely-típussal rendelkezik, amik széles affinitástartományt fednek le ($K_d \sim 10^{-9}$ – 10^{-3} M). A dolgozat tárgyalja („1. G-aktin” fejezet, 7. oldal), hogy ezek közül egy nagy affinitású ($K_d \sim 10^{-9}$ M) kétértékű kationkötőhely, amit *in vitro* rendszerint Ca²⁺, *in vivo* pedig Mg²⁺ foglal el a kötött nukleotidhoz kapcsolódva. Emellett az aktinon több kisebb affinitású kötőhely is található, amiket mono- vagy divalens kationok (pl. Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺) foglalhatnak el. Az aktin által kötött kationok típusa és a kötőhelyek telítettsége hatással van az aktin szerkezetére és mechanikai tulajdonságaira (pl. perzisztenciahossz), a polimerizációs sajátságaira (pl. kritikus koncentráció), valamint az aktinkötő fehérjékkel való kölcsönhatásaira.

Az aktin kritikus koncentrációja függ a nagy affinitású kötőhely által kötött kétértékű kationtól és a kisebb affinitású kötőhelyek telítettségétől is. Ennek megfelelően az aktin polimerizációját befolyásolja az oldatban jelen lévő ionok típusa és koncentrációja. A sók csökkentik a kritikus koncentrációt, ezáltal segítik elő a filamentumképződést. Az irodalom ezt monomer aktivációnak nevezi [133], aminek hátterében az alábbi mechanizmusok állhatnak:

- (i) a monomer felszíni töltéseinek semlegesítése, ami révén csökken a monomerek közötti elektrosztatikus taszítás,
- (ii) a monomer konformációs változásainak előidézése, ami révén a filamentumnak megfelelő szerkezethez közelebbi állapotba kerül a molekula.

Az aktin polimerizációját jellemzően 1 mM MgCl₂ és 50-100 mM KCl/NaCl hozzáadásával indukáljuk, ami az *in vitro* aktin kutatással foglalkozó laborok esetén rutinszerűen alkalmazott körülménynek felel meg [128, 130]. A filamentumok össze-, és szétszerelődését jellemző sebességi állandók és kritikus koncentráció értékei is ennek megfelelően vannak megadva (dolgozat, 3. táblázat, 9. oldal).

Az aktin filamentumok összeszerelődésének fluoreszcencia spektroszkópai vizsgálata során a G-aktint tartalmazó mintához adtuk a polimerizációt indukáló oldatot (összetételét lásd a dolgozat 78. oldalán) egy lépésben egy Eppendorf-csőben. A hígítást követően a teljes térfogatot pipettával átvittük a méréshez használt küvettába, majd a küvettát a műszerbe helyeztük. Ez a folyamat

jellemzően néhány másodpercet vett igénybe. A $t = 0$ időpontot a minta fluoreszcencia emissziójának mérésének megkezdése definiálta. A műszer beállításai szerint az adatgyűjtést már a küvetta (minta) műszerbe helyezése előtt elindítottuk, így a küvetta (minta) behelyezését követően azonnal követni tudtuk a jelet. A kísérleti körülményeket (pl. fehérjekoncentráció) úgy választottuk meg, hogy a vizsgált folyamat kinetikáját tekintve a mérés technikai kivitelezése – beleértve a minta átvitelét és a küvetta behelyezését – ne eredményezzen érdemi adatvesztést. A reakció kezdeti szakasza a mérés indításának időpontjától megbízhatóan követhető volt.

85. oldal: „(a $t = 0$ s időpillanatban mért emisszió értékével)” Mi definiálta a $t = 0$ időpillanatot?

Az aktin filamentumok szétszerelődésének fluoreszcencia spektroszkópai vizsgálata során az F-aktint tartalmazó mintát F pufferrel hígítottuk egy Eppendorf-csőben (az F puffer összetételét lásd a dolgozat 78. oldalán.). A hígítást követően a teljes térfogatot pipettával átvittük a méréshez használt küvetta, majd a küvetta a műszerbe helyeztük. Ez a folyamat jellemzően néhány másodpercet vett igénybe. A $t = 0$ időpontot a minta fluoreszcencia emissziójának mérésének megkezdése definiálta. A műszer beállításai szerint az adatgyűjtést már a küvetta (minta) műszerbe helyezése előtt elindítottuk, így a küvetta (minta) behelyezését követően azonnal követni tudtuk a jelet. A kísérleti körülményeket (pl. fehérjekoncentráció) úgy választottuk meg, hogy a vizsgált folyamat kinetikáját tekintve a mérés technikai kivitelezése – beleértve a minta átvitelét és a küvetta behelyezését – ne eredményezzen érdemi adatvesztést. A reakció kezdeti szakasza a mérés indításának időpontjától megbízhatóan követhető volt.

85. oldal: „A minta F-aktint ($7\mu\text{M}$, 10% TAMRA jelölt),” Mit jelent itt a $7\mu\text{M}$ érték? Mi lenne az F-aktin molekulatömege? Eddig nem esett szó arról, hogy a polimernek meghatározott monomerszáma, s így konkrét molekulatömege lenne.

A $7\mu\text{M}$ az aktin koncentrációját jelöli monomer formára vonatkoztatva. Az F-aktint tartalmazó mintákat G-aktin polimerizációjával állítottuk elő. Ennek részleteit a dolgozat „Általános kísérleti körülmények” fejezete (78. oldal) ismerteti. A G-aktin koncentrációját UV-Vis abszorpciós fotometria segítségével határoztuk meg az aminosav-összetétel alapján számított extinkciós koefficiens ($\epsilon_{280\text{ nm}} = 1.11\text{ ml}\times\text{mg}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{290\text{ nm}} = 0.63\text{ ml}\times\text{mg}^{-1}\text{cm}^{-1}$) és molekulatömeg (42.3 kDa) alapján ([Expasy Protparam](https://www.expasy.org/resources/protparam)⁵). A filamentumokat alkotó monomerek számát és a filamentum molekulatömegét nem határoztuk meg. Nehézséget jelentene, hogy a filamentumok hossza nem azonos. Amennyiben ilyen adatra lenne szükség, becslést lehetne végezni például a filamentumok hosszeloszlása alapján, felhasználva azt, hogy $1\mu\text{m}$ -nyi filamentum körülbelül 370 monomert tartalmaz (dolgozat, „Az aktin filamentumok *de novo* nukleációjának és elongációjának vizsgálata” fejezet, 86. oldal).

⁵ <https://www.expasy.org/resources/protparam>

Irodalomjegyzék

1. Pollard, T.D., *Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 2007. **36**: p. 451-77.
2. Nyitrai, L. and G. Pál, *A biokémia és molekuláris biológia alapjai*. 2013.
3. Pollard, T.D., *Actin and Actin-Binding Proteins*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2016. **8**(8).
4. Blanchoin, L., et al., *Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility*. Physiol Rev, 2014. **94**(1): p. 235-63.
5. Bugyi, B. and M.F. Carlier, *Control of actin filament treadmilling in cell motility*. Annu Rev Biophys, 2010. **39**: p. 449-70.
6. Nag, S., et al., *Gelsolin: the tail of a molecular gymnast*. Cytoskeleton (Hoboken), 2013. **70**(7): p. 360-84.
7. Feuer, G., F. Molnar, and et al., *Studies on the composition and polymerization of actin*. Hung Acta Physiol, 1948. **1**(4-5): p. 150-63.
8. Straub, F.B. and G. Feuer, *Adenosinetriphosphate the functional group of actin*. Biochimica et Biophysica Acta, 1950. **4**: p. 455-470.
9. Jégou, A., et al., *Individual Actin Filaments in a Microfluidic Flow Reveal the Mechanism of ATP Hydrolysis and Give Insight Into the Properties of Profilin*. PLOS Biology, 2011. **9**(9): p. e1001161.
10. Merino, F., et al., *Structural transitions of F-actin upon ATP hydrolysis at near-atomic resolution revealed by cryo-EM*. Nat Struct Mol Biol, 2018. **25**(6): p. 528-537.
11. Kanematsu, Y., et al., *Structures and mechanisms of actin ATP hydrolysis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2022. **119**(43): p. e2122641119.
12. Oda, T., et al., *The nature of the globular- to fibrous-actin transition*. Nature, 2009. **457**(7228): p. 441-5.
13. Chou, S.Z. and T.D. Pollard, *Mechanism of actin polymerization revealed by cryo-EM structures of actin filaments with three different bound nucleotides*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019. **116**(10): p. 4265-4274.
14. Merino, F., S. Pospich, and S. Raunser, *Towards a structural understanding of the remodeling of the actin cytoskeleton*. Semin Cell Dev Biol, 2020. **102**: p. 51-64.
15. Rould, M.A., et al., *Crystal Structures of Expressed Non-polymerizable Monomeric Actin in the ADP and ATP States**. Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(42): p. 31909-31919.
16. McCullagh, M., M.G. Saunders, and G.A. Voth, *Unraveling the mystery of ATP hydrolysis in actin filaments*. J Am Chem Soc, 2014. **136**(37): p. 13053-8.
17. Blanchoin, L. and T.D. Pollard, *Hydrolysis of ATP by polymerized actin depends on the bound divalent cation but not profilin*. Biochemistry, 2002. **41**(2): p. 597-602.
18. Guo, K., J. Shillcock, and R. Lipowsky, *Treadmilling of actin filaments via Brownian dynamics simulations*. J Chem Phys, 2010. **133**(15): p. 155105.
19. Li, X., J. Kierfeld, and R. Lipowsky, *Actin polymerization and depolymerization coupled to cooperative hydrolysis*. Phys Rev Lett, 2009. **103**(4): p. 048102.
20. Lantos, E., *Autokatalitikus reakcióháló bioinspirált rendszerekben*. 2023.
21. Pankotai-Bodó, G., *A hidrogenáz enzim autokatalitikus működésének vizsgálata*. 2009.
22. Sept, D. and J.A. McCammon, *Thermodynamics and kinetics of actin filament nucleation*. Biophys J, 2001. **81**(2): p. 667-74.
23. Kudryashov, D.S., et al., *The crystal structure of a cross-linked actin dimer suggests a detailed molecular interface in F-actin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(37): p. 13105-10.
24. Mockrin, C.S. and D.E. Korn, *Isolation and characterization of covalently cross-linked actin dimer*. Journal of Biological Chemistry, 1981. **256**(15): p. 8228-8233.
25. Oosawa, F. and S. Asakura, *Theory of polymerization equilibrium*. In *Thermodynamics of the polymerization of proteins.*, in *Thermodynamics of the Polymerization of Proteins*. 1975.
26. Korn, E.D., M.F. Carlier, and D. Pantaloni, *Actin polymerization and ATP hydrolysis*. Science, 1987. **238**(4827): p. 638-44.

27. Wegner, A., *Head to tail polymerization of actin*. Journal of Molecular Biology, 1976. **108**(1): p. 139-150.
28. Carrier, M.F. and S. Shekhar, *Global treadmilling coordinates actin turnover and controls the size of actin networks*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2017. **18**(6): p. 389-401.
29. Kang, H., et al., *Regulation of actin by ion-linked equilibria*. Biophys J, 2013. **105**(12): p. 2621-8.
30. Bindschadler, M., et al., *A mechanistic model of the actin cycle*. Biophys J, 2004. **86**(5): p. 2720-39.
31. 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.
32. Tóth, M.A., et al., *Biochemical activities of the Wiskott-Aldrich syndrome homology region 2 domains of sarcomere length short (SALS) protein*. J Biol Chem, 2016. **291**(2): p. 667-80.
33. Boiero Sanders, M., A. Antkowiak, and A. Michelot, *Diversity from similarity: cellular strategies for assigning particular identities to actin filaments and networks*. Open Biol, 2020. **10**(9): p. 200157.
34. Bugyi, B., et al., *Formins regulate actin filament flexibility through long range allosteric interactions*. J Biol Chem, 2006. **281**(16): p. 10727-36.
35. Papp, G., et al., *Conformational changes in actin filaments induced by formin binding to the barbed end*. Biophys J, 2006. **91**(7): p. 2564-72.
36. Homa, K.E., et al., *Arp2/3 complex- and formin-mediated actin cytoskeleton networks facilitate actin binding protein sorting in fission yeast*. Eur J Cell Biol, 2024. **103**(2): p. 151404.
37. Ampe, C. and M. Van Troys, *Mammalian Actins: Isoform-Specific Functions and Diseases*. Handb Exp Pharmacol, 2017. **235**: p. 1-37.
38. Varland, S., J. Vandekerckhove, and A. Drazic, *Actin Post-translational Modifications: The Cinderella of Cytoskeletal Control*. Trends Biochem Sci, 2019. **44**(6): p. 502-516.
39. Vedula, P., et al., *Diverse functions of homologous actin isoforms are defined by their nucleotide, rather than their amino acid sequence*. eLife, 2017. **6**: p. e31661.
40. Vedula, P., et al., *Different translation dynamics of β - and γ -actin regulates cell migration*. eLife, 2021. **10**: p. e68712.
41. Gunning, P.W., et al., *The evolution of compositionally and functionally distinct actin filaments*. J Cell Sci, 2015. **128**(11): p. 2009-19.
42. Selvaraj, M., et al., *Structural basis underlying specific biochemical activities of non-muscle tropomyosin isoforms*. Cell Rep, 2023. **42**(1): p. 111900.
43. Gunning, P., G. O'Neill, and E. Hardeman, *Tropomyosin-based regulation of the actin cytoskeleton in time and space*. Physiol Rev, 2008. **88**(1): p. 1-35.
44. Gunning, P.W., et al., *Tropomyosin - master regulator of actin filament function in the cytoskeleton*. J Cell Sci, 2015. **128**(16): p. 2965-74.
45. Vindin, H. and P. Gunning, *Cytoskeletal tropomyosins: choreographers of actin filament functional diversity*. J Muscle Res Cell Motil, 2013. **34**(3-4): p. 261-74.
46. Lehman, W., et al., *Tropomyosin and actin isoforms modulate the localization of tropomyosin strands on actin filaments*¹¹Edited by W. Baumeister. Journal of Molecular Biology, 2000. **302**(3): p. 593-606.
47. Truebestein, L. and T.A. Leonard, *Coiled-coils: The long and short of it*. Bioessays, 2016. **38**(9): p. 903-16.
48. Christensen, J.R., et al., *Competition between Tropomyosin, Fimbrin, and ADF/Cofilin drives their sorting to distinct actin filament networks*. Elife, 2017. **6**.
49. Christensen, J.R., et al., *Cooperation between tropomyosin and α -actinin inhibits fimbrin association with actin filament networks in fission yeast*. Elife, 2019. **8**.
50. Sztyéhlikné Bérces, Z., *Nanostrukturált felületek és idegszöveti sejtek kölcsönhatásának vizsgálata*. 2018.
51. Becsky, D., *A szindekán-4 összetett szerepe a mioblasztok migrációjában*. 2021.

52. Kőhidi, T., *Különböző agyterületekről izolált radiális glia- jellegű idegi őssejtek sajátosságainak összehasonlító elemzése*. 2019.
53. Darvas, Z. and V. László, *Sejtbológia*. 2005: Semmelweis Kiadó.
54. Fujiwara, I., et al., *Microscopic analysis of polymerization dynamics with individual actin filaments*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(9): p. 666-73.
55. Wang, Y.L., *Exchange of actin subunits at the leading edge of living fibroblasts: possible role of treadmilling*. J Cell Biol, 1985. **101**(2): p. 597-602.
56. Lai, F.P., et al., *Arp2/3 complex interactions and actin network turnover in lamellipodia*. EMBO J, 2008. **27**(7): p. 982-92.
57. Wiesner, S., et al., *A biomimetic motility assay provides insight into the mechanism of actin-based motility*. J Cell Biol, 2003. **160**(3): p. 387-98.
58. Loisel, T.P., et al., *Reconstitution of actin-based motility of Listeria and Shigella using pure proteins*. Nature, 1999. **401**(6753): p. 613-6.
59. Bugyi, B., et al., *How do in vitro reconstituted actin-based motility assays provide insight into in vivo behavior?* FEBS Lett, 2008. **582**(14): p. 2086-92.
60. Le Clainche, C. and M.F. Carlier, *Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration*. Physiol Rev, 2008. **88**(2): p. 489-513.
61. Letort, G., et al., *Dynamic reorganization of the actin cytoskeleton*. F1000Res, 2015. **4**.
62. Mattila, P.K. and P. Lappalainen, *Filopodia: molecular architecture and cellular functions*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(6): p. 446-54.
63. Beltzner, C.C. and T.D. Pollard, *Pathway of Actin Filament Branch Formation by Arp2/3 Complex* ^{*}. Journal of Biological Chemistry, 2008. **283**(11): p. 7135-7144.
64. van Eeuwen, T., et al., *Transition State of Arp2/3 Complex Activation by Actin-Bound Dimeric Nucleation-Promoting Factor*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2023. **120**(33): p. e2306165120.
65. Chou, S.Z., M. Chatterjee, and T.D. Pollard, *Mechanism of actin filament branch formation by Arp2/3 complex revealed by a high-resolution cryo-EM structure of the branch junction*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2022. **119**(49): p. e2206722119.
66. Chavali, S.S., et al., *Cryo-EM structures reveal how phosphate release from Arp3 weakens actin filament branches formed by Arp2/3 complex*. Nature Communications, 2024. **15**(1): p. 2059.
67. Zimmet, A.A.-O., et al., *Cryo-EM structure of NPF-bound human Arp2/3 complex and activation mechanism*. 2020(2375-2548 (Electronic)).
68. Fäßler, F., et al., *Cryo-electron tomography structure of Arp2/3 complex in cells reveals new insights into the branch junction*. Nat Commun, 2020. **11**(1): p. 6437.
69. Beltzner, C.C. and T.D. Pollard, *Pathway of actin filament branch formation by Arp2/3 complex*. Journal of Biological Chemistry, 2008. **283**(11): p. 7135-7144.
70. Pantaloni, D., C. Le Clainche, and M.F. Carlier, *Mechanism of actin-based motility*. Science, 2001. **292**(5521): p. 1502-6.
71. Manhart, A. and C. Schmeiser, *Existence of and decay to equilibrium of the filament end density along the leading edge of the lamellipodium*. J Math Biol, 2017. **74**(1-2): p. 169-193.
72. Ghasemi, F., et al., *Regeneration of actin filament branches from the same Arp2/3 complex*. Sci Adv, 2024. **10**(4): p. eadj7681.
73. Grimm, H.P., et al., *Analysis of actin dynamics at the leading edge of crawling cells: implications for the shape of keratocyte lamellipodia*. Eur Biophys J, 2003. **32**(6): p. 563-77.
74. Walters, D.E., *Enzymes. A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis. Second Edition By Robert A. Copeland. Wiley-VCH, New York. 2000. xvi + 397 pp. 16 × 24.5 cm. ISBN 0-471-35929-7. \$99.95*. Journal of Medicinal Chemistry, 2002. **45**(25): p. 5607-5607.
75. Bisswanger, H., *Multiple Equilibria, Principles, and Derivations*, in *Enzyme Kinetics*. 2017. p. 1-26.
76. Copeland, R., *Enzymes. A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis. Vol. 45. 2000: John Wiley & Sons, Inc. 5607-5607*.

77. 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.
78. Schmidt, S., *Motility and Force Generation Based on the Dynamics of Actin Gels*. 2009.
79. Plastino, J. and C. Sykes, *The actin slingshot*. Curr Opin Cell Biol, 2005. **17**(1): p. 62-6.
80. Mogilner, A., *On the edge: modeling protrusion*. Curr Opin Cell Biol, 2006. **18**(1): p. 32-9.
81. Zhu, J. and A. Mogilner, *Mesosopic model of actin-based propulsion*. PLoS Comput Biol, 2012. **8**(11): p. e1002764.
82. Holmes, K.C. and W. Lehman, *Gestalt-binding of tropomyosin to actin filaments*. J Muscle Res Cell Motil, 2008. **29**(6-8): p. 213-9.
83. Bisswanger, H., *Cooperativity and Allosteric Enzymes*, in *Enzyme Kinetics*. 2017. p. 27-53.
84. Weiss, J.N., *The Hill equation revisited: uses and misuses*. The FASEB Journal, 1997. **11**(11): p. 835-841.
85. Singh, A.a.H.-D.S.E., *Tropomyosin's Periods Are Quasi-Equivalent for Actin Binding but Have Specific Regulatory Functions*. Biochemistry, 2007. **46**(51): p. 14917-14927.
86. Blanchoin, L., T.D. Pollard, and S.E. Hitchcock-DeGregori, *Inhibition of the Arp2/3 complex-nucleated actin polymerization and branch formation by tropomyosin*. Curr Biol, 2001. **11**(16): p. 1300-4.
87. Jülicher, F., et al., *Active behavior of the Cytoskeleton*. Physics Reports, 2007. **449**(1): p. 3-28.
88. Marcy, Y., et al., *Forces generated during actin-based propulsion: A direct measurement by micromanipulation*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2004. **101**(16): p. 5992-5997.
89. Dickinson, R.B., L. Caro, and D.L. Purich, *Force Generation by Cytoskeletal Filament End-Tracking Proteins*. Biophysical Journal, 2004. **87**(4): p. 2838-2854.
90. Dickinson, R.B., *Models for actin polymerization motors*. Journal of Mathematical Biology, 2009. **58**(1): p. 81-103.
91. van der Gucht, J., et al., *Stress release drives symmetry breaking for actin-based movement*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(22): p. 7847-52.
92. Jarmoskaite, I., et al., *How to measure and evaluate binding affinities*. Elife, 2020. **9**.
93. Hoare, S.R.J., *Analyzing kinetic binding data*, in *Assay guidance manual*. 2021.
94. Lehnert, T. and M.T. Figge, *Dimensionality of Motion and Binding Valency Govern Receptor-Ligand Kinetics As Revealed by Agent-Based Modeling*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 1692.
95. Pollard, T.D. and E.M. De La Cruz, *Take advantage of time in your experiments: a guide to simple, informative kinetics assays*. Mol Biol Cell, 2013. **24**(8): p. 1103-10.
96. Maiti, S., et al., *Structure and activity of full-length formin mDia1*. Cytoskeleton (Hoboken), 2012. **69**(6): p. 393-405.
97. Oosterheert, W., et al., *Molecular mechanism of actin filament elongation by formins*. Science, 2024. **384**(6692): p. eadn9560.
98. Otomo, T., et al., *Structural basis of Rho GTPase-mediated activation of the formin mDia1*. Mol Cell, 2005. **18**(3): p. 273-81.
99. Rose, R., et al., *Structural and mechanistic insights into the interaction between Rho and mammalian Dia*. Nature, 2005. **435**(7041): p. 513-8.
100. Nezami, A.G., F. Poy, and M.J. Eck, *Structure of the autoinhibitory switch in formin mDia1*. Structure, 2006. **14**(2): p. 257-63.
101. Kühn, S. and M. Geyer, *Formins as effector proteins of Rho GTPases*. Small GTPases, 2014. **5**: p. e29513.
102. Chesarone, M.A., A.G. DuPage, and B.L. Goode, *Unleashing formins to remodel the actin and microtubule cytoskeletons*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(1): p. 62-74.
103. Watanabe, S., et al., *Rho and anillin-dependent control of mDia2 localization and function in cytokinesis*. Mol Biol Cell, 2010. **21**(18): p. 3193-204.

104. Higashi, T., et al., *Flightless-I (Fli-I) regulates the actin assembly activity of diaphanous-related formins (DRFs) Daam1 and mDia1 in cooperation with active Rho GTPase*. J Biol Chem, 2010. **285**(21): p. 16231-8.
105. Pintér, R., et al., *The activities of the gelsolin homology domains of Flightless-I in actin dynamics*. Front Mol Biosci, 2020. **7**: p. 575077.
106. Kathryn, M.E., et al., *Dia-Interacting Protein Modulates Formin-Mediated Actin Assembly at the Cell Cortex*. Current Biology, 2007. **17**(7): p. 579-591.
107. Rizvi, S.A., et al., *Identification and characterization of a small molecule inhibitor of formin-mediated actin assembly*. Chem Biol, 2009. **16**(11): p. 1158-68.
108. Matusek, T., et al., *Formin proteins of the DAAM subfamily play a role during axon growth*. J Neurosci, 2008. **28**(49): p. 13310-9.
109. Matusek, T., et al., *The Drosophila formin DAAM regulates the tracheal cuticle pattern through organizing the actin cytoskeleton*. Development, 2006. **133**(5): p. 957-66.
110. Mihály, J., *A szöveti polaritás és egy új aktin sejtvez szabályozó fehérje vizsgálata Drosophila melanogaster ben*. 2010.
111. Fischer, R.S. and V.M. Fowler, *Tropomodulins: life at the slow end*. Trends Cell Biol, 2003. **13**(11): p. 593-601.
112. Wear, M.A., et al., *How capping protein binds the barbed end of the actin filament*. Curr Biol, 2003. **13**(17): p. 1531-7.
113. Edwards, M., et al., *Capping protein regulators fine-tune actin assembly dynamics*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(10): p. 677-89.
114. Burtneck, L.D., et al., *Structure of the N-terminal half of gelsolin bound to actin: roles in severing, apoptosis and FAF*. EMBO J, 2004. **23**(14): p. 2713-22.
115. Barrie, K.R., G. Rebowski, and R. Dominguez, *Mechanism of actin filament severing and capping by gelsolin*. Nat Struct Mol Biol, 2025. **32**(2): p. 237-242.
116. Lagarrigue, E., et al., *Co-operation of domain-binding and calcium-binding sites in the activation of gelsolin*. Eur J Biochem, 2003. **270**(10): p. 2236-43.
117. Ghoshdastider, U., et al., *The expanding superfamily of gelsolin homology domain proteins*. Cytoskeleton (Hoboken), 2013. **70**(11): p. 775-95.
118. Arora, P.D., et al., *Flightless I interacts with NMMIIA to promote cell extension formation, which enables collagen remodeling*. Mol Biol Cell, 2015. **26**(12): p. 2279-97.
119. Kuwabara, Y., et al., *A human FLII gene variant alters sarcomeric actin thin filament length and predisposes to cardiomyopathy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2023. **120**(19): p. e2213696120.
120. Mohammad, I., et al., *Flightless I is a focal adhesion-associated actin-capping protein that regulates cell migration*. FASEB J, 2012. **26**(8): p. 3260-72.
121. Cowin, A.J., et al., *Flightless I deficiency enhances wound repair by increasing cell migration and proliferation*. J Pathol, 2007. **211**(5): p. 572-581.
122. Kopecki, Z., et al., *Overexpression of the Flii gene increases dermal-epidermal blistering in an autoimmune ColVII mouse model of epidermolysis bullosa acquisita*. J Pathol, 2011. **225**(3): p. 401-13.
123. Kopecki, Z., et al., *Topically applied flightless I neutralizing antibodies improve healing of blistered skin in a murine model of epidermolysis bullosa acquisita*. J Invest Dermatol, 2013. **133**(4): p. 1008-16.
124. Jackson, J.E., et al., *Flii neutralizing antibodies improve wound healing in porcine preclinical studies*. Wound Repair Regen, 2012. **20**(4): p. 523-36.
125. Renault, L., B. Bugyi, and M.F. Carrier, *Spire and Cordon-bleu: multifunctional regulators of actin dynamics*. Trends Cell Biol, 2008. **18**(10): p. 494-504.
126. Klenchin, V.A., S.Y. Khaitlina, and I. Rayment, *Crystal structure of polymerization-competent actin*. J Mol Biol, 2006. **362**(1): p. 140-50.
127. Dominguez, R., *Structural insights into de novo actin polymerization*. Curr Opin Struct Biol, 2010. **20**(2): p. 217-25.

128. Doolittle, L.K., M.K. Rosen, and S.B. Padrick, *Measurement and analysis of in vitro actin polymerization*. Methods Mol Biol, 2013. **1046**: p. 273-93.
129. Cooper, J.A., S.B. Walker, and T.D. Pollard, *Pyrene actin: documentation of the validity of a sensitive assay for actin polymerization*. J Muscle Res Cell Motil, 1983. **4**(2): p. 253-62.
130. Cooper, J. and T. Pollard, *Methods to measure actin polymerization*. Methods Enzymol, 1982. **85**: p. 182-210.
131. Barkó, 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.
132. Estes, J.E., et al., *Tightly-bound divalent cation of actin*. J Muscle Res Cell Motil, 1992. **13**(3): p. 272-84.
133. Carlier, M.F., *Actin: protein structure and filament dynamics*. J Biol Chem, 1991. **266**(1): p. 1-4.