

Válasz

a Prof. Dr. Vonderviszt Ferenc

a Pannon Egyetem, Bio-nanotechnológiai és Műszaki Kémiai Kutatóintézet egyetemi tanára
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.

(1) A vizsgálatok során egyes magasabbrendű fajok (*Drosophila melanogaster*, *Homo sapiens*, *Mus musculus*) különféle aktinkötő fehérjéit (ADF, DAAM, Flightless-I, gelsolin, N-WASP, profilin, SALS, tropomiozin TpmBr3/Tpm5NM1) *E. coli* (BL21) expressziós rendszerben termeltették. Általános tapasztalat, hogy a nagyméretű eukarióta fehérjék funkcionális formában történő előállítása baktériumokban komoly nehézségekbe ütközik, különösen, ha cisztein oldalláncokat is tartalmaznak. Pl. a Jelölt által vizsgált *drosophila* Flightless-I fehérje GH16 fragmentuma kifejezetten nagyméretű, 795 aminosavból áll, amelyek között nagyszámú (összesen 17 db) cisztein található. (De pl. a DAAM, profilin vagy cofilin fehérjék is több ciszteint tartalmaznak).

Milyen módon bizonyosodtak meg arról, hogy az előállított rekombináns fehérjék minden részletükben megfelelően feltekeredettek-e, kialakult-e a natív szerkezetre jellemző diszulfidhíd mintázat, vagy nem jöttek-e létre hibás S-S keresztkötések?

Mi a helyzet a poszttranszlációs módosításokkal, amelyek az *E. coli* expressziós rendszerben nem történnek meg? A UniProt adatbázis tanúsága szerint a vizsgált aktinkötő fehérjék jelentős része több poszttranszlációs módosítást is tartalmaz (rendszerint foszforiláltak és acetiláltak), amelyek befolyásolhatják szabályozó funkcióikat. Mindezek mennyiben érintik a kapott eredmények relevanciáját? Nem a poszttranszlációs módosítások hiánya okozza-e bizonyos funkciók elvesztését vagy módosulását?

A fentiek tükrében felmerül az a kérdés, hogy nem lett volna-e célszerűbb eukarióta expressziós rendszerben előállított fehérjékkel végezni a vizsgálatokat?

Az Opponens felvetése jogos, elfogadom a megfogalmazott észrevételeket. A vizsgált fehérjék, a DAAM és a Flightless-I fiziko-kémiai tulajdonságai alapján – pl. méret, cisztein aminosavak és diszulfidhidak, poszttranszlációs módosítások – eukarióta expressziós rendszerben történő előállítása várhatóan a natív állapotukhoz közelebb álló formát eredményezett volna. A modellrendszer kiválasztásakor a bakteriális expressziós rendszer (*E. coli* BL21) mellett döntöttünk, ami – bár rendelkezik korlátokkal – az irodalomban elfogadott és alkalmazott az aktinkötő fehérjék előállítására (pl. [1, 2]). A prokarióta expressziós rendszerhez szükséges valamennyi erőforrás rendelkezésünkre áll(t). Az eukarióta expressziós rendszereket (rovar-, emlős-, vagy élesztősejtek) csak jelentős infrastrukturális fejlesztést követően tudnánk alkalmazni, ugyanakkor a rendszer hatékony működtetéséhez szükséges humán erőforrás és szakértelem kialakítása is befektetést és célzott képzést igényelne.

A különböző génexpressziós rendszerek előnyeit/hátrányait összegzi és a gyakorlati szempontokat figyelembe véve kínál döntési sémát a megfelelő rendszer kiválasztásához egy közelmúltban megjelent tanulmány [3]. A tanulmány a [P4EU](#) (*Protein Production and Purification Partnership in Europe*) hálózat tagjai körében végzett felmérésen alapul, így a *know-how* egyik legértékesebb forrását, a fehérjetermeléssel foglalkozó központok tapasztalatait alapul véve mutatja be a rendszerek alkalmazhatóságát.

Az eukarióta célfehérje baktériumban történő előállítása elsősorban akkor ajánlott, ha a fehérje kis molekulatömegű (< 100 kDa), nem igényel poszttranszlációs módosítást (PTM, elsősorban glikoziláció) és kevesebb diszulfidhidat (≤ 3) tartalmaz [3]. Az eukarióta rendszerben történő előállítás ajánlott a nagyobb a molekulatömegű (> 100 kDa), funkcionális PTM-eket igénylő és több (≥ 4) diszulfidhidat tartalmazó eukarióta célfehérjénél.

A Flightless-I előállítás az *E. coli* BL21 törzs alkalmazásával tapasztalataink alapján komoly erőfeszítést igényelt. A kihozatal jellemzően alacsony a vizsgált fragmentumok esetén. Ennek a méret mellett lehet az oka a nagyszámú cisztein aminosav és a diszulfidhidak jelenléte. A jövőben tervezzük a fehérje előállításának további optimalizálását. A diszulfidhidakat tartalmazó fehérjék előállításához használhatók például olyan *E. coli* törzsek, amik elősegítik azok létrejöttét. Ilyen a kereskedelmi forgalomban elérhető SHuffle® T7 Competent *E. coli* törzs (New England Biolabs). Az *E. coli*-ban előállított fehérjék esetében külön vizsgálatot nem végeztünk a diszulfidhid-mintázat ellenőrzésére. Erre vonatkozóan a tömegspektrometriai analízis lehet célravezető. A fehérjék előállítását követően ultracentrifugálással klarifikáltuk a mintákat a nem oldható frakció eltávolítása érdekében. A fehérjék aktivitását funkcionális vizsgálatokban ellenőriztük, viszonylag nagy affinitású ($K_d \sim 10^{-9} - 10^{-6}$ M) kölcsönhatásokat írtunk le. A DAAM és a Flightless-I fehérjék esetében a poszttranszlációs módosításokkal kapcsolatos adatok elérhetők például a [dbPTM](#) adatbázisban [4]. Az *E. coli* rendszer nem képes eukarióta típusú poszttranszlációs módosítások végrehajtására, ugyanakkor a vizsgált aktin-kötő fehérjék esetében ezek a módosítások a biológiai aktivitás és szabályozás fontos elemei lehetnek. Ez a szempont jelenleg kevésbé feltárt és vizsgált terület, ami egy különálló kutatási irány és tanulmány alapját jelentheti.

A módszertani stratégiánk, az *E. coli*-ban előállított fehérjék vizsgálata lehetőséget nyújt a fehérje-fehérje kölcsönhatások alapmechanizmusainak feltárására. Az eredményeink értelmezését a rendszer korlátainak ismeretében tesszük meg. Fontosnak tartom kiemelni, hogy munkánk során nem elégedtünk meg a tisztított fehérjék aktivitásának feltérképezésével, hanem minden esetben törekedtünk az *in vitro* eredményeink biológiai relevanciájának validálására és értékelésére. Ennek érdekében az adatainkat korreláltattuk *in vivo* rendszerekből származó megfigyelésekkel, egyrészt irodalmi adatok alapján vagy együttműködő partnerünk által *Drosophila* modellrendszerben végzett vizsgálatokkal (Mihály József, Szegedi Biológiai Kutatóközpont).

Minden esetben el lettek-e távolítva a tisztítást elősegítő GST vagy His6 toldalékok? Ha nem, akkor hogyan győződtek meg arról, hogy ezek jelenléte nem befolyásolta-e a vizsgált kölcsönhatásokat?

Az *E. coli* (BL21) expressziós rendszerben termeltetett fehérjék tisztítását affinitástag segítségével végeztük az alábbiak szerint:

fehérje	affinitáscímke N-terminálison	kromatográfiás eljárás affinitás kromatográfia	proteáz általunk előállított
TpmBr3 Tpm5NM1	hexahisztidin (His ₆)	nikkel-nitrilotriacetát (Ni-NTA)	Tobacco Etch Virus (TEV) proteáz Hasítási szekvencia: ENLYFQ↓G
DAAM Flightless-I	glutathion-S- transzferáz (GST)	glutathion (GSH)	PreScission (humán rhinovírus 3C) proteáz (PSP) Hasítási szekvencia: LEVLFQ↓GP

(i) His₆-tag alkalmazása

A nem-izom eredetű tropomiozin izoformák esetében a His₆-taget TEV proteázzal történő emésztéssel távolítottuk el, a hasítás a klónozási terv szerint közvetlenül a fehérje szekvenciájának első metioninja előtt történt [5, 6]. A Tpm F-aktinhoz való kötődése kooperatív, amiben meghatározó szerepet játszik a szomszédos Tpm molekulák között kialakuló kollektív kölcsönhatás, az N-, és C-terminális végek közötti vég-vég kapcsolódás (*head-to-tail*) [7]. Már

kisebbségi szekvenciamódosítás is befolyásolhatja a Tpm működését és a Tpm:F-aktin kölcsönhatást. Ezért célunk volt, hogy a TpmBr3 és Tpm5NM1 izoformákat az eredeti szekvenciához nem tartozó aminosavak nélkül állítsuk elő. A kísérleteket minden esetben tag nélküli, az eredeti szekvenciának megfelelő Tpm izoformákkal végeztük.

(ii) GST-tag alkalmazása

A DAAM és a Flightless-I esetében GST-taggal ellátott fehérjéket használtunk a kísérleteinkben. A GST egy viszonylag nagyméretű fúziós tag (26 kDa) [8]. A GST-tag hatását a DAAM FH2 és a Flightless-I GH16 fragmentumainak aktivitására kontroll kísérletekben ellenőriztük. Ennek érdekében a GST-taget PreScission proteázzal történő emésztéssel távolítottuk el. A DAAM FH2 esetében az eredményeket nem mutattam be a dolgozatban és más formában sem publikáltuk azokat. A Flightless-I GH16 esetében az eredményeket nem mutattam be a dolgozatban, de publikálásra kerültek [9]. A kontroll kísérletekben (pirén aktin alapú polimerizációs vizsgálatok) a GST-tartalmú és a tag nélküli fehérjék *in vitro* tulajdonságainak összehasonlítása alapján kvalitatív különbséget nem, kvantitatív eltérést azonban tapasztaltunk: a tag eltávolítása az aktin affinitás csökkenését eredményezte mindkét fehérje esetében. Ezt magyarázhatja a GST által elősegített dimerizáció vagy a GST közvetített fehérjeszerkezet-stabilizáció [8]. Fontos megjegyezni azonban, hogy tag alkalmazása nem befolyásolta a munkánk főbb következtetéseit.

(2) A Jelölt az aktinkötő fehérjék szerepét az aktin sejtvázas szerveződésében többféle modellrendszerben vizsgálja. Több esetben is azonban az egyes fehérje komponensek eltérő organizmusokból származnak. Pl. a Flightless I aktin sejtvázas dinamikában betöltött szerepének tanulmányozása során *ecetmuslica* Fli-I-t használt, az aktin nyúl vázizomból származott, humán gelsolinnal és egér profilinnal kiegészülve. Miért feltételezhetjük, hogy a távoli fajokból származó partnerekkel jól reprezentálhatjuk egy adott sejtben belül működő, együttes evolúció során összeecsiszolódott fehérje komponensek kölcsönhatásait? Ha pl. a Flightless I aktinnal vagy aktin filamentumokkal való kölcsönhatására vagyunk kíváncsiak, akkor nem az volna a logikus, hogy ugyanazon fajból származó fehérjével dolgozunk? Bár az aktin nagyon erősen konzerválódott fehérje, az aktinkötő fehérjék már korántsem annyira azok. (Pl. a *drosophila* és a nyúl/humán Fli-I már csak 57 %-os aminosav egyezést mutat.) Egy adott fehérjepár esetében bizonyos kölcsönhatások még az ortológok tekintetében is megmaradhatnak, ugyanakkor mások elveszhetnek. Ha azt találjuk, hogy a Dm Fli-I a nyúl aktinból felépülő filamentumok tekintetében nem rendelkezik fragmentáló aktivitással, abból miért következne, hogy a nyúl Fli-I sem képes szétbontani a nyúl aktinból álló filamentumokat? Nem lehet, hogy csupán arról van szó, hogy az *ecetmuslica* Fli-I fehérje fragmentáló aktivitásért felelős kötőfelszíne az evolúciós változások miatt egyszerűen már nem kompatibilis a nyúl F aktinnal, de a Dm F aktinnal az volna?

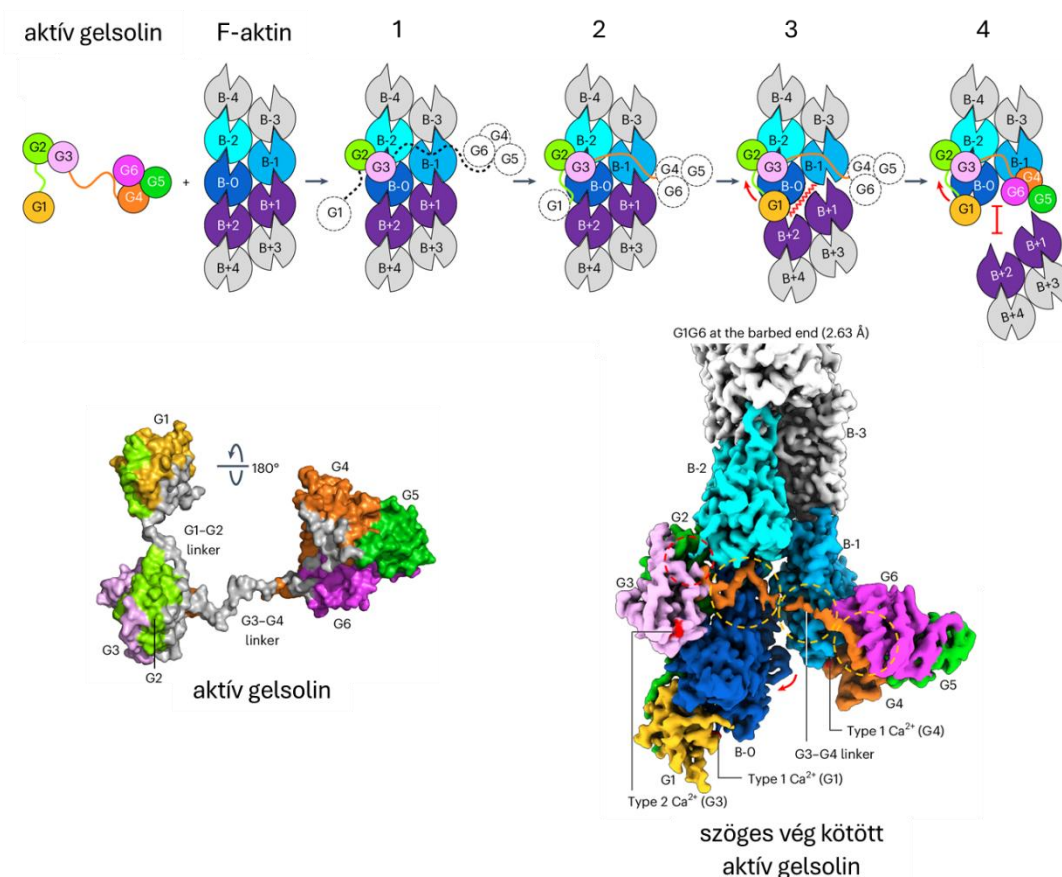
Az Opponens felvetése jogos, az észrevételt elfogadom. A biológiai releváns kölcsönhatások azonosítására megfelelőbb lett volna azonos fajból származó fehérjéket alkalmazni. A vizsgálataink alapján nem zárható ki, hogy a Flightless-I és az aktin közötti kölcsönhatás fajszerkezet-specifikus és a fragmentáló aktivitás hiánya az evolúciós diverzitásból eredő inkompatibilitás következménye. Munkánk során a tisztított fehérjék aktivitásának feltérképezése mellett törekszünk az *in vitro* eredmények biológiai relevanciájának validálására is. A Dm Flightless-I esetén azonban nem áll rendelkezésünkre a fragmentáló aktivitásra vonatkozó *in vivo* adat.

A fragmentáló aktivitásért felelős kötőfelszín konzerváltságát nem vizsgáltuk a Flightless-I fehérjében. A gelsolin szupercsalád névadó tagjának, a gelsolinnak a fragmentáló aktivitással rendelkező minimális egysége a G1¹ doménből és a G1–G2 linker régióból áll, azonban a hatékony fragmentációhoz mind a hat gelsolin homológ domén (G1–G6) szükséges [10, 11]. A gelsolin szupercsalád tagjai (CapG, adseverin, gelsolin, Flightless-I, advillin, villin, villin-like protein, supervillin) a fragmentáló aktivitásukban eltérnek [10]. A hat gelsolin homológ domént tartalmazó gelsolin, adseverin, advillin és villin fragmentáló aktivitással rendelkezik. A CapG (a G1-G3 doménekből áll, nem rendelkezik a G4-G6 doménnel) és a supervillin (a G1 doménnel nem rendelkezik) nem fragmentál. A Flightless-I esetén ez az aktivitás vitatott [10].

A közelmúltban publikálták a kalcium-aktivált, aktív gelsolin szerkezetét, amit kriogén elektronmikroszkópiával határoztak meg az aktin filamentum szöges végéhez kötött állapotban (1. ábra [11]). Ez a szerkezet nemcsak a gelsolin fragmentáló és sapkázó mechanizmusának pontosabb megértését tette lehetővé, hanem elsőként mutatta be a teljes hosszúságú, aktív gelsolin térszerkezetét (1. ábra). A gelsolin fragmentáló/sapkázó aktivitásának szerkezeti alapjaira vonatkozó sémát az 1. ábra mutatja be, a folyamatot az ábra aláírása részletezi. Ezeknek az eredményeknek az alapján megvizsgálhatjuk, hogy a Flightless-I szerkezete lehetővé tesz-e a

¹ Az 1. ábra jelölésével összhangban a gelsolin homológ domén jelölésére a G-t használtam.

gelsolinhoz hasonló mechanizmust. Az ilyen vizsgálatok hozzájárulhatnak az eredményeink tisztázásához, ezen túlmutatóan pedig a gelsolin szupercsalád tagjai közötti funkcionális különbségek jobb megértéséhez. A dolgozatban bemutatott munka során ez nem volt célunk, de a kérdéskör jelentősége való tekintettel a jövőben tervezünk ilyen irányú vizsgálatokat.



1. ábra A gelsolin fragmentáló/sapkázó aktivitásának szerkezeti modellje. Az ábra a [11] irodalmi hivatkozás Figure 1. és Figure 2. jelölésű ábrái alapján készült. A folyamatot bemutató animáció elérhetősége: [Supplementary Video 1](#) [11].

(i) fragmentáció

1. G2-G3 kötődése

A G2-G3 domének két szomszédos aktin monomer (B-0 és B-2) határán kötődnek a filamentumhoz.

2. linkerek kötődése

A G1-G2 és a G3-G4 linkerek kötődése a G1, illetve a G4-G6 doméneket a kötőhelyeik közelébe pozicionálja az F-aktin ellentétes oldalain.

3. B-0 rotációja, G1 kötődése

A B-0 aktin monomer rotációja elősegíti a G1 domén kötődését a filamentumhoz. A G1 domén kötődése – ami a gelsolin és aktin közötti legnagyobb affinitású kapcsolat – éket képez a B-0 és B+2 monomerek között.

4. G4-G6 kötődése, pincer movement (csipeszmozgás)

A G4-G6 domének kötődnek a filamentumhoz. A G1-G3 és a G4-G6 domének összehangolt „csipesz” mozgása a filamentum fragmentációját eredményezi.

(ii) sapkázás

A fragmentációt követően a G1 és a G4 domének a B-0, illetve a B-1 monomerek szögcsúcsához kötődnek. Ez nemcsak a további monomerek asszociációját gátolja, hanem a B-0/B-2 longitudinális kapcsolatot stabilizálásával a monomerek disszociációját is akadályozza.

(3) Mi indokolja az elsőrendű enzimreakciók kinetikájának leírására kidolgozott Michaelis-Menten modell alkalmazhatóságát az skTpm aktin polimerizációra kifejtett hatásának leírására? Az így származtatott féltelítési koncentrációnak miért van köze az skTpm:F-aktin komplex disszociációs állandójához? Ez a disszociációs állandó egyáltalán jól definiált-e, és különösen a rövid filamentumok esetében nem függ azok (átlagos) hosszától? A MM modellben az szubsztrát koncentráció függvényében vizsgáljuk az enzimreakció kezdeti sebességét. Az (1) és (2) egyenletekben az skTpm koncentráció jelenik meg a klasszikus formalizmus szubsztrát koncentrációjának a helyén? Még tovább bonyolítja a helyzetet, hogy az skTpm mellett az aktin filamentumok összeszerelődésében az Arp2/3 komplex is szerepet játszik, sőt az ATP jelenléte és hidrolízise további bonyolító tényező lehet. Hasonlóképpen, miért alkalmazható a klasszikus kompetitív gátlás modellje erre a bonyolult rendszerre? Klasszikusan a szubsztrátkoncentráció reciprokának függvényében ábrázoljuk a reakciósebesség reciprokát. A 8. ábrán miért az Arp2/3 koncentráció kerül a szubsztrátkoncentráció helyére?

Köszönöm az Opponensnek a kísérleti eredményeket leíró modellre vonatkozó észrevételét és kérdéseit, ami lehetőséget adott arra, hogy újragondoljam és körültekintőbben értelmezzem a kérdéskört és az analízisünket.

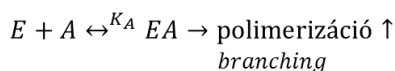
Az Arp2/3 komplex nukleációt elősegítő faktor (*nucleation promoting factor*, NPF) aktivátorát egyes szakirodalmi források enzimszerű szabályozó fehérjeként írják le, mivel működése több szempontból is hasonlóságot mutat az enzimekével [12-14]. Az NPF „enzimként” működve szubsztrátként köti az Arp2/3 komplexet, a G-aktint és az anya filamentumot és a ciklusa során egy elágazó filamentumot hoz létre (*branching*). A *branching* modellezésére a szakirodalomban található példák a Michaelis-Menten típusú megközelítés alkalmazására [15-17]. Az enzimek definíció szerint kémiai reakciókat katalizálnak [18, 19]. 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 modellje alapján írhatjuk le [18, 20, 21]. A dolgozatban alkalmazott matematikai leírásmód és összefüggések összhangban vannak ezzel a megközelítéssel, utalás történik erre a vonatkozó publikációm „Materials and Methods” részében [22]. 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 [21]. 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 ismertetem az analízis főbb pontjait.

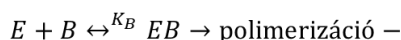
Az Arp2/3 komplex és a tropomiozin (skTpm) aktin polimerizációra gyakorolt hatásait a kompetitív (versengő) kötődési séma szerint írhatjuk le (2. ábra) [18, 20]. A modell alapján az aktivált Arp2/3 komplex és az skTpm egymással versengve kötődnek az aktin filamentumokhoz. Ez a kötődési

verseny határozza meg a polimerizáció sebességét: az Arp2/3 komplex a *branching* révén fokozza a sebességet (2. ábra ↑), míg az skTpm a spontán polimerizációra jellemző sebességet (2. ábra –) tartja fenn (Supplemental Figure 1. jelölésű ábra [22]).

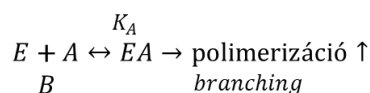
Arp2/3:aktin kötődés



skTpm:aktin kötődés



Arp2/3-skTpm kompetitív kötődés



B

↓

K_B EB

↓

polimerizáció –

2. 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 deplécio. Így a szabad ligandum koncentrációja jó közelítéssel azonosnak tekinthető a hozzáadott összes ligandum koncentrációjával [18, 21].

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

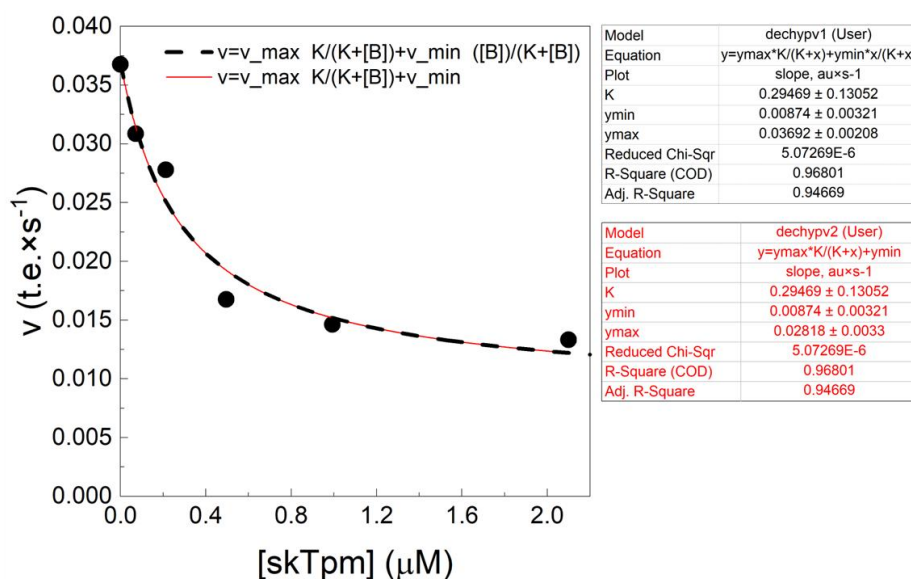
$v_{\max}$: a polimerizáció sebessége skTpm hiányában

$K = K_B(1 + \frac{[A]}{K_A})$: 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 (3. ábra). Az illesztésből származtatott féltelítési koncentráció a fenti modell alapján nem azonos az skTpm:F-aktin disszociációs egyensúlyi állandójával (K_B), hanem azzal arányos a $K = K_B(1 + [A]/K_A)$ összefüggés alapján.



3. 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 ($[B] = \text{állandó}$) 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: $v_{min} \sim 0.009 \text{ t.e.xs}^{-1}$ - $v_{max} \sim 0.6 \text{ t.e.xs}^{-1}$ és jellemzően meghaladták a v_{min} értéket (4. ábra). Ennek alapján a $v \gg v_{min}$ és

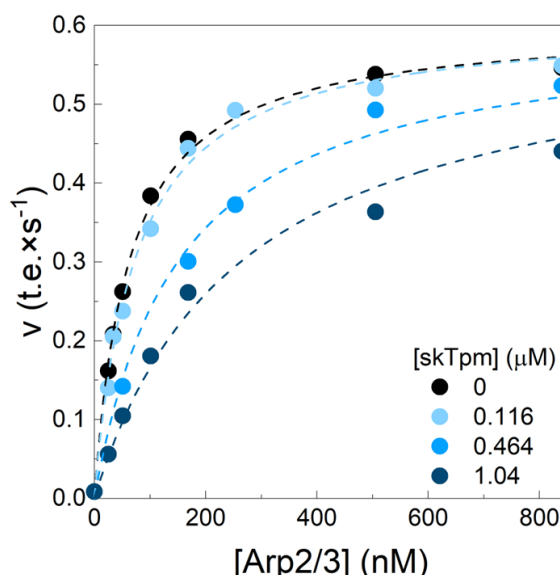
a $v_{\max} \gg v_{\min}$ közelítést alkalmaztuk és a $v_{\min}$ tagot elhanyagoltuk. A $v_{\min}$ elhanyagolása az adatok illesztésében és a dolgozat következtetéseiben lényegi eltérést nem eredményez (4. ábra).

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

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 bemutatott adatokból.



4. 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.

Az Opponensnek az skTpm:F-aktin disszociációs egyensúlyi állandójához kapcsolódó kérdése a Tpm:F-aktin kölcsönhatás kooperativitására hívja fel a figyelmet. A fenti modell a legegyszerűbb megközelítést alkalmazza a fehérje-ligandum kölcsönhatás leírására; a fehérje egyetlen specifikus kötőhellyel rendelkezik a ligandum számára [18, 20]. Ugyanakkor a fehérjék lehetnek többértékűek a ligandumra nézve, azaz egynél több specifikus kötőhellyel rendelkezhetnek. Ha egy fehérjében egy ligandumnak több kötőhelye is van azok esetleges heterogenitását (ekvivalens/nem ekvivalens kötőhelyek) és kooperativitását (független/nem független kötés) is figyelembe kell venni [21]. A Tpm esetén a molekulák párhuzamos dimerként tekercselődnek össze egy superhélix (coiled-coil) alkotva. A Tpm dimer hét szomszédos monomerhez kötődik a filamentum nagy menetemelkedésű hélice mentén egy 385 Å hosszú szakaszon [7]. 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 (*head-to-tail*) kapcsolódás révén egy folytonos, hézagmentes láncot képeznek a filamentum mentén ($K_a \sim 10^6 \text{ M}^{-1}$). Egy $1 \mu\text{m}$ hosszú filamentumot körülbelül 25 Tpm dimer alkotta lánc fed le. A Tpm F-aktin kötődése pozitív kooperativitást mutat. A kölcsönhatás pontosabb leírásához a kooperatív kötődési modellnek megfelelő Hill-egyenletet alkalmazhatjuk [18, 23-25]:

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

n: Hill-együttható

K: disszociációs egyensúlyi állandó

Megjegyzendő, hogy a fenti adatok a vázizom Tpm-ra érvényesek. A Tpm izoformák hagyományosan nagy molekulatömegű (*high molecular weight*, HMW, pl. skTpm) és kis molekulatömegű (*low molecular weight*, LMW, pl. Tpm5NM1 és TpmBr3) osztályokba sorolhatók [26]. A HMW és LMW Tpm izoformák hossza rendre körülbelül 284 és 247 aminosav. A méretkülönbségük abból adódik, hogy az N-terminálison különböző exonokat tartalmaznak: a HMW forma az 1a és a 2 exont, az LMW forma az 1b exont és a 2 exon hiányzik. Az eltérő hosszuk miatt a HMW és LMW Tpm dimerek eltérő számú monomerhez (6-7) kötődnek a filamentumban.

A vázizom eredetű tropomiozinnal kapcsolatos eredményeinket közlő eredeti publikációban [22] nem vettük figyelembe a Tpm F-aktin kötődésének kooperatív természetét, a dolgozatban célom az ott alkalmazott megközelítés bemutatása volt.

(4) 42. ábra: Mi lehet az oka annak, hogy magas Fli-I GH13 koncentrációnál (148.4 nM) az aktin polimerizáció kezdeti sebessége lényegesen gyorsabb, mint a spontán polimerizáció esetén, mégis jelentősen kisebb mértékű filamentum-összeszerelődésnél telítésébe megy a folyamat?

Az Opponens által jelzett tendenciát az alábbiak figyelembevételével magyarázhatjuk.

A dolgozat „Kinetikai vizsgálatok” fejezete (84. oldal) említi, hogy a pirén fluoreszcencia intenzitása az aktin monomer formájában alacsony, míg a jelölt monomerek filamentumba épülésével azok mennyiségével arányosan növekszik.

A Flightless-I kettős hatással bír az aktin dinamika szabályozásában: egyrészt elősegíti a filamentumok *de novo* nukleációját (pozitív hatás), másrészt sapkázó (*capping*) aktivitása révén a szöges véghez kötődve gátolja azok elongációját (negatív hatás).

A 42. ábrán bemutatott kísérletekben a polimerizációs sebesség (v) függ a nukleáció és az elongáció hatékonyságától is:

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

[A]: a monomerek kezdeti ($t = 0$ s) koncentrációja

[F]: a filamentumvégek koncentrációja

dF/dt : a filamentumban lévő aktin mennyiségének változási sebessége

k_+ : asszociációs sebességi állandó

k_- : disszociációs sebességi állandó

A polimerizáció kezdeti sebességének növekedése a Flightless-I nukleációra kifejtett pozitív hatása miatt, míg a fluoreszcencia jel csökkenése a telítési fázisban a Flightless-I szöges vég sapkázó aktivitása miatt jelenik meg.

A nukleációt elősegítő hatása miatt a Flightless-I jelenlétében a filamentumok gyorsabban képződnek, mint a spontán polimerizáció során, de a Flightless-I sapkázó aktivitása miatt a növekedésük gátolt. A nukleáció hatékonysága azonban kompenzálhatja a szöges vég sapkázásából eredő gátló hatást, így a fenti összefüggés szerint a monomerek filamentumba épülésének sebessége és így a pirén jel időbeli növekedésének üteme nagyobb a Flightless-I jelenlétében, mint hiányában.

Az egyensúlynak megfelelő fázisban a pirén fluoreszcencia intenzitása időben állandó, az egyensúlyi monomer:filamentum arányt tükrözi. A spontán polimerizáció során az egyensúlyi nem polimerizált, szabad aktin monomerek koncentrációját (kritikus koncentráció, c_c) a szöges és a hegyes vég kinetikai paraméterei együttesen határozzák meg. Ennek értéke $c_c \sim 0.2 \mu\text{M}$ (dolgozat, 3. táblázat, 9. oldal, [14, 27]). A Flightless-I sapkázó aktivitása révén a szöges vég dinamikáját blokkolja. Így az egyensúlyi szabad aktin monomerek koncentrációját csak a hegyes vég kinetikai paraméterei határozzák meg, ennek megfelelően a kritikus koncentráció $\sim 0.6 \mu\text{M}$ -ra emelkedik (dolgozat, 3. táblázat, 9. oldal, [14, 27]). A nem polimerizált aktin mennyiségének növekedésével a polimerizált aktin mennyisége csökken, ami a fluoreszcencia intenzitás csökkenését eredményezi.

(5) A 42. ábra szerint 10 nM Flii GH16 vagy GH13 jelenléte kb. 1/5 részére csökkenti a polimerizációs sebességet. A 43. ábrán miért látunk ennél lényegesen nagyobb mértékű csökkenést?

A dolgozat 42. és 43. ábrája (68-69. oldal) az aktin polimerizáció vizsgálatára vonatkozó adatokat mutat be. A kísérletekben két eltérő módszertani megközelítést alkalmaztunk; *bulk* filamentum sokaságon végzett fluoreszcencia spektroszkópiai és egyedi filamentumok megjelenítésén alapuló TIRF mikroszkópiai méréseket. Az Opponens által jelzett eltérés a módszerek természetéből fakad és az alábbiak szerint magyarázható.

bulk filamentum sokaságon végzett fluoreszcencia spektroszkópiai kísérletek (42. ábra)

A Flightless-I hatását a filamentumok összeszerelődésére fluoreszcencia spektroszkópiai vizsgálatokban, *bulk* filamentum sokaságon írtuk le. A módszer limitációja az, hogy - ebben a kísérleti elrendezésben - nem teszi lehetővé a nukleáció és az elongáció fázisainak elkülönített vizsgálatát. A kvantitatív elemzéshez a görbe lineáris szakaszára illesztett egyenes meredekségét határoztuk meg, mint a polimerizáció sebességét jellemző paramétert (v : *polimerizációs sebesség*, tetszőleges egység $\times s^{-1}$). A polimerizációs sebesség függ a nukleáció és az elongáció hatékonyságától is:

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

k_+ : asszociációs sebességi állandó

k_- : disszociációs sebességi állandó

$[A]$: a monomerek kezdeti ($t = 0$ s) koncentrációja

$[F]$: a filamentumvégek koncentrációja

egyedi filamentumok megjelenítésén alapuló TIRFM kísérletek (43. ábra)

A Flightless-I hatását a filamentumok összeszerelődésére TIRFM vizsgálatokban, egyedi aktin filamentumokon írtuk le. A fluoreszcencia spektroszkópiával szemben a TIRFM lehetőséget ad a nukleáció és az elongáció fázisainak elkülönített vizsgálatára. Ezek kvantitatív módon külön-külön is jellemezhetők a filamentumok darabszámának (nukleáció hatékonysága, darab) és növekedésük sebességének (v : *elongációs sebesség*, monomer $\times s^{-1}$) meghatározásával. Az elongációs sebesség egy filamentumra vonatkoztatva kerül meghatározásra, így nem függ a nukleációtól, csak az elongáció hatékonyságát tükrözi (dolgozat, 12. egyenlet, 86. oldal):

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

k_+ : asszociációs sebességi állandó

k_- : disszociációs sebességi állandó

$[A]$: a monomerek kezdeti ($t = 0$ s) koncentrációja

Flightless-I aktivitásai: *de novo* nukleáció és szöges vég sapkázás

További szempontként figyelembe kell vennünk azt, hogy a Flightless-I kettős hatással bír az aktin dinamika szabályozásában: egyrészt elősegíti a filamentumok *de novo* nukleációját (pozitív hatás), másrészt sapkázó (*capping*) aktivitása révén a szöges véghez kötődve gátolja azok elongációját (negatív hatás).

A 42. és 43. ábrán bemutatott eltérő mértékű csökkenés az alábbiak szerint értelmezhető.

A TIRFM kísérletekben az elongációs sebesség csak a filamentumnövekedés hatékonyságától függ. Így kizárólag a Flightless-I sapkázó aktivitását (negatív hatás) tükrözi, a nukleációs aktivitását (pozitív hatás) nem. A fluoreszcencia spektroszkópiai kísérletekben a polimerizációs sebesség a nukleáció és a filamentumnövekedés hatékonyságától is függ. Így a Flightless-I sapkázó aktivitását (negatív hatás) és nukleációs aktivitását (pozitív hatás) is tükrözi. A kisebb mértékű gátló hatás, ami ezzel a módszerrel megfigyelhető, annak tudható be, hogy a sapkázó aktivitás által okozott gátlást részben kompenzálja a nukleációra kifejtett serkentő hatás.

A dolgozatban tudatosan alkalmaztam eltérő elnevezéseket a két paraméterre (*polimerizációs sebesség* és *elongációs sebesség*) ezzel is jelezve a különböző módszertani megközelítést.

(6) A 44. ábra szerint a steady-state TIRFM mérések alapján 800 nM Fli-I koncentráció hatására az aktin filamentumok átlagos hossza kb. 1/30-ad részére csökken, de a filamentumok száma csak nagyjából ötszörösére nő. Hova lett az aktin ~80%-a?

Az Opponens által felvetett probléma értelmezésem szerint a fénymikroszkóp felbontóképességének korlátjából ered. Az alkalmazott kísérleti körülmények mellett a felbontási határ (d) körülbelül 206 nm (lásd a dolgozat 86. oldalán bemutatott adatok):

$$d = 0.61 \frac{\lambda}{NA} = 0.61 \frac{491 \text{ nm}}{1.45} \sim 206 \text{ nm}$$

Ez a filamentumhossz (l) tekintetében hozzávetőlegesen 76 monomernek felel meg (lásd a dolgozat 86. oldalán bemutatott adatok és megfontolások):

$$l = 206 \text{ nm} \times \frac{370 \text{ monomer}}{1000 \text{ nm}} \sim 76 \text{ monomer}$$

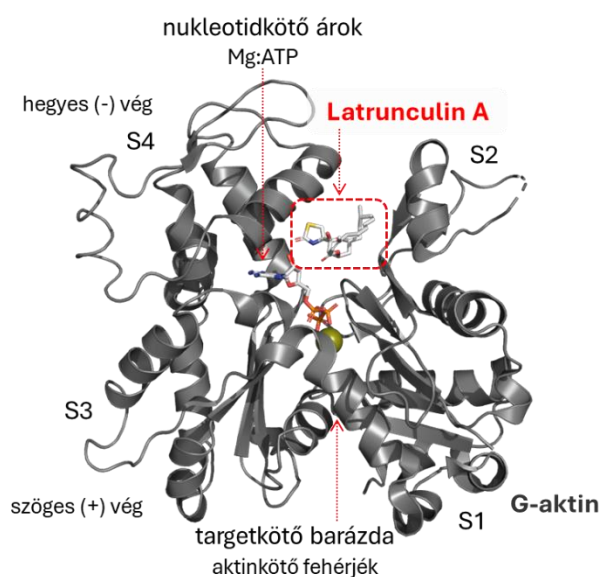
A Flightless-I elősegíti a filamentumok képződését (*de novo* nukleáció), ugyanakkor a keletkező filamentum szöges végén maradva sapkafehérjeként gátolja a növekedést (elongáció). Ezen aktivitások miatt a Flightless-I jelenlétében számos, de rövid filamentum jön létre. A méréseinkben azokat a filamentumokat, amiknek a hossza a fénymikroszkóp felbontási határa alá esett nem tudtuk detektálni. Ez a filamentumok számának alulbecslését és a filamentumhossz felülbecslését eredményezte. Fontos azonban hangsúlyozni, hogy ez nem befolyásolja a következtetéseinket, mivel azok nem az abszolút értékek, hanem az egyes paraméterek között megfigyelt relatív trendek értelmezésén alapunak.

(7) Az aktinkötő fehérjék aktin monomerekkel való kölcsönhatásának fluoreszcencia anizotrópiás vizsgálata során Latrunculin A kezeléssel gátolták a G-aktin polimerizációját. A LatA kötődése az aktinhoz nem befolyásolhatja-e az aktinkötő fehérjékkel kialakított kölcsönhatásokat?

A Latrunculin A (LatA):G-aktin komplex röntgenkristallográfiával meghatározott szerkezete ismert (5. ábra, PDB 1IJJ, PDB 1ESV [28, 29]). A LatA kötőhelye a monomer 2-es és 4-es szubdoménje közötti hasadékbán, a nukleotidkötő árokban, a nukleotid felett helyezkedik el. A dolgozat „Az aktin szerkezeti sajátosságai” fejezete (6-8. oldal, 2. ábra) tárgyalja, hogy az aktinkötő fehérjékkel való kölcsönhatásban kitüntetett szerepet játszik a monomer 1-es és 3-as szubdoménje közötti targetkötő barázda [30, 31]. A LatA kötőhelye a monomer ezzel ellentétes oldalán található.

A LatA kis mérete (421.55 Da) és kötőhelyének elhelyezkedése alapján nem várható, hogy jelentős mértékben befolyásolja az aktin és aktinkötő fehérjék kölcsönhatásait. Az irodalomban tudomásom szerint nincs ezzel kapcsolatos átfogó, több aktinkötő fehérjére kiterjedő vizsgálat. A rendelkezésre álló adatok alapján a LatA nem befolyásolja sem a profilin, sem a DNáz I G-aktinhoz való kötődését, míg a thymosin- β 4 (T β 4) G-aktin affinitása csökken LatA jelenlétében [32]. Kiegészítésként szolgálhat, hogy a DNáz I az aktin monomer hegyes végéhez kötődik (PDB 1ATN, PDB 2A42 [33, 34]), míg a profilin a szöges véghez kapcsolódik. A T β 4 mindkét régióval – a szöges és a hegyes véggel is – kölcsönhatásba lép. A T β 4 kötési módja megfeleltethető a WH2 doménekének [35]. A profilin:G-aktin és a WH2:G-aktin komplexek szerkezeti sajátosságait a dolgozat 31. ábrája (51. oldal) mutatja be.

Bár direkt módon nem vizsgáltuk a LatA ezen hatását, eredményeink alapján feltételezhető, hogy a LatA nem befolyásolja szignifikánsan az általunk vizsgált aktin:aktinkötő fehérje kölcsönhatásokat. A LatA alkalmazásán alapuló fluoreszcencia anizotrópia vizsgálataink eredményei kvantitatív tekintetben is összhangban vannak olyan mérésekkel, amik során nem alkalmaztunk LatA-t (pl. pirén aktin alapú polimerizációs és TIRFM kísérletek).



5. ábra A Latrunculin A (LatA):G-aktin komplex röntgenkristallográfiával meghatározott szerkezete (PDB 1IJJ, [28]). A targetkötő barázda az S1 és S3 szubdomének közötti mélyedés, amit túlnyomórészt hidrofób aminosavak alkotnak (pl. Tyr¹⁴³, Ala¹⁴⁴, Gly¹⁴⁶, Thr¹⁴⁸, Gly¹⁶⁸, Ile³⁴¹, Ile³⁴⁵, Leu³⁴⁶, Leu³⁴⁹, Thr³⁵¹, Met³⁵⁵).

(8) A Jelölt értelmezése szerint a profilin:G-aktin kölcsönhatás molekuláris kapcsolóként működik a DAAM, illetve a Fli-I aktin aktivitásainak szabályozásában. Mit értünk itt molekuláris kapcsoló alatt? Általában a molekuláris kapcsolóként működő fehérjék esetében egy konformációváltozás áll a jelenség hátterében. A profilin:G-aktin esetében nem egyszerűen csak egy sztérikus gátlásról van szó?

Az Opponens megjegyzését elfogadom. A „molekuláris kapcsoló” kifejezést általában olyan szabályozó fehérjére használjuk, ami konformációváltozás révén vált a „bekapcsolt”/aktív és „kikapcsolt”/inaktív állapot között; a bekapcsolt, például ligandum kötött állapotban képes kötődni a szabályozandó célfehérjéhez, míg a kikapcsolt állapotban nem (pl. G-fehérjék, kalmodulin [18]). A Flightless-I és a DAAM esetében a profilin:G-aktin kölcsönhatás „kapcsoló” szerepe nem ebben a klasszikus értelemben valósul meg, hanem az alábbiak szerint működik.

(i) Flightless-I

A Flightless-I esetében a profilin a *de novo* nukleációs aktivitást negatívan befolyásolja, ugyanakkor nincs hatással a Flightless-I közvetített filamentum elongációra (sapkafehérje-szerű aktivitás). Eredményeink arra utalnak, hogy a Flightless-I és a profilin kötőhelye a G-aktinon átfed, így a profilin G-aktinhoz való kötődése sztérikusan gátolja a Flightless-I:G-aktin interakciót (dolgozat, 46. ábra, 72. oldal).

(ii) DAAM

A forminok – így a DAAM – esetében a profilin mind a *de novo* nukleációs, mind az elongációs aktivitást befolyásolja [30]; a *de novo* nukleációs aktivitás negatív, a formin közvetített filamentum elongáció pozitív szabályozója.

A profilinnak a formin közvetített filamentum elongációra kifejtett pozitív hatása az alábbiak szerint magyarázható. A formin FH2 domén által kötött szöges vég kétféle állapotot vehet fel: nyitott, ami lehetővé teszi a monomerek asszociációját és zárt, ami azt gátolja [36, 37]. A formin jelenlétében a filamentumvég növekedésének sebessége a két állapot relatív időbeli előfordulásától függ, ami forminfüggő és széles skálán mozoghat ($t_{\text{nyitott}} : t_{\text{teljes}} \sim 5-90\%$). A forminok izolált FH2 doménje lassítja a szöges vég növekedését profilin hiányában. A formin FH1 domén egy vagy több poli-prolin szakaszt tartalmaz. A profilin eze(ke)n keresztül kötődve az FH1 doménhez segíti elő a G-aktin toborzását az FH2 domén számára. Az FH1 domén az FH2 domén N-terminális szomszédságában helyezkedik el és flexibilis „karként” működve juttatja el a profilin:G-aktint az FH2 kötött filamentumvéghez, támogatva ezzel a szöges vég növekedését.

Az egyes formin altípusok nukleációs és elongációs aktivitása kvalitatív módon nem, csak kvantitatív jellemzőiben tér el [30, 38]. A kinetikai jellemzők alapján a formin családban két szélsőséget képvisel például a DAAM és az mDia1. A DAAM profilin hiányában sapkafehérje-szerű módon szinte teljesen gátolja a filamentumok elongációját, míg profilin jelenlétében a DAAM közvetített elongáció sebessége eléri a szöges vég spontán növekedési sebességét [39]. Ezzel szemben az mDia1 profilin hiányában csak mérsékelten gátolja az elongációt, profilin jelenlétében pedig az mDia1 közvetített elongáció sebessége akár az ötszöröse is lehet a szöges vég spontán növekedési sebességének [38]. Az mDia1 az idő 90%-ában nyitott állapotban van és FH1 doménje 14 potenciális profilin:G-aktin kötőhellyel rendelkezik. A rekombináns úton előállított mDia1 fehérjével végzett vizsgálatokat megerősítik a sejtes megfigyelések; az mDia1 fibroblasztokban másodpercenként 700 „monomernyi” filamentumot képes növesztetni [40].

Apróbb megjegyzések:

- Az értekezés végén található rövidítések jegyzékéből egyes rövidítések kimaradtak (pl. DADCT, cDAAM, GH13, GH16, TpmBr3, Tpm5NM1).

Az Opponens megjegyzése jogos. A felsorolt rövidítések nem szerepelnek a jegyzékben, azokhoz kapcsolódó rövidítések megtalálhatóak a listában (pl. DAD, DAAM, GH és Tpm).

- Az elért eredmények tárgyalásánál a könnyebb követhetőség kedvéért hasznos lett volna direkt módon utalni az egyes eredményeket bemutató saját publikáció(k)ra, nem csak a fejezet végén felsorolni a kapcsolódó közlemények listáját.

Az Opponens észrevételét elfogadom és egyetértek azzal, hogy az elért eredmények tárgyalásánál a saját publikációkra való direkt utalás a könnyebb követhetőséget és áttekinthetőséget szolgálta volna.

- Feleslegesnek tűnik minden fejezet végén újra és újra teljes részletezettséggel megadni a kapcsolódó saját publikációkat. Számos saját publikáció így 3-4-szeres ismétlésben szerepel részletes publikációs adatokkal. Elég lett volna az értekezés alapjául szolgáló közlemények listájában sorszámmal ellátni őket és hivatkozásul azokat megadni.

A publikációk megadásával kapcsolatos megjegyzést elfogadom.

- 40. ábra: Az összerendezett szekvenciák legfelső blokkjában a 3 Fli-I szekvencia hibásan egy pozícióval jobbra tolódott.

Az Opponens megjegyzése jogos. Sajnos ez egy elírásként maradt az ábrán.

- A 4. ábra leírása és szövegbeli magyarázata túlságosan szűkszavú és nehezen követhető.

Az Opponens megjegyzését elfogadom. A 4. ábra (11. oldal) részletesebb bemutatása és szövegbeli kifejtése jobban szolgálta volna az érthetőséget.

Az Opponens által megfogalmazott kérdések mellett az alábbi észrevételekre szeretnék kitérni és reagálni.

A disszertáció alapjául szolgáló közlemények közé nem volt szerencsés beválogatni a Barkó és mts. (2010) cikket, mert annak eredményei Mihály József MTA doktori értekezésében (2010) bemutatásra kerültek, ezért ismételtén már nem felhasználhatók.

Sajnos „A DAAM formin homológia domének fiziko-kémiai sajátosságai” témakörben az 1-6. pontokban leírt megállapításokat a Jelölt új tudományos eredményeiként nem tartom elfogadhatónak, mert azok Mihály József MTA doktori értekezésében (2010) gyakorlatilag azonos tartalommal már bemutatásra kerültek.

#Barkó Szilvia, **#Bugyi Beáta**, Carlier Marie-France, Gombos Rita, Matusek Tamás, Mihály József, Nyitrai Miklós ✉
Characterization of the biochemical properties and biological function of the formin homology domains of *Drosophila* DAAM.

JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 285 : 17 pp. 13154-13169. , 16 p. (2010)

IF: 5.328 Folyóiratcikk (Szakcikk) Tudományos

megosztott első szerzős közlemény

Az idézett publikációban megosztott első szerzőként szerepelek (*"Both authors contributed equally to this work."*). Ez a szerzői hierarchia a munkamegosztás valós arányának megfelelően került kialakításra és pontosan mutatja be a munkához való hozzájárulásomat. Az általam elvégzett kísérleteket (beleértve a kísérleti körülmények optimalizálását, az ismétlések végrehajtását, az adatok kiértékelését és az eredmények értelmezését) a publikációban bemutatott ábrák számozása szerint adom meg az alábbiakban.

Figure 3. B, C, D; Figure 4. B, C, D

- egyedi filamentumok megfigyelésén alapuló TIRFM kísérletek, profilin hiányában és jelenlétében (*dual color* TIRFM)
- a szöges/hegyes vég növekedésének specifikus vizsgálatára lehetőséget adó gelsolin/spektrin aktin *seed* alapú fluoreszcencia spektroszkópiai vizsgálatok, profilin hiányában és jelenlétében

Figure 5. C

- steady-state G:F aktin arány vizsgálata

Figure 6. A-E

- formin funkcionizált mikrogöngyökön alapuló biomimetikus módszertan, az mDia1 és a DAAM összehasonlító vizsgálata

Az általam végzett vizsgálatok és az azokból származó eredmények alapvetően járultak hozzá a DAAM formin homológia domének fiziko-kémiai sajátosságainak feltérképezéséhez, ezért a dolgozatomban való szerepeltetésüket szakmailag indokoltnak tartottam. A Doktori Tanács segítőkész kollégái által nyújtott tájékoztatás alapján a VIII. Biológiai Tudományok Osztálya, Biofizikai Osztályközi Bizottsághoz benyújtott pályázathoz nem szükséges társszerzői nyilatkozat mellékelése. Értesítést nem kaptam arról, hogy ezek az eredmények doktori értekezésében már felhasználásra kerültek.

Mindezek alapján tisztelettel kérem az Opponens, hogy fogadja el a szerzői hozzájárulásomat, valamint *A DAAM formin homológia domének fiziko-kémiai sajátosságai* témakörben az 1-6. pontokban leírt megállapításokat a dolgozat új tudományos eredményeként.

3. A Flightless-I nagy affinitású filamentumvég kötése révén az aktin sejtvázdinamika negatív szabályozója. Ugyanakkor a DAAM C-terminálisával (DAD-CT) kialakított direkt kölcsönhatása révén a sejtváz DAAM közvetített szabályozásában is szerepet játszhat.

Az első általános állítás igaz, de már korábban is ismert volt (Mohammad et al., 2012), és nem köthető egyértelműen a Jelölt munkásságához.

Az Opponens által hivatkozott publikációban rekombináns úton előállított Flightless-I aktivitását vizsgálták pirén aktin alapú polimerizációs kísérletekben. A *bulk* filamentum sokaságon végzett fluoreszcencia spektroszkópiai mérések eredményei utalnak a Flightless-I sapkázó aktivitására ([41] irodalmi hivatkozás Figure 3. jelölésű ábráján bemutatott adatok). Ugyanakkor úgy gondolom, hogy a munkánk érdemben bővíti a Flightless-I fehérjével kapcsolatos ismereteket: egyedi aktin filamentumokon mutattuk be a sapkázó aktivitást, meghatároztuk a filamentumvégekhez való kötődés affinitását, valamint leírtuk a profilin hatását a fehérje aktivitásaira.

Tisztelettel kérem az Opponenst a fenti kiegészítés figyelembevételére az eredmény megítélésekor.

Irodalomjegyzék

1. 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.
2. Gould, C.J., et al., *The formin DAD domain plays dual roles in autoinhibition and actin nucleation*. Curr Biol, 2011. **21**(5): p. 384-90.
3. Schütz, A., et al., *A concise guide to choosing suitable gene expression systems for recombinant protein production*. STAR Protoc, 2023. **4**(4): p. 102572.
4. Chung, C.R., et al., *dbPTM 2025 update: comprehensive integration of PTMs and proteomic data for advanced insights into cancer research*. Nucleic Acids Res, 2025. **53**(D1): p. D377-D386.
5. Kis-Bicskei, N., et al., *Purification of tropomyosin Br-3 and 5NM1 and characterization of their interactions with actin*. Cytoskeleton (Hoboken), 2013. **70**(11): p. 755-65.
6. Kis-Bicskei, N., et al., *Tropomyosins Regulate the Severing Activity of Gelsolin in Isoform-Dependent and Independent Manners*. Biophys J, 2018. **114**(4): p. 777-787.
7. 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.
8. Bell, M.R., et al., *To fuse or not to fuse: what is your purpose?* Protein Sci, 2013. **22**(11): p. 1466-77.
9. Pintér, R., et al., *The activities of the gelsolin homology domains of Flightless-I in actin dynamics*. Front Mol Biosci, 2020. **7**: p. 575077.
10. Nag, S., et al., *Gelsolin: the tail of a molecular gymnast*. Cytoskeleton (Hoboken), 2013. **70**(7): p. 360-84.
11. 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.
12. 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.
13. Pantaloni, D., C. Le Clainche, and M.F. Carlier, *Mechanism of actin-based motility*. Science, 2001. **292**(5521): p. 1502-6.
14. Bugyi, B. and M.F. Carlier, *Control of actin filament treadmilling in cell motility*. Annu Rev Biophys, 2010. **39**: p. 449-70.
15. 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.
16. Ghasemi, F., et al., *Regeneration of actin filament branches from the same Arp2/3 complex*. Sci Adv, 2024. **10**(4): p. eadj7681.
17. 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.
18. Nyitrai, L. and G. Pál, *A biokémia és molekuláris biológia alapjai*. 2013.
19. 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.
20. Bisswanger, H., *Multiple Equilibria, Principles, and Derivations*, in *Enzyme Kinetics*. 2017. p. 1-26.
21. Copeland, R., *Enzymes. A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*. Vol. 45. 2000: John Wiley & Sons, Inc. 5607-5607.
22. 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.
23. Bisswanger, H., *Cooperativity and Allosteric Enzymes*, in *Enzyme Kinetics*. 2017. p. 27-53.
24. Weiss, J.N., *The Hill equation revisited: uses and misuses*. The FASEB Journal, 1997. **11**(11): p. 835-841.

25. 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.
26. 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.
27. Pollard, T.D., *Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 2007. **36**: p. 451-77.
28. Morton, W.M., K.R. Ayscough, and P.J. McLaughlin, *Latrunculin alters the actin-monomer subunit interface to prevent polymerization*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(6): p. 376-8.
29. Bubb, M.R., et al., *Polylysine induces an antiparallel actin dimer that nucleates filament assembly: crystal structure at 3.5-A resolution*. J Biol Chem, 2002. **277**(23): p. 20999-1006.
30. Pollard, T.D., *Actin and Actin-Binding Proteins*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2016. **8**(8).
31. Amann, K.J. and T.D. Pollard, *Direct real-time observation of actin filament branching mediated by Arp2/3 complex using total internal reflection fluorescence microscopy*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001. **98**(26): p. 15009-15013.
32. Yarmola, E.G., et al., *Actin-latrunculin A structure and function. Differential modulation of actin-binding protein function by latrunculin A*. J Biol Chem, 2000. **275**(36): p. 28120-7.
33. Kabsch, W., et al., *Atomic structure of the actin:DNase I complex*. Nature, 1990. **347**(6288): p. 37-44.
34. Chereau, D., et al., *Actin-bound structures of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP)-homology domain 2 and the implications for filament assembly*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(46): p. 16644-9.
35. Renault, L., B. Bugyi, and M.F. Carlier, *Spire and Cordon-bleu: multifunctional regulators of actin dynamics*. Trends Cell Biol, 2008. **18**(10): p. 494-504.
36. Vavylonis, D., et al., *Model of formin-associated actin filament elongation*. Mol Cell, 2006. **21**(4): p. 455-66.
37. Mark, E.Z., et al., *Nucleation limits the lengths of actin filaments assembled by formin*. Biophysical Journal, 2021. **120**(20): p. 4442-4456.
38. Kovar, D.R., et al., *Control of the assembly of ATP- and ADP-actin by formins and profilin*. Cell, 2006. **124**(2): p. 423-35.
39. 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.
40. Higashida, C., et al., *Actin polymerization-driven molecular movement of mDia1 in living cells*. Science, 2004. **303**(5666): p. 2007-10.
41. 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.