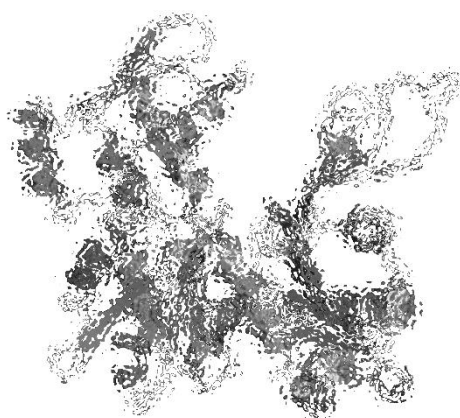


MTA Doktori Értekezés

Az aktin sejtváz funkcionális polimorfizmusa: aktinkötő fehérjék vizsgálata

Bugyi Beáta



Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
2024



Tartalomjegyzék

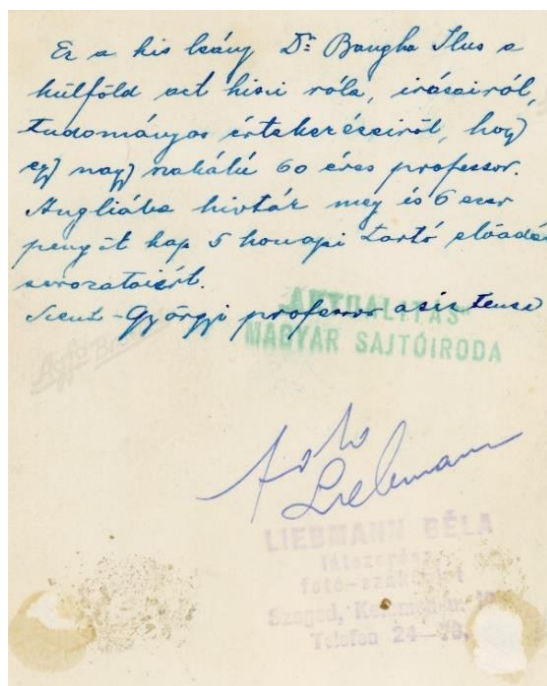
Tartalomjegyzék	2
1. Bevezetés	4
Az aktin fehérje, több mint 80 évnyi folyamatos inspiráció.....	4
Az aktin inherens fiziko-kémiai sajátosságai.....	5
Az aktin önszerveződésének mechanizmusai.....	9
Az intracelluláris aktin hálózatok funkcionális polimorfizmusa.....	10
A sejt motilis sajátágaiban meghatározó citoszeletális polimer rendszerek.....	12
Kapcsolódó publikációk, az eredmények közzései helyének megadása.....	14
2. Motiváció, hipotézis, célkitűzések	16
3. Eredmények és megbeszélésük	17
3.1. A tropomiozin izoformák a protrúziós aktin hálózatok, a lamellipodium és a lamella koordinációjában	17
A tropomiozin fehérjecsatlád.....	17
Hipotézis, célkitűzések, kérdések.....	19
Eredmények és következtetések.....	20
Összefoglalás.....	32
Tudományos szempontból új eredmények.....	34
Kapcsolódó publikációk, az eredmények közzései helyének megadása.....	35
3.2. A DAAM formin az aktin sejtvezdinamika szabályozásában	36
A formin fehérjecsatlád.....	36
Hipotézis, célkitűzések, kérdések.....	38
Eredmények és következtetések.....	38
Összefoglalás.....	53
3.3. A DAAM formin az aktin és a mikrotubulus sejtvez funkcionális integrációjában	55
A formin fehérjecsatlád az aktin:mikrotubulus sejtvez funkcionális koordinációjában.....	55
Hipotézis, célkitűzések, kérdések.....	55
Eredmények és következtetések.....	55
Összefoglalás.....	58
Tudományos szempontból új eredmények.....	62
Kapcsolódó publikációk, az eredmények közzései helyének megadása.....	62
3.4. A Flightless-I gelsolin homológ fehérje az aktin sejtvezdinamika szabályozásában	64
A gelsolin homológ fehérjecsatlád.....	64
Hipotézis, célkitűzések, kérdések.....	65
Eredmények és következtetések.....	66
Összefoglalás.....	73
Tudományos szempontból új eredmények.....	76
Kapcsolódó publikációk, az eredmények közzései helyének megadása.....	76
4. Módszerek	77
Fehérjék előállítása és módosítása.....	77
Általános kísérleti körülmények.....	78
Fluoreszcencia spektroszkópiái vizsgálatok.....	78
<i>Fluoreszcencia emisszió és anizotrópia vizsgálatok</i>	78
Fluoreszcencia spektroszkópiái módszer validálása a G-aktin kölcsönhatás vizsgálatára.....	79
<i>Kinetikai vizsgálatok</i>	84
Az aktin filamentumok összeszerelődésének kinetikai vizsgálata.....	84
Az aktin filamentumok szétszerelődésének kinetikai vizsgálata.....	85
Fénymikroszkópiái vizsgálatok.....	85
<i>Biomimetikus modellrendszerekkel történt vizsgálatok</i>	85
<i>Teljes belső visszaverődésen alapuló fluoreszcencia mikroszkópiái (TIRFM) vizsgálatok</i>	86
Az aktin filamentumok de novo nukleációjának és elongációjának vizsgálata.....	86

Az aktin filamentumok szétszerelődésének vizsgálata.....	87
Az aktin filamentumok vég-vég kapcsolódásának vizsgálata - annealing kísérletek.....	88
Szedimentáción alapuló vizsgálatok.....	88
Fehérjeszerkezeti, doménszerkezeti ábrák	89
Kapcsolódó publikációk, az eredmények közlési helyének megadása.....	90
5. Szintézis - tézispontok, tudományos szempontból új eredmények.....	92
6. Közlemények listája	93
Az értekezés alapjául szolgáló tudományos közlemények.....	93
További tudományos közlemények.....	95
7. Köszönetnyilvánítás.....	99
8. Függelék	102
Kiegészítő ábrák és táblázatok	102
Rövidítések és jelölések jegyzéke	103
9. Irodalomjegyzék	106

1. Bevezetés

Az aktin fehérje, több mint 80 évnyi folyamatos inspiráció

Az aktinkutatás története az 1940-es évek elején a II. világháború alatt kezdődött Szent-Györgyi Albert laboratóriumában a Szegedi Tudományegyetem Orvosi Kémiai Intézetben (1. ábra). Az aktin fehérjét Szent-Györgyi munkatársaival, Banga Ilonával és Straub F. Brunóval azonosította és izolálta elsőként nyúl vázizomból [1-7]. Korszakalkotó eredményeiket a *Studies* három kötetében publikálták. A tanulmányok facsimile kiadása a közelmúltban látott napvilágot [8]. A felfedezés az izom biokémiai és orvosbiológiai kutatások egyik mérföldköve, többek között azért is, mert az aktin azonosítása és izolálása mellett elsőként mutatott rá az aktin és a miozin II közötti ATP-függő kölcsönhatás jelentőségére az izomkontrakcióban.



1. ábra: Szent-Györgyi Albert laboratóriumában legközvetlenebb munkatársával, Banga Ilonával.

Az ábra forrása: SZTE Klebelsberg Könyvtár Képtár és Médiatéka, létrehozó: Liebmann Béla [9].

Az ezt követő több mint 80 évnyi kutatómunka az aktin funkcionális sokszínűségét tárta fel (1. táblázat). Mára ismert, hogy az aktin nem csupán az izom, de a nemizom sejtekben is nélkülözhetetlen alkotó. Az aktin sejtváza meghatározó jóformán minden sejtfunkcióban, sokrétű működését az aktinkötő fehérjék tárháza finomhangolja [10-12]. Az aktin sokoldalúsága bővült annak felismerésével, hogy a citoplazma mellett a fehérje a sejtmagban is előfordul [13-16]. Itt szerepet játszik többek között a transzkripció szabályozásában, a kromatin átrendeződésben, a DNS hibajavításban és import/export folyamatokban. A következő áttörést a bakteriális genom által kódolt aktin homológ fehérjék (pl. MreB, FtsA, MamK, ParM) azonosítása jelentette, amelyek a sejtosztódásban, a sejt morfológia kialakításában, a sejtfal bioszintézisében, a DNS szegregációban és a magnetotaxisban játszanak szerepet [17-19]. Az aktin evolúciójának tekintetében jelentős felfedezéshez vezetett

az *Archaea* domén *Asgard* rendszertani csoportjának genomikai elemzése, amely számos eukarióta homológ fehérjét, így aktint és aktinkötő fehérjéket kódoló gént is (pl. profilin, gelsolin, cofilin) azonosított [20-23]. Említésre méltó továbbá, hogy az aktin inherens sajátságai távolinak tűnő területek szakembereit, mérnököket és matematikusokat is inspirálnak, akik 3D aktin hálózatok alkotta elektromos kapcsolatok [24] vagy az aktomiozin gépezet alapú nanofabrikált bioszámítógépek [25] építését valósították meg.

1941 - 1943	aktin felfedezése és extrakciója izomszövetből izom sejtek - erő kifejtés/kontrakció <i>Studies</i>
1950-es évek	aktin a nemizom sejtekben nemizom sejtek - erő kifejtés/motilitás a funkcionális polimorfizmus alapja: „ <i>egy aktin minden funkcióra</i> ” elv
1977	sejtmagi aktin 2022. 1 st Nuclear Actin Symposium – Szeged, Hungary ¹
2000-es évek	bakteriális aktin homológok/aktinszerű fehérjék a funkcionális polimorfizmus alapja: „ <i>minden funkcióra egy aktin</i> ” elv
2015, 2017	<i>Archaea</i> domén aktin és aktinkötő fehérjei
2013, 2016	műszaki alkalmazások 3D aktin hálózatok alkotta elektromos kapcsolatok aktomiozin gépezet alapú nanofabrikált bioszámítógépek

1. táblázat: Az aktinkutatás mérföldkövei.

A mérföldkövek rövid leírását és az azokhoz tartozó irodalmi hivatkozásokat a szöveg részletezi.

Az aktin inherens fiziko-kémiai sajátságai

Az aktin géncsalád, fehérje izoformák

Az emlősök (*Mammalia*) genomja hat aktint kódoló gént tartalmaz, ezek mindegyikéről egy fehérje izoforma képződik (kanonikus izoformák, 2. táblázat, szürke háttér) [26-28]. Az izoformák eloszlása szövetspecifikus: két izoforma a nemizom sejtekben (β -citoplazmatikus (*Actb*), γ -citoplazmatikus (*Actg1*)), négy izoforma pedig az izomsejtekben fejeződik ki (α -vázizom (*Acta1*), α -szívizom (*Actc1*), α -vaszkuláris simaizom (*Acta2*), γ -enterális simaizom (*Actg2*)). A gerinces altörzs (*Vertebrata*) aktin géncsaládhoz további két ortológ tartozik (aktin $\alpha 4$ (*Acta4*), aktin $\epsilon 1$ (*Acte1*)) [28].

¹ <https://nuclear-actin-symposium.webnode.hu/>

<i>előfordulás/sejttípus</i>	<i>NCBI gén jelölés</i>	<i>fehérje</i>	<i>UniProt azonosító humán</i>	
citoplazmatikus	<i>Actb</i>	β-citoplazmatikus aktin	P60709	
	<i>Actg1</i>	γ-citoplazmatikus aktin	P63261	
izom	<i>Acta1</i>	α-vázizom aktin	P68133	
	<i>Actc1</i>	α-szívizom aktin	P68032	
	¹ <i>Acta4</i>	aktin α4	#P04752	
	sima	<i>Acta2</i>	α-vaszkuláris simaizom aktin	P62736
		<i>Actg2</i>	γ-enteriális simaizom aktin	P63267
		^{1,2} <i>Acte1</i>	aktin ε1 aktin	##D3YYH9

2. táblázat: A gerincesek aktin génállományának nómenklatúrája.

kanonikus aktin izoformák: szürke háttér

¹az emlős géncsaládban nem előforduló ortológ

²a harántcsíkolt- és simaizom aktin fehérjecsoporttól különálló csoportot képez filogenetikai tekintetben

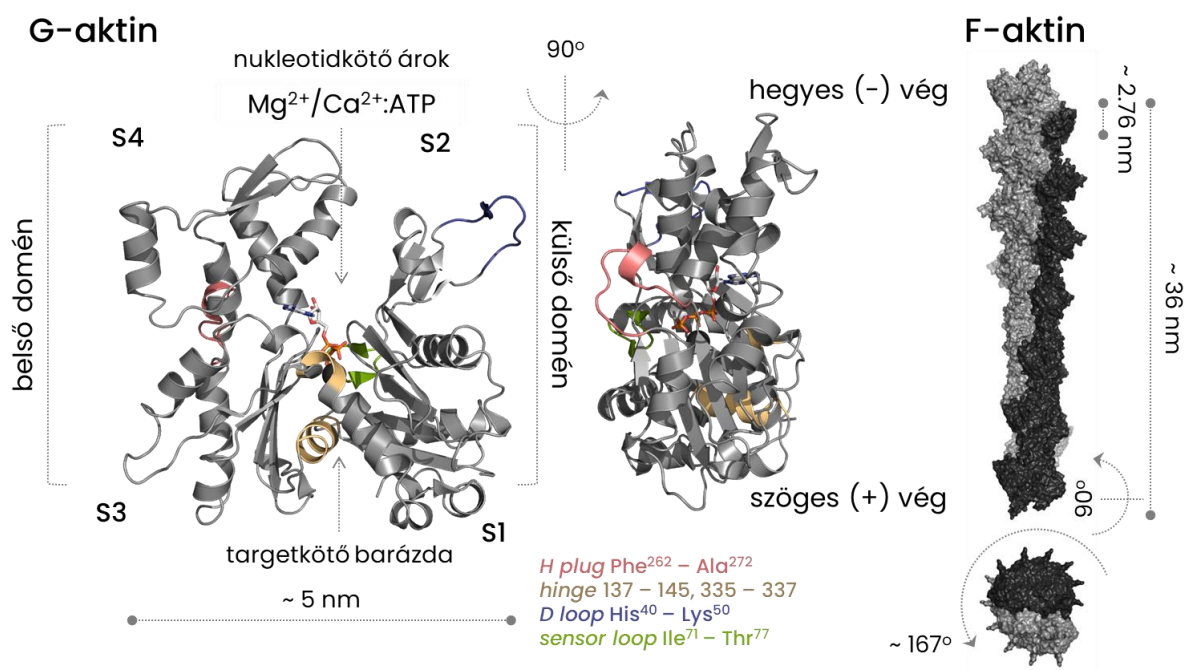
Xenopus laevis, ## *Mus musculus*

Az aktin szerkezeti sajátságai

Az aktin fehérje intracellulárisan és extrakcióját követően két formában fordulhat elő: gömbszerű, illetve inkább lapos, a szalagosfánk alakjára emlékeztető monomerként (globuláris, G-aktin) és a monomerek összekapcsolódása révén létrejött polimerként (filamentális, F-aktin) (2. ábra) [29, 30]. A két forma leírása elsőként Straub viszkozimetriai mérései alapján történt meg, a G-aktin és F-aktin elnevezés Szent-Györgyitől származik [31]. A G-aktin első atomi felbontású szerkezetét Kenneth Charles Holmes kutatócsoportja határozta meg röntgenkristallográfia segítségével 1990-ben (PDB 1ATN, felbontás = 2.80 Å [32]). Napjainkban az aktin molekulának több mint 100 kristályszerkezete érhető el (pl. vad típusú és mutációt hordozó formák, különböző ligandokkal alkotott komplexek), így a szerkezeti sajátságai jól ismertek. Az F-aktin első szerkezeti modelljét ugyancsak a Holmes laboratórium készítette el olyan módon, hogy a filamentumok száldiffrakciós képét a G-aktin kristályszerkezetével illesztették (felbontás = 8.4 Å [33]). A felbontásban jelentős áttörést a 2010-es években értek el [34, 35]. Ez egyrészt a röntgendiffrakció és egy speciális mintakészítési eljárás (kontrollált hosszúságú F-aktin szol) ötvözésének (felbontás_{radiális} = 3.3 Å, felbontás_{ekvátor} = 5.6 Å [34]), másrészt pedig a kriogén elektronmikroszkópia (krio-EM) fejlődésének köszönhető (felbontás = 6.6 Å [35]). A krio-EM technika alkalmazásával napjainkban elérhetővé vált az F-aktin közel atomi felbontású (~ 3.0 – 4.2 Å) szerkezete különböző nukleotid állapotokban (ATP, ADP.Pi, ADP [36-40], toxinokkal (jasplakinolide [37], falloidin [41, 42], fluoreszcens jelzővegyületek (N-(1-pirén)-jóacetamid [38]) és aktinkötő fehérjékkel kialakított komplexekben is (lifeAct [41, 43, 44], utrophin [41], tropomiozin izoformák [45-47], miozin [42, 46], Arp2/3 komplex [48], formin Cdc42, INF2 és mDia1 [49]).

Érdemes megjegyezni, hogy a polimerizációra való hajlam, illetve a polimer geometriai sajátságai az F-aktin atomi felbontású szerkezetének meghatározása tekintetében kihívások elé állították a tudományos közösséget. Az aktin szerkezeti sajátságainak és konformációs

dinamikájának megismerésében kiemelt szerepet kaptak a spektroszkópia (pl. elektron paramágneses rezonancia spektroszkópia (EPR), fluoreszcencia és foszforeszcencia spektroszkópia) vagy a termikus analízis módszerei (pl. differenciális pásztázó kalorimetria (DSC)). Az aktin konformációs dinamikai sajátosságainak vizsgálatára alkalmazott spektroszkópai módszerekről rövid áttekintést ad összefoglaló közleményünk [50].



2. ábra: Az aktin monomer (G-aktin) és polimer (F-aktin) szerkezeti sajátosságai.

G-aktin. Az aktin monomer röntgendiffrakcióval meghatározott szerkezete (PDB 1ATN) [32].

F-aktin. Az aktin filamentum Oda féle szerkezeti modellje [34]. Az egyszálú, balmenetes, kis menetemelkedésű hélixet egymást követő világos és sötét színnel jelölt alegységek alkotják. A duplaszálú, jobbménetes, nagy menetemelkedésű hélixet rendre a világos, illetve sötét színnel jelölt alegységekből felépülő láncok alkotják.

1. G-aktin

A monomer két nagy doménre (a filamentumbeli elhelyezkedésük alapján belső és külső domén) osztható, amelyeket rendre 2-2 szubdomén alkot (S1-2 és S3-4) (2. ábra). A G-aktin egy kétértékű fémionnal (Ca^{2+} , Mg^{2+}) komplexált adenosin nukleotidot (ATP, ADP.Pi, ADP) köt. A köthely az S2 és S4 szubdomének közötti mediális, viszonylag mély hasadékban található (nukleotidkötő árok, hegyes (-) vég). A kétértékű kation intracellulárisan magnézium, míg *in vitro*, a fehérjetisztítás során kalcium. Az S1 és S3 szubdomének közötti mélyedést túlnyomórészt hidrofób aminosavak alkotják (pl. Tyr¹⁴³, Ala¹⁴⁴, Gly¹⁴⁶, Thr¹⁴⁸, Gly¹⁶⁸, Ile³⁴¹, Ile³⁴⁵, Leu³⁴⁶, Leu³⁴⁹, Thr³⁵¹, Met³⁵⁵). A régió kitüntetett szerepet játszik az aktinkötő fehérjékkel való kölcsönhatásban (targetkötő barázda, szögcs (+) vég) [12, 51].

2. F-aktin

A filamentum egy egyszálú, balmenetes, kis menetemelkedésű hélixként írható le (2. ábra). A G-F transzformáció során az alegységek ezen hélix mentén épülnek a polimerbe. A hélix mentén egy alegység a szomszédjához képest ~2.76 nm-rel eltolva és ~167°-kal elfordulva

helyezkedik el. Mivel az alegységenkénti fordulat ($\sim 167^\circ/\text{alegység}$) közel 180° a filamentum tekinthető egy duplaszálú, jobbmenetes hélixnek is. Ennek félmenetemelkedése ~ 36 nm (~ 13.9 fordulat/ μm), ami 13 alegységet (tridekamer) foglal magába. Az aktin filamentumban a monomerek rendezett orientációja annak szerkezeti polaritását eredményezi. A miozin II nehéz meromiozin fragmentumával (*heavy meromyosin*, HMM) dekorált aktin filamentumok negatív festéssel készített elektronmikroszkópos képe a miozin szembeötlő, nyílhegyszerűen irányított elrendeződését fedte fel [52]. A mintázat alapján a filamentum két végét szöges (*barbed*, (+)), illetve hegyes (*pointed*, (-)) végnek nevezték el. A filamentum szerkezeti stabilitásában longitudinális ($E = 12\text{--}20$ kT) és laterális ($E = 4\text{--}8$ kT) kapcsolatok is szerepet játszanak [53]. Hosszanti irányban az egyik alegység DNáz I-kötő régiója (*D loop*, 2. ábra) kölcsönhatást alakít ki a soron következő alegység targetkötő zsebével és S3 szubdoménjével (Tyr¹⁶⁹). A hossz tengelyre merőleges irányban az egyik alegység hidrofób régiója (*H plug*, 2. ábra) inzertálódik a másik szál két szomszédos alegysége közé, a kölcsönhatásban az egyik alegység DNáz I-kötő régiója is szerepet játszik.

Az aktin ATPáz

A G-aktin nem hatékony ATPáz ($k_{\text{hidrolízis}} \sim 10^{-6} \text{ s}^{-1}$). Az ATPáz aktivitást a monomerek filamentumba szerveződése során bekövetkező szerkezeti változások triggerelik [36, 37, 54–56]. Az aktin össze-, és szétszerelődési folyamatai és ATPáz aktivitása az alábbi ciklus szerint kapcsolódnak [39].

1. $ATP-G \rightarrow ATP-F$

A monomer filamentumba épülése során az aktin külső és belső doménje $\sim 15\text{--}20^\circ$ -kal elfordul egymáshoz képest a csuklópánt régió (*hinge*, 2. ábra) körül és a molekula kilaposodik [34].

2. $ATP-F \rightarrow ADP.Pi-F$

A két nagy domén (külső és belső) egymáshoz képesti rotációja a katalitikus zseb Gln¹³⁷ és His¹⁶¹ oldalláncainak elmozdulását és a vízmolekulák átrendeződését (W1 támadó és W2 segítő) eredményezi [36, 37]. Ezek a szerkezeti változások facilitálják az ATP hidrolízist ($k_{\text{hidrolízis}} \sim 0.1 \text{ s}^{-1}$).

3. $ADP.Pi-F \rightarrow ADP-F$

A foszfátcsoport disszociációja eltérő kinetikával történik a szöges végen ($k_{\text{Pi disszociáció}} \sim 1 \text{ s}^{-1}$) és az attól távolabbi filamentumszegmenseken ($k_{\text{Pi disszociáció}} \sim 0.001 \text{ s}^{-1}$). Az alegységek nukleotid tartalma így inhomogén a filamentum mentén (ATP, ADP.Pi vagy ADP) [57].

4. $ADP-F \rightarrow ADP-G$

A foszfátcsoport disszociációját követő változások a nukleotidkötő hely környezetében kihatnak a DNáz I-kötő hurokra (*D loop*) az S2 szubdoménben. A *D loop* mind az oldalirányú, mind a hosszirányú kapcsolatokban meghatározó, az abban bekövetkező szerkezeti változások alegységről alegységre áttevődve, kumulatív módon a filamentum integritásának megbomlását és destabilizációját eredményezhetik.

5. $ADP-G \rightarrow ATP-G$

Az alegységek filamentumról történő leválását követően a kötött nukleotid cseréje az aktin monomeren történik.

Az aktin önszerveződésének mechanizmusai

Az aktin sejtmentes környezetben és aktinkötő fehérjék hiányában is képes filamentumokba és filamentumokból álló magasabb rendű struktúrákba szerveződni (3. ábra).

1. De novo nukleáció és szekvenciális alegység beépülés (elongáció) - polimerizáció

Az aktin filamentumok kialakulása megfelelő biokémiai környezetben (pl. ionerősség, aktin koncentráció) spontán módon végbemegy. A nukleáció során két (dimer), illetve három (trimer) monomer asszociációja révén nukleuszok alakulnak ki. A nukleáció a polimerizáció sebességmeghatározó lépése. A Brown-dinamikán alapuló szimulációval becsült kinetikai paraméterek szerint a nukleációs intermedierek asszociációja viszonylag gyors ($k_+ \sim 1\text{-}10 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$), azonban a disszociáció valószínűsége nagy ($k_- \sim 10\text{-}10^{10} \text{s}^{-1}$) [58]. A nukleációt követően a monomerek diffúziógátolt filamentumba épülése azok hossznövekedését (elongáció) eredményezi. A szerkezeti sajátosságok miatt az alegységek asszociációs és disszociációs sebességi állandói eltérőek a filamentum szöges és hegyes végén, ami annak kinetikai polaritását eredményezi [59, 60] (3. táblázat). Egyensúlyban a monomer:filamentum arány állandó. Az egyensúlyi szabad G-aktin koncentráció a kritikus koncentráció (c_c), ami az aktin ATPáz aktivitása miatt nem klasszikus értelemben vett disszociációs egyensúlyi állandó ($K_D = k_-/k_+$).

nukleotidállapot	filamentumvég	asszociációs sebességi állandó $k_+ (\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$	disszociációs sebességi állandó $k_- (\text{s}^{-1})$	kritikus koncentráció $c_c = k_-/k_+ (\mu\text{M})$
ATP	szöges vég	11.6	1.4	0.12
	hegyes vég	1.3	0.8	0.62
ADP.Pi	szöges vég	3.4	0.2	0.06
	hegyes vég	0.11	0.02	0.18
ADP	szöges vég	2.9	5.4	1.80
	hegyes vég	0.14	0.25	1.80

3. táblázat: Az aktin filamentumok össze-, és szétszerelődését jellemző sebességi állandók és kritikus koncentráció.

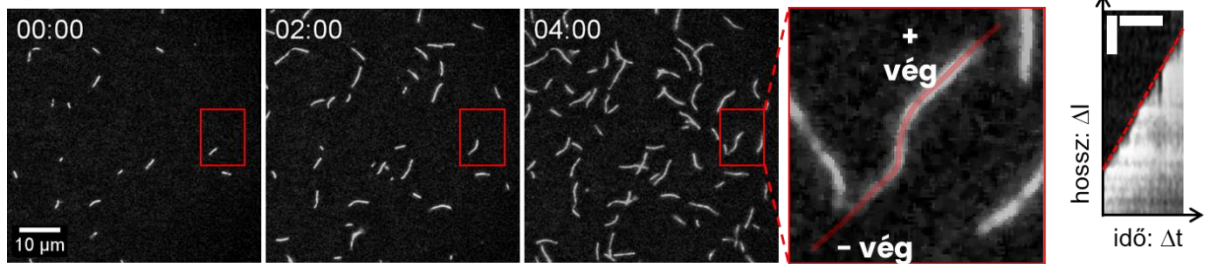
2. Longitudinális vég-vég asszociáció - annealing

A filamentumok egymás végeihez parallel irányítottsággal kapcsolódhatnak, ami azok hossznövekedését eredményezi (annealing).

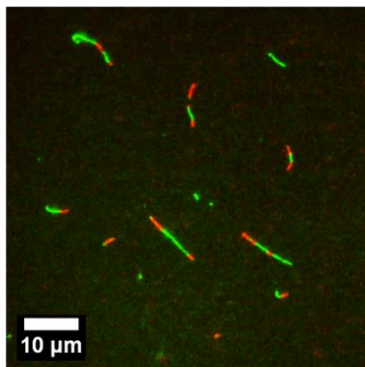
3. Transzverzális oldal-oldal asszociáció - bundling/crosslinking

A filamentumok oldalirányú összekapcsolódása parallel és/vagy antiparallel irányítottsággal azok megvastagodását eredményezi (kötegelés (bundling)/keresztkötés (crosslinking)).

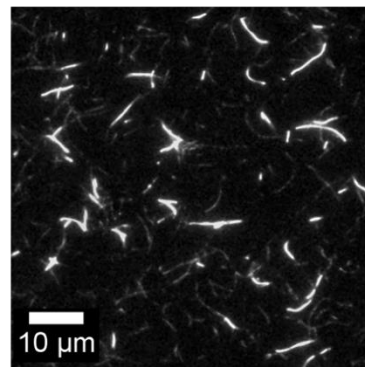
(1) *de novo* nukleáció és szekvenciális alegység beépülés polimerizáció



(2) longitudinális vég-vég asszociáció *annealing*



(3) transzverzális oldal-oldal asszociáció *bundling/crosslinking*



3. ábra: Az aktin önszerveződésének mechanizmusai.

Az aktin filamentumok összeszerelődésének megjelenítése az egyedi polimerek vizualizációjával teljes belső visszaverődésen alapuló fluoreszcencia mikroszkópiával (TIRFM). Az ábra forrása: [4].

(1) *De novo* nukleáció és szekvenciális alegység beépülés (*elongáció*) - *polimerizáció*. Egyedi filamentumok *elongáció*jának kimográf elemzése. A filamentumok kinetikai polaritása miatt a kísérleti körülmények mellett ($c_c(+)<[A_0]=0.5\text{ }\mu\text{M}<c_c(-)$) a filamentumok szögese (+) végén domináns a monomerek asszociációja. ΔL : filamentumhossz, Δt : idő.

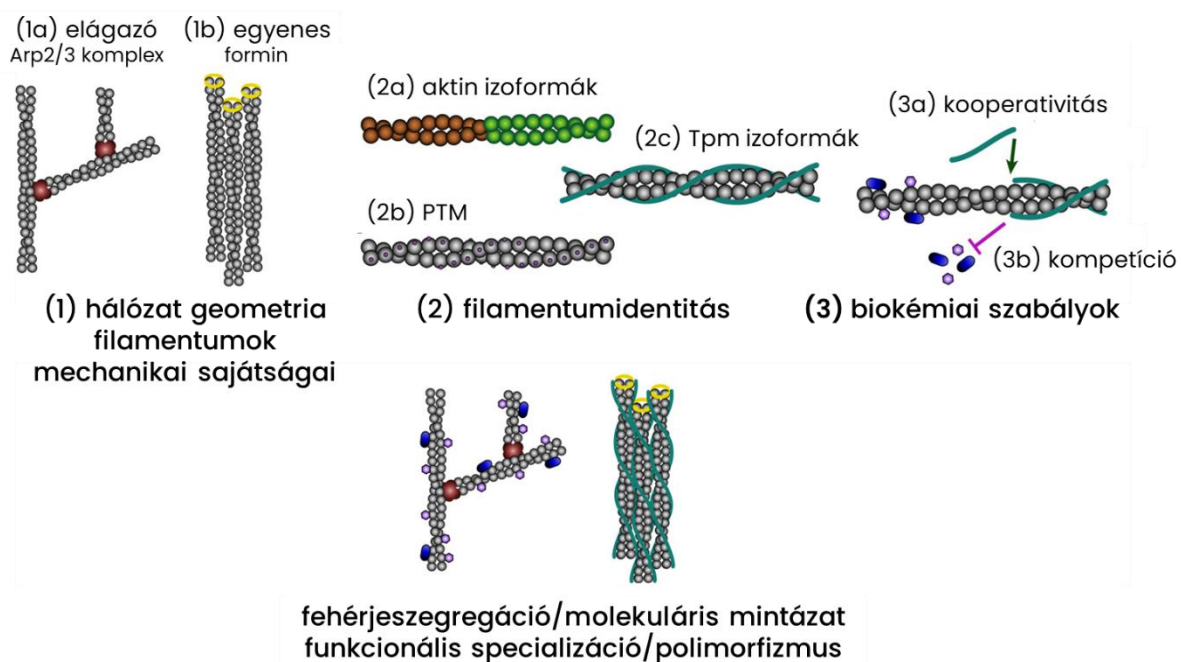
(2) *Longitudinális vég-vég asszociáció* - *annealing*. Az eltérő spektrális tulajdonságú fluorofórokkal jelölt filamentumok vég-vég kapcsolódását a filamentumok hossznövekedése és inhomogén fluoreszcencia emissziója tükrözi.

(3) *Transzverzális oldal-oldal asszociáció* - *bundling/crosslinking*. A vastagabb, magasabb intenzitású szegmensek az oldalirányban összekapcsolódott filamentumoknak, míg a vékonyabb, alacsonyabb intenzitású szakaszok az egyedi filamentumoknak felelnek meg.

Az intracelluláris aktin hálózatok funkcionális polimorfizmusa

Az élesztőtől az emberig az evolúciós távolság 1.3 milliárd év, mégis az aktin fehérje szekvenciaazonossága $>90\%$ (Függelék, F1. ábra). Az eukarióta aktinnal összevetve a bakteriális aktin homológok/aktinszerű fehérjék viszonylag alacsony szekvenciaazonosságot mutatnak [61]. Az eukarióta evolúció az aktin funkcionális diverzifikációjának tekintetében az „egy aktin minden funkcióra” elvet követi, míg a baktériumok esetén a „minden funkcióra egy aktin” tűnik inkább helyénvalónak.

Az intracelluláris környezetben az aktin sejtíváz szerveződése során a működésükben eltérő filamentumhálózatok összeszerelődésének térbeli és időbeli szabályozása, valamint funkcionális specializációja kell megvalósuljon. Egy adott sejtívazban meghatározó aktin hálózatok az arra optimalizált geometriai, mechanikai és dinamikai sajátságokkal kell rendelkezzenek. Az „*egy aktin minden funkcióra*” elv alapján a viszonylag kis számú aktin izoformára épülő eukarióta sejtíváz biológiai komplexitásának egyik meghatározó pillére az asszociált fehérjék aktivitásainak a sokszínűsége. Az aktin hálózatok molekuláris identitásának kialakításában és az aktinkötő fehérjék szegregációjában (*sorting*) több mechanizmus is szerepet játszhat (4. ábra) [62].



4. ábra: Az aktin hálózatok funkcionális specializációjának mechanizmusai.

PTM: poszttranszlációs módosulás, Tpm: tropomiozin. Az ábra forrása: [62].

1. Hálózat geometria/filamentumok mechanikai sajátságai

Az aktin hálózatok geometriai sajátságai (pl. elágazó/egyenes, parallel/antiparallel orientáció, kötegelési távolság), az aktin filamentumok mechanikai sajátságai (pl. rugalmas/merev, rugalmassági modulus, perzisztenciahossz) [63-67].

(1a) Arp2/3 komplex katalizált nukleáció (elágazó filamentumok, dendritikus hálózat)

(1b) Formin katalizált nukleáció és processzív elongáció (egyenes filamentumok)

A PhD munkám egyik meghatározó eredményeként leírtuk, hogy a forminok (pl. mDia1) komplex módon befolyásolhatják az aktin filamentumok mechanikai sajátságait [66, 67]. Hipotézisünk szerint az aktinkötő fehérjék szegregációjában és így az aktin hálózatok funkcionális specializációjában meghatározó szerepet játszanak az összeszerelő faktorok (Arp2/3 komplex, formin). Az Arp2/3 komplex és formin fehérjék aktivitásuk természeténél fogva elsőként kerülnek kapcsolatba a filamentumokkal, azok mechanikai sajátságai révén pedig szabályozhatják a kölcsönhatásaikat. Az összeszerelő faktorok vezérelt *sorting*-ot

nemrégiben hasadó élesztőben és tisztított fehérjerendszerekben egyedi filamentumok vizualizációján alapuló kísérletekben is alátámasztották [65].

2. *Filamentumidentitás*

(2a) *Aktin izoformák, csendes kód (silent code) mechanizmus*

Az aktin izoformái egymás és a fajok között is nagyfokú aminosav-szekvenciabeli konzerváltságot mutatnak [26], ugyanakkor az mRNS kódoló régióban lényegesen nagyobb az eltérés [68]. Az aktin izoformák eltérő funkcionális sajátosságait nem a kódolt fehérje, hanem a kódoló génszekvenciában való eltérések biztosíthatják a kódoló régiót érintő szinonim/csendes (*samesense*) pontmutációk révén [68, 69].

(2b) *Kovalens módosulás, poszttranszlációs módosulás (PTM) [70]*

(2c) *Tropomiozin (Tpm) izoformák*

A Tpm izoformák azimutális pozíciója az aktin filamentumon eltérő lehet, ami az aktin sejtváza Tpm izoforma specifikus szabályozásának alapjait jelentheti [47, 71-76].

3. *Biokémiai szabályok*

Az aktinkötő fehérjék

(3a) *kooperatív/szinergikus, vagy*

(3b) *kompetitív/antagonisztikus kötődése [65, 77-79].*

A sejt motilis sajátásaiban meghatározó citoskeletális polimer rendszerek

A sejtek motilis sajátásaiban meghatározók a protrúziós, adhézis és kontraktilis erő kifejtésre specializálódott citoskeletális polimer rendszerek közötti mechanikai csatolások [10, 11, 80-82] (5. ábra). A vezető élen a lamellipodium, az aktin filamentumok polarizált dinamikája által vezérelt vékony, lemezszerű membránkitüremkedés a migráló sejtek egyik fémjele. A lamellipodium mögött a sejttest felé húzódó lamella található. A filopodiumok a vezető él újszerű projekciói. Ezek a protrúziós aktin hálózatok morfológiai és dinamikai sajátágaikban, valamint molekuláris mintázatukban is heterogenitást mutatnak. Az aktin sejtváza ugyanakkor funkcionális csatolásokon keresztül kapcsolt a mikrotubulusokhoz is, a két polimer rendszer működésének koordinációja számos sejtfolyamatban meghatározó [83-89].

1. *Lamellipodium*

A lamellipodium iniciátora a membrán belső felszínéhez asszociált WAVE (*Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP)-family verprolin homologous*): Arp2/3 komplex fehérjerendszer, a Cdc42 és Rac1 Rho GTPázok effektora [80]. A WAVE által aktivált Arp2/3 komplex az aktin filamentumok *de novo* képződését segíti elő úgy, hogy egy meglévő filamentum oldaláról (anya filamentum) egy új filamentumot (leány filamentum) nukleál (autokatalitikus *branching*) [10, 12, 59, 90]. Az Arp2/3 komplex által létrehozott aktin hálózat karakterisztikus, elágazó mintázatot mutat (dendritikus hálózat) [48, 91-93]. A vezető élnél az aktin filamentumok tranziensen növekednek, elágazások kialakításában (*branching*) vesznek részt, majd az elongációjuk befejeződik a filamentumvégek sapkázása révén (*capping*). A membránközeli, proximális zónában a polimerizációhoz kapcsolódó erőhatások hozzájárulnak a protrúziók kialakulásához. A lamellipodium szétszerelődését a membrántól távolabbi, disztális régióban

az ADF/cofilin fehérje katalizálja. A lamellipodium egy gyors és a taposómalom egyensúlyának (*treadmilling*) megfelelően irányított dinamikájú hálózat [94, 95].

2. Lamella

A lamella elágazásoktól mentes, egyenes aktin filamentumokat tartalmaz és lassabb dinamika jellemzi [90]. Eredete, valamint a szerkezeti és dinamikai sajátosságainak kialakítását irányító mechanizmusok nem pontosan ismertek. Nem tisztázott például, hogy a lamellipodium és a lamella két eltérő nukleációs faktor (pl. Arp2/3 komplex, forminok) és szerveződési elvek által vezérelt aktin hálózat, vagy egy aktin hálózathoz többlépcsős kinetikai folyamat révén önszerveződő morfológiai és dinamikai gradienst mutató rendszer.

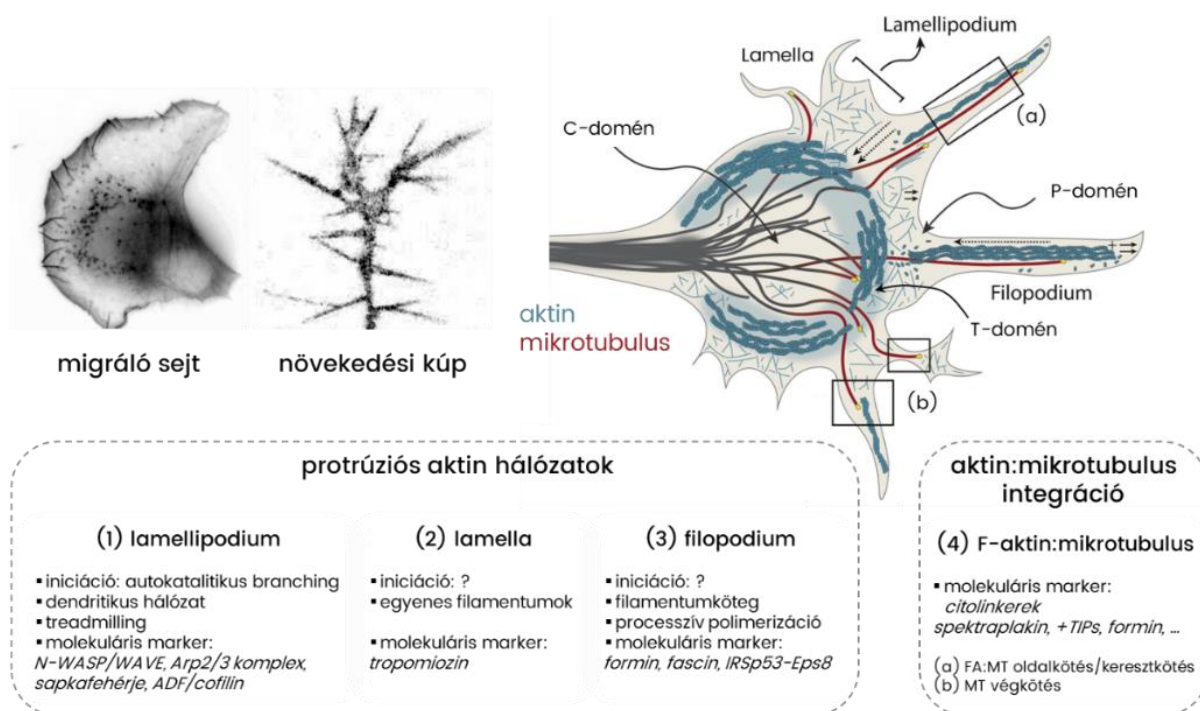
3. Filopodium

A filopodiumokban az aktin filamentumok elágazásoktól mentes, párhuzamos lefutású kötegekbe (*bundle*) rendeződnek szöges végükkel a membrán felé. A filopodium létrejöttéért felelős mechanizmusok nem pontosan ismertek [96]. A konvergens elongáció modell szerint a filopodium aktin hálózata a lamellipodium filamentumaiból a sapkafehérje disszociációja (*uncapping*) és az így szabaddá vált filamentumvégek elongációja révén ered. Más elképzelések alapján a lamellipodium és a filopodium kialakulásáért különböző, egymástól független útvonalak által vezérelt molekuláris mechanizmusok felelősek. Több megfigyelés is bizonyítja a formin fehérjék szerepét a filopodiumok képződésében [80].

4. Az aktin és mikrotubulus sejtváza funkcionális koordinációja

Az aktin és mikrotubulus alapú citoskeletális polimer rendszerek sokrétű szerepe mára viszonylag jól ismert. Az is nyilvánvalóvá vált, hogy ezek az alstruktúrák nem függetlenek, hanem működésük funkcionális csatlásokon keresztül kapcsolt és összehangolt. Az aktin és mikrotubulus sejtváza közötti koordináció fontos például a sejtalak és polaritás kialakításában, a sejtmigráció és osztódás során, valamint az idegsejtek működésében [83-89].

Az axonok irányított növekedésében meghatározó szerepet játszik a sejttől távol, disztálisan elhelyezkedő növekedési kúp (*growth cone*) (5. ábra). A növekedési kúp citoskeletális rendszere három fő doménre osztható: egy perifériás, aktin-gazdag kompartmentre a protrúziós aktin képletekkel (P-domén; lamellipodium, lamella, filopodium), az axon nyélből eredő mikrotubulusokban gazdag centrális régióra (C-domén) és a kettő között húzódó átmeneti tartományra (T-domén). A mikrotubulusok disztális végei behatolhatnak a P-domén aktin-gazdag zónájába, ahol a két polimer rendszer asszociált fehérjéken keresztül kölcsönhatásba lép. A perifériás aktin és központi mikrotubulus hálózat citolinkerek (pl. *microtubule plus-end tracking proteins* (+TIP fehérjék, +TIPs), spektraplakin, tau, tumor-szuppresszor *adenomateous polyposis coli* (APC), forminok) által közvetített funkcionális integrációja meghatározó a növekedési kúp sejtvázában működésében és így az axonnövekedés és navigáció folyamatában [83, 85, 88, 89, 97].



5. ábra: A migráló sejt és a növekedési kúp sejtvezének szerveződése.

Migráló sejt. B16 melanoma sejt (EGFP-aktin fluoreszcencia) [98].

Növekedési kúp. *Drosophila* primer idegsejt (aktin5C::GFP fluoreszcencia) [99].

Sematikus ábra. A növekedési kúp aktin és mikrotubulus sejtvezének szerveződése [80, 88].

FA: F-aktin, MT: mikrotubulus

Kapcsolódó publikációk, az eredmények közlési helyének megadása

#Bugyi Beáta ✉, #Kellermayer Miklós ✉

The discovery of actin: “to see what everyone else has seen, and to think what nobody has thought”.

JOURNAL OF MUSCLE RESEARCH AND CELL MOTILITY 41 : 1 pp. 3-9. , 7 p. (2020)

IF: 2.698 Folyóiratcikk (Szakcikk) Tudományos

Független idéző: 11 Összesen: 11

megosztott utolsó/levelező szerzős közlemény

Bugyi Beáta, Carlier Marie-France ✉

Control of actin filament treadmilling in cell motility.

ANNUAL REVIEW OF BIOPHYSICS 39 pp. 449-470. , 22 p. (2010)

IF: 17.524 Folyóiratcikk (Összefoglaló cikk) Tudományos

Független idéző: 267 Függő idéző: 19 Összesen: 286

#Hild Gábor, #Bugyi Beáta, Nyitrai Miklós ✉

Conformational dynamics of actin: effectors and implications for biological function.

CYTOSKELETON 67 : 10 pp. 609-629. , 21 p. (2010)

IF: 3.071 Folyóiratcikk (Összefoglaló cikk) Tudományos

Független idéző: 36 Függő idéző: 7 Összesen: 43

megosztott első szerzős közlemény

Romet-Lemonne Guillaume, Helfer Emmanuel, Delatour Vincent, Bugyi Beáta, Bosch Montserrat, Romero Stephane, Carlier Marie-France, Schmidt Stephan, Fery Andreas ✉

Biomimetic systems shed light on actin-based motility down to the molecular scale.

BIOPHYSICAL REVIEWS AND LETTERS 4 : 1-2 pp. 5-15. , 11 p. (2009)

Impakt faktor: -, Folyóiratcikk (Szakcikk) Tudományos

Független idéző: 1 Összesen: 1

Bugyi Beáta, Le Clainche Christophe, Romet-Lemonne Guillaume, Carlier Marie-France ✉
How do in vitro reconstituted actin-based motility assays provide insight into in vivo behavior?
FEBS LETTERS 582 : 14 pp. 2086-2092. , 7 p. (2008)
IF: 3.264 Folyóiratcikk (Összefoglaló cikk) Tudományos
Független idéző: 12 Függő idéző: 2 Összesen: 14

Renault Louis, **Bugyi Beáta**, Carlier Marie-France ✉
Spire and Cordon-bleu: multifunctional regulators of actin dynamics.
TRENDS IN CELL BIOLOGY 18 : 10 pp. 494-504. , 11 p. (2008)
IF: 13.385 Folyóiratcikk (Összefoglaló cikk) Tudományos
Független idéző: 56 Függő idéző: 15 Összesen: 71

Bugyi Beáta ✉
Actin and actin binding proteins.
In: Kellermayer, Miklós (szerk.) Muscle Contraction - a Hungarian Perspective
Budapest, Magyarország : Semmelweis Kiadó (2018) 628 p. p. 253
ISBN: 9789633314562
Könyvrészlet (Könyvfejezet) Tudományos

Bugyi Beáta, Matkó János, Nagy Péter, Szöllősi János, Vámosi György, Vereb György
Fénymikroszkópiák a sejtszintű fehérjekutatásban.
In: Buday, L, Nyitray, László, Perczel, A (szerk.) Ezerarcú fehérjék
Budapest, Magyarország : Semmelweis Kiadó és Multimédia Stúdió (2018) 960 p. pp. 437-483. , 47 p.
ISBN: 9789633314586
Könyvrészlet (Könyvfejezet) Tudományos

2. Motiváció, hipotézis, célkitűzések

Az aktin sejtvázs összehangolt egységében az egyes funkciókra specializálódott kompartmentek különböző szerkezeti és dinamikai sajátságokkal rendelkeznek és molekuláris mintázatukban is eltérőnek mutatkoznak. Az aktin sejtvázs biológiai komplexitásának egyik meghatározó pillére az aktinkötő fehérjék aktivitásainak sokszínűsége és az azok közötti additív vagy interaktív (szinergikus és antagonistikus) funkcionális csatolások megléte. Az aktin hálózatok molekuláris identitásának kialakításában szerepet játszó mechanizmusok vizsgálata a tématerület egy napjainkban is intenzíven kutatott kérdésköre [62].

A tudományos munkámat összefogó motiváció és célkitűzések az alábbi hipotézis és kérdések mentén fogalmazódnak meg.

Hipotézis

Az aktin hálózatok funkcionális specializációjában alapvető az aktinkötő fehérjék révén meghatározott molekuláris identitásuk.

Kérdések

- Milyen fiziko-kémiai sajátságokkal és aktivitásokkal rendelkeznek az aktinkötő fehérjék?
- Miként nyilvánulnak meg ezek az aktivitások az aktin sejtvázs működésében?
- Milyen mechanizmusok határozzák meg az aktinkötő fehérjék szegregációját és ez által az aktin hálózatok molekuláris identitását és funkcionális sajátságait?

Kutatásaim célja az aktin sejtvázs szerveződésében tetten érhető fehérje-fehérje kölcsönhatások azonosítása, valamint azok szerkezeti aspektusainak és funkcionális következményeinek leírása. Megközelítésként aktin polimer sokaságon végzett *bulk* fluoreszcencia spektroszkópiai és szedimentációs méréseket, egyedi polimerek megjelenítésén alapuló teljes belső visszaverődésen alapuló fluoreszcencia mikroszkópiai kísérleteket, valamint mezoszkópikus aktin hálózatokra kiterjedő biomimetikus modelleket ötvöző módszertani stratégiát alkalmazok.

A problémakör vizsgálatára különböző biológiai rendszerekhez kapcsolódóan több, egymással nem rokon aktinkötő fehérje (tropomiozin, formin és gelsolin homológ fehérjecsalád) szerepét tanulmányoztam

- a sejt motilis sajátságaiban meghatározó protrúziós aktin hálózatok, a lamellipodium, a lamella és a filopodium szerveződésében, illetve
- a növekedési kúp aktin és mikrotubulus sejtváza közötti funkcionális integrációban.

3. Eredmények és megbeszélésük

3.1. A tropomiozin izoformák a protrúziós aktin hálózatok, a lamellipodium és a lamella koordinációjában

A tropomiozin fehérjecsalád

Az aktin meghatározó partnerfehérjéi a tropomiozin (Tpm) család tagjai. A tropomiozin, a miozint követően az elsőként azonosított olyan fehérje, ami aktinkötő sajátssággal bír. Ennek felismerésében meghatározó szerepe volt Laki Kálmánnak² [3, 4, 100].

A tropomiozinok az Állatok (*Metazoa/Animalia*) és Gombák (*Fungi*) rendszertani országában fordulnak elő, nem ismert képviselőjük a növények, egysejtűek vagy a prokarióták körében. Érdeemes megjegyezni, hogy az eukarióták fejlődése során az aktin izoformák száma csökkent (humán citoplazmatikus aktin izoformák = 2), amit a tropomiozin izoformák számának növekedése kísért (humán citoplazmatikus Tpm izoformák > 20). Ez a negatív korreláció jelenti az alapját annak az elképzelésnek, mi szerint a Tpm izoformák meghatározóak az aktin sejtvázas funkcionális polimorfizmusának kialakításában [62, 71-74, 101].

Emlősökben a tropomiozint négy gén kódolja (*Tpm1-4*), amelyekről alternatív *splicing* révén több mint 20 fehérje izoforma képződik. Az izoformák diverzitását az 1a/b, 2a/b, 6a/b és 9a/b/c/d exonvariánsok biztosítják (4. táblázat).

gén	kromoszomális lokalizáció	exon összetétel															
		1a	2a	2b	1b	3	4	5	6a	6b	7	8	9a	9b	9c	9d	
Tpm1	15q22.2	1a	2a	2b	1b	3	4	5	6a	6b	7	8	9a	9b	9c	9d	
Tpm2	9p13.3	1a	-	2b	1b	3	4	5	6a	6b	7	8	9a	-	-	9d	
Tpm3	1q21.3	1a	-	2b	1b	3	4	5	6a	6b	7	8	9a	-	9c	9d	
Tpm4	19p13.12-11	1a	-	2b	1b	3	4	5	-	6b	7	8	-	-	-	9d	

gén	fehérje izoforma	jellemző szöveti előfordulás	¹ splice variáns			
<i>Tpm1-4</i>	1-14	³ st, sm, br, cy	exon 1 a, b	exon 2 a, b, ² -	exon 6 a, b	exon 9 a, b, c, d

4. táblázat: A tropomiozin izoformák exon összetétele és nevezéktana.

¹az 1, 2, 6 exonnak két (a, b), míg a 9 exonnak négy (a, b, c, d) *splice* variánsa létezik

²hiányzó 2 exon: rövid Tpm izoforma, meglévő 2 exon: hosszú Tpm izoforma

³st: vázizom, sm: simaizom, br: agy, cy: citoplazmatikus

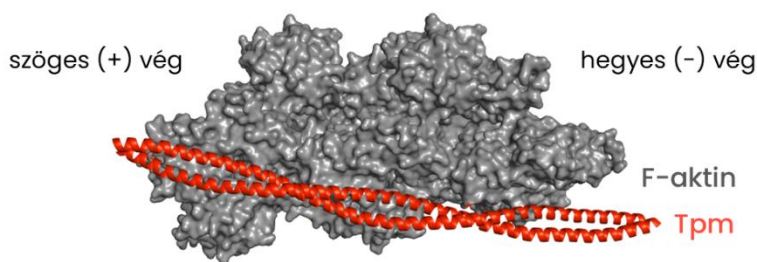
² A publikációkon a Koloman Laki név jelenik meg.

Az izoformák nagy számára való tekintettel 2015-ben egységes nevezéktan került bevezetésre (4. táblázat) [102, 103]. Példaként a vázizom Tpm α izoformája az új nevezéktan szerint Tpm1.1st(a.b.b.a). Ez a fehérje tehát a *Tpm1* génről átíródó első izoforma, vázizomban fordul elő és az 1a, 2b, 6b, 9a exonvariánsokat tartalmazza. A korábbi nevezéktan szerinti Tpm5NM1 izoforma a Tpm3.1cy(b.-a.d) kóddal adható meg: a *Tpm3* génről átíródó első izoforma, citoszkeletális lokalizációt mutat és az 1b, 6a, 9d exonvariánsokat tartalmazza, míg a 2 exon hiányzik. A vizsgált Tpm izoformák régi és új elnevezéseit az 5. táblázatban foglaltam össze.

régi nevezéktan		új nevezéktan	exon összetétel									
Tm sk α	skTpm	Tpm1.1st(a.b.b.a)	1a	2b	3	4	5	6b	7	8	9a	
Tm sk β		Tpm2.2st(a.b.b.a)	1a	2b	3	4	5	6b	7	8	9a	
Tpm5NM1		Tpm3.1cy(b.-a.d)	1b	-	3	4	5	6a	7	8	9d	
TpmBr3		Tpm1.12br (b.-b.c)	1b	-	3	4	5	6b	7	8	9c	

5. táblázat: A vizsgált tropomiozin izoformák régi és új nomenklatura szerinti elnevezése és exon összetétele.

Az α -helikális Tpm molekulák párhuzamos dimerként tekercselődnek össze egy *coiled-coil*-t alkotva (6. ábra). A Tpm dimerek a nagy menetemelkedésű hélix mentén tekerednek az aktin filamentum köré, vég-vég kölcsönhatásuk révén egy pszeudofolytonos láncot alkotva, ami molekuláris vázként szolgálhat a filamentum kölcsönhatásainak szabályozására [76]. A Tpm izoformák azimutális pozíciója a filamentumon eltérő lehet, ami az aktin sejtváza Tpm izoforma specifikus szabályozásának szerkezeti alapjait biztosíthatja [47, 75]. Gondoljunk csak az izomkontrakció klasszikus térbeli kizárásos modelljére, mely szerint a miozin II:F-aktin kölcsönhatást a vázizom Tpm azimutális pozíciója szabályozza [45, 104].



6. ábra: A tropomiozin:F-aktin komplex szerkezete.

A Tpm (felbontás = 6.5 Å, rekombináns egér α -Tpm, Uniprot P58771) és F-aktin (felbontás = 3.7 Å, 5 alegység, nyúl vázizom) komplexének krio-elektronmikroszkópiával meghatározott szerkezete (PDB 3J8A) [45].

A tropomiozinok élettani szerepe az embriogenezistől a morfogenezisen keresztül, speciális sejtes (pl. kontrakció, adhézió, migráció, *trafficking*) és szöveti funkciókig, valamint klinikai állapotokig (pl. daganatos megbetegedések, katarakta) széles skálát ölel fel [101]. A Tpm izoformák közötti funkcionális redundancia meglepően kicsi. A protrúziós aktin hálózatok tekintetében a Tpm lokalizációjával és aktivitásaival kapcsolatban ellentmondásos eredmények

születtek [105-109]. Fontos megjegyezni, hogy a Tpm izoformák közötti nagyfokú exonazonosság miatt az antitestek vagy reagensek jellemzően egynél több izoformát céloznak, ami nehézkessé teszi az izoforma specifikus sajátságok pontos leírását. Bizonyos endogén Tpm izoformák a lamellipodium dendritikus hálózatának membrántól távolabbi, disztális zónáiban fordulnak elő, nem mutatva átfedést az Arp2/3 komplex és ADF lokalizációjával (PtK1, *Drosophila* S2 sejtek) [107, 108]. A Tpm izoformák csendesítése a lamellipodiális hálózat kiterjedését és a lamella eltűnését okozta (*Drosophila* S2 sejt, II típusú Tpm izoforma) [107]. A vázizom eredetű Tpm (skTpm) mikroinjektálása (PtK1 sejt) a lamellipodiumra jellemző dinamikai és molekuláris sajátságok eltűnését és egy lamellára emlékeztető hálózat megjelenését eredményezte a membránközeli régióban [108]. Érdekes módon, a lamellipodium hiányában dinamikusabb membránkitüremkedések és gyorsabb sejtmozgás volt megfigyelhető. A vázizom izoforma nemizom sejtekben való expressziója fiziológias tekintetben nem releváns, ugyanakkor modellként szolgálhat az aktin sejtvasz funkcionális specifikációját irányító elvek vizsgálatához. A képet árnyalja a nemizom Tpm izoformák változatossága. Az skTpm-hoz hasonlóan a Tpm5NM1 gátolta a lamellipodium formálását és a sejtmozgást, míg a TpmBr3 fokozott lamellipodiális aktivitáshoz és sejtmozgáshoz vezetett (transzfekció, B35 neuroepiteliális sejtvonal) [109]. A Tpm5NM1 nem, míg a TpmBr3 kolokalizált az ADF régióival.

Hipotézis, célkitűzések, kérdések

A tropomiozinok szerepe a protrúziós aktin hálózatok szerveződésében egyértelműen megfogalmazódik. A Tpm izoformák az aktin hálózatok aktinkötő fehérjékkel kialakított kölcsönhatásainak specifikációja révén azok molekuláris összetételében és így funkcionális sajátságaiban meghatározó szerepet játszhatnak.

Hipotézis

A Tpm izoformák a lamellipodium és a lamella közötti egyensúly koordinációjának meghatározó szabályozói.

Munkánk során a Tpm szövetből és rekombináns úton előállított izoformáit vizsgáltuk *in vitro*. Célunk volt az aktinnal kialakított kölcsönhatások és azok funkcionális következményeinek leírása.

Kérdések

1. Az aktinkötő fehérjék milyen aktivitásai állnak a tropomiozin protrúziós fenotípusának a hátterében?
2. Milyen mechanizmus révén jön létre a lamella? A lamellipodiumtól független hálózat, vagy a lamellipodiumnak a szabályozófehérjék által irányított graduális szerkezeti és dinamikai átrendeződése során alakul ki?

Az skTpm hatása az Arp2/3 komplex által katalizált filamentumképződésre: fluoreszcencia spektroszkópai tanulmányok

Az skTpm-nak az Arp2/3 komplex által katalizált polimerizációra (autokatalitikus *branching*) kifejtett hatását elsőként pirén jelölt aktin alkalmazásán alapuló *bulk* fluoreszcencia spektroszkópai kísérletekben vizsgáltam polimer sokaságon (7., 8. ábra). Az Arp2/3 komplexet az N-WASP C-terminális VCA régiójával aktiváltam. A kísérletekben az skTpm koncentrációfüggő módon gátolta az Arp2/3 komplex aktivitását (7. ábra), összhangban korábbi megfigyelésekkel [55]. Kontroll mérésekben az skTpm nem befolyásolta a filamentum-összeszerelődés kinetikáját a VCA-Arp2/3 komplex hiányában (*nem bemutatott adatok, Supplemental Figure 1* [110]). Az skTpm hatásának kvantitatív jellemzésére a pirén tranziens féltelítéséhez illesztett egyenes meredekségéből származtattam a polimerizációs sebességet (v). A $v([skTpm])$ adatsort a Michaelis-Menten modell szerint illesztve (7. ábra, 1. egyenlet) a féltelítési koncentráció $K = 0.295 \pm 0.131 \mu M$ -nak adódott. Ez az érték összhangban van az skTpm:F-aktin komplex disszociációs egyensúlyi állandójával [111].

$$v = v_{max} \frac{K}{K + [skTpm]} + v_{min} \quad (1)$$

1. egyenlet: Michaelis-Menten modell

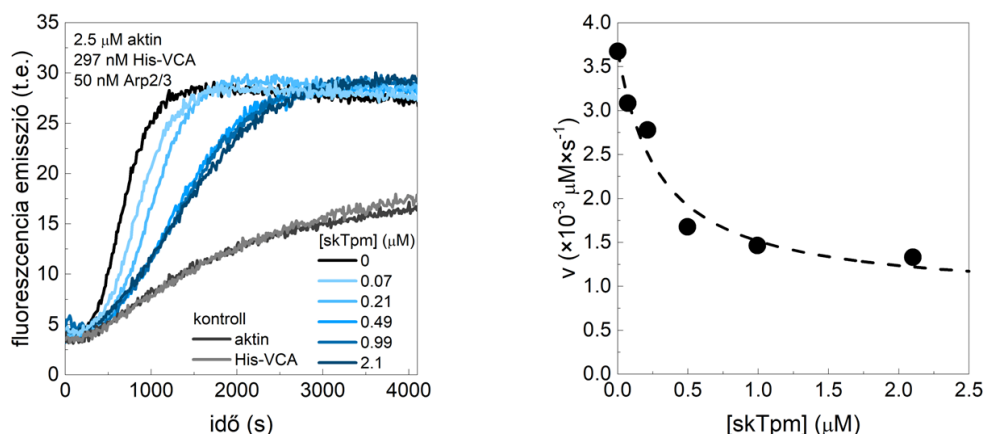
v : polimerizációs sebesség

v_{max} : az skTpm hiányának megfelelő sebesség

v_{min} : az skTpm telítési koncentrációjának megfelelő sebesség

K : az 50%-os gátláshoz tartozó (féltelítési) $[skTpm]$

$[skTpm]$: az skTpm koncentrációja



7. ábra: Az skTpm gátolja az Arp2/3 komplex által katalizált elágazások kialakulását.

Az aktin filamentumok Arp2/3 komplex által katalizált összeszerelődésének kinetikája skTpm hiányában és jelenlétében. $[aktin] = 2.5 \mu M$ (2% pirén jelölt), $[Arp2/3] = 50 nM$, $[His-VCA] = 297 nM$.

A pirén tranziensek féltelítéséhez illesztett egyenes meredekségéből származtatott polimerizációs sebesség (v) az $[skTpm]$ függvényében. A szaggatott vonal az adatokra illesztett függvényt jelzi a Michaelis-Menten modell szerint (1. egyenlet).

Az skTpm gátló hatásának hátterében álló mechanizmus vizsgálatára a méréseket több skTpm és Arp2/3 komplex koncentráción is elvégeztem. A $v([Arp2/3])$ adatsor kettős reciprok ábrázolása (Lineweaver–Burk ábrázolás) növekvő meredekségű és azonos függőleges tengelymetszetű lineáris tendenciát követett az skTpm, mint inhibitor koncentrációjának növelésével (8. ábra, bal oldali panel, 2. egyenlet).

$$\frac{1}{v} = \frac{K}{v_{max}} \frac{1}{[skTpm]} + \frac{1}{v_{max}} \quad (2)$$

2. egyenlet: Lineweaver–Burk (kettős reciprok) ábrázolás

v : polimerizációs sebesség

v_{max} : az skTpm hiányának megfelelő sebesség

K : az 50%-os gátláshoz tartozó (féltelítési) $[skTpm]$

$[skTpm]$: az skTpm koncentrációja

K/v_{max} : meredekség (8. ábra, bal oldali panel)

$1/v_{max}$: függőleges tengelymetszet (8. ábra, bal oldali panel)

Az illesztési paraméterekből az 50%-os gátláshoz tartozó Arp2/3 komplex koncentrációt származtattam ($K = [Arp2/3]_{1/2}$, klasszikus jelöléssel: $K_{m,app}$). Az $[Arp2/3]_{1/2}([skTpm])$ adatsor lineáris trendet követett, amit a klasszikus kompetitív kötési modell alapján illesztettem (8. ábra, jobb oldali panel, 3. egyenlet):

$$\begin{aligned} \text{klasszikus jelölés: } K_{m,app} &= K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \\ [Arp2/3]_{1/2} &= [Arp2/3]_{1/2,0} \left(1 + \frac{[skTpm]}{K_{skTpm}}\right) \end{aligned} \quad (3)$$

3. egyenlet: Klasszikus kompetitív gátlás modellje

$[Arp2/3]_{1/2}$: az 50%-os gátláshoz tartozó $[Arp2/3]$ (8. ábra, bal oldali panel, meredekség és függőleges tengelymetszet hányadosa)

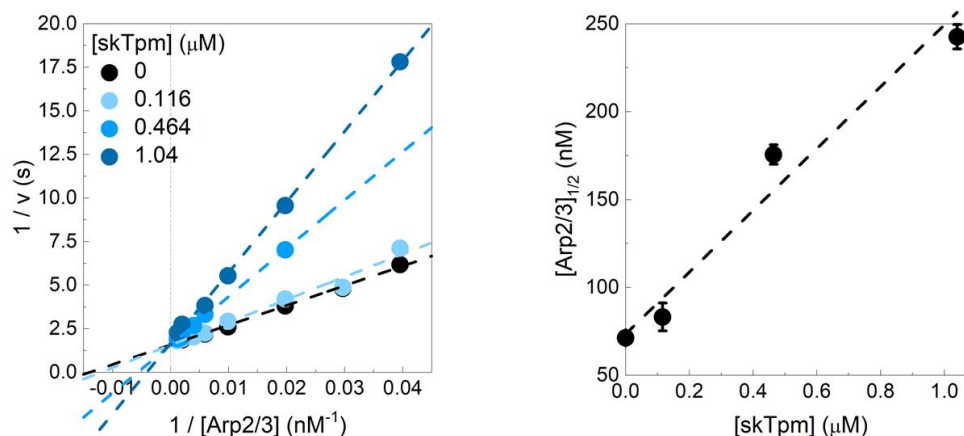
$[Arp2/3]_{1/2,0}$: az skTpm hiányának megfelelő $[Arp2/3]_{1/2}$ (8. ábra, jobb oldali panel, függőleges tengelymetszet)

K_{skTpm} : az skTpm:F-aktin komplex disszociációs egyensúlyi állandója (8. ábra, jobb oldali panel, meredekség)

$[skTpm]$: az skTpm koncentrációja

Az illesztés alapján az skTpm:F-aktin disszociációs egyensúlyi állandója $K_{skTpm} = 0.418 \pm 0.092 \mu\text{M}$ -nak adódott. Ez az érték összhangban van az irodalomban fellelhető adatokkal [111]. A fenti eredmények arra utalnak, hogy az skTpm és az Arp2/3 komplex kompetitív módon befolyásolják és antagonisztikus hatást fejtenek ki az elágazások kialakulására. A funkcionális kompetíció szerkezeti magyarázatául szolgálhat, hogy a két fehérje kötőhelye részleges átfedést mutat az aktin filamentum felszínén [112].

Megjegyzendő, hogy egy korábbi tanulmányban a Tpm hatása függetlennek bizonyult az Arp2/3 komplex koncentrációjától [55]. Az ellentmondást feloldja, hogy abban a munkában lényegesen alacsonyabb Arp2/3 komplex koncentráción történtek a mérések (10-60 nM).



8. ábra: Az skTpm és az Arp2/3 komplex kompetitív módon befolyásolja az elágazások kialakulását.

A $v([Arp2/3 \text{ komplex}])$ adatsor dupla reciprok ábrázolása skTpm hiányában és jelenlétében. A szaggatott vonalak az adatokra illesztett lineáris függvényt jelzik (2. egyenlet). $[aktin] = 2.5 \mu M$ (2% pirén jelölt), $[His-VCA] = 297 nM$.

Az Arp2/3 komplex féltelítési koncentrációja ($[Arp2/3]_{1/2}$) az $[skTpm]$ függvényében. A szaggatott vonal az adatokra illesztett lineáris függvényt jelzi (3. egyenlet). Az egyenes függőleges tengelymetszete $[Arp2/3]_{1/2,0} = 73.536 \pm 9.123 \mu M$ -nak, meredeksége $K_{skTpm} = 0.418 \pm 0.092 \mu M$ -nak adódott, összhangban az skTpm:F-aktin disszociációs egyensúlyi állandójával [111]. Átlag $\pm$ SD, $n = 2-3$.

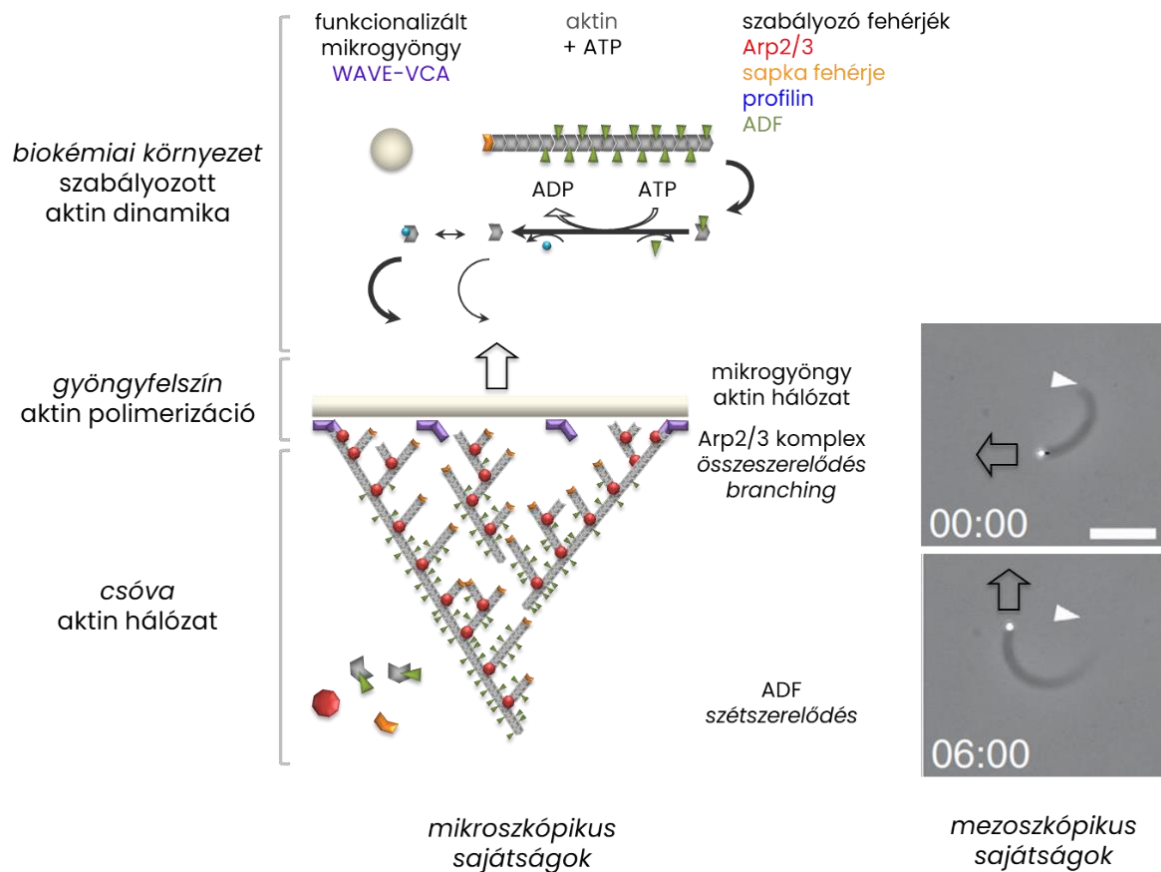
Az skTpm hatása az Arp2/3 komplex által katalizált filamentumképződésre: rekonstrukciós tanulmányok

Az skTpm-nak a fluoreszcencia spektroszkópiai kísérletekben, *bulk* polimer sokaságon felderített inhibitor hatása magyarázhatja azokat a sejtbiológiai megfigyeléseket, mi szerint többlet skTpm jelenlétében a lamellipodium kialakulása gátolt [108]. Ugyanakkor az skTpm mikroinjektált sejtekben a gátolt lamellipodium ellenére perzisztens membránkitüremkedések és gyorsabb sejtmozgás volt megfigyelhető [108]. Az skTpm hatásait a továbbiakban komplex fehérjekörnyezetben, mezoszkópikus aktin hálózatokra kiterjedő biomimetikus modellben vizsgáltam.

A lamellipodium szerkezeti, dinamikai és molekuláris sajátosságait rekonstruáló biomimetikus modell

A standard biomimetikus rendszerben öt esszenciális fehérje aktivitása rekonstruálja a lamellipodium legfőbb szerkezeti és dinamikai sajátosságait, valamint molekuláris mintázatát (9. ábra) [90, 95, 113-115]. A sejtmembránt és az Arp2/3 komplex aktivátorának membránlokalizációját az N-WASP funkcionális polisztrén mikrogöngyök felszíne modellezi. A lamellipodiális kitüremkedések vonatkozásában az endogén Arp2/3 komplex aktivátora a WAVE fehérje [90, 95]. A nukleációt elősegítő faktorok (*nucleation promoting factor*, NPF) közös sajátossága 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. Ez az Arp2/3 komplex aktiválásában meghatározó katalitikus VCA szakasz konzervált a fehérjecsaládban, így az N-WASP ebben a tekintetben alkalmazható a

modellben. Az intracelluláris milliók egy F-aktint, szabályozó fehérjéket (Arp2/3 komplex, sapkafehérje, profilin, ADF) és ATP-t tartalmazó oldat felel meg, ami jól kontrollálható biokémiai környezetet biztosít. A funkcionális gyöngyök felszínén az N-WASP:Arp2/3 komplex elágazó aktin filamentumok létrejöttét katalizálja (*branching*), ami révén egy aktin hálózat (csóva) épül fel. Az elágazásokkal az Arp2/3 komplex is az aktin hálózatba épül. A polimerizációhoz kapcsolódó erőhatások a gyöngyök irányított mozgását eredményezik, ami a membránkitüremkedéseket rekonstruálja. A filamentumok elongációját a sapkafehérje zárja le (*capping*). Az aktin hálózat proximális végén történő felépülését annak a gyöngyfelszíntől távolabbi, disztális végén az ADF depolimerizációs aktivitása ellensúlyozza, így az aktin hálózat hossza állandó (taposómalom egyensúly, *treadmilling*). A kvantitatív elemzés érdekében fénymikroszkópia (fázis-kontraszt, fluoreszcencia) alkalmazásával meghatározható a gyöngymozgás sebessége és időtartama, az aktin hálózat morfológiája és fehérjeösszetétele a különböző kísérleti paraméterek függvényében.

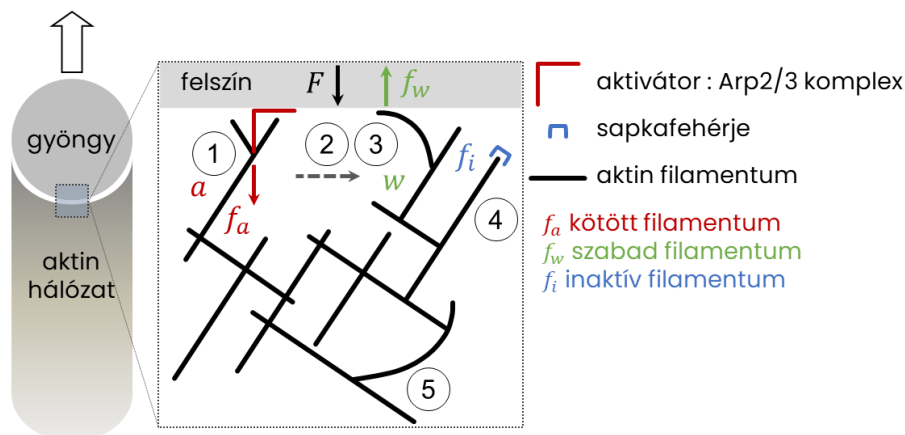


9. ábra: A lamellipodium szerkezeti, dinamikai és molekuláris sajátságait rekonstruáló biomimetikus modell.

Az ábra az alábbi publikációkban bemutatott ábrák nyomán készült [10, 90].

A gyöngyök mozgását/membránkitüremkedések létrejöttét biztosító erőhatások eredetére mikroszkópikus szinten az Alex Mogilner és George Oster által javasolt két-kompartmentes elasztikus-pányvázott kilincskerék/racsni modell (*elastic-tethered ratchet*) adhat magyarázatot (10. ábra) [116, 117]. A modell szerint a gyöngymozgást a felszínhez kötött (mozgást

akadályozó) és szabad (mozgást segítő) aktin filamentumokhoz kapcsolódó erőhatások egyensúlya határozza meg. A gyöngyfelszínhez kötött aktivátor (pl. N-WASP) által aktivált Arp2/3 komplex egy leány filamentumot nukleál egy meglévő filamentum oldalán (*branching*). Ez az új filamentum az aktivátor:Arp2/3 komplexen keresztüli direkt fizikai kapcsolat révén a gyöngyfelszínhez van pányvázva (kötött filamentum, *attached*, f_a). A kötött filamentum a gyöngyök mozgását fékként gátolja, ugyanakkor szerepe van a gyöngy és az aktin hálózat közötti kapcsolat fenntartásában/integritásában, a mozgás folytonosságában. A gyöngyfelszín és a filamentum kölcsönhatása tranziens. A gyöngyfelszínről disszociált filamentum (szabad filamentum, *working*, f_w) elasztikus sajátságai miatt a termikus fluktuációi által vezérelt növekedése/elongációja révén erőt fejt ki, ami a gyöngyök mozgását segíti. Végül a filamentumvég sapkázására kerül sor (*capping*), ami így az erő kifejtés tekintetében inaktívvá válik (inaktív filamentum, f_i). Az elasztikus-pányvázott racsnik hatékony működésében az aktin filamentumok mechanikai tulajdonságai is meghatározóak [117, 118]. A modell alapján a hatékony erő kifejtés tekintetében optimális aktin filamentumhossz (a szögös vég és az első elágazás távolsága) a $\sim 10\text{-}100\text{ nm}$ -es nagyságrendbe esik. A rövidebb filamentumok túl merevek, kismértékű termikus fluktuációjuk limitálja a filamentumvég és a gyöngyfelszín közötti rés méretét, és ezáltal a monomerek beépülését. A hosszabb filamentumok ugyanakkor kisebb terhelés (kisebb, mint a megálláshoz szükséges erő, *stall force*) hatására is hajlamosak lehetnek az oldalirányú kihajlásra (*buckling*).



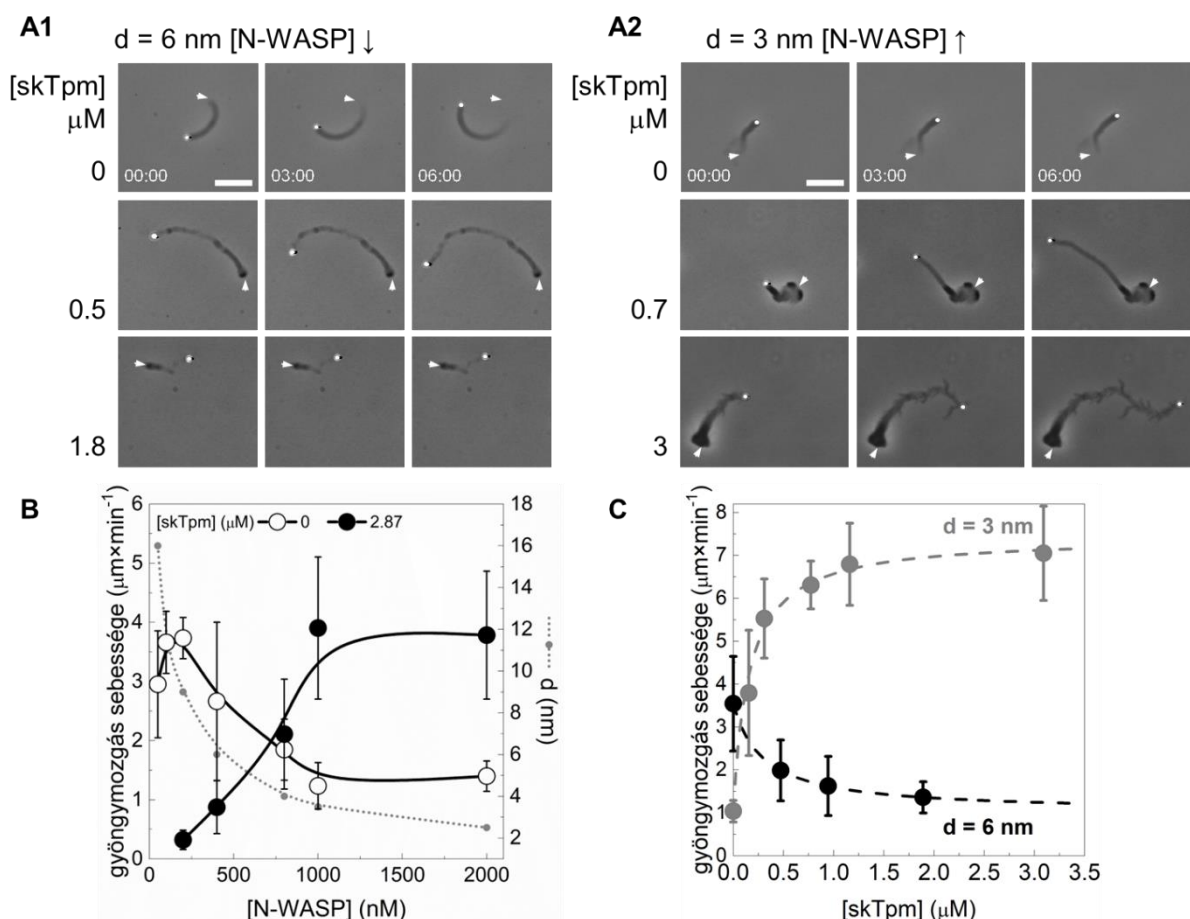
10. ábra: A elasztikus-pányvázott racsnik modell.

1. Az Arp2/3 komplex által katalizált nukleáció (elágazások kialakulása/autokatalitikus *branching*, kötött filamentum), 2. a filamentum disszociációja (szabad filamentum), 3. a filamentum termikus fluktuációja, monomerek beépülése/elongáció, 4. a filamentumvég sapkázása (*capping*, inaktív filamentum), 5. a filamentum hosszirányú kihajlása (*buckling*). f_a : a kötött (a: *attached*) filamentumvégekhez kapcsolódó erőhatás, f_w : a szabad (w: *working*) filamentumvégekhez kapcsolódó erőhatás, a: a kötött filamentumok száma, w: a szabad filamentumok száma, F: teher. A gyöngyök egyenletes mozgását feltételezve ($v = \text{állandó}$) az erőegyensúly az alábbiak szerint írható fel: $w \times f_w - a \times f_a - F = 0$ [116].

Az skTpm lassítja vagy gyorsítja a gyöngyök mozgását az N-WASP gyöngyfelszíni távolságától függően

Tropomiozin hiányában a gyöngyök sebessége kétfázisú karakterisztikát mutatott az N-WASP átlagos gyöngyfelszíni távolságának (d), és így az aktivált Arp2/3 komplex sűrűségének a

függvényében (11. B ábra) [113, 119]. A küszöb távolság ($d \sim 15$ nm) alatt az elágazások kialakulásának alacsony frekvenciája miatt a gyöngy mozgását biztosítani képes filamentumszám és kohézív aktin hálózat nem alakul ki, a gyöngyök csóva nélkül, csupaszok maradnak (*nem bemutatott adatok*) [118]. A távolság csökkenésével a gyöngymozgás sebessége nő. A maximális sebességet biztosító optimális távolságot ($d \sim 6$ nm) meghaladva az elágazások kialakulásának viszonylag nagy frekvenciája miatt a gyöngymozgás sebessége csökken.



11. ábra: Az skTpm a gyöngymozgás negatív, vagy pozitív szabályozója az N-WASP gyöngyfelszíni távolságától függően.

Reprezentatív fázis-kontraszt mikroszkópiai felvételek a biomimetikus modellről alacsony (**A1**, $d = 6$ nm, [N-WASP] ↓) és magas (**A2**, $d = 3$ nm, [N-WASP] ↑) N-WASP gyöngyfelszíni sűrűség esetén. Az N-WASP funkcionális mikrogöngyök ($\varnothing 2$ μm) fehér körként, míg az Arp2/3 komplex által létrehozott aktin hálózat szürke, csóvaszerű nyúlványként jelenik meg. Az aktin hálózat disztális végének eredeti ($t = 00:00$) pozícióját fehér nyilak jelölik. Méretvonal = 20 μm, idő = min : s, d: az N-WASP átlagos gyöngyfelszíni távolsága. (**A1**) [F-aktin] = 7 μM, [profilin] = 2.6 μM, [ADF] = 6.5 μM, [gelsolin] = 100 nM, [Arp2/3] = 100 nM, $d = 6$ nm. (**A2**) [F-aktin] = 7 μM, [profilin] = 2.6 μM, [ADF] = 6.5 μM, [gelsolin] = 100 nM, [Arp2/3] = 50 nM, $d = 3$ nm.

(**B**) A gyöngymozgás sebessége az N-WASP gyöngyfelszíni sűrűségének függvényében skTpm hiányában és jelenlétében. Átlag ± SD, $n_{\text{gyöngy}} = 10-30$, $n_{\text{minta}} = 2-5$, d: az N-WASP átlagos gyöngyfelszíni távolsága.

(**C**) A gyöngymozgás sebessége az [skTpm] függvényében alacsony ($d = 6$ nm) és magas ($d = 3$ nm) N-WASP gyöngyfelszíni sűrűség esetén. Átlag ± SD, $n_{\text{gyöngy}} = 11-28$, $n_{\text{minta}} = 2-6$. A szaggatott vonalak az adatokra illesztett függvényeket jelzik a Michaelis-Menten modell szerint (4.1., 4.2. egyenletek).

A biomimetikus modell milyen fenotípusai figyelhetők meg az skTpm jelenlétében?

Az skTpm jelenlétében a gyöngymozgás sebessége, az aktin hálózat szerkezetének mezoszkópikus sajátosságai, össze-, és szétszerelődésének dinamikája, valamint molekuláris összetétele is eltérő volt a standard rendszerhez képest (11. ábra).

Az skTpm a gyöngymozgás negatív, vagy pozitív szabályozója az N-WASP gyöngyfelszíni távolságától függően (11. B, C ábra). Az optimális N-WASP távolság ($d \sim 6$ nm) esetén a gyöngyök mozgását az skTpm lassította, magas skTpm koncentráción ($> 3 \mu\text{M}$) a gyöngyök aktin hálózatot nem hoztak létre, mozdulatlanok maradtak. Ellentétben, kis N-WASP távolság esetén ($d \sim 3$ nm) a gyöngyök sebessége nagyobb volt skTpm jelenlétében, mint hiányában. Az skTpm hatása mindkét esetben koncentrációfüggőnek bizonyult. A $v([\text{skTpm}])$ adatsort a Michaelis-Menten modell szerint illesztettem (4.1. és 4.2. egyenletek):

$$v = v_{\max} \frac{K}{K + [\text{skTpm}]} + v_{\min} \quad (4.1.)$$

4.1. egyenlet: Michaelis-Menten modell, $d = 6$ nm

v : a gyöngymozgás sebessége

$v_{\max}$: az skTpm hiányának megfelelő sebesség

$v_{\min}$: az skTpm telítési koncentrációjának megfelelő sebesség

K : az 50%-os gátláshoz tartozó (féltelítési) $[\text{skTpm}]$

$[\text{skTpm}]$: az skTpm koncentrációja

$$v = v_{\max} \frac{[\text{skTpm}]}{K + [\text{skTpm}]} + v_{\min} \quad (4.2.)$$

4.2. egyenlet: Michaelis-Menten modell, $d = 3$ nm

v : a gyöngymozgás sebessége

$v_{\max}$: az skTpm telítési koncentrációjának megfelelő sebesség

$v_{\min}$: az skTpm hiányának megfelelő sebesség

K : az 50%-os gátláshoz tartozó (féltelítési) $[\text{skTpm}]$

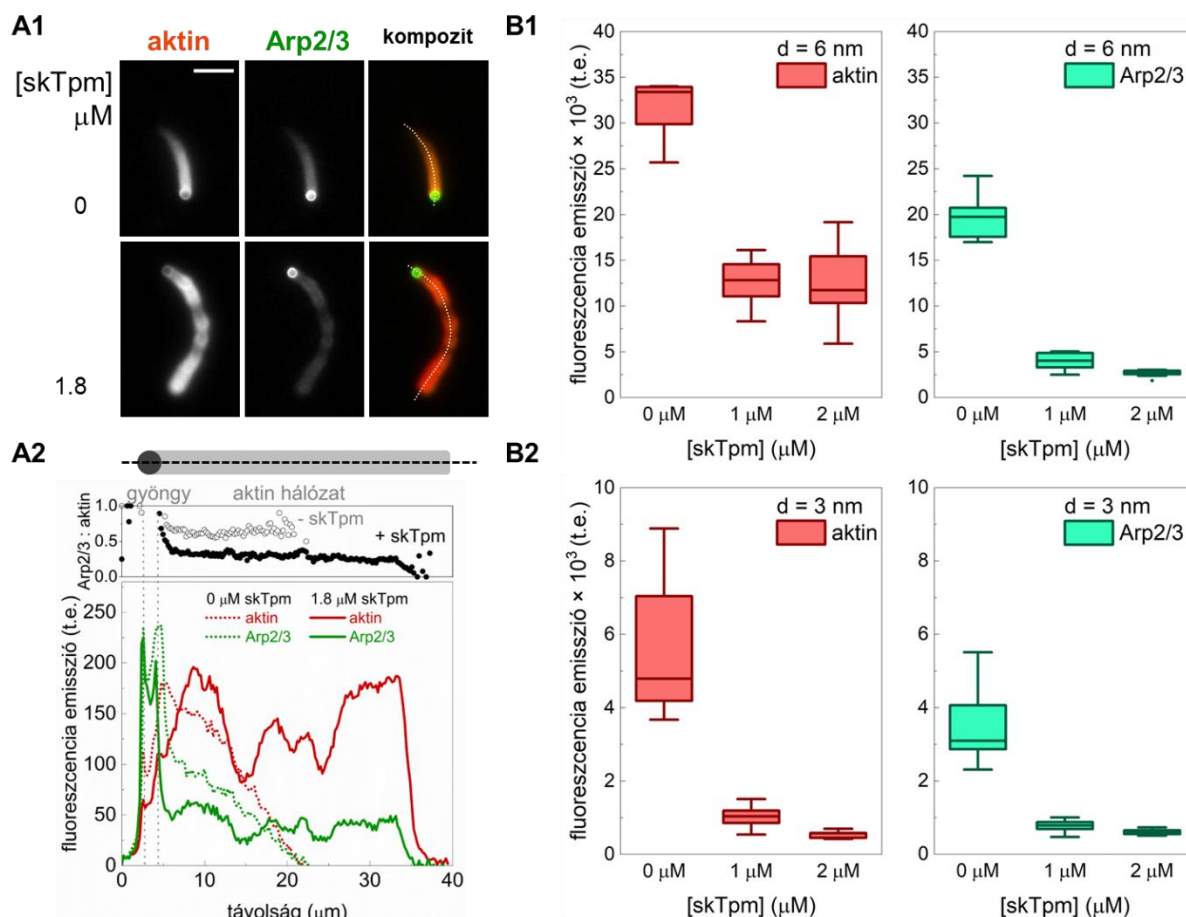
$[\text{skTpm}]$: az skTpm koncentrációja

A féltelítési skTpm koncentráció $K(d = 6 \text{ nm}) = 0.295 \pm 0.005 \mu\text{M}$ -nak és $K(d = 3 \text{ nm}) = 0.156 \pm 0.030 \mu\text{M}$ -nak adódott (11. C ábra), ami összhangban van a *bulk* polimer sokaságon végzett mérésekből származtatott értékekkel. Ez arra utal, hogy az skTpm gyöngymozgásra kifejtett hatásainak hátterében, mint inhibitor, az Arp2/3 komplex aktivitásának gátlása áll.

Az skTpm nem segíti elő az Arp2/3 komplex aktin hálózatról való disszociációját

Az aktin hálózat molekuláris összetételét fluoreszcensen jelölt aktin és Arp2/3 komplex alkalmazásával vizsgáltam (12. ábra). A fluoreszcencia mikroszkópiai vizsgálatok kvantitatív elemzése alapján az egységnyi idő alatt létrejött hálózatban az Arp2/3:aktin arány csökkenő tendenciát mutatott növekvő skTpm jelenlétében. Az arány azonban állandó volt a hálózat mentén skTpm hiányában és jelenlétében (12. ábra). A fehérjemennyiség csökkenését

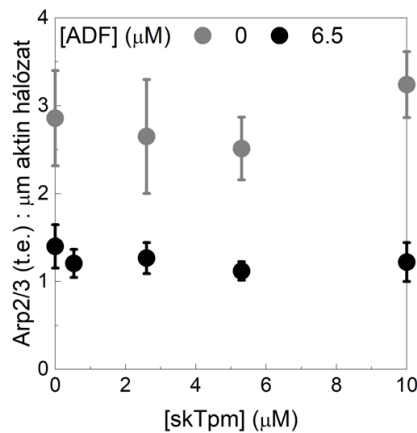
eredményezheti az, hogy az skTpm gátolja az Arp2/3 komplex aktivitását és az elágazások kialakulását a gyöngyfelszín közelében és/vagy elősegíti az Arp2/3 komplex és az elágazások hálózatról való disszociációját. A kérdés vizsgálata érdekében tropomiozin hiányában létrehozott aktin hálózatok Arp2/3 komplex tartalmát vizsgáltam skTpm hozzáadását követően (13. ábra). Az Arp2/3 komplexnek a hálózat egységni hosszára vonatkozó mennyisége nem változott az skTpm *de novo* hozzáadásával, ami arra utal, hogy az skTpm nem képes az Arp2/3 komplex disszociációját előidézni az aktin hálózatról, hanem annak beépülését a gyöngyfelszín közelében gátolja.



12. ábra: Az skTpm hatása az aktin hálózat molekuláris összetételére 1.

(A1) Reprezentatív fluoreszcencia mikroszkópiai felvételek a biomimetikus modellről. Zöld fluoreszcencia emisszió: Alexa488M-Arp2/3 komplex, piros fluoreszcencia emisszió: TAMRA-aktin. [TAMRA-F-aktin] = 7 μM , [profilin] = 2.6 μM , [ADF] = 6.5 μM , [gelsolin] = 100 nM, [Alexa488M-Arp2/3] = 100 nM, [skTpm] = 0, 1.8 μM , d = 6 nm. Méretvonal = 10 μm . **(A2) alsó panel:** TAMRA-aktin és Alexa488M-Arp2/3 komplex fluoreszcencia emissziója a gyöngyfelszíntől mért távolság függvényében skTpm hiányában és jelenlétében ([skTpm] = 1.8 μM). **felső panel:** Az Arp2/3:aktin fluoreszcencia emisszió aránya a gyöngyfelszíntől mért távolság függvényében. A függőleges, szürke pontozott vonalak a gyöngyfelszint jelzik.

(B1, B2) TAMRA-aktin és Alexa488M-Arp2/3 komplex fluoreszcencia emissziója az aktin hálózat egységi idő alatt létrejött hányadára vonatkoztatva skTpm hiányában és jelenlétében alacsony **(B1, d = 6 nm)** és magas **(B2, d = 3 nm)** N-WASP gyöngyfelszíni sűrűség esetén. **ngyöngy** = 8-19. **(B1)** [F-aktin] = 7 μM , [profilin] = 2.6 μM , [ADF] = 6.5 μM , [gelsolin] = 175 nM, [Arp2/3] = 208 nM, d = 6 nm. **(B2)** [F-aktin] = 7 μM , [profilin] = 2.6 μM , [ADF] = 6.5 μM , [gelsolin] = 105 nM, [Arp2/3] = 45 nM, d = 3 nm.



13. ábra: Az skTpm hatása az aktin hálózat molekuláris összetételére 2.

Az Arp2/3 komplexnek az aktin hálózat egységnyi hosszára (μm) vonatkozó mennyisége az skTpm *de novo* hozzáadásával. [TAMRA-F-aktin] = 7 μM, [profilin] = 2.6 μM, [gelsolin] = 175 nM, [Alexa488M-Arp2/3] = 50 nM, d = 6 nm. Átlag ± SD, n = 2-3. Az ADF jelenlétében az aktin hálózat Arp2/3 komplex tartalma alacsonyabb az ADF-nek a hálózat szétszerelődését katalizáló hatása miatt.

Hogyan értelmezhető az skTpm gyöngymozgásban tetten érhető kettős fenotípusa az inhibitor sajátja alapján?

Az elasztikus-pányvázott racsnit modell alapján a gyöngyök mozgását két filamentumvég típus, a kötött (az N-WASP:Arp2/3 komplexen keresztül a gyöngyhez kapcsolt) és a szabad (az N-WASP:Arp2/3 komplexről disszociált) közötti kinetikai egyensúly határozza meg. Nagyobb N-WASP távolságok és így alacsony aktivált Arp2/3 komplex gyöngyfelszíni sűrűség esetén a szabad, elongációra képes filamentumvégek dominálnak. Ezek polimerizációjához kapcsolódó erőhatások a gyöngyök mozgását segítik. Ezen a tartományon, amikor a szabad filamentumvégek száma limitálja a gyöngyök mozgását az skTpm az Arp2/3 komplex aktivitását gátolva lassítja a gyöngyök mozgását. Kisebb N-WASP távolságok, és így magas aktivált Arp2/3 komplex gyöngyfelszíni sűrűség esetén a kötött, elongációra nem képes filamentumok dominálnak és limitálják a gyöngyök mozgását. Ezen a tartományon az skTpm az Arp2/3 komplex aktivitását gátolva, a fékként ható kötött végek számát csökkentve gyorsítja a gyöngyök mozgását.

Az skTpm aktin hálózathoz való kötődését az elágazások disszociációja (debranching) szabályozza

Az skTpm aktin hálózathoz való lokalizációját fluoreszcensen jelölt fehérjék segítségével vizsgáltam (14. ábra). Érdekes módon az skTpm eloszlása az aktin hálózat mentén inhomogénnek mutatkozott, mennyisége növekedett a gyöngyfelszíntől a hálózat disztális régiói felé. A mintázat állandó volt a gyöngyök mozgása során, ami arra utal, hogy az elágazások kialakulása és az skTpm kötődése olyan reakción keresztül csatolt, ami a filamentumok összeszerelődését követi és kinetikai határt szab az skTpm hálózathoz való asszociációjának. Az skTpm:aktin és az skTpm:Arp2/3 arány (r) gyöngyfelszíni távolságtól (L) való függését az alábbi egyenlettel illesztettem:

$$r(L) = r_0 + R(1 - \exp(-\frac{L}{L_{1/2}})) \quad (5)$$

5. egyenlet

r: az skTpm:aktin vagy az skTpm:Arp2/3 komplex arány

r_0 : az $L = 0$ -nak megfelelő arány

$r_0 + R$: a maximumnak megfelelő arány

$L_{1/2}$: az 50%-os telítésnek megfelelő távolság (féltelítési távolság)

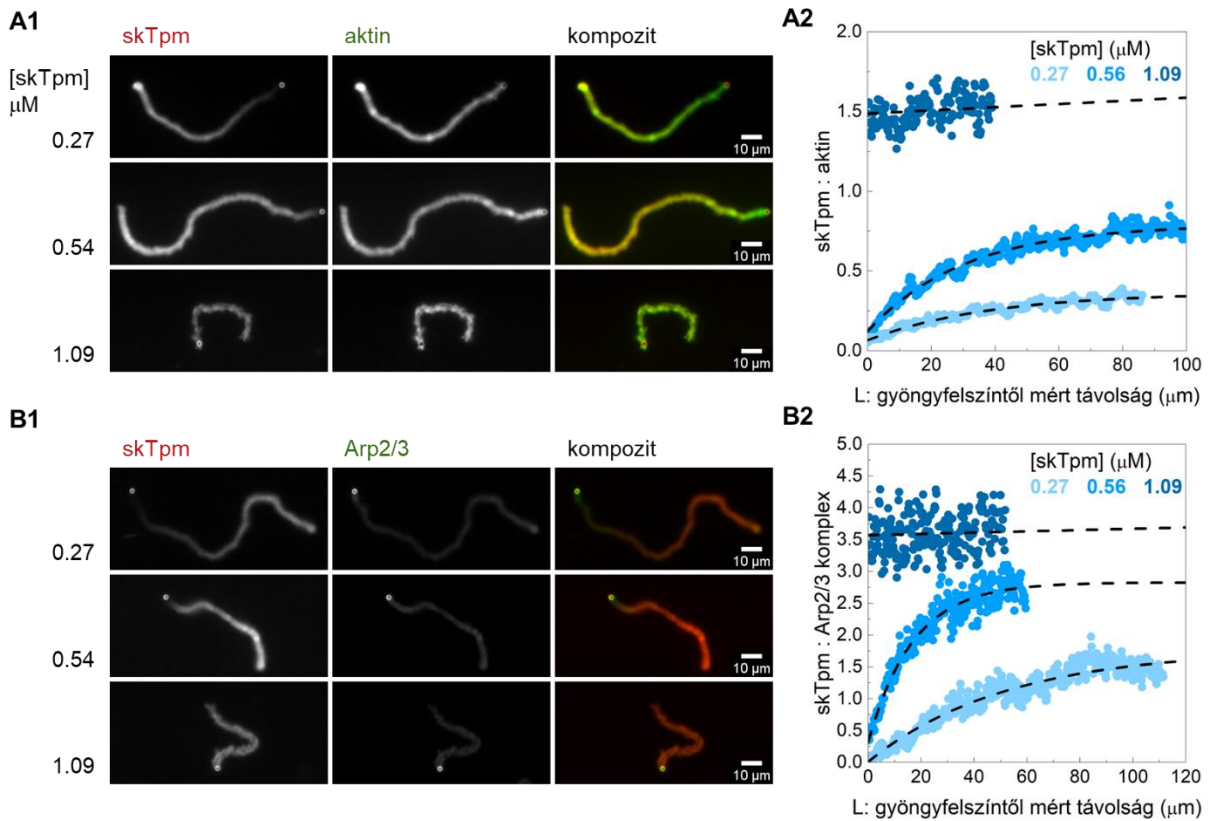
L: a gyöngyfelszíntől mért távolság

Az 50%-os skTpm:aktin és skTpm:Arp2/3 aránynak megfelelő gyöngyfelszíntől mért távolság (féltelítési távolság, $L_{1/2}$) csökkent az [skTpm] függvényében (6. táblázat). Az skTpm-nak a gyöngyök sebességére (v) kifejtett hatását figyelembe véve a féltelítési távolságnak megfelelő féltelítési idő ($t_{1/2} = L_{1/2} \times v \sim 13$ -17 min) függetlennek bizonyult az skTpm koncentrációjától (6. táblázat). A koncentrációtól való függetlenség arra utal, hogy az érték nem az skTpm aktin filamentumokhoz való asszociációs sebességi állandóját tükrözi. Ugyanakkor az érték jól egyezik Arp2/3 komplex által létrehozott elágazások disszociációjának kinetikájával (*debranching*, $k_{1/2} = 13.3 \pm 1.6$ min) [120]. Mindezek arra engednek következtetni, hogy az skTpm eloszlása az aktin hálózat mentén korrelál az elágazások disszociációjával és az skTpm kötődését az Arp2/3 komplex által létrehozott aktin hálózathoz az elágazások sűrűsége szabályozza. Ez az eredmény összhangban van az N-WASP/WAVE2 *knockdown* sejtes fenotípusával, amennyiben az Arp2/3 komplex mennyiségének csökkenése és a tropomiozin (LC24 Ab: humán tropomiozin, alfa-4 specifikus antitest) mennyiségének növekedése volt jellemző a vezető élnél [121].

[skTpm] (μM)	skTpm:aktin		skTpm:Arp2/3	
	$L_{1/2} (\mu m) \pm SD$	$t_{1/2} (min) \pm SD$	$L_{1/2} (\mu m) \pm SD$	$t_{1/2} (min) \pm SD$
0.27	32.36 ± 9.18	13.47 ± 3.82	51.32 ± 16.82	15.65 ± 5.13
0.54	26.74 ± 6.16	15.17 ± 3.50	11.72 ± 3.41	17.12 ± 4.98

6. táblázat: Az skTpm aktin hálózathoz való asszociációját jellemző paraméterek.

Féltelítési távolság: $L_{1/2}$ és idő: $t_{1/2} = L_{1/2} \times v$. Az értékek az skTpm:aktin(L) és az skTpm:Arp2/3 komplex(L) adatsorok illesztéséből kerültek meghatározásra (14. ábra, 5. egyenlet). Átlag $\pm$ SD, n = 14-19.

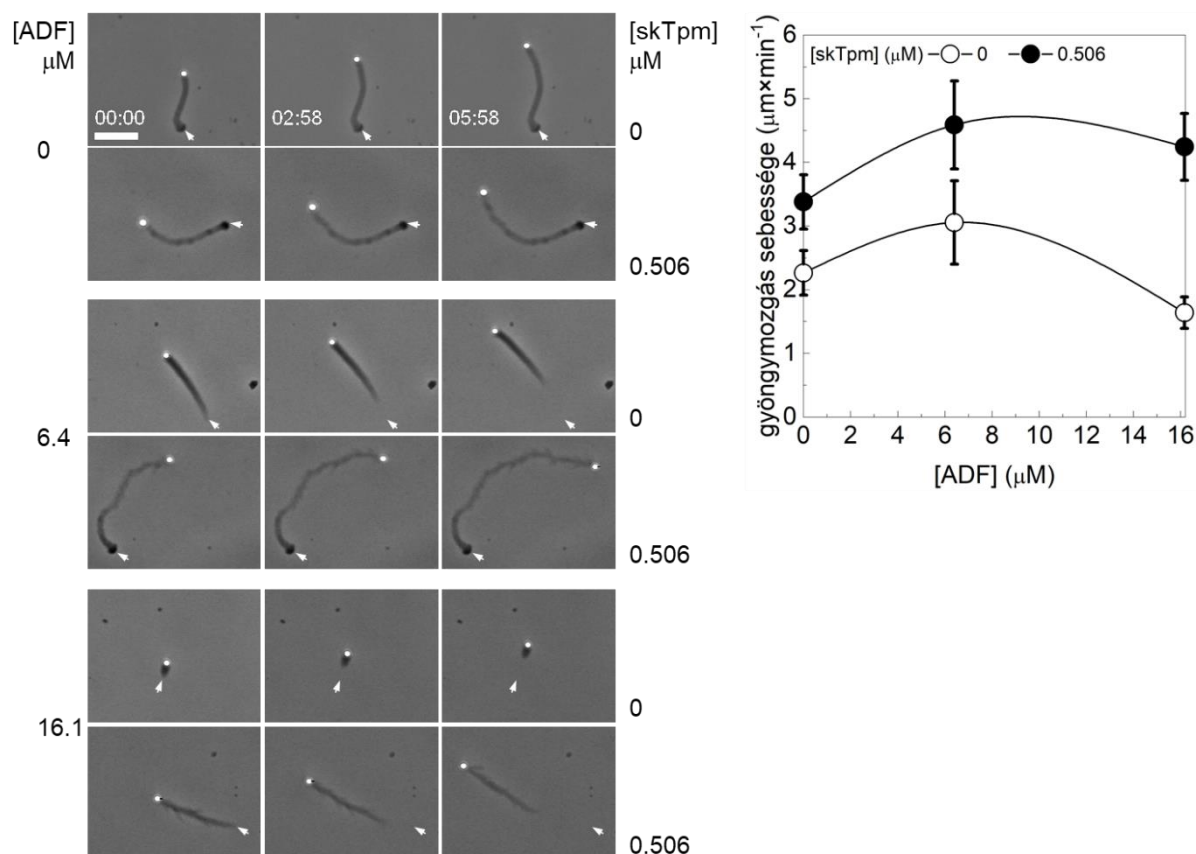


14. ábra: Az skTpm hatása az aktin hálózat molekuláris összetételére 3.

(A1, B1) Reprezentatív fluoreszcencia mikroszkópai felvételek a biomimetikus modellről skTpm hiányában és jelenlétében. Zöld fluoreszcencia emisszió: Alexa488NHS-aktin (A1) vagy Alexa488M-Arp2/3 komplex (B1), piros fluoreszcencia emisszió: Alexa568M-skTpm. Az skTpm:aktin arány (A2) és az skTpm:Arp2/3 arány (B2) a gyöngyfelszíntől mért távolság függvényében. A szaggatott vonalak az adatokra illesztett függvényt jelzik (5. egyenlet). (A1, A2) [F-aktin] = 7 μM , [profilin] = 2.6 μM , [ADF] = 6.5 μM , [gelsolin] = 175 nM, [Alexa488M-Arp2/3] = 84 nM, $d = 6$ nm. (B1, B2) [F-aktin] = 7 μM , [profilin] = 2.6 μM , [ADF] = 6.5 μM , [gelsolin] = 105 nM, [Alexa488M-Arp2/3] = 60 nM, $d = 6$ nm. Méretvonal = 10 μm .

Az skTpm és az ADF kompetitív módon szabályozzák és antagonisztikus hatást fejtenek ki az aktin hálózat szétszerelődésére

A standard biomimetikus rendszerben az aktin csóva szétszerelődését az ADF katalizálja [90, 119]. Az aktin hálózat össze-, és szétszerelődése a taposómalom egyensúlynak megfelelően szabályozott, így annak hossza állandó. Az skTpm jelenlétében az aktin csóva szétszerelődésének gátlása volt megfigyelhető a disztális végen, ami annak meghosszabbodását eredményezte (15. ábra). A méréseket több skTpm és ADF koncentráción is elvégezve az eredmények arra utalnak, hogy az skTpm és az ADF kompetitív módon befolyásolják és antagonisztikus hatást fejtenek ki az aktin hálózat szétszerelődésére. A megfigyelések összhangban vannak a *bulk* polimer sokaságon végzett vizsgálatokkal, mi szerint az skTpm és az ADF kompetitív módon szabályozza az aktin filamentumok szétszerelődését (nem bemutatott adatok, Supplemental Figure 4, 5 [110]). Megjegyzendő, hogy az ADF gyöngymozgás sebességére kifejtett kvalitatív hatása függetlennek bizonyult az skTpm jelenlététől (15. B. ábra).



15. ábra: Az skTpm és az ADF kompetitív módon befolyásolják az aktin hálózata szétszerelődését.

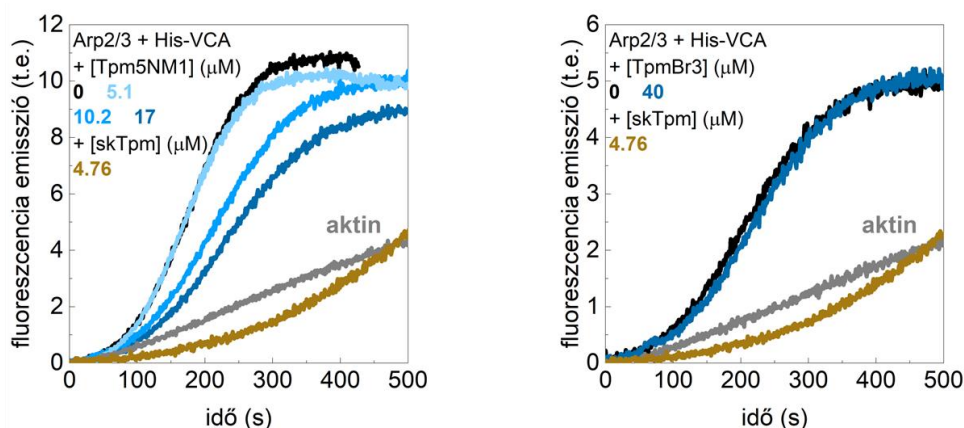
Reprezentatív fázis-kontraszt mikroszkópai felvételek a biomimetikus modellről skTpm és ADF hiányában és jelenlétében. Az N-WASP funkcionális mikrogyöngyök ($\varnothing$ 2 μm) fehér körként, az aktin hálózat szürke, csóvaszerű nyúlványként jelenik meg. Az aktin hálózat disztális végének eredeti ($t = 00:00$) pozícióját fehér nyilak jelölik. Méretvonal = 20 μm , idő = min : s. [F-aktin] = 7 μM , [profilin] = 2.6 μM , [gelsolin] = 175 nM, [Arp2/3] = 90 nM, $d = 4$ nm.

A gyöngymozgás sebessége az [ADF] függvényében skTpm hiányában és jelenlétében. Átlag $\pm$ SD, $n_{\text{gyöngy}} = 9-20$, $n_{\text{minta}} = 2-4$.

A tropomiozinok izoforma specifikus módon befolyásolják az Arp2/3 komplex aktivitását

A sejtbiológiai megfigyelések nyomán [109] a TpmBr3 és a Tpm5NM1 nemizom izoformáknak az Arp2/3 komplex aktivitására gyakorolt hatását is megvizsgáltuk (16. ábra). Pirén aktin alkalmazásán alapuló *bulk* kinetikai kísérletekben megmutattuk, hogy a Tpm5NM1 az skTpm-hoz hasonlóan gátló hatást fejt ki. Ezzel szemben a TpmBr3 nem befolyásolja az Arp2/3 komplex által katalizált filamentumképződést. A TpmBr3 eddig az egyetlen olyan Tpm izoforma, amely nem gátolja az Arp2/3 komplex aktivitását. Ezek az eredmények összhangban vannak a sejtes megfigyelésekkel [109]. A Tpm5NM1 és a TpmBr3 kötőfelszíne az aktin filamentumon nem ismert. Azonban tudjuk, hogy a tropomiozinok azimutális pozíciója az aktin filamentumon izoforma specifikus sajátosságokat mutat, ami magyarázhatja az Arp2/3 komplex aktivitására kifejtett izoforma specifikus hatásokat [47, 75]. Feltételezéseink szerint a

Tpm5NM1 filamentumon elfoglalt pozíciója, az skTpm-hoz hasonlóan átfedést mutat az Arp2/3 komplex kötőhelyével, míg a TpmBr3 pozíciója a komplex kötését nem befolyásolja.



16. ábra: A tropomiozinok izoforma specifikus módon befolyásolják az Arp2/3 komplex aktivitását.

Tpm izoformák hatása az Arp2/3 komplex által katalizált filamentum-összeszerelődés kinetikájára. [G-aktin] = 2.5 μ M (5% pirén jelölt), [Arp2/3] = 100 nM, [His-VCA] = 200 nM.

<i>relatív polimerizációs sebesség</i>	
<i>- Tpm</i>	
spontán polimerizáció	0.199
Arp2/3 komplex katalizált polimerizáció	1.000 $\pm$ 0.005
<i>+ Arp2/3 komplex + Tpm ([Tpm])</i>	
Tpm5NM1 (17 μ M)	0.749 $\pm$ 0.002
TpmBr3 (40 μ M)	1.033 $\pm$ 0.003
skTpm (4.76 μ M)	0.532 $\pm$ 0.006

7. táblázat: A spontán és az Arp2/3 komplex által katalizált filamentum-összeszerelődést jellemző polimerizációs sebesség.

Átlag $\pm$ SD, n = 2-4.

Összefoglalás

A tropomiozin protrúziós fenotípusának modellje

Miként magyarázzák a biomimetikus rendszerben tett megfigyeléseink a Tpm protrúziós fenotípusát?

Többlet tropomiozin jelenlétében, az skTpm injektált sejtekben megfigyelt protrúziós fenotípus jellemzőit [108] rekonstruálja a biomimetikus modellünk, feltételezve az skTpm és az Arp2/3 komplex, valamint az skTpm és az ADF közötti kompetitív antagonisztikus hatást (17. ábra). A fenotípus magában foglalja a lamellipodium dendritikus aktin hálózatainak gátlását és egy lineáris lamellaszerű hálózattá való transzformációját, a lamellipodiális molekuláris markerek (Arp2/3 komplex, ADF) mennyiségének csökkenését, valamint a Tpm jelenlétében megfigyelt

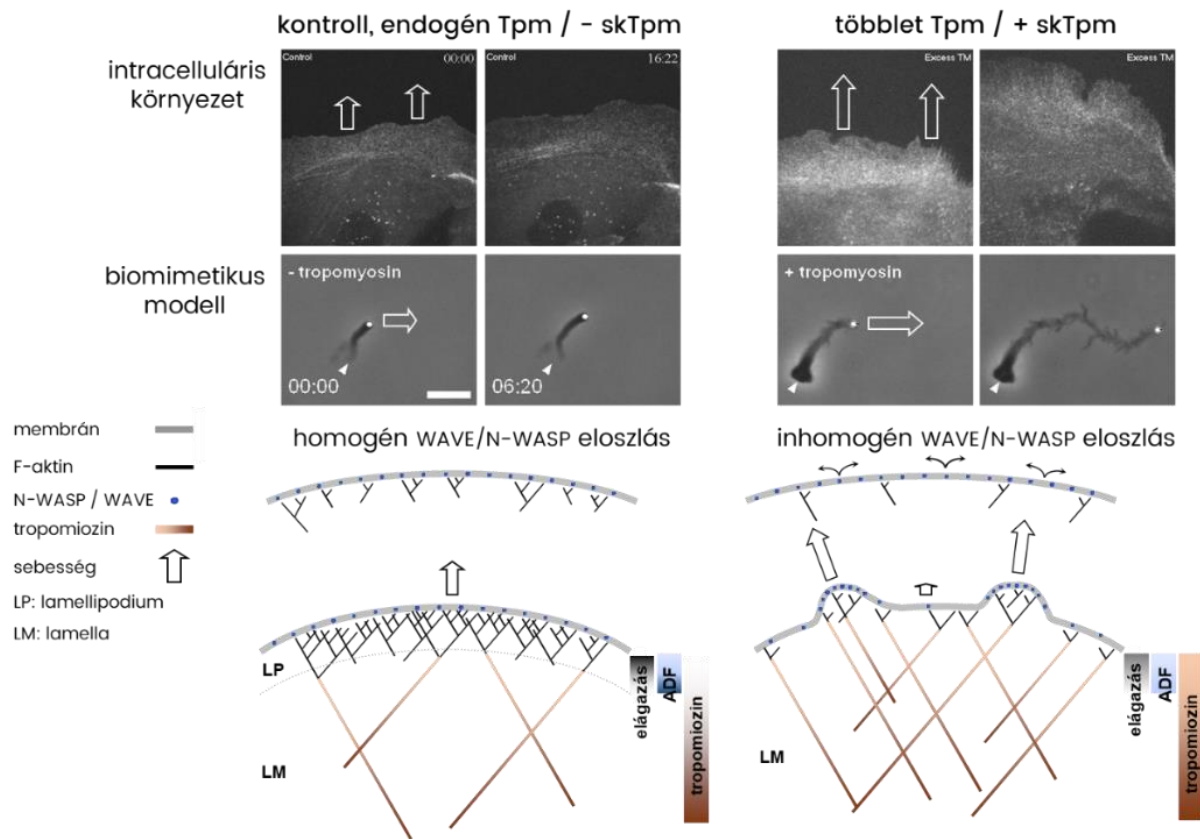
gyorsabb sejtmozgást is, aminek a magas N-WASP sűrűségű gyöngyök skTpm indukálta sebességnövekedése feleltethető meg. Az skTpm injektált sejtekben a vezető él fűrészfogszerű megjelenést mutatott [108], ami az erő kifejtés háttérében álló aktin nukleációs régiók szegregációjára utal. Sejtes környezetben és unilamelláris vezikulákat alkalmazó *in vitro* biomimetikus rendszerekben az N-WASP membránbeli diffúzióját az aktin filamentumokkal kialakított Arp2/3 komplex közvetített tranziens kapcsolatai korlátozzák, ami az aktin és az N-WASP koszegregációjához vezet [122, 123]. Az skTpm inhibitor aktivitása (az Arp2/3 komplex aktivitásának és az elágazások létrejöttének gátlása), az Arp2/3 komplex aktivátorának (WAVE/N-WASP) diffúziós sajátosságai és az elágazások létrejöttének autokatalitikus természete együttesen a WAVE/N-WASP inhomogén membránbeli eloszlásához, diszkrét dendritikus alhálózatok kialakulásához és így erő kifejtéshez vezet. A magas WAVE/N-WASP sűrűségű régiókban az skTpm az elágazások létrejöttének gyakoriságát csökkentve a *branching* reakciót az erő kifejtést tekintetében optimalizálja, ami a membránkitüremkedéseknek kedvez. Az alacsony WAVE/N-WASP sűrűségű régiókban az skTpm az elágazások létrejöttének egyébként is alacsony frekvenciáját csökkentve az erő kifejtést, így a membránkitüremkedéseket negatív módon befolyásolja, továbbá egy lamella-szerű hálózat kialakulásának kedvez.

A lamellipodium és a lamella szegregációjának lehetséges mechanizmusai

Hogyan értelmezhetjük a Tpm hatásait a lamellipodium és a lamella szegregációjának vonatkozásában?

Endogén Tpm jelenlétében, kontroll sejtekben az Arp2/3 aktivátora (WAVE/N-WASP) homogén eloszlást mutat a sejtmembránban a vezető élen. A membrán közelében aktivált Arp2/3 komplex egy dendritikus aktin hálózat kialakulását katalizálja. Az elágazások sűrűsége miatt a Tpm kötődése a membránközeli, proximális régiókban gátolt, így az ADF a filamentumokhoz kötődve elősegíti azok szétszerelődését. Ezen aktivitások révén alakul ki a lamellipodium elágazásokban gazdag, gyors *turnover*-rel jellemezhető hálózata. A membrántól távolabbi, disztális régiókban az elágazások disszociációját követően a Tpm az elágazásoktól mentes filamentumszegmensekhez kötődik, ezzel gátolja az ADF aktivitását, ami lassabb *turnover*-t eredményez. Ez a régió felel meg a lamella egyenes filamentumokból álló, kevésbé dinamikus hálózatának. Összességében tehát az skTpm és a WAVE/N-WASP-Arp2/3 nukleációs komplex, valamint az skTpm és az ADF kompetitív antagonisztikus hatásai elegendőnek bizonyulnak a lamellipodium és a lamella szegregációjához. A Tpm hatását rekonstruáló modell definiálja azt a minimális biomimetikus rendszert, amely egy aktin hálózathoz a rendszer önszerveződése révén két eltérő tulajdonságú kompartment, a lamellipodium és a lamella kialakulásához szükséges.

Megjegyzendő, hogy az skTpm izoforma nemizom sejtekben való előfordulása nem fiziológias. Ugyanakkor eredményeink alapján egyes nemizom Tpm izoformák (pl. Tpm5NM1) a vázizom tropomiozinhoz hasonlóan az Arp2/3 komplex aktivitását gátolják, míg mások (pl. TpmBr3) a *branching* reakciót támogatják. Ezek a funkcionális sajátosságok az aktin sejt váz Tpm izoforma specifikus szabályozására adnak lehetőséget és támogatják a modellünk relevanciáját a nemizom sejtek kontextusában.



17. ábra: A Tpm protrúziós fenotípusának modellje, a lamellipodium és a lamella szegregációjának lehetséges mechanizmusai.

Az intracelluláris környezetet bemutató ábra forrása: [108].

Tudományos szempontból új eredmények

Az eltérő szerkezeti és dinamikai sajátosságokkal rendelkező kompartmentek, a lamellipodium és a lamella egy aktin hálózattól, a rendszer önszerveződése révén alakulhat ki, amelyben meghatározóak a tropomiozin fehérjecsalád izoforma specifikus kölcsönhatásai.

1. Az skTpm és az Arp2/3 komplex kompetitív módon befolyásolják és antagonisztikus hatást fejtenek ki az elágazások kialakulására (*branching*) és ez által a dendritikus aktin hálózat összeszerelődésére.
2. Az skTpm kötődését az Arp2/3 komplex által létrehozott dendritikus aktin hálózathoz az elágazások sűrűsége szabályozza.
3. Az skTpm és az ADF kompetitív módon befolyásolják és antagonisztikus hatást fejtenek ki a dendritikus aktin hálózat szétszerelődésére.
4. Az skTpm és az Arp2/3 komplex, valamint az skTpm és az ADF közötti kompetitív antagonisztikus hatás elegendő a többlet skTpm indukálta protrúziós fenotípus kialakulásához, illetve a lamellipodium és a lamella szegregációjához.
5. Az skTpm-nak a sejt protrúziós aktin hálózataira kifejtett hatását rekonstruáló biomimetikus modell definiálja azt a minimális fehérjerendszert, amely egy aktin

hálózatból a rendszer önszerveződése révén két eltérő sajátságokkal rendelkező aktin kompartment, a lamellipodium és a lamella kialakulásához szükséges.

6. A tropomiozinok izoforma specifikus módon befolyásolják az Arp2/3 komplex aktivitását, aminek szerkezeti magyarázatát adhatja az izoforma specifikus azimutális pozíciójuk az aktin filamentumon.

Kapcsolódó publikációk, az eredmények közlési helyének megadása

Kis-Bicskei Nikolett, Vig Andrea Teréz, Nyitrai Miklós, **#Bugyi Beáta** ✉, #Talián Csaba Gábor ✉

Purification of tropomyosin Br-3 and 5NM-1 and characterization of their interactions with actin.

CYTOSKELETON 70 : 11 pp. 755-765. , 11 p. (2013)

IF: 3.007 Folyóiratcikk (Szakcikk) Tudományos

Független idéző: 16 Függő idéző: 3 Összesen: 19

[#megosztott levelező/utolsó szerzős közlemény](#)

Bugyi Beáta, Didry Dominique, Carlier Marie-France ✉

How tropomyosin regulates lamellipodial actin-based motility: a combined biochemical and reconstituted motility approach.

EMBO JOURNAL 29 : 1 pp. 14-26. , 13 p. (2010)

IF: 10.124 Folyóiratcikk (Szakcikk) Tudományos

Független idéző: 40 Függő idéző: 7 Összesen: 47

Bugyi Beáta, Carlier Marie-France ✉

Control of actin filament treadmilling in cell motility.

ANNUAL REVIEW OF BIOPHYSICS 39 pp. 449-470. , 22 p. (2010)

IF: 17.524 Folyóiratcikk (Összefoglaló cikk) Tudományos

Független idéző: 267 Függő idéző: 19 Összesen: 286

Romet-Lemonne Guillaume, Helfer Emmanuel, Delatour Vincent, **Bugyi Beáta**, Bosch Montserrat, Romero Stephane, Carlier Marie-France, Schmidt Stephan, Fery Andreas ✉

Biomimetic systems shed light on actin-based motility down to the molecular scale.

BIOPHYSICAL REVIEWS AND LETTERS 4 : 1-2 pp. 5-15. , 11 p. (2009)

Impakt faktor: -, Folyóiratcikk (Szakcikk) Tudományos

Független idéző: 1 Összesen: 1

Bugyi Beáta, Le Clainche Christophe, Romet-Lemonne Guillaume, Carlier Marie-France ✉

How do in vitro reconstituted actin-based motility assays provide insight into in vivo behavior?

FEBS LETTERS 582 : 14 pp. 2086-2092. , 7 p. (2008)

IF: 3.264 Folyóiratcikk (Összefoglaló cikk) Tudományos

Független idéző: 12 Függő idéző: 2 Összesen: 14

3.2. A DAAM formin az aktin sejtvezdinamika szabályozásában

A formin fehérjecsalád

A formin család (8. táblázat) névadó tagját, a formin-1 fehérjét (formin, FMN) egérben azonosították [124]. Az elnevezés a *formin-1* gén mutációja által okozott *limb deformity* fenotípusból származik. Habár a későbbiekben kiderült, hogy a fenotípus nem a formin-1 fehérje diszfunkciójából ered, hanem egy, a szomszédos *gremlin* gén funkcióját érintő pontmutáció eredménye [125]. A forminok széles körben előfordulnak, a növényektől az élesztőkön át az emlősökig megtaláljuk őket. A forminokat moduláris doménfelépítés jellemzi (18. ábra). A leginkább konzervált, a fehérjecsaládot definiáló régiók a formin homológia domének (FH1, FH2). Az FH2 domén filogenetikai elemzése alapján az Állatok (*Metazoa/Animalia*) rendszertani országában a forminokat kilenc alcsaládba sorolhatjuk [126-129] (8. táblázat). A kilencből hét altípus az emberben is előfordul, 15 formint kódoló génnel, amelyek közül több esetben klinikai relevancia is ismert.

<i>fehérje</i>	<i>rövid elnevezés</i>	<i>humán gén lókus</i>	<i>klinikai relevancia</i>
Formin	FMN1	15q13.3	polidaktília, intellektuális fogyatékoság
<i>limb deformity protein homolog</i>	FMN2	1q43	
kanonikus formin			
<i>Diaphanous</i>	Dia1	5q31.3	siketség, kérgi vakság,
<i>Diaphanous-related formin</i>	Dia2	Xq21.33	mikrokefália
	Dia3	13q21.2	
<i>Dishevelled-associated activator of morphogenesis</i>	Daam 1	14q23.1	Guillain-Barré szindróma,
	Daam 2	6p21.2	skizofrénia, szívfejlődési rendellenesség
<i>Delfilin</i>			-
<i>Glutamate receptor ionotropic delta 2-interacting proteins (GRID2IP)</i>	-	7p22.1	
<i>FH1/FH2 domain containing protein</i>	FHOD1	16q22.1	hipertrófiás kardiomiopátia
	FHOD3	18q12.2	
<i>Formin-like protein</i>	FMNL1	17q21.31	-
<i>Formin-related proteins identified in leukocytes (FRL)</i>	FMNL2	2q23.3	
	FMNL3	12q13.13	
<i>Inverted formin</i>	INF1	4q31.3	Charcot-Marie-Tooth betegség, fokális
<i>FHDC1</i>	INF2	14q32.33	szegmentális glomeruloszklerózis
<i>Multiple wing hairs-related formin</i>	MWHF	-	-
<i>Pleckstrin homology (PH)-domain-containing formin</i>	PHCF	-	-

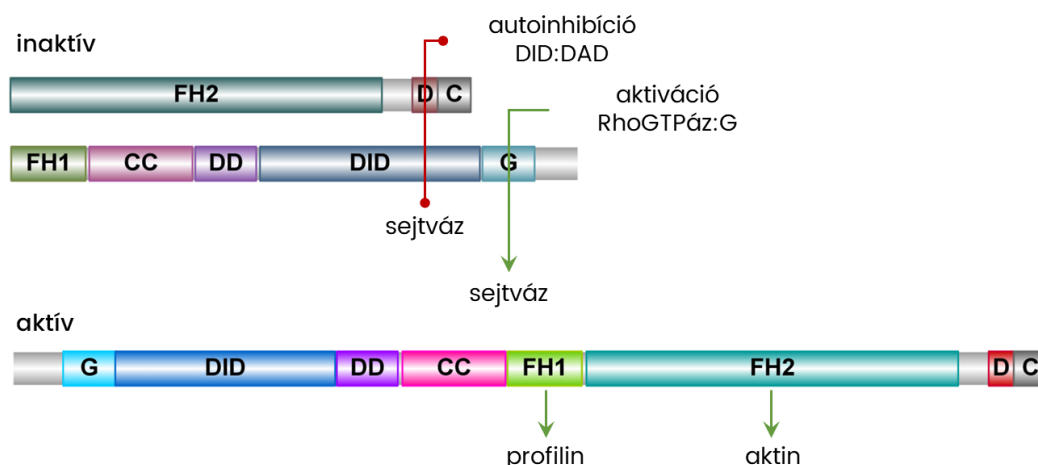
8. táblázat: A formin fehérjecsalád.

Drf forminok: szürke háttér

A formin fehérjecsalád szignatúrája a központi FH2 domén, valamint az attól N-terminális irányban található prolin gazdag FH1 domén. Az FH1-FH2 modulhoz szerkezetileg és

funkcionálisan is eltérő domének csatoltak az egyes alcsaládokban. Az FH2 aktinkötő domén, míg az FH1 az aktin monomerkötő profilinnal alakít ki kölcsönhatást [10, 12, 59, 79, 130]. A PhD munkámhoz kapcsolódó kutatások egyik meghatározó eredménye, hogy az FH2 funkcionális formája a homodimer és a dimerizációhoz nélkülözhetetlen az FH2 és az FH1 doméneket összekötő *linker* szakasz [131]. Az FH1-FH2 modul katalizálja az aktin filamentumok nukleációját és processzív módon támogatja a szöges vég elongációját. Ilyen módon aktin polimerázként működik [12]³. Az egyes formin altípusok FH1-FH2 moduljának aktin aktivitásai kvalitatív módon nem, csak kvantitatív jellemzőikben térnek el.

A *Diaphanous-related formin* (Drf) alcsaládba tartozó fehérjék (Dia, Daam, FMNL) további konzervált doménekkel rendelkeznek, amelyek a fehérje aktivitásának szabályozásában vesznek részt (8. táblázat, 18. ábra). Az N-terminális DID (*diaphanous inhibitory domain*) és a C-terminális DAD (*diaphanous autoregulatory domain*) domének közötti intramolekuláris kölcsönhatás a fehérjét zárt konformációban, inaktív állapotban tartja. A Drf forminok GTPáz-kötő doménjének (*GTPase-binding domain*, G) Rho GTPáz kötése az autoinhibíciós kölcsönhatás feloldását és a fehérje aktivációját eredményezi. Az autoinhibíciós kölcsönhatásban részt vevő domének (G, DID, DAD) hiányában vagy funkciójuk sérülése esetén a forminok konstitutívan aktívak [132, 133].



18. ábra: A Drf forminok doménszerkezete és szabályozásuk egyszerűsített sémája.

szignatúra formin homológia domének: FH1, FH2

Drf specifikus domének: G: GTPáz-kötő domén (*GTPase-binding domain*), DID: diaphanous inhibíciós domén (*diaphanous inhibitory domain*), DAD: diaphanous autoregulációs domén (*diaphanous autoregulatory domain*)
DD: dimerizációs domén, CC: *coiled-coil*, C: CT régió

A Dishevelled-associated activator of morphogenesis formin

A *Dishevelled-associated activator of morphogenesis* (DAAM) alcsaládot élesztő kettős hibrid kísérlet során azonosították, amikor az egér Dishevelled2 (mDvl2) PDZ doménjével kölcsönható partnereket kerestek [134]. A Daam ortológok (*Drosophila*, *Xenopus*, csirke, egér) magas szinten expresszálódnak a tranchearendszerben (apikális aktin kötegek) [132], a

³ polimeráz: a polimerizáció folyamatát katalizáló fehérje

szívizomban és a harántcsíkolt izomban (szarkomer) [135, 136], valamint a központi idegrendszerben (aktin gazdag filopodiális nyúlványok) [133, 137]. Az adatok korrelálnak a humán fehérje expressziós mintázatával⁴ és funkcióival, amelyek az izomrendszer [138] és az idegrendszer [139-141] normál és patológias működéséhez (pl. Guillain-Barré szindróma, skizofrénia, szívfejlődési rendellenesség) kapcsolódnak.

Az idegrendszeri funkciókat illetően a DAAM meghatározó az axonok növekedésében embrionális korban és felnőtt állatokban is (*Drosophila*, egér) [133]. Sejtes szinten a DAAM jellemzően a növekedési kúp perifériás régióiban, az aktin gazdag filopodiális kompartmentekhez lokalizál és azok képződését segíti elő. Kölcsönhat a Rac GTPázokkal, az Ena és profilin fehérjékkel. A DAAM idegrendszeri funkcióinak konzerváltságát a humán fehérje agyi diszfunkciókban való érintettsége is alátámasztja [139-141].

Hipotézis, célkitűzések, kérdések

A DAAM meghatározó szereppel bírhat az aktin sejtvázas szabályozásában, azonban a fehérje ezen funkciójának fiziko-kémiai hátterét nem vizsgálták.

Hipotézis

A DAAM az aktin sejtvázas, azon belül is a filopodiális nyúlványok meghatározó szabályozója.

Munkánk során a DAAM rekombináns úton előállított, natív, trunkált és mutációt hordozó fragmentumait vizsgáltuk *in vitro*. Célunk volt az aktinnal kialakított kölcsönhatások és azok funkcionális következményeinek leírása.

Kérdések

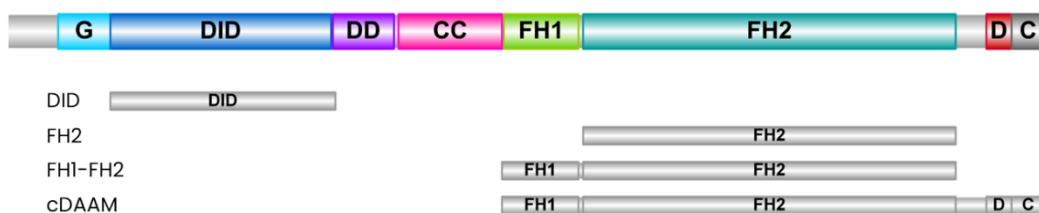
1. Milyen fiziko-kémiai sajátságokkal és aktivitásokkal rendelkeznek a DAAM egyes szakaszai?
2. Milyen szerkezeti aspektusai vannak a DAAM aktivitásainak?
3. Milyen sejtvázaszabályozó funkciókkal rendelkezik a DAAM?

Eredmények és következtetések

A DAAM FH1-FH2 egy profilin kapcsolt aktin összeszerelő faktor

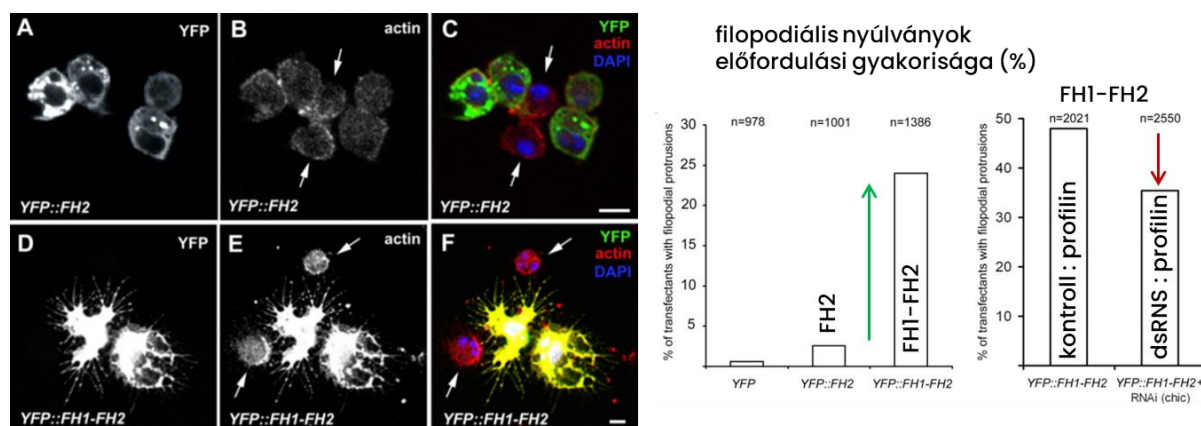
Az aktin sejtvázas szabályozásában potenciálisan a DAAM formin homológia doménjei vesznek részt, ezért elsőként az FH2 és a tandem FH1-FH2 szakaszok fiziko-kémiai sajátságait vizsgáltuk (19. ábra).

⁴ Human Protein Atlas: <https://www.proteinatlas.org/>



19. ábra: A vizsgált DAAM konstruktok doménszerkezete.

A DAAM FH domének vizsgálatára *Drosophila* S2 sejteket transzfektáltuk az FH2 és az FH1-FH2 fluoreszcensen jelölt (YFP::FH2, YFP::FH1-FH2) változataival (20. ábra) [142]. A Drf DID:DAD szabályozó modul hiányában ezek a DAAM konstitutívan aktív fragmentumai [132, 133]. Az izolált FH2 domén látszólag semmilyen változást nem okozott az aktin sejtvázsban. Ugyanakkor az FH1-FH2-t kifejező sejtek morfológiai változást és megnövekedett F-aktin szintet mutattak. A kvantitatív elemzés szerint többlet FH1-FH2 jelenlétében a filopodiális sejtnyúlványok száma szignifikánsan (~ 25%) megnövekedett, míg az FH2 nem befolyásolta jelentősen ezt a paramétert. *In vivo* (*Drosophila* központi idegrendszer) és *in vitro* (ko-IP, *Drosophila* S2 sejt) vizsgálatok is arra utalnak, hogy a DAAM FH1 doménje kölcsönhat a profilinnal [133]. Az FH1-FH2 hatását profilin csendesített sejtekben megvizsgálva azt tapasztaltuk, hogy az kevésbé hatékonyan volt képes sejthalak változásokat előidézni. Összegezve, a DAAM elősegíti a filopodiális sejtnyúlványok képződését és ebben az aktivitásában meghatározó az FH1 domén és a profilin.



20. ábra: A DAAM FH2 és FH1-FH2 túlermelésének fenotípusai *Drosophila* S2 sejtekben.⁵

A DAAM FH2 és FH1-FH2 transzfektált *Drosophila* S2 sejtek reprezentatív konfokális mikroszkópiai felvételei és a filopodiális nyúlványok előfordulásának kvantitatív analízise. Az ábra forrása: [142].

Az *in vivo* [133] és az *in vitro* [142] vizsgálatok is alátámasztják a DAAM filopodiumok képződésében betöltött szerepét. A sejt fenotípus háttérben álló molekuláris mechanizmusok feltárása érdekében a DAAM FH2 és FH1-FH2 fragmentumait rekombináns úton állítottuk elő és aktivitásaikat sejtmentes környezetben írtuk le. A DAAM filamentum-összeszerelődésre

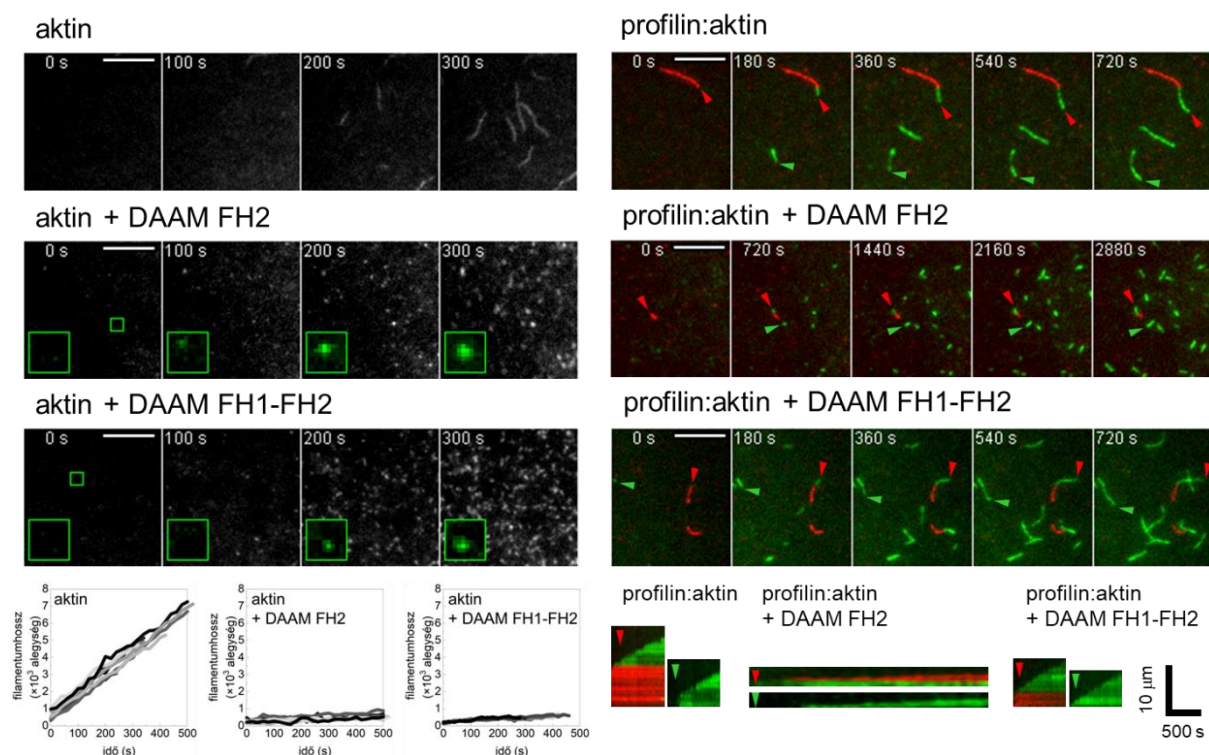
⁵ A vizsgálatokat együttműködő partnerünk Dr. Mihály József (HUN-REN SZBK, Szeged) és kutatócsoportja végezte el.

kifejtett hatását egyedi polimereken, TIRFM kísérletekben vizsgáltam (21. ábra, 9. táblázat). A DAAM FH2 jelenlétében a filamentumszám szignifikáns növekedése, ugyanakkor az elongáció sebességének jelentős csökkenése volt megfigyelhető a kontroll mintához képest (spontán filamentum-összeszerelődés). Ez arra enged következtetni, hogy a DAAM izolált FH2 doménje kettős aktivitással bír az aktin dinamika szabályozásában:

1. katalizálja a nukleációt a monomerekkel való kölcsönhatása révén,
2. gátolja az elongációt a filamentumvégekkel kialakított kölcsönhatásán keresztül.

Az FH1-FH2 hatása profilin hiányában kvalitatív és kvantitatív szempontból is azonosnak mutatkozott az FH2 doménével. Profilin jelenlétében azonban lényegi aktivitásbeli különbségek voltak kimutathatók, ugyanis az FH1-FH2 támogatta a profilin:aktin filamentumvégekhez való asszociációját.

Eredményeink arra utalnak, hogy a profilin molekuláris kapcsolóként működik a DAAM aktin aktivitásaiban: a profilin:FH1 modul az FH2 domént az elongációt gátló sapkafehérjéből összeszerelő faktorrá alakítja.



21. ábra: A DAAM FH2 és FH1-FH2 hatása a filamentum-összeszerelődésre: egyedi polimereken alapuló TIRFM vizsgálatok.

Profilin hiányában (aktin). [aktin] = 1.2 μM (10% Alexa488NHS jelölt), [DAAM FH2] = [DAAM FH1-FH2] = 2.4 μM . Lépték = 10 μm . A filamentumnövekedés sebessége (átlag $\pm$ SD): $v_{\text{aktin}} = 12.68 \pm 0.96$ alegység $\times$ s $^{-1}$ (n = 10), $v_{\text{DAAM FH2}} = 0.59 \pm 0.22$ alegység $\times$ s $^{-1}$ (n = 10), $v_{\text{DAAM FH1-FH2}} = 0.99 \pm 0.32$ alegység $\times$ s $^{-1}$ (n = 10).

Profilin jelenlétében (profilin:aktin). [aktin] = 0.3 μM (10% Alexa488NHS jelölt), [DAAM FH2] = [DAAM FH1-FH2] = 2.4 μM , [profilin] = 0.72 μM . Lépték = 10 μm . A filamentumnövekedés sebessége (átlag $\pm$ SD): $v_{\text{aktin}} = 3.98 \pm 0.61$ alegység $\times$ s $^{-1}$ (n = 32), $v_{\text{profilin:aktin}} = 2.91 \pm 0.50$ alegység $\times$ s $^{-1}$ (n = 69), $v_{\text{DAAM FH2}} = 0.20 \pm 0.05$ alegység $\times$ s $^{-1}$ (n = 31), $v_{\text{DAAM FH1-FH2}} = 2.35 \pm 0.28$ alegység $\times$ s $^{-1}$ (n = 62).

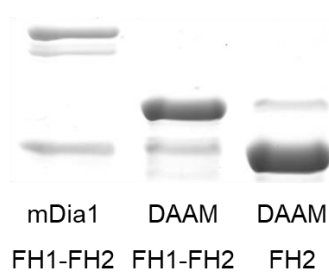
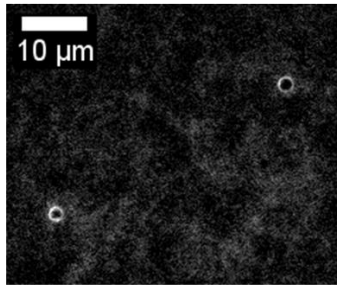
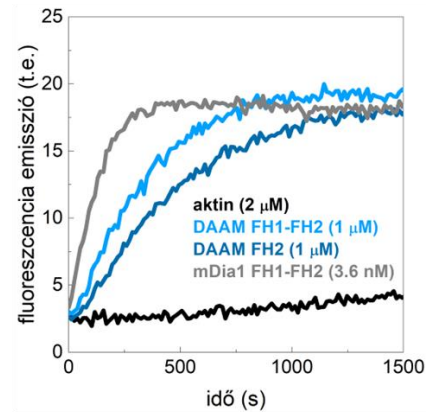
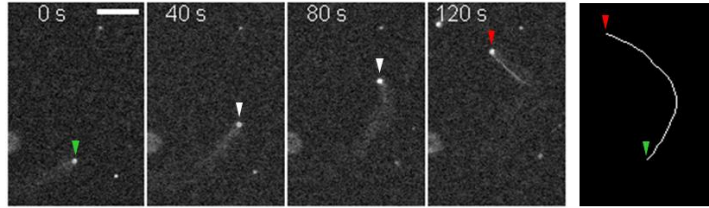
aktin forma	asszociációs sebességi állandó k_+ ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)		
	szabad filamentumvég	FH2 kötött filamentumvég	FH1-FH2 kötött filamentumvég
aktin	* 11.52 ± 0.87 # 10.88 ± 0.67	* 0.59 ± 0.22	* 1.05 ± 0.33
profilin:aktin	# 7.28 ± 0.58	# 0.09 ± 0.06	# 9.54 ± 0.14

9. táblázat: A DAAM FH2 és FH1-FH2 által katalizált filamentum-összeszerelődés kinetikai paramétere.

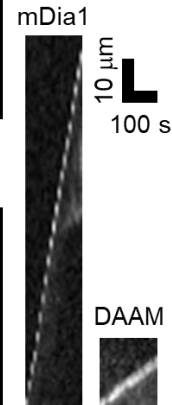
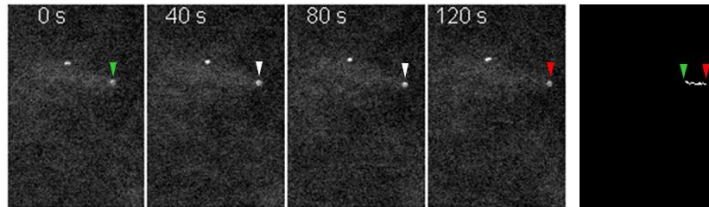
A monomer:szöges vég kölcsönhatást jellemző asszociációs sebességi állandók a fentiekben bemutatott TIRFM kísérletek (*) [142], illetve a dolgozatban nem bemutatott fluoreszcencia spektroszkópiai kísérletek (#) (Figure 4D [142]) alapján kerültek meghatározásra.

A forminok sajátja, hogy processzív összeszerelő faktorként működnek: a polimerizáció során a filamentumok szöges végéhez kötődnek és ezzel egyidőben lehetővé teszik az alegységek asszociációját és disszociációját több cikluson keresztül [10, 12, 59, 130]. A DAAM processzív sajátját, illetve az FH1, az FH2 és a profilin együttműködését komplex fehérjerendszerben, biomimetikus módszertan alkalmazásával vizsgáltam (22. ábra). A DAAM FH2, vagy FH1-FH2 fragmentumaival funkcionalizált mikrogöngyök aktivitását figyeltem meg aktint tartalmazó környezetben epifluoreszcens mikroszkópiával. Kontrollként az mDia1 formin szolgált [143, 144]. A profilin és/vagy az FH1 domén hiányában a DAAM funkcionizált göngyök inaktívok voltak, aktin hálózat összeszerelődése és a göngyök mozgása nem volt megfigyelhető (22. ábra, A1). A kontroll kísérletek szerint ennek nem az az oka, hogy a göngyfelszín nem kötött fehérjét vagy a fehérje a funkcionizációt követően inaktívvá vált (22. ábra, A2, A3). Profilin:aktin jelenlétében az FH1-FH2 funkcionizált göngyök aktin hálózatot hoztak létre és tartottak fent, a göngyfelszínhez kapcsolt polimerizációt kísérő erőhatások pedig a göngyök irányított mozgását eredményezték (22. ábra, B). Ezek az eredmények alátámasztják a DAAM processzív sajátját, továbbá összhangban vannak az *in vivo* és *in vitro* megfigyelésekkel, mi szerint a profilin:FH1 modul nélkülözhetetlen ahhoz, hogy az FH2 hatékony aktin összeszerelő faktorként működjön (20., 21. ábra) [133, 142].

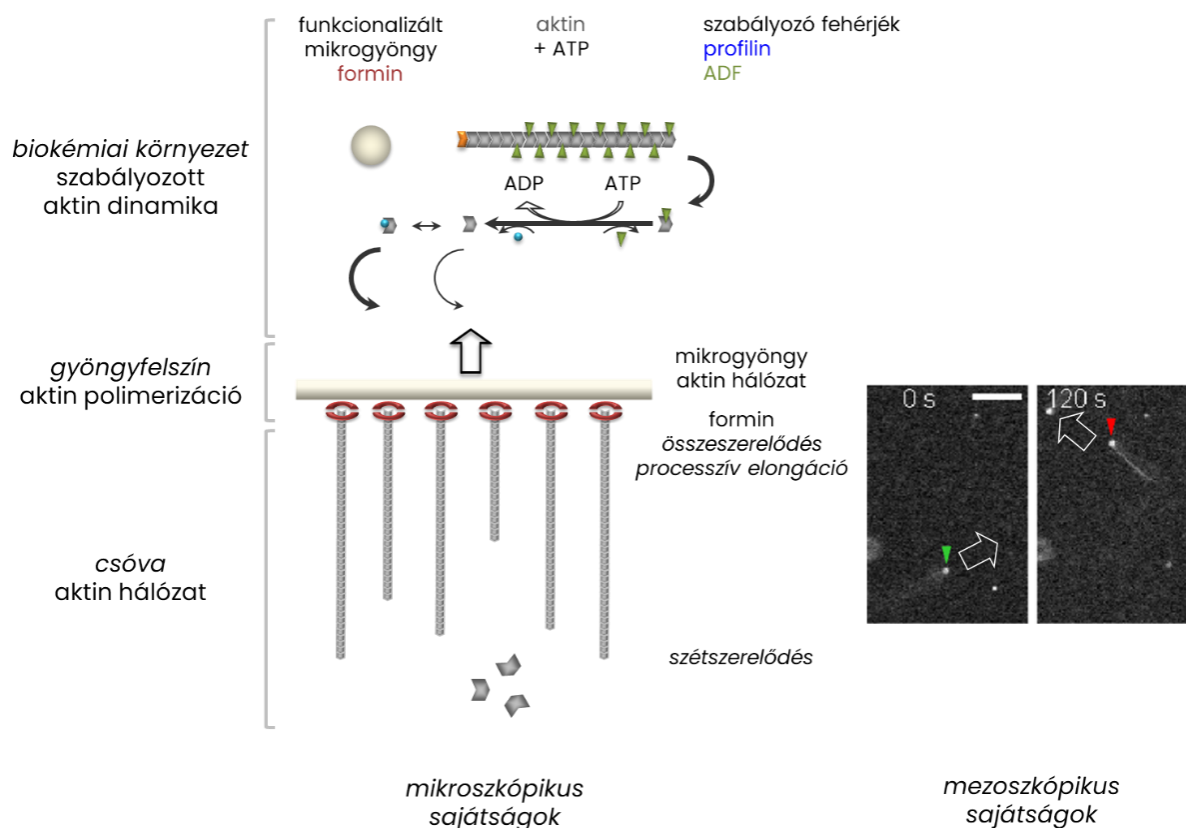
A DAAM funkcionizált göngyök alkalmazásán alapuló biomimetikus modell segítségével definiáltam azt a minimális fehérjerendszert (formin FH1-FH2, profilin), ami egy filopodiumszerű aktin hálózat létrehozásához szükséges (23. ábra). A biomimetikus rendszer rekonstruálja a DAAM FH1-FH2 aktivitását a filopodiális nyúlványok kialakulásában.

A1 FH2/FH1-FH2 - profilin **A2****A3****B** mDia1 FH1-FH2 + profilin

DAAM FH1-FH2 + profilin

**22. ábra: A DAAM FH2 és FH1-FH2 hatása a filamentum-összeszerelődésre: biomimetikus tanulmányok.**

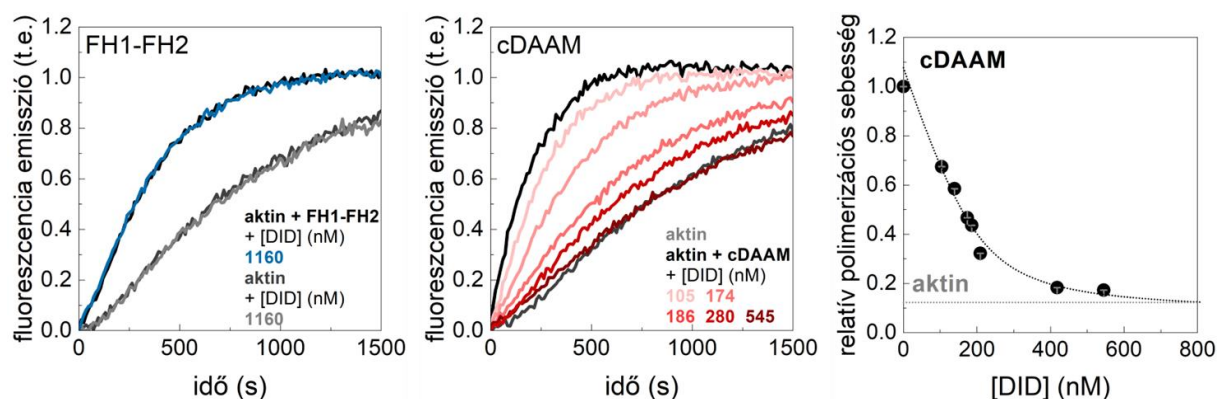
(A1) DAAM FH2/FH1-FH2 funkcionális gyöngyök profilin hiányában. **(A2)** A formin funkcionális gyöngyök fehérjetartalmának SDS-PAGE analízise. **(A3)** A formin funkcionális gyöngyök aktivitása pirén jelölt aktin alkalmazásán alapuló polimerizációs kísérletekben. t.e.: tetszőleges egység. **(B)** mDia1/DAAM FH1-FH2 funkcionális gyöngyök aktivitása profilin jelenlétében. A gyöngyök trajektóriája és annak kimográf elemzése. A gyöngyök kezdeti pozíciója: zöld háromszög, végpozíciója: piros háromszög. A gyöngyök sebessége (átlag $\pm$ SD): $v_{\text{mDia1 FH1-FH2}} = 24.1 \pm 6 \mu\text{m} \times \text{s}^{-1}$ ($n = 26$), $v_{\text{DAAM FH1-FH2}} = 5.54 \pm 0.97 \mu\text{m} \times \text{s}^{-1}$ ($n = 23$). Lépték = 20 μm . [F-aktin] = 7 μM (5% TAMRA jelölt), [profilin] = 16 μM , [ADF] = 15 μM .



23. ábra: A filopodium szerkezeti, dinamikai és molekuláris sajátságait rekonstruáló biomimetikus modell. Az ábra az alábbi publikációkban bemutatott ábrák nyomán készült [10, 90].

A DAAM FH2:aktin kölcsönhatást a DID:DAD modul szabályozza

Vizsgálataink szerint a DAAM FH2 és FH1-FH2 kölcsönhat az aktinnal, ezek tehát a DAAM konstitutívan aktív formái [133, 145]. A DID:DAD modulnak a DAAM FH domének aktin aktivitásában betöltött szerepének részletesebb vizsgálatára a fehérje izolált DID szakaszát, illetve egy olyan fragmentumát állítottuk elő, ami az FH domének mellett a C-terminális DAD domént és a CT régiót is tartalmazza (cDAAM) (19. ábra). Pirén aktin alapú *bulk* fluoreszcencia spektroszkópiai vizsgálatokban a DID nem befolyásolta a spontán vagy az FH1-FH2 katalizált aktin polimerizációt, ugyanakkor koncentrációfüggő módon gátolta a cDAAM katalizált filamentum-összeszerelődést (24. ábra). Magas DID koncentrációkon a spontán polimerizációra jellemző kinetikát detektáltuk. A relatív polimerizációs sebesség([DID]) adatsor illesztése a bimolekuláris kötési egyenlet alapján nem volt megfelelő jóságú (Módszerek, 9., 10. egyenlet). Az adatsor inkább lineáris, töréspont felé hajló jellege arra utal, hogy a mérésekben alkalmazott [cDAAM] jóval meghaladja a K_D értékét ([cDAAM] = 510 nM $\gg K_D$, 'titrálási tartomány'). Így a titrálási görbe a komplex sztöchiometriájának becslését teszi lehetővé a disszociációs egyensúlyi állandó meghatározása helyett ([cDAAM] $\ll K_D$, 'kötési tartomány') [146]. Ugyanakkor eredményeink egyértelműen alátámasztják, hogy a DAAM DID és DAD-CT régiói egy viszonylag nagy affinitású ($K_D \sim 1$ nM-10 nM) kölcsönhatást alakítanak ki, ami az FH2 domén aktin aktivitásának negatív szabályozója, azaz igazolják a DAAM Drf természetét.



24. ábra: A DAAM FH2:aktin kölcsönhatást a DID:DAD modul szabályozza.

A filamentumok spontán, az FH1-FH2 és a cDAAM által katalizált összeszerelődésének kinetikája DID hiányában és jelenlétében. A pirén tranziensek kezdeti, lineáris szakaszához illesztett egyenes meredekségéből származtatott relatív polimerizációs sebesség a [DID] függvényében. [aktin] = 2 μ M (5% pirén jelölt), [FH1-FH2] = 5 μ M, [cDAAM] = 0.51 μ M. Átlag $\pm$ SD, n = 1-4.

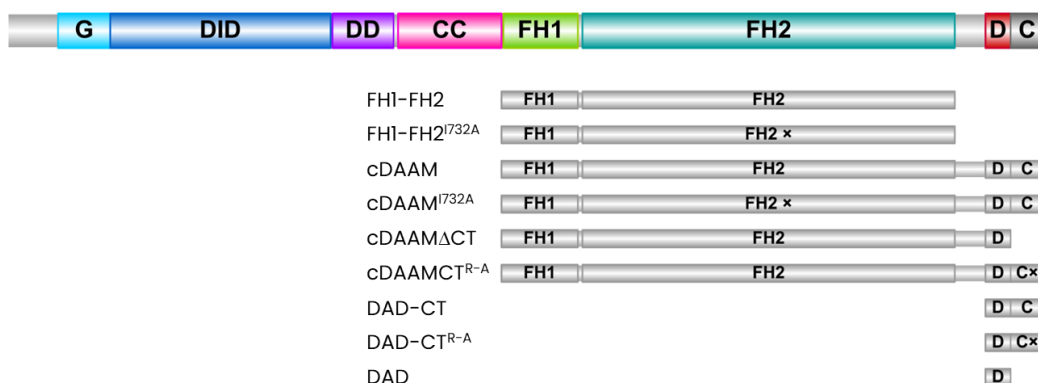
A DAAM C-terminális DAD-CT régiója az aktív FH2 domén aktin aktivitásainak finomhangolója

A DAAM Drf formin, a C-terminálisa a DID:DAD modul elemeként részt vesz az FH domének aktivitásának Rho GTPáz-függő szabályozásában. A fentiekben bemutatott vizsgálatainkban a DAD-CT jelenlétében (cDAAM) a DAAM hatékonyabban volt képes elősegíteni az aktin filamentumok összeszerelődését, mint annak hiányában (FH1-FH2) (24. ábra). Hasonló működést írtak le az élesztő Bni1 és Bnr1, az egér Dial1 [147], az egér FMNL3 [148], az egér INF2 [149], a *Drosophila* Cappuccino [150], valamint a humán Daam1 esetén [147]. A funkció tehát konzerváltnak tűnik az evolúció során, azonban a C-terminális szakasz aktin kölcsönhatása és aktivitása forminonként változó lehet (10. táblázat). Felmerül továbbá az is, hogy az izolált C-terminális aktivitásai miként nyilvánulnak meg az FH1-FH2 funkcionalitásában.

formin (hivatkozás)	aktinkötő modul	K_D (G-aktin)	nukleációs aktivitás	további hatások
<i>Mm</i> INF2 [149]	WH2-szerű DAD	$K_D \sim 0.06 \mu\text{M}$ 50 mM KCl	-	szekvesztráció, fragmentáció
<i>Mm</i> FMNL3 [148]	WH2-DAD-CT	$K_D \sim 2-3 \mu\text{M}$ 50 mM KCl	+	elongáció gátlása
<i>Mm</i> Dia1 [147]	DAD-CT	$K_D \sim 100 \mu\text{M}$ 200 mM NaCl	+	elongáció fokozása
<i>Dm</i> Cappuccino [150]	tail	$K_D \sim 20 \mu\text{M}$ 50 mM NaCl	-	elongáció gátlása
<i>Dm</i> DAAM [99]	DAD-CT	$K_D = 44.4 \pm 2.85 \mu\text{M}$ 50 mM NaCl	-	elongáció gátlása

10. táblázat: A forminok izolált C-terminálisának sajátosságai az aktin dinamika szabályozásában.

Mm: *Mus musculus*, *Dm*: *Drosophila melanogaster*



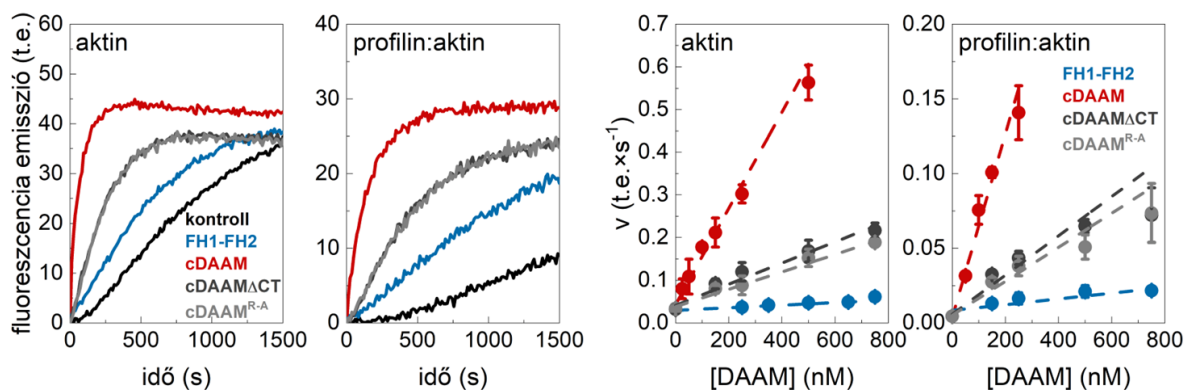
25. ábra: A vizsgált DAAM konstruktok doménszerkezete.

x: mutáció, FH2 domén: I732A mutáció, CT szakasz: R-A mutáció

A cDAAM hatékonyabb összeszerelő faktor, mint az FH1-FH2

Hipotézisünk szerint a DAAM DAD-CT az autoregulációs kölcsönhatás mellett az aktív FH2 domén aktin aktivitásának szabályozásában is meghatározó.

A kérdés vizsgálatára különböző DAAM fragmentumok aktivitásainak átfogóbb vizsgálatát végeztük el (25. ábra). Megerősítve korábbi eredményeinket koncentrációfüggő pirén aktin alapú fluoreszcencia spektroszkópai vizsgálataink szerint a cDAAM mintegy 36× hatékonyabban segíti elő a filamentum-összeszerelődést, mint az FH1-FH2 (26. ábra).

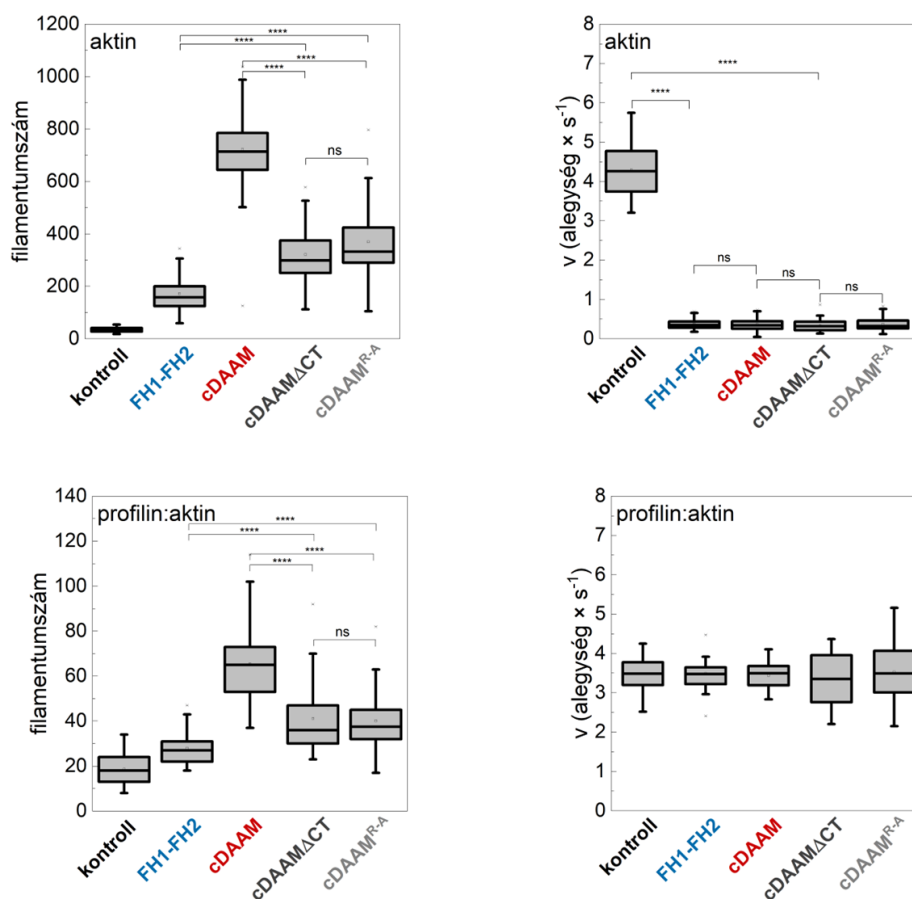


26. ábra: A DAAM konstruktok aktin aktivitásainak összehasonlító vizsgálata: *bulk* fluoreszcencia spektroszkópai tanulmányok.

A filamentum-összeszerelődés kinetikája DAAM hiányában és jelenlétében. [aktin] = 2 μM (5% pirén jelölt), [profilin] = 6 μM, [DAAM] = 200 nM. A pirén tranziensek kezdeti, lineáris szakaszához illesztett egyenes meredekségéből származtatott polimerizációs sebesség (v) a [DAAM] függvényében. A szaggatott vonalak az adatokra illesztett lineáris függvényt jelzik. Átlag ± SD, $n = 3-5$.

Az eltérő polimerizációs hatások származhat a nukleációra és/vagy az elongációra kifejtett hatás különbözőségéből. A mechanizmus részletesebb tanulmányozására a filamentumok

összeszerelődését egyedi polimereken, TIRFM kísérletekben vizsgáltuk (27. ábra). A cDAAM jelenlétében a filamentumok száma szignifikánsan nagyobb volt, mint az FH1-FH2 esetén. Ez arra utal, hogy a cDAAM hatékonyabb nukleációs faktor, azaz a DAD-CT az FH2:aktin monomer kölcsönhatás pozitív szabályozója. Ugyanakkor az elongáció sebességében szignifikáns eltérést nem találtunk.



27. ábra: A DAAM konstruktok aktin aktivitásainak összehasonlító vizsgálata: egyedi polimeren végzett TIRFM tanulmányok.

A filamentumszám ($n = 20-62$) és az elongáció sebessége (v) ($n = 30-89$) DAAM hiányában és jelenlétében. [aktin] = $0.5 \mu\text{M}$ (10% Alexa488NHS jelölt), [profilin] = $2 \mu\text{M}$, [DAAM] = 100 nM . A reprezentatív TIRFM felvételeket és a képelemzés részleteit a *Módszerek* fejezet mutatja be.

A DAAM a filamentumvég kölcsönhatás tekintetében nem szokványos formán. Ugyanis bár az FH1-FH2 kötődik a filamentumvégekhez, ott a profilin:aktin asszociációs sebességi állandóját nem befolyásolja (9. táblázat [142]). A DAD-CT szerepét a DAAM:filamentumvég kölcsönhatásban így alternatív módon, a sapkafehérjével való kompetíciós kísérletekben vizsgáltuk (28. ábra). Az α/β heterodimer sapkafehérje (*capping protein*, CP) nagy affinitással ($K_D \sim 0.1-1 \text{ nM}$) kötődik a filamentumvégekhez és gátolja az alegységek asszociációját és disszociációját [151]. Pirén aktin alapú fluoreszcencia spektroszkópai kísérleteinkben a polimerizációt különböző DAAM fragmentumok jelenlétében indítottuk el, majd adott idő elteltével ($\sim 120 \text{ s}$) a mintához sapkafehérjét adtunk. A sapkafehérje koncentrációfüggő módon gátolta a DAAM katalizált polimerizációt, azonban a hatékonysága eltérő volt az egyes DAAM

fragmentumok esetén. A relatív polimerizációs sebesség([CP]) adatsor illesztéséből az 50%-os gátláshoz tartozó [CP]-t határoztuk meg (IC₅₀, 28. ábra, 11. táblázat, 6. egyenlet) [152].

$$\frac{v_0 - v}{v_0 - v_{min}} = \frac{[I]}{[I] + IC_{50}} \quad (6)$$

6. egyenlet

v: a polimerizáció sebessége

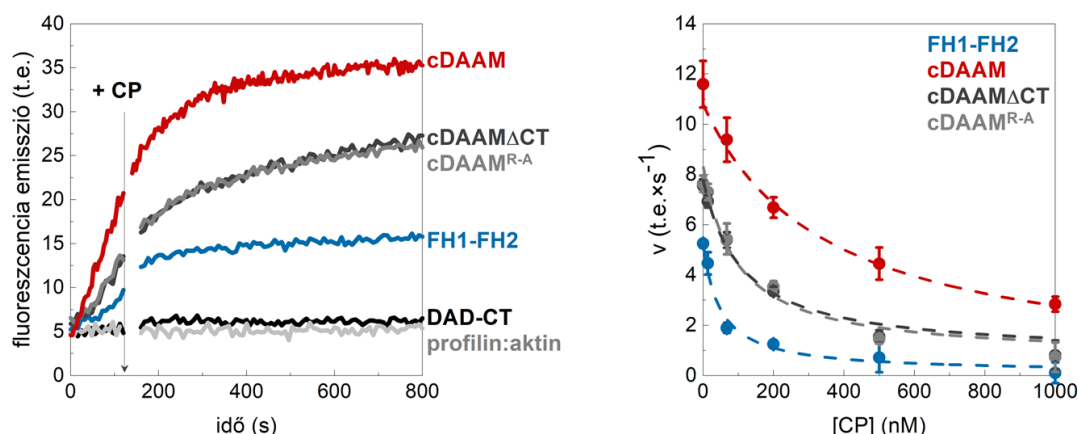
v₀: a polimerizáció sebessége az inhibitor hiányában

v_{min}: a polimerizáció sebessége az inhibitor telítési koncentrációjában

IC₅₀: az 50%-os gátláshoz tartozó inhibitor koncentráció, félmaximális gátló koncentráció

[I]: az inhibitor fehérje koncentrációja

Megjegyzendő, hogy a DAAM és a CP filamentumvég kötése nem írható le egyszerű kompetitív modellel, amit a 6. egyenlet nem vesz figyelembe [152, 153]. A származtatott IC₅₀ értékek így közelítésnek tekinthetők, ha abszolút értékük nem feltétlenül, de relatív értékük alkalmazható a DAAM konstruktok hatásainak összevetésére. Az IC₅₀ értékek alapján a cDAAM hatékonyabban képes fenntartani a filamentumok elongációját a sapkafehérje jelenlétében, mint az FH1-FH2. Ez arra utal, hogy a monomer kölcsönhatás mellett a DAD-CT a DAAM FH2 filamentumvéggel kialakított kölcsönhatásának is pozitív szabályozója.



28. ábra: A sapkafehérje hatása a DAAM katalizált profilin:aktin polimerizációra.

A DAAM katalizált profilin:aktin polimerizáció kinetikája sapkafehérje (CP) hiányában és jelenlétében. [aktin] = 2 μM (5% pirén jelölt), [profilin] = 6 μM, [DAAM] = 200 nM, [CP] = 68 nM. A pirén tranziensek kezdeti, lineáris szakaszához illesztett egyenes meredekségéből származtatott polimerizációs sebesség (v) [CP] függése. A szaggatott vonalak az adatok illesztését mutatják (6. egyenlet). Átlag ± SD, n = 2-4, t.e.: tetszőleges egység.

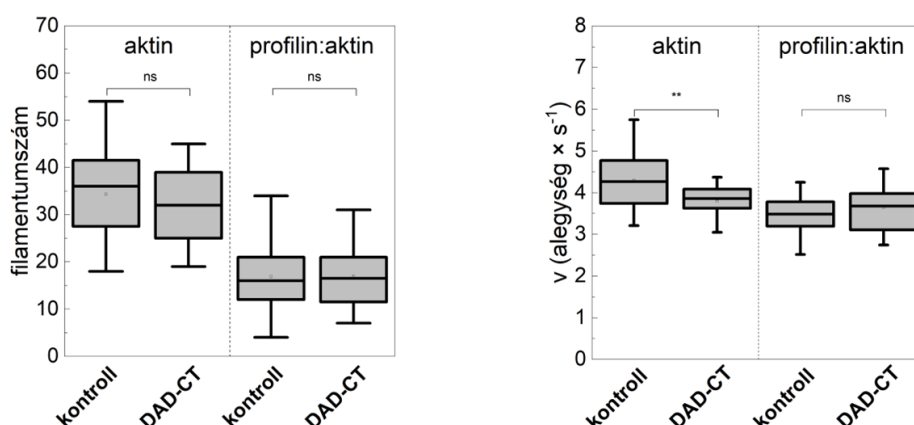
DAAM (natív)	IC ₅₀ ± SD (nM)	DAAM (trunkált/mutáció)	IC ₅₀ ± SD (nM)
FH1-FH2	345.9 ± 27.60	cDAAMΔCT	108.6 ± 19.35
cDAAM	47.7 ± 16.97	cDAAMCT ^{R-A}	93.7 ± 19.06

11. táblázat: A DAAM katalizált profilin:aktin polimerizáció sapkafehérje általi gátlását jellemző IC₅₀ értékek.

A DAAM DAD-CT FH2-függő módon járul hozzá az aktin dinamika szabályozásához

A cDAAM és az FH1-FH2 közötti különbség a C-terminális DAD-CT régió. Eredményeink arra engednek következtetni, hogy a DAD-CT befolyásolja az aktív FH2 domén:aktin kölcsönhatást, mind a monomerek (nukleációs aktivitás (27. ábra)), mind pedig a filamentumok (elongációs aktivitás (28. ábra)) vonatkozásában. Ugyanakkor az izolált DAD-CT, az FH2 hiányában nem befolyásolja szignifikánsan a filamentum-összeszerelődést pirén aktin alapú fluoreszcencia spektroszkópiai vizsgálatainkban (nem bemutatott adatok, Figure 3D [99]). Ezzel összhangban a DAD-CT sem a filamentumok számára, sem pedig azok elongációjára nem volt hatással a TIRFM kísérleteinkben (29. ábra) és a sapkafehérje gátló hatását sem volt képes ellensúlyozni (28. ábra).

Kísérleteinket elvégeztük két olyan DAAM fragmentummal is, amelyek az FH2 domén funkcióvesztéses mutációját hordozzák: a konzervált Ile⁷³² aminosavat cseréltük alaninra (cDAAM^{I732A}, FH1-FH2^{I732A}) (25. ábra) [131, 147, 148, 154, 155]. Az aktivitások összehasonlító elemzése alapján a DAD-CT nem volt képes kompenzálni a funkcióvesztéses mutáció által okozott defektusokat az FH2 aktin aktivitásaiban (nem bemutatott adatok, Figure 5, 6 [99]). Ez arra utal, hogy az izolált DAD-CT nem képes befolyásolni a filamentum-összeszerelődést funkcionális FH2 domén hiányában. A DAAM DAD-CT tehát FH2-függő módon járul hozzá az aktin dinamika szabályozásához.



29. ábra: A DAAM izolált DAD-CT régiójának aktin aktivitásainak vizsgálata: egyedi polimeren végzett TIRFM vizsgálatok.

A filamentumszám ($n = 16-20$) és az elongáció sebessége (v) ($n = 24-79$) DAAM hiányában és jelenlétében. $[\text{aktin}] = 0.5 \mu\text{M}$ (10% Alexa488NHS jelölt), $[\text{profilin}] = 2 \mu\text{M}$, $[\text{DAAM}] = 42 \mu\text{M}$. A reprezentatív TIRFM felvételeket és a képelemzés részleteit a *Módszerek* fejezet mutatja be.

A DAAM DAD és CT régiója additív módon járul hozzá a DAAM aktin kölcsönhatásaihoz és aktivitásaihoz

A DAD és CT szakaszok szerepének további vizsgálatára a cDAAM natív FH2 domént tartalmazó, de a C-terminálison módosított változatait állítottunk elő (CT trunkált változat: cDAAM Δ CT, CT régióban mutációt hordozó változat: cDAAMCT^{R-A}) (25. ábra). A cDAAMCT^{R-A} esetén a CT régió töltéseloszlását módosítottuk a pozitívan töltött arginin

aminosavak alaninre való cseréjével. A két C-terminálison módosított fehérje ekvivalensnek mutatkozott mind a pirén aktin alapú fluoreszcencia spektroszkópiái (26. *ábra*, 28. *ábra*), mind pedig a TIRFM kísérleteinkben (27. *ábra*). A cDAAM Δ CT és cDAAMCT^{R-A} hatékonyabban ($\sim 6\times$) segítette elő az aktin filamentumok összeszerelődését, mint az FH1-FH2, de hatásuk elmaradt ($\sim :6$) a natív C-terminálissal rendelkező cDAAM-étól. A sapkafehérjével való kompetíciós kísérletekben is hasonló trend mutatkozott.

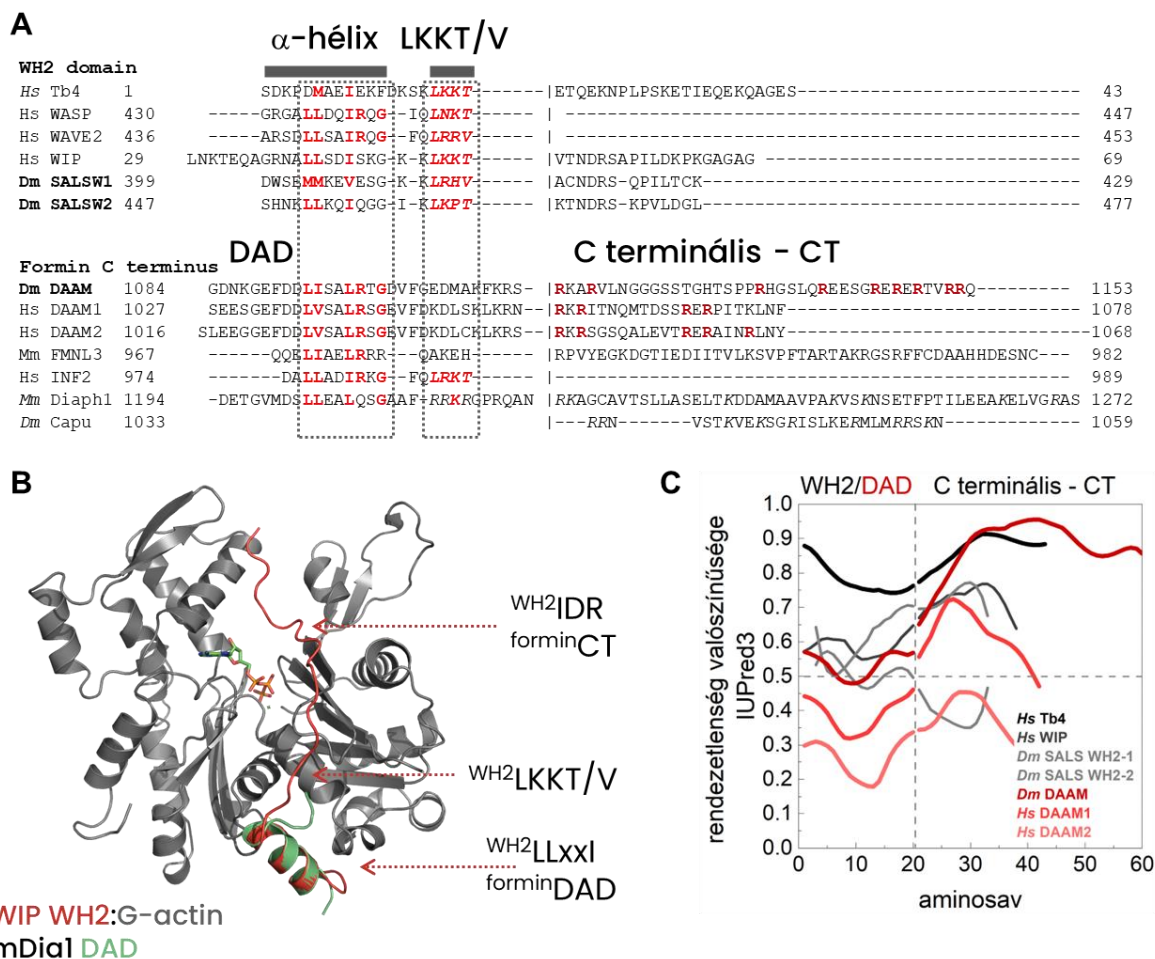
Megfigyeléseink arra utalnak, hogy a DAD és a CT régió is szerepet játszik a DAAM FH1-FH2 aktin monomerekkel (nukleációs aktivitás) és filamentumokkal (elongációs aktivitás) kialakított kölcsönhatásában. Adataink azt is jelzik, hogy a DAD és a CT régiók hozzájárulása a DAAM aktin aktivitásaihoz additív és nem-kooperatív.

A DAAM C-terminális DAD-CT régiója WH2-szerű kötési módot alakít ki az aktinnal

Az mDia1 DID:DAD autoregulációs komplexének röntgenkristallográfiával meghatározott szerkezete ismert (PDB 2BAP [156]). Ugyanakkor a forminok C-terminálisának aktin aktivitásaihoz kapcsolódó szerkezeti vizsgálatok nem állnak rendelkezésre. A DAAM DAD-CT:aktin kölcsönhatás szerkezeti aspektusainak leírására bioinformatikai analízist végeztünk (30. *ábra*). Az összehasonlító szekvenciaelemzés szerint a DAAM DAD-CT régiója az aktinkötő WH2 doménekkel mutat hasonlóságot. A WH2 egy ~ 20 -50 aminosavból álló aktin monomerkötő domén [79, 157-160]. A WH2:aktin komplex szerkezete jól ismert (30., 50. *ábra*). A WH2 N-terminálisán található rövid, amfipatikus α -hélix az aktin molekula szöges végének hidrofób barázdájával alakít ki kölcsönhatást, amelyben meghatározó a domén konzervált izoleucin, leucin és/vagy metionin, valin alkotta hidrofób aminosav dublettje/triplettje (LLxxI/L). A másik fontos eleme a kölcsönhatásnak az LKKT/V konszenzus szakasz, amely az aktin monomer nukleotidkötő zsebének irányába nyúlik. A WH2 domének C-terminálisa változatos hosszúságú és összetételű, valamint jellemzően rendezetlen szerkezetű, az aktinnal való kölcsönhatása elsősorban elektrosztatikus jellegű. A DAAM DAD-CT a fenti három elemből kettővel rendelkezik (30. *ábra*):

1. a DAD régióban található egy hidrofób aminosav tripllett,
2. a C-terminális viszonylag hosszú, töltött aminosavakban gazdag és rendezetlen szerkezetű,
3. azonban az LKKT/V szakasz nem konzervált.

A DAAM-hoz hasonló sajátságokat mutat az mDia1 [147] és az FMNL3 [148] DAD doménje, amelyek viszonylag gyengén hatnak kölcsön az aktinnal ($K_D > \mu\text{M}$) (10. táblázat). Az INF2 ugyanakkor rendelkezik az LKKT/V szakasszal és aktin affinitása is lényegesen nagyobb ($K_D \sim \text{nM}$) (10. táblázat) [149]. Érdeemes megjegyezni, hogy az mDia1 DAD peptidje α -helikális szerkezetű, hasonlóan a WH2 domének N-terminálisához (30. B *ábra*) [156].

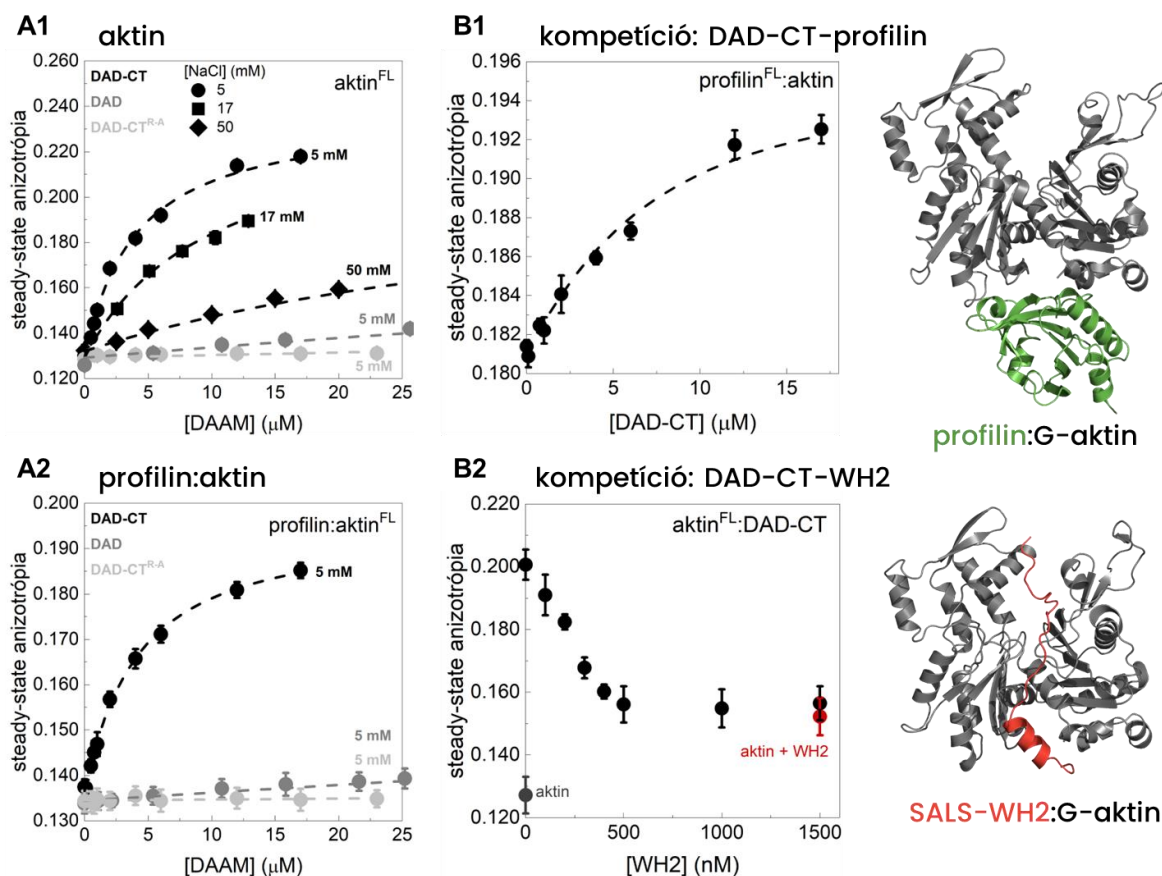


30. ábra: A DAAM C-terminálisának *in silico* elemzése.

(A) Aktinkötő fehérjék WH2 doménjeinek és forminok C-terminálisainak összehasonlító szekvenciaelemzése. (B) A DAAM DAD-CT:G-aktin kölcsönhatás szerkezeti modellje. (WIP WH2:G-aktin PDB 2A41 [161], mDia1 DAD PDB 2BAP [156]). (C) WH2 domének és forminok C-terminálisának rendezetlenségi becslése. Uniprot azonosítók: Hs Tb4, P62328; Hs WASP, P42768; Hs WAVE2, Q9Y6W5; Hs WIP, O43516; Dm SALS, Q9VGN4; Dm DAAM, Q8IRY0; Hs DAAM1, Q9Y4D1; Hs DAAM2, Q86T65; Mm FMNL3, Q6ZPF4; Hs INF2, Q27J81; Mm Diaph1, Dm Capu, Q24120. Dm: *Drosophila melanogaster*, Hs: *Homo sapiens*, Sc: *Saccharomyces cerevisiae*, Mm: *Mus musculus*.

Hipotézisünk szerint a DAAM DAD-CT WH2-szerű kötési módot alakít ki az aktinnal.

Feltételezésünket *steady-state* fluoreszcencia anizotrópia kísérletekben vizsgáltuk (31. ábra). Ennek érdekében a WH2 domén:G-aktin kölcsönhatás vizsgálatára alkalmas fluoreszcencia spektroszkópai módszert validáltunk (Módszerek, Fluoreszcencia spektroszkópai módszer validálása a G-aktin kölcsönhatás vizsgálatára fejezet [162]). Elsőként igazoltuk, hogy az izolált DAD-CT képes mind a szabad aktin monomerekhez, mind pedig a profilin:aktinhoz kötödni az FH2 jelenlététől függetlenül (31. A1, A2 ábra). Az anizotrópia([DAD-CT]) adatsor illesztéséből a DAD-CT:G-aktin komplex disszociációs egyensúlyi állandója $K_D \sim 3\text{-}4 \mu\text{M}$ -nak adódott (Módszerek, 9., 10. egyenlet, 12. táblázat).



31. ábra: G-aktin és komplexeinek steady-state fluoreszcencia anizotrópiája.

(A1-2) Alexa488NHS-G-aktin és profilin:Alexa488NHS-G-aktin anizotrópiájának függése a natív (DAD-CT), trunkált (DAD) és mutációt hordozó (DAD-CT^{R-A}) DAD-CT koncentrációjától. A szaggatott vonalak az adatok illesztését jelzik a kvadratikus kötési egyenlet szerint (Módszerek, 9., 10. egyenlet). [Alexa488NHS-G-aktin] = 0.2 μ M, [profilin] = 0.8 μ M. (B1) bal panel Alexa568M-profilin:G-aktin anizotrópiájának [DAD-CT] függése. A szaggatott vonal az adatok illesztését jelzi a kvadratikus kötési egyenlet szerint (Módszerek, 9., 10. egyenlet). jobb panel A profilin:G-aktin komplex röntgenkristallográfiás szerkezete (PDB 1HLU [163]). (B2) bal panel Alexa488NHS-G-aktin:DAD-CT anizotrópiájának [SALS-WH2] függése. jobb panel A G-aktin:WH2 komplex röntgenkristallográfiás szerkezete (WIP WH2:G-aktin, PDB 2A41) [161]. Átlag $\pm$ SD, n = 2-4. FL: fluoreszcensen jelölt.

[NaCl] (mM)	$K_D \pm SD$ (μ M)		
	G-aktin ^{FL} (31. A1 ábra)	profilin:G-aktin ^{FL} (31. A2 ábra)	profilin ^{FL} :G-aktin (31. B1 ábra)
5	3.78 $\pm$ 0.19	3.54 $\pm$ 0.22	4.71 $\pm$ 0.53
17	9.71 $\pm$ 0.51	-	-
50	44.43 $\pm$ 2.85	-	-

12. táblázat: A DAAM DAD-CT:G-aktin komplex disszociációs egyensúlyi állandójának ionerősségfüggése. FL: fluoreszcensen jelölt

Az ionerősség növelése (növekvő [NaCl]) az affinitás graduális csökkenését eredményezte, ami a kölcsönhatás elektrosztatikus természetére enged következtetni (31. A1 ábra, 12. táblázat). A

CT trunkált (DAD), illetve a CT régióban arginin-alanin mutációt hordozó (DAD-CT^{R-A}) konstruktok már alacsony ionerősségen ([NaCl] = 5 mM) sem mutattak számottevő kötődést az aktinhoz (31. A1, A2 ábra). Ez arra utal, hogy az DAD-CT:G-aktin kölcsönhatásban meghatározó a CT régió és a bázikus arginin aminosavai.

Megjegyzendő, hogy a néhány aminosavban megváltoztatott CT szakasznak (DAD-CT^{R-A}) a komplex stabilitására kifejtett hatása számottevőbb, mint a teljes hiánya (DAD). A látszólagos ellentmondás feloldása a C-terminális töltéseloszlásában rejlik (13. táblázat). A natív CT szakasz izoelektromos pontja viszonylag magas (pI = 11.47), így a pH7.4 tartományban nettó töltése pozitív (+ 6). Az arginin-alanin mutáció révén a CT^{R-A} izoelektromos pontja jelentősen csökken (pI = 4.77), így nettó töltése negatív (- 3). A natív CT pozitív töltésű aminosavai és az aktin negatív felszíne között vonzó elektrosztatikus kölcsönhatások alakulhatnak ki, ami hozzájárul a DAD-CT:aktin komplex stabilitásához. A CT teljes hiányában a DAD viszonylag gyenge affinitása a meghatározó. A negatív töltésű CT^{R-A} és az aktin negatív felszíne között taszító erőhatások lépnek fel, ami a natív CT-vel ellentétben a viszonylag gyenge DAD:aktin kötést még inkább destabilizálhatja az affinitás csökkenését eredményezve. A CT teljes hiányához képest a CT^{R-A} tehát nem kevésbé pozitívan befolyásolja a DAD-CT:aktin komplex integritását, hanem éppen ellenkezőleg, negatív hatással bír. Ezek a megfontolások jól illeszkednek ahhoz a feltételezésünkhöz, mi szerint a DAD-CT:aktin komplexben a CT az aktin molekula hegyes vég felé nyúló negatív felszínével alakít ki elektrosztatikus kölcsönhatást.

konstrukt	aminosav-összetétel	pI	töltés (pH7.4)
DAD	GDNKGEFDDLISALRTGDVFGEDMAKFKRS	4.46	- 2.1
CT	R KARVLNNGGSSTGHTSPPRHGS LQ R EESG R ERERTV R R Q	11.74	+ 6
CT ^{R-A}	A KA A VLNNGGSSTGHTSPPAHGS LQ A EESG A E A EATV A A Q	4.77	- 3

13. táblázat: A DAAM DAD, CT és CT^{R-A} szakaszának izoelektromos pontja (pI) és töltése a kísérleteinkben alkalmazott pH értékhez (pH7.8) közeli tartományon (pH7.4).

A helyspecifikus mutagenézis során kicserélt aminosavakat piros szín jelöli. Az izoelektromos pont (pI) és a töltés becslését az IPC – Isolelectric Point Calculator segítségével számoltuk [164].

A DAD-CT:aktin kölcsönhatást megvizsgáltuk aktinkötő fehérjék jelenlétében is (31. B1, B2 ábra). Ismert, hogy a profilin az aktin monomer S1 és S3 szubdoménje közötti hidrofób zsebbe kötődik, ami átfed a WH2 domén LLxxI/L kötőhelyével [163]. Fluoreszcensen jelölt profilin:G-aktin komplexet titrálva a DAD-CT-vel az anizotrópia növekedését tapasztaltuk (31. B1 ábra). Kompetitív kötés esetén a fluoreszcensen jelölt profilin disszociációja annak anizotrópiájának csökkenését eredményezte volna. Az ellenkező tendencia a G-aktin, profilin és a DAD-CT közötti hármas komplex létrejöttére utal. Egy másik kísérletsorozatban fluoreszcensen jelölt G-aktin DAD-CT-vel alkotott komplexét titráltunk *bona fide* WH2 doménnel (31. B2 ábra). A *sarcomere lenght short* (SALS) fehérje viszonylag hosszú C-terminálissal rendelkező WH2 doménjeit tartalmazó szakaszát használtuk (SALS-WH2), amelynek G-aktin kölcsönhatását korábbi munkánk során leírtuk (Módszerek [162]). A G-aktin anizotrópiája [SALS-WH2]-függő módon csökkent, magasabb koncentrációkon az értéke azonos volt a SALS-WH2:G-aktin komplexre jellemző értékkel.

A profilin tehát nem befolyásolja a DAD-CT:G-aktin kölcsönhatást, míg a SALS-WH2 és a DAD-CT kompetitív módon kötődik az aktin monomerhez. Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy a DAAM DAD-CT

1. meghatározó aktinkötő szakasza a CT régió,
2. kötési módja hasonló a WH2 domének G-aktinnal kialakított kölcsönhatásához.

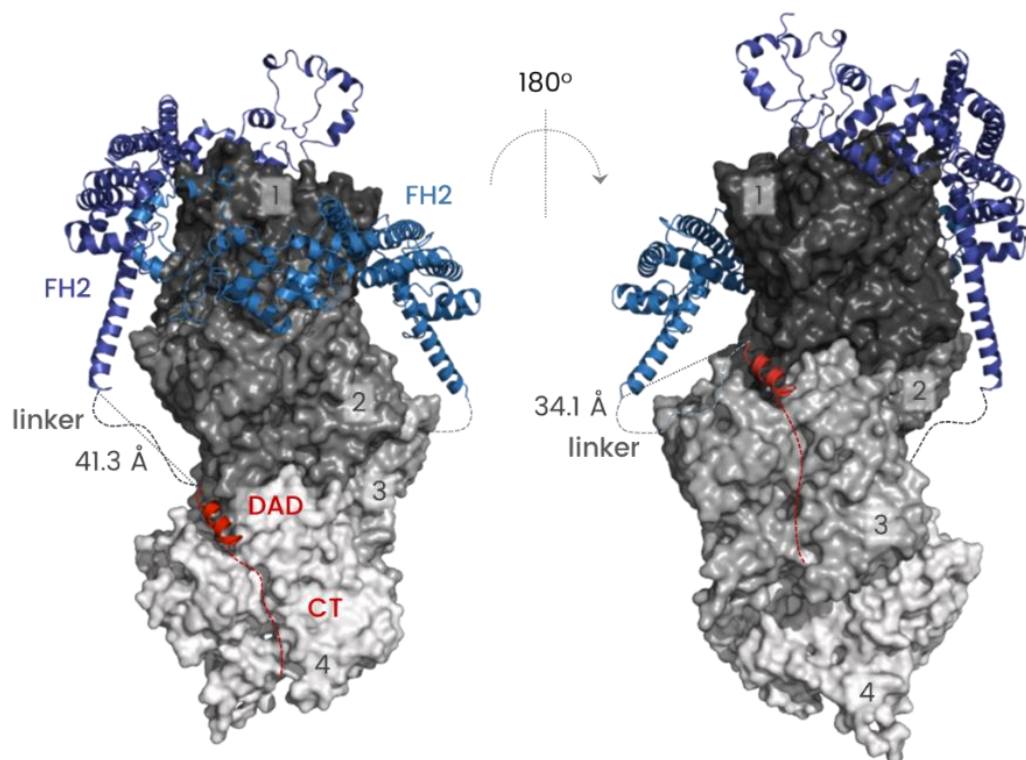
Összefoglalás

A DAAM:aktin kölcsönhatás szerkezeti modellje, a DAD-CT FH2 közvetített aktin összeszerelődésre kifejtett hatásának molekuláris alapjai

Mi a DAAM FH-DAD-CT aktin összeszerelődésre kifejtett hatásának molekuláris alapja?

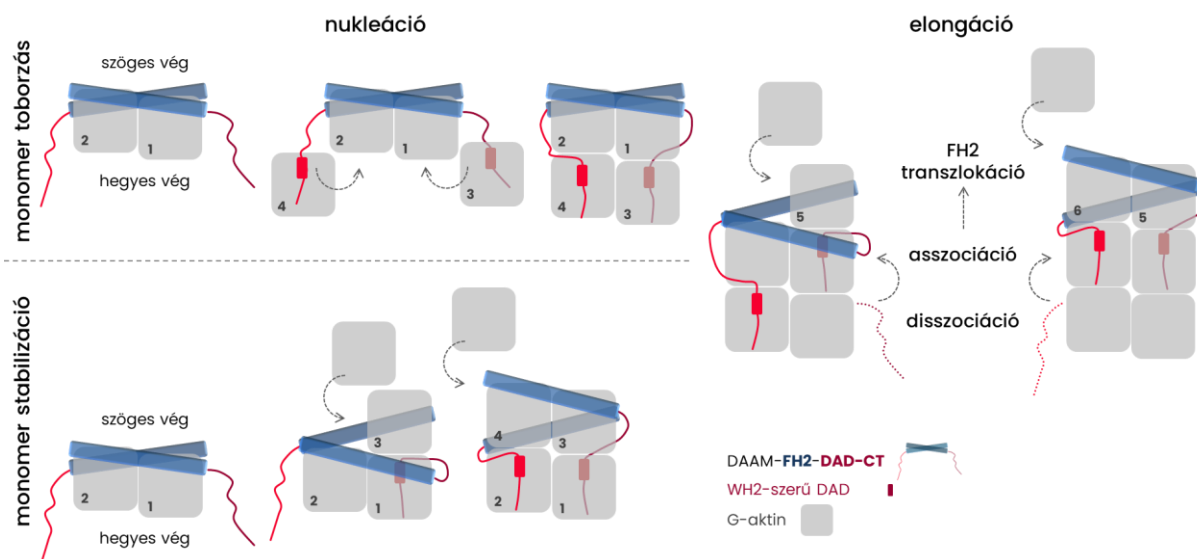
A DAAM FH1-FH2 egy profilin kapcsolt aktin összeszerelő faktor. A DAAM DAD-CT régiója az aktív FH2 domén aktin aktivitásainak finomhangolója, ami WH2-szerű kötési módot alakít ki az aktinnal. A DAD-CT egyrészt stabilizálhatja az FH2 szerkezetét és ez által közvetetten, az aktinkötő képességétől függetlenül támogathatja annak aktin összeszerelődésre kifejtett hatásait. Alternatívaként, az aktinkötő képességét figyelembe véve a DAD-CT közvetlen kölcsönhatást is kialakíthat az aktinnal az FH2-DAD-CT:aktin komplexben. Ezt az elképzelést alátámasztja a szerkezeti modellünk (32. ábra). A DAAM dimert alkotó két FH2 domén által kötött aktin alegység (32. ábra, 1 és 2 alegység) mellett mindkét DAD-CT régió egy-egy további aktin alegységet köthet (32. ábra, 3 és 4 alegység). A DAAM FH2-DAD-CT dimer tehát egy négy aktin alegységből álló komplexet stabilizálhat. A modell egyrészt magyarázza a DAD-CT FH2 katalizált nukleációra kifejtett pozitív hatását. A DAD-CT ugyanakkor segíti az FH2 filamentumvégekkel kialakított interakcióját is (sapkafehérjével való kompetíció). Ennek szerkezeti alapját a DAD-CT-nek a filamentum négy terminális/szubterminális alegységével (32. ábra, 1-4 alegység) kialakított kölcsönhatása jelentheti. A DAAM:filamentumvég kölcsönhatás processzív jellegét az FH2 és a DAD-CT disszociáció/asszociáció kinetikája határozza meg. A C-terminális így a processzivitásra is befolyással lehet, ami nem feltétlenül szembeötlő az elongációra kifejtett kvantitatív hatásban [150].

A DAAM:aktin kölcsönhatás általunk javasolt monomer stabilizáción alapuló modelljében a DAAM:aktin asszociációban és a komplex affinitásában az FH2 domén a meghatározó, míg a DAD-CT stabilizáló szereppel bír az FH2 által rekrutált monomerek vonatkozásában (33. ábra, monomer stabilizáció modell). Alternatívaként az FH2 domén mellett a DAD-CT is monomer toborzó régióként szolgálhat (33. ábra, monomer toborzás modell) [147, 165]. Ez utóbbi a DAD-CT kötött monomerek hegyes végen való beépülését sejteti, ami a profilin által gátolt kell legyen. A DAAM DAD-CT ilyen hatását kísérleteinkben nem tapasztaltuk. Másrészt a forminok izolált C-terminálisának aktin affinitása jellemzően alacsony (10. táblázat), ami a toborzás hatékonyságát negatívan befolyásolja. A C-terminális affinitásnövekedését eredményezheti az FH2 domén jelenléte által indukált szerkezeti változás vagy az FH2 kötött aktin monomerek közelsége is. A monomer toborzáson alapuló modell a nagy affinitású, míg a monomer stabilizáción alapuló modell inkább a kisebb affinitású formin C-terminális működésével van összhangban.



32. ábra: A DAAM FH2-DAD-CT:aktin kölcsönhatás szerkezeti modellje.

A modellhez felhasznált szerkezetek: FH2:aktin (FMNL FH2:TMR G-aktin, PDB 4EAH) [165], WH2:G-aktin (*WASP-interacting protein* (WIP) WH2, PDB 2A41) [161], DAAM1 FH2 (PDB 2Z6E) [166], mDia1 DAD (PDB 2BAP) [156], F-aktin Oda modellje [34].



33. ábra: A DAAM FH2-DAD-CT:aktin kölcsönhatás funkcionális modellje.

3.3. A DAAM formin az aktin és a mikrotubulus sejtíváz funkcionális integrációjában

A formin fehérjecsald az aktin:mikrotubulus sejtíváz funkcionális koordinációjában

A *Bevezetés* fejezetben tárgyaltak alapján a növekedési kúp aktin és mikrotubulus hálózatának citolinkerek által közvetített funkcionális integrációja meghatározó a sejtíváz működésében, így az axonnövekedés és navigáció folyamatában is [83, 85, 88, 89]. A citolinkerek egyidejűleg kölcsönhatnak az aktin és a mikrotubulus sejtívázzal. A kölcsönhatás megvalósulhat direkt módon, a két eltérő polimertípus egyidejű oldalkötése/kereszt-kötése révén vagy indirekt módon, például a mikrotubulus +TIP fehérjékkel való interakción keresztül (pl. EB1, CLIP-170, APC) (5. ábra). A mikrotubulusokkal való direkt vagy indirekt kölcsönhatás a formin fehérjecsald több tagja esetén is igazolt *in vitro* (pl. mDia1, mDia2, Cappuccino, INF1, INF2, DAAM1) [97, 167-170]. Az egyidejű aktin:mikrotubulus asszociáció a forminokat citolinker tulajdonsággal is felruházhajja.

Hipotézis, célkitűzések, kérdések

A DAAM meghatározó szereppel bírhat az aktin és a mikrotubulus sejtíváz szabályozásában, azonban a fehérje ezen funkciójának fiziko-kémiai hátterét nem vizsgálták.

Hipotézis

A DAAM meghatározó a növekedési kúp mikrotubulus sejtívázának működésében, valamint az aktin és mikrotubulus sejtíváz közötti koordinációban és funkcionális csatolásokban.

Munkánk során a DAAM rekombináns úton előállított fragmentumait vizsgáltuk *in vitro*. Célunk volt az aktinnal és mikrotubulusokkal kialakított kölcsönhatások és azok funkcionális következményeinek leírása.

Kérdések

1. Rendelkezik-e citolinker sajátssággal a DAAM, azaz kölcsönhat-e egyidejűleg az aktin filamentumokkal és a mikrotubulusokkal?
2. A DAAM mely szakaszai meghatározóak a citolinker aktivitásban?

Eredmények és következtetések

A DAAM lokalizációját primer idegsejtekben immunfluoreszcencia segítségével vizsgálva a kvantitatív elemzés alapján a DAAM három alpopulációja volt elkülöníthető (34. ábra) [171].

1. Aktin sejtíváz lokalizáció

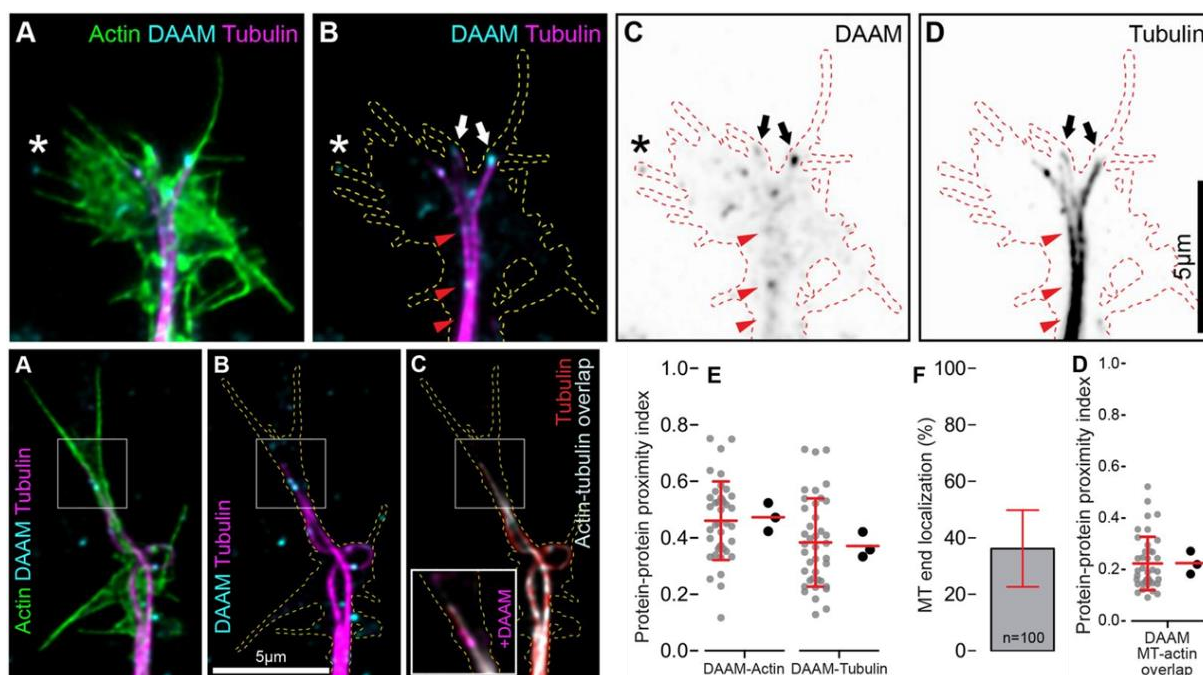
Korábbi megfigyelésekkel összhangban a DAAM egy jelentős része (~ 47%) az aktin gazdag intracelluláris kompartmentekhez lokalizál (pl. filopodium mentén és csúcsánál, lamellipodiális struktúrák, kortikális aktin hálózat).

2. Mikrotubulus sejtíváz lokalizáció

A DAAM közel hasonlóan nagy hányada (~ 37%) az axonális mikrotubulusok mentén detektálható.

3. Aktin:mikrotubulus sejtíváz kolokalizáció

Érdekes módon a DAAM egy jelentős része (~ 20%) az aktin és mikrotubulus sejtíváz átfedő szegmenseiben jelenik meg.

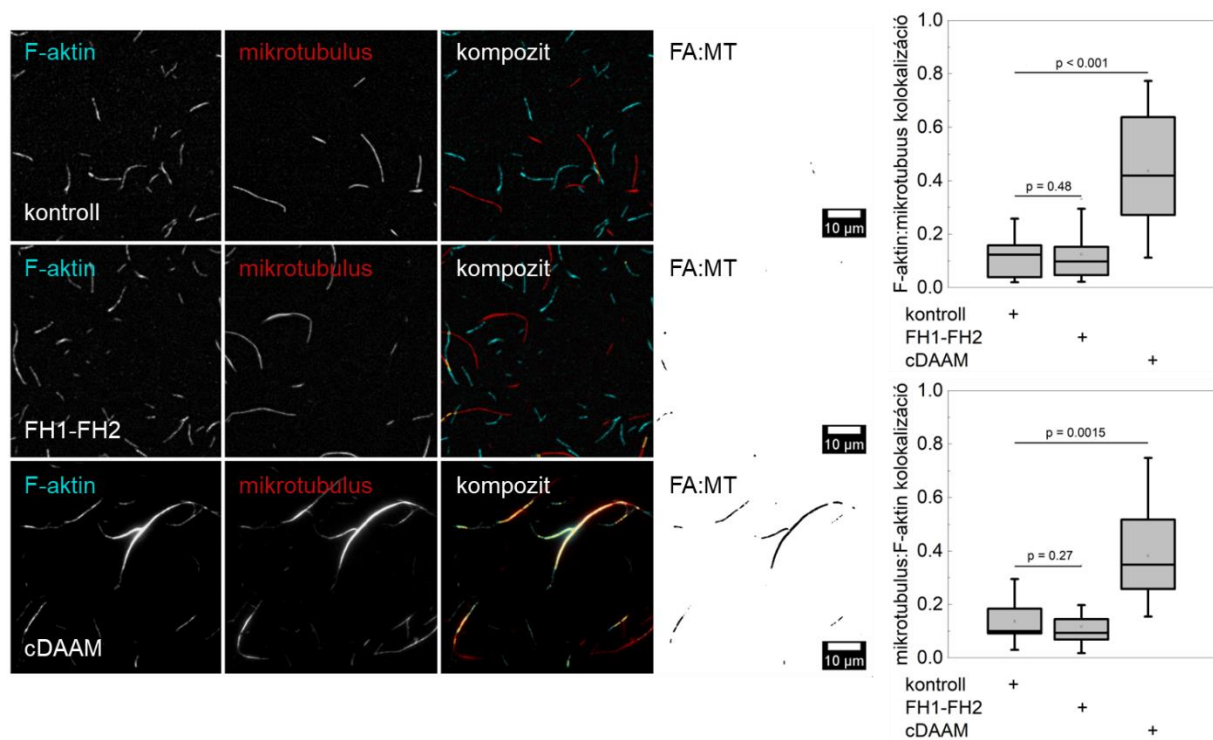


34. ábra: Az endogén DAAM lokalizációja primer idegsejtekben.⁶

Drosophila primer idegsejtek (6 HIV) növekedési kúpjának aktin (Alexa Fluor™ 546 falloidin festés) és mikrotubulus (immunfluoreszcencia, egér anti- α -tubulin) sejtíváz, valamint az endogén DAAM (immunfluoreszcencia, nyúl anti-dDAAM) lokalizációja. A DAAM lokalizációjának kvantitatív elemzése. Az ábra forrása: [171].

Az *in vivo* megfigyelések nyomán a DAAM F-aktin és mikrotubulus (MT) oldalkötő/kötegelő/keresztelő aktivitását vizsgáltuk *in vitro*, tisztított fehérjékkel. Szedimentáción alapuló vizsgálatainkban azt találtuk, hogy a DAAM köt az aktin filamentumok oldalához és kötegel azokat (*nem bemutatott adatok*, Figure 7, 8 [142], Figure 7 [99]), valamint a mikrotubulusokhoz is képes kötődni (*nem bemutatott adatok*, Figure 1H [171]). A DAAM két polimertípussal való egyidejű kölcsönhatását (keresztelő aktivitás, direkt citolinker aktivitás) egyedi polimereken TIRFM kísérletekben vizsgáltuk falloidin-stabilizált F-aktin és taxol-stabilizált mikrotubulusok megjelenítésével (35. ábra). A kvantitatív elemzés érdekében a két polimertípus közötti kolokalizációt mértük. A kontroll mintákban, DAAM hiányában a kolokalizáció mértéke ~ 13%-os volt, amit a polimerek véletlen orientációjából adódó átfedésnek tudtunk be. Az FH1-FH2 jelenléte nem befolyásolta számottevően ezt az értéket. A cDAAM azonban szignifikánsan, ~ 40%-ra növelte a kolokalizáció mértékét. Eredményeink szerint a DAAM tehát F-aktin:mikrotubulus keresztelő aktivitással rendelkezik és a kopolimerek kialakulásában meghatározó a fehérje C-terminális DAD-CT szakasza.

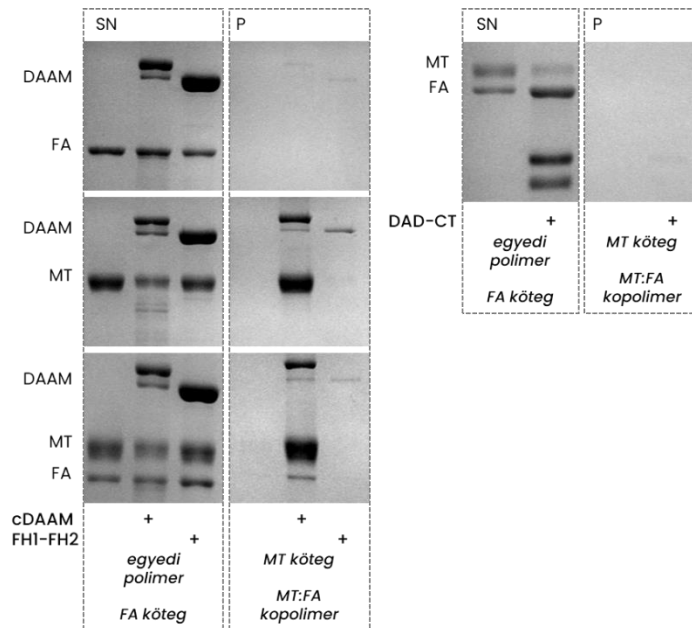
⁶ A vizsgálatokat együttműködő partnerünk Dr. Mihály József (HUN-REN SZBK, Szeged) és kutatócsoportja végezte el.



35. ábra: A DAAM F-aktin és mikrotubulus keresztkötő/direkt citolinker aktivitásának rekonstrukciója: egyedi polimereken alapuló TIRFM vizsgálatok.

Fluoreszcensen jelölt aktin filamentumok (FA, Alexa Fluor™ 568 falloidin) és mikrotubulusok (MT, taxol-stabilizált, 10% HiLyte Fluor™ 488 jelölt tubulin) reprezentatív TIRFM felvételei DAAM hiányban (kontroll, $n = 19$) és jelenlétében ($n_{\text{FH1-FH2}} = 18$, $n_{\text{cDAAM}} = 22$). A bináris képek az átfedő polimer területet mutatják.

Az egyedi polimerek vizualizációjának alternatívájaként a DAAM keresztkötő aktivitását *bulk* polimer sokaságon alapuló szedimentációs kísérletekben is megvizsgáltuk (36. ábra). Ennek érdekében elsőként egy olyan szedimentációs eljárást dolgoztam ki, ami lehetővé teszi az F-aktin:MT kopolimerek elválasztását az egyedi polimerektől/homogén polimerkötegektől (Módszerek, Szedimentáción alapuló vizsgálatok fejezet). A mintát egy 30%-os szacharóz gradiensre rétegezve, majd szedimentálva az egyedi polimerek és az aktin filamentumkötegek a felülúszóban maradnak, míg a nagyobb polimer komplexek (mikrotubulus köteg és F-aktin:mikrotubulus kopolimer) ülepednek és jelennek meg a pelletben. A módszerből adódóan az aktin filamentumok csak abban az esetben pelletálódhatnak, ha fizikailag a mikrotubulusokhoz vannak kötve. F-aktin és mikrotubulus együttes jelenlétében a cDAAM tartalmú mintákban az aktin filamentumok egy része megjelent a pelletben a mikrotubulusokkal. Az F-aktin ülepedését DAAM hiányában, FH1-FH2 vagy DAD-CT jelenlétében nem tapasztaltuk. Megerősítve a TIRFM eredményeinket ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy a cDAAM egyidejűleg képes kölcsönhatni a két polimer típussal és elősegíteni a kopolimerek kialakulását. Az izolált FH2 és DAD-CT önmagukban nem elégségesek a keresztkötő aktivitáshoz, az a két szakasz kooperatív kölcsönhatásán alapul.



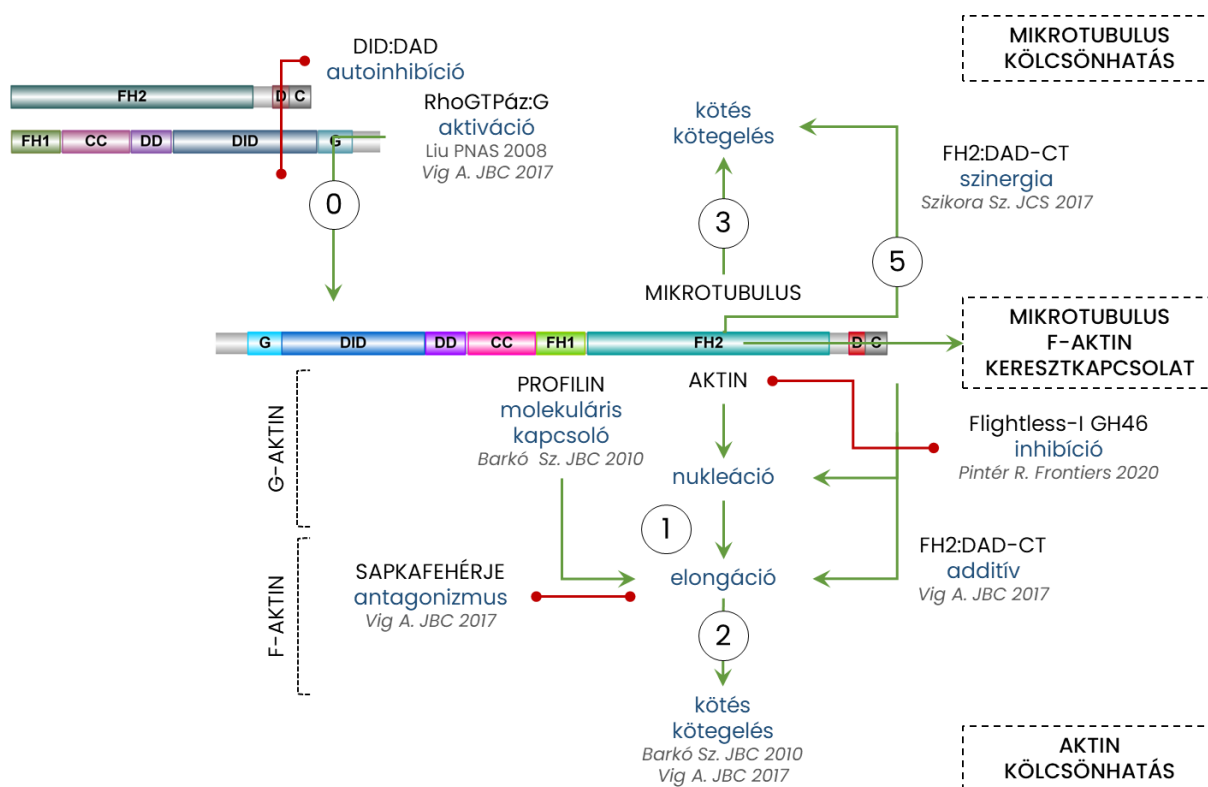
36. ábra: A DAAM F-aktin és mikrotubulus keresztkötő/direkt citolinker aktivitásának rekonstrukciója: *bulk* polimer sokaságon alapuló szedimentációs kísérletek.

A felülúszó (SN) és pellet (P) fehérjetartalmának SDS-PAGE elemzése DAAM fragmentumok hiányban és jelenlétében (FH1-FH2, cDAAM, DAD-CT). [F-aktin] = 2 μ M, [MT] = 2 μ M, [DAAM] = 9 μ M. FA: F-aktin, MT: mikrotubulus.

Összefoglalás

A DAAM biokémiai aktivitásai és biológiai funkciója közötti korreláció a növekedési kúp sejtvezérlésének szabályozásában

A rekombináns úton előállított fehérjék szerkezeti és működésbeli sajátosságainak *in vitro* vizsgálata alapján a DAAM kölcsönhatásainak komplex rendszere rajzolódik ki (37. ábra) [99, 142, 171]. A DAAM aktin és mikrotubulus kapcsolt funkciói meghatározóak a növekedési kúp sejtvezérlésének szabályozásában, valamint az idegrendszeri fejlődés és az axonnövekedés során [99, 133, 171, 172]. A DAAM biokémiai aktivitásai és biológiai funkciói közötti lehetséges korrelációt az alábbi szakasz mutatja be (38. ábra).



37. ábra: A DAAM biokémiai aktivitásai és kölcsönhatástérképe.

A számozás összhangban van a 38. ábrán bemutatott számozással.

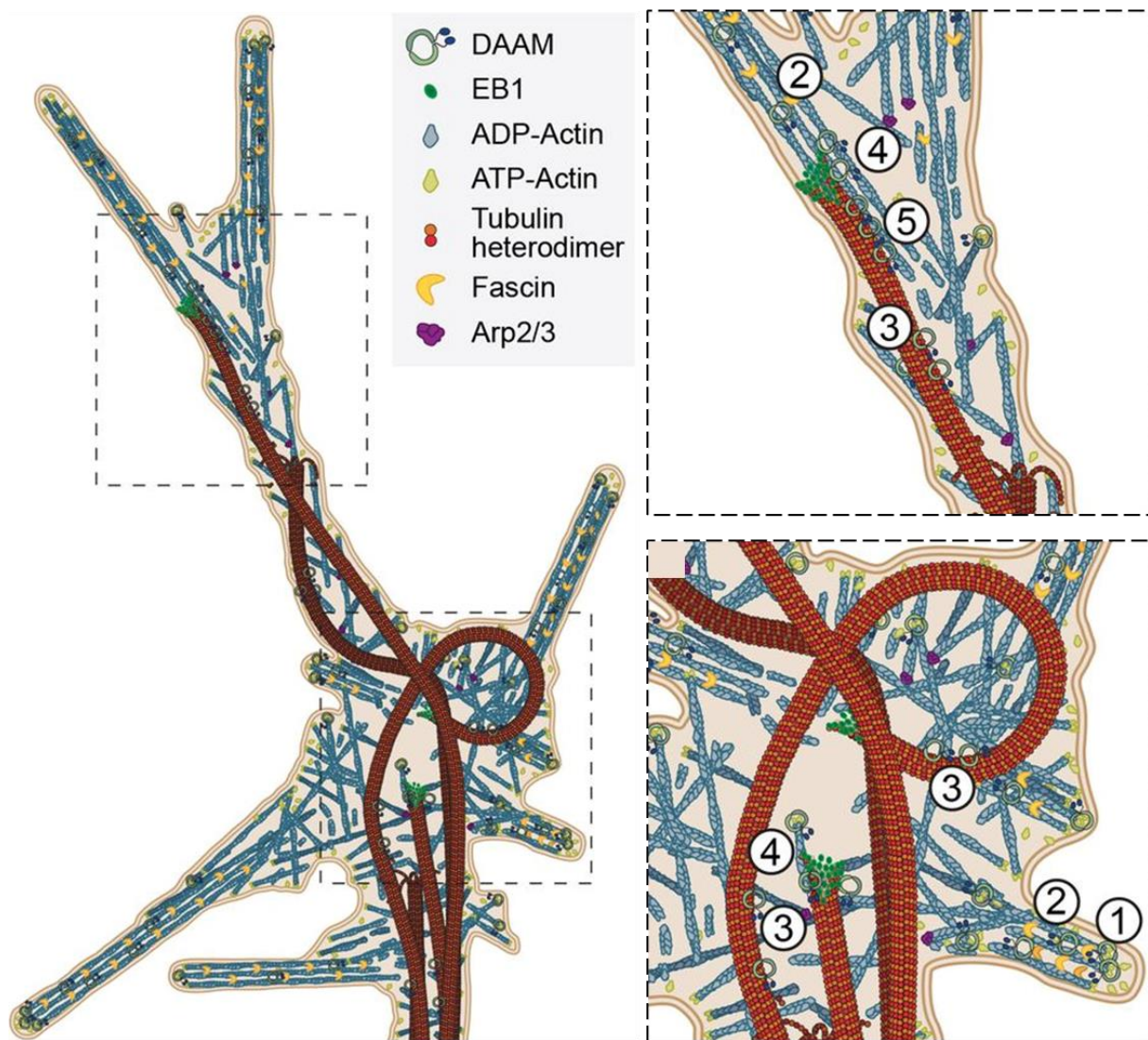
A DAAM mely in vitro kölcsönhatásai és aktivitásai relevánsak a biológiai környezetben és miként járulnak hozzá a növekedési kúp aktin és mikrotubulus sejtvezének működéséhez?

Drosophila primer idegsejtekben a DAAM a növekedési kúp perifériás régióiban a filopodiumokhoz lokalizálódik, együttműködik a Rho GTPázokkal és a profilinnal az axonális növekedés során [133]. Funkcionális tekintetben a DAAM DAD trunkált formájának (Δ DAD-DAAM, konstitutívan aktív) túltermelése az axonális filopodiumok számának szignifikáns növekedését eredményezi [99, 133]. A biomimetikus modellünk rekonstruálja a filopodiumszerű aktin hálózat létrehozásához szükséges fehérje-fehérje kölcsönhatásokat *in vitro* környezetben [142]. Ezek alapján a DAAM FH1-FH2 és a profilin az a minimális fehérjerendszer, ami képes a filopodiumszerű nyúlványok kialakulását katalizálni. Az eredményeink arra utalnak, hogy a DAAM ezen biológiai funkciójában meghatározó az FH2:aktin és az FH1:profilin kölcsönhatás, az FH1-FH2 processzív sajátága és a sapkafehérjével való antagonisztikus működése.

A primer idegsejtek filopodiumszámának elemzése megerősíti a DAAM CT régió szerepével kapcsolatos *in vitro* vizsgálatainkat [99]. A DAD-CT trunkált forma (Δ DAD-CT-DAAM) kevésbé hatékonyan képes filopodiumszám növekedést előidézni, mint a Δ DAD-DAAM. Tehát a DAAM natív FH2 domént tartalmazó formája hatékonyabb a CT régió jelenlétében a filopodiális nyúlványok képződésének vonatkozásában. Érdekes módon a CT régióval rendelkező, de az FH2 tekintetében funkcióvesztéssel hordozó fragmentum (Δ DAD-DAAM^{I732A}) túltermelése esetén a DAD-CT trunkált forma (Δ DAD-CT-DAAM, natív FH2

domén) hatásával összemérhető a filopodiumszám növekedés. Ez alapján, ugyan az *in vitro* aktin aktivitásukban viszonylag nagy eltérések mutatkoznak, de mind az FH2 domén, mind pedig a CT régió szükséges a filopodiumok képződéséhez. Ugyanakkor a Δ DAD-CT-DAAM^{I732A} hatása a kontroll sejtekével összemérhető, azaz a CT hiánya az I732A mutációval kombinálva teljes funkcióvesztést eredményez a DAAM aktin aktivitásaiban. Az *in vivo* vizsgálataink eredményei igazolják, hogy a CT régió hozzájárul a DAAM közvetített axonális filopodiumképződéshez, tehát a biológiai kontextusban is fontos szerepet tölt be a DAAM aktin aktivitásaiban [99].

A DAAM a filopodiális aktin hálózat szabályozása mellett az axonális mikrotubulus sejtváza működésének, illetve az aktin:mikrotubulus sejtváz közötti csatolásoknak is egyik meghatározó eleme. A növekedési kúpban az aktin asszociáció mellett a DAAM jelentős része kolokalizál a mikrotubulusokkal (rács mentén, (+) végen) és a DAAM:aktin:mikrotubulus hármas kolokalizáció is megfigyelhető [133, 171]. A DAAM mikrotubulus sejtvázhhoz való asszociációja tekintetében fontos jellemző annak direkt/indirekt mivolta. *In vitro* vizsgálataink alapján az FH2 domén és a C-terminális is képes direkt kölcsönhatást kialakítani a mikrotubulusokkal. A DAAM aktin:mikrotubulus keresztkötő aktivitással is bír, amit az FH2 és a DAD-CT szinergikus együttműködése biztosít [171]. Indirekt szabályozási módokat kínálhat a DAAM mikrotubulus (+) vég asszociált fehérjékkel (+TIPs) való kölcsönhatása. Ezt támasztja alá a DAAM mikrotubulus (+) vég lokalizációja, valamint az EB1 fehérjével való kölcsönhatása (ko-IP *Drosophila* S2 sejt [171], *nem publikált eredményeink rekombináns úton előállított fehérjékkel*). Az irodalmi adatok arra utalnak, hogy a DAAM esetén azonosított mikrotubulus és aktin:mikrotubulus kölcsönhatás konzervált a formin fehérjecsalcában [97, 173]. A mikrotubulusokkal kialakított direkt interakció több formin esetén is igazolt *in vitro* (mDia2 [167, 168], mDia1, INF2 [168], Cappuccino [169]). E mellett a +TIP:formin modul is az aktin:mikrotubulus sejtváz funkcionális integrációjának egy általános mechanizmusa lehet [173]. A forminoknak egy másik +TIP fehérjével, a CLIP170-nel kialakított kölcsönhatását is leírták (mDia1, mDia2, INF1, INF2, DAAM1 [170]). Megjegyzendő, hogy az mDia1:CLIP-170 az EB1-on keresztül az képes az aktin polimerizációt a mikrotubulus (+) véghez csatolni *in vitro*, aminek biológiai relevanciája is elképzelhető [170, 171, 173].



38. ábra: A DAAM biológiai funkciói a növekedési kúp sejtvezének szabályozásában.

A DAAM lokalizációjának és funkcióinak sematikus modellje a növekedési kúp sejtvezének szabályozásában. Az ábra forrása: [171]. A DAAM biokémiai aktivitásai és biológiai funkciói közötti korrelációt az alábbiakban foglaltam össze az ábra szerinti számozásnak megfelelően.

<i>jelölés</i>	<i>DAAM</i>	<i>biokémiai aktivitás</i>	<i>biológiai funkció</i>
0	G, DID, DAD	autoinhibíciós kölcsönhatás	RhoGTPáz-függő szabályozás
1a	FH2-DAD-CT	G-aktin, F-aktin kötés	aktin összeszerelődés
1b	FH1	profilin kötés	processzív szöges vég elongáció CP antagonizmus
2	FH2	F-aktin kötés és kötegelés	F-aktin stabilizáció
3a	FH2	MT kötés	MT stabilizáció
3b	FH2-DAD-CT	MT kötegelés	
4	CT	EB1 kötés	indirekt F-aktin:MT keresztkapcsolat indirekt citolinker funkció
5	FH2-DAD-CT	F-aktin:MT keresztkötés	direkt F-aktin:MT keresztkapcsolat direkt citolinker funkció

Tudományos szempontból új eredmények

A DAAM formin homológia (FH1, FH2) domének, az aktin és a profilin tripartit kölcsönhatása meghatározó a filopodiumszerű aktin hálózat létrehozásában. A DAAM C-terminálisa (DAD-CT) az aktinnal kialakított direkt kölcsönhatásával az FH domének aktivitásainak pozitív szabályozója, valamint citolinker funkciót tölt be az aktin és mikrotubulus sejtváz működésének összehangolásában.

A DAAM formin homológia domének fiziko-kémiai sajátosságai

1. A DAAM FH1-FH2 fragmentuma *bona fide* Drf formin, aktin aktivitását a DID:DAD autoregulációs modul szabályozza.
2. Az FH2 alapvető a DAAM:aktin kölcsönhatásban.
3. A DAAM FH1:profilin kölcsönhatás molekuláris kapcsolóként működik a fehérje aktin aktivitásának szabályozásában.
4. A DAAM FH1-FH2 processzív elongációs faktor, a polimerizáció során a filamentum szögcsúcs végéhez kötődik és ezzel egyidőben lehetővé teszi az aktin alegységek asszociációját és disszociációját több cikluson keresztül.
5. A DAAM és a sapkafehérje kompetitív módon szabályozza a filamentumok elongációját.
6. A DAAM FH1-FH2 és profilin az a minimális fehérjerendszer, ami egy filopodiumszerű aktin hálózat létrehozásához szükséges.

A DAAM C-terminális szakaszának új szerepe az aktin dinamika szabályozásában

1. A DAD-CT a DAAM egy újonnan azonosított aktinkötő régiója.
2. A DAD-CT az FH1-FH2 aktin kölcsönhatásainak (monomer, filamentum) és aktivitásainak (nukleáció, elongáció) pozitív szabályozója, amelyhez a DAD és a CT szakaszok additív módon járulnak hozzá.
3. A DAAM DAD-CT FH2-szerű kötési módot alakít ki az aktinnal.

A DAAM az aktin és a mikrotubulus sejtváz működésének összehangolásában

1. A DAAM egyidejűleg kölcsönhat az aktin filamentumokkal és a mikrotubulusokkal (keresztelő aktiválás, direkt citolinker funkció).
2. A DAAM citolinker aktivitása az FH2 és a DAD-CT szinergikus kölcsönhatásán alapul.

Kapcsolódó publikációk, az eredmények közlési helyének megadása

Szikora Szilárd, Földi István, Tóth Krisztina, Migh Ede, Vig Andrea Teréz, **Bugyi Beáta**, Maléth József, Hegyi Péter, Kaltenecker Péter, Sanchez-Soriano Natalia, Mihály József ✉

The formin DAAM is required for coordination of the actin and microtubule cytoskeleton in axonal growth cones.

JOURNAL OF CELL SCIENCE 130 : 15 pp. 2506-2519. , 14 p. (2017)

IF: 4.401 Folyóiratcikk (Szakcikk) Tudományos

Független idéző: 30 Függő idéző: 8 Összesen: 38

Vig Andrea Teréz, Földi István, Szikora Szilárd, Migh Ede, Gombos Rita, Tóth Mónika Ágnes, Huber Tamás, Pintér Réka, Csaba Talián Gábor, Mihály József, **Bugyi Beáta** ✉

The activities of the C-terminal regions of the formin protein Disheveled-associated activator of morphogenesis (DAAM) in actin dynamics.

JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 292 : 33 pp. 13566-13583. , 18 p. (2017)

IF: 4.01 Folyóiratcikk (Szakcikk) Tudományos

Független idéző: 5 Függő idéző: 6 Összesen: 11

Tóth Mónika Ágnes, Kinga Majoros Andrea, Vig Andrea Teréz, Migh Ede, Nyitrai Miklós, Mihály József, **Bugyi Beáta** ✉

Biochemical activities of the Wiskott-Aldrich syndrome homology region 2 domains of sarcomere length short.

JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 291 : 2 pp. 667-680. , 14 p. (2016)

IF: 4.125 Folyóiratcikk (Szakcikk) Tudományos

Független idéző: 7 Függő idéző: 8 Összesen: 15

#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

Független idéző: 19 Függő idéző: 16 Összesen: 35

[# megosztott első szerzős közlemény](#)

Renault Louis, **Bugyi Beáta**, Carlier Marie-France ✉

Spire and Cordon-bleu: multifunctional regulators of actin dynamics.

TRENDS IN CELL BIOLOGY 18 : 10 pp. 494-504. , 11 p. (2008)

IF: 13.385 Folyóiratcikk (Összefoglaló cikk) Tudományos

Független idéző: 56 Függő idéző: 15 Összesen: 71

Bugyi Beáta ✉

Forminfehérjék: aktinösszeszerelő molekuláris gépezetek.

MAGYAR TUDOMÁNY 177 : 1 pp. 8-11. , 4 p. (2016)

Folyóiratcikk (Szakcikk) Tudományos

Bugyi Beáta ✉

Wiskott-Aldrich szindróma fehérje homológ 2 domén: a kirakós sokoldalú eleme.

Biokémia: a Magyar Biokémiai Egyesület folyóirata 39 : 2 pp. 25-35. , 11 p. (2015)

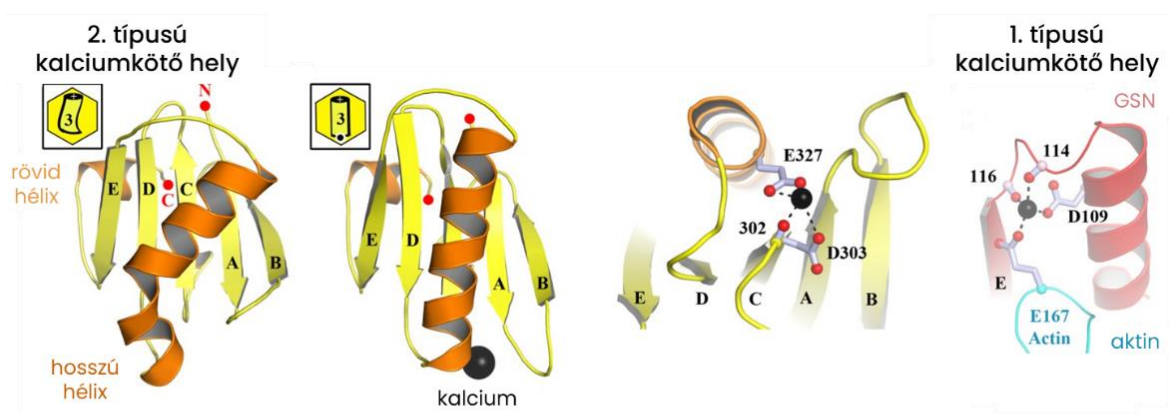
Folyóiratcikk (Szakcikk) Tudományos

3.4. A Flightless-I gelsolin homológ fehérje az aktin sejtvázdinamika szabályozásában

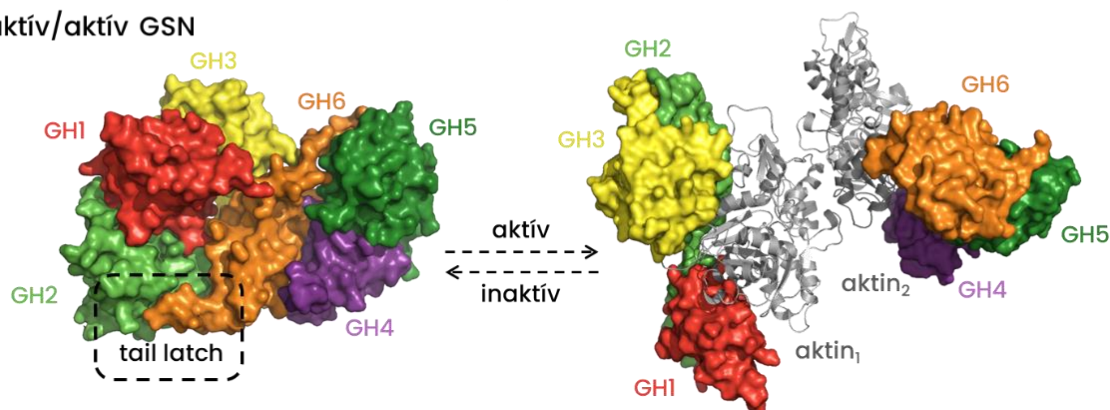
A gelsolin homológ fehérjecsalád

A gelsolin szupercsalád az aktin sejtvázdinamika szabályozó fehérjéit foglalja magába, melyek szignatúrája a gelsolin homológ (GH) domének jelenléte [174, 175]. Az emlősökben és emberben is előforduló GH fehérjék a makrofág sapkaféhrje (*macrophage capping protein*, CapG), az adseverin, a gelsolin (GSN), a Flightless-I (Fli-I), az advillin, a villin, a villin-szerű fehérje és a szupervillin. A prototípus GH domén szerkezetét tekintve egy 5-, vagy 6-szálú β -lemez alkotja, ami egy rövid (a száakra közel merőleges) és egy hosszú (a száakkal közel párhuzamos) α -hélix közé szendvicselődik (39. ábra). A GH domének 2. és 1. típusú kalciumkötő helyekkel rendelkezhetnek, amelyek a fehérjék aktivitásának szabályozásában vesznek részt. A fehérjecsalád névadó tagja, a gelsolin 6 GH doménnel rendelkezik (39., 40. ábra) [176-178]. A GSN egy multifunkcionális fehérje, kölcsönhat az aktin filamentumokkal és monomerekkel, szöges vég sapkázó (*capping*), fragmentáló (*severing*) és nukleációs aktivitással bír. A GSN aktivitása komplex módon szabályozott a kalcium, a foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát (PIP₂) és az ATP kötése, valamint a pH által [179].

prototípus GH domén



inaktív/aktív GSN



39. ábra: A gelsolin homológ domén és a gelsolin szerkezeti sajátosságai.

Prototípus GH domén. 2. típusú kalciumkötő hely: a kalciumion koordinálásában egy glutaminsav (rövid α -hélix), egy aszparaginsav és egy α -szénatom (β -lemez C szála) vesz részt, 1. típusú kalciumkötő hely: a koordinációban a kötőpartner, az aktin (Glu¹⁶⁷) is részt vesz. Az ábra forrása: [174].

Inaktív/aktív GSN. Az inaktív GSN röntgenkristallográfiával meghatározott szerkezete és az aktív GSN:aktin komplex szerkezeti modellje. A modellhez felhasznált szerkezetek: inaktív GSN GH16 (PDB 3FFN) [178], aktív GSN GH13:G-aktin (PDB 1RGI) [180], aktív GSN GH46:G-aktin (PDB 1H1V) [181]. Az aktin monomerek (szürke, aktin₁, aktin₂) az F-aktin Oda féle szerkezeti modell szerinti elrendezésben láthatóak [34].

Flightless-I

A Flightless-I egyedi felépítése révén két fehérjecsald szerkezeti jellemzőit ötvözi [174, 182]. Az N-terminálisán tandem leucinban gazdag ismétlődést találunk (*leucine-rich repeat*, LRR), a C-terminális pedig 6 GH domént tartalmaz (40. ábra). A GH domének platformként szolgálnak az aktin sejtvázaszociációhoz, míg az LRR molekuláris mintafelismerő motívumként kiterjedt kölcsönhatási hálózatot biztosíthat [183]. Állatkísérletes modellekben (egér, *Drosophila*, *C. elegans*) történt vizsgálatok alapján a *Fli-I* mutációja és a Fli-I diszfunkciója már az egyedfejlődés korai szakaszaiban letális, az aktin sejtvázhoz kapcsolódó folyamatok defektusát eredményezi [184-186]. A Fli-I alapvető szerepét támasztja alá továbbá az, hogy a GH fehérjecsald tagjai közül a legszélesebb szöveti eloszlást mutatja (Table I. [178]). A humán Fli-I a sebgyógyulás és a szöveti regeneráció negatív szabályozója, megnövekedett expresszióját kimutatták epidermolysis bullosa páciensekben [187, 188]. A Fli-I megváltozott értelmű (*missense*) pontmutációja (rs8821, R1243H) a szarkomer szerkezeti és kontraktilis sajátságainak megváltozását és a kardiomiopátia fokozott kockázatát eredményezi [189]. A *Fli-I* a 17-es kromoszómán a neurodevelopmentális zavarokhoz társuló magatartási fenotípust okozó Smith-Magenis mikrodéliós szindróma kritikus régiójában (17p11.2) található [190, 191]. A sejtbiológiai relevancia tekintetében a Fli-I aktin asszociációját igazolták állatmodellekben (egér, *Drosophila*, *C. elegans*), sejttes modellrendszerekben és tisztított fehérjékkel végzett *in vitro* kísérletekben is [182, 192]. Ugyan több tanulmány is vizsgálta a Fli-I aktin dinamikában tetten érhető hatásait az eredmények ellentmondásosak és a háttérben álló mechanizmusok nem pontosan tisztázottak.

Hipotézis, célkitűzések, kérdések

Hipotézis

A Flightless-I a gelsolin homológ doménjei révén meghatározó az aktin sejtvázdinamika szabályozásában.

Munkánk során a Fli-I rekombináns úton előállított fragmentumait vizsgáltuk *in vitro*. Célunk volt az aktinnal kialakított kölcsönhatások és azok funkcionális következményeinek leírása.

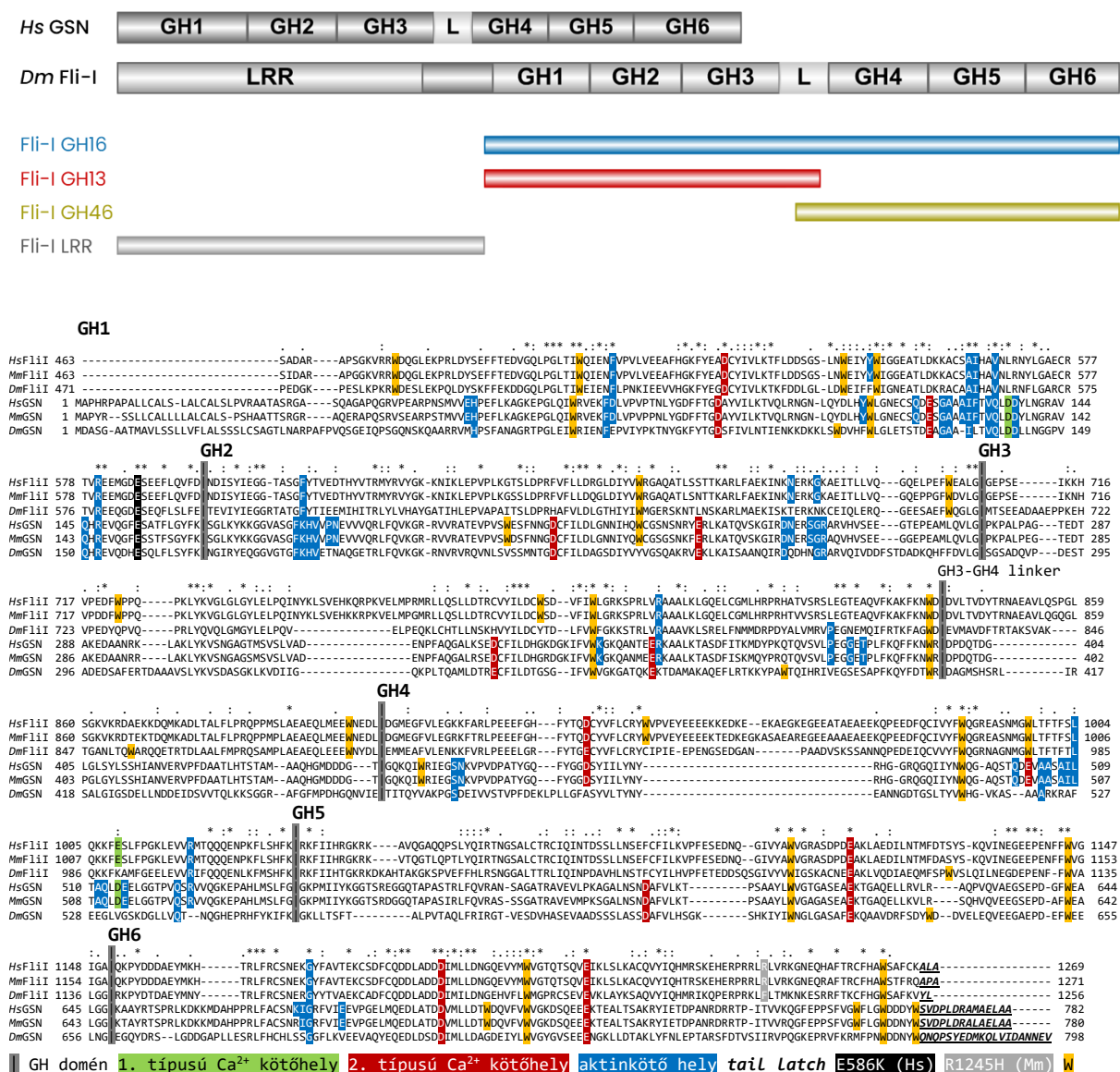
Kérdések

1. Milyen kölcsönhatásokat alakít ki az aktinnal és milyen aktivitásokkal rendelkezik a Fli-I?
2. Hogyan járulnak hozzá ehhez a fehérje egyes szakaszai?
3. Milyen sejtvázaszabályozó funkciókkal rendelkezik a Fli-I?

Eredmények és következtetések

A Flightless-I aktin kölcsönhatása és aktivitása kalciumfüggetlen és a GH13 doménekhez köthető

A GSN aktin kölcsönhatásának és aktivitásának előfeltétele a fehérje aktivációja, ami megvalósulhat a kalciumkötése révén [174]. A GSN proteolitikus hasítása a kaszpáz-3 helyen egy kalciumfüggetlen N-terminális (GH13) és egy kalciumfüggő C-terminális (GH46) fragmentumot eredményez (40. ábra). A szekvenciaelemzés alapján a GSN kalciumfüggő szabályozásában meghatározó szerkezeti elemek (1. és 2. típusú kalciumkötő helyek, C-terminális *tail latch*) nem konzerváltak a Fli-I-ben (40. ábra).



40. ábra: A gelsolin és a Flightless-I doménszerkezete és összehasonlító szekvenciaelemzése.

Hs gelsolin (GSN: 1-782aa), *Dm* Flightless-I (Fli-I GH16: 461-1256aa, GH13: 461-881aa, GH46: 851-1256aa, LRR: 1-460aa). UniProt azonosítók: Q13045 (*Hs* Fli-I), Q9JJ28 (*Mm* Fli-I), Q24020 (*Dm* Fli-I), P06396 (*Hs* GSN), P13020 (*Mm* GSN), Q07171 (*Dm* GSN). *Hs*: *Homo sapiens*, *Dm*: *Drosophila melanogaster*, GSN: gelsolin, Fli-I:

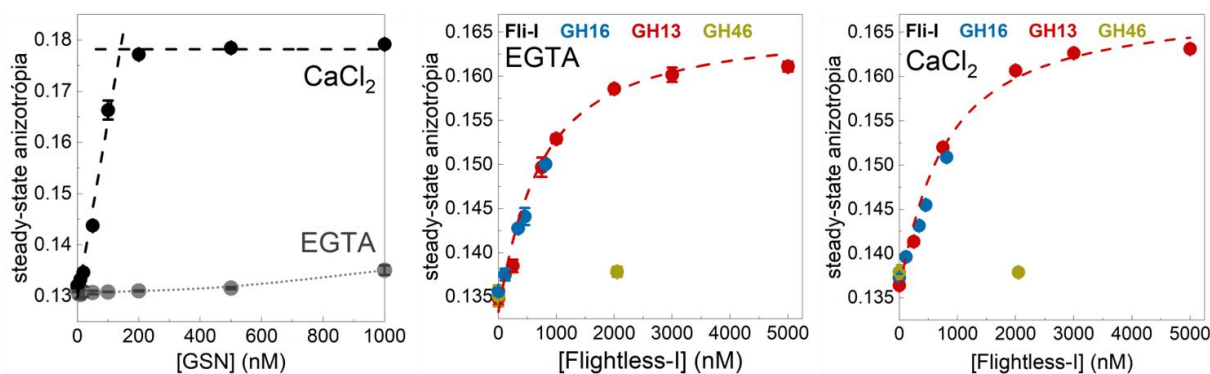
Flightless-I, GH: gelsolin homológ, L: GH3-GH4 linker régió, LRR: leucine-rich repeat. Az elemzést a ClustalX programmal készítettem.

A bioinformatikai elemzés kísérletes alternatívájaként a Fli-I rekombináns úton előállított GH doménjeinek (GH16, GH13, GH46) aktin kölcsönhatásait és aktivitásait írtuk le. A GH domén:G-aktin kölcsönhatást *steady-state* anizotrópia mérésekben fluoreszcensen jelölt aktin (Alexa488NHS) alkalmazásával vizsgáltuk (41. ábra). A GSN esetén kalcium hiányában (1 mM EGTA) nem detektáltunk komplexképződést, míg CaCl_2 (1 mM) jelenlétében szignifikáns anizotrópia növekedést tapasztaltunk. Az adatsor lineáris, törésponti jellege összhangban van az 1 GSN:2 G-aktin sztöchiometriával és a komplex nagy affinitásával ($K_D \ll \sim 100$ nM). A pirén aktin alapú kinetikai méréseinkben a GSN filamentum-összeszerelődésre kifejtett hatása is kalciumfüggést mutatott (41. ábra), összhangban korábbi eredményeinkkel [193]. Ezzel szemben a Fli-I:G-aktin kölcsönhatás és a filamentumok összeszerelődésére kifejtett hatása is kalciumfüggetlennek bizonyult.

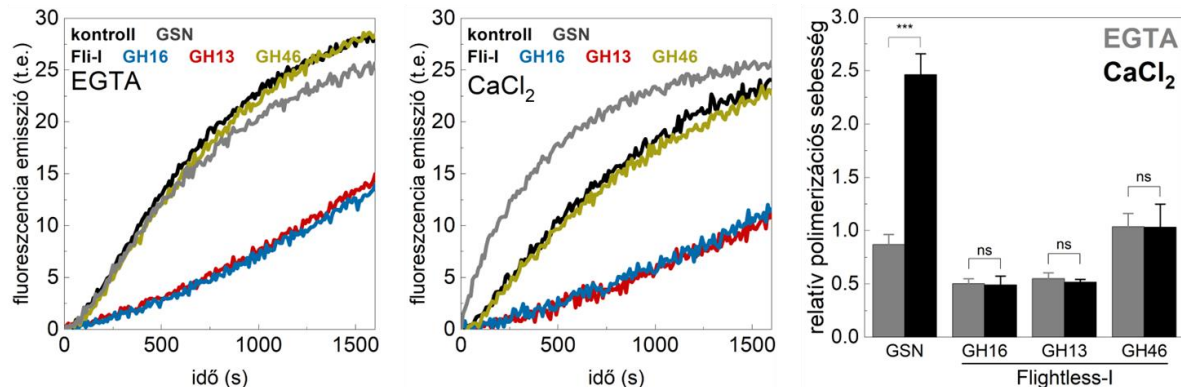
Fontos megfigyelésünk, hogy a Fli-I GH16 és GH13 hatása mind kvalitatív, mind pedig kvantitatív módon megegyezett. Ugyanakkor sem a Fli-I GH46, sem az LRR esetén nem tapasztaltunk kölcsönhatást a vizsgált koncentrációtartományon (41., 42., ábra, nem bemutatott adatok [194]). A anizotrópia([Fli-I]) adatsor kvadratikus kötési egyenlet szerinti illesztése alapján a Fli-I:G-aktin komplex disszociációs egyensúlyi állandója $K_D \sim 500\text{-}600$ nM-nak adódott (Módszerek, 9., 10. egyenlet).

Eredményeink arra utalnak, hogy a Fli-I aktin kölcsönhatása és aktivitásai kalciumfüggetlenek, a Fli-I:aktin kölcsönhatásban a fehérje GH13 szakasza meghatározó.

steady-state anizotrópia



aktin polimerizáció - *bulk*



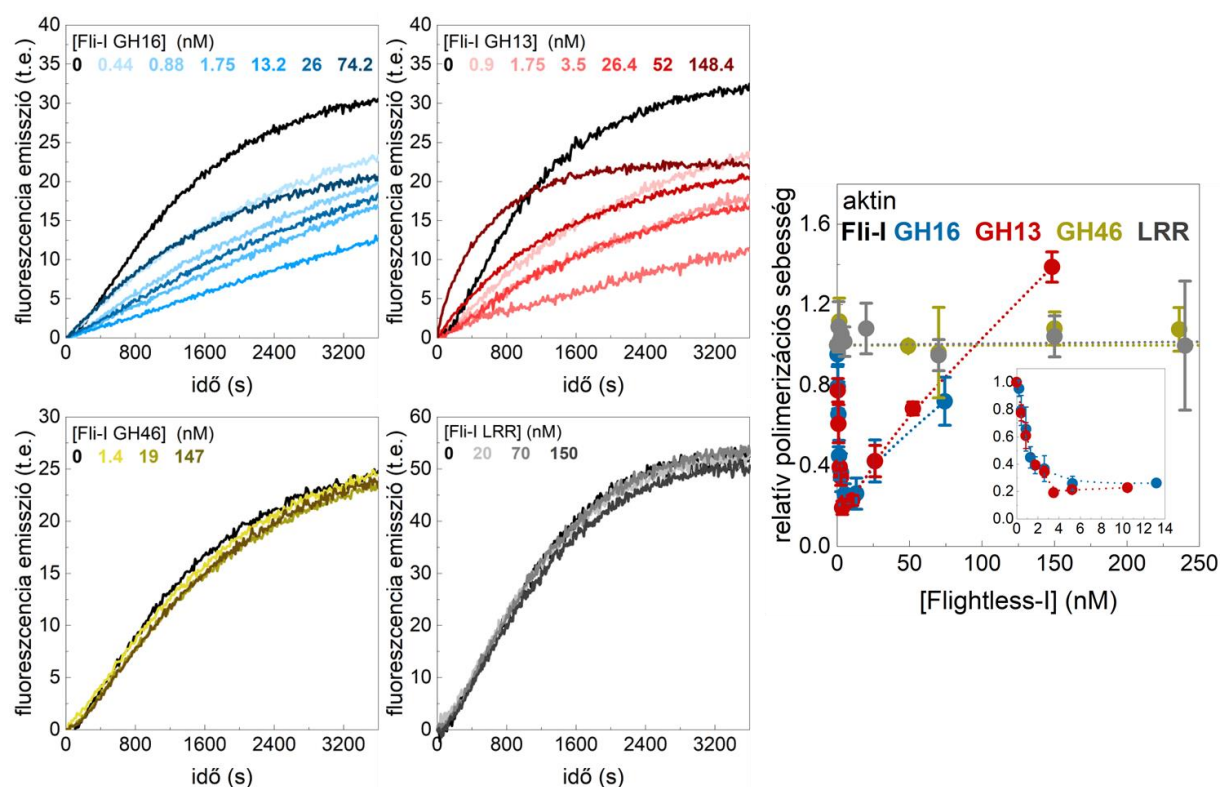
41. ábra: A Flightless-I aktin kölcsönhatása és aktivitásai kalciumfüggetlenek.

Steady-state anizotrópia. Alexa488NHS-G-aktin *steady-state* anizotrópiája. [Alexa488NHS-G-aktin] = 0.2 μ M, [EGTA] = 1 mM, [CaCl₂] = 1 mM. A piros szaggatott vonal az adatok illesztését jelzi a kvadratikus kötési egyenletnek megfelelően. $K_D(\text{Fli-I GH13:G-aktin}) = 576 \pm 182$ nM (1 mM EGTA), $K_D(\text{Fli-I GH16:G-aktin}) = 638 \pm 152$ nM (1 mM CaCl₂). Átlag $\pm$ SD, n = 3.

Aktin polimerizáció - bulk. A filamentum-összeszerelődés kinetikája. A pirén tranziensek kezdeti, lineáris szakaszához illesztett egyenes meredekségéből származtatott relatív polimerizációs sebesség. [aktin] = 2 μ M (5% pirén jelölt), [EGTA] = 1 mM, [CaCl₂] = 1 mM, [GSN] = 5 nM, [Fli-I] = 5 nM. Átlag $\pm$ SD, n = 2-4.

A Flightless-I multifunkcionális sajátságokkal bír az aktin dinamika szabályozásában

A Fli-I GH domének aktin polimerizációra kifejtett hatásának átfogóbb vizsgálatát végeztük el (42. ábra). A pirén aktin alapú kinetikai mérésekben azt találtuk, hogy a Fli-I GH16/GH13 hatása kétfázisú. Alacsonyabb koncentráción ([Fli-I] < 10 nM) a polimerizáció gátlása, míg magasabb koncentráción ([Fli-I] > 25 nM) annak elősegítése volt megfigyelhető (megjegyzendő, hogy magasabb Fli-I GH13 koncentráción ([Fli-I] > 100 nM) a polimerizáció sebessége meghaladta a spontán összeszerelődésre jellemző értéket). A kétfázisú trend a Fli-I multifunkcionális sajátságára utal. A továbbiakban célunk volt az ennek hátterében álló aktivitások azonosítása.

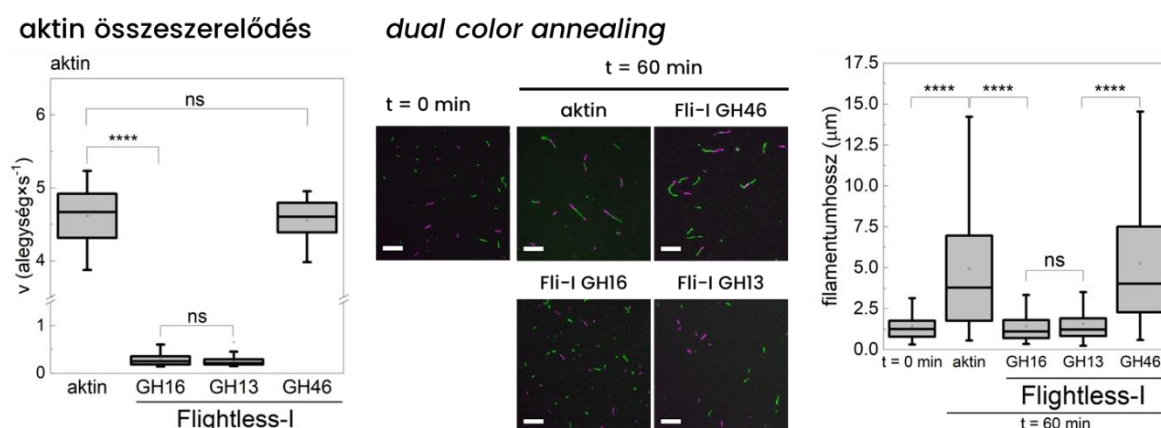


42. ábra: A Flightless-I hatása az aktin filamentumok összeszerelődésére.

A filamentum-összeszerelődés kinetikája Fli-I hiányában és jelenlétében. [aktin] = 2 μ M (5% pirén jelölt). A pirén tranziensek kezdeti, lineáris szakaszához illesztett egyenes meredekségéből származtatott relatív polimerizációs sebesség a [Fli-I] függvényében. Átlag $\pm$ SD, n = 2-7. Inzert: az adatok alacsony [Fli-I] < 15 nM-nak megfelelő tartománya.

A Flightless-I gátolja az aktin filamentumok szöges vég növekedését: sapkázó (capping) aktivitás

A *bulk* fluoreszcencia spektroszkópai kísérletek alapján, amit az egyedi polimerek megfigyelésén alapuló TIRFM vizsgálataink is alátámasztanak (43. ábra), egyértelmű, hogy a Fli-I alacsony, nM-os koncentrációban gátolja a filamentum-összeszerelődést. Ez nagy affinitású kölcsönhatást feltételez, aminek funkcionális kimenetele a monomerek szekvesztrálása és/vagy a szöges vég sapkázása lehet. A TIRFM kísérletekben alkalmazott aktin koncentráció ($[A_0] = 0.5 \mu\text{M} < c_c(-)$) mellett a filamentumok szöges vég elongációja jellemző. A Fli-I:G-aktin komplex disszociációs egyensúlyi állandója ($K_D \sim 500\text{-}600 \text{ nM}$) és az alkalmazott Fli-I koncentráció ($[Fli-I] = 10 \text{ nM}$) alapján a Fli-I a G-aktin mintegy 1%-ával alkot komplexet ($[Fli-I:G\text{-aktin}] \sim 5 \text{ nM}$). Ez az elongáció sebességének elhanyagolható, mindössze $\sim 1\text{-}2\%$ -os csökkenését eredményezné (Módszerek, 12. egyenlet). A monomer kölcsönhatáson alapuló szekvesztráció tehát nem magyarázza a Fli-I aktin polimerizációra kifejtett gátló hatásának kvantitatív jellemzőit. Következésképpen adataink a szöges véghez kapcsolódó aktivitásokat sejtetnek. A Fli-I filamentumvég sapkázó aktivitását egyedi polimereken vizsgáltuk, mechanikailag fragmentált filamentumok vég-vég kapcsolódását mértük (*dual color annealing*, 43. ábra). A Fli-I hiányában a filamentumok hossznövekedése és az azok mentén detektálható inhomogén fluoreszcencia emisszió a spontán *annealing*-re utal. A Fli-I GH16/GH13 jelenlétében a filamentumok rövidek maradtak és homogén fluoreszcencia emissziót mutattak, a vég-vég kapcsolódásuk gátolt volt. Eredményeink alapján a Fli-I a szöges véggel kialakított kölcsönhatásán keresztül filamentumvég sapkázó aktivitással rendelkezik és ez által gátolja a filamentum-összeszerelődést.



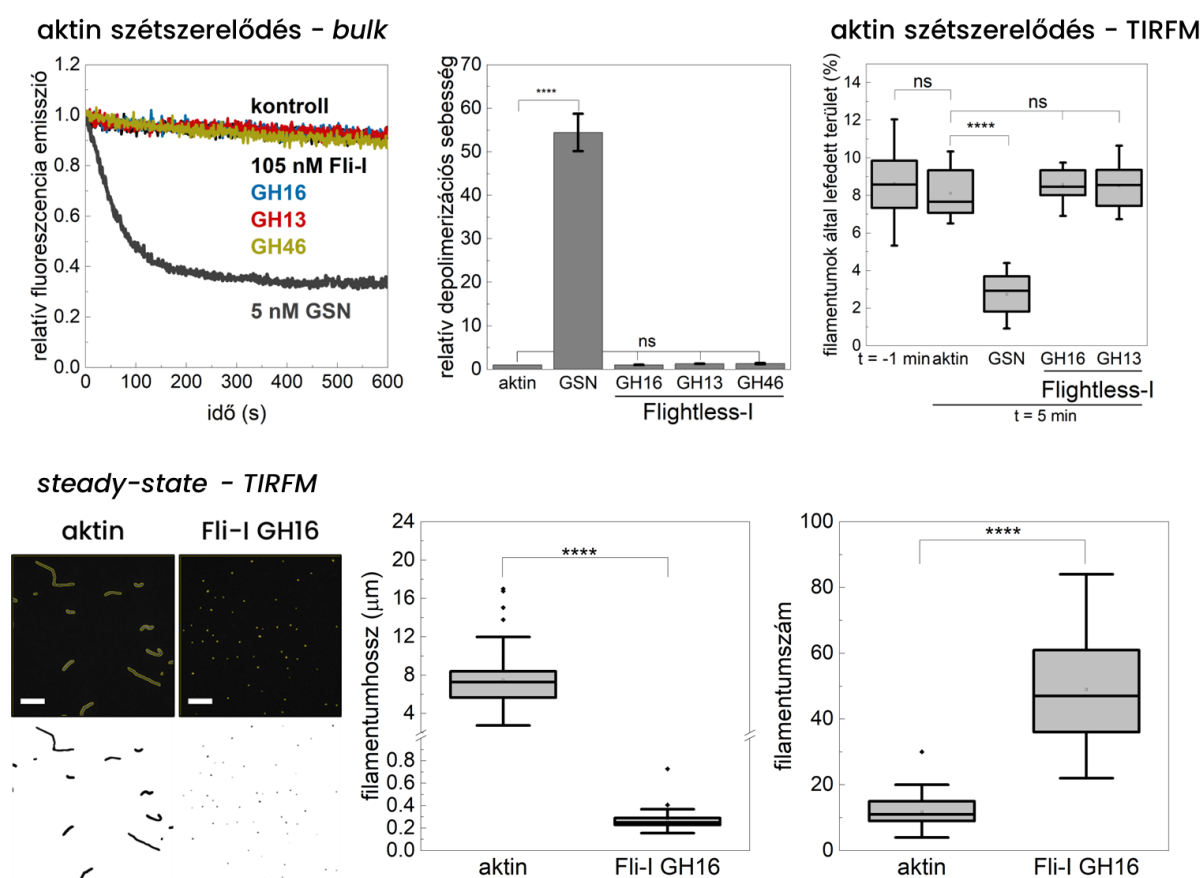
43. ábra: A Flightless-I gátolja az aktin filamentumok szöges vég növekedését: sapkázó (capping) aktivitás.

Aktin összeszerelődés. A filamentumok elongációs sebessége (v) Fli-I hiányában és jelenlétében. $[aktin] = 0.5 \mu\text{M}$ (10% Alexa488NHS jelölt), $[Fli-I] = 10 \text{ nM}$. $n = 20\text{-}60$. Reprezentatív TIRFM felvételeket és a képelemzés részleteit a *Módszerek* fejezet mutatja be. Kontroll minta (aktin): $v_{aktin} = 4.61 \pm 0.36 \text{ aegység} \times s^{-1}$ és $k_+ = 11.53 \pm 0.90 \mu\text{M}^{-1} \times s^{-1}$ ($n = 23$) (Módszerek, 12. egyenlet).

Dual color annealing. A filamentumok vég-vég kapcsolódásának vizsgálata, reprezentatív TIRFM felvételek és a filamentumhossz kvantitatív elemzése. t : a filamentumok fragmentációját követő idő. $[aktin] = 0.5 \mu\text{M}$ (10% Alexa488NHS jelölt, 10% Alexa568NHS jelölt), $[Fli-I] = 120 \text{ nM}$. Méretvonal = $10 \mu\text{m}$. $n_{minta} = 3\text{-}9$, $n_{filamentum} = 136\text{-}174$.

A Flightless-I elősegíti a nukleációs intermedierek kialakulását: *de novo* nukleációs aktivitás

A pirén aktin alapú kinetikai vizsgálatainkban a Fli-I viszonylag nagy koncentrációban ($[Fli-I] > \sim 100$ nM) elősegítette a polimerizációt. Ez kisebb affinitású kölcsönhatást feltételez, aminek funkcionális kimenetele a filamentumok fragmentációja (*severing*) és/vagy a *de novo* nukleáció lehet. A GSN a filamentumok oldalával kialakított kölcsönhatása révén katalizálja azok szétszerelődését, összhangban korábbi eredményeinkkel (44. ábra) [193, 195]. Pirén aktin alapú fluoreszcencia spektroszkópai kísérletekben a Fli-I GH16/GH13 (105 nM) nem befolyásolta a filamentumok szétszerelődésének kinetikáját (44. ábra). Az aktivitás vizsgálatára egy egyedi polimereken megfigyelésén alapuló TIRFM mérést is kidolgoztunk, ahol a szétszerelődés mértékének kvantitatív leírására a filamentumok által lefedett területet határoztuk meg. A fluoreszcencia spektroszkópai mérések eredményével összhangban a Fli-I GH16/GH13 nem befolyásolta szignifikánsan ezt a paramétert (44. ábra). A *de novo* nukleációs aktivitás vizsgálatára a filamentumok egyensúlyi számát határoztuk meg TIRFM mérésekben (44. ábra). A Fli-I GH16 jelenlétében (800 nM) szignifikánsan több filamentum volt megfigyelhető a kontroll mintához képest. Ugyanakkor ezek hossza lényegesen rövidebb volt, mint a kontroll mintában, ami összhangban van a Fli-I szöges vég sapkázó aktivitásával. Eredményeink tehát arra utalnak, hogy a Fli-I a monomerekkel kialakított kölcsönhatásán keresztül *de novo* nukleációs aktivitással rendelkezik és ennek révén katalizálja a filamentum-összeszerelődést.



44. ábra: A Flightless-I elősegíti a nukleációs intermedierek kialakulását: *de novo* nukleációs aktivitás.

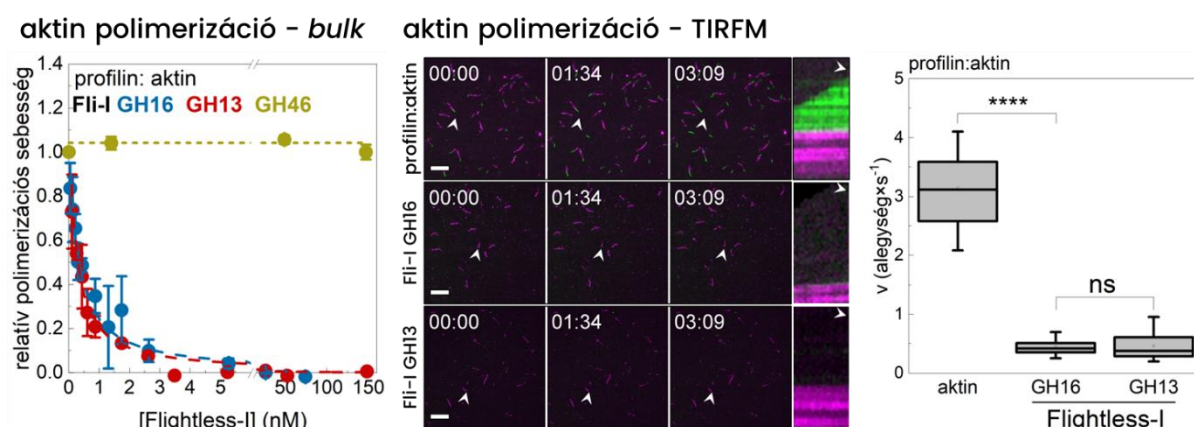
Aktin szétszerelődés – bulk. A filamentumok szétszerelődésének kinetikája GSN és Fli-I hiányában és jelenlétében. A kvantitatív elemzés során a pirén tranziensek kezdeti, lineáris szakaszához illesztett egyenes meredekségéből származtatott relatív depolimerizációs sebességet határoztuk meg. [aktin] = 50 nM (50% pirén jelölt), [GSN] = 5 nM, [Fli-I] = 105 nM, [CaCl₂] = 1 mM. Átlag ± SD. n = 2-3.

Aktin szétszerelődés – TIRFM. A filamentumok által lefedett terület GSN és Fli-I hiányában és jelenlétében. A t = -1 és 5 min a GH domén fehérjék hozzáadása előtti, illetve azt követő időpontnak felel meg. [aktin] = 0.5 μM (10% Alexa488NHS jelölt), [GSN] = 0.5 nM, [Fli-I] = 105 nM. n = 12-51. Reprezentatív TIRFM felvételeket és a képelemzés részleteit a *Módszerek* fejezet mutatja be.

Steady-state – TIRFM. A filamentumok *steady-state* sajátságainak vizsgálata, reprezentatív TIRFM felvételek és a filamentumszám és hossz kvantitatív elemzése. [aktin] = 2 μM (10% Alexa488NHS jelölt), [Fli-I] = 800 nM. Méretvonal = 10 μm. n = 69-73.

A profilin:G-aktin kölcsönhatás molekuláris kapcsolóként szolgál a Flightless-I aktin aktivitásainak szabályozásában

Az aktin polimerizáció kompetens formája intracelluláris környezetben a G-aktin profilinnal alkotott komplexe. A GSN vonatkozásában a profilin hatásairól nem állnak rendelkezésre adatok. Ezért vizsgálatokat végeztünk, arra vonatkozóan, hogy a profilin milyen hatással van a Fli-I aktin kölcsönhatására és aktivitásaira (45. ábra). Fluoreszcencia spektroszkópiai és TIRFM alapú kinetikai vizsgálataink szerint a Fli-I GH16/GH13 gátolta a profilin:G-aktin összeszerelődését. Azonban a szabad G-aktin polimerizációja esetén megfigyelt gyorsító hatást magas Fli-I koncentrációkon nem tapasztaltuk. A relatív polimerizációs sebesség([Fli-I]) adatsor illesztése alapján (6. egyenlet) a félmaximális gátló koncentráció az alábbiak szerint adódott: IC₅₀(Fli-I GH16) = 0.93 ± 0.12 nM és IC₅₀(Fli-I GH13) = 0.13 ± 0.01 nM. A gátló hatást a szöges vég sapkázásnak tulajdonítva a Fli-I GH16/13 nagy affinitású kölcsönhatást alakít ki a filamentumvégekkel. A profilin:G-aktin kölcsönhatás tehát molekuláris kapcsolóként működik a Fli-I aktin aktivitásainak szabályozásában: a profilin nem befolyásolja a Fli-I szöges vég sapkázó aktivitását, viszont gátolja annak *de novo* nukleációs aktivitását.

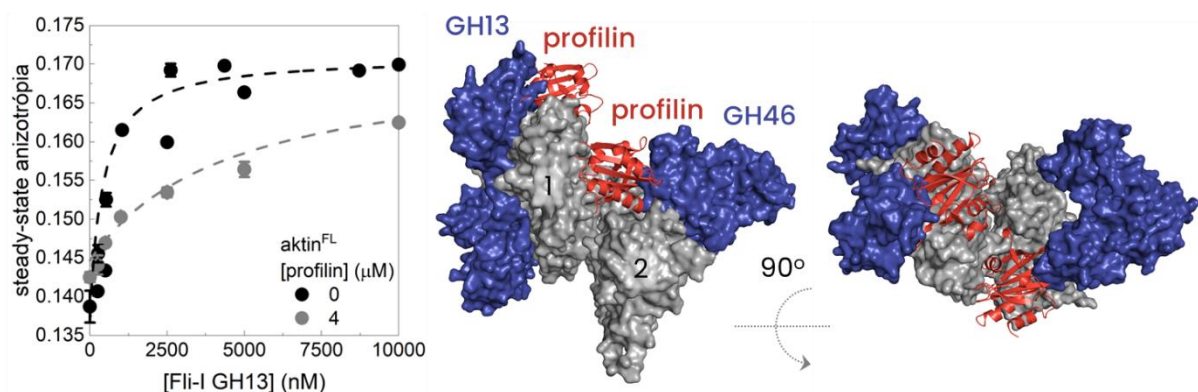


45. ábra: A profilin:G-aktin kölcsönhatás molekuláris kapcsolóként működik a Flightless-I aktivitásaiban: funkcionális következmények.

Aktin polimerizáció – bulk. A pirén tranziensek kezdeti, lineáris szakaszához illesztett egyenes meredekségéből származtatott relatív polimerizációs sebesség (v) a [Fli-I] függvényében. A szaggatott vonalak az adatok illesztését jelölik (6. egyenlet). IC₅₀(Fli-I GH16) = 0.93 ± 0.12 nM és IC₅₀(Fli-I GH13) = 0.13 ± 0.01 nM. [aktin] = 2.5 μM (2% pirén jelölt), [profilin] = 6 μM. Átlag ± SD, n = 2-7.

Aktin polimerizáció – TIRFM. Az aktin filamentumok összeszerelődésének vizsgálata, reprezentatív *dual color* TIRFM felvételek és az aktin filamentumok elongációs sebességének kvantitatív elemzése. [aktin] = 2 μ M (10% Alexa488NHS jelölt, 10% Alexa568NHS jelölt), [profilin] = 2 μ M, [Fli-I] = 10 nM. Idő = mins : s. Méretvonal = 10 μ m. n = 37-62.

A polimerizációt elősegítő hatás elmaradása arra utal, hogy a profilin gátolja a Fli-I:G-aktin kölcsönhatást. Ezt kísérletesen alátámasztják anizotrópia méréseink, amennyiben a Fli-I:G-aktin komplex affinitása szignifikánsan csökkent profilin jelenlétében ($K_D(\text{Fli-I GH13}) = 411.43 \pm 22.69$ nM (0 μ M profilin), $K_D(\text{Fli-I GH13}) = 4511.6 \pm 631.92$ nM (4 μ M profilin)) (46. ábra). A GSN GH domén:G-aktin, illetve a profilin:G-aktin röntgenkristallográfiával meghatározott szerkezete alapján a GH domén, profilin és aktin hármass komplex szerkezeti modelljét állítottuk elő (46. ábra). A modell egyértelműen jósolja a GH domének és a profilin szterikus ütközését a szimultán aktinkötés esetén, ami a profilin gátló hatásának szerkezeti magyarázatául szolgálhat.



46. ábra: A profilin:G-aktin kölcsönhatás molekuláris kapcsolóként működik a Flightless-I aktivitásaiban: szerkezeti alapok.

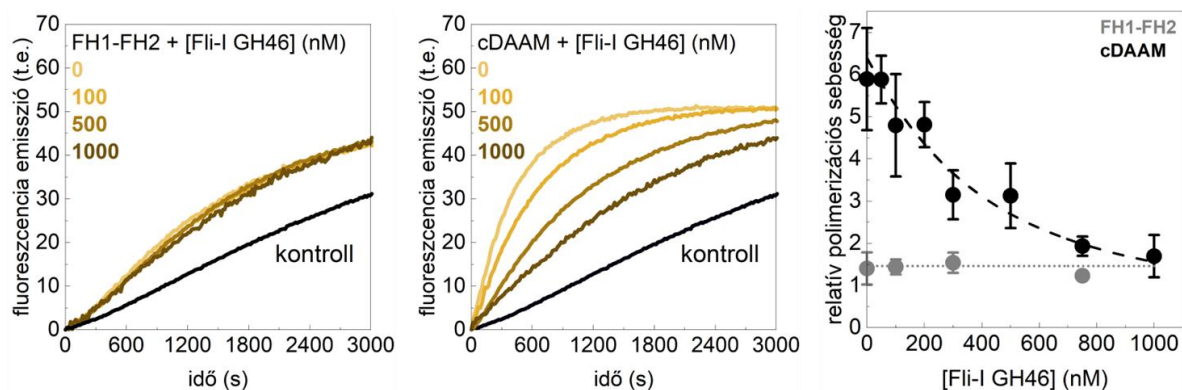
Alexa488NHS-G-aktin anizotrópiájának [Fli-I GH13]-függése profilin hiányában és jelenlétében. A szaggatott vonalak az adatok illesztését jelölik a kvadratikus kötési egyenlet alapján (*Módszerek*, 9., 10. egyenlet). $K_D(\text{Fli-I GH13}) = 411.43 \pm 22.69$ nM (0 μ M profilin), $K_D(\text{Fli-I GH13}) = 4511.6 \pm 631.92$ nM (4 μ M profilin). [Alexa488NHS-G-aktin] = 0.2 μ M, [profilin] = 4 μ M. Átlag $\pm$ SD. n = 2-3. FL: fluoreszcensen jelölt.

A profilin:GSN:aktin komplex szerkezeti modellje. A modellhez felhasznált szerkezetek: GSN GH13:G-aktin (PDB 1RGI) [180], GSN GH46:G-aktin (PDB 1H1V) [181], profilin:G-aktin (PDB 1HLU) [163]. Az aktin monomerek (szürke, 1, 2) az F-aktin Oda féle szerkezeti modell szerinti elrendezésben láthatóak [34].

A Flightless-I a DAAM aktin aktivitásainak negatív szabályozója

A Fli-I GH46 a kísérleteinkben a vizsgált koncentrációtartományon nem befolyásolta közvetlenül az aktin dinamikát. Irodalmi adatok alapján a Fli-I GH46 doménje kötődik a humán mDia1 és DAAM forminokhoz *in vitro* [196]. Ennek nyomán megvizsgáltuk a Fli-I GH46 doménjeinek a DAAM (*Drosophila*) aktin aktivitására kifejtett hatását (47. ábra). A Fli-I GH46 a DAAM FH1-FH2-t nem, a cDAAM katalizált aktin polimerizációt viszont koncentrációfüggő módon gátolta. Ez arra utal, hogy a Fli-I GH46 kötődik a DAD-CT régióhoz és ez által negatívan szabályozza az aktív DAAM aktin összeszerelődésre kifejtett hatását. A relatív polimerizációs sebesség([Fli-I GH46]) adatsor kvadratikus kötési egyenlet szerinti illesztése

(Módszerek, 9., 10. egyenlet) alapján a DAAM:Fli-I GH46 komplex disszociációs egyensúlyi állandója $K_D = 255 \pm 189$ nM-nak adódott.



47. ábra: A Flightless-I GH46 kölcsönhat a DAAM C-terminális szakaszával és negatívan befolyásolja a DAAM filamentum-összeszerelődésre kifejtett hatását.

A filamentum-összeszerelődés kinetikája. [aktin] = 2 μ M (5% pirén jelölt), [FH1-FH2] = 250 nM, [cDAAM] = 250 nM. A pirén tranziensek kezdeti, lineáris szakaszához illesztett egyenes meredekségéből származtatott relatív polimerizációs sebesség (v) a [Fli-I GH46] függvényében. A szaggatott vonal az adatok illesztését jelzi a kvadratikus kötési egyenlet szerint (Módszerek, 9., 10. egyenlet). $K_D(\text{cDAAM:Fli-I GH46}) = 255 \pm 189$ nM. Átlag $\pm$ SD, $n = 3-5$.

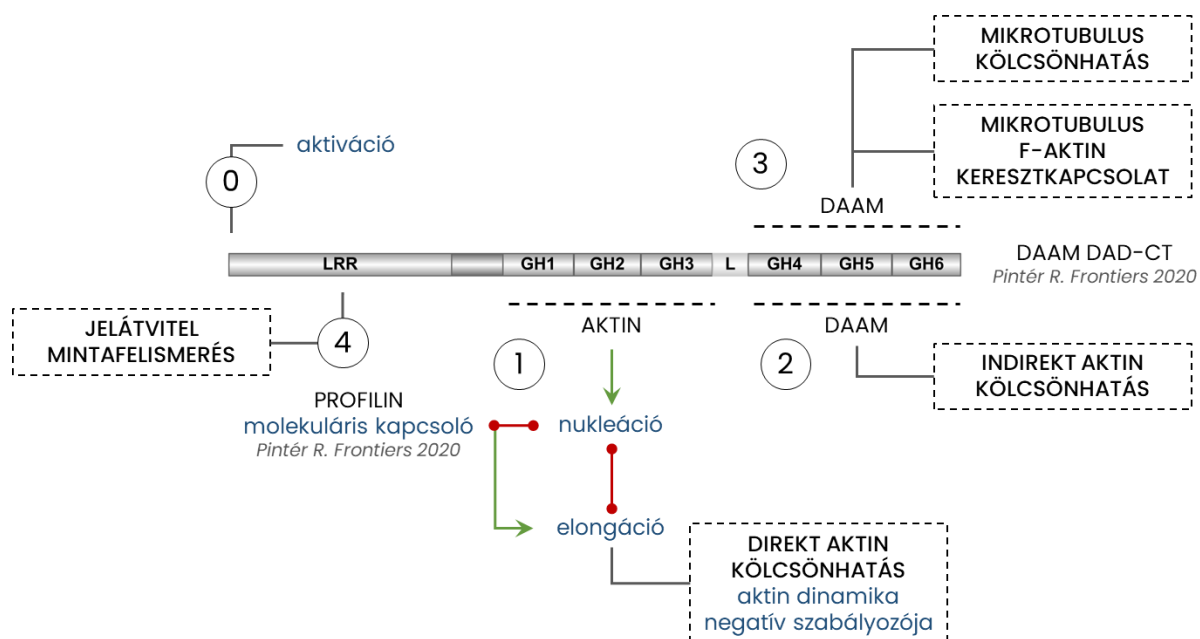
Összefoglalás

A Flightless-I biokémiai aktivitásai és biológiai funkciói közötti korreláció

A Flightless-I mely in vitro kölcsönhatásai és aktivitásai meghatározóak a biológiai környezetben?

A GSN-nal szemben a Fli-I aktin kölcsönhatása és aktivitása kalciumfüggetlen, azonban a fehérje aktivációjának molekuláris mechanizmusa egyelőre nem ismert. A kísérleti eredményeink összhangban vannak a bioinformatikai predikciókkal. A GSN kalciumszabályozásért felelős szerkezeti elemei (1. és 2. típusú kalciumkötő helyek, C-terminális *tail latch*) nem konzerváltak a Fli-I-ben (40. ábra). Ez alól kivétel a Fli-I GH6 doménjében található 2. típusú kalciumkötő hely, ami feltételezhetően köti is a fémiont. A kalciumszabályozás hiánya arra utal, hogy a Fli-I GH doménjei a GSN-tól eltérő szerkezetet vesznek fel, amelyben az aktinkötő helyek konstitutívan hozzáférhetőek⁷.

⁷ Fluoreszcencia spektroszkópián és limitált proteolízisen alapuló nem publikált vizsgálataink megerősítik ezt a hipotézisünket.



48. ábra: A Flightless-I biokémiai aktivitásai és kölcsönhatástérképe.

A Fli-I GH doménjei kölcsönhatnak az aktin monomerekkel és a filamentumokkal is, ugyan lényegesen eltérő affinitással ($K_D(\text{Fli-I:G-aktin}) \sim \mu\text{M}$, $K_D(\text{Fli-I:F-aktin}) \sim \text{nM}$). Az interakcióban a Fli-I GH13 szakasz meghatározó, sem a GH46, sem pedig az LRR esetén nem detektáltunk szignifikáns kölcsönhatást. A szekvenciaelemzés alapján a GSN:aktin kölcsönhatásért felelős régiók csak kismértékű konzerváltságot mutatnak a Fli-I-ban, legnagyobb egyezést a GH1 doménben találunk (40. ábra). A GH1 szerepét a Fli-I:aktin kölcsönhatásban alátámasztja, hogy a humán fehérje GH1 trunkálása (Fli-I GH26, pirén aktin alapú vizsgálatok [197]) vagy a GH1 domén E586K mutációja (ko-IP 293T sejt [198]) az aktin kölcsönhatás defektusát eredményezi.

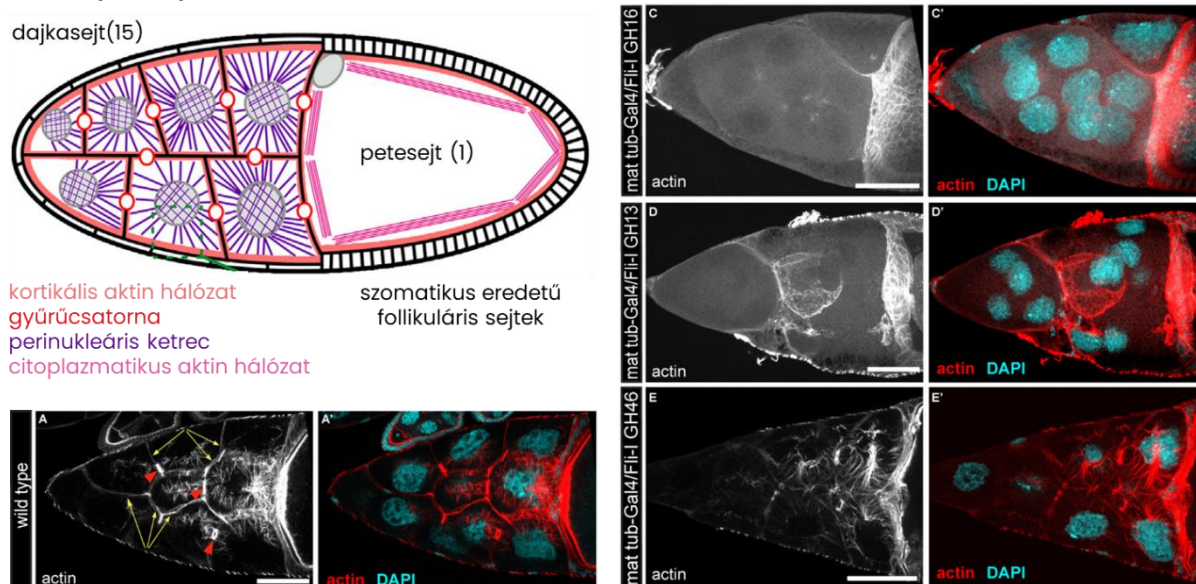
A GSN katalizálja a filamentumok fragmentációját [178]. Az aktivitás szerkezeti alapját az jelenti, hogy a GH1 és a GH4 domének a filamentum ellentétes oldalán kötődve szterikus ütközést indukálnak az alegység:alegység határfelületen. Ugyanakkor az 1. típusú kötőhely (a GH1 és GH4 doménekben) és az aktin Glu¹⁶⁷ aminosava által koordinált kalcium jelenléte is hozzájárul a fragmentáló aktivitáshoz. A GH46 aktinkötésének és az 1. típusú kalciumkötő helyek hiánya valószínűsíti, hogy a Fli-I nem képes elősegíteni a filamentum-szétszerelődést, összhangban kísérletes eredményeinkkel.

A nagy affinitású Fli-I:F-aktin kölcsönhatás funkcionális következményeként a Fli-I gátolja a filamentumok szöges vég elongációját, sapkafehérjeként működik. A kisebb affinitású Fli-I:G-aktin kölcsönhatás révén a Fli-I *de novo* nukleációs aktivitással rendelkezik. A profilin negatív hatása a Fli-I:G-aktin kölcsönhatásra, valamint a profilin és Fli-I részben átfedő kötőhelye a két fehérje kompetitív kötési módjára enged következtetni. A profilin hatása a GSN:aktin vonatkozásában nem ismert. A profilin az aktin szöges végével az S1 és S3 szubdomének közötti targetkötő barázdával alakít ki kölcsönhatást [163], hasonlóan a GSN N-terminálisához (46. ábra) [180]. Eredményeink alapján feltételezzük, hogy a Fli-I aktinkötő GH13 szakaszának kölcsönhatása is hasonló szerkezeti elvek alapján valósul meg.

A Fli-I túltermelés hatásának vizsgálata *Drosophila* fejlődő petekamrában megerősíti a Fli-I GH domének szerepével kapcsolatos *in vitro* eredményeinket (49. ábra) [194]. A Fli-I GH16 túltermelése súlyos zavart okozott a dajkasejtek aktin sejtvázában. A jellemző aktin struktúrák (kortikális aktin hálózat, gyűrűcsatorna, perinukleáris ketrec) nem voltak megfigyelhetők. A diffúz fluoreszcencia emisszió az aktin sejtváz integritásának megbomlására, a multinukleáris sejtek jelenléte pedig citoplazma-fúzióra utal. Hasonló fenotípus volt jellemző többlet Fli-I GH13 esetén, míg a GH46 túltermelésének látszólag nem volt hatása.

Összefoglalva eredményeink arra utalnak, hogy a biológiai környezetben a Fli-I fiziko-kémiai sajátosságai közül a nagy affinitású filamentumvég kötése meghatározó, ami a fehérjét szöges vég sapkázó aktivitással ruházza fel. Ez által a Fli-I a filamentum-összeszerelődés inhibitora és az aktin sejtváz dinamikájának negatív szabályozója.

Drosophila petekamra



49. ábra: A Flightless-I túltermelés hatása *Drosophila* fejlődő petekamrában.⁸

A petekamra és aktin hálózatainak szerveződését bemutató sematikus ábra. Az ábra forrása: [199]. A dajkasejtek (10B stádium) aktin sejtvázában reprezentatív konfokális mikroszkópiai felvételei vad típusú egyedekben (A, A'), illetve Fli-I túltermelés hatására (C, C': GH16, D, D': GH13, E, E': GH46). Méretvonal = 50 μm. DAPI: sejtanyag. Sárga nyilak: kortikális aktin hálózat, piros nyilak: gyűrűcsatorna. Aktin: Alexa Fluor™ 546 falloidin. Az ábra forrása: [194].

A Fli-I GH46 esetén aktin kölcsönhatást nem detektáltunk, ugyanakkor a Fli-I ezen szakasza a GH46:DAD-CT kölcsönhatáson keresztül befolyásolja a DAAM katalizált filamentum-összeszerelődést. Eredményeink összhangban vannak irodalmi adatokkal és jelzik a funkció konzerváltságát a Fli-I fehérjékben (humán és *Drosophila* [196]), ugyanakkor a konzerváltság hiányát is a GH domén fehérjecsalcában (Fli-I és GSN [196]). A Fli-I:DAAM interakció révén, a direkt szabályozás mellett a Fli-I közvetett módon is befolyásolhatja az aktin dinamikát, azonban a kölcsönhatás *in vivo* funkcionális következményei tisztázásra várnak. A DAAM C-

⁸ A vizsgálatokat együttműködő partnerünk Dr. Mihály József (HUN-REN SZBK, Szeged) és kutatócsoportja végezte el.

terminálisa meghatározó a DAAM aktiváció Rho GTPáz-függő szabályozásában [145]. Elképzelhető, hogy a Fli-I GH46 az autoinhibíciós kölcsönhatás kompetítoraként elősegíti a DAAM aktiválását [196]. A DAD-CT az aktív FH1-FH2 aktin aktivitásainak pozitív szabályozója, így a Fli-I GH46 a DAAM aktin dinamikára kifejtett hatását negatív módon is befolyásolhatja [99]. Tekintettel arra hogy a DAD-CT a DAAM:mikrotubulus kölcsönhatásban is meghatározó [171] a Fli-I:DAAM kölcsönhatás szerepet játszhat a mikrotubulus sejtváza működésében és/vagy az aktin:mikrotubulus sejtváza funkcionális koordinációjában.

Tudományos szempontból új eredmények

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

1. A Fli-I aktin kölcsönhatása és aktivitásai kalciumfüggetlenek.
2. A Fli-I kölcsönhat az aktin monomerekkel ($K_D \sim \mu M$) és a filamentumokkal ($K_D \sim nM$).
3. A Fli-I aktin kölcsönhatásai révén elősegíti a filamentumok *de novo* nukleációját, ugyanakkor sapkafehérjeként gátolja azok elongációját (*capping*). A Fli-I a gelsolinnal szemben nem rendelkezik fragmentáló (*severing*) aktivitással.
4. A Fli-I aktin kölcsönhatásában és aktivitásaiban meghatározó a GH13 szakasza.
5. A profilin molekuláris kapcsolóként működik a Fli-I aktin aktivitásainak szabályozásában.
6. A Fli-I GH46 direkt kölcsönhatást alakít ki a DAAM C-terminálisával (DAD-CT), ez által a DAAM FH1-FH2 katalizált aktin összeszerelődés szabályozója.

Kapcsolódó publikációk, az eredmények közlési helyének megadása

Vemula Venukumar, Huber Tamás, Ušaj Marko, **#Bugyi Beáta** ✉, #Mansson Alf ✉
 Myosin and gelsolin cooperate in actin filament severing and actomyosin motor activity.
 JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 296 Paper: 100181 , 16 p. (2021)
 IF: 5.485 Folyóiratcikk (Szakcikk) Tudományos
 Független idéző: 7 Függő idéző: 3 Összesen: 10
[# megosztott levelező/utolsó szerzős közlemény](#)

Pintér Réka, Huber Tamás, Bukovics Péter, Gaszler Péter, Vig Andrea Teréz, Tóth Mónika Ágnes, Gázsó-Gerhát Gabriella, Farkas Dávid, Migh Ede, Mihály József, **Bugyi Beáta** ✉
 The activities of the gelsolin homology domains of Flightless-I in actin dynamics.
 FRONTIERS IN MOLECULAR BIOSCIENCES 7 Paper: 575077 , 18 p. (2020)
 IF: 5.246 Folyóiratcikk (Szakcikk) Tudományos
 Független idéző: 2 Függő idéző: 1 Összesen: 3

4. Módszerek

Fehérjék előállítása és módosítása

A fehérjéket szövetből, illetve rekombináns úton (*E.coli* bakteriális rendszer) állítottuk elő. A fehérjék nagy számára való tekintettel az előállításukra vonatkozó protokollok részletes bemutatásától eltekintek, az azokra vonatkozó hivatkozásokat az 14. táblázat tartalmazza. A tubulint kereskedelmi forgalomból szereztük be ([Cytoskeleton Inc.](#)). A taxol-stabilizált mikrotubulusokat jelöletlen/HiLyte Fluor™ 488 jelölt tubulinból polimerizáltuk a gyártó protokollja szerint.

<i>fehérje</i>	<i>eredet</i>	<i>előállítás</i>	<i>hivatkozás</i>
aktin	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	szövet vázizom	[200]
ADF	<i>Homo sapiens</i>	<i>E. coli</i> BL21 pET-16b	[201]
Arp2/3 komplex	<i>Bos taurus</i>	szövet agy	[202]
DAAM	<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>E. coli</i> BL21 pGEX-2T	[99]
Flightless-I	<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>E. coli</i> BL21 pGEX-6P-1	[194]
gelsolin	<i>Homo sapiens</i>	<i>E. coli</i> BL21 pET-21d	[178]
miozin II	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	szövet vázizom	[203]
N-WASP	<i>Homo sapiens</i>	High Five Sf9 pFastBac™HT B	[202]
profilin-1 (profilin)	<i>Mus musculus</i>	<i>E. coli</i> BL21 pET-16b	[201]
SALS	<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>E. coli</i> BL21 pGEX-2T	[204]
tropomiozin, vázizom, skTpm	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	szöveti vázizom	[205]
tropomiozin, TpmBr3	<i>Mus musculus</i>	<i>E. coli</i> BL21 pET-28a	[193]
tropomiozin, Tpm5NM1	<i>Mus musculus</i>	<i>E. coli</i> BL21 pET-28a	[193]
tubulin	<i>Bos taurus</i>	szövet agy	Cytoskeleton Inc.

14. táblázat: A vizsgált fehérjék.

A fluoreszcencia spektroszkópai és mikroszkópai vizsgálatokhoz a fehérjék fluoreszcens jelölését végeztük el tiol (pl. jódiacetamid; IAEDANS, pirén, Alexa Fluor™ C₅ 488 vagy 568 maleimid) és amin (Alexa Fluor™ 488 vagy 568 NHS észter, 5(6)-TAMRA) reaktív jelzővegyületekkel (15. táblázat). A fluoreszcens jelölő hozzájárulását a fehérje 280 nm-en

mért abszorbanciájához ($A_{280\text{ nm, mért}}$) a fluorofór abszorpciós maximumához tartozó fényelnyelést ($A_{\lambda_{\text{max}}}$) figyelembe véve az alábbi összefüggés alapján korrigáltuk:

$$A_{280\text{ nm, korrigált}} = A_{280\text{ nm, mért}} - KF_{280\text{ nm}} \times A_{\lambda_{\text{max}}} \quad (7)$$

7. egyenlet

$A_{280\text{ nm, mért}}$: a fehérje 280 nm-en mért abszorbanciája

$A_{\lambda_{\text{max}}}$: a fluorofór abszorpciós maximumához tartozó abszorbancia

KF: korrekciós faktor

<i>fluorofór</i>	<i>MW</i> (Da)	λ_{max} (nm)	ε_{max} ($M^{-1} \times \text{cm}^{-1}$)	<i>korrekciós faktor</i> $KF_{280\text{ nm}}$
IAEDANS	434	336	6 100	0.21
pirén	297	344	22 000	0.127
Alexa488NHS	643	495	71 000	0.11
Alexa568NHS	792	578	91 300	0.46
Alexa488M	721	493	72 000	0.11
Alexa568M	881	577	91 300	0.46
TAMRA	468	555	65 000	0.03

15. táblázat: A fluoreszcencia spektroszkópiai és mikroszkópiai kísérletekben alkalmazott fluorofórok.

Az adatok forrása: www.thermofischer.com.

IAEDANS: jódacetaminoetil-1-naftilamin-5-szulfonsav, pirén: N-(1-pirén)-jódacetamid, AlexaNHS: Alexa Fluor™ karboxilsav szukcinimidil észter, AlexaM: Alexa Fluor™ C5 maleimid, TAMRA: 5-karboxitetrametilrodamin

Általános kísérleti körülmények

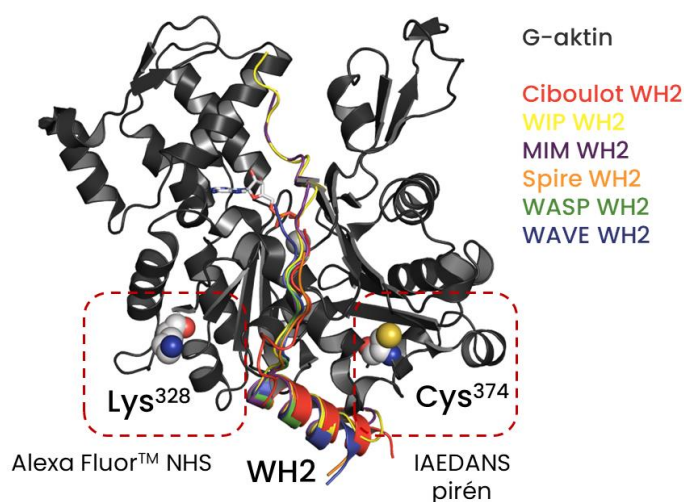
Az értekezésben megadott koncentrációk a végkoncentrációnak felelnek meg. A G-aktin tárolása Ca^{2+} -ATP-G formában G pufferben történt (4 mM Tris-HCl pH7.8, 0.1 mM CaCl_2 , 0.2 mM ATP, 0.005% NaN_3 , 0.5 mM β -merkaptotanol (BME)) jégen. A méréseket Mg^{2+} és ATP kötött aktinon végeztük (Mg-ATP-aktin). Az aktin monomer által kötött kalciumot 50 μM MgCl_2 és 200 μM EGTA hozzáadásával cseréltük magnéziumra (~ 5 min, szobahő). Az aktin polimerizációját 50 mM KCl és 1 mM MgCl_2 hozzáadásával indukáltuk (F puffer: G puffer + 50 mM KCl és 1 mM MgCl_2). A koncentrációfüggést vizsgáló mérésekben az egyes koncentrációkhoz külön mintákat készítettünk. Az állandó pufferkörülmeny biztosítása érdekében a mintákban a vizsgált fehérjék tárolópufferének és a fehérjét tartalmazó oldat térfogatának az összege állandó volt.

Fluoreszcencia spektroszkópiai vizsgálatok

Fluoreszcencia emisszió és anizotrópia vizsgálatok

Az aktin és aktinkötő fehérjék kölcsönhatásának fluoreszcencia spektroszkópiai vizsgálatára elterjedt jelzővegyületek a tiol reaktív jelölők (pl. jódacetamid; IAEDANS, pirén, Alexa

FluorTM C₅ 488 és 568 maleimid) [66, 67]. A tiol specifikus reagensek segítségével a fehérjék elérhető helyen lévő/felszíni cisztein aminosavainak jelölése gyorsan és szelektíven elvégezhető. Az aktin esetében ez a Cys³⁷⁴ aminosav, ami a szögcs végen a targetkötő barázda szomszédságában található (50. ábra). A TIRFM térhódításával az aktin jelölésére az amin reaktív jelzővegyületek is elterjedté váltak (pl. aktív észter; Alexa FluorTM 488 és 568 NHS észter, 5(6)-TAMRA) [206]. Az alkalmazásukat elsősorban a műszeres infrastruktúra elvárásai tették szükségessé, ugyanakkor fotofizikai tulajdonságaik is kedvezőek (pl. kvantumhatásfok, fotostabilitás). Az amin specifikus reagensek a hozzáférhető lizin aminosavak oldalláncainak nem-specifikus jelölését teszik lehetővé.



50. ábra: A Cys³⁷⁴ és Lys³²⁸ aminosavak és a WH2 domén relatív pozíciója a WH2:G-aktin komplexben. Ciboulot (PDB 1SQK [207]), WIP (WASP-interacting protein, PDB 2A41 [161]), MIM (Missing in metastasis, PDB 2D1K [208]), Spire (PDB 3MN7 [209]), WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein, PDB 2A3Z [161]), WAVE (WASP-family verprolin homologous protein, PDB 2A40 [161]). Az ábra az alábbi publikációk nyomán készült: [79, 157].

Fluoreszcencia spektroszkópai módszer validálása a G-aktin kölcsönhatás vizsgálatára

Az aktinkötő fehérjék aktin monomerekkel kialakított kölcsönhatását *steady-state* fluoreszcencia emisszió és anizotrópia vizsgálatokban jellemeztük fluoreszcensen jelölt G-aktin alkalmazásával (IAEDANS, Alexa488NHS). Az alkalmazott kísérleti körülmények (pl. ionok jelenléte, aktinkötő fehérjék aktivitásai) a monomer-filamentum átalakulást katalizálhatják, ami a jelölő spektrális jellemzőinek változását eredményezheti (pl. emissziós sajátságok változása, anizotrópia növekedése). A polimerizáció gátlása érdekében a G-aktint Latrunculin A (LatA)-val kezeltük (G puffer, 4°C, 30 min) az aktinkötő fehérjék és más mintaösszetevők hozzáadása előtt. A LatA a polimerizáció inhibitora, a G-aktint szekvesztrálja egy 1:1 sztöchiometriájú, viszonylag nagy affinitású komplexben ($K_D = 0.2 \mu M$) [210]. A LatA koncentrációját úgy állítottuk be, hogy a szabad, LatA által nem kötött G-aktin mennyisége a szögcs vég kritikus koncentrációja ($c_c(+)$ ~ 100 nM) alatt legyen. A méréseket Horiba Jobin Yvon spektrofluoriméteren végeztük (IAEDANS: $\lambda_{ex} = 350$ nm, $\lambda_{em} = 460$ nm, Alexa488NHS:

$\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 516 \text{ nm}$). Az elnyelési spektrumok jellemzőit: az intenzitás maximális értékét (maximum intenzitás, I) és a maximális emisszióhoz tartozó hullámhosszat (maximum hullámhossz, λ_{max}) határoztuk meg. Az anizotrópia (r) vertikálisan polarizált gerjesztő fény (I_V) alkalmazása mellett az emisszió vertikálisan (I_{VV}) és horizontálisan (I_{VH}) polarizált komponenseiből került meghatározásra (8. egyenlet).

$$r = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} - 2GI_{VH}} \quad (8)$$

8. egyenlet: steady-state anizotrópia

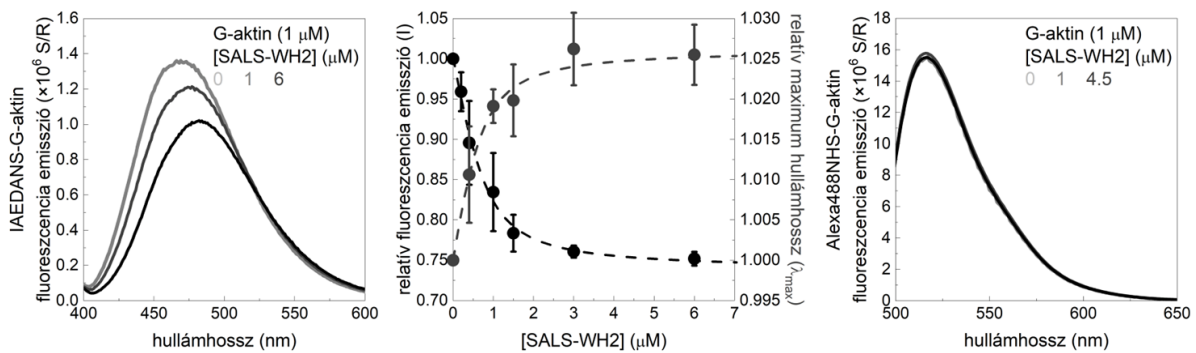
r : steady-state anizotrópia

I_{VV} : vertikálisan polarizált gerjesztő fény alkalmazása mellett az emisszió vertikálisan polarizált komponense

I_{VH} : vertikálisan polarizált gerjesztő fény alkalmazása mellett az emisszió horizontálisan polarizált komponense

$G = I_{HV}/I_{HH}$: a detektor vertikálisan és horizontálisan polarizált fényre való eltérő érzékenysége

Munkánk első fázisában megvizsgáltuk az IAEDANS és az Alexa Fluor™ NHS jelölők alkalmazhatóságát a fluoreszcencia spektroszkópai kísérletekben és validáltuk a vonatkozó módszert. Ennek során a SALS (*sarcomere length short*) fehérje két WH2 doménjét tartalmazó fragmentumának (SALS-WH2) G-aktin kölcsönhatását vizsgáltuk [162]. A SALS-WH2 jelenlétében az IAEDANS-G-aktin intenzitásmaximumának csökkenését és a maximum hullámhossz növekedését tapasztaltuk (51. ábra). A fluorofór spektrális sajátságainak változása arra utal, hogy a SALS-WH2 kölcsönhat az aktin monomerekkel. Ugyanakkor az Alexa488NHS-G-aktin emissziójára a SALS-WH2 nem volt hatással (51. ábra).



51. ábra: IAEDANS-G-aktin és Alexa488NHS-G-aktin fluoreszcencia emissziójának sajátságai SALS-WH2 hiányában és jelenlétében.

[IAEDANS-G-aktin] = 1 μM, [Alexa488NHS-G-aktin] = 1 μM, [LatA] = 4 μM.

Az IAEDANS-G-aktin és Alexa488NHS-G-aktin emissziós spektrumai. Az IAEDANS-G-aktin relatív fluoreszcencia emisszió (I , a spektrum integrálja 400 – 600 nm között) és maximum hullámhossz (λ_{max}) értékei a [SALS-WH2] függvényében. A szaggatott vonalak az illesztett függvényeket jelzik (9., 10. egyenlet). Átlag ± SD, $n = 2-3$.

Disszociációs egyensúlyi állandó

I ([SALS-WH2]) adatsor, (9. egyenlet): $K_D = 0.24 \pm 0.1 \text{ μM}$

λ_{max} ([SALS-WH2]) adatsor, (9. egyenlet): $K_D = 0.22 \pm 0.20 \text{ μM}$

A kvantitatív elemzés során a detektált spektroszkópai paraméter értékeit (Y: maximum intenzitás, maximum hullámhossz, anizotrópia) az aktinkötő fehérje koncentrációjának függvényében ábrázoltuk. Ennek illesztéséből az aktinkötő fehérje kötött hányada az alábbi összefüggéssel határozható meg:

$$\frac{Y - Y_{min}}{Y_{max} - Y_{min}} = \frac{[AP]}{[A_0]} \quad (9)$$

9. egyenlet

Y: a detektált spektroszkópai paraméter egy tetszőleges aktinkötő fehérje koncentráción (maximum emisszió, maximum hullámhossz, anizotrópia)

Y_{min} : a detektált spektroszkópai paraméter aktinkötő fehérje hiányában mért értéke

Y_{max} : a detektált spektroszkópai paraméter aktinkötő fehérje telítési koncentrációjának megfelelő értéke

$[A_0]$: az aktin koncentrációja

$[AP]$: az aktinkötő fehérje:aktin komplex koncentrációja

Az aktinkötő fehérje:G-aktin komplex disszociációs egyensúlyi állandója (K_D) a kölcsönhatás természetét figyelembe vevő kötési modell alapján származtatható. Bimolekuláris, 1:1 sztöchiometriájú, nem-kooperatív kölcsönhatást feltételezve a K_D a kvadratikus kötési egyenlet alapján számolható (10. egyenlet).

$$[AP] = \frac{[A_0] + [P_0] + K_D - \sqrt{([A_0] + [P_0] + K_D)^2 - 4[A_0][P_0]}}{2} \quad (10)$$

10. egyenlet: kvadratikus kötési egyenlet

$[A_0]$: az aktin koncentrációja

$[P_0]$: az aktinkötő fehérje koncentrációja

$[AP]$: az aktinkötő fehérje:aktin komplex koncentrációja

K_D : az aktinkötő fehérje:aktin komplex disszociációs egyensúlyi állandója

Az IAEDANS az aktin Cys³⁷⁴-es aminosavához kapcsolódik (50. ábra). Az Alexa488NHS pozíciója nem volt ismert az irodalomban. Tömegspektrometriai elemzésünk a jelölő kötőhelyeként az aktin Lys³²⁸-as aminosavát azonosította (50. ábra) [162]⁹. Az aminosavak pozícióját a WH2 domén:G-aktin komplex röntgenkristallográfiás szerkezetével összevetve egyértelmű, hogy a Cys³⁷⁴ aminosav a WH2 kötőhelyével átfedésben, míg a Lys³²⁸ attól távolabb helyezkedik el (50. ábra). A fluoreszcencia spektroszkópai megfigyeléseink valószínű magyarázata az, hogy a SALS-WH2 G-aktinhoz való kötődése az IAEDANS lokális környezetét igen, míg az Alexa488NHS körüli fehérjeszegmenst közvetlenül nem befolyásolja. A SALS-WH2:G-aktin kölcsönhatást *steady-state* fluoreszcencia anizotrópia kísérletekben is vizsgáltuk. Mindkét fluorofór esetén az anizotrópia $[SALS-WH2]$ koncentrációfüggő növekedését tapasztaltunk, ami a SALS-WH2:G-aktin komplex létrejöttére utal (52., 53. ábra). Az anizotrópia($[SALS-WH2]$) adatsor kvantitatív elemzésekor az alábbi megfontolásokat tettük. A 9. egyenlet szerinti összefüggés abban az esetben alkalmazható, ha a spektroszkópai jel lineáris válaszfüggvény, azaz előáll az egyes komponensek (n) koncentrációjával (c_i)

⁹ További tömegspektrometriai vizsgálataink szerint az Alexa Fluor™ 488 NHS észter mellett az 568 és 647 jelölők is az aktin Lys³²⁸ aminosavához kötnek.

súlyozott moláris spektroszkópai karakterisztikájának (y_i) lineáris kombinációjaként ($Y = \sum_{i=1}^n c_i y_i$) [211, 212]. Egy adott hullámhosszhoz tartozó intenzitás lineáris válaszfüggvény, a maximum hullámhossz és az anizotrópia azonban általában nem [211, 213]. Az anizotrópia esetén a linearitás akkor teljesül, ha az intenzitásban bekövetkező változásokat is figyelembe vesszük [211]. Az anizotrópia additív tulajdonsága miatt egy keverék anizotrópiája (r) az alkotók (n) anizotrópiájának (r_i) moláris fluoreszcencia intenzitásokkal (f_i) súlyozott összegeként adható meg ($r = \sum_{i=1}^n f_i r_i$) [214, 215]. A fenti megfontolások alapján a K_D meghatározását célzó anizotrópia méréseinkben az Alexa488NHS jelölő esetén az adatokat a 9. egyenlettel illesztettük. Az IAEDANS jelölő esetén mért adatok kvantitatív analízisét pedig a szabad és a SALS-WH2 kötött IAEDANS-G-aktin eltérő intenzitását figyelembe véve az alábbi összefüggés alapján végeztük el:

$$\frac{(r_A - r)I_{max}}{(r_A - r)I_{max} + (r - r_{AP})I_{min}} = \frac{[AP]}{[A_0]} \quad (11)$$

11. egyenlet

r : *steady-state* anizotrópia

r_A : az aktinkötő fehérje hiányának megfelelő anizotrópia

r_{AP} : az aktinkötő fehérje telítési koncentrációjának megfelelő anizotrópia

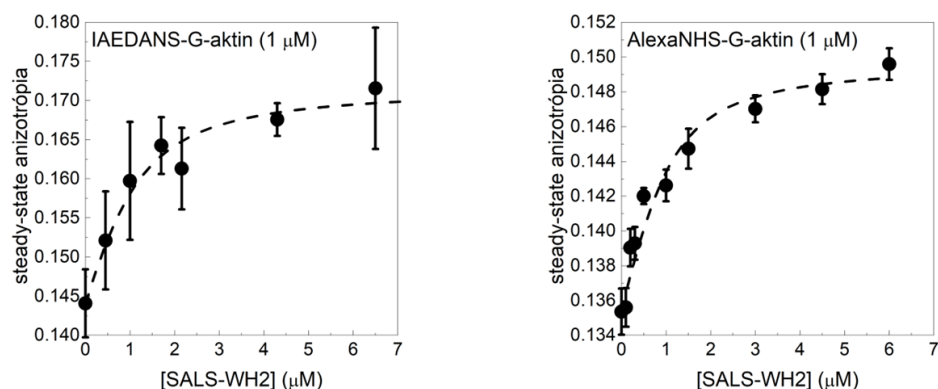
I_{max} : az aktinkötő fehérje hiányának megfelelő intenzitás

I_{min} : az aktinkötő fehérje telítési koncentrációjának megfelelő intenzitás

$[A_0]$: az aktin koncentrációja

$[AP]$: az aktinkötő fehérje:aktin komplex koncentrációja

A sztöchiometria meghatározására irányuló mérésekben a G-aktin koncentrációját úgy választottuk meg, hogy az jóval ($[G\text{-aktin}] = 20 \mu\text{M} > 10 \times K_D$) meghaladja a SALS-WH2:G-aktin komplex disszociációs egyensúlyi állandóját ($K_D \sim 0.2\text{-}0.3 \mu\text{M}$) (53. ábra) [146]. A titrálás során kapott anizotrópia($[SALS\text{-}WH2]$) adatsor nem kvadratikussal, inkább lineáris, töréspont felé hajló tendenciát követett. A törésponthoz tartozó $[SALS\text{-}WH2]$ alapján a SALS-WH2:G-aktin arány IAEDANS jelölő esetén 1:1-nek, míg Alexa488NHS jelölő esetén 1:2-nek adódott. A titrálási tartományban végzett méréseink, összhangban a fluorofórok spektrális sajátosságain alapuló következtetéseinkkel arra utalnak, hogy a fluorofór helyzete befolyásolja a SALS-WH2:G-aktin kölcsönhatást. A Cys³⁷⁴-hez kapcsolt IAEDANS szterikusan gátolhatja a SALS-WH2 G-aktin kötését, míg a Lys³²⁸-hoz kapcsolt Alexa488NHS a WH2 kötőhelyétől távolabb azt nem befolyásolja. Mindezek alapján arra következtettünk, hogy a SALS mindkét WH2 doménje képes egy-egy monomerrel kölcsönhatást kialakítani.



52. ábra: IAEDANS-G-aktin és Alexa488NHS-G-aktin *steady-state* anizotrópiája SALS-WH2 hiányában és jelenlétében.

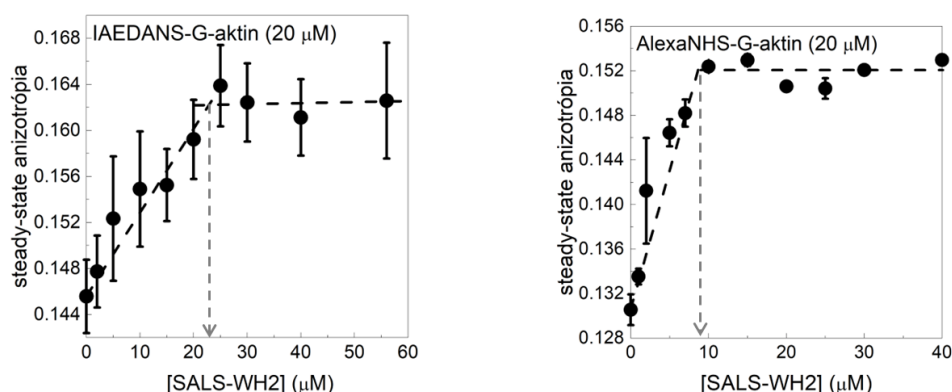
Kötési tartomány, [G-aktin] = 1 μM ~ K_D

[IAEDANS-G-aktin] = 1 μM, [Alexa488NHS-G-aktin] = 1 μM, [LatA] = 4 μM. A szaggatott vonalak az adatok illesztését jelzik (9., 11. egyenlet). Átlag ± SD, n = 2-3.

Disszociációs egyensúlyi állandó

IAEDANS-G-aktin (11. egyenlet): $K_D = 0.33 \pm 0.00 \mu\text{M}$

AlexaNHS488-G-aktin (9. egyenlet): $K_D = 0.34 \pm 0.21 \mu\text{M}$



53. ábra: IAEDANS-G-aktin és Alexa488NHS-G-aktin *steady-state* anizotrópiája SALS-WH2 hiányában és jelenlétében.

Titrlási tartomány, [G-aktin] = 20 μM >> K_D

[IAEDANS-G-aktin] = 20 μM, [Alexa488NHS-G-aktin] = 20 μM, [LatA] = 20 μM. A sztöchiometriai mérésekben az adatokra két egyenes illeszthető, az ezek által meghatározott töréspont a SALS-WH2:G-aktin molarányról ad információt. A töréspont értéke függött az alkalmazott fluorofórtól. Átlag ± SD, n = 2-3.

Sztöchiometria

SALS-WH2:IAEDANS-G-aktin ~ 20:20

SALS-WH2:Alexa488NHS-G-aktin ~ 10:20

kísérleti összeállítás fluoreszcens jelzővegyület mért paraméter	K_D (átlag ± SD)	SALS-WH2:G-aktin sztöchiometria
IAEDANS-G-aktin maximum intenzitás ([SALS-WH2])	$0.24 \pm 0.12 \mu\text{M}$ (9. egyenlet)	nm
IAEDANS-G-aktin maximum hullámhossz([SALS-WH2])	$0.22 \pm 0.20 \mu\text{M}$ (9. egyenlet)	nm
IAEDANS-G-aktin	$0.33 \pm 0.00 \mu\text{M}$	1:1

<i>anizotrópia</i> ([SALS-WH2])	(11. egyenlet)	
Alexa488NHS-G-aktin <i>anizotrópia</i> ([SALS-WH2])	0.34 ± 0.21 μM (9. egyenlet)	1:2

16. táblázat: A SALS-WH2:G-aktin kölcsönhatást jellemző disszociációs egyensúlyi állandó és sztöchiometria.

nm: nem meghatározott

A fenti tanulmány validálja az Alexa488NHS-G-aktin alkalmazhatóságát a fluoreszcencia spektroszkópiai kísérletekben. Megjegyzendő, hogy a Cys³⁷⁴ az aktin molekula targetkötő hasadéknál az asszociált fehérjék (pl. WH2, profilin, gelsolin, D vitamin kötő fehérje, aktin) jellemző kötőhelyének közvetlen közelében helyezkedik el (2., 50. ábra) [12, 51]. A tiol reaktív jelzővegyületekkel szemben tehát az Alexa FluorTM NHS észter előnyösebb pozíciója (Lys³²⁸) és fotofizikai sajátságai (kvantumhatásfok) miatt is egyértelmű előnyöket kínál. A munkánk során a G-aktin kölcsönhatás vizsgálatát célzó fluoreszcencia spektroszkópiai vizsgálatokat Alexa488NHS-G-aktin alkalmazásával a fentiekben bemutatott megfontolások szerint végeztük el.

Kinetikai vizsgálatok

Az aktin filamentumok össze-, és szétszerelődését jellemző kinetikai és egyensúlyi paramétereket *bulk* polimer sokaságon fluoreszcencia spektroszkópiai vizsgálatokban pirén jelölt aktin alkalmazásával írtuk le. A pirén az aktin molekula Cys³⁷⁴-es aminosavához kapcsolódik (50. ábra). A fluorofór sajátsága, hogy fluoreszcencia intenzitása az aktin G formájában alacsony, míg a jelölt monomerek filamentumba épülésével azok mennyiségével arányosan növekszik, ami lehetőséget ad az aktin dinamika kinetikai és egyensúlyi jellemzésére [216, 217]. A pirén jelölt F-aktin krio-elektronmikroszkópiával meghatározott szerkezete (felbontás (Mg²⁺-ADP.Pi-F-aktin) = 3.0 Å, felbontás (Mg²⁺-ADP-F-aktin) = 3.2 Å) alapján az intenzitás/kvantumhatékonyság növekedését a fluorofór oldószer számára való kitettségének markáns csökkenése eredményezi (oldószer által hozzáférhető felszín: G-aktin ~ 99.5 Å², F-aktin ~ 0.1-6.2 Å²) [38]. 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. Érdemes ugyanakkor megjegyezni, hogy bizonyos aktinkötő fehérjék (pl. profilin, miozin, ADF/cofilin, Leiomodin) hatással lehetnek a pirén emisszióra [38, 218, 219]. A méréseket Safas Xenius FLX, illetve Horiba Jobin Yvon spektrofluoriméteren végeztük (λ_{ex} = 365 nm, λ_{em} = 407 nm).

Az aktin filamentumok összeszerelődésének kinetikai vizsgálata

A G-aktin (2.5 μM, 2-5% pirén jelölt) polimerizációját 1 mM MgCl₂ és 50 mM KCl hozzáadásával indukáltuk. A filamentumok összeszerelődésének kinetikáját a pirén fluoreszcencia emissziójának időbeli növekedésén keresztül követtük nyomon. A kvantitatív elemzés érdekében a polimerizáció/összeszerelődés sebességét (v) a pirén tranziens kezdeti/lineáris szakaszára illesztett egyenes meredeksége alapján határoztuk meg. Az

egyszerűbb összehasonlíthatóság érdekében bizonyos vizsgálatok során a relatív polimerizációs sebességet határoztuk meg. Megjegyzendő, hogy a polimerizáció sebesség, mint *bulk* kinetikai paraméter magában foglalja a nukleáció és az elongáció hatékonyságát is.

Az aktin filamentumok szétszerelődésének kinetikai vizsgálata

A G-aktint (1 μ M, 50% pirén jelölt) polimerizáltuk (1 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl) éjszakán át. A filamentumokat F pufferben a szöges végek kritikus koncentrációja alá (20 nM-ra) hígítottuk. A filamentumok szétszerelődés kinetikáját a pirén fluoreszcencia emissziójának időbeli csökkenésén keresztül követtük nyomon. A relatív fluoreszcencia emissziót a görbék 1-re normálásával származtattuk (a $t = 0$ s időpillanatban mért emisszió értékével). A depolimerizáció/szétszerelődés sebességét (v) a pirén tranziens kezdeti, lineáris szakaszára illesztett egyenes meredeksége alapján határoztuk meg. Az egyszerűbb összehasonlíthatóság érdekében a vizsgálatok során a relatív polimerizációs sebességet határoztuk meg, mint az aktinkötő fehérje jelenlétében és hiányában mért sebesség hányadosa.

Fénymikroszkópiai vizsgálatok

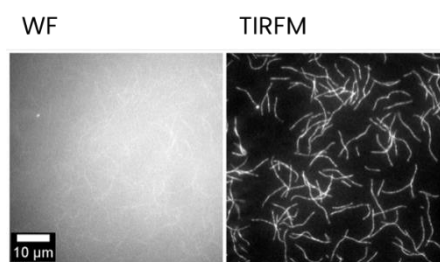
Biomimetikus modellrendszerekkel történt vizsgálatok

A biomimetikus modellrendszer alkalmazásán alapuló kísérletekben karboxilált polisztrén mikrogöngyök ($\varnothing$ 2 μ m, 2.5% w/v, Polysciences) felszínét funkcionizáltam az Arp2/3 komplex aktivátorával (N-WASP), illetve forminokkal (mDia1, DAAM) Xb pufferben (10 mM HEPES, pH7.8, 100 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 0.1 mM $CaCl_2$, 1 mM ATP) 1 h-n át 4°C-on. A szabad göngyfelszínt blokkoltam (100 mg/ml marha szérumból albumin (*bovine serum albumin* (BSA)) Xb pufferben oldva, 15 min, 4°C). A göngyöket a nem kötött fehérjétől centrifugálással választottam el (Beckman Microfuge 22R, 21 920 g, 4°C, 5 min). A funkcionizált mikrogöngyöket 1 mg/ml BSA-t tartalmazó Xb pufferben tároltam jégén. A minta F-aktint (7 μ M, 10% TAMRA jelölt), különböző aktinkötő fehérjéket (ADF/cofilin, profilin, gelsolin, Arp2/3 komplex, tropomiozin) tartalmazott Xb* pufferben (Xb puffer + 5 mg/ml BSA, 0.2% metilcellulóz (w/v) (M-0512, Sigma-Aldrich), 6.6 mM DTT, 0.15 mM 1,4-diazabicyclo-[2,2,2]oktán (DABCO), 2 mM ATP, 4 mM $MgCl_2$). A göngyök mennyisége a mintában 0.01% (v/v) volt. A göngyök és az általuk létrehozott aktin hálózat sajátságait (göngymozgás sebessége, aktin hálózat szerkezete és molekuláris összetétele) fázis-kontraszt és epifluoreszcens képalkotással vizsgáltam (Olympus AX70, 20 $\times$ NA0.5, 60 $\times$ NA1.45, OrcaII ERG Hamamatsu CCD kamera). A göngyök nyomonkövetését és a sebességük meghatározását a *Metamorph 6.0* (Universal Imaging) program *Object Tracking* funkciójával végeztem. A göngymozgás sebességének az átlaga 8-30 véletlenszerűen választott göngy sebességéből került kiszámításra. Az aktin hálózat molekuláris összetételének meghatározására fluoreszcensen jelölt fehérjék (Alexa488NHS-aktin, TAMRA-aktin, Alexa488M-Arp2/3 komplex, Alexa568M-skTpm) fluoreszcencia emisszióját

határoztam meg az aktin hálózat hosszanti tengelye mentén a *Fiji*¹⁰ *Linescan plugin* segítségével.

Teljes belső visszaverődésen alapuló fluoreszcencia mikroszkópiai (TIRFM) vizsgálatok

Az aktin filamentumok szerveződési folyamatait (*de novo* nukleáció és szekvenciális alegység beépülés (elongáció), szétszerelődés, vég-vég kapcsolódás (*annealing*)) valós időben egyedi aktin filamentumok vizualizációjával TIRF mikroszkópia módszerével vizsgáltuk (54-57. ábra) [220, 221]. A TIRFM kísérletekben ~ 50 µl térfogatú áramlási cellák (18 × 18 mm és 24 × 60 mm; N#1.5) üvegfelszínét egyszeres térfogatnyi N-etilmaleimid (NEM) miozin II-vel inkubáltuk, majd kétszeres térfogatnyi miozin pufferrel (F puffer + 0.5 M KCl) és kétszeres térfogatnyi 0.1% (w/v) BSA-val (F pufferben oldva) mostuk. Végezetül kétszeres térfogatnyi TIRFM pufferrel (F puffer + 0.5% metilcellulóz, 10% BSA, 1 mM 1,4-diazabiciklo-[2,2,2]oktán (DABCO), 100 mM DTT) ekvibráltuk. A képalkotáshoz lézer alapú TIRFM rendszerrel felszerelt invertált mikroszkópot használtunk (Olympus IX81, ApoTIRFM 60× NA1.45, Hamamatsu CCD kamera, $\lambda = 491$ nm, $\lambda = 568$ nm). A képeket és *time-lapse* felvételeket a *Fiji* programmal értékeltük ki.



54. ábra: Egyedi aktin filamentumok megfigyelése széleslátóterű (WF) és TIRF mikroszkópiával (TIRFM).

Az aktin filamentumok de novo nukleációjának és elongációjának vizsgálata

A filamentumok összeszerelődésének (nukleáció/elongáció) vizsgálatára irányuló kísérleteinkben G-aktin ($[A_0] = 0.5$ µM vagy $[A_0] = 1.2$ µM, 10% Alexa488NHS jelölt) polimerizációjának kinetikáját követtük nyomon *time-lapse* felvételeken (55. ábra). A nukleációs aktivitás kvantitatív leírására a filamentumok számát határoztuk meg a polimerizáció elindítását követően 20 perccel a minta egy 66×66 µm²-es régiójában saját készítésű *Fiji plugin*-nel. Egyedi filamentumokon végzett hossz mérés, illetve a *Fiji Multiplegkymograph plugin* segítségével határoztuk meg a filamentumok elongációjának sebességét (v , 12. egyenlet), feltételezve, hogy 1 µm filamentum 370 alegységet tartalmaz [45, 222]:

$$v = \frac{\Delta l}{\Delta t} = k_+([A_0] - c_c(+)) \quad (12)$$

¹⁰ <http://fiji.sc/Fiji>

12. egyenlet

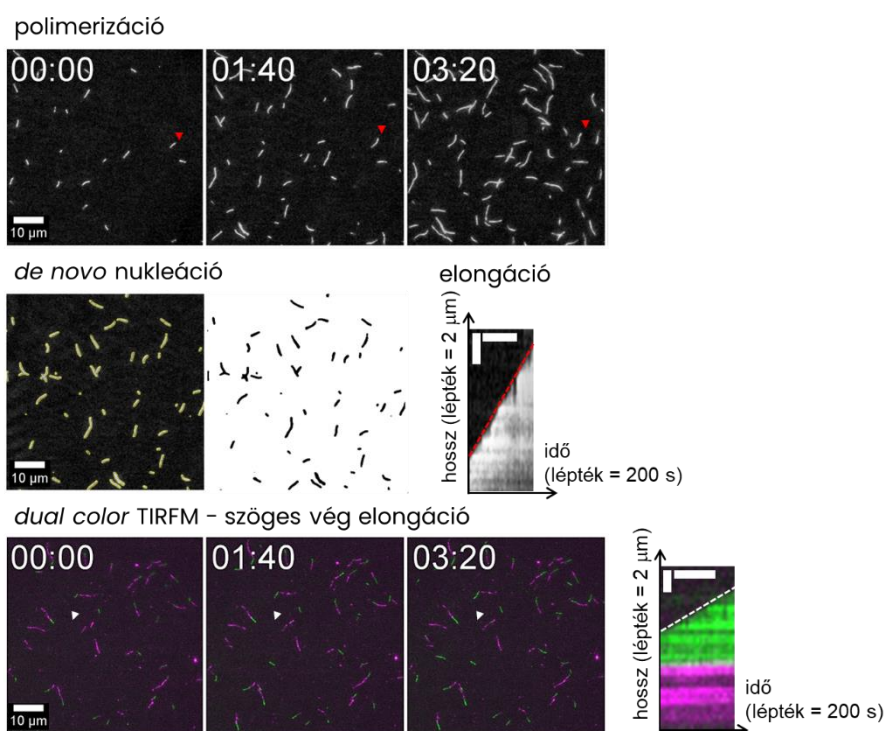
Δl : a filamentum hossznövekedése Δt idő alatt

k_+ : a monomerek filamentumba épülését jellemző asszociációs sebességi állandó a szöges végen

$c_c(+)$: a szöges vég kritikus koncentrációja

$[A_0]$: a G-aktin koncentrációja

Profilin jelenlétében a filamentumok szöges vég növekedését két eltérő spektrális tulajdonságú fluorofórral jelölt aktin alkalmazásával vizsgáltuk (*dual color* kísérletek) [142, 194]. G-aktint ($0.5 \mu\text{M}$, 10% Alexa568NHS jelölt) polimerizáltuk az áramlási cellában 10 percig. A nempolimerizált aktint 1 térfogatnyi TIRFM pufferrel kimostuk, majd G-aktin ($c_c(+)<[A_0]=0.3 \mu\text{M}<c_c(-)$, 10% Alexa488NHS jelölt), profilin ($0.72 \mu\text{M}$, $2 \mu\text{M}$) és a vizsgált aktinkötő fehérje keverékét áramoltattuk a cellába. Az aktin filamentumok elongációjának sebességét a fentiekben leírtak alapján határoztuk meg.



55. ábra: Egyedi aktin filamentumok összeszerelődésének (polimerizáció) időbeli nyomon követése.

de novo nukleáció: A nukleáció kvantitatív vizsgálata a filamentumszám meghatározása alapján.

elongáció: Az elongáció kvantitatív vizsgálata a filamentumhossz meghatározása alapján (kimográf elemzés, piros háromszöggel jelölt filamentum).

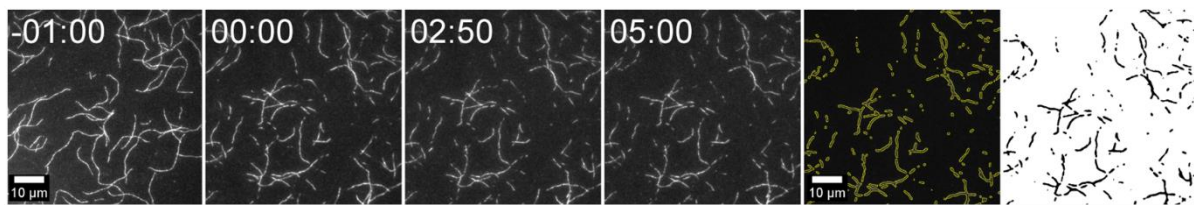
dual color TIRFM - szöges vég elongáció: Az elongáció kvantitatív vizsgálata a *dual color* kísérletekben a filamentumhossz meghatározása alapján (kimográf elemzés, fehér háromszöggel jelölt filamentum). Idő = min : s.

Az aktin filamentumok szétszerelődésének vizsgálata

A filamentumok szétszerelődésének nyomon követésére az egyedi polimerek szintjén egy TIRFM alapú módszert dolgoztunk ki (56. ábra) [194]. G-aktint ($0.5 \mu\text{M}$, 10% Alexa488NHS jelölt) polimerizáltuk az áramlási cellában (~ 35 min). A nempolimerizált aktint 1 térfogatnyi TIRFM pufferrel történő mosással távolítottuk el, majd TIRFM puffer és a vizsgált aktinkötő

fehérje (GSN, Fli-I) keverékét áramoltattuk a cellába. A depolimerizáció mértékének kvantitatív leírására a filamentumok által lefedett területet határoztuk meg a depolimerizáció elindítását követően 5 perccel egy $66 \times 66 \mu\text{m}^2$ -es régióban saját készítésű *Fiji plugin*-nel.

szétszerelődés



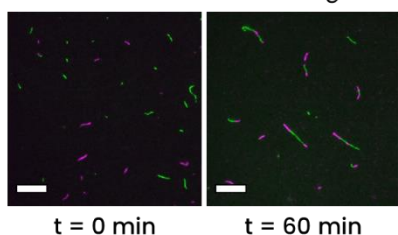
56. ábra: Egyedi aktin filamentumok szétszerelődésének (depolimerizáció) időbeli nyomon követése.

A kvantitatív elemzéshez a filamentumok által lefedett terület került meghatározásra a képelemzés során. Idő = min : s.

Az aktin filamentumok vég-vég kapcsolódásának vizsgálata - *annealing* kísérletek

A filamentumok vég-vég kapcsolódásának vizsgálatára (57. ábra) Alexa488NHS-, illetve Alexa568NHS-G-aktinból polimerizált filamentumokat ($1 \mu\text{M}$, 10% AlexaNHS jelölt) stabilizáltunk falloidinnel (1:1 moláris arány) éjszakán át. Ezt követően az eltérő spektrális tulajdonságú fluorofórral jelölt filamentumokat összekevertük, fragmentáltuk ($10 \times$, $26\text{G} \times \frac{1}{2}$ injekciós tű), majd TIRFM pufferrel hígítottuk. Poly-L-lizinnel (0.01% oldat) kezelt tárgy-, és fedőlemezből készült cellát használtunk. A vég-vég kapcsolódás mértékének kvantitatív leírására a filamentumok hosszát határoztuk meg a fragmentációt követően (0 és 60 min) egy $66 \times 66 \mu\text{m}^2$ -es régióban a *Fiji Measure plugin* segítségével.

dual color TIRFM - annealing

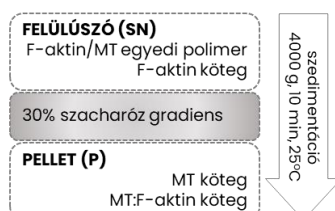


57. ábra: Egyedi aktin filamentumok vég-vég kapcsolódásának (*annealing*) vizsgálata *dual color* TIRFM kísérletekben.

Szedimentáción alapuló vizsgálatok

A DAAM egyidejű F-aktin és mikrotubulus kölcsönhatásának (keresztelő/citolinker aktivitás) vizsgálatára egy szedimentációs protokollt dolgoztam ki (58. ábra). Falloidin-stabilizált F-aktin ($2 \mu\text{M}$) és/vagy taxol-stabilizált mikrotubulusok ($2 \mu\text{M}$) elegyét DAAM konstrukttal ($9 \mu\text{M}$) inkubáltam *Britton-Robinson* pufferben (BRB-K 80 mM PIPES, pH7.0, 2 mM MgCl_2 , 0.5 mM EGTA, 50 mM KCl, 40 min, szobahő). A mintákat egy 30%-os szacharóz gradiensre rétegezve centrifugáltam (Eppendorf Centrifuge 5415 R, 4000 g, 10 min, 25°C). Az egyedi polimerek és

az F-aktin kötegek a felülúszóban maradnak, míg a nagyobb polimer komplexek (mikrotubulus köteg, F-aktin:mikrotubulus kopolimer) ülepednek és a pelletben jelennek meg. A kvantitatív elemzés érdekében a pellet és a felülúszó fehérjetartalmát SDS-PAGE módszerrel vizsgáltam. Kontroll kísérletekben a mintákat nagy fordulatszámon centrifugálva (Beckman Optima MAX-XP, 100 000 g, 20 min, 25°C) az F-aktin és a mikrotubulusok is megjelentek a pelletben, ami alátámasztja, hogy a kísérleti elrendezés által biztosított a polimer formát támogató körülmény.



58. ábra: A szedimentációs kísérlet elvének sematikus vázlata.

Fehérjeszerkezeti, doménszerkezeti ábrák

A fehérjeszerkezeti ábrákat a PyMol 2.5.2 (Schrödinger) programmal¹¹ készítettem a *Protein Data Bank*-ban (PDB) elérhető adatok alapján (17. táblázat). A doménszerkezeti ábrákat az *Illustrator for BioSequence* (IBS) programmal készítettem [223].

fehérje/komplex	PDB azonosító	hivatkozás
DNáz I:G-aktin komplex	1ATN	[32]
Tpm:F-aktin komplex	3J8A	[45]
mDia1 armadillo repeat régió, dimerizációs domén:DAD komplex	2BAP	[156]
DNáz I:G-aktin:WIP (WASP-interacting protein) WH2 komplex	2A41	[161]
Ciboulot	1SQK	[207]
MIM (<i>Missing in metastasis</i>)	2D1K	[208]
Spire	3MN7	[209]
WASP (<i>Wiskott-Aldrich syndrome protein</i>)	2A3Z	[161]
WAVE (<i>WASP-family verprolin-homologous protein</i>)	2A40	[161]
profilin:G-aktin komplex	1HLU	[163]
FMNL FH2:TMR G-aktin komplex	4EAH	[165]
DAAM1 FH2 domén	2Z6E	[166]
inaktív GSN GH16 domének	3FFN	[178]
aktív GSN GH13:G.aktin komplex	1RGI	[180]
aktív GSN GH46:G.aktin komplex	1H1V	[181]

17. táblázat: A felhasznált szerkezetek.

¹¹ <https://pymol.org/2/>

Kapcsolódó publikációk, az eredmények közlési helyének megadása

A *Módszerek* fejezetében bemutatott módszertani fejlesztéseink az alábbi publikációkban kerültek közlésre.

A lamellipodium és a lamella szegregációját, valamint a filopodiumszerű aktin hálózatot rekonstruáló biomimetikus rendszer kidolgozása.

#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

Független idéző: 19 Függő idéző: 16 Összesen: 35

[# megosztott első szerzős közlemény](#)

Bugyi Beáta, Didry Dominique, Carlier Marie-France ✉

How tropomyosin regulates lamellipodial actin-based motility: a combined biochemical and reconstituted motility approach.

EMBO JOURNAL 29 : 1 pp. 14-26. , 13 p. (2010)

IF: 10.124 Folyóiratcikk (Szakcikk) Tudományos

Független idéző: 40 Függő idéző: 7 Összesen: 47

Az aktinkötő fehérjék aktin monomerekkel kialakított kölcsönhatásának vizsgálatára alkalmas fluoreszcencia spektroszkópiai módszer és fluoreszcens jelzőmolekulák alkalmazhatóságának validálása.

Tóth Mónika Ágnes, Kinga Majoros Andrea, Vig Andrea Teréz, Migh Ede, Nyitrai Miklós, Mihály József, **Bugyi Beáta** ✉

Biochemical activities of the Wiskott-Aldrich syndrome homology region 2 domains of sarcomere length short.

JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 291 : 2 pp. 667-680. , 14 p. (2016)

IF: 4.125 Folyóiratcikk (Szakcikk) Tudományos

Független idéző: 7 Függő idéző: 8 Összesen: 15

Kétcsatornás teljes belső visszaverődésen alapuló mikroszkópiai (TIRFM) rendszer kiépítése az aktin filamentumok szerveződési folyamatainak (*de novo* nukleáció és szekvenciális alegység beépülés (elongáció), szétszerelődés, vég-vég kapcsolódás (*annealing*)) valós időben történő vizsgálatára az egyedi aktin polimerek megjelenítése révén.

Pintér Réka, Huber Tamás, Bukovics Péter, Gaszler Péter, Vig Andrea Teréz, Tóth Mónika Ágnes, Gázsó-Gerhát Gabriella, Farkas Dávid, Migh Ede, Mihály József, **Bugyi Beáta** ✉

The activities of the gelsolin homology domains of Flightless-I in actin dynamics.

FRONTIERS IN MOLECULAR BIOSCIENCES 7 Paper: 575077 , 18 p. (2020)

IF: 5.246 Folyóiratcikk (Szakcikk) Tudományos

Független idéző: 2 Függő idéző: 1 Összesen: 3

Vig Andrea Teréz, Földi István, Szikora Szilárd, Migh Ede, Gombos Rita, Tóth Mónika Ágnes, Huber Tamás, Pintér Réka, Csaba Talián Gábor, Mihály József, **Bugyi Beáta** ✉

The activities of the C-terminal regions of the formin protein Disheveled-associated activator of morphogenesis (DAAM) in actin dynamics.

JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 292 : 33 pp. 13566-13583. , 18 p. (2017)

IF: 4.01 Folyóiratcikk (Szakcikk) Tudományos

Független idéző: 5 Függő idéző: 6 Összesen: 11

#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

Független idéző: 19 Függő idéző: 16 Összesen: 35

[# megosztott első szerzős közlemény](#)

A forminok egyidejű F-aktin és mikrotubulus kölcsönhatásának (keresztítő/citolinker aktivitás) vizsgálata szedimentációs módszer alkalmazásával.

Szikora Szilárd, Földi István, Tóth Krisztina, Migh Ede, Vig Andrea Teréz, **Bugyi Beáta**, Maléth József, Hegyi Péter, Kaltenecker Péter, Sanchez-Soriano Natalia, Mihály József ✉

The formin DAAM is required for coordination of the actin and microtubule cytoskeleton in axonal growth cones.

JOURNAL OF CELL SCIENCE 130 : 15 pp. 2506-2519. , 14 p. (2017)

IF: 4.401 Folyóiratcikk (Szakcikk) Tudományos

Független idéző: 30 Függő idéző: 8 Összesen: 38

5. Szintézis - tézispontok, tudományos szempontból új eredmények

A fehérje:fehérje kölcsönhatások szerkezeti aspektusainak és funkcionális következményeinek leírása mentén a kutatásaink hozzájárultak az aktinkötő fehérjék szerepének pontosabb megismeréséhez a sejt motilis sajátságaiban alapvető protrúziós aktin hálózatok szerveződési folyamataiban, illetve a növekedési kúp aktin és mikrotubulus sejtvázában funkcionális integrációjában. A tudományos munkám szintézise az alábbi tézispontok szerint tehető meg.

1. Azonosításra kerültek a protrúziós aktin hálózatok létrehozásában alapvető fehérje:fehérje kölcsönhatások és rekonstruáltuk a vonatkozó fehérjerendszereket.
 - Az eltérő szerkezeti és dinamikai sajátságokkal rendelkező kompartmentek, a lamellipodium és lamella egy aktin hálózattól, a rendszer önszerveződése révén alakulhat ki. Ebben meghatározóak a tropomiozin fehérjecsald izoforma specifikus kölcsönhatásai.
 - A DAAM formin homológia domének, az aktin és a profilin tripartit kölcsönhatása meghatározó a filopodiumszerű aktin hálózat létrehozásában.
2. A DAAM C-terminálisa (DAD-CT) az aktinnal kialakított direkt kölcsönhatásával a formin homológia domének aktivitásainak pozitív szabályozója, valamint citolinker funkciót tölt be az aktin és a mikrotubulus sejtváz működésének összehangolásában.
3. A Flightless-I nagy affinitású filamentumvég kötése révén az aktin sejtvázdinamika negatív szabályozója. Ugyanakkor a DAAM C-terminálisával (DAD-CT) kialakított direkt kölcsönhatása a sejtváz DAAM közvetített szabályozásában is szerepet játszhat.
4. Kiépítésre került egy kétcsatornás teljes belső visszaverődésen alapuló fluoreszcencia mikroszkópai rendszer. Illetve kidolgozásra került több más, fluoreszcencia spektroszkópián és szedimentáción alapuló módszertani fejlesztés is az aktin és az aktin:mikrotubulus polimer rendszerek vizsgálatára.

6. Közlemények listája

A megosztott első, vagy levelező/utolsó szerzőség feltüntetésre került a publikációknál.

Az értekezés alapjául szolgáló tudományos közlemények

Vemula Venukumar, Huber Tamás, Ušaj Marko, **#Bugyi Beáta** ✉, #Mansson Alf ✉

Myosin and gelsolin cooperate in actin filament severing and actomyosin motor activity.

JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 296 Paper: 100181 , 16 p. (2021)

IF: 5.485 Folyóiratcikk (Szakcikk) Tudományos

Független idéző: 7 Függő idéző: 3 Összesen: 10

megosztott levelező/utolsó szerzős közlemény

#Bugyi Beáta ✉, #Kellermayer Miklós ✉

The discovery of actin: “to see what everyone else has seen, and to think what nobody has thought”.

JOURNAL OF MUSCLE RESEARCH AND CELL MOTILITY 41 : 1 pp. 3-9. , 7 p. (2020)

IF: 2.698 Folyóiratcikk (Szakcikk) Tudományos

Független idéző: 11 Összesen: 11

megosztott utolsó/levelező szerzős közlemény

Pintér Réka, Huber Tamás, Bukovics Péter, Gaszler Péter, Vig Andrea Teréz, Tóth Mónika Ágnes, Gazsó-Gerhát Gabriella, Farkas Dávid, Migh Ede, Mihály József, **Bugyi Beáta** ✉

The activities of the gelsolin homology domains of Flightless-I in actin dynamics.

FRONTIERS IN MOLECULAR BIOSCIENCES 7 Paper: 575077 , 18 p. (2020)

IF: 5.246 Folyóiratcikk (Szakcikk) Tudományos

Független idéző: 2 Függő idéző: 1 Összesen: 3

Szikora Szilárd, Földi István, Tóth Krisztina, Migh Ede, Vig Andrea Teréz, **Bugyi Beáta**, Maléth József, Hegyi Péter, Kaltenecker Péter, Sanchez-Soriano Natalia, Mihály József ✉

The formin DAAM is required for coordination of the actin and microtubule cytoskeleton in axonal growth cones.

JOURNAL OF CELL SCIENCE 130 : 15 pp. 2506-2519. , 14 p. (2017)

IF: 4.401 Folyóiratcikk (Szakcikk) Tudományos

Független idéző: 30 Függő idéző: 8 Összesen: 38

Vig Andrea Teréz, Földi István, Szikora Szilárd, Migh Ede, Gombos Rita, Tóth Mónika Ágnes, Huber Tamás, Pintér Réka, Csaba Talián Gábor, Mihály József, **Bugyi Beáta** ✉

The activities of the C-terminal regions of the formin protein Dishevelled-associated activator of morphogenesis (DAAM) in actin dynamics.

JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 292 : 33 pp. 13566-13583. , 18 p. (2017)

IF: 4.01 Folyóiratcikk (Szakcikk) Tudományos

Független idéző: 5 Függő idéző: 6 Összesen: 11

Tóth Mónika Ágnes, Kinga Majoros Andrea, Vig Andrea Teréz, Migh Ede, Nyitrai Miklós, Mihály József, **Bugyi Beáta** ✉

Biochemical activities of the Wiskott-Aldrich syndrome homology region 2 domains of sarcomere length short.

JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 291 : 2 pp. 667-680. , 14 p. (2016)

IF: 4.125 Folyóiratcikk (Szakcikk) Tudományos

Független idéző: 7 Függő idéző: 8 Összesen: 15

Kis-Bicskei Nikolett, Vig Andrea Teréz, Nyitrai Miklós, **#Bugyi Beáta** ✉, #Talián Csaba Gábor ✉

Purification of tropomyosin Br-3 and 5NM-1 and characterization of their interactions with actin.

CYTOSKELETON 70 : 11 pp. 755-765. , 11 p. (2013)

IF: 3.007 Folyóiratcikk (Szakcikk) Tudományos

Független idéző: 16 Függő idéző: 3 Összesen: 19

megosztott levelező/utolsó szerzős közlemény

#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

Független idéző: 19 Függő idéző: 16 Összesen: 35

[# megosztott első szerzős közlemény](#)

Bugyi Beáta, Didry Dominique, Carlier Marie-France ✉

How tropomyosin regulates lamellipodial actin-based motility: a combined biochemical and reconstituted motility approach.

EMBO JOURNAL 29 : 1 pp. 14-26. , 13 p. (2010)

IF: 10.124 Folyóiratcikk (Szakcikk) Tudományos

Független idéző: 40 Függő idéző: 7 Összesen: 47

Bugyi Beáta, Carlier Marie-France ✉

Control of actin filament treadmilling in cell motility.

ANNUAL REVIEW OF BIOPHYSICS 39 pp. 449-470. , 22 p. (2010)

IF: 17.524 Folyóiratcikk (Összefoglaló cikk) Tudományos

Független idéző: 267 Függő idéző: 19 Összesen: 286

#Hild Gábor, **#Bugyi Beáta**, Nyitrai Miklós ✉

Conformational dynamics of actin: effectors and implications for biological function.

CYTOSKELETON 67 : 10 pp. 609-629. , 21 p. (2010)

IF: 3.071 Folyóiratcikk (Összefoglaló cikk) Tudományos

Független idéző: 36 Függő idéző: 7 Összesen: 43

[# megosztott első szerzős közlemény](#)

Romet-Lemonne Guillaume, Helfer Emmanuel, Delatour Vincent, **Bugyi Beáta**, Bosch Montserrat, Romero Stephane, Carlier Marie-France, Schmidt Stephan, Fery Andreas ✉

Biomimetic systems shed light on actin-based motility down to the molecular scale.

BIOPHYSICAL REVIEWS AND LETTERS 4 : 1-2 pp. 5-15. , 11 p. (2009)

Impakt faktor: -, Folyóiratcikk (Szakcikk) Tudományos

Független idéző: 1 Összesen: 1

Bugyi Beáta, Le Clainche Christophe, Romet-Lemonne Guillaume, Carlier Marie-France ✉

How do in vitro reconstituted actin-based motility assays provide insight into in vivo behavior?

FEBS LETTERS 582 : 14 pp. 2086-2092. , 7 p. (2008)

IF: 3.264 Folyóiratcikk (Összefoglaló cikk) Tudományos

Független idéző: 12 Függő idéző: 2 Összesen: 14

Renault Louis, **Bugyi Beáta**, Carlier Marie-France ✉

Spire and Cordon-bleu: multifunctional regulators of actin dynamics.

TRENDS IN CELL BIOLOGY 18 : 10 pp. 494-504. , 11 p. (2008)

IF: 13.385 Folyóiratcikk (Összefoglaló cikk) Tudományos

Független idéző: 56 Függő idéző: 15 Összesen: 71

Bugyi Beáta ✉

Forminféhrjék: aktinösszeszerelő molekuláris gépezetek.

MAGYAR TUDOMÁNY 177 : 1 pp. 8-11. , 4 p. (2016)

Folyóiratcikk (Szakcikk) Tudományos

Bugyi Beáta ✉

Wiskott-Aldrich szindróma fehérje homológ 2 domén: a kirakós sokoldalú eleme.

Biokémia: a Magyar Biokémiai Egyesület folyóirata 39 : 2 pp. 25-35. , 11 p. (2015)

Folyóiratcikk (Szakcikk) Tudományos

Bugyi Beáta, Matkó János, Nagy Péter, Szöllősi János, Vámosi György, Vereb György
Fénymikroszkópiák a sejtszintű fehérjekutatásban.
In: Buday, L., Nyitrai, László, Perczel, A (szerk.) Ezerarcú fehérjék
Budapest, Magyarország : Semmelweis Kiadó és Multimédia Stúdió (2018) 960 p. pp. 437-483. , 47 p.
ISBN: 9789633314586
Könyvrészlet (Könyvfejezet) Tudományos

Bugyi Beáta ✉

Actin and actin binding proteins.
In: Kellermayer, Miklós (szerk.) Muscle Contraction - a Hungarian Perspective
Budapest, Magyarország : Semmelweis Kiadó (2018) 628 p. p. 253
ISBN: 9789633314562
Könyvrészlet (Könyvfejezet) Tudományos

További tudományos közlemények

A PhD fokozat megszerzését követő közlemények - tudományos folyóiratcikk

Farkas Dávid, Szikora Szilárd, Jijumon A S, Polgár Tamás Ferenc, Patai Roland, Tóth Mónika Ágnes, **Bugyi Beáta**,
Gajdos Tamás, Bíró Péter, Novák Tibor, Erdélyi Miklós, Mihály József ✉
Peripheral thickening of the sarcomeres and pointed end elongation of the thin filaments are both promoted by SALS
and its formin interaction partners.
PLOS GENETICS 20 : 1 Paper: e1011117 , 31 p. (2024)
IF: 4.5 ** Folyóiratcikk (Szakcikk) Tudományos

Szatmári Dávid, **Bugyi Beáta**, Pintér Réka, Lőrinczy Dénes ✉
Cyclophosphamide treatment modifies the thermal stability of profilin bound monomeric and leiomodin2 bound
filamentous actin.
JOURNAL OF THERMAL ANALYSIS AND CALORIMETRY 148 : 3 pp. 837-844. , 8 p. (2023)
IF: 4.4 * Folyóiratcikk (Szakcikk) Tudományos

Földi István, Tóth Krisztina, Gombos Rita, Gaszler Péter, Görög Péter, Zygouras Ioannis, **Bugyi Beáta**, Mihály
József ✉
Molecular Dissection of DAAM Function during Axon Growth in Drosophila Embryonic Neurons.
CELLS 11 : 9 Paper: 1487 , 20 p. (2022)
IF: 6 Folyóiratcikk (Szakcikk) Tudományos
Független idéző: 2 Összesen: 2

Ragán Dániel ✉, Kustán Péter, Horváth-Szalai Zoltán, Szirmay Balázs, **Bugyi Beáta**, Ludány Andrea, Miseta Attila,
Nagy Bálint, Mühl Diána
Urinary actin, as a potential marker of sepsis-related acute kidney injury : A pilot study.
PLOS ONE 16 : 7 Paper: e0255266 , 13 p. (2021)
IF: 3.752 Folyóiratcikk (Szakcikk) Tudományos
Független idéző: 1 Függő idéző: 3 Összesen: 4

Telek Elek, Karádi Kristóf, Kardos József, Kengyel András, Fekete Zsuzsanna, Halász Henriett, Nyitrai Miklós,
#Bugyi Beáta ✉, #Lukács András ✉
The C-terminal tail extension of myosin 16 acts as a molten globule, including intrinsically disordered regions, and
interacts with the N-terminal ankyrin.
JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 297 : 1 Paper: 100716 , 16 p. (2021)
IF: 5.485 Folyóiratcikk (Szakcikk) Tudományos
Független idéző: 2 Függő idéző: 1 Összesen: 3
[# megosztott levelező/utolsó szerzős közlemény](#)

Bugyi Beáta, Kengyel András ✉

Myosin XVI
ADVANCES IN EXPERIMENTAL MEDICINE AND BIOLOGY 1239 pp. 405-419. , 15 p. (2020)
IF: 2.622 Folyóiratcikk (Szakcikk) Tudományos
Független idéző: 3 Függő idéző: 2 Összesen: 5

Telek Elek, Kengyel András, **Bugyi Beáta** ✉

Myosin XVI in the nervous system.

CELLS 9 : 8 Paper: 1903 , 15 p. (2020)

IF: 6.6 Folyóiratcikk (Összefoglaló cikk) Tudományos

Független idéző: 4 Függő idéző: 1 Összesen: 5

Horváth-Szalai Zoltán, Kustán Péter, Szirmay Balázs, Lakatos Ágnes, Christensen Per Hjort, Huber Tamás, **Bugyi Beáta**, Mühl Diána, Ludány Andrea, Miseta Attila, Kovács L Gábor, Kőszegi Tamás ✉

Predictive value of serum gelsolin and Gc globulin in sepsis - a pilot study.

CLINICAL CHEMISTRY AND LABORATORY MEDICINE 56 : 8 pp. 1373-1382. , 10 p. (2018)

IF: 3.638 Folyóiratcikk (Szakcikk) Tudományos

Független idéző: 9 Függő idéző: 3 Összesen: 12

Horváth-Szalai Zoltán, Kustán Péter, Szirmay Balázs, Lakatos Ágnes, Christensen Per Hjort, Huber Tamás, **Bugyi Beáta**, Mühl Diána, Ludány Andrea, Miseta Attila, Kovács L Gábor, Kőszegi Tamás ✉

Validation of an automated immune turbidimetric assay for serum gelsolin and its possible clinical utility in sepsis.

JOURNAL OF CLINICAL LABORATORY ANALYSIS 32 : 3 Paper: e22321 , 7 p. (2018)

IF: 1.728 Folyóiratcikk (Szakcikk) Tudományos

Független idéző: 6 Függő idéző: 3 Összesen: 9

Kis-Bicskei Nikolett, Bécsi Bálint, Erdődi Ferenc, Robinson C. Robert, **Bugyi Beáta**, Huber Tamás, Nyitrai Miklós, Talián Gábor Csaba ✉

Tropomyosins regulate the severing activity of gelsolin in isoform-dependent and independent manners.

BIOPHYSICAL JOURNAL 114 : 4 pp. 777-787. , 11 p. (2018)

IF: 3.665 Folyóiratcikk (Szakcikk) Tudományos

Független idéző: 5 Függő idéző: 2 Összesen: 7

Szatmári Dávid, Xue Bo, Kannan Balakrishnan, Burtneck D. Leslie, **Bugyi Beáta**, Nyitrai Miklós, Robert C. Robinson ✉

ATP competes with PIP2 for binding to gelsolin.

PLOS ONE 13 : 8 Paper: e0201826 , 17 p. (2018)

IF: 2.776 Folyóiratcikk (Szakcikk) Tudományos

Független idéző: 10 Függő idéző: 4 Összesen: 14

Horváth-Szalai Zoltán, Kustán Péter, Mühl Diána, Ludány Andrea, **Bugyi Beáta**, Kőszegi Tamás ✉

Antagonistic sepsis markers: serum gelsolin and actin/gelsolin ratio.

CLINICAL BIOCHEMISTRY 50 : 3 pp. 127-133. , 7 p. (2017)

IF: 2.584 Folyóiratcikk (Szakcikk) Tudományos

Független idéző: 14 Függő idéző: 8 Összesen: 22

Szatmári Dávid, **Bugyi Beáta**, Ujfalusi Zoltán, Grama László, Dudás Réka, Nyitrai Miklós ✉

Cardiac leiomodulin binds to the sides of actin filaments and regulates the ATPase activity of myosin.

PLOS ONE 12 : 10 Paper: e0186288 , 21 p. (2017)

IF: 2.766 Folyóiratcikk (Szakcikk) Tudományos

Független idéző: 11 Függő idéző: 3 Összesen: 14

Hild Gábor, Kalmár Lajos, Kardos Roland, Nyitrai Miklós, **Bugyi Beáta** ✉

The other side of the coin: Functional and structural versatility of ADF/cofilins.

EUROPEAN JOURNAL OF CELL BIOLOGY 93 : 5-6 pp. 238-251. , 14 p. (2014)

IF: 3.825 Folyóiratcikk (Összefoglaló cikk) Tudományos

Független idéző: 37 Függő idéző: 1 Összesen: 38

Molnár Imre, Migh Ede, Szikora Szilárd, Kalmár Tibor, Végh G. Attila, Deák Ferenc, Barkó Szilvia, **Bugyi Beáta**,

Orfanos Zacharias, Kovács János, Juhász Gábor, Váró György, Nyitrai Miklós, Sparrow John, Mihály József ✉

DAAM is required for thin filament formation and sarcomerogenesis during muscle development in Drosophila.

PLOS GENETICS 10 : 2 Paper: e1004166 , 15 p. (2014)

IF: 7.528 Folyóiratcikk (Szakcikk) Tudományos

Független idéző: 22 Függő idéző: 12 Összesen: 34

Bugyi Beáta, Hild Gábor, Lukács András, Nyitrai Miklós
Mérőszalaggal a fehérjék világában.
MAGYAR TUDOMÁNY 173 : 9 pp. 1072-1080. , 9 p. (2012)
Folyóiratcikk (Szakcikk) Tudományos

Ujfalusi Zoltán, Kovács Mihály, Nagy Nikolett, Barkó Szilvia, Hild Gábor, Lukács András, Nyitrai Miklós, **Bugyi Beáta** ✉
Myosin and tropomyosin stabilize the conformation of formin-nucleated actin filaments.
JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 287 : 38 pp. 31894-31904. , 11 p. (2012)
IF: 4.651 Folyóiratcikk (Szakcikk) Tudományos
Független idéző: 17 Függő idéző: 2 Összesen: 19

Vig Andrea Teréz, Ohmacht Róbert, Jámor Éva, **Bugyi Beáta**, Nyitrai Miklós, Hild Gábor ✉
The effect of toxins on inorganic phosphate release during actin polymerization.
EUROPEAN BIOPHYSICS JOURNAL 40 : 5 pp. 619-626. , 8 p. (2011)
IF: 2.139 Folyóiratcikk (Szakcikk) Tudományos
Független idéző: 7 Függő idéző: 1 Összesen: 8

Bosch Montserrat, Le Kim Ho, **Bugyi Beáta**, Correia J. John, Renault Louis, Carlier Marie-France ✉
Analysis of the function of Spire in actin assembly and its synergy with formin and profilin.
MOLECULAR CELL 28 : 4 pp. 555-568. , 14 p. (2007)
IF: 13.156 Folyóiratcikk (Szakcikk) Tudományos
Független idéző: 61 Függő idéző: 29 Összesen: 90

A PhD fokozat megszerzése előtti közlemények - tudományos folyóiratcikk

Bugyi Beáta, Papp Gábor, Hild Gábor, Lőrinczy Dénes, Nevalainen M. Elisa, Lappalainen Pekka, Somogyi Béla, Nyitrai Miklós ✉
Formins regulate actin filament flexibility through long range allosteric interactions.
JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 281 : 16 pp. 10727-10736. , 10 p. (2006)
IF: 5.808 Folyóiratcikk (Szakcikk) Tudományos
Független idéző: 43 Függő idéző: 15 Összesen: 58

Halasi Szulamit, Papp Gábor, **Bugyi Beáta**, Barkó Szilvia, Orbán József, Ujfalusi Zoltán, Visegrády Balázs ✉
The effect of pyrene labelling on the thermal stability of actin filaments.
THERMOCHIMICA ACTA 445 : 2 pp. 185-189. , 5 p. (2006)
IF: 1.417 Folyóiratcikk (Szakcikk) Tudományos
Független idéző: 2 Függő idéző: 1 Összesen: 3

#Papp Gábor, **#Bugyi Beáta**, Ujfalusi Zoltán, Barkó Szilvia, Hild Gábor, Somogyi Béla, Nyitrai Miklós ✉
Conformational changes in actin filaments induced by formin binding to the barbed end.
BIOPHYSICAL JOURNAL 91 : 7 pp. 2564-2572. , 9 p. (2006)
IF: 4.757 Folyóiratcikk (Szakcikk) Tudományos
Független idéző: 44 Függő idéző: 9 Összesen: 53
[# megosztott első szerzős közlemény](#)

Bugyi Beáta, Papp Gábor, Halasi Szulamit, Visegrády Balázs ✉
The effect of toxins on the thermal stability of actin filaments by differential scanning calorimetry.
JOURNAL OF THERMAL ANALYSIS AND CALORIMETRY 82 : 1 pp. 275-279. , 5 p. (2005)
IF: 1.425 Folyóiratcikk (Szakcikk) Tudományos
Független idéző: 6 Összesen: 6

Orbán József, Halasi Szulamit, Papp Gábor, Barkó Szilvia, **Bugyi Beáta** ✉
Thermodynamic characterization of different actin isoforms.
JOURNAL OF THERMAL ANALYSIS AND CALORIMETRY 82 : 1 pp. 287-290. , 4 p. (2005)
IF: 1.425 Folyóiratcikk (Szakcikk) Tudományos
Független idéző: 1 Függő idéző: 4 Összesen: 5

Papp Gábor, **Bugyi Beáta**, Ujfalusi Zoltán, Halasi Szulamit, Orbán József ✉

The effect of pH on the thermal stability of α -actin isoforms.

JOURNAL OF THERMAL ANALYSIS AND CALORIMETRY 82 : 1 pp. 281-285. , 5 p. (2005)

IF: 1.425 Folyóiratcikk (Szakcikk) Tudományos

Független idéző: 4 Függő idéző: 4 Összesen: 8

Shimada Atsushi, Nyitrai Miklós, Vetter R. Ingrid, Kühlmann Dorothee, **Bugyi Beáta**, Narumiya Shuh, Geeves A.

Michael, Wittinghofer Alfred ✉

The core FH2 domain of diaphanous-related formins is an elongated actin binding protein that inhibits polymerization.

MOLECULAR CELL 13 : 4 pp. 511-522. , 12 p. (2004)

IF: 16.811 Folyóiratcikk (Szakcikk) Tudományos

Független idéző: 107 Függő idéző: 20 Összesen: 127

7. Köszönetnyilvánítás

Olvasd föl – parancsolta a Király a fehér Nyuszinak.

A fehér Nyuszi feltette pápaszemét.

– Hol kezdjem felség? – kérdezte.

– Kezdd a kezdetén – mondta a Király -, és leghelyesebb, ha a végén végzed.

Lewis Carroll: Alice Csodaországban

Pályafutásom során lehetőségem nyílt kiváló mentorokkal, kutatókkal és kollégákkal együtt dolgozni, tudományos és baráti kapcsolatokat kialakítani.

A tudományos pálya iránti elköteleződéselem alapjait a komlói Nagy László Gimnázium kiváló matematika szakos tanárának *Marosi Gézánnának*, *Irma néni*nek köszönhetem. Speciális pedagógiai módszerei révén megszerettem a matematikai gondolkodásmódot és a problémamegoldás kihívásait. Kiscsoportos óráin minden diáknak jutott egy tábla, ahol a feladatok megoldásán dolgozott. Irma néni a katedráról így jól nyomon követhette a munkát. A helyes megoldás megtalálásának általában nem dicsérő szavak, hanem egy újabb feladat volt a jutalma „*Kérek egy másik megoldási elvet bemutatni!*” felszólítással. Igazi élmény volt számunkra, ha négy-öt különböző megoldási stratégiát találtunk egy feladatra.

A gimnáziumi matematika órák és élmények meghatározóak voltak abban, hogy a matematika-fizika szakos tanári képzés mellett döntöttem, amit a szegedi József Attila Tudományegyetemen kezdtem, majd a Pécsi Tudományegyetem Természettudományi Karán fejeztem be. A kutatómunkába diplomamunka konzulensem *Erostyák János* (PTE TTK Kísérleti Fizika Tanszék) mentorálásával kapcsolódtam be. Témavezetésével elsajátíthattam a fluoreszcencia spektroszkópia alapjait, amit biztonságtechnikában használt vegyületek vizsgálatában alkalmaztam. Hálával tartozom Jánosnak a támogatásáért és az utam egyengetéséért. Öröm számomra, hogy a mai napig van lehetőségünk az együttműködésre.

Az egyetemi évek alatt fogalmazódott meg bennem, hogy milyen jó is volna a matematika és fizika tudományát egy kis élettellel megtölteni. Így várakozással álltam annak a feladatnak az elébe, amit a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Biofizikai Intézetében PhD témavezetőimtől *Somogyi Bélától* és *Nyitrai Miklóstól* kaptam. A sejtváz egyik alapvető alkotójával az aktin fehérjével kezdtem foglalkozni. Már ismert volt, hogy az Arp2/3 komplex az aktin filamentumok *de novo* nukleációját katalizáló faktorként működik. A tudományterületet a formin fehérjecsald, mint potenciális új nukleációs faktor tartotta lázban. A PhD munkám célja annak vizsgálata volt, hogy miként befolyásolják a formin fehérjék (pontosabban az mDia1 formin) az aktin filamentumok összeszerelődését, mely régiók felelősek a nukleációs aktivitásért és milyen biomechanikai tulajdonságokkal rendelkeznek a forminok által létrehozott aktin filamentumok. Az eredményeink meghatározó jelentőséggel bírtak a forminok nukleációs mechanizmusának pontosabb megértésben [131]. Ugyanakkor egy új, a filamentumok konformációs sajátságain alapul szabályozó elvet is felvetettek az aktin sejtváz funkcionális diverzifikációjában [66, 67]. Köszönettel tartozom Bélának és Micónak,

hogy témavezetésükkel volt lehetőségem elmélyedni a fluoreszcencia spektroszkópia, illetve a fehérje biofizika és biokémia módszertanában. A Bélának hála azóta is figyelemmel vagyok a parallaxis hibára minden egyes pufferkészítés során.

A pályafutásom meghatározó időszakának tartom a *Centre National de la Recherche Scientifique* (CNRS) Párizs mellett található *Gif-sur-Yvette-i Laboratoire d'Enzymologie et Biochimie Structurales* (LEBS) intézetében töltött időszakot. Posztdoktori munkámat a *Marie-France Carlier* által vezetett, az aktinkutatás világszinten is kiemelkedő laboratóriumában végeztem. Itt sajátíthattam el a teljes belső visszaverődésen alapuló fluoreszcencia mikroszkópia technikáját és a komplex fehérjerendszerek működését rekonstruáló biomimetikus módszertant, valamint az aktin vizsgálatára alkalmazott módszerek fortélyait [10, 90, 220, 221]. A posztdoktori kutatómunkám legfontosabb eredményének a protrúziós aktin hálózatok (a lamellipodium és a lamella, valamint a filopodiális nyúlványok) létrehozásában alapvető kölcsönhatások és a vonatkozó fehérjerendszereket rekonstruáló biomimetikus modellek kidolgozását tartom [110, 142]. *Marie-France, je vous remercie pour toutes les nuances de la biochimie de l'actine.*



*Marie-France a Spire fehérje nukleációs mechanizmusát magyarázza.
Pot chez Marie-France, Gif-sur-Yvette, Franciaország, 2006.*

A hazatérésemet követően 2010 óta vezetem az *Aktin dinamika* kutatócsoport. A csoport 2023-ig a PTE ÁOK Biofizikai Intézetében tevékenykedett, jelenleg pedig a PTE ÁOK Orvosi Biológiai Intézet kutatási portfóliójának meghatározó csoportja. Az aktinkutatás *in vitro* módszertanának bővítése érdekében infrastrukturális fejlesztéseket hajtottunk végre. A PTE ÁOK műszerparkja bővíthetett egy kétsatornás teljes belső visszaverődésen alapuló fluoreszcencia mikroszkópiai rendszerrel a Baross Gábor Program keretében. Illetve kidolgozásra került több más, fluoreszcencia spektroszkópián és szedimentáción alapuló módszertani fejlesztés is az aktin és aktin:mikrotubulus polimer rendszerek *in vitro* vizsgálatára.

Az értekezésben bemutatott eredmények nem jöhettek volna létre a kutatócsoportom tagjainak munkája nélkül, köszönettel tartozom nekik: *Vig Andrea, Tóth Mónika, Pintér Réka, Gaszler Péter* és *Rauan Sakenov*. Andi, Móni és Réka témavezetésemmel szereztek PhD fokozatot, Péter és Rauan jelenleg PhD hallgatóként tevékenykedik.



*Az Aktin dinamika kutatócsoport: Rauan, Réka, Bea, Móni, Andi, Péter.
Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, 2023.*

Munkánk során több hazai és nemzetközi kutatócsoporttal működünk/működünk együtt. A legmeghatározóbb és a legrégebbre visszanyúló a *Mihály József* kutatócsoportjával, az aktinkutatás meghatározó hazai tudományos műhelyével (HUN-REN SZBK Genetikai Intézet) való munka. Köszönöm Józsiéknak a mindig inspiráló közös munkát, ami jó néhány projekt és publikáció alapját jelentette és jelenti [99, 135, 142, 171, 172, 194, 224].

Különleges köszönetet illeti családomat, szüleimet *Ábel Terézt* és *Bugyi Sándort*, testvéreimet *Bugyi Zsoltot* és férjemet *Tegzes Zoltánt* önzetlen támogatásukért és odaadásukért, végtelen türelmükért és kifogyhatatlan szeretetükért. Köszönöm, hogy elviselték és elviselik a kutatói életpálya szélsőségeit. A munkámat nekik ajánlom.

Alice nevetett.

– Nincs értelme – mondta -, a lehetetlent nem hiheti el az ember!

– Szerintem nincs elég gyakorlatod – mondta a Királynő. – Én a te korodban naponta fél órát csak ezt gyakoroltam. Volt úgy, hogy már reggeli előtt hat lehetetlen dolgot elhittem.

Lewis Carroll: Alice Tükkörországban

Rövidítések és jelölések jegyzéke

<i>rövidítés jelölés</i>	<i>elnevezés (angol/magyar)</i>
ADF	actin depolymerizing factor aktin depolimerizáló faktor
Alexa488M	Alexa Fluor™ C ₅ 488 maleimide Alexa Fluor™ C ₅ 488 maleimid
Alexa568M	Alexa Fluor™ C ₅ 568 maleimide Alexa Fluor™ C ₅ 568 maleimid
Alexa488NHS	Alexa Fluor™ 488 NHS ester (succinimidyl ester) Alexa Fluor™ 488 karboxilsav szukcinimidil észter
Alexa568NHS	Alexa Fluor™ 568 NHS ester (succinimidyl ester) Alexa Fluor™ 568 karboxilsav szukcinimidil észter
APC	adenomateous polyposis coli
Arp2/3	actin-related protein 2/3 aktinszerű fehérje 2/3
BME	β-mercaptoethanol β-merkaptóetanol
BSA	bovine serum albumin marha szérum albumin
BRB	Britton-Robinson puffer
c _c	kritikus koncentráció
c _c (+)	a szögcs vég kritikus koncentrációja
c _c (-)	a hegyes vég kritikus koncentrációja
CapG	macrophage capping protein makrofág sapkaféherje
CP	capping protein sapkaféherje
DAAM	dishevelled-associated activator of morphogenesis
DABCO	1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane 1,4-diazabiklo-[2,2,2]oktán
DAD	diaphanous autoregulatory domain diaphanous autoregulációs domén
DID	diaphanous inhibitory domain diaphanous inhibíciós domén
Drf	diaphanous-related formin
DSC	differential scanning calorimetry differenciális pásztázó kalorimetria
EGTA	ethyleneglycol-bis(β-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraacetoxymethyl ester

EMD	electron microscopy data bank
EPR	electron paramagnetic resonance elektron paramágneses rezonancia
FA	F-aktin
FH	formin homology formin homológia
FL	fluoreszcensen jelölt
Fli-I	Flightless-I
FMN	formin
G, GBD	GTPase-binding domain GTPáz-kötő domén
GH	gelsolin homologue gelsolin homológ
GSN	gelsolin
HMM	heavy meromyosin nehéz meromiozin
IAEDANS	1,5-IAEDANS, 5-(((2-iodoacetyl)amino)ethyl)amino)naphthalene-1-sulfonic acid jódacetaminoetil-1-naftilamin-5-szulfonsav
IBS	Illustrator for BioSequence
K _D	disszociációs egyensúlyi állandó
ko-IP	ko-immunprecipitáció
krio-EM	kriogén elektronmikroszkópia
<i>lifeAct</i>	az <i>S. cerevisiae</i> ABP140 N-terminálisából származó 17 aminosavas F-aktin-kötő peptid [44]
LatA	Latrunculin A
LRR	leucine-rich repeat leucingazdag ismétlődés
MIM	missing in metastasis
MT	mikrotubulus
NEM	N-ethylmaleimide N-etilmaleimid
nm	nem meghatározott
NPF	nucleation promoting factor nukleációt elősegítő faktor
N-WASP	neuronal-Wiskott-Aldrich syndrome protein

PDB	protein data bank
PIP ₂	phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát
pirén	N-(1-pyrene)iodoacetamide N-(1-pirén)-jódacetamid
SALS	sarcomere length short
TAMRA	5(6)-TAMRA (5-(and-6)-carboxytetramethylrhodamine) 5(6)-karboxitetrametilrodamin
t.e.	tetszőleges egység
TIPs	microtubule plus-end tracking proteins
TIRFM	total internal reflection fluorescence microscopy teljes belső visszaverődésen alapuló fluoreszcencia mikroszkópia
Tpm	tropomiozin
WASP	Wiskott-Aldrich syndrome protein
WAVE	Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP)-family verprolin homologous
WH2	Wiskott-Aldrich syndrome homology domain 2
WIP	WASP-interacting protein
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
<i>Dm</i> <i>Drosophila</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Hs</i>	<i>Homo sapiens</i>
<i>Mm</i>	<i>Mus musculus</i>
<i>Sc</i> <i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

9. Irodalomjegyzék

1. Straub, F., *Actin*. Studies from the Institute of Medical Chemistry University Szeged, ed. A. Szent-Györgyi. Vol. II. 1942: S. Karger Basel, New York.
2. Straub, F., *Actin II*. Studies from the Institute of Medical Chemistry University Szeged, ed. A. Szent-Györgyi. 1943: S. Karger Basel, New York.
3. Bugyi, B. and M. Kellermayer, *The discovery of actin: "to see what everyone else has seen, and to think what nobody has thought"*. J Muscle Res Cell Motil, 2019.
4. Bugyi, B., *Actin and actin binding proteins*, in *Muscle contraction: a Hungarian perspective*, M.S. Kellermayer, Editor. 2018, Semmelweis Publishers: Budapest.
5. Banga, I., Szent-Györgyi, A., *Preparation and properties of myosin A and B*. Studies from the Institute of Medical Chemistry University Szeged, Myosin and muscular contraction, ed. S.-G. A. Vol. 1. 1942: S. Karger Basel, New York, R. Gergely, Budapest.
6. Szent-Györgyi, A., *Discussion*. Studies from the Institute of Medical Chemistry University Szeged, ed. A. Szent-Györgyi. Vol. 1. 1941: S. Karger Basel, New York, R. Gergely, Budapest.
7. Szent-Györgyi, A., *The contraction of myosin threads*. Studies from the Institute of Medical Chemistry University, ed. A. Szent-Györgyi. Vol. 1. 1942: S. Karger Basel, New York, R. Gergely, Budapest.
8. Kellermayer, M.S., *Muscle contraction: a Hungarian perspective* 2018, Budapest: Semmelweis Publishers.
9. Liebmann, B., *Szent-Györgyi Albert laboratóriumában, legközvetlenebb munkatársával, Banga Ilonával*. 1937: <https://mediateka.ek.szte.hu/items/show/27135>.
10. Bugyi, B. and M.F. Carlier, *Control of actin filament treadmilling in cell motility*. Annu Rev Biophys, 2010. **39**: p. 449-70.
11. Blanchoin, L., et al., *Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility*. Physiol Rev, 2014. **94**(1): p. 235-63.
12. Pollard, T.D., *Actin and Actin-Binding Proteins*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2016. **8**(8).
13. Clark, T.G. and R.W. Merriam, *Diffusible and bound actin nuclei of Xenopus laevis oocytes*. Cell, 1977. **12**(4): p. 883-91.
14. Percipalle, P. and M. Vartiainen, *Cytoskeletal proteins in the cell nucleus: a special nuclear actin perspective*. Mol Biol Cell, 2019. **30**(15): p. 1781-1785.
15. Ulferts, S., et al., *Emerging Properties and Functions of Actin and Actin Filaments Inside the Nucleus*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2021. **13**(3).
16. Kristó, I., et al., *Actin, actin-binding proteins, and actin-related proteins in the nucleus*. Histochem Cell Biol, 2016. **145**(4): p. 373-88.
17. Bork, P. and R.F. Doolittle, *Proposed acquisition of an animal protein domain by bacteria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(19): p. 8990-4.
18. Jones, L.J., R. Carballido-López, and J. Errington, *Control of cell shape in bacteria: helical, actin-like filaments in Bacillus subtilis*. Cell, 2001. **104**(6): p. 913-22.
19. Wagstaff, J. and J. Lowe, *Prokaryotic cytoskeletons: protein filaments organizing small cells*. Nat Rev Microbiol, 2018. **16**(4): p. 187-201.
20. Akil, C., et al., *Mythical origins of the actin cytoskeleton*. Curr Opin Cell Biol, 2021. **68**: p. 55-63.
21. Stairs, C.W. and T.J.G. Ettema, *The Archaeal Roots of the Eukaryotic Dynamic Actin Cytoskeleton*. Curr Biol, 2020. **30**(10): p. R521-R526.
22. Spang, A., et al., *Complex archaea that bridge the gap between prokaryotes and eukaryotes*. Nature, 2015. **521**(7551): p. 173-179.
23. Zaremba-Niedzwiedzka, K., et al., *Asgard archaea illuminate the origin of eukaryotic cellular complexity*. Nature, 2017. **541**(7637): p. 353-358.
24. Galland, R., et al., *Fabrication of three-dimensional electrical connections by means of directed actin self-organization*. Nat Mater, 2013. **12**(5): p. 416-21.

25. Nicolau, D.V., et al., *Parallel computation with molecular-motor-propelled agents in nanofabricated networks*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2016. **113**(10): p. 2591-2596.
26. Ampe, C. and M. Van Troys, *Mammalian Actins: Isoform-Specific Functions and Diseases*. Handb Exp Pharmacol, 2017. **235**: p. 1-37.
27. Perrin, B.J. and J.M. Ervasti, *The actin gene family: function follows isoform*. Cytoskeleton (Hoboken), 2010. **67**(10): p. 630-4.
28. Witjes, L., et al., *A new evolutionary model for the vertebrate actin family including two novel groups*. Mol Phylogenet Evol, 2019. **141**: p. 106632.
29. Dominguez, R. and K.C. Holmes, *Actin structure and function*. Annu Rev Biophys, 2011. **40**: p. 169-86.
30. Jégou, A. and G. Romet-Lemonne, *The many implications of actin filament helicity*. Semin Cell Dev Biol, 2020. **102**: p. 65-72.
31. Szent-Györgyi, A., *Studies on muscle*. Acta Physiol Scand, 1945. **25**: p. 1-116.
32. Kabsch, W., et al., *Atomic structure of the actin:DNase I complex*. Nature, 1990. **347**(6288): p. 37-44.
33. Holmes, K.C., et al., *Atomic model of the actin filament*. Nature, 1990. **347**(6288): p. 44-9.
34. Oda, T., et al., *The nature of the globular- to fibrous-actin transition*. Nature, 2009. **457**(7228): p. 441-5.
35. Fujii, T., et al., *Direct visualization of secondary structures of F-actin by electron cryomicroscopy*. Nature, 2010. **467**(7316): p. 724-8.
36. 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.
37. 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.
38. Chou, S.Z. and T.D. Pollard, *Cryo-electron microscopy structures of pyrene-labeled ADP-Pi- and ADP-actin filaments*. Nat Commun, 2020. **11**(1): p. 5897.
39. Kanematsu, Y., et al., *Structures and mechanisms of actin ATP hydrolysis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2022. **119**(43): p. e2122641119.
40. Oosterheert, W., et al., *Molecular mechanisms of inorganic-phosphate release from the core and barbed end of actin filaments*. Nat Struct Mol Biol, 2023. **30**(11): p. 1774-1785.
41. Kumari, A., et al., *Structural insights into actin filament recognition by commonly used cellular actin markers*. EMBO J, 2020. **39**(14): p. e104006.
42. Menten, A., et al., *High-resolution cryo-EM structures of actin-bound myosin states reveal the mechanism of myosin force sensing*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018. **115**(6): p. 1292-1297.
43. Belyy, A., et al., *Structure of the Lifeact-F-actin complex*. PLoS Biol, 2020. **18**(11): p. e3000925.
44. Riedl, J., et al., *Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin*. Nat Methods, 2008. **5**(7): p. 605-7.
45. von der Ecken, J., et al., *Structure of the F-actin–tropomyosin complex*. Nature, 2015. **519**(7541): p. 114-117.
46. von der Ecken, J., et al., *Cryo-EM structure of a human cytoplasmic actomyosin complex at near-atomic resolution*. Nature, 2016. **534**(7609): p. 724-8.
47. Selvaraj, M., et al., *Structural basis underlying specific biochemical activities of non-muscle tropomyosin isoforms*. Cell Rep, 2022: p. 111900.
48. Ding, B., et al., *Structure of Arp2/3 complex at a branched actin filament junction resolved by single-particle cryo-electron microscopy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2022. **119**(22): p. e2202723119.
49. Oosterheert, W., et al., *Molecular mechanism of actin filament elongation by formins*. Science, 2024. **384**(6692): p. eadn9560.
50. Hild, G., B. Bugyi, and M. Nyitrai, *Conformational dynamics of actin: effectors and implications for biological function*. Cytoskeleton (Hoboken), 2010. **67**(10): p. 609-29.

51. Dominguez, R., *Actin-binding proteins--a unifying hypothesis*. Trends Biochem Sci, 2004. **29**(11): p. 572-8.
52. Woodrum, D.T., S.A. Rich, and T.D. Pollard, *Evidence for biased bidirectional polymerization of actin filaments using heavy meromyosin prepared by an improved method*. J Cell Biol, 1975. **67**(1): p. 231-7.
53. Jegou, A. and G. Romet-Lemonne, *The many implications of actin filament helicity*. Semin Cell Dev Biol, 2020. **102**: p. 65-72.
54. Dominguez, R., *Nucleotide-dependent conformational changes in the actin filament: Subtler than expected*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019. **116**(10): p. 3959-3961.
55. 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.
56. 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.
57. 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.
58. Sept, D. and J.A. McCammon, *Thermodynamics and kinetics of actin filament nucleation*. Biophys J, 2001. **81**(2): p. 667-74.
59. Pollard, T.D., *Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 2007. **36**: p. 451-77.
60. Fujiwara, I., D. Vavylonis, and T.D. Pollard, *Polymerization kinetics of ADP- and ADP-Pi-actin determined by fluorescence microscopy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(21): p. 8827-32.
61. Jiang, S., et al., *Structural complexity of filaments formed from the actin and tubulin folds*. Commun Integr Biol, 2016. **9**(6): p. e1242538.
62. 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.
63. Reymann, A.C., et al., *Nucleation geometry governs ordered actin networks structures*. Nat Mater, 2010. **9**(10): p. 827-32.
64. Reymann, A.C., et al., *Actin network architecture can determine myosin motor activity*. Science, 2012. **336**(6086): p. 1310-4.
65. 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.
66. Bugyi, B., et al., *Formins regulate actin filament flexibility through long range allosteric interactions*. J Biol Chem, 2006. **281**(16): p. 10727-36.
67. 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.
68. 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.
69. Vedula, P., et al., *Different translation dynamics of β - and γ -actin regulates cell migration*. eLife, 2021. **10**: p. e68712.
70. 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.
71. 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.
72. Gunning, P.W., et al., *The evolution of compositionally and functionally distinct actin filaments*. J Cell Sci, 2015. **128**(11): p. 2009-19.
73. Gunning, P.W., et al., *Tropomyosin - master regulator of actin filament function in the cytoskeleton*. J Cell Sci, 2015. **128**(16): p. 2965-74.
74. 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.

75. Lehman, W., et al., *Tropomyosin and actin isoforms modulate the localization of tropomyosin strands on actin filaments*. J Mol Biol, 2000. **302**(3): p. 593-606.
76. Truebestein, L. and T.A. Leonard, *Coiled-coils: The long and short of it*. Bioessays, 2016. **38**(9): p. 903-16.
77. Christensen, J.R., et al., *Competition between Tropomyosin, Fimbrin, and ADF/Cofilin drives their sorting to distinct actin filament networks*. Elife, 2017. **6**.
78. Christensen, J.R., et al., *Cooperation between tropomyosin and α -actinin inhibits fimbrin association with actin filament networks in fission yeast*. Elife, 2019. **8**.
79. 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.
80. Le Clairche, 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.
81. Rottner, K. and T.E. Stradal, *Actin dynamics and turnover in cell motility*. Curr Opin Cell Biol, 2011. **23**(5): p. 569-78.
82. Small, J.V. and G.P. Resch, *The comings and goings of actin: coupling protrusion and retraction in cell motility*. Curr Opin Cell Biol, 2005. **17**(5): p. 517-23.
83. Dogterom, M. and G.H. Koenderink, *Actin-microtubule crosstalk in cell biology*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019. **20**(1): p. 38-54.
84. Pimm, M.L. and J.L. Henty-Ridilla, *New twists in actin-microtubule interactions*. Mol Biol Cell, 2021. **32**(3): p. 211-217.
85. Cammarata, G.M., E.A. Bearce, and L.A. Lowery, *Cytoskeletal social networking in the growth cone: How +TIPs mediate microtubule-actin cross-linking to drive axon outgrowth and guidance*. Cytoskeleton (Hoboken), 2016. **73**(9): p. 461-76.
86. Colin, A., et al., *Actin-Network Architecture Regulates Microtubule Dynamics*. Curr Biol, 2018. **28**(16): p. 2647-2656.e4.
87. Qu, Y., et al., *Periodic actin structures in neuronal axons are required to maintain microtubules*. Mol Biol Cell, 2017. **28**(2): p. 296-308.
88. Pinto-Costa, R. and M.M. Sousa, *Microtubules, actin and cytolinkers: how to connect cytoskeletons in the neuronal growth cone*. Neurosci Lett, 2021. **747**: p. 135693.
89. Prokop, A., *The intricate relationship between microtubules and their associated motor proteins during axon growth and maintenance*. Neural Dev, 2013. **8**: p. 17.
90. 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.
91. 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.
92. Svitkina, T.M. and G.G. Borisy, *Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia*. J Cell Biol, 1999. **145**(5): p. 1009-26.
93. Vinzenz, M., et al., *Actin branching in the initiation and maintenance of lamellipodia*. J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 11): p. 2775-85.
94. 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.
95. Lai, F.P., et al., *Arp2/3 complex interactions and actin network turnover in lamellipodia*. EMBO J, 2008. **27**(7): p. 982-92.
96. Faix, J. and K. Rottner, *The making of filopodia*. Curr Opin Cell Biol, 2006. **18**(1): p. 18-25.
97. Bartolini, F. and G.G. Gundersen, *Formins and microtubules*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1803**(2): p. 164-73.
98. Small, V. *Cytoskeleton and Cell Migration*. Video sequence of a B16 melanoma cell express-ing GFP-actin]. Available from: <https://vimeo.com/79119757>.
99. 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.

100. Laki, K., K. Maruyama, and D.R. Kominz, *Evidence for the interaction between tropomyosin and actin*. Arch Biochem Biophys, 1962. **98**: p. 323-30.
101. Hardeman, E.C., N.S. Bryce, and P.W. Gunning, *Impact of the actin cytoskeleton on cell development and function mediated via tropomyosin isoforms*. Semin Cell Dev Biol, 2020. **102**: p. 122-131.
102. Geeves, M.A., S.E. Hitchcock-DeGregori, and P.W. Gunning, *A systematic nomenclature for mammalian tropomyosin isoforms*. J Muscle Res Cell Motil, 2015. **36**(2): p. 147-53.
103. Marston, S., *Important announcement: a rational nomenclature for tropomyosin variants*. J Muscle Res Cell Motil, 2015. **36**(2): p. 145.
104. Behrmann, E., et al., *Structure of the rigor actin-tropomyosin-myosin complex*. Cell, 2012. **150**(2): p. 327-38.
105. Hillberg, L., et al., *Tropomyosins are present in lamellipodia of motile cells*. Eur J Cell Biol, 2006. **85**(5): p. 399-409.
106. DesMarais, V., et al., *Spatial regulation of actin dynamics: a tropomyosin-free, actin-rich compartment at the leading edge*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 23): p. 4649-60.
107. Iwasa, J.H. and R.D. Mullins, *Spatial and temporal relationships between actin-filament nucleation, capping, and disassembly*. Curr Biol, 2007. **17**(5): p. 395-406.
108. Gupton, S.L., et al., *Cell migration without a lamellipodium: translation of actin dynamics into cell movement mediated by tropomyosin*. J Cell Biol, 2005. **168**(4): p. 619-31.
109. Bryce, N.S., et al., *Specification of actin filament function and molecular composition by tropomyosin isoforms*. Mol Biol Cell, 2003. **14**(3): p. 1002-16.
110. 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.
111. Boussouf, S.E., et al., *Role of tropomyosin isoforms in the calcium sensitivity of striated muscle thin filaments*. J Muscle Res Cell Motil, 2007. **28**(1): p. 49-58.
112. Rouiller, I., et al., *The structural basis of actin filament branching by the Arp2/3 complex*. J Cell Biol, 2008. **180**(5): p. 887-95.
113. 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.
114. Disanza, A., et al., *Eps8 controls actin-based motility by capping the barbed ends of actin filaments*. Nat Cell Biol, 2004. **6**(12): p. 1180-8.
115. Reymann, A.C., et al., *Turnover of branched actin filament networks by stochastic fragmentation with ADF/cofilin*. Mol Biol Cell, 2011. **22**(14): p. 2541-50.
116. Mogilner, A. and G. Oster, *Force generation by actin polymerization II: the elastic ratchet and tethered filaments*. Biophys J, 2003. **84**(3): p. 1591-605.
117. Mogilner, A. and G. Oster, *Polymer motors: pushing out the front and pulling up the back*. Curr Biol, 2003. **13**(18): p. R721-33.
118. Mogilner, A. and G. Oster, *Cell motility driven by actin polymerization*. Biophys J, 1996. **71**(6): p. 3030-45.
119. Loisel, T.P., et al., *Reconstitution of actin-based motility of Listeria and Shigella using pure proteins*. Nature, 1999. **401**(6753): p. 613-6.
120. Le Clainche, C., D. Pantaloni, and M.F. Carlier, *ATP hydrolysis on actin-related protein 2/3 complex causes debranching of dendritic actin arrays*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(11): p. 6337-42.
121. Sarmiento, C., et al., *WASP family members and formin proteins coordinate regulation of cell protrusions in carcinoma cells*. J Cell Biol, 2008. **180**(6): p. 1245-60.
122. Delatour, V., et al., *Arp2/3 controls the motile behavior of N-WASP-functionalized GUVs and modulates N-WASP surface distribution by mediating transient links with actin filaments*. Biophys J, 2008. **94**(12): p. 4890-905.
123. Weisswange, I., et al., *The rate of N-WASP exchange limits the extent of ARP2/3-complex-dependent actin-based motility*. Nature, 2009. **458**(7234): p. 87-91.

124. Woychik, R.P., et al., '*Formins*': proteins deduced from the alternative transcripts of the limb deformity gene. *Nature*, 1990. **346**(6287): p. 850-3.
125. Zuniga, A., et al., *Mouse limb deformity mutations disrupt a global control region within the large regulatory landscape required for Gremlin expression*. *Genes Dev*, 2004. **18**(13): p. 1553-64.
126. Higgs, H.N. and K.J. Peterson, *Phylogenetic analysis of the formin homology 2 domain*. *Mol Biol Cell*, 2005. **16**(1): p. 1-13.
127. Valencia, D.A. and M.E. Quinlan, *Formins*. *Curr Biol*, 2021. **31**(10): p. R517-R522.
128. Pruyne, D., *Revisiting the Phylogeny of the Animal Formins: Two New Subtypes, Relationships with Multiple Wing Hairs Proteins, and a Lost Human Formin*. *PLoS One*, 2016. **11**(10): p. e0164067.
129. Pruyne, D., *Probing the origins of metazoan formin diversity: Evidence for evolutionary relationships between metazoan and non-metazoan formin subtypes*. *PLoS One*, 2017. **12**(10): p. e0186081.
130. Courtemanche, N., *Mechanisms of formin-mediated actin assembly and dynamics*. *Biophys Rev*, 2018. **10**(6): p. 1553-1569.
131. Shimada, A., et al., *The core FH2 domain of diaphanous-related formins is an elongated actin binding protein that inhibits polymerization*. *Mol Cell*, 2004. **13**(4): p. 511-22.
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.
134. Habas, R., Y. Kato, and X. He, *Wnt/Frizzled activation of Rho regulates vertebrate gastrulation and requires a novel Formin homology protein Daam1*. *Cell*, 2001. **107**(7): p. 843-54.
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.
136. Ajima, R., et al., *DAAM1 and DAAM2 are co-required for myocardial maturation and sarcomere assembly*. *Dev Biol*, 2015. **408**(1): p. 126-39.
137. Kida, Y., T. Shiraishi, and T. Ogura, *Identification of chick and mouse Daam1 and Daam2 genes and their expression patterns in the central nervous system*. *Brain Res Dev Brain Res*, 2004. **153**(1): p. 143-50.
138. Bao, B., et al., *Deletion of a single-copy DAAM1 gene in congenital heart defect: a case report*. *BMC Med Genet*, 2012. **13**: p. 63.
139. Proitsi, P., et al., *Positional pathway screen of wnt signaling genes in schizophrenia: association with DKK4*. *Biol Psychiatry*, 2008. **63**(1): p. 13-6.
140. Kuzman, M.R., et al., *Genome-wide expression analysis of peripheral blood identifies candidate biomarkers for schizophrenia*. *J Psychiatr Res*, 2009. **43**(13): p. 1073-7.
141. Cui, Q. and P. Xie, *Correlation Between Daam2 Expression Changes and Demyelination in Guillain-Barre Syndrome*. *Cell Mol Neurobiol*, 2016. **36**(5): p. 683-8.
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.
143. Bosch, M., et al., *Analysis of the function of Spire in actin assembly and its synergy with formin and profilin*. *Mol Cell*, 2007. **28**(4): p. 555-68.
144. Romero, S., et al., *Formin is a processive motor that requires profilin to accelerate actin assembly and associated ATP hydrolysis*. *Cell*, 2004. **119**(3): p. 419-29.
145. Liu, W., et al., *Mechanism of activation of the Formin protein Daam1*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(1): p. 210-5.
146. Jarmoskaite, I., et al., *How to measure and evaluate binding affinities*. *Elife*, 2020. **9**.
147. 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.

148. Heimsath, E.G. and H.N. Higgs, *The C terminus of formin FMNL3 accelerates actin polymerization and contains a WH2 domain-like sequence that binds both monomers and filament barbed ends*. J Biol Chem, 2012. **287**(5): p. 3087-98.
149. Chhabra, E.S. and H.N. Higgs, *INF2 Is a WASP homology 2 motif-containing formin that severs actin filaments and accelerates both polymerization and depolymerization*. J Biol Chem, 2006. **281**(36): p. 26754-67.
150. Vizcarra, C.L., B. Bor, and M.E. Quinlan, *The role of formin tails in actin nucleation, processive elongation, and filament bundling*. J Biol Chem, 2014. **289**(44): p. 30602-30613.
151. Wear, M.A., et al., *How capping protein binds the barbed end of the actin filament*. Curr Biol, 2003. **13**(17): p. 1531-7.
152. Bombardier, J.P., et al., *Single-molecule visualization of a formin-capping protein 'decision complex' at the actin filament barbed end*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 8707.
153. Shekhar, S., et al., *Formin and capping protein together embrace the actin filament in a ménage à trois*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 8730.
154. Xu, Y., et al., *Crystal structures of a Formin Homology-2 domain reveal a tethered dimer architecture*. Cell, 2004. **116**(5): p. 711-23.
155. Lu, J., et al., *Structure of the FH2 domain of Daam1: implications for formin regulation of actin assembly*. J Mol Biol, 2007. **369**(5): p. 1258-69.
156. Lammers, M., et al., *The regulation of mDia1 by autoinhibition and its release by Rho*GTP*. EMBO J, 2005. **24**(23): p. 4176-87.
157. Bugyi, B., *Wiskott-Aldrich szindróma fehérje homológ 2 domén: a kirakós sokoldalú eleme*. Biokémia, 2015. **XXXIX**(2): p. 11.
158. Renault, L., C. Deville, and C. van Heijenoort, *Structural features and interfacial properties of WH2, β -thymosin domains and other intrinsically disordered domains in the regulation of actin cytoskeleton dynamics*. Cytoskeleton (Hoboken), 2013. **70**(11): p. 686-705.
159. Dominguez, R., *The WH2 Domain and Actin Nucleation: Necessary but Insufficient*. Trends Biochem Sci, 2016. **41**(6): p. 478-490.
160. Paunola, E., P.K. Mattila, and P. Lappalainen, *WH2 domain: a small, versatile adapter for actin monomers*. FEBS Lett, 2002. **513**(1): p. 92-7.
161. 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.
162. 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.
163. Chik, J.K., U. Lindberg, and C.E. Schutt, *The structure of an open state of beta-actin at 2.65 Å resolution*. J Mol Biol, 1996. **263**(4): p. 607-23.
164. Kozlowski, L.P., *IPC - Isoelectric Point Calculator*. Biol Direct, 2016. **11**(1): p. 55.
165. Thompson, M.E., et al., *FMNL3 FH2-actin structure gives insight into formin-mediated actin nucleation and elongation*. Nat Struct Mol Biol, 2013. **20**(1): p. 111-8.
166. Yamashita, M., et al., *Crystal structure of human DAAM1 formin homology 2 domain*. Genes Cells, 2007. **12**(11): p. 1255-65.
167. Bartolini, F., et al., *The formin mDia2 stabilizes microtubules independently of its actin nucleation activity*. J Cell Biol, 2008. **181**(3): p. 523-36.
168. Gaillard, J., et al., *Differential interactions of the formins INF2, mDia1, and mDia2 with microtubules*. Mol Biol Cell, 2011. **22**(23): p. 4575-87.
169. Roth-Johnson, E.A., et al., *Interaction between microtubules and the Drosophila formin Cappuccino and its effect on actin assembly*. J Biol Chem, 2014. **289**(7): p. 4395-404.
170. Henty-Ridilla, J.L., et al., *Accelerated actin filament polymerization from microtubule plus ends*. Science, 2016. **352**(6288): p. 1004-9.
171. Szikora, S., et al., *The formin DAAM is required for coordination of the actin and microtubule cytoskeleton in axonal growth cones*. J Cell Sci, 2017. **130**(15): p. 2506-2519.

172. Földi, I., et al., *Molecular Dissection of DAAM Function during Axon Growth in Drosophila Embryonic Neurons*. Cells, 2022. **11**(9).
173. Foldi, I., S. Szikora, and J. Mihály, *Formin' bridges between microtubules and actin filaments in axonal growth cones*. Neural Regen Res, 2017. **12**(12): p. 1971-1973.
174. Nag, S., et al., *Gelsolin: the tail of a molecular gymnast*. Cytoskeleton (Hoboken), 2013. **70**(7): p. 360-84.
175. Ghoshdastider, U., et al., *The expanding superfamily of gelsolin homology domain proteins*. Cytoskeleton (Hoboken), 2013. **70**(11): p. 775-95.
176. Li, G.H., et al., *Multifunctional roles of gelsolin in health and diseases*. Med Res Rev, 2012. **32**(5): p. 999-1025.
177. Feldt, J., et al., *Structure, regulation and related diseases of the actin-binding protein gelsolin*. Expert Rev Mol Med, 2019. **20**: p. e7.
178. Nag, S., et al., *Ca²⁺ binding by domain 2 plays a critical role in the activation and stabilization of gelsolin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(33): p. 13713-8.
179. Szatmári, D., et al., *ATP competes with PIP2 for binding to gelsolin*. PLoS One, 2018. **13**(8): p. e0201826.
180. Burtnick, 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.
181. Choe, H., et al., *The calcium activation of gelsolin: insights from the 3A structure of the G4-G6/actin complex*. J Mol Biol, 2002. **324**(4): p. 691-702.
182. Strudwick, X.L. and A.J. Cowin, *Multifunctional Roles of the Actin-Binding Protein Flightless I in Inflammation, Cancer and Wound Healing*. Front Cell Dev Biol, 2020. **8**: p. 603508.
183. Kobe, B. and A.V. Kajava, *The leucine-rich repeat as a protein recognition motif*. Curr Opin Struct Biol, 2001. **11**(6): p. 725-32.
184. Campbell, H.D., et al., *The Drosophila melanogaster flightless-I gene involved in gastrulation and muscle degeneration encodes gelsolin-like and leucine-rich repeat domains and is conserved in Caenorhabditis elegans and humans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(23): p. 11386-90.
185. Campbell, H.D., et al., *Fliih, a gelsolin-related cytoskeletal regulator essential for early mammalian embryonic development*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(10): p. 3518-26.
186. Davy, D.A., et al., *The flightless I protein localizes to actin-based structures during embryonic development*. Immunol Cell Biol, 2000. **78**(4): p. 423-9.
187. Kopecki, Z. and A.J. Cowin, *Flightless I: an actin-remodelling protein and an important negative regulator of wound repair*. Int J Biochem Cell Biol, 2008. **40**(8): p. 1415-9.
188. 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.
189. 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.
190. Chen, K.S., et al., *The human homologue of the Drosophila melanogaster flightless-I gene (flii) maps within the Smith-Magenis microdeletion critical region in 17p11.2*. Am J Hum Genet, 1995. **56**(1): p. 175-82.
191. Csábi, G. and T. Tényi, *[Behavioral phenotypes and cognitive characteristics in mental retardation]*. Neuropsychopharmacol Hung, 2006. **8**(3): p. 127-42.
192. 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.
193. 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.
194. Pintér, R., et al., *The activities of the gelsolin homology domains of Flightless-I in actin dynamics*. Front Mol Biosci, 2020. **7**: p. 575077.
195. Vemula, V., et al., *Myosin and gelsolin cooperate in actin filament severing and actomyosin motor activity*. J Biol Chem, 2021. **296**: p. 100181.

196. 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.
197. 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.
198. He, J.P., et al., *Flightless-I Blocks p62-Mediated Recognition of LC3 to Impede Selective Autophagy and Promote Breast Cancer Progression*. Cancer Res, 2018. **78**(17): p. 4853-4864.
199. Bernard, F., J.A. Lepesant, and A. Guichet, *Nucleus positioning within Drosophila egg chamber*. Semin Cell Dev Biol, 2018. **82**: p. 25-33.
200. Spudich, J.A. and S. Watt, *The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin*. J Biol Chem, 1971. **246**(15): p. 4866-71.
201. Le Clainche, C. and M.F. Carrier, *Actin-based motility assay*. Curr Protoc Cell Biol, 2004. **Chapter 12**: p. Unit 12 7.
202. Egile, C., et al., *Activation of the CDC42 effector N-WASP by the Shigella flexneri IcsA protein promotes actin nucleation by Arp2/3 complex and bacterial actin-based motility*. J Cell Biol, 1999. **146**(6): p. 1319-32.
203. Margossian, S.S. and S. Lowey, *Preparation of myosin and its subfragments from rabbit skeletal muscle*. Methods Enzymol, 1982. **85 Pt B**: p. 55-71.
204. Toth, 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.
205. Smillie, L.B., *Preparation and identification of alpha- and beta-tropomyosins*. Methods Enzymol, 1982. **85 Pt B**: p. 234-41.
206. Wioland, H., A. Jégou, and G. Romet-Lemonne, *Celebrating 20 years of live single-actin-filament studies with five golden rules*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2022. **119**(3).
207. Hertzog, M., et al., *The beta-thymosin/WH2 domain; structural basis for the switch from inhibition to promotion of actin assembly*. Cell, 2004. **117**(5): p. 611-23.
208. Lee, S.H., et al., *Structural basis for the actin-binding function of missing-in-metastasis*. Structure, 2007. **15**(2): p. 145-55.
209. Ducka, A.M., et al., *Structures of actin-bound Wiskott-Aldrich syndrome protein homology 2 (WH2) domains of Spire and the implication for filament nucleation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(26): p. 11757-62.
210. 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.
211. Toptygin, D. and L. Brand, *Analysis of equilibrium binding data obtained by linear-response spectroscopic techniques*. Anal Biochem, 1995. **224**(1): p. 330-8.
212. White, S.H., et al., *Protein folding in membranes: determining energetics of peptide-bilayer interactions*. Methods Enzymol, 1998. **295**: p. 62-87.
213. Ladokhin, A.S., S. Jayasinghe, and S.H. White, *How to measure and analyze tryptophan fluorescence in membranes properly, and why bother?* Anal Biochem, 2000. **285**(2): p. 235-45.
214. Lakowicz, J.R., *Principles of fluorescence spectroscopy*. 2006: Springer US.
215. Demchenko, A.P., *Introduction to fluorescence sensing*. 2015: Springer International Publishing.
216. Kouyama, T. and K. Mihashi, *Fluorimetry study of N-(1-pyrenyl)iodoacetamide-labelled F-actin. Local structural change of actin protomer both on polymerization and on binding of heavy meromyosin*. Eur J Biochem, 1981. **114**(1): p. 33-8.
217. 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.
218. Szatmari, D., et al., *Cardiac leiomodin2 binds to the sides of actin filaments and regulates the ATPase activity of myosin*. PLoS One, 2017. **12**(10): p. e0186288.
219. Lee, S., M. Li, and T.D. Pollard, *Evaluation of the binding of Acanthamoeba profilin to pyrene-labeled actin by fluorescence enhancement*. Anal Biochem, 1988. **168**(1): p. 148-55.

- 220. Bugyi, B., et al., *Fénymikroszkópiák a sejtszintű fehérjekutatásban*, in *Ezerarcú fehérjék*, L. Buday, L. Nyitray, and A. Perczel, Editors. 2018: Semmelweis Kiadó.
- 221. Bugyi, B., *Forminfehérjék: aktinösszeszerelő molekuláris gépezetek*. Magyar Tudomány, 2016. **177**(1): p. 4.
- 222. Hanson, J. and J. Lowy., *The structure of F-actin and of actin filaments isolated from muscle*. . Journal of Molecular Biology, 1963. **6**: p. 46-60.
- 223. Liu, W., et al., *IBS: an illustrator for the presentation and visualization of biological sequences*. Bioinformatics, 2015. **31**(20): p. 3359-61.
- 224. Farkas, D., et al., *Peripheral thickening of the sarcomeres and pointed end elongation of the thin filaments are both promoted by SALS and its formin interaction partners*. submitted manuscript; PLOS Genetics, 2023.