

Ph.D. értekezés tézisei

**A Flightless-I gelsolin homológ doménjeinek
szerepe az aktin dinamika szabályozásában**

Pintér Réka



Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar

Biofizika Intézet

2023.

Ph.D. értekezés tézisei

A Flightless-I gelsolin homológ doménjeinek szerepe az aktin dinamika szabályozásában

Pintér Réka

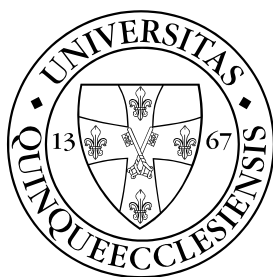
Témavezető: Dr. Bugyi Beáta

Doktori Iskola: Interdiszciplináris Orvostudományok (D93)

Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Balázs Sümegei†, ifj. Prof. Dr. Ferenc Gallyas

Program: Funkcionális fehérjedynamika vizsgálata biofizikai módszerekkel (B-130/199)

Doktori program vezetője: Prof. Dr. Nyitrai Miklós



Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Biofizika Intézet

2023.

BEVEZETÉS

A Flightless-I (Fli-I) egy viszonylag újonnan azonosított fehérje, melyet először a *Drosophila melanogaster*-ben fedeztek fel 1993-ban, majd később a humán változatát 1997-ben (Campbell et al, 1993, Campbell et al, 1997). A fehérjét érintő génmutációk miatt a repülőizmok miofibrillumaiában rendellenességek jöhetnek létre, melyek röpképtelenséget okozhatnak az ecetmuslicákban (Campbell et al, 1993). A Fli-I a gelsolin (GSN) szupercsalád tagja, amely magába foglal más aktin kötő fehérjéket is, mint a gelsolin, villin, adseverin, capG, advillin és a supervillin. Ezek az aktin kötő fehérjék változatos funkcióval rendelkeznek, és fontos szerepet játszanak az aktin citoszkeleton szervezésében. Különböző módokon szabályozhatják az aktin dinamikát: meglévő filamentumok fragmentálása (*severing*), kötegelése, filamentum végek sapkázása vagy új filamentumok *de novo* nukleációjának elősegítése révén (Cowin et al., 2006, Kopecki and Cowin, 2007). A család alapító tagját, a gelsolint jellemezték eddig a legrészletesebben; a fehérje részt vesz az aktin filamentumok fragmentációjában, a filamentum végek sapkázásában és a *de novo* nukleációban (Cowin et al., 2006, Kopecki and Cowin, 2007).

Az aktin citoszkeleton minden élőlényben megtalálható az archeáktól az eukariótáig; fontos szerepet játszik a sejtek alakjának és funkcióinak a fenntartásában (Kopecki and Cowin, 2007). A gelsolin család tagjaihoz hasonlóan, a Fli-I is egy nagymértékben konzervált fehérje, amely arra utal, hogy létfontosságú funkciókkal rendelkezik. A fehérje mind a gerinces, mind a gerinctelen állatokban megtalálható (Kopecki and Cowin, 2007). Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy a Fli-I hiánya homozigóta egerekben már az embriogenezis korai szakaszában letalitást okoz, ami jelzi a fehérje elengedhetetlen szerepét az egyedfejlődés során (Campbell et al., 2002). A *Fli-I* mutációja ecetmuslicák esetében nem okoz letalitást és valószínű, hogy az egyedek normális embrionális fejlődésen mennek keresztül, viszont a repülőizmok abnormalitása miatt röpképességük csökkenhet (Davy et al., 2000). A Fli-I széleskörű szöveti eloszlást mutat, főleg a váz-, és szívizom, valamint az idesejtekben fordul elő (Campbell et al., 1997). A Fli-I megtalálható a sejtmagban, ahol hormon-aktivált nukleáris receptor ko-aktivátorként működik (Davy et al., 2000). Szérumban jelenlétében a fehérje transzlokálódik a magból a citoplazmába, ahol szerepet játszik a sejtmigrációban, mely összefüggésben lehet a sebgyógyulással és a szöveti regenerációra gyakorolt negatív hatásával (Cowin et al., 2007). Vizsgálatok igazolták, hogy a Fli-I mennyiségének a csökkentése akár genetikai úton, akár Fli-I neutralizáló antitest alkalmazásával csökkentheti a fibrózis és a túlzott hegszövetképződés súlyosságát (Jackson et al., 2012, Cameron et al., 2016).

A Fli-I egyedi felépítéssel rendelkezik, amely két fehérjecsalád, a leucine-rich-repeat (LRR) és gelsolin homológ (GH) fehérjék szerkezeti jellemzőit ötvözi. Kimutatták, hogy a Fli-I más fehérjékkel kölcsönhatva részt vehet jelátviteli folyamatokban, befolyásolhatja az aktin dinamikát vagy a sejt migrációt (Kopecki and Cowin, 2007). A Fli-I LRR régió 16 tandem 23 aminosavból álló motívumot tartalmaz (Liu and Yin, 1998, Matsushima et al., 2010). Goshima és munkatársai (1999) vizsgálatai kimutatták, hogy a *C. elegans* Fli-I LRR szakasza kötődik a Ras fehérjéhez és ez által közreműködhet a citoszkeleton szabályozásában. A Ras fehérjék a génexpresszió, a sejtprolifерáció és differenciáció szabályozói, de szerepet játszanak az onkogenezisben is. A Fli-I hat GH domént tartalmaz, amelyek eltérően befolyásolhatják az aktin dinamikát (Arora et al., 2015). Habár a Fli-I aktin kötő képességét igazolták, a funkcionális hatása még nem tisztázott (Goshima et al., 1999, Mohammad et al., 2012). A *C. elegans* fehérjével végzett vizsgálatok arra utalnak, hogy az Fli-I EGTA (10 mM) jelenlétében is képes kölcsönhatást kialakítani az aktinnal, ami Ca^{2+} -független interakciót jelez (Goshima et al., 1999). Szedimentáción alapuló kísérletekben a Fli-I az aktin filamentumokkal együtt megfigyelhető volt a pelletben, valamint a nem polimerizált aktin mennyisége növekedett a felülúszóban, amit F-aktin fragmentáló aktivitásként értelmeztek (Goshima et al., 1999). Pirén jelölt aktin alapú fluoreszcencia spektroszkópiai kísérletekben a Fli-I koncentrációfüggő módon gátolta az aktin filamentumok összeszerelődését, ugyanakkor a szétszerelődésüket nem befolyásolta jelentősen (Mohammad et al., 2012). Ez arra a következtetésre vezetett, hogy a Fli-I rendelkezik aktin filamentumvég sapkázó aktivitással, de nem rendelkezik *severing* aktivitással. Arora és mtsai (2015) kimutatták, hogy az Fli-I GH16 doménjei gátolják az aktin polimerizációt, míg a trunkált Fli-I GH26 nem volt hatással a folyamatra, ami arra utal, hogy a Fli-I aktinnal kapcsolatos funkciója a GH1 doménjéhez köthető. Az aktinnal kialakított direkt kölcsönhatásai mellett a Fli-I befolyásolhatja az aktin kötő formin fehérjék, köztük a Daam1 és mDia1 nukleációs aktivitását azáltal, hogy a Daam1-hez és mDia1-hez kötődik a GH46 régióján keresztül (Higashi et al., 2010).

Bár számos tanulmányt foglalkozott az Fli-I aktin dinamikára gyakorolt hatásával, a fehérje biológiai funkcióinak hátterében álló molekuláris mechanizmusok még mindig ellentmondásosak és hiányosak. A Fli-I működésének részletesebb megismerése érdekében célul tűztük ki a fehérje különböző régióinak (gelsolin homológ (GH) domének, leucin gazdag szegmens (LRR)) aktin aktivitásainak vizsgálatát biokémiai és biofizikai eszközökkel.

CÉLKITŰZÉSEK

Kutatásunk célja az volt, hogy a Flightless-I citoplazmatikus biológiai funkciójának háttérében álló molekuláris mechanizmusokat megismerjük és bővítsük az ezzel kapcsolatos ismereteket. A vizsgálatok során tanulmányoztuk a fehérje egyes szakaszainak aktinnal kialakított kölcsönhatását *in vitro* rendszerekben. A Fli-I gelsolin homológ doménjei felelősek az aktinkötő aktivitásért, ezért elsősorban a GH domének hatásait vizsgáltuk az aktin dinamikára.

Profilin egy aktin kötő fehérje, amely fontos szerepet játszik a celluláris aktin struktúrák felépítésében. Kísérleteket végeztünk, hogy kiderítsük a profilin milyen módon befolyásolja a Fli-I aktin kötő aktivitását. A Fli-I és a gelsolin aktin aktivitásainak összehasonlító vizsgálatát szintén elvégeztük, hogy feltárjuk a GH domének közötti hasonlóságokat és különbségeket.

Munkám során az alábbi kérdésekre kerestem a választ:

- Milyen aktivitásokkal bír a Flightless-I fehérje az aktin dinamika szabályozásában?
- Hogyan járulnak hozzá a fehérje egyes régiói (LRR és GH domének) az aktin aktivitásokhoz?
- Milyen hasonlóságok és különbségek mutathatók ki a gelsolin és a Flightless-I aktinnal kialakított kölcsönhatásában?
- Befolyásolja a profilin a Flightless-I aktin aktivitásait? Milyen hatással van a profilin a Flightless-I:aktin kölcsönhatásra?

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A vizsgált fehérjék előállítása és fluoreszcens jelölése

A Flightless-I (Fli-I, *D. melanogaster*, GenBank accession no. Q24020) fehérje fragmentumait rekombináns GST-fúziós fehérjeként *E. coli* expressziós rendszerben termeltettük meg. A preparáláshoz a plazmidokat Mihály József és munkacsoportja (Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Genetikai Intézet) készítette el a számunkra; a GH16 domén szekvenciát pGEX-6P1, míg az LRR, a GH13 és a GH46 doméneket tartalmazó génszakaszt pGEX-2T vektorba inszertálták. A plazmidokat *E. coli* BL21(DE3)pLysS (Novagen) kompetens sejtekbe transzformáltuk. A Fli-I fehérjét affinitás kromatográfiás módszerrel tisztítottuk, melynek során Glutathione Sepharose 4B (Sigma-Aldrich) oszlopot használtunk. Az aktint nyúl vázizomból nyert acetoneforgácsból tisztítottuk (Feuer et al., 1948). A fluoreszcencia spektroszkópiai és mikroszkópiai vizsgálatokhoz az aktint fluoreszcens jelölőkkel (pirén, Alexa488NHS és Alexa568NHS) módosítottuk standard eljárások szerint (Bugyi et al, 2006; Barko et al., 2010; Bugyi et al, 2010; Bugyi, Didry et a., 2010; Toth et a., 2016). A gelsolin (humán) és a profilin 1 (egér) a már korábban leírt módszerek szerint kerültek tisztításra (Perelroizen et al., 1994; Nag et a., 2009). A DAAM (*D. melanogaster*) fehérje fragmentumait Vig és munkatársai (2017) alapján izoláltuk.

Fluoreszcencia spektroszkópiai vizsgálatok

A **polimerizációs/depolymerizációs** kísérletekben gél filtrált aktin használtunk, melynek koncentrációját a mintákban 2,5 μM -ra (2% és 5%-ban pirén-jelölt) állítottuk be. A polimerizációt 1 mM MgCl_2 és 50 mM KCl hozzáadásával indítottuk. A mérés során a Fli-I fehérjét különböző koncentrációkban adtuk a mintákhoz. A profilint tartalmazó mintákban a profilin koncentrációja 6 μM volt, az aktin pedig 2%-ban volt pirén jelölt. A polimerizáció nyomon követésére Safas Xenius FLX spektrofluorimétert használtunk ($\lambda_{\text{gerjesztés}} = 365 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emisszió}} = 407 \text{ nm}$). A polimerizáció sebességét úgy számoltuk, hogy egyenest illesztettünk a polimerizációs görbék lineáris szakaszára és meghatároztuk ezeknek az egyeneseknek a meredekségét.

A **steady-state anizotrópia kísérletek** során a Fli-I és a G-aktin kölcsönhatását tanulmányoztuk. A vizsgálat során Alexa488NHS jelölt aktint (0,2 μM) használtunk, melyet LatranculinA-val (LatA, 4 μM) inkubáltunk. A Fli-I fehérjét különböző koncentrációkban adtuk az aktinhoz és mértük az anizotrópiában bekövetkező változást. Egyes esetekben profilint

(4 μM) is adtunk a mintákhoz a LatA-val történő inkubálást követően. A vizsgálatokhoz Horiba Jobin Yvon Fluorolog 3 spektrofluorimétert használtunk ($\lambda_{\text{gerjesztés}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emisszió}} = 516 \text{ nm}$).

Teljes belső visszaverődésen alapuló fluoreszcencia mikroszkópai (TIRFM) vizsgálatok

TIRFM módszerrel vizsgáltuk a Fli-I aktinnal kialakított kölcsönhatásait. Az „egyszínű”, azaz egy adott spektrális tulajdonságú fluorofórral jelölt aktin alkalmazásán alapuló TIRFM kísérletek átfogó képet adtak a fehérjék aktin dinamikára (polimerizáció/depolymerizáció) gyakorolt hatásairól az egyedi filamentumok szintjén. Az aktint (0,5 μM , 10%-ban Alexa488NHS jelölt) 1 mM MgCl_2 és 50 mM KCl hozzáadásával polimerizáltuk, különböző koncentrációjú Fli-I jelenlétében vagy hiányában. Az Alexa488NHS és Alexa568NHS jelölt aktin együttes alkalmazásán alapuló TIRFM kísérletekben specifikusabban tudtuk vizsgálni az aktin filamentum végeken történő kölcsönhatásokat. G-aktint (0,5 μM , 10%-ban Alexa488NHS jelölt) polimerizáltuk az áramlási cellában, amíg “zöld” filamentumokat nem kaptunk, majd a be nem polimerizált aktint kimostuk a cellából. Ezután a „piros” aktin (0,5 μM , 10%-ban Alexa568NHS jelölt), profilin (2 μM) és Fli-I keverékét mértük a cellába. A depolymerizációs kísérletekben G-aktint (0,5 μM , 10%-ban Alexa488NHS jelölt) polimerizáltunk, majd különböző mennyiségű Fli-I-t, illetve gelsolint mértünk a mintákhoz. A filamentumok vég-vég kapcsolódását vizsgáló, annealing kísérletekben G-aktint (1 μM , 10%-ban Alexa488NHS, illetve 10%-ban Alexa568NHS jelölt) 1 órán keresztül szobahőmérsékleten polimerizáltunk. A keletkezett aktin filamentumokat falloidinnel (1:1 moláris arány) stabilizáltuk éjszakán át. A különböző fluorofórral jelölt filamentumokat összekevertük, majd fecskendővel (26G, 10 \times) fragmentáltuk Fli-I jelenlétében (120 nM) és hiányában. A mintákat kihígítottuk F-pufferben (2 nM F-aktin) és poly-L-lysine-el kezelt fedőlemezre vittük fel a mikroszkópai elemzés céljából. Az aktin filamentumok *steady-state* számának meghatározásához G-aktint (2 μM) polimerizáltunk Fli-I GH16 jelenlétében (800 nM) és hiányában, éjszakán át; a filamentumokat Alexa FluorTM 488 falloidinnel (1:1) stabilizáltuk. A mintákat kihígítottuk F-pufferben (5 nM F-aktin) és poly-L-lysine-el kezelt fedőlemezre vittük fel a mikroszkópai elemzés céljából.

Képkalkotás és képelemzés

Az aktin polimerizáció/depolymerizáció folyamatáról a felvételeket egy TIRF modullal felszerelt Olympus IX81 inverz fluoreszcencia mikroszkóppal készítettük (lézer vonalak: 491 nm, 561 nm; 60x objektív, NA1.45; Hamamatsu Orca-ER high-resolution digital B/W CCD

kamera). A kinetikai elemzéshez a képeket 10,5 másodpercenként rögzítettük. A képelemzéshez a Fiji szoftvert használtuk. Az aktin filamentumok számát és hosszát a képek egy $66 \times 66 \mu\text{m}^2$ területére vonatkozóan határoztuk meg.

Statisztikai analízis

A disszertációban bemutatott adatok legalább két független mérésből származnak. A statisztikai elemzést Microsoft Excel programmal végeztük (ns $p > 0.05$, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$).

EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

A Flightless-I aktin kölcsönhatása és aktin dinamikára kifejtett hatása Ca^{2+} független

A Fli-I aktin dinamikára gyakorolt hatását vizsgáltuk Ca^{2+} hiányában és jelenlétében fluoreszcencia spektroszkópiai kísérletekben. Méréseink során vizsgáltuk mind a hat GH domént tartalmazó szakaszt (Fli-I GH16), valamint az N-és C-terminális fragmenteket is (Fli-I GH13 és GH46).

A Fli-I GH domének G-aktinnal való kölcsönhatását *steady-state* anizotrópia mérésekben vizsgáltuk fluoreszcensen jelölt G-aktin alkalmazásával (0,2 μM , Alexa488NHS jelölt). A kontrol mintákban a gelsolin gyengén; viszonylag kis affinitással kötődött az aktin monomerekhez Ca^{2+} ion hiányában (1 mM EGTA), míg 1 mM CaCl_2 jelenlétében jelentős volt az interakció. A Fli-I GH16 aktin monomerekhez történő hozzáadása, még CaCl_2 hiányában is, az anizotrópia növekedését eredményezte, ami a G-aktin és a Fli-I GH doménjeinek közvetlen kötésére utal. Hasonló megfigyelést tettünk a Fli-I GH13 esetében is, míg a Fli-I GH46 nem befolyásolta az anizotrópiát.

A kontroll kísérletekben, Ca^{2+} mentes környezetben (1 mM EGTA) a gelsolin nem befolyásolta számottevően az aktin polimerizációt, míg Ca^{2+} jelenlétében (1 mM CaCl_2) jelentősen gyorsította azt. A Fli-I GH16 és GH13 (5 nM) gátolta az aktin polimerizációt Ca^{2+} hiányában és jelenlétében is. Ezzel szemben az Fli-I GH46 (5 nM) a kalcium jelenlététől függetlenül nem volt hatással az aktin filamentumok összeszerelődésére.

Eredményeink arra engednek következtetni, hogy *a Fli-I kalcium hiányában is képes kötődni az aktin monomerekhez és befolyásolni a polimerizációt, amely azt jelzi, hogy szemben a gelsolinnal, a Fli-I aktin aktivitása kalcium független.*

A Flightless-I aktin polimerizációra kifejtett hatása bifázisos, ami a Fli-I GH13 régióhoz köthető

A Fli-I GH doménjeinek az aktin dinamikára gyakorolt hatását vizsgáltuk pirén aktin alapú polimerizációs kísérletekben. A Fli-I GH16 a koncentráció függvényében különböző módokon befolyásolta az aktin polimerizációt. Alacsonyabb koncentrációban (< 10 nM) lassította a polimerizációt, míg magasabb koncentrációban (> 25 nM) gyorsította azt. A továbbiakban azt is vizsgáltuk, hogy a fent említett hatásokért a Fli-I mely szakaszai felelősek. A Fli-I GH13 hatása mind kvalitatív, mind pedig kvantitatív módon megegyezett a Fli-I GH16 hatásával. Ezzel szemben, a Fli-I GH46 jelentős hatással nem volt a polimerizációra. Ahhoz, hogy a változásokat az egyedi filamentumok szintjén is megvizsgáljuk TIRF mikroszkópiai

módszert alkalmaztunk. A Fli-I GH16 (10 nM) jelenlétében rövidebb aktin filamentumok jöttek létre és a filamentumok száma is jelentősen csökkent. Összhangban a polimerizációs vizsgálataink eredményével, a Fli-I GH13 (10 nM) ugyanolyan gátló hatással volt aktin polimerizációra, mint a Fli-I GH16 (10 nM). A Fli-I GH46 nem volt hatással sem az aktin filamentumok számára, sem azok elongációjának sebességére. Eredményeink alapján *a Fli-I többféle módon; aktivitáson keresztül is befolyásolhatja az aktin dinamikát, ami a Fli-I GH13 régióinak tulajdonítható.*

A Fli-I LRR régiójának a hatását is vizsgáltuk az aktin dinamikára. Az aktin monomerek (0,2 μM , Alexa488NHS jelölt G-aktin) *steady-state* anizotrópiájában Fli-I LRR jelenlétében nem volt kimutatható szignifikáns változás. A Fli-I LRR nem befolyásolta az aktin polimerizáció kinetikáját sem. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy *a Fli-I LRR régiója nem hat kölcsön az aktinnal.*

A Flightless-I szöges vég sapkázó aktivitása révén akadályozza az aktin filamentumok növekedését

A polimerizáció során az aktin filamentumok szöges vég elongációja a meghatározó. A TIRF mikroszkópiai eredmények alapján viszonylag alacsony, nM-os koncentrációban a Fli-I gátolja az aktin filamentumok összeszerelődését. Ez nagy affinitású kölcsönhatást feltételez és a monomerek filamentumba épülésének gátlásából adódhat (monomer szekvesztrálás, szöges vég sapkázás). Figyelembe véve a Fli-I:G-aktin kölcsönhatás disszociációs állandóját (*steady-state* anizotrópia mérések, $K_D \sim 500$ nM), 10 nM Fli-I – amely a TIRF mérésekben gátolta a polimerizációt (0,5 μM G-aktin) – az aktin monomerek kb. 1%-val alkot komplexet, ami megközelítőleg 5 nM-t jelent. Ez viszont a polimerizáció sebességében elhanyagolható ($\sim 1.4\%$) csökkenést eredményezne. A Fli-I aktin monomerhez való kötődése tehát nem magyarázza azt a polimerizáció gátlást, amit már viszonylag alacsony fehérje koncentráció mellett megfigyeltünk a pirén fluoreszcencia spektroszkópiai és TIRFM mérésekben. Mindezek alapján feltételezzük, hogy a Fli-I az aktin filamentumok szöges végén, sapkázó aktivitása révén akadályozza az összeszerelődést. A Fli-I sapkázó aktivitását TIRFM alapú annealing kísérletekben vizsgáltuk, melynek során mechanikusan fragmentált filamentumok vég-vég kapcsolódását mértük. Fli-I hiányában a filamentumok hosszirányú növekedése, azaz az annealing megfigyelhető volt. Mind a Fli-I GH16, mind pedig a GH13 jelenlétében (120 nM) a filamentumok rövidek maradtak, nem kapcsolódtak össze egymással. Fli-I GH4-6 esetén nem észleltünk ilyen gátló hatást. Eredményeink arra utalnak, hogy *a Fli-I a szöges véggel kialakított*

kölcsönhatásán keresztül, a sapkázó aktivitása révén gátolja a filamentumok vég-vég kapcsolódását.

A Flightless-I nem befolyásolja az aktin filamentumok szétszerelődését, de elősegíti a nukleációs intermedierek kialakulását

A pirén polimerizációs kísérletekben a Fli-I viszonylag nagy koncentrációban (105 nM) elősegítette a polimerizációt, ami fokozottabb nukleációval és/vagy az aktin filamentumok fragmentációjával – és így a szöges végek számának növekedésével – magyarázható. A fragmentációs aktivitás vizsgálatára az aktin filamentumok depolimerizációjának kinetikáját követtük nyomon pirén fluoreszcencia spektroszkópiai és TIRFM kísérletekben. A filamentumok spontán depolimerizációja viszonylag lassú, míg a gelsolin Ca^{2+} függő módon gyorsítja az aktin filamentumok szétszerelődését. A Fli-I konstruktok jelenlétében (105 nM) a filamentumok depolimerizációjában szignifikáns eltérést nem tapasztaltunk a spontán szétszerelődéshez képest. A Fli-I aktin filamentumok szétszerelődésére gyakorolt hatását TIRFM kísérletekben is megvizsgáltuk; a kvantitatív elemzés érdekében a filamentumok által lefedett területet határoztuk meg. A gelsolin esetén (0,5 nM, 1 mM CaCl_2 jelenlétében) a filamentumok területe jelentősen csökkent a kontrollhoz képest, ami összhangban van azzal, hogy a gelsolin aktívan elősegíti a filamentumok szétszerelődését (fragmentáció, *severing*). A Fli-I GH16 és GH13 szakasza (105 nM) azonban nem befolyásolta szignifikánsan ezt a paramétert. *A gelsolinnal ellentétben tehát a Fli-I GH doménjei nem képesek elősegíteni az aktin filamentumok szétszerelődését; nem rendelkeznek szevering aktivitással.*

Az anizotrópia méréseink igazolják a Fli-I aktin monomer kötő képességét, ezért azt feltételezzük, hogy a Fli-I polimerizációt elősegítő hatása a *de novo* nukleációs aktivitásából fakad. Ennek vizsgálatára TIRFM mérések során a filamentumok *steady-state* számát határoztuk meg. Fli-I GH16 jelenlétében (800 nM) lényegesen több filamentum volt megfigyelhető a kontroll mintához képest. Ugyanakkor ezek hossza is jelentősen rövidebb volt, mint a kontroll mintában, ami összhangban van a Fli-I szöges vég sapkázó aktivitásával. Eredményeink alapján *a Fli-I nem az aktin filamentumok fragmentációja révén segíti elő a polimerizációt, hanem az aktin monomerekkel való kölcsönhatása révén, katalizálva a nukleációs intermedierek képződését.*

A Flightless-I sapkafehérjeként működik profilin jelenlétében

A sejtekben a profilin:G aktin komplex fontos szerepet játszik az aktin sejtváz felépítésében, ezért vizsgálatokat végeztünk, arra vonatkozóan, hogy a profilin milyen hatással

van a Fli-I:aktin kölcsönhatásra. A Fli-I GH16 és GH13 gátolta a profilin:G aktin összeszerelődését, azonban a szabad G-aktin polimerizációja esetén megfigyelt gyorsító hatást magas Fli-I koncentrációkon nem tapasztaltuk. A profilin jelenlétében észlelt polimerizációt elősegítő hatás hiánya azt jelzi, hogy a profilin befolyásolja van a Fli-I és a G-aktin kölcsönhatását. Ezt megerősítik *steady-state* anizotrópia méréseink, amelyek szerint a Fli-I GH13 G-aktin affinitása lényegesen kisebb profilin jelenlétében ($K_D \sim 4500$ nM), mint annak hiányában ($K_D \sim 500$ nM). Eredményeink arra utalnak, hogy *a profilin nem befolyásolja a Fli-I szöges vég sapkázó aktivitását, viszont gátolja annak nukleációs aktivitását*. Ez arra enged következtetni, hogy *a profilin és a Fli-I kompetitív módon kötődnek az aktin monomerhez*.

A Flightless-I GH46 szakasza kölcsönhat a DAAM C-terminálisával és gátolja annak aktin polimerizációra gyakorolt hatását

A vizsgálatainkban azt tapasztaltuk, hogy a Fli-I GH46 nem befolyásolta az aktin dinamikát, ezért kíváncsiak voltunk, milyen kölcsönhatásokban játszhat szerepet. Kutatások kimutatták, hogy a fehérje GH46 doménjén keresztül közvetlenül kötődik a humán DAAM fehérjéhez, ezáltal befolyásolva annak aktin aktivitásait (Higashi et al., 2010). Megvizsgáltuk a Fli-I GH46 és a *D. melanogaster* DAAM fehérje kölcsönhatását pirén polimerizációs kísérletekben. Ezek során a DAAM N terminálisán trunkált/mutált konstitutívan aktív formáit használtuk (DAAM FH1FH2, cDAAM = DAAM FH1FH2-DAD-CT). A Fli-I GH46 nem befolyásolta a DAAM FH1FH2 aktin összeszerelődést elősegítő hatását, viszont koncentráció függő módon gátolta a cDAAM által katalizált aktin polimerizációt. Eredményeink összhangban vannak az eddigi irodalmi adatokkal, mi szerint *a Fli-I GH46 kötődik a DAAM DAD-CT régiójához és ezáltal befolyásolja az aktin polimerizációt*. Azon kívül, hogy *közvetlenül is képes kölcsönhatni az aktinnal, ez a folyamat a Fli-I hatásmechanizmusának akár egy alternatív útvonala is lehet, melynek révén a Fli-I képes aktiválni a DAAM-ot és ezáltal közvetetten befolyásolni aktin dinamikát*.

ÖSSZEFOGLALÁS

Munkám során a Flightless-I fehérje aktin dinamikára gyakorolt hatását vizsgáltam. A fehérje a gelsolin szupercsalád tagjaihoz hasonlóan számos funkcióval rendelkezik és fontos szerepet játszik az aktin sejtvez szabályozásában. A Fli-I citoplazmatikus biológiai funkcióinak hátterében álló molekuláris mechanizmusok megértéséhez a fehérje különböző régióinak aktinnal kialakított kölcsönhatásait vizsgáltam *in vitro* rendszerekben.

Elért új eredmények összefoglalása:

- A Flightless-I LRR és GH szakaszait sikeresen állítottuk elő *E.coli* rendszerben.
- A Flightless-I kölcsönhat mind az aktin monomerekkel (kis affinitású kölcsönhatás), mind pedig a filamentumokkal (nagy affinitású kölcsönhatás).
- A Flightless-I ezen kölcsönhatások révén elősegíti a filamentumok nukleációját (kis affinitású kölcsönhatás), ugyanakkor sapkafehérjeként gátolja azok elongációját (nagy affinitású kölcsönhatás).
- A Flightless-I, szemben a gelsolinnal, nem rendelkezik fragmentáló (*severing*) aktivitással.
- A Flightless-I aktin aktivitásaiban meghatározók a GH13 domének; az LRR és a GH46 szakasznak nincs közvetlen hatása az aktin dinamikára.
- A profilin feltehetően nem befolyásolja a Flightless-I sapkázó hatását, azonban gátolja a fehérje nukleációs aktivitását.
- A Flightless-I:aktin kölcsönhatás kalcium független, ellentétben a gelsolinnal, melyek aktivitását jelentős mértékben befolyásolja a Ca^{2+} ion koncentrációja. Ez feltételezhetően azzal magyarázható, hogy a legfőbb Ca^{2+} kötő helyek nem konzerváltak a két fehérjében.
- A Flightless-I GH46 képes direkt kölcsönhatást kialakítani DAAM C-terminális DAD-CT régiójával, ezáltal közvetett módon gátolja a DAAM aktin polimerizációra gyakorolt hatását.

Eredményeink biológiai jelentőségét hangsúlyozva feltételezzük, hogy az intracelluláris környezetben a Flightless-I sapkázó aktivitásán keresztül gátolhatja az aktin filamentumok növekedését és ez által negatív módon befolyásolhatja a sejt migrációt, amely kulcsfontosságú a sebgyógyulás és szöveti regeneráció folyamatában.

IRODALOMJEGYZÉK

1. 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1993. 90(23):11386.
2. Campbell, H.D. Genomic structure, evolution, and expression of human FLII, a gelsolin and leucine-rich-repeat family member: overlap with LLGL. *Genomics*. 1997. 42(1):46-54.
3. Kopecki, Z., Cowin, A.J. Flightless I: an actin-remodelling protein and an important negative regulator of wound repair. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008. 40(8):1415-9.
4. Cowin, A.J et al. Flightless I deficiency enhances wound repair by increasing cell migration and proliferation. *J Pathol*. 2007. 211(5):572-81.
5. Campbell, H.D., et al. Fliih, a gelsolin-related cytoskeletal regulator essential for early mammalian embryonic development. *Mol. Cell. Biol*. 2002. 22(10):3518-26.
6. Davy, D.A., et al. The flightless I protein localizes to actin-based structures during embryonic development. *Immunol Cell Biol*. 2000. 78(4):423-9.
7. Liu, Y.T. and Yin, H.L. Identification of the binding partners for flightless I, A novel protein bridging the leucine-rich repeat and the gelsolin superfamilies. *J Biol Chem*. 1998. 273(14):7920-7.
8. Matsushima, N., et al. A nested leucine rich repeat (LRR) domain: The precursor of LRRs is a ten or eleven residue motif. *BMC Microbiology*. 2010. 10:235.
9. 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):2279-2297.
10. Goshima, M., et al. Characterization of a Novel Ras-Binding Protein Ce-FLI-1 Comprising Leucine-Rich Repeats and Gelsolin-like Domains. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1999. 257(1):111-116.
11. Mohammad, I., et al. Flightless I is a focal adhesion-associated actin-capping protein that regulates cell migration. *The FASEB Journal*. 2012. 26(8):3260-3272.
12. 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. *Journal of Biological Chemistry*, 2010. 285(21):16231-16238.
13. Ghoshdastider, U., et al. The expanding superfamily of gelsolin homology domain proteins. *Cytoskeleton (Hoboken)*, 2013. 70(11):775-795.

14. Jackson, J.E., et al. Flii neutralizing antibodies improve wound healing in porcine preclinical studies. *Wound Repair Regen.* 2012. 20(4):523-536.
15. Cameron, A.M., et al. Flightless I is a key regulator of the fibroproliferative process in hypertrophic scarring and a target for a novel antiscarring therapy. *Br. J. Dermatol.* 2016. 174(4):786-794.
16. Feuer, G. et al., Studies on the composition and polymerization of actin. *Hung Acta Physiol.* 1948. 1(4-5):150-163.
17. Bugyi, B. and M.F. Carrier. Control of actin filament treadmilling in cell motility. *Annu Rev Biophys.* 2010. 39:449-70.
18. Bugyi, B. et al. Formins regulate actin filament flexibility through long range allosteric interactions. *J Biol Chem.* 2006. 281(16):10727-10736.
19. 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):667-80.
20. Barko, S., et al. Characterization of the biochemical properties and biological function of the formin homology domains of *Drosophila* DAAM. *J Biol Chem.* 2010. 285(17):13154-13169.
21. Perelroizen, I. et al. Interaction of profilin with G-actin and poly(L-proline). *Biochemistry.* 1994. 33(28):8472-8.
22. Nag, S. et al. Ca²⁺ binding by domain 2 plays a critical role in the activation and stabilization of gelsolin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009. 106(33):13713-8.
23. 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. 18;292(33):13566-13583.

PUBLIKÁCIÓS LISTA

A Ph.D. munkámhoz kapcsolódó publikációk

Réka Pintér, Tamás Huber, Péter Bukovics, Péter Gaszler, Andrea Vig, Mónika Ágnes Tóth, Gabriella Gázsó-Gerhát, Dávid Farkas, Ede Migh, József Mihály and Beáta Bugyi
The activities of the gelsolin homology domains of Flightless-I in actin dynamics. *Front Mol Biosci.* 2020; 7:575077
IF: 5.246, Q1

Andrea Teréz Vig, István Földi, Szilárd Szikora, Ede Migh, Rita Gombos, Mónika Ágnes Tóth, Tamás Huber, **Réka Pintér**, Gábor Csaba Talián, József Mihály and Beáta Bugyi
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):13566–13583.
IF: 4.011, Q1/D1

A Ph.D. munkámhoz kapcsolódó előadások, posztterek

Péter Gaszler, **Réka Pintér**, Péter Bukovics, Rauan Sakenov, Tamás Huber, Andrea Teréz Vig, Mónika Ágnes Tóth, Veronika Takács-Kollár, Beáta Bugyi
Comparative Analyses of the Gelsolin Homology Domains of Gelsolin and Flightless-I. The 2nd International Electronic Conference on Biomolecules: Biomacromolecules and the Modern World Challenges/online, November 1-15th 2022

Péter Gaszler, Rahmah Hanifatul, **Réka Pintér**, Péter Bukovics, Rauan Sakenov, Tamás Huber, Andrea Teréz Vig, Mónika Ágnes Tóth, Beáta Bugyi
Structural and functional analyses of the gelsolin homology domains of Flightless-I in actin dynamics. *FASEB Journal* 2021; 35:00391

Réka Pintér, Budiman Hanifatul Rahmah, Rauan Sakenov, Tamás Huber, Péter Bukovics, Péter Gaszler, Beáta Bugyi
The activities of the gelsolin homology domains of Flightless-I in actin dynamics. Proceedings of the EFOP-3.6.2-16-2017-00006 (LIVE LONGER) project, University of Szeged, Szeged. 2020; p. 95-95, ISBN: 9789633067642

Réka Pintér, Péter Gaszler, Tamás Huber, Andrea Teréz Vig, Mónika Ágnes Tóth, Beáta Bugyi
Activities of Flightless-I in the organisation of the actin cytoskeleton. UNIA Workshop, „Current trends in biomedicine”, Baeza, Spain, November 11-13th 2019

Bukovics Péter, Gaszler Péter, Rauan Sakenov, **Pintér Réka**, Huber Tamás, Bugyi Beáta
Szerkezet-funkció koordináció gelsolin homológ fehérjékben. Magyar Biofizikai Társaság XXVII. Kongresszusa, Szeged, 2019. augusztus 26-29. (Előadás)

Péter Gaszler, Andrea Teréz Vig, **Réka Pintér**, Tamás Huber, Beáta Bugyi

Activities of Flightless-I (Fli I) in the organisation of actin cytoskeleton. Molekuláris Élettudományi Konferencia, Eger, 2019. március 29-31.

Péter Gaszler, Péter Bukovics, Rauan Sakenov, **Réka Pintér**, Tamás Huber, Beáta Bugyi
Structural differences between Gelsolin and Flightless-I proteins and their behaviour in the presence and absence of Ca^{2+} . Molekuláris Élettudományi Konferencia, Eger, 2019. március 29-31.

Réka Pintér, Péter Gaszler, Tamás Huber, Andrea Teréz Vig, Mónika Ágnes Tóth, Beáta Bugyi
The role of Flightless-I (Fli-I) in the organisation of actin cytoskeleton. Medical Conference for PhD Students and Experts of Clinical Science, Pécs, Hungary, Oktober 27th 2018

Réka Pintér, Péter Gaszler, Tamás Huber, Andrea Teréz Vig, Mónika Ágnes Tóth, Beáta Bugyi
The role of Flightless-I (Fli-I) in the organisation of actin cytoskeleton. Regional Biophysics Conference, Zreče, Slovenia, May 16th - 20th 2018

Fórizs Judit Viktória, **Pintér Réka**, Huber Tamás, Vig Andrea Teréz, Tóth Mónika Ágnes és Bugyi Beáta
Flightless I fehérje szerepe az aktin sejtíváz szerveződésében. MBFT Konferencia, Szeged, 2017. augusztus 22-25.