

Ph.D. értekezés

---

**AZ IRSp53 FEHÉRJE SZEREPE A FILOPÓDIUM  
FORMÁLÁS FOLYAMATÁBAN**

**FUTÓ KINGA**



Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar,

Biofizikai Intézet

2014

Program: Interdiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola  
Doktori Program vezetője: Dr. Sümegi Balázs  
Alprogram (B-130): Funkcionális fehérjedinamika vizsgálata biofizikai  
módszerekkel  
Alprogramvezető: Dr. Nyitrai Miklós  
Témavezető: Dr. Visegrády Balázs

## **Köszönetnyilvánítás**

Köszönettel tartozom Professzor Dr. Nyitrai Miklósnak, a PTE-ÁOK Biofizikai Intézet intézetvezető egyetemi tanárának, hogy lehetőséget biztosított számomra a Biofizikai Intézetben Ph.D. tanulmányaim elvégzésére. Köszönöm szakmai tanácsait illetve a munkám során nyújtott támogatását.

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Visegrády Balázs egyetemi adjunktusnak, szakmai segítségét, baráti támogatását és azt, hogy önálló munkára, gondolkodásra nevelt.

Szeretném megköszönni a Biofizikai Intézet minden munkatársának a jó hangulatú, családi légkört és segítséget. Külön köszönet illeti Tóth Mónikát, Raics Katalint, Orbán Józsefet, Kardos Rolandot, Kengyel Andrást, Kollár Veronikát, Szabó-Meleg Edinát, Bódis Emőkét, Bugyi Beátát, Barkó Szilviát és Telek Eleket.

Szeretnék köszönetet mondani családomnak: szüleimnek, nagyszüleimnek és Gyöngyinek a támogatásukért, biztatásukért és türelmükért.

## Tartalomjegyzék

I.	Irodalmi áttekintés .....	5
I.1.	A filopodium felépítése.....	7
I.2.	A filopodium dinamikája .....	10
I.3.	BAR és inverz BAR (I-BAR) domén fehérjék.....	11
I.3.1.	Az IRSp53 szerkezete .....	14
I.3.2.	Az IRSp53 szerepe.....	15
I.4.	Az aktin szerkezete és funkciója .....	17
II.	Célkitűzések.....	21
III.	Anyagok és módszerek.....	22
III.1.	Felhasznált anyagok .....	22
III.2.	Fehérjék preparálása és módosítása.....	22
III.2.1.	Az aktin preparálása .....	22
III.2.2.	Az IRSp53-I-BAR fehérje expressziója és tisztítása .....	23
III.3.	A vezikulák és micellák preparálása .....	24
III.4.	Az aktin és az IRSp53-I-BAR fluoreszcens jelölése, koncentráció-meghatározás .....	25
III.5.	„Steady-state” fluoreszcencia kísérletek .....	26
III.5.1.	Förster-típusú Rezonancia Energia Transzfer (FRET) mérések.....	27
III.5.2.	Fluoreszcencia kioltási kísérletek.....	29
III.5.3.	„Steady-state” fluoreszcencia anizotrópia .....	30
III. 5.4.	TNS fluoreszcencia mérések .....	31
III. 5.5.	Aktin polimerizációs kísérlet.....	31
III.5.6.	Koszedimentációs vizsgálatok.....	32
III.5.7.	Statisztika .....	32
III.6.	Fluoreszcencia mikroszkópia .....	33
III. 6.1.	Sejtek transzfektálása, fixálása .....	33
III.6.2.	Mikroszkópiai vizsgálatok, adatelemzés .....	33
IV.	Eredmények.....	34
IV.1.	I-BAR-foszfolipid kölcsönhatás vizsgálata FRET módszerrel .....	34
IV.2.	Fluoreszcencia kioltási kísérletek I-BAR domén fehérjén.....	37
IV.3.	Az I-BAR hatása micellák szerkezetére.....	39
IV.4.	Az aktin szerepe az I-BAR foszfolipid kötésében.....	40
IV.5.	Az IRSp53-I-BAR filamentális, illetve monomer aktinnal való kapcsolata .....	42

IV.6. Az IRSp53-I-BAR hatása az aktin filamentum polimerizációjára.....	44
IV.7. Az IRSp53-I-BAR hatása az aktin nukleációra.....	46
IV.8. Vizsgálatok COS-7 sejtutúrán.....	49
IV. 8.1. IRSp53 valamint I-BAR fehérjék túlexpresszállása COS-7 sejtekben.....	49
IV. 8.2. Filopódium hosszeloszlás vizsgálata COS-7 sejtekben.....	52
V. Összefoglalás.....	54
VI. Perspektívák.....	56
VII. Rövidítések.....	58
VIII. Irodalomjegyzék.....	59
IX. Közlemények.....	69

## I. Irodalmi áttekintés

A sejteket az extracelluláris tértől a plazmamembrán választja el, mely a sejtfolyamatok során (morfogenezis, endocitózis, migráció) dinamikus morfológiai változásokon megy keresztül [1, 2, 3]. A sejtmembrán a sejtvázzal és a sejtközi térrel egyaránt kapcsolatban áll. A sejtek közötti kapcsolatot a sejt felszínén megjelenő kitüremkedések, úgynevezett sejtnyúlványok biztosítják. A sejtnyúlványok dinamikus képződmények, megjelenésük különböző lehet. Ilyenek például a sejtvándorlás során kialakuló lamellipódiumok, a filopódiumok vagy a felszíni fodrozódások. A sejtnyúlványok létrejöttéért alapvetően hasonló molekuláris mechanizmusok felelősek, jelen értekezés témája ezek közül a filopódiumok szerveződésének molekuláris leírása.

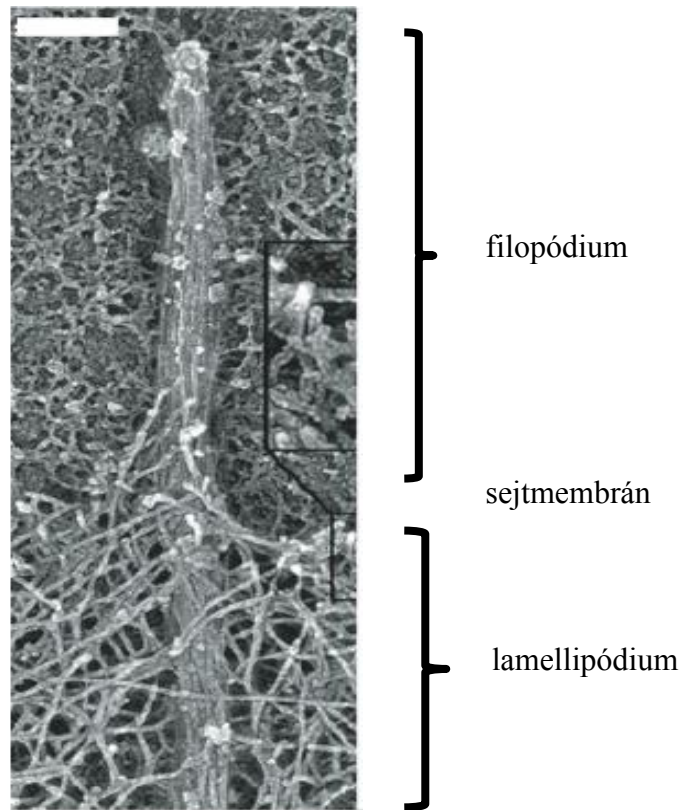
A filopódiumok hosszú, vékony, ujjszerű kitüremkedések a sejt felszínén. Szerepet játszanak a környezeti ingerek felvételében [4], fagocitózis során a környezeti anyagok érzékelésében [5], a sejt szubsztráthoz való kapcsolódásában [6], illetve a kémiai vagy más jelekre adott válaszok közvetítésében [7-9] is. A filopódiumok nagy mennyiségben figyelhetők meg a különböző sejttypusoknál, mind *in vivo* körülmények között, mind sejt kultúrákon. Fontos szerepet töltenek be az idegsejtekben, emellett szerepet játszanak a sejt-sejt adhéziók kialakításában epitheliális szövetekben, pl. morfogenezis során [10]. Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy a filopódiumok a sejttesttől távol eső jelátviteli molekulákat is képesek érzékelni. Filopódiumszerű struktúrák elsőként a *Drosophila melanogaster*-nél (citonéma) jelentek meg a törzsfajlás során, ahol a sejt-sejt kommunikációban töltötték be fontos szerepet [11]. Továbbá, filopódiumszerű sejt-sejt hidak játszanak szerepet különböző szállítmányok transzportjában, a kalcium-ionoktól egészen a sejtorganelumokig. Ezen tulajdonságuk alapján néha alagútképző („tunneling”) nanocsöveknek is nevezik őket [12]. Patogének esetében is megfigyelhető a nanocsöveknek illetve nyúlványoknak a használata. Számos alkalommal leírták, hogy vírusok ezeken keresztül vándorolnak („surfing”) a sejt belseje felé vagy egy fertőzött sejttől kiindulva a nem fertőzött sejtekhez. Ezzel a mechanizmussal magyarázható a vírusfertőzés nagy hatékonysága azoknál a sejteknél, amelyek fizikai kapcsolatban vannak egymással [13]. Nemcsak vírusok, de invazív baktériumok is gyakran felhasználják az epitheliális sejtek nyúlványait arra, hogy elérjék a gazdasejtet és tovább vigyék a fertőzést [14]. Más tanulmányok szerint, a makrofágok szintén filopódiumokat használnak prekurzorként a fagocitózishoz [15].

A különböző típusú filopódiumok tehát nagymértékben specializált feladatokat látnak el annak ellenére, hogy hasonló szerkezettel rendelkeznek és gyakran azonos alkotóelemekből épülnek fel [16].

A filopódium létrejötte főként az aktin citoskeleton hatására történik. A filopódiumok növekedésében fontos az aktin polimerizációja, míg stabilitását jórészt a kötegelt aktin filamentumok határozzák meg. Az aktin dinamikáját számos aktin-kötő fehérje szabályozza, amelyek a filamentumok felépülését és lebomlását, valamint a gyorsan növekvő szöges vég orientációját biztosítják a plazmamembrán irányába [17]. A különböző aktin-kötő fehérjék hatásmechanizmusát a Rho-család kis GTPáz-kötő fehérjéi szabályozzák, amelyek az aktin filamentumok specifikus formálódásáért felelősek a sejtekben [18]. Az aktin sejtmembránhoz való kapcsolódása során állványozó fehérjékkel is kapcsolatban áll, ilyenek az Bin-amphiphysin-Rvs (BAR) illetve inverz BAR (I-BAR) fehérjék.

## I.1. A filopódium felépítése

A filopódium szerkezetét először részletesen elektronmikroszkópos felvételek alapján sikerült leírni (1. ábra). Ezeken a képeken jól látható, hogy az emlős sejtekben minden egyedi filopódium aktin kötegeket tartalmaz, amelyeket 15-20 aktin filamentum épít fel. A filamentumok a kötegekben párhuzamosan rendeződnek el a sejtmembrántól távolabbi filopódium szakaszokban, szöges végeikkel a filopódium csúcsa felé orientálódva [19]. Különböző sejtípusoknál megfigyelték, hogy a filopódiumszerű nyúlványok szoros kapcsolatban állnak a membrán alatt elhelyezkedő aktin hálózattal [1], az úgynevezett lamellipódiummal. Ebben „gyökereznek”, továbbá abból türemkedhetnek ki [20, 21] (1. ábra).



1. ábra: A filopódium felépítése elektronmikroszkópos felvételen [1].

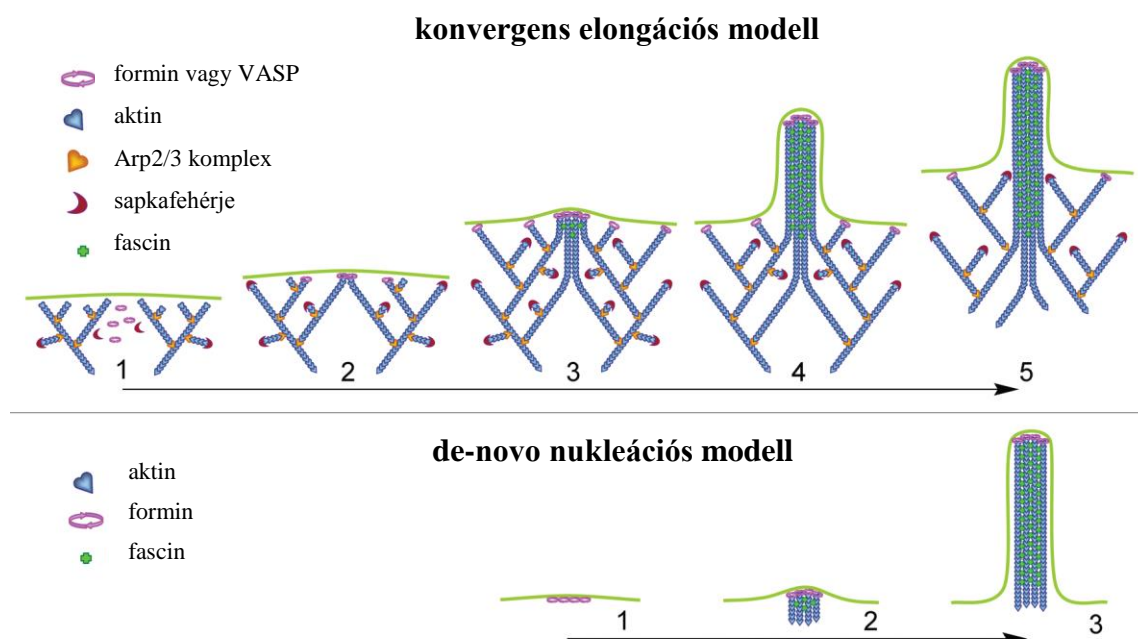
A lamellipódiumban elhelyezkedő, elágazó aktin filamentumokból felépülő hálózat polarizált, a filamentumok gyorsan növekvő szöges végükkel a vezérél („leading edge”) felé rendeződnek [22]. Az aktin filamentum polaritása rendszerint a hozzá kapcsolódó molekuláris motorfehérjék feji része révén határozható meg az elektronmikroszkópos felvételeken [23]. Filopódiumok a sejt más területén is kialakulhatnak, például közvetlenül a plazmamembrán



alatt elhelyezkedő, megközelítőleg 100 nm vastag, kontraktilis, kortikális aktinhálózatból [24]. Az itt található filamentumok a membránnal párhuzamosan rendeződnek, néhány ezekre merőleges filopódium azonban létrejöhet ezen a területen is [25]. Kétdimenziós sejt kultúrákban a filopódiumok lamellipódium hiányában is kialakulnak [26-30].

A filopódiumok formálódása kétféleképpen történhet a polarizált lamellipódiumban elhelyezkedő aktin hálózatból, egyrészt a „konvergens elongációs”, másrészt a „de-novo nukleáció”-s modellek révén [16, 31] (2. ábra). Az első modell szerint, az elágazó filamentumok, – amelyek az Arp2/3 komplex által szabályozott nukleáció révén jönnek létre –  $\lambda$ -alakú prekursorok a vezérlőben, és a fascin fehérje segítségével kötegelődnek [1, 31, 32].

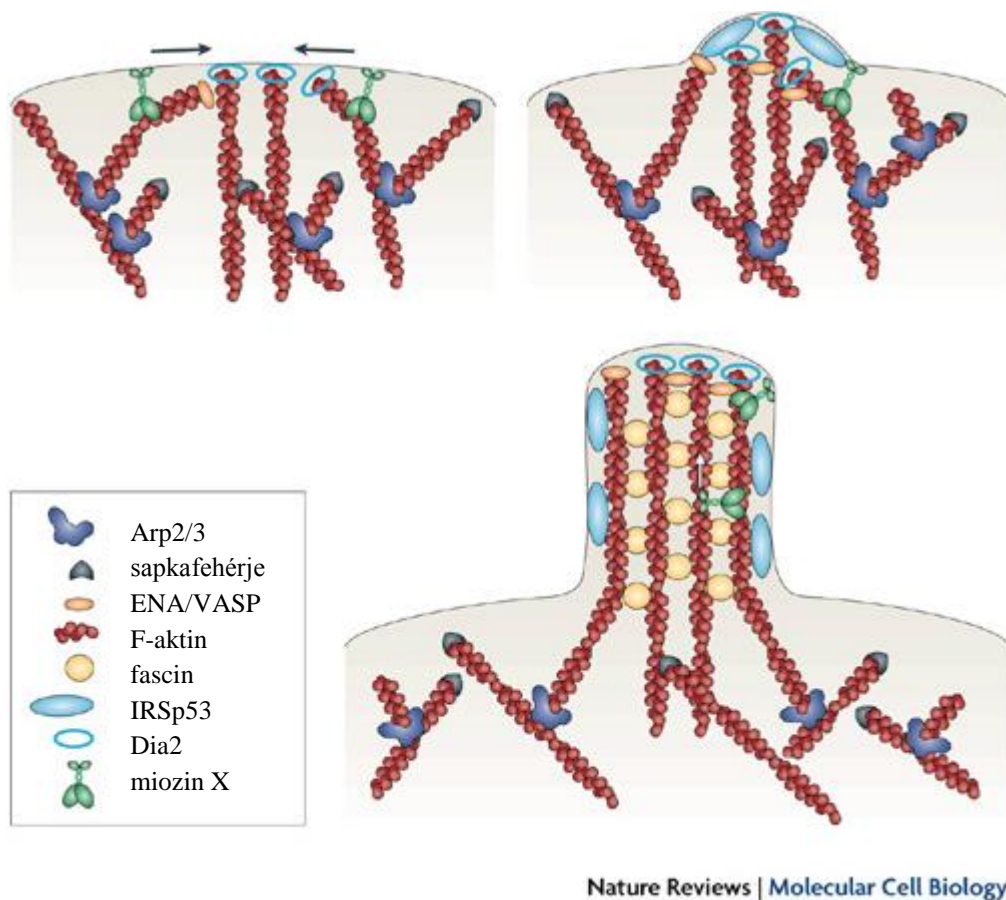
A „de-novo nukleáció”-s modell szerint az aktin filamentumok a formin segítségével jönnek létre, amely a filopódium csúcsában helyezkedik el. Innen indul a polimerizáció folyamata [16, 33, 34] (2. ábra).



2. ábra: A filopódium formálás modelljei [31].

A két modell leírásában közös, hogy a létrejövő filopódiumok polarizált aktin filamentumok kötegét tartalmazzák, amelyek – kísérleti megfigyelések alapján – gyorsan növekvő végükkel a filopódium csúcsa felé mutatnak [35].

Az aktinon kívül azonban, számos más fehérje is megtalálható a filopódiumokban pl. a formin, Dia2 (Diaphanous 2), amely nukleálja az aktin monomereket, valamint az Ena / WASP (enabled / vasodilator-stimulated phosphoprotein) fehérjék, amelyek a filopódiumok csúcsában mutathatók ki [36, 37], sűrű fehérje-komplexumot alkotva [22, 35]. Az Ena / WASP, Mena (mouse Ena) és mDia2 (mouse Dia 2) úgynevezett „csúcs komplexet” formál a filopódiumokban, továbbá az Ena / WASP elősegíti az aktin filamentumok szöges végeinek növekedését [38] (3. ábra).



3. ábra: A filopódium kialakulásában kulcsfontosságú szerepet betöltő fehérjék funkciója a filopódium formálódása során [38].

Jóllehet a különböző sejttípusok filopódiumai nagyfokú szerkezeti hasonlóságot mutatnak, akadnak azonban kivételek. Az egyik kivétel ezek közül a *Dictyostelium discoideum* fajnál fordul elő, az aktin filamentumok ebben az esetben is párhuzamosan rendeződnek, de átlagos hosszuk nem haladja meg a 200 nm-t. Sokkal rövidebbek, a korábban megfigyeltekhez (1  $\mu$ m) képest. A filopódium bazális részén mutatták ki ezeket a rövid aktin

filamentumokat, amelyek egymáshoz különböző szögekben kapcsolódtak, és nem „gyökereztek” olyan mélyen a kortikális aktinhálózatban sem [39]. A dendritikus filopodium is kivételt képez, amely a dendritikus tüskék prekuzora [40]. Nemrégiben mutatták ki, hogy ebben az esetben az aktin filamentumok száma kevesebb, illetve a lassan növekvő végük helyezkedik el a csúcsi régióban [41]. Immunfluoreszcens jelölés segítségével bebizonyították, hogy az Arp2/3 komplex illetve a miozin II nemcsak a nyúlványok csúcsában helyezkedik el és az aktint kötegelő fascin is meglepő módon hiányozhat [28].

## **I.2. A filopodium dinamikája**

A filopodium szerkezete nemcsak a sejt típusától függ, hanem annak dinamikai állapotával is összefüggésben van. A filopodiumok létrejöttéért, fenntartásáért és dinamikájáért különböző fehérjék felelősek. Ilyenek például a korábban említett forminok, amelyek az aktin polimerizáció pozitív szabályozói [34, 36, 37, 42, 43]. Emellett a gélszolin [44], a sapkafehérjék [45] vagy az ESP8 [46, 47]. Közös ezekben a fehérjékben, hogy aktin-sapkázó tulajdonságuknak köszönhetően negatív módon szabályozzák a filopodiumok kialakulását [48]. A filamentális aktin megújulásáért („turnover”) felelős még az ADF/kofilin fehérjecsald is. Ezek a fehérjék depolimerizálják a filamentumot a hegyes vég felől [49]. Ezenkívül fontos a folyamatban a membránkötő I-BAR fehérjecsald, amely a membrángörbületek kialakításáért felelős [2, 9, 50-53]. A miozinok közül a miozin X-et kell mindenképp megemlíteni, ez a fehérje a csúcs felé irányuló transzportfolyamatokban [54, 55], valamint a filopodium kialakításában is szerepet játszhat, ellentétben más nem-konvencionális miozinokkal, amelyek inkább a membrán és a citoskeletális hálózat adhéziójában töltenek be jelentős szerepet [56].

A sejtnyúlványok dinamikus szerkezeti elemek, amelyek különböző mozgásokra képesek. Bizonyos szögben elfordulhatnak a rögzítési pont körül, ez teszi lehetővé számukra, hogy a sejt környezetében viszonylag nagy területeket le tudjanak „tapogatni” [57]. Ezenkívül, többféle sejttípusnál pl.: migráló fibroblaszt, illetve B16 melanóma sejteknél is megfigyelték, hogy a nyúlványok képesek visszahajlani a sejtre. Laterális mozgásokat is tudnak végezni, a leggyakoribb azonban a lineáris növekedés és a visszahúzódás. A lamellipodiumba ágyazott nyúlványok dinamikája függ a lamellipodium dinamikájától is. A sejtnyúlványok viselkedése azonban nem tekinthető egyszerűen statikus aktin szerkezeti

elemek motorfehérje alapú átrendeződésének. A filamentumokra folyamatos megújulás („turnover”) jellemző a vezérlésnél történő polimerizáció, a folyamatos ellenáramlás illetve a depolimerizáció miatt [58, 59].

A lamellipódiumokban a citoskeletális hálózat dinamikus átrendeződésének fontos szerepe az aktin folyamatos visszaáramlása a sejttest felé [20, 21]. Ezen ellenáramlásos rendszer szabályozásában számos fehérje vesz részt, valamint fontos szerepe van a folyamatban az aktin filamentum esetében tapasztalható „taposómalom” effektusnak is [60-63]. Ilyen ellenáramlási rendszer a filopódiumokban is megfigyelhető [64, 65], a növekedést és visszahúzódtatást a filopódium csúcsában történő aktin polimerizáció és az ellenáramlási rendszer sebessége közti különbség határozza meg [66]. Fontos azonban kiemelni, hogy ezeket a mechanizmusokat nagymértékben befolyásolja a sejt típusa, illetve a filopódium aktuális fejlettségi szintje.

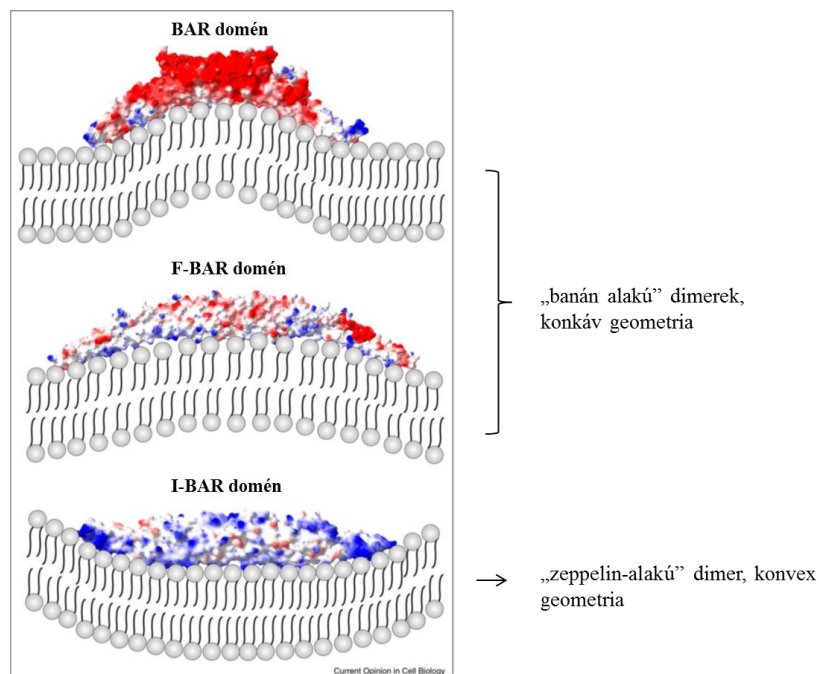
### **I.3. BAR és inverz BAR (I-BAR) domén fehérjék**

Az utóbbi évtizedben vált nyilvánvalóvá, hogy bizonyos, aktinhoz asszociált fehérjék direkt módon is képesek a plazmamembrán alakját és a lipidek szerveződését megváltoztatni: ezeket a fehérjéket membrándeformáló fehérjéknek nevezzük. Ebbe a családba tartoznak a Bin-amphiphysin-Rvs (BAR) fehérjék, a dynamin és az espin. Ezek a fehérjék úgynevezett pozitív vagy negatív – azaz konvex vagy konkáv – membrángörbületek kialakításáért felelősek a sejtekben. Pozitív görbületnek számítanak a betüremkedések; pl. az endocitotikus vezikulák, ezzel ellentétben negatív membrángörbületnek minősülnek a kitüremkedések; pl. a sejtnyúlványok. Megfigyelték, hogy mindegyik jelenség szorosan összefügg az aktin hálózat dinamikus változásával [18, 67-69].

A BAR domént eredetileg konzervált fehérjerészletként tartották számon, melyet különböző emlős fehérjékben, mint pl. Bin1 és amphiphysin mutattak ki [70]. Későbbi tanulmányok azonban bebizonyították, hogy az amphiphysin fehérjének szerepe lehet a membrán-dinamikában, N-terminális BAR doménje pedig *in vitro* körülmények között képes elősegíteni a membrán „csőszerű” deformációját [28, 71]. Elsőként az amphiphysin BAR doménjének sikerült meghatározni - röntgen diffrakciós módszerrel - a háromdimenziós atomi felbontású szerkezetét, amely egy úgynevezett „banán-alakú”  $\alpha$ -helikális dimer. Bebizonyosodott róla, hogy képes hozzákötni a negatív töltésű membránhoz, konkáv

felszínének köszönhetően. A fehérje pozitív membrángörbületek kialakításában betöltött szerepe a szerkezetével magyarázható [72].

A későbbiekben felfedeztek egy nagyobb membrándeformáló fehérjecsaládot, amelynek tagjai egy úgynevezett F-BAR domént tartalmaztak [72-74]. Az F-BAR domének is banán alakúak, de sokkal laposabbak, mint az előbb említett BAR fehérjék. Éppen ezért nagyobb átmérőjű, laposabb görbületeket eredményeznek a membránon [75, 76]. A BAR és F-BAR domének közös tulajdonsága azonban, hogy mindegyikük pozitív membrángörbületek kialakításáért felelős (4. ábra). A teljes hosszúságú BAR/F-BAR domént tartalmazó fehérjék pedig tipikusan a plazmamembrán betüremkedések kialakításában vesznek részt; pl. klatrin által szabályozott endocitózis során [77-79].

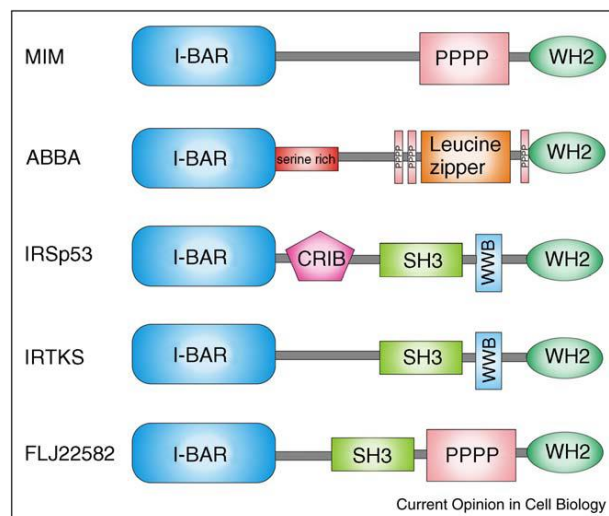


4. ábra: BAR domén fehérjék általi membrán deformáció. (Elektrosztatikus felszín: kék-pozitív, piros-negatív) [9].

A BAR, illetve az F-BAR fehérjékkel távoli szerkezeti homológiát mutatnak az inverz BAR (I-BAR) domén fehérjék [2, 80]. Az I-BAR domént eredetileg a „missing-in-metastasis” (MIM) és az inzulin receptor tirozin kináz szubsztrát p53 (IRSp53) fehérjék N-terminális régiójaként azonosították, ennél fogva eredetileg IMD-nek (IRSp53/MIM domén) nevezték. Megfigyelték, hogy sejtben való expressziójuk során filopódium-, vagy lamellipódiumszerű plazmamembrán kitüremkedések létrejöttét segítik elő [52].

Az IRSp53 és MIM I-BAR fehérjék  $\alpha$ -helikális szerkezetű, antiparalel [2, 80], „zeppelin-alakú” dimert hoznak létre [9]. Az I-BAR domének nemcsak kötődnek a foszfatidilben gazdag membránokhoz, de tubuláris struktúrává is képesek azt deformálni [7, 81, 82]. Az I-BAR fehérjék lipid-kötő felszínüknek köszönhetően a membrántubulus belső oldalához rögzülnek. Konvex geometriával rendelkeznek, amely az úgynevezett negatív membrángörbület kialakításához járul hozzá. Geometriai tulajdonságukból adódóan az I-BAR domén fehérjék - szemben a BAR és F-BAR fehérjékkel - inkább a membrán protrúziók kialakításáért felelősek, nem pedig a betüremkedések létrehozásáért [7, 81]. A membrán görbületének kialakításakor az I-BAR domének befolyásolják a lipidszerveződést, és előidézik a PI(4,5)P<sub>2</sub> foszfolipidek aggregálódását [7].

Az emlősökben öt különböző I-BAR domén fehérjét írtak le, melyek a következők: IRSp53 (inzulin receptor szubsztrát protein 53 kDa molekulatömeggel; BAIAP2 néven is ismert), MIM (missing-in-metastasis), IRTKS (inzulin receptor tirozin kináz szubsztrát; BAIAP2L1 néven is ismert), ABBA (aktin-kötegelő fehérje BAIAP2 homológiával), és FLJ22582 (BAIAP2L2) (5. ábra).



5. ábra: Az emlősökben előforduló I-BAR domén fehérjék szerkezete. I-BAR: I-BAR domén, WH2: WH2 domén, SH3: SH3 domén, PPPP: prolin-gazdag régió, Serine rich: szerin-gazdag régió, CRIB: Cdc42-/Rac-kötő domén, és WWB: WW-kötő fehérje [9].

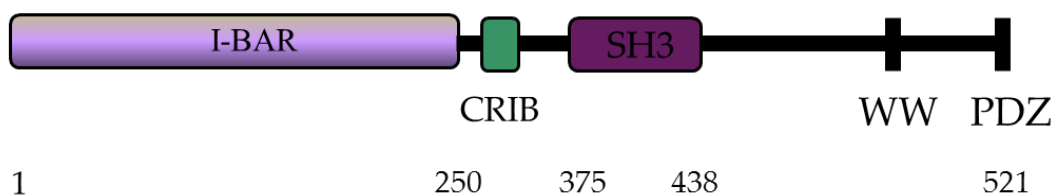
Az I-BAR domén fehérjecsalád minden mostanában felfedezett tagja (IRSp53, MIM, IRTKS és ABBA) valamilyen módon szerepet játszik a plazmamembrán kitüremkedések kialakulásában, mint amilyenek a filopodiumok és lamellipodiumok [83]. Emellett ezek a fehérjék számos fehérje-fehérje kölcsönhatásban is részt vesznek. Legtöbbjük C-terminális

része aktin monomer-kötő WASP-homológia 2 (WH2) részt tartalmaz, továbbá egy SH3 domén (Src homológia domén) jelenlétét mutatták ki az IRSp53, IRTKS és az FLJ22582 fehérjékben. Az IRSp53 SH3 szakasza számos aktin dinamikát szabályozó fehérje prolinban gazdag régiójához köt, mint például a WAVE-2, Mena és Eps8 [51, 69, 84]. Az IRSp53 fehérje CRIB doménjén keresztül kölcsönhat a kis GTPázok közül a Cdc42-vel, a MIM fehérje pedig prolinban gazdag régiójával köt az aktint szabályozó kortaktinhoz [50, 51, 85].

### I.3.1. Az IRSp53 szerkezete

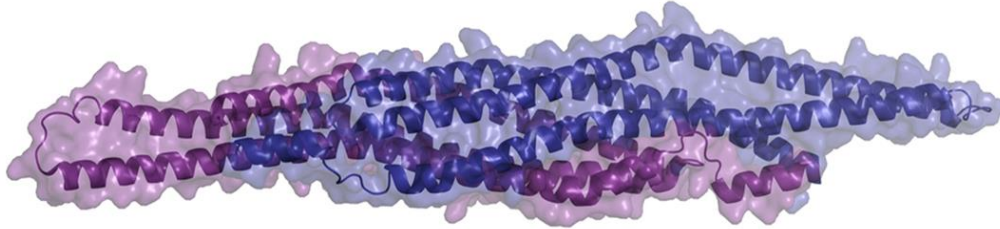
Az 521 aminosavból álló IRSp53 fehérjét először az inzulin receptor foszforilációs célpontjainak keresése közben azonosították [86], ez a fehérje BAIAP2 („brain-specific angiogenesis inhibitor-1 associated protein 2”) néven is ismert [53]. Az IRSp53 fehérjét kódoló gén számos összetett „splicing” folyamaton megy keresztül [87]. Ez alapján a fehérje négy izoformáját tudjuk elkülöníteni: IRSp53, amelyet IRSp53S-nek is neveznek, IRSp53L, IRSp53T és IRSp53M. Ezek egymástól a C-terminális régiójukban különböznek [87, 88]. Még nem tisztázott, hogy a C-terminális szakaszban jelentkező különbségnek milyen jelentősége van a fehérjefunkció szempontjából, de az eddigi eredmények alapján úgy gondolják, hogy az emberi szervezetben a C-terminális régió a felelős az IRSp53 szövetspecifikus expressziójáért [88]. Az S- illetve L-izoformák főként az agyban jelennek meg, míg az M-izoforma jelenlétét kizárólag a humán MCF7 sejtvonalban („breast cancer cell line”) sikerült kimutatni [87].

A fehérje három fő domént tartalmaz, az N-terminális részen egy I-BAR-t vagy IMD-t (IRSp53/MIM homológia domén), ezt követően egy CRIB (Cdc42- ill. Rac-kötő domén) majd pedig egy SH3 domén helyezkedik el. Az IRSp53 C-terminális régióján egy PDZ („post-synaptic density”) és egy WH2 („WASP homology 2”) szakasz található [53] (6. ábra). (A későbbiekben az IRSp53 N-terminális régiója esetén az I-BAR domén elnevezést használom.)



6. ábra: Az IRSp53 fehérje doménszerkezete [2].

Az IRSp53 fehérjecsaládban az N-terminális I-BAR szakasz a leginkább konzervált [52], ez a régió 250 aminosavból áll [80]. Az I-BAR monomer három  $\alpha$ -hélixből áll, két monomer egy úgynevezett „zeppelin-alakú” (ellipszoid) dimert képez [2] (7. ábra).



7. ábra: Az I-BAR domén dimer szalag modellje [2].

Az I-BAR domén gyenge szerkezeti hasonlóságot mutat a korábban említett BAR fehérjékkel [89].

### I.3.2. Az IRSp53 szerepe

A sejtnyúlványok kialakulása összetett folyamat, amelynek háttérében az aktin polimerizációja, valamint az aktinnal kapcsolatban álló állványozó fehérjék finoman szabályozott mechanizmusa áll [17].

A filopódiumok egyik fő állványozó fehérjéje az IRSp53/MIM fehérjecsalád tagja, széleskörűen expresszálódik a különböző szövet és emlős sejtípusokban, különösen nagy mennyiségben azonban az idegsejtekben jelenik meg. A filopódiumok hosszú, vékony, átmeneti kitüremkedések a sejt felszínén, amelyek általában kötegelt aktin filamentumokat tartalmaznak, kialakításukban az általunk vizsgált IRSp53 (inzulin receptor szubsztrát fehérje) fehérjének fontos szerepe van. Az IRSp53 a filopódium belső felszínén a membránhoz kötődve stabilizálja annak szerkezetét, egyúttal kölcsönhatásban áll az aktin citoskeletonnal is [86, 90, 91]. Megfigyelték, hogyha az IRSp53-at kódoló gént egér modellekben kiütik („knock out”), akkor az egerek tanulási folyamata, memóriája, illetve szinaptikus plaszticitása károsodik. Bizonyos humán IRSp53 alléleket olyan neurológiai problémákkal hoznak kapcsolatba, mint például a dendritikus túska mennyiségének megváltozása, egyes figyelemhiányos betegségek, illetve a hiperaktivitás [9].

Sejtekben a teljes hosszúságú IRSp53 a lamellipódiumok és filopódiumok csúcsában helyezkedik el [92]. Az 53 kDa-os inzulin receptor szubsztrát fehérje része annak a



szabályozó hálózatnak, amely az aktin-citoszkeletális rendszer (újra)szerveződéséért felelős. Ez az átrendeződés kis GTPázok hatására valósul meg. Ugyanakkor az átrendeződés elősegíti olyan aktin tartalmú sejtnyúlványok létrejöttét is, mint amilyen például a filopódium vagy a lamellipódium [86, 90, 93]. A vad típusú IRSp53 túlexpresszállása vagy sejtekbe történő mikroinjektálása a citoszkeleton átrendeződéséhez vezet, ezáltal vesz részt a filopódiumok kialakulásában [94]. A fehérje több jelátviteli útvonalban szerepet játszik, valamint változatos doménszerkezetének köszönhetően számos kölcsönható partnerrel rendelkezik. Az IRSp53 a Rac-kötő doménjén keresztül (CRIB) kölcsönhat a kis GTPázok családjába tartozó Rho fehérjékkel, miközben SH3 doménjével olyan aktint szabályozó fehérjékhez kapcsolódik, mint amilyen a WAVE2 [82, 95], Mena/VASP, Eps8 [47, 84], mDia [96], espin [97], DRLPA [98], Shank-1 [98, 99] vagy synaptopodin [100]. Az IRSp53 szerepét a PI(3,4,5)P<sub>3</sub> tartalmú liposzómák segítségével kezdték el vizsgálni [82]. Korábbi tanulmányok azt állították, hogy az IRSp53 I-BAR része nem specifikus elektrosztatikus kötással létesít kapcsolatot különböző foszfolipidekkel, ezek közé tartozik például a PI(3,4,5)P<sub>3</sub> mellett, a PS, a PI(3)P, a PI(3,5)P<sub>2</sub> és a PI(4,5)P<sub>2</sub>. Egy másik nemrégiben megjelent cikkben is hasonló módszerrel tanulmányozták a MIM és IRSp53-I-BAR fehérjék membránnal való kapcsolatát is [81]. Azt találták, hogy az I-BAR specifikusan a PI(4,5)P<sub>2</sub> lipidekhez köt, amelyek csoportokba rendeződnek a membránban.

Az IRSp53 funkciójának megértése szempontjából fontos volt a fehérje I-BAR (IRSp53/MIM homológia domén) doménjének jellemzése [52]. Ez a domén a fehérje N-terminális részén helyezkedik el, 250 aminosavból áll [80]. Az I-BAR domén önmagában képes a filopódiumok létrejöttét indukálni sejtekben, ezért munkánk során elsősorban az I-BAR domén funkciójának részletes leírására volt a célunk. A tisztított rekombináns I-BAR képes kötni, illetve – alacsony sókoncentráció mellett – kötegelni az aktin filamentumokat. Az utóbb említett tulajdonság *in vitro* megfigyeléseken alapul [52]. Továbbá képes előidézni a membrán specifikus görbületét is [76, 89, 101]. Korábbi eredmények azt mutatták, hogy az I-BAR a sejt perifériás részén lévő aktin filamentumok kötegelésével képes a filopódium formálásban részt venni. Későbbi munkák azt állapították meg, hogy a fehérje közvetlenül képes kötni és deformálni a membrán lipideket [2, 80, 81, 102].

Az IRSp53-I-BAR szerkezetére jellemző [2], hogy pozitív töltésű aminosavak koncentrálnak a fehérje disztális végén (Lys142, 143, 146 és 147) [2, 80, 81, 102], amelyeknek kulcsfontosságú szerepük van a negatív fejcsoporttal rendelkező membrán foszfolipidek megkötésében. Bár több korábbi munka is azt sugallja, hogy az I-BAR képes a

sejtmembrán foszfolipidjeihez kötni és azt csőszerű struktúrává deformálni, az aktinnal való kölcsönhatásának a jelentősége egyenlőre nem tisztázott [81, 82].

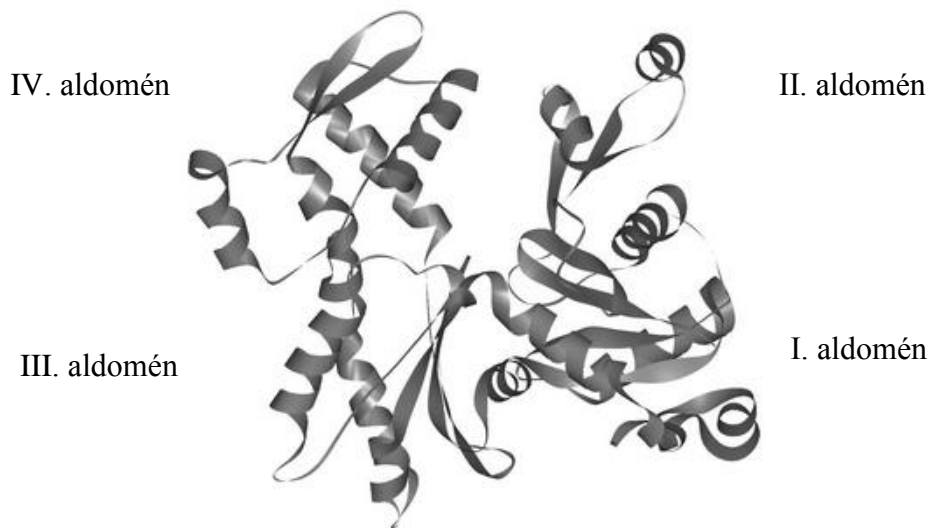
#### **I.4. Az aktin szerkezete és funkciója**

Az eukarióta sejtek váza (citoszkeleton) mikrofilamentumokból (aktin), mikrotubulusokból és intermedier filamentumokból áll. A citoszkeleton dinamikus struktúra, a sejtek igényeihez alkalmazkodik pl.: mozgás esetén. A mikrofilamentum rendszer fontos azonban a belső merevség megtartásában is pl.: mikrovillusok esetén vagy a sejtalk megváltozása során [103]. Az aktin, az egyik legfontosabb citoskeletális fehérjének tekinthető, amely nagy mennyiségben található a különböző sejtípusokban [104]. Nélkülözhetetlen szerepet tölt be az eukarióta sejtekben lezajló folyamatok többségében [105]. Az aktin számos kötőpartnerrel rendelkezik, beleértve a fémionokat, nukleotidokat és aktinkötő fehérjéket is, amelyeknek köszönhetően sokoldalú funkcióval rendelkezik [106, 107].

A gerincesekben 3 fő izoformát különböztetünk meg, melyek az  $\alpha$ ,  $\beta$  és  $\gamma$  jelöléseket kapták. Az  $\alpha$  főként a váz-, szív- és simaizomban fordul elő, ezzel szemben a másik kettő izom és nem-izom sejtekben is megtalálható. Az izoformák N-terminális részen mindössze néhány aminosavban tér el egymástól [108]. A fehérje főként a citoplazmában helyezkedik el, de sikerült már a sejtmagban is kimutatni.

Kétféle formában létezik, egyrészt monomer (G-aktin), másrészt polimer vagy filamentális (F-aktin) formában, 375 aminosav alkotja, tömege 43 kDa. A monomer aktin felosztható két fő doménre, melyek további két részre különíthetők el, tehát összesen 4 aldomént különböztethetünk meg a szerkezetét tekintve [109]. Főként  $\beta$ -lemez és  $\beta$ -kanyar szerkezeti elemekből áll, a fehérje 40 %-a tartalmaz  $\alpha$ -hélixeket (8. ábra).

Az 1. és a 4. aldomének között egy nukleotidkötő zseb helyezkedik el, ide kötődik az ATP  $Mg^{2+}$  vagy  $Ca^{2+}$  ionnal együtt. *In vivo* körülmények között a  $Mg^{2+}$  ion a domináns, laboratóriumi körülmények között  $Ca^{2+}$  ionnal telítve állítják elő az aktint, mert a  $Ca^{2+}$  stabilizálja a fehérjét.

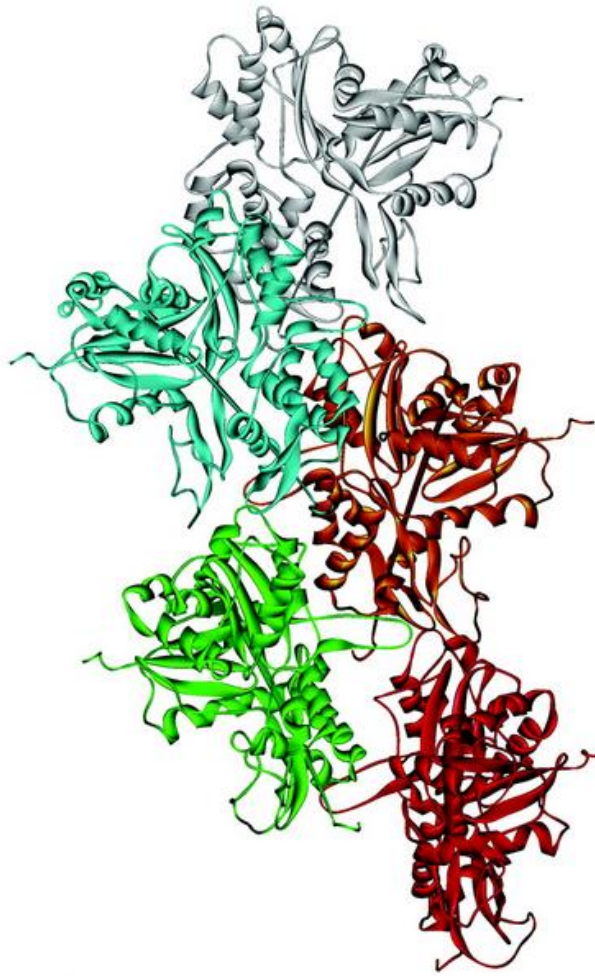


8. ábra: Nyúl vázizomból származó aktin monomer szalagmodellje [110].

Az aktin molekula képes az ATP hidrolízisére, a folyamat eredményeképpen ADP és inorganikus foszfát szabadul fel. Attól függően, hogy az aktin ATP vagy ADP molekulát köt, más konformációt vehet fel [107].

A szerkezetnek fontos része az 1. és 4. domén között elhelyezkedő úgynevezett „hinge” vagy csuklópánt régió. Ez teszi lehetővé a domének egymáshoz viszonyított elmozdulását („propeller mozgás”), ami a nukleotidkötő zseb nyitása és zárása miatt fontos [111].

Az ATP-t kötő monomer aktin molekulák összekapcsolódhatnak és filamentumot formálhatnak. A filamentumok hossza több  $\mu\text{m}$  is lehet, átmérője 7 nm. A filamentumban a monomerek egymással  $166^\circ$ -os szöget zárnak be, ezért a megjelenése leginkább egy jobbmenetes kettős hélixhez hasonlít, amelyben a menetemelkedés 72 nm.



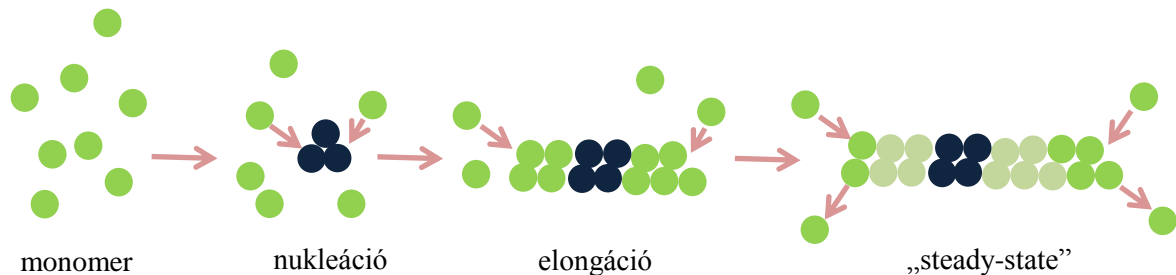
9. ábra: Holmes-féle F-aktin szalagmodell [112].

Ebben a modellben minden monomer négy másikkal áll összeköttetésben. A monomerek középpontja közötti távolság 55 Å (9. ábra).

Mivel az összes aktin molekula egy irányba néz, így a filamentum jól meghatározott polaritással rendelkezik, megkülönböztetünk szöges (+) és hegyes (-) véget. A szöges vég az első és harmadik, ezzel szemben a hegyes vég a második és negyedik aldoménnek feleltethető meg [112, 113].

A filamentum, tehát a monomerek összekapcsolódásából jön létre. Ezt a folyamatot polimerizációnak nevezzük. A polimerizáció több lépésből áll, az első lépés a nukleáció, amelynek során 2-3 monomer lassú összeállásából egy aggregátum keletkezik, amit nukleusznak is neveznek. Ezután következik a meghosszabbítás fázisa (elongáció), ekkor további aktin monomerek épülnek be a filamentum mindkét végéhez (10. ábra). Amikor aktin monomerek beépülnek a filamentumba, az általuk kötött ATP molekula hidrolizál ADP-vé és

szervetlen foszfát-ionná. Az egyik végen – szöges vagy plusz vég –, azonban a beépülés sokkal gyorsabb, akár tízszerese is lehet a másikhoz – hegyes vagy mínusz véghez – viszonyítva.



10. ábra: Az aktin polimerizáció lépései [114].

Ez a különbség a filamentum egyirányú növekedéséhez vezet, a fehérjék a hegyes vég felől folyamatosan áramlanak a szöges vég felé. Dinamikus egyensúly alakul ki, amelynek során az aktin filamentum átlagos hossza állandó marad, mert a filamentumhoz asszociálódó és onnan ledisszociáló molekulák száma időegységenként megegyezik. A jelenség neve „treadmilling” vagy taposómalom mechanizmus. Az aktin filamentum dinamikus fel- és leépülése nélkülözhetetlen a sejtmozgás és alakváltoztatás szempontjából.

Az aktin polimerizáció reverzibilis folyamat, a filamentum képes depolimerizálódni is, ez azonban nem nevezhető egyszerűen a polimerizáció ellentétének, mivel az aktin nem képes ADP-ből és foszfátból ATP előállítására [115]. Helyette az ADP-t kötő aktin monomerek az oldatban gyorsan kicserélik a kötött ADP-t ATP-re [116].

Az ATP-kötés és hidrolízis kulcsfontosságú szerepet tölt be az aktin filamentum felépítése és dinamikai tulajdonságainak meghatározása szempontjából [117]. A sejtekben az aktin filamentumok magasabbrendű szervezeti egységekké, kötegekké és hálózatokká szerveződnek és ebben a formában látják el feladatukat.

## II. Célkitűzések

Kutatási témám a filopódiumok létrejöttének szabályozására irányul az aktin-membrán kölcsönhatásának a tanulmányozásán, valamint az ezen kölcsönhatást befolyásoló állványozó fehérjék (IRSp53/MIM fehérjecsalád) működésének a vizsgálatán keresztül. Noha a sejt felszíni nyúlványok széles körben látnak el funkciókat, a filopódiumok fel- és leépülésének folyamata máig nem tisztázott. Jelenleg az irodalomban ellentmondó eredményeket találunk az IRSp53 membránkötésére, illetve az aktinnal való kölcsönhatására vonatkozólag a filopódiumok létrehozásának tekintetében. Nem jelent még meg olyan eredmény, amely részleteiben meghatározta volna az IRSp53-membrán kapcsolatát, megadva a kötést leíró biokémiai paramétereket (pl. egyensúlyi disszociációs állandó). Nem tisztázott továbbá az sem, hogy milyen molekuláris kölcsönhatások állnak a membránkötés hátterében, illetve az IRSp53 aktin citoszkeletonnal való kapcsolatát, szabályozó funkcióját is homály fedi. Mindezeket a munkám során tisztázni szerettem volna, hiszen az IRSp53 fehérjecsalád és az aktin citoszkeleton kölcsönhatásának, illetve ezek sejtmembránra gyakorolt hatásának ismerete elengedhetetlen a sejt-kommunikációt megalapozó molekuláris mechanizmusok pontos megértéséhez.

A munka során az alábbi célokat tűztük ki:

1. Az IRSp53-I-BAR fehérje membránkötő tulajdonságainak leírása, a vonatkozó egyensúlyi kötődési és kinetikai paraméterek számszerűsítése.
2. Az I-BAR domén aktin-kötő tulajdonságainak jellemzése különböző ionerősségű oldatok alkalmazása esetén.
3. A monomer, illetve a filamentális aktin hatásának vizsgálata az I-BAR-membrán kölcsönhatásra.
4. Az I-BAR hatásának vizsgálata az aktin filamentum polimerizációjára.
5. COS-7 sejtek morfológiai változásának nyomonkövetése I-BAR, illetve IRSp53 fehérjék túlexpresszállást követően.
6. COS-7 sejtekben az aktin polimerizációs állapotának megváltoztatása, annak vizsgálata.

### **III. Anyagok és módszerek**

#### **III.1. Felhasznált anyagok**

A kísérletek során a következő anyagokat használtuk fel: kálium-klorid (KCl), magnézium-klorid ( $MgCl_2$ ), kalcium-klorid ( $CaCl_2$ ), nátrium-hidroxid (NaOH), 3-(N-morfolin)propán (MOPS), tris-(hidroxi-metil)amino-metán (TRIS), adenzin-5'-trifoszfát (ATP), 2-merkaptoetanol (MERCK, Darmstadt, Germany), nátrium-azid ( $NaN_3$ ) (Fluka, Svájc), akrilamid (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, USA), Latrunkulin A és B, falloidin, dimetilformamid, N-(((iodoacetyl)amino)etil)-5-1-szulfonát (IAEDANS), 5-(iodoacetamid)fluoreszcein (IAF) (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), 2-p-toluidinyl-naphtylene-6-sulphonate (TNS), DiO (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), SFM-1 DMEM (Serum free medium-1 Dulbecco's Modified Eagle's Medium), tripszin, Lipofektamin 2000 reagens, phosphate buffered saline (PBS), paraformaldehid, ammónium-klorid ( $NH_4Cl$ ), DL-Dithiothreitol (DTT).

#### **III.2. Fehérjék preparálása és módosítása**

##### **III.2.1. Az aktin preparálása**

Kísérleteinket nyúl vázizomból preparált  $\alpha$ -aktinnal végeztük, amelynek előállítása több lépésben zajlik. Az aktin izolálását aceton forgácsból végeztük Spudich és Watt módszere alapján [118]. A folyamat során az aktint A-pufferben oldottuk fel, amelynek összetétele: 2 mM TRIS/HCl (pH8.0), 0,2 mM ATP, 0,1 mM  $CaCl_2$ , 0,005%  $NaN_3$ , 0,5 mM 2-merkaptoetanol vagy DTT.

Az aktin monomer vagy globuláris (G-aktin), illetve filamentális (F-aktin) formájával is végeztünk vizsgálatokat. Az aktin monomer formában való tartásához Latrunkulin A-t, illetve B-t, a filamentális forma stabilizálásához pedig falloidint használtunk (1:1 moláris arány).

### III.2.2. Az IRSp53-I-BAR fehérje expressziója és tisztítása

pGEX4T2 plazmid tartalmazta az IRSp53-I-BAR domén DNS szekvenciáját, melyet metionin-auxotróf *E. coli* törzsbe transzformáltuk [2], majd tisztítottuk. Rendelkezésünkre állt az I-BAR egy mutáns variánsa, ahol pontmutációval a 4 lizin aminosav lett glutaminsavra cserélve (K142E, K143E, K146E, K147E), az ú.n. K4E-I-BAR [2], tisztítása megegyezett a vad típuséval. A preparálás első lépéseként felolvasztottuk a sejteket, majd a nedves sejttömeeggel arányos mennyiségű puffert (50 mM TRIS / HCl (pH7,5), 300 mM NaCl, 3 mM DTT, 1 mM EDTA), proteáz-inhibitor koktélt, PMSF-et és lizozimot adtunk. A sejtszuspenziót mechanikusan kézi homogenizátor, illetve szonikátor (5-ször 1 perces impulzusokkal, 80%-os amplitúdóval) segítségével tártuk fel. A sejtszuspenzióhoz DNáz I enzimet adva, a mintát 0 °C-on 1 órán át kevertettük. Az inkubálást követően a felesleges sejttörmelékkel a mintától ultracentrifugálással (Sorwall, 30.000 rpm, 4 °C, 30 perc) választottuk el. A GST-fúziós rekombináns I-BAR fehérjét affinitás kromatográfiás módszerrel (Pharmacia FPLC) tisztítottuk, melynek során a GST-I-BAR fehérje a GSH (glutation-sepharose 4B) oszlop (Amersham) gyöngyeihez kötődött. A nemkívánatos, aspecifikusan kötődő fehérjék eltávolítása körülbelül 20-szoros oszloptérfogatú pufferrel (50 mM TRIS/HCl (pH 7,5), 300 mM NaCl, 3 mM DTT, 1 mM EDTA) történő mosással valósult meg. Az I-BAR fehérjét trombinos hasítást (0 °C, 16 óra) követően egy 10 mM TRIS/HCl (pH7,5), 150 mM NaCl, 3 mM DTT, 1 mM EDTA-t tartalmazó pufferrel eluáltuk. A mintát Amicon ULTRA 10 MWCO centrifugacsövekben koncentráltuk (Janetzki K26, 4000 rpm, 4 °C), ezt követően a mintában jelenlévő trombin elválasztásához benzamidin gyöngyöket használtunk. Inkubálást (0 °C, 1 óra, rázatás) követően az I-BAR-t eluáltuk, a fehérjét tartalmazó frakciókat összegyűjtöttük és Amicon ULTRA 10 MWCO centrifugacsövekben koncentráltuk (Janetzki K26, 4000 rpm, 4 °C). Tárolás előtt az IRSp53-I-BAR fehérjét a kívánt pufferbe átdializáltuk, és ezt követően folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, felhasználásig - 80 °C-on tároltuk.



### III.3. A vezikulák és micellák preparálása

A munka során a vezikulák előállításához a következő foszfolipideket használtuk: foszfatidil-kolin (PC), foszfatidil-szerin (PS), L- $\alpha$ -foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát (PIP<sub>2</sub>). A lipidek marha agyból származtak, 99 % feletti tisztaságúak voltak (Avanti Polar Lipids, Alabama, USA).

Ezen lipidek különböző arányából nagy unilamelláris vezikulákat (LUVET) hoztunk létre, extrúder segítségével [119-121]. A lipideket kloroformban történő oldás után, nitrogén gáz segítségével üveglombik aljára szárítottuk. Ezt követte a lipidek dehidratálása puffer (50 mM TRIS/HCl (pH8,0), 150 mM NaCl) hozzáadásával. Öt fagyasztási (folyékony nitrogén) - felolvasztási ciklust (37 °C-os vízfürdő) követően a mintát körülbelül tízszer átnyomtuk egy 200 nm pórusméretű polikarbonát membránon, extrúder (Avestin, Ottawa, ON, Canada) segítségével. A mintakészítés során a vezikulákat fluoreszcens jelölő (DiO) alkalmazásával jelöltük meg. A lipidkoncentráció változását az extrúzió során a DiO jelölt vezikulák fluoreszcencia intenzitásának mérésén keresztül ellenőriztük. Ehhez azt használtuk ki, hogy a híg oldatok koncentrációja a fluoreszcencia intenzitással egyenesen arányos. A mérés során a fluorofórt 490 nm-en gerjesztettük, a fluoreszcencia emisszió maximumát 505-510 nm között állapítottuk meg. Az extrúzió előtt mért fluoreszcencia intenzitás 88722 cps  $\pm$  6115, az extrúzió utáni 88958 cps  $\pm$  5553 volt. Az eredmények alapján azt a következtetést vontuk le, hogy a lipidek koncentrációja nem változott a preparálás során.

A liposzómákban a foszfolipidek a következő arányban voltak jelen: 100% PS, 100% PC vagy 70% PS és 30% PC (PS/PC (70/30)) kombinációjával. A liposzómák PI(4,5)P<sub>2</sub> foszfolipidet is tartalmaztak 4 illetve 15%-ban, 96 vagy 85% PC lipidekkel együtt (PIP<sub>2</sub> /PC (4/96) vagy PIP<sub>2</sub>/PC (15/85)).

Homogén PIP<sub>2</sub> micellákat készítettünk 1 mg PIP<sub>2</sub> 0,5 ml deionizált vízben vagy a kívánt pufferben történő oldásával [122]. Az oldatot vízfürdő szonikátorban szonikáltuk 30 percig szobahőmérsékleten.

### III.4. Az aktin és az IRSp53-I-BAR fluoreszcens jelölése, koncentráció-meghatározás

A kutatás során olyan *in vitro* fluoreszcencia spektroszkópai méréseket is végeztünk, amelyekhez szükség volt a fehérjék fluoreszcens jelölésére. A jelölés MEA illetve DTT-mentes pufferben történt.

Az aktinban (Cys374) és az I-BAR fehérjében (Cys137, 195, 202, 230) lévő cisztein aminosavakat (az I-BAR fehérjében ezek valamelyikét) IAEDANS fluorofórral jelöltük meg. A monomer aktin, illetve az I-BAR fehérjék jelölése 50  $\mu$ M koncentrációban történt. A monomer aktint 100 mM KCl és 2 mM MgCl<sub>2</sub> segítségével 2 óra alatt, szobahőmérsékleten polimerizáltuk. Ezután az IAEDANS festéket DMSO-ban feloldottuk és 10-szeres moláris feleslegben adtuk a fehérjékhez. A szerves oldószer mennyisége sosem haladta meg 1% (v/v)-ot. A jelölést szobahőmérsékleten végeztük, 1 órán át. A jelölés leállítása 2 mM MEA hozzáadásával történt, ezután a mintát centrifugáltuk (80.000 rpm, 4 °C, 40 perc). A pelletet A-pufferben duzzasztottuk néhány órán át, homogenizáltuk, majd éjszakán át A-pufferrel szemben dializáltuk. Az I-BAR esetében a jelölés leállítását követően, a felesleges festéket éjszakán át, A-pufferben történő kétszeri dialízissel távolítottuk el.

Az aktinban lévő cisztein aminosav (Cys374) jelölése IAF fluorofórral is lehetséges. Az aktin koncentrációját a jelölés előtt 50  $\mu$ M-ra állítottuk be. Az aktin jelölése monomer formában történt, az IAF festék 10-szeres moláris feleslegben volt jelen. A festéket 0,1 M-os NaOH-ban oldottuk fel, az aktin oldat állandó pH-ját, 0,1 M-os HCl oldat hozzáadásával biztosítottuk. A jelölés 4 °C-on, 24 órán át tartott. Ezt követően az aktint szobahőmérsékleten, 2 órán át, 100 mM KCl és 2 mM MgCl<sub>2</sub> segítségével polimerizáltuk. Centrifugálást (80.000 rpm, 4 °C, 40 perc) követően a pelletet A-pufferben duzzasztottuk néhány órán át, homogenizáltuk, majd éjszakán át A-pufferrel szemben az oldatot egyszer cserélve dializáltuk.

Az aktin pirén-jódacetamid jelölése a következőképpen zajlott. Az 50  $\mu$ M koncentrációjú aktint 100 mM KCl és 2 mM MgCl<sub>2</sub> jelenlétében szobahőmérsékleten, 2 órán keresztül polimerizáltuk, ezt követően az oldathoz 1,1 tömegszázalékban adtuk hozzá a pirén-jódacetamid festéket. A jelölést 18 órán át, szobahőmérsékleten végeztük. A jelölést követően a mintát centrifugáltuk (80.000 rpm, 4 °C, 40 perc), majd a pelletet A-pufferben duzzasztottuk néhány órán át, homogenizáltuk és éjszakán át A-pufferrel szemben dializáltuk.

A jelölést követően meghatároztuk a fehérje koncentrációkat és a jelölési arányt. A koncentrációmérést Jasco V-660 típusú spektrofotométerrel végeztük. A fehérje koncentrációkat a Lambert-Beer törvény alapján lehet meghatározni (1. egyenlet).

$$\ln I_0/I = A = \varepsilon \times c \quad (1)$$

ahol  $I_0$  a beeső fény intenzitása,  $I$  az oldatból kilépő fény intenzitása,  $A$  az abszorbanca,  $\varepsilon$  a moláris extinkciós koefficiens,  $x$  az oldat rétegvastagsága,  $c$  az adott anyag koncentrációja. A fehérjék koncentrációjának meghatározásához használt extinkciós koefficienseket az 1. táblázatban foglaltam össze.

<i>név</i>	<i>extinkciós koefficiens</i>
monomer aktin	1,11 ml mg <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>
IRSp53-I-BAR	22140 M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>
IAEDANS	6100 M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>
IAF	77000 M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>
pirén-jódacetamid	22000 M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>

1. táblázat: A koncentráció-meghatározáshoz használt moláris extinkciós koefficiensek értékei.

A jelölési arányokat is meghatároztuk, amik megadhatók a fehérje illetve a festék moláris koncentrációjának hányadosaként.

### III.5. „Steady-state” fluoreszcencia kísérletek

A „steady-state” fluoreszcencia méréseket Horiba JobinYvon (Longjumeau, France) fluoriméterrel végeztük. Méréseinket termosztált mintatartóban, 22 °C-on végeztük. A kívánt hullámhosszakot monokromátor segítségével állítottuk be mind a gerjesztési, mind pedig az emissziós oldalon. Vizsgálatainkat fehérjékhez kötött fluoreszcens festékek segítségével végeztük el. A fluoreszcens festékeknek több típusa van, közülük mi az úgynevezett külső fluorofórokat használtuk. Ezek olyan molekulák, melyek kovalens módon specifikus kötőhelyekhez kapcsolhatók (pl.: cisztein, lizin aminosavakhoz). Ezek közül a DiO fluorofór kivételt képezett. Ez a festék a membrán jelölésére alkalmas, a fluorofór a kettős lipidrétegbe penetrál.

Az alkalmazott fluorofórok spektrális tulajdonságait a 2. táblázat foglalja össze.

<i>alkalmazott fluorofór</i>	<i>gerjesztési hullámhossz maximuma (<math>\lambda_{ex}</math>)</i>	<i>emissziós hullámhossz maximuma (<math>\lambda_{em}</math>)</i>
IAEDANS	350	490
IAF	490	515
DiO	490	510
pirén-jódacetamid	365	407

2. táblázat: Az alkalmazott fluorofórok spektrális tulajdonságai.

A mérés során a minta ön-abszorpciójából eredő „inner filter” hatást figyelembe véve a mért fluoreszcencia intenzitásokat minden esetben korrigáltuk [123]. Ehhez szükségünk volt a kivetta és fénynyaláb geometriai elrendezésére, 1 x 1 cm-es fényúttal rendelkező kivetta esetében a következő összefüggést alkalmaztuk:

$$F_{\text{korrigált}} = F_{\text{mért}} \text{ antilog} [(OD_{\text{ex}} + OD_{\text{em}}) / 2] \quad (2)$$

ahol  $F_{\text{korrigált}}$  és  $F_{\text{mért}}$  a korrigált és mért intenzitásokat jelenti,  $OD_{\text{ex}}$  és  $OD_{\text{em}}$  pedig a gerjesztési és emissziós hullámhosszakon mért fényelnyelés értékek, 1 cm-es fényút esetén.

### III.5.1. Förster-típusú Rezonancia Energia Transzfer (FRET) mérések

A Förster-típusú Energia Transzfer a gerjesztett állapotban lévő molekula (donor), valamint egy megfelelő spektroszkópai követelményeket kielégítő molekula (akceptor) között jön létre, dipól-dipól kölcsönhatás révén. Ez egy sugárzás nélküli energiaátadás során valósul meg. A FRET létrejöttének feltételei a következők:

- 1) fluoreszcens donor molekula
- 2) a donor és akceptor molekulák alkalmas orientációja
- 3) átfedés a donor emissziós és az akceptor abszorpciós spektruma között
- 4) megfelelő távolság (2-10 nm) a donor és akceptor molekulák között.

Steady-state Förster-típusú Rezonancia Energia Transzfer (FRET) méréseket végeztünk a fluoreszcensen jelölt I-BAR és lipidek illetve aktin között. Az I-BAR-ben lévő cisztein

aminosavak IAEDANS festékkel voltak jelölve, mely donorként szolgált a FRET kísérletekben. A kettős lipidrétegbe penetráló DiO fluorofór szolgált akceptorként illetve az aktinon jelen lévő IAF fluorofór. A fluoreszcens festékeket úgy választottuk meg, hogy eleget tegyenek a FRET mérések követelményeinek, egymással úgynevezett FRET-párt alkottak.

A FRET hatásfokot az 3. egyenlet alapján számoltuk ki [124]. A kötési jellemzők illetve az egyensúlyi disszociációs konstans ( $K_d$ ) meghatározása volt a célunk, így a kísérletekben az I-BAR koncentrációját fixen tartottuk, a LUVET illetve az aktin koncentrációt változtattuk.

A FRET kísérletekhez tehát az I-BAR felszíni ciszteinjeihez kovalens módon kötöttük a jelölőt, 1,1-1,7 jelölési aránnyal (fluoreszcens próba vs. I-BAR koncentráció).

Az IAEDANS gerjesztési hullámhosszát 350 nm-nek vettük, az optikai rések mérete mind a gerjesztési, mind az emissziós oldalon 4 nm volt. A FRET mérések során a donor molekula (IAEDANS) emissziós spektrumai 400 és 460 nm között kerültek felvételre. A spektrumok alatti terület integrálásával határoztuk meg a FRET paramétereiket.

A FRET transzferhatásfok meghatározása a donor intenzitása alapján, a következő egyenlet felhasználásával történt:

$$E = 1 - (F_{DA}/F_D) \quad (3)$$

ahol  $F_{DA}$  és  $F_D$  a donor fluoreszcencia intenzitását jelenti az akceptor jelenlétében és hiányában.

Megfigyeléseink szerint, a transzferhatásfok értéke nő, ahogy a lipidek az I-BAR-hoz kötnek és ez az érték arányos a kialakult komplex koncentrációjával. Az egyensúlyi disszociációs konstans ( $K_d$ ) meghatározása [125] a következő egyenlettel történt:

$$[PL]/[P] = (([P] + [L] + K_d) - (([P] + [L] + K_d)^2 - 4 * [P] * [L])^{0.5}) / (2 * [P]) \quad (4)$$

ahol  $[L]$  a teljes lipidkoncentráció (ez a kísérletek során változott),  $[PL]$  a lipidhez kötött I-BAR koncentrációja,  $[P]$  az I-BAR koncentrációja. A  $[PL]/[P]$  arány megadja a lipidekhez kötött I-BAR frakcióját. A kísérletben az I-BAR-hoz adott lipidek koncentrációját változtattuk és mértük a transzferhatásfokot.

### III.5.2. Fluoreszcencia kioltási kísérletek

A gerjesztett állapotban lévő fluorofór többféleképpen leadhatja energiáját a környezetében lévő, például az oldatban található molekuláknak. Az energiaátadás csökkenő fluoreszcencia emisszió értékekben nyilvánul meg, ebben az esetben fluoreszcencia kioltásról („quenching”) beszélhetünk. Kísérleteink során a dinamikus kioltás jelensége játszódtott le. Dinamikus kioltás során a kioltó és a fluorofór molekulák diffúziós folyamatok révén egymás közelébe kerülnek, úgynevezett ütközési komplex létrehozásával a fluorofór átadja energiáját a kioltónak.

A fluoreszcencia kioltási kísérleteket IAEDANS-I-BAR fehérjén végeztük, elektromos töltését tekintve semleges kioltó molekula (akrilamid) segítségével. A méréseket Horiba JobinYvon (Longjumeau, France) fluoriméterrel végeztük, 22°C-on. Az IAEDANS-I-BAR koncentrációja 1  $\mu\text{M}$  volt. A kioltó koncentrációját az oldatban 0 M-tól indulva 0,42 M-ig növeltük. A „steady-state” kioltási mérések során kapott eredményeket a klasszikus Stern-Volmer egyenlet felhasználásával értékeltük ki, mely a kioltás hatékonyságát jellemzi. A kiértékeléshez a következő egyenletet alkalmaztuk [126]:

$$F_0/F = 1 + K_{SV} * [Q] \quad (5a)$$

ahol  $F_0$  a minta fluoreszcencia intenzitása a kioltó molekula hiányában és  $F$  a minta fluoreszcencia intenzitása különböző kioltó koncentrációk esetén  $[Q]$ .

A  $K_{SV}$  értékek az  $F_0 / F$  vs  $[Q]$  alapján ábrázolt görbékre illesztett egyenesek meredekségéből állapítottuk meg. A Stern-Volmer kioltási állandó ( $K_{SV}$ ) a bimolekuláris kioltási állandó ( $k_+$ ) és a fluorofór – kioltó hiányában mért – fluoreszcencia élettartamának ( $\tau_0$ ) szorzata:

$$K_{SV} = k_+ / \tau_0 \quad (5b)$$

### III.5.3. „Steady-state” fluoreszcencia anizotrópia

Kísérleteinkben IAEDANS-jelölt aktin monomerek „steady-state” fluoreszcencia anizotrópiáját mértük, IRSp53-I-BAR hiányában, illetve különböző koncentrációjú IRSp53-I-BAR jelenlétében. Az IAEDANS aktin koncentrációja 2  $\mu\text{M}$  volt, a mérés A-pufferben történt. A vizsgálatok során azt használtuk ki, hogy az anizotrópia érzékeny a fluoreszcens molekula méretének megváltozására. A fehérjékhez kovalens módon kötött fluorofórok fluoreszcencia anizotrópiája információt adhat számunkra egy fehérjemátrix flexibilitásáról. Ha az anizotrópia értéke nő, akkor a fehérjemátrix merevebbé válik, míg ha csökken, akkor rugalmasabb, flexibilesebb lesz.

A fluoreszcencia anizotrópia mérése során a gerjesztő fény hullámhossza 360 nm volt, az emissziót 470 nm-en detektáltuk, 5nm-es réseket alkalmaztunk mind a gerjesztési, mind pedig az emissziós oldalon. Vizsgálatainkat Horiba JobinYvon (Longjumeau, France) fluoriméterrel végeztük, amely termosztálható mintatartóval rendelkezett. Méréseinket 22 °C-on végeztük. Az egyensúlyi disszociációs konstans ( $K_d$ ) meghatározása a következő egyenlettel történt [127]:

$$[\text{PL}]/[\text{P}] = \left( ([\text{P}] + [\text{L}] + K_d) - \left( ([\text{P}] + [\text{L}] + K_d)^2 - 4 * [\text{P}] * [\text{L}] \right)^{0.5} \right) / (2 * [\text{P}]) \quad (6)$$

ahol [L] az I-BAR koncentráció (ez a kísérletek során változott), [PL] az IAEDANS-aktinhoz kötött I-BAR koncentrációja, [P] az IAEDANS-aktin koncentrációja.

### III. 5.4. TNS fluoreszcencia mérések

6-p-toluidinilnaftalin-2-szulfonát (TNS) magas fluoreszcens aktivitással rendelkezik, ha alacsony polaritású médiumban oldjuk fel vagy ha fehérjéhez kötődik hozzá. A Megfigyelhető, hogy a médium (oldószer, fehérje mátrix) hatására, hogyan változik meg a molekula fluoreszcencia intenzitása. Az intenzitás megváltozása minden esetben visszavezethető a fluorofór környezetének a módosulására [128].

TNS kísérletek segítségével megállapítható, hogy az I-BAR fehérje a micellák felszínéhez köt vagy inkább azok belső terébe penetrál. A TNS fluorofór intenzitásának változásán követtük nyomon a folyamatot. A fluorofór érzékeny a külső környezet megváltozására, elsősorban a hidrofóbicitásra [122, 129]. Ha a micellák szerkezete megváltozik, pl. aggregáció vagy egy fehérje kötődésének a hatására, akkor a TNS fluorofór intenzitása többszörösére növekedhet. Ezt használtuk ki a kísérlet során. A méréseket Horiba JobinYvon (Longjumeau, France) fluoriméterrel végeztük, 22°C-on. A gerjesztési hullámhossz 360 nm volt, a fluoreszcencia emisszió detektálása 360-560 nm között történt.

### III. 5.5. Aktin polimerizációs kísérlet

Pirén jelölt aktin monomerek segítségével vizsgáltuk az I-BAR aktin polimerizációra kifejtett hatását. A kísérlet során I-BAR jelenlétében illetve hiányában polimerizáltuk az aktint (2,5  $\mu\text{M}$ , 2 %-ban pirén jelölt), majd a pirén intenzitásának időbeli eloszlását követtük nyomon. A pirén jelölt aktin monomerek fluoreszcencia intenzitása alacsony, ha az aktin monomerek a filamentumba épülnek, ez az érték jelentősen megnő, majd az egyensúly beálltával a fluoreszcencia intenzitás nem változik (plató fázis). A fluoreszcencia intenzitást változását mértük az idő függvényében, a gerjesztési hullámhossz 365 nm volt, a fluoreszcencia emissziót 405 nm-en detektáltuk. Ezután a kapott görbét normáltuk. Az aktin filamentum növekedésének sebességi állandóját meghatároztuk a normált pirén intenzitás-görbék féltelítésben illesztett egyenesek meredekségéből. A polimerizáció sebességi állandójának kiszámításához a meredekség értékeket átszámoltuk  $\text{s}^{-1}$  egységre, ezt követően az I-BAR koncentráció függvényében ábrázoltuk.



### **III.5.6. Koszedimentációs vizsgálatok**

Koszedimentációs kísérlettel vizsgáltuk az IRSp53-I-BAR és az aktin filamentumok kölcsönhatását, a kísérlethez pirén-jelölt aktint használtunk. A pirén-aktint (1  $\mu\text{M}$ ) monomer formában inkubáltuk növekvő I-BAR koncentráció jelenlétében éjszakán át. Ezután megmértük a pirén jel intenzitását. A méréseket Horiba JobinYvon (Longjumeau, France) fluoriméterrel végeztük. A gerjesztési hullámhossz 365 nm volt, a fluoreszcencia emisszió detektálása 405 nm-en történt. Ezután a mintákat ultracentrifugáltuk (Beckman: TLA 100 rotor, 80000 rpm, 20°C, 40 min), majd a pelletet és a felülúszót elválasztottuk egymástól és 12 %-os SDS-PAGE segítségével elemeztük azok fehérjetartalmát.

### **III.5.7. Statisztika**

A mérések során meghatározott átlagértékek mellett minden esetben az átlag standard hibáját (SEM) adtam meg. Egyes esetekben kétmintás t-próbával hasonlítottam össze az átlagértékeket 0,05 szignifikancia szint mellett. Az átlagértékek között tapasztalt szignifikáns különbségeket \*-al jelöltem.

## **III.6. Fluoreszcencia mikroszkópia**

### **III. 6.1. Sejtek transzfektálása, fixálása**

EGFP-aktin, mCherry-I-BAR, mCherry-IRSp53 fehérjéket kódoló DNS szekvenciával transzfektáltunk COS-7 sejteket. A transzfekció során lipofektamint alkalmaztunk. A plazmidokat a lipofektamin reagenssel 15 percig inkubáltuk szérummentes DMEM tápoldatban, majd a sejtekhez adtuk. 24-36 óra inkubációt (37 °C-on) követően a sejteken tápoldatcserét végeztünk, a transzfekció sikerességét fluoreszcens mikroszkóppal ellenőriztük. A transzfektálást követően a mintákat fixáltuk. A fixálás első lépéseként a sejteket PBS-sel mostuk, majd 4 %-os paraformaldehidben fixáltuk 10 percig. Ezután ismét PBS-sel történő mosás következett. A mosás után 50 mM NH<sub>4</sub>Cl-ban blokkoltuk a sejteket 10 percig. A fedőlemezzel történő lefedéshez 200 mM-os DTT oldatot használtunk. A toxinnal kezelt minták esetében a fixálás előtt a sejtekhez 10 μM Latrunkulin B-t adtuk és a mintákat 1 órán keresztül inkubáltuk. Ezt követően a sejteken, az előbb említett módon végeztük el a fixálást.

### **III.6.2. Mikroszkópiai vizsgálatok, adatelemzés**

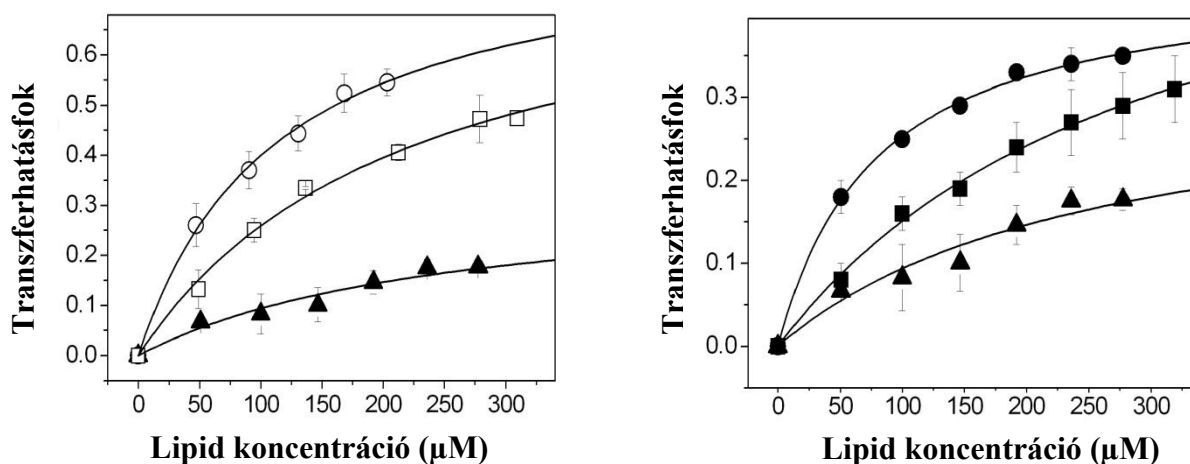
A transzfekció sikerességét Olympus IX81 inverz fluoreszcens, illetve Zeiss LSM710 konfokális mikroszkóp segítségével vizsgáltuk. Az Olympus IX81 fluoreszcens mikroszkóp esetében Xenon lámpa segítségével világítottuk meg a mintákat, az emissziós oldalon az optikai filtereket a használt fluorofóroknak megfelelően választottuk meg. A Zeiss LSM710 konfokális mikroszkópon végzett vizsgálatok során alkalmazott lézerek gerjesztési hullámhosszai a következők voltak: EGFP esetében  $\lambda_{\text{ex}}=488$  nm, illetve mCherry esetében  $\lambda_{\text{ex}} = 594$  nm.

A filopodium hosszeloszlás kiértékelése Fiji program [130] segítségével történt. A számításokhoz figyelembe vettük az objektív nagyítását (63x), majd a nagyítástól függően a pixel értékeket hosszúság értékekre kalibráltuk (0,106 μm / pixel, vagy 9,434 pixel / 1 unit (μm)). Ezt követően a lemért filopodiumok hosszúságát μm-ben adtuk meg.

## IV. Eredmények

### IV.1. I-BAR-foszfolipid kölcsönhatás vizsgálata FRET módszerrel

*E. coli* baktérium kultúrában megtermeltettük és megtisztítottuk az IRSp53 fehérje I-BAR doménjét, majd a FRET kísérletekhez IAEDANS fluoreszcens próbával megjelöltük a felszíni cisztein aminosavakat [2]. A jelölés eredményét fotometrálassal vizsgáltuk, és azt tapasztaltuk, hogy 1,2-1,8 IAEDANS molekula kötődött átlagosan egy I-BAR fehérjemolekulához. A nagy unilamelláris vezikulákat (LUVET) különböző lipidek keverékéből hoztuk létre és DiO fluoreszcens festékkel jelöltük meg a fluoreszcencia kísérletekhez, ahol a DiO fluoreszcens jelölő molekula a hidrofób lipid kettősrétegbe penetrált. Az *in vitro* FRET kísérletekben tehát IAEDANS-jelölt I-BAR és DiO-jelölt LUVET-ek segítségével tanulmányoztuk az IRSp53-I-BAR-membrán kapcsolatot. Az IAEDANS szolgált donorként, míg a DiO akceptorként. 1  $\mu\text{M}$  I-BAR fehérjéhez meghatározott koncentrációban (9. ábra) adtuk a jelölt lipideket, majd mértük az IAEDANS fluoreszcencia intenzitását. Minden esetben párhuzamosan egy donor nélküli mintát és mértünk, a donor – akceptoros minta jelének korigálása érdekében. A FRET transzferhatásfok kiszámítása a mért fluoreszcencia intenzitások alapján történt (3. egyenlet). Ennek a paraméternek az értékét a lipid koncentráció függvényében ábrázoltuk. A mérési pontokra a 4. egyenlet segítségével hiperbolákat illesztettünk, majd a görbék alapján meghatároztuk az egyensúlyi disszociációs állandó értékeket ( $K_d$ ) (3. táblázat). A kísérletek során az I-BAR-nak a lipidekhez való kötődését különböző lipid összetételek mellett vizsgáltuk. Ezek a következők voltak: PC, PS/PC (70/30), PS, PIP<sub>2</sub>/PC (4/96) vagy PIP<sub>2</sub>/PC (15/85) (11. ábra). Megállapítottuk, hogy a FRET transzferhatásfok nő, ha növeljük a LUVET koncentrációt, ezzel jelezve, hogy egyre több és több donornak van akceptor párja a közvetlen környezetében.



11. ábra: A FRET transzferhatásfok változása az IRSp53- I-BAR és növekvő koncentrációjú LUVET-ek között. A LUVET-ek a következő komponenseket tartalmazták: PC (fekete háromszög), PS/PC (70/30) (fekete négyzet), PS (fekete kör), PIP<sub>2</sub>/PC (4/96) (üres négyzet) és PIP<sub>2</sub>/PC (15/85) (üres kör).

A FRET transzferhatásfok 200 μM lipid koncentráció esetén 0,33, 0,24 és 0,15 volt a PS, PS/PC (70/30) illetve PC liposzómák tekintetében (11. ábra). Az IAEDANS-I-BAR és PIP<sub>2</sub>/PC (4/96) valamint PIP<sub>2</sub>/PC (15/85) LUVET-ek esetében kaptuk a legmagasabb értékeket, 0,38 és 0,52 FRET transzferhatásfokot mértünk 200 μM lipid koncentráció esetén (11. ábra). Ezt az értéket alapvetően két tényező befolyásolja: a donor és akceptor közötti távolság, valamint a fluorofórok relatív orientációja. Általánosságban megállapítható, hogy a negatívan töltött fejcsoporttal rendelkező lipidek (PS vagy PIP<sub>2</sub>-t tartalmazó lipidek) esetében nagyobb a transzferhatásfok, amelynek egyik magyarázata a kialakult fehérjekapcsolatok kisebb távolsága lehet. Ez utalhat a fehérjék lipidekhez való erősebb kötődésére, valamint ez a kialakult kötődés elektrosztatikus jellegét mutatja. Megjegyzendő azonban, hogy noha a kötődés feltehetően főként elektrosztatikus jellegű, a töltéssel nem rendelkező PC lipidek esetében is tapasztaltuk a transzferhatásfok-növekedést, ami az I-BAR, PC lipidekhez való kötődését igazolja. Összességében tehát megállapítható, hogy az I-BAR minden vizsgált lipid típushoz képes kötődni, valamint hogy a kötődés elektrosztatikus módon stabilizálódik.

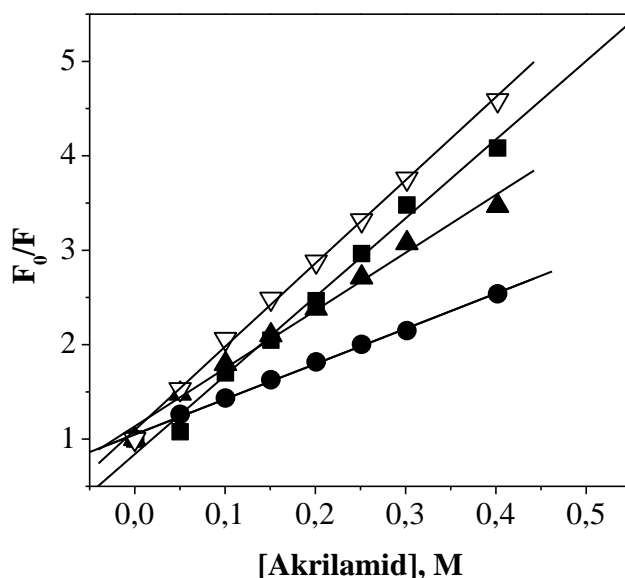
<i>LUVET összetétel</i>	$K_d$ ( $\mu\text{M}$ )	<i>SEM</i>
PS	78,86	13,19
PC	168,87	141,16
PS/PC (70/30)	146,38	50,03
PIP <sub>2</sub> /PC (15/85)	87,23	20,07
PIP <sub>2</sub> /PC (4/96)	99,35	71,98

3. táblázat: Az egyensúlyi disszociációs állandók ( $K_d$ ) értékei az I-BAR és a különböző összetételű LUVET-ek esetén.

A mérési pontokra 4. egyenlet segítségével hiperbolát illesztettünk. Az illesztett görbékéből meghatároztuk az egyensúlyi disszociációs értékeket ( $K_d$ ), amiket a 3. táblázatban foglaltam össze. A legkisebb  $K_d$  értéket (legnagyobb affinitásokat) a PS ( $K_d = 78,86 \pm 13,19 \mu\text{M}$ ) illetve a PIP<sub>2</sub> tartalmú vezikulák esetén kaptuk:  $87,23 \pm 20,07 \mu\text{M}$  a PIP<sub>2</sub>/PC (15/85) és  $99,35 \pm 71,98 \mu\text{M}$  a PIP<sub>2</sub>/PC (4/96) liposzómáknál). Megfigyeléseink szerint azonban az I-BAR fehérje képes kötni a PS/PC (70/30) vagy a csak PC foszfolipideket tartalmazó LUVET-ekhez is, bár gyengébb affinitással ( $K_d = 146,38 \pm 50,03 \mu\text{M}$  és  $K_d = 168,87 \pm 141,16 \mu\text{M}$ ). A semleges PC foszfolipidek esetében tapasztaltuk a legkisebb affinitás értékeket, ez is azt mutatja, hogy az I-BAR fehérje preferáltan kötődik a negatív töltéssel rendelkező lipidekhez.

## IV.2. Fluoreszcencia kioltási kísérletek I-BAR domén fehérjén

„Steady-state” fluoreszcencia kioltási kísérleteket végeztünk az IAEDANS-I-BAR segítségével, nagy unilamelláris vezikulák hiányában és jelenlétében (12. ábra). A kísérletek kezdetén az I-BAR-t önmagában vizsgáltuk, valamint különböző összetételű (PC és PS) 200  $\mu\text{M}$  LUVET-tel inkubáltuk. Az IAEDANS festék intenzitását követtük nyomon akrilamid kioltó molekula növekvő koncentrációjú hozzáadása során. A kapott eredményeket ábráztuk, az egyenesek meredekségéből meghatároztuk a Stern-Volmer kioltási állandót ( $K_{SV}$ ) (5. egyenlet). A kioltási kísérletek eredményeit a 4. táblázat mutatja.



12. ábra: Fluoreszcencia kioltás IAEDANS-I-BAR-ral LUVET-ek jelenlétében és hiányában: I-BAR jelenlétében (fekete négyzet), I-BAR + 100 % PS (fekete kör), I-BAR + 100 % PC (fekete háromszög), K4E-I-BAR + 100 % PC (üres háromszög).

A bimolekuláris kioltási állandó meghatározása céljából szeretnénk volna megmérni az IAEDANS-I-BAR élettartamát, azonban ehhez nem sikerült az I-BAR fehérjét megfelelően nagy koncentrációban előállítanunk. Rendelkezésünkre állt azonban egy mutáns fehérje, a K4E-I-BAR [2], amelyben a disztálisan elhelyezkedő 4 lizin aminosav – ami a membránkötődést a sejtben meghatározza [2] – célzott mutagenezis során glutaminsavra lett

cserélve. A K4E-I-BAR-t sikerült megfelelő koncentrációban előállítanunk, ezért a kísérletben ennek a fehérjének meg tudtuk határozni az élettartamát, így a kísérletekben ez szolgált negatív kontrollként. A K4E-I-BAR-ral a következő élettartam értékeket kaptuk:  $8,2 \pm 0,3$  és  $16,4 \pm 0,8$  ns.

<i>LUVET összetétel</i>	$K_{SV}$	<i>SEM</i>
LUVET-ek nélkül	8,23	0,35
PS	3,73	0,08
PC	6,13	0,26
PC (K4E-IMD)	8,82	0,17

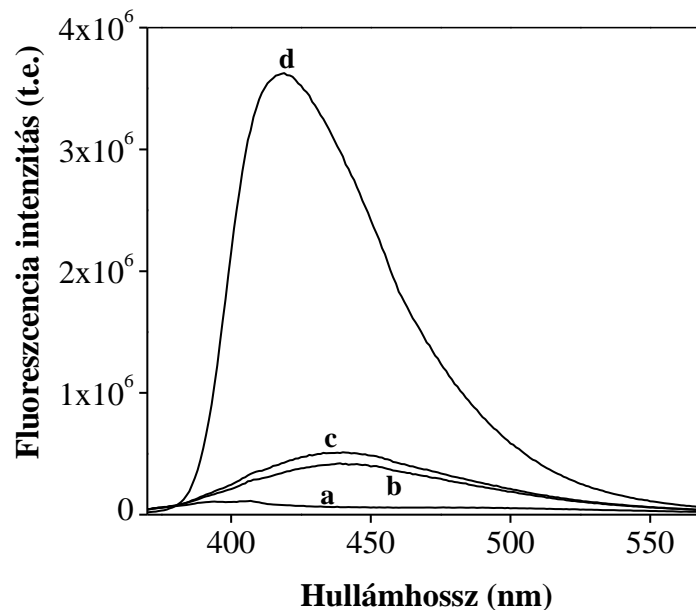
4. táblázat: A kioltási kísérlet során számolt Stern-Volmer állandók értékei ( $K_{SV}$ ).

Mivel a kioltási állandó értékének meghatározásához az élettartam szükséges és az élettartamot csak a K4E-I-BAR esetében tudtuk meghatározni, a kioltási állandó értékek helyett a  $K_{SV}$  értékeket hasonlítjuk össze következtetéseinkben. Feltételezésünk az volt, hogy az IAEDANS élettartama az I-BAR illetve K4E-I-BAR fehérjék esetében megegyezik, valamint az, hogy ez a kötődés során nem változik. Az IAEDANS-I-BAR akrilamiddal történő kioltása esetében a legnagyobb  $K_{SV}$  értéket ( $8,23 \text{ M}^{-1}$ ) LUVET-ek hiányában kaptuk, ami azt jelenti, hogy a fluorofór a kioltó molekula számára jól hozzáférhető. A semleges PC LUVET-ek jelenlétében a  $K_{SV}$  értéke lecsökkent ( $6,13 \text{ M}^{-1}$ ), jelezve az I-BAR-hoz kötött fluorofór korlátozott hozzáférhetőségét a kioltó számára. Ez az eredmény – a FRET kísérletek eredményével megegyezően – azt igazolja, hogy az I-BAR képes a PC lipidekhez kötődni. A PS lipidek jelenlétében a  $K_{SV}$  értéke, az előző esetekhez képest tovább csökkent ( $3,73 \text{ M}^{-1}$ ), ami erősebb kötésre utal és a fluorofór további korlátozott hozzáférését eredményezi. Ez az eredmény szintén összhangban áll a FRET vizsgálatokkal, miszerint a foszfolipidekben megjelenő negatív töltések az I-BAR-foszfolipid kölcsönhatást stabilizálják.

A fluoreszcencia kioltási kísérletet elvégeztük a K4E-I-BAR mutánsal is PC lipidek jelenlétében. A  $K_{SV}$  értéke ( $8,82 \text{ M}^{-1}$ ) hasonlóan magasnak adódott, mint amit az I-BAR esetében, lipidek hiányában kaptunk ( $8,23 \text{ M}^{-1}$ ). Az eredmények azt mutatják, hogy a mutáns K4E-I-BAR nem képes a PC lipidekhez való kötődésre.

### IV.3. Az I-BAR hatása micellák szerkezetére

Kísérleteink során megvizsgáltuk, hogy az IRSp53-I-BAR domén vajon megbontja-e a micellák felszínének folytonosságát – azok hidrofób belsejébe penetrálva – a foszfolipid-kötés során. A mérések során használt TNS fluorofórral, korábbi tanulmányok azt mutatták be, hogy a hidrofób közegbe beépülve a TNS fluorofór molekula érzékeny a közeg hidrofóbicitásának a megváltozására [122, 129].



13. ábra: TNS fluoreszcencia intenzitásának változása micellákban: (a) 100  $\mu\text{M}$  TNS, (b) 100  $\mu\text{M}$  TNS + 10  $\mu\text{M}$  PIP<sub>2</sub>/PC (4/96), (c) 100  $\mu\text{M}$  TNS + 10  $\mu\text{M}$  PIP<sub>2</sub>/PC (4/96) és 1  $\mu\text{M}$  I-BAR, (d) 100  $\mu\text{M}$  TNS + 10  $\mu\text{M}$  PIP<sub>2</sub>/PC (4/96) és 10 mM MgCl<sub>2</sub>.

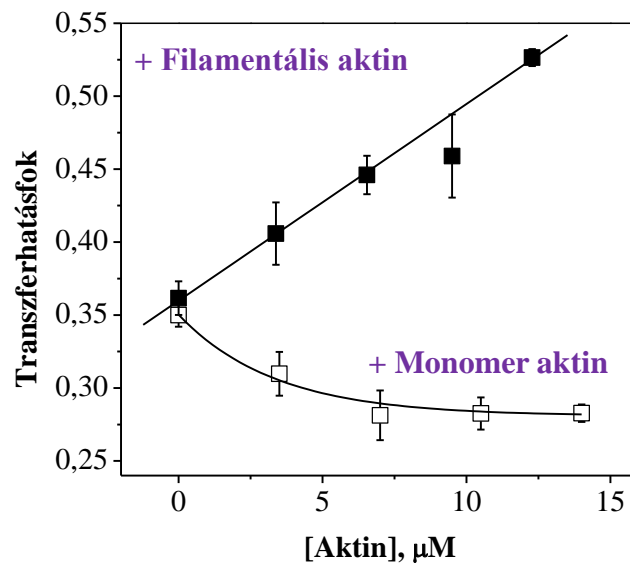
Ebben a kísérletben I-BAR domént illetve micellákat használtunk, melyek erősen negatívan töltött PIP<sub>2</sub>/PC (4/96) lipidekből álltak, és TNS fluoreszcens festékkel voltak jelölve. Az irodalomban ismert, hogy MgCl<sub>2</sub> hozzáadására a micellák aggregálódnak és nagy multilamelláris struktúrákat hoznak létre, megbontva ezzel a micellák eredeti szerkezetét [122, 129]. Ezt a változást jelzi a TNS festék intenzitásának megváltozása, mely mintegy háromszorosára növekszik MgCl<sub>2</sub> hatására. Vizsgálataink során azt találtuk, hogy az I-BAR fehérje képes kötni a micellák felszínéhez, de ez csak minimális változással jár a TNS-jelölt micellák jelintenzitásában (13. ábra). Ez a megfigyelés azt mutatja, hogy az I-BAR a PIP<sub>2</sub>



vagy PC lipidek fejcsoportjához kötődik ahelyett, hogy a micellák közepébe penetrálna. Bár az I-BAR nem növeli meg a TNS fluoreszcencia intenzitását, mégsem tudjuk kizárni a csekély penetráció lehetőségét a micellák membránlipidjeinek hidrofób régiójába.

#### IV.4. Az aktin szerepe az I-BAR fosfolipid kötésében

Eddigi megfigyelések szerint az I-BAR egyidejűleg áll kapcsolatban a membránnal és az aktin filamentális formájával. FRET méréseket végeztünk, hogy megvizsgáljuk a filamentális (F-aktin), illetve monomer aktin (G-aktin) hatását a már meglévő I-BAR-lipid kölcsönhatásra. A kísérlet előtt 1  $\mu\text{M}$  jelölt I-BAR-t inkubáltunk 200  $\mu\text{M}$  PS fosfolipidet tartalmazó jelölt vezikulákkal, amelynek eredménye a kötődésből származóan kialakult kb. 0,35 FRET transzferhatásfok volt (14. ábra). Ez szolgált a mérés kiindulópontjaként.



14. ábra: A FRET transzferhatásfok változása F- és G- aktin hatása az I-BAR-PS-vezikulák kölcsönhatásában. A kísérlet kezdetén az I-BAR koncentrációja 1  $\mu\text{M}$ , a PS vezikuláké 200  $\mu\text{M}$  volt.

Ezután a mintához monomer vagy filamentális aktint adtunk és a transzferhatásfok változását követtük nyomon (14. ábra). A G-aktint Latrunkulin A-val, az F-aktint pedig falloidinnel stabilizáltuk. A FRET transzferhatásfok 10  $\mu\text{M}$  G-aktin jelenlétében 0,28-ra csökkent. Ez egyrészt utalhat arra, hogy az I-BAR-lipid komplex koncentrációja lecsökkent, másrészt jelentheti a kötődés erősségének csökkenését is. F-aktin jelenlétében a transzferhatásfok

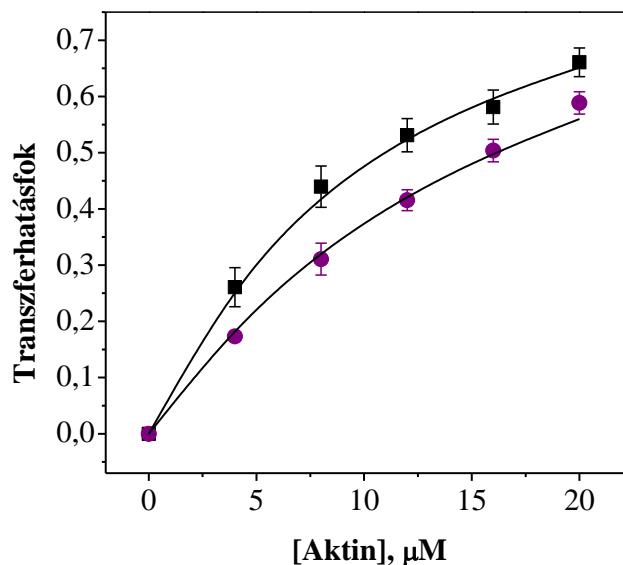
értéke 0,53-ra nőtt, ami valószínűsíti, hogy további I-BAR-lipid komplex képződött aktin filamentumok jelenlétében, illetve azok átlagos távolsága csökkent. Ezek a megfigyelések azt sugallják, hogy az aktin monomereknek és filamentumoknak ellentétesen befolyásolják az I-BAR fehérje lipidkötését. Kísérleteink alapján feltételezzük továbbá, hogy a G- illetve F-aktin kötőhelyei az I-BAR különböző felszínein találhatóak (hiszen különböző hatást alakítani ki). Továbbá az is valószínűsíthető, hogy az I-BAR G-aktin kötőhelye – legalább részben – átfed a lipidkötő hellyel.

Az F- és G-aktin hatása további érdekes következtetésekre utalhat az I-BAR funkcióját tekintve. A filopodium felépülésében stabilizáló szerepet tölt be az I-BAR domén, aminek a membránhoz való kötődését az F-aktin jelenléte tovább növelheti. A filopodiumban megjelenő – esetlegesen már kötegelődött F-aktin – saját szerkezeti merevsége mellett így, az I-BAR-on keresztül, közvetett módon stabilizálhatja a filopodiumot. Ezzel ellentétes hatást fejthet ki a G-aktin jelenléte. A visszahúzódó filopodiumban az F-aktin, G-aktinná történő depolimerizációja zajlik, ami megnövekedett mennyiségű szabad G-aktin megjelenését eredményezheti. Az így megemelkedett G-aktin koncentráció viszont destabilizálhatja az I-BAR-membrán kölcsönhatást, ezzel közvetett módon is csökkentve a filopodium stabilitását, a filopodium lebomlását segítve elő.

Jelen eredményeink alapján a sejtekben zajló mechanizmusokra közvetlenül túlzás volna következtetéseket levonnunk, de nem zárjuk ki annak a lehetőségét, hogy a filopodium dinamikájának megértésében az aktin-I-BAR kölcsönhatásnak fontos szerepe lehet. A mechanizmus részletes leírásához azonban további kísérletek szükségesek.

#### IV.5. Az IRSp53-I-BAR filamentális, illetve monomer aktinnal való kapcsolata

Az előző fejezetben tárgyalt, G- illetve F-aktin hatására bekövetkező különbség az I-BAR tekintetében felveti a kérdést, hogy vajon az I-BAR milyen módon képes a polimer illetve monomer aktinhoz kötődni. Korábbi eredmények az I-BAR aktin kötegelő hatásáról szolgáltattak információt. Millard és munkatársai [2] *in vitro* kísérletekben azt tapasztalták, hogy az I-BAR az aktin filamentumok kötegelődését idézi elő fiziológias sókoncentráció (100 mM KCl) mellett. Mattila és munkatársai később ezzel ellentmondóan [81] azt találták, hogy az I-BAR domén aktin kötegelő hatása csak alacsony ionerősség (25 mM KCl) mellett történik meg [2]. Az ionerősség változása – az újabb eredmények alapján – tehát befolyásolhatja az I-BAR-aktin kölcsönhatást. Az I-BAR-aktin kapcsolat leírása céljából további FRET kísérleteket terveztünk, amelyet F-aktinnal, különböző ionerősség mellett végeztünk el (25 mM, ill. 100 mM KCl). Méréseink során IAEDANS fluorofórral jelölt I-BAR-t és IAF festékkel jelölt F-aktint használtunk (15. ábra).



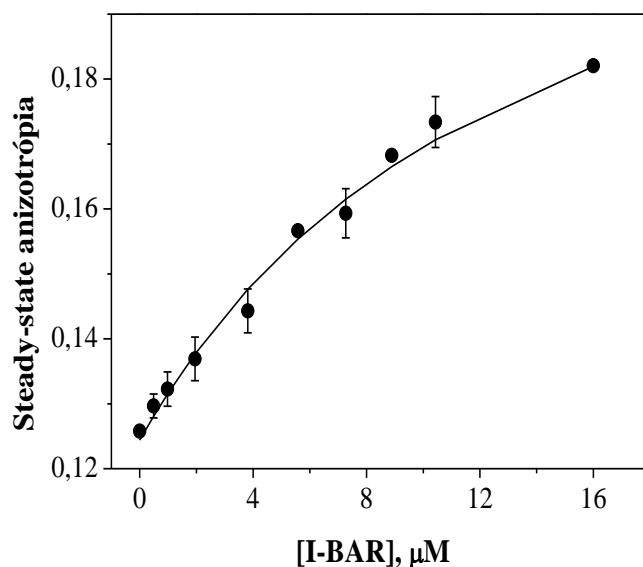
15. ábra: A FRET transzferhatásfok változása IAEDANS-I-BAR (1  $\mu\text{M}$ ) és IAF-F-aktin között, növekvő F-aktin koncentráció mellett, különböző ionerősség (25 mM (fekete négyzet) ill. 100 mM (lila kör) KCl) esetén.

Az egyensúlyi disszociációs állandók ( $K_d$ ) értékeit a kapott görbékre illesztett hiperbola segítségével határoztuk meg (6. egyenlet). Mindkét esetben azt figyeltük meg, hogy az aktin koncentráció növekedésével megnőtt a transzferhatásfok értéke mindkét sókoncentráció mellett. Ez azt jelenti, hogy az I-BAR képes az F-aktinhoz kötődni, az I-BAR F-aktinhoz való kötését ( $K_{d(25\text{mM})}=9,9 \mu\text{M}$ ,  $K_{d(100\text{mM})}=17,3 \mu\text{M}$ ) a sókoncentráció számottevően nem befolyásolja (5. táblázat).

<i>Ionerősség</i>	<i>Egyensúlyi disszociációs állandó (<math>K_d</math>)</i>
25 mM KCl	$9,9 \pm 1,16 \mu\text{M}$
100 mM KCl	$17,3 \pm 4,12 \mu\text{M}$

5. táblázat: IAEDANS- I-BAR és IAF-aktin között meghatározott egyensúlyi disszociációs állandók értékei 25 mM illetve 100 mM KCl koncentráció esetén.

A G-aktin és az I-BAR közti kapcsolat vizsgálható volt „steady-state” fluoreszcencia anizotrópia segítségével. A kísérlet során az IAEDANS-aktin monomerek ( $2 \mu\text{M}$ ) anizotrópiáját mértük különböző koncentrációjú I-BAR jelenlétében és hiányában (16. ábra).



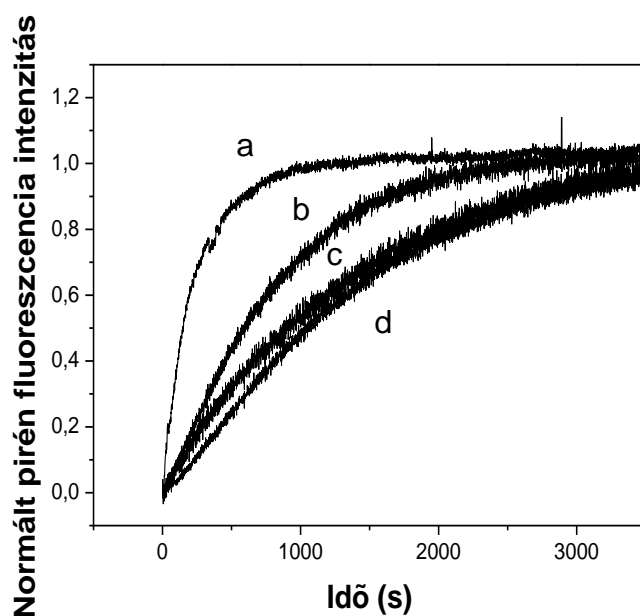
16. ábra: IAEDANS-G-aktin ( $2 \mu\text{M}$ ) anizotrópia változása növekvő I-BAR koncentráció mellett, A-pufferben.

A jelölt aktin monomerek anizotrópiája nőtt, a növekvő I-BAR koncentrációval, amely a két fehérje közötti kötődést tükrözi. Az anizotrópia adatokra a 6. egyenlettel illesztett hiperbola sajátértékeiből meghatároztuk a disszociációs  $K_d$  értékét, ami  $12,5 \mu\text{M}$ -nak adódott.

Összességében megállapítottuk, hogy az I-BAR képes az aktin filamentális és monomer formájához egyaránt kötődni. Az I-BAR hasonló affinitással köt mind az aktin monomer, mind a filamentum formához (F-aktin:  $K_{d(25\text{mM})}=9,9 \mu\text{M}$ ,  $K_{d(100\text{mM})}=17,3 \mu\text{M}$ ; G-aktin:  $K_d=12,5 \mu\text{M}$ ). Az az eredmény, hogy az I-BAR polimerizációs állapottól függetlenül képes kötni az aktinhoz, összhangban áll az előző fejezetben tárgyalt kettős hatással is, miszerint mindkét polimerizációs forma képes az I-BAR-hoz kötődni, annak funkciójára eltérő hatást gyakorolva. A továbbiakban kíváncsiak voltunk ezek alapján arra, hogy vajon az I-BAR milyen hatással lehet az aktin polimerizációjára.

#### IV.6. Az IRSp53-I-BAR hatása az aktin filamentum polimerizációjára

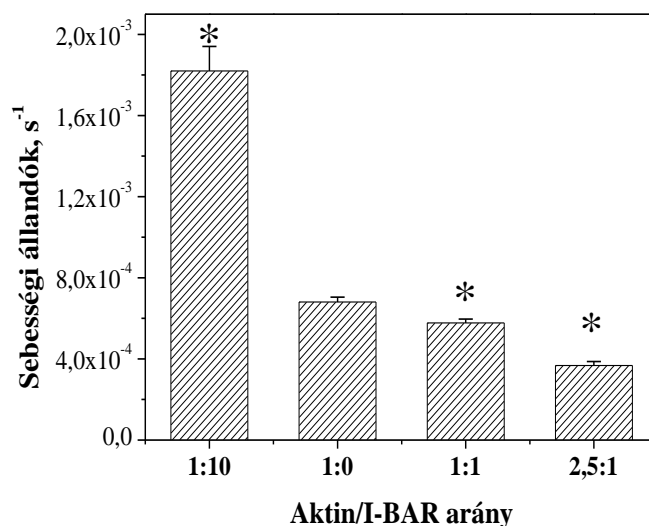
Pirén-aktin alkalmazásával követtük nyomon az aktin polimerizációját ( $2,5 \mu\text{M}$ , 2%-ban jelölt) különböző koncentrációjú I-BAR jelenlétében és hiányában (17. ábra). A pirén-aktin fluoreszcencia intenzitása drasztikusan (kb. 20-szorosára) nő az aktin polimerizációja során.



17. ábra: Pirén-aktin ( $2,5 \mu\text{M}$ , 2%-ban jelölt) polimerizációja I-BAR jelenlétében. Az aktin/I-BAR arány: 1:10 (a), 1:0 (b), 1:1 (c), 2,5:1 (d).

Az aktin/I-BAR arányát az aktin polimerizációs kísérletben 1:0 és 1:10 változtattuk (17. ábra). Azt tapasztaltuk, hogy az I-BAR alacsony koncentrációjának jelenlétében (1:1, 2,5:1 arány) az aktin polimerizációja gátolt (17. ábra: c, d). Ezzel együtt a polimerizáció hosszabb idő alatt, de teljesen végbemegy. Ezzel ellentétes hatást figyeltünk meg magas, 1:10 aktin-I-BAR arány esetén, amikor az I-BAR, polimerizációt gyorsító hatása jelentkezett.

A polimerizációs görbék alapján, a kezdeti, gyorsan emelkedő szakaszra illesztett egyenesek meredekségéből meghatároztuk az aktin polimerizációját jellemző sebességi állandókat, majd azokat oszlop diagrammon ábráztuk (18. ábra). A sebességi állandókat tekintve megállapíthatjuk, hogy az 1:1 aktin/I-BAR vagy kisebb I-BAR arány esetében a polimerizáció sebessége kis mértékben csökken. Ez esetben feltételezhető, hogy az I-BAR nagyobb valószínűséggel kötődhet a monomerekhez, mint a polimerizáció során kialakuló nukleuszokhoz, így a polimerizációt nem képes gyorsítani. Az I-BAR-t 1:10 arányban adva az aktinhoz viszont a polimerizáció sebességi állandója kb. kétszeresére nőtt. Ebben az esetben az aktinnál jóval nagyobb feleslegben jelen lévő I-BAR nagyobb valószínűséggel képes a megjelenő nukleuszokhoz, majd protofilamentumhoz kötődni, ami a polimerizációt felgyorsítja.

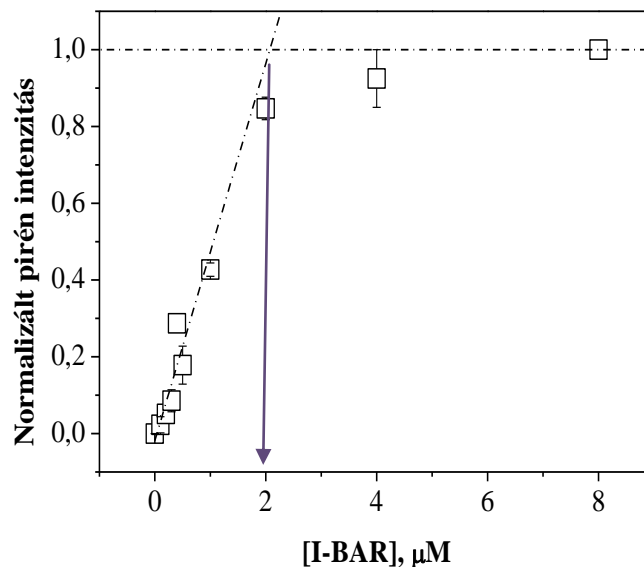


18. ábra: A pirén-aktin (2,5 μM) polimerizációs esszé sebességi állandói különböző aktin/I-BAR arány alkalmazása (1:10, 1:0, 1:1, 2,5:1) mellett (Az 1:0 referenciához képest, \*: p < 0,05).

Összegezve megállapítható, hogy az I-BAR koncentrációfüggő módon képes befolyásolni az aktin filamentum polimerizációját. További kérdésként merült fel az, hogy vajon az I-BAR ebben a mechanizmusban előidézheti-e az aktin nukleációját. A munkám további részében erre is választ kerestem.

#### IV.7. Az IRSp53-I-BAR hatása az aktin nukleációra

Az I-BAR domén hasonló affinitással képes monomer és filamentális aktinhoz is kötni, ezért megvizsgáltam, hogy vajon előidézi-e az aktin nukleációját. Kísérletet terveztünk ennek megállapítására, amelyben pirén-aktint használtunk a nukleáció vizsgálatára. A kísérletben monomer pirén-aktint ( $1 \mu\text{M}$ ) inkubáltunk növekvő koncentrációjú I-BAR domén fehérjével együtt, a mérés A-pufferben történt. Az egyensúly beállta után fluoriméterrel mértük a pirén jel-intenzitását (19. ábra). A pirén jel nagymértékben megnő a kialakult aktin nukleuszok, valamint a filamentális aktin megjelenésével, jelezve az I-BAR nukleációs képességét.

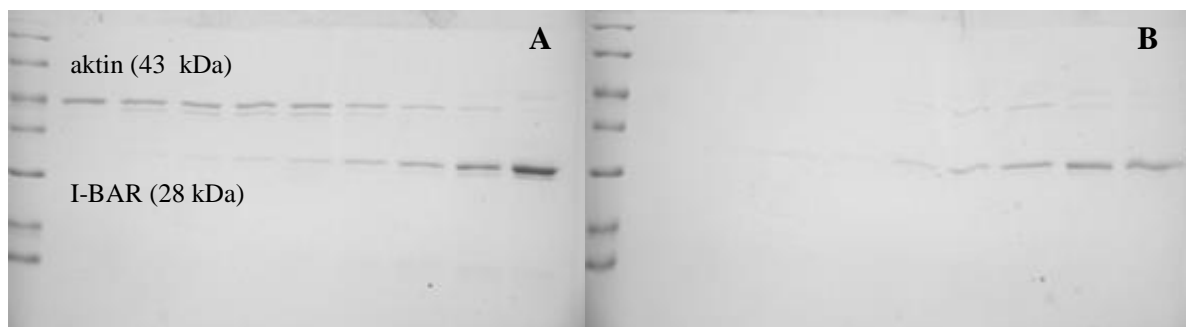


19. ábra: A pirén-aktin intenzitásának változása növekvő I-BAR domén koncentráció mellett. A mintában  $1 \mu\text{M}$  G-aktin került inkubálásra az I-BAR doménnel, majd az egyensúly beállta után mértük a pirén fluoreszcencia intenzitását.

Eredményeink szerint az 1  $\mu\text{M}$  pirén-aktin és 1  $\mu\text{M}$  vagy kevesebb I-BAR koncentráció mellett a pirén jel-intenzitás csak kis mértékben változott meg. A pirén jel 2  $\mu\text{M}$  I-BAR esetén viszont nagymértékű változást eredményezett, ami ennél magasabb I-BAR koncentrációk mellett nem nőtt tovább jelentősen (19. ábra).

A pirén-aktin fluoreszcencia intenzitásának változásából következtethetünk az I-BAR/aktin sztöchiometriára is. A mérési pontok maximumértékéhez illesztett egyenes, valamint a görbe alacsony koncentrációkhoz tartozó értékeire (lineáris változás feltételezésével) illesztett egyenes metszéspontjából ez a sztöchiometria meghatározható (19. ábra). Eredményeink szerint az I-BAR/aktin sztöchiometria 2:1-nek adódott. Annak ismeretében, hogy az I-BAR dimer fehérje az állapítható meg, hogy egy I-BAR dimer egy aktin protomerhez kötődik a filamentumban.

A mintát a fluoreszcenciás mérések után koszedimentációs esszével is megvizsgáltuk, majd SDS-page gél elektroforézissel analizáltuk (20. ábra).



20. ábra: A pirén-aktin kísérletben vizsgált minta centrifugálása során kapott koszedimentáció eredménye. A képen felülúszó (A) valamint a pellet (B) SDS-page gél elektroferogramja látható. A kísérletben 1  $\mu\text{M}$  G-aktin és különböző koncentrációjú I-BAR (0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 1; 2; 4; 8  $\mu\text{M}$ ) került inkubálásra A-pufferben.

A koszedimentációs kísérletben – az alkalmazott centrifugálás időtartama és fordulatszáma mellett – F-aktin került a pelletbe a hozzá kötött fehérjékkel együtt, a G-aktin pedig a felülúszóban maradt. Az elektroforézissel szétválasztott fehérjék analízisével – a pirén esszében megfigyelt eredményünkkel teljes összhangban – megállapítható, hogy a pelletben megjelenő F-aktin csak magasabb, 0,5  $\mu\text{M}$ -nál nagyobb I-BAR koncentráció mellett jelent meg. Alacsonyabb, 1  $\mu\text{M}$  alatti koncentrációknál az F-aktin a pelletben nem volt kimutatható (20. ábra). A pirén fluoreszcenciában, alacsony I-BAR koncentráció mellett megjelenő

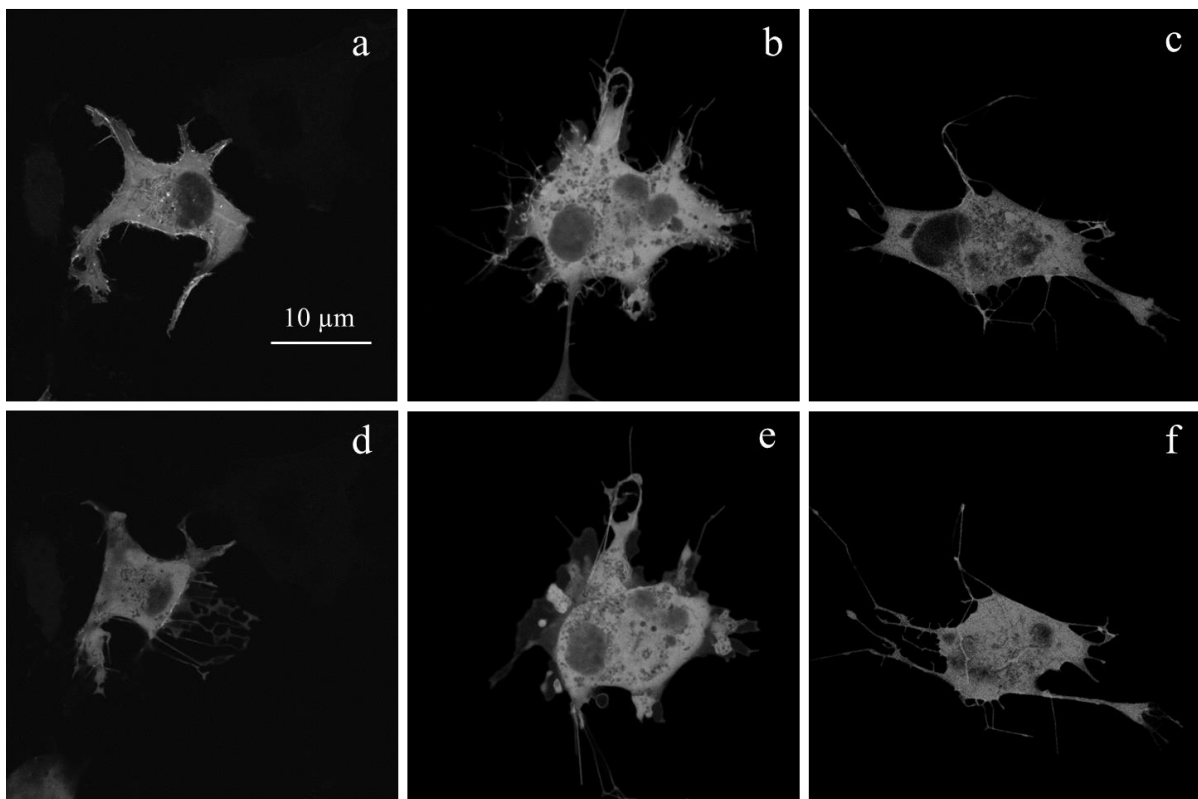


kismértékű változás származhat a kis számban megjelenő nukleuszok jeléből, amelyek a centrifugálás során, az F-aktinhoz képest alacsony molekulatömegük miatt nem jelennek meg a pelletben. Emellett nem zárható ki az, hogy az I-BAR aktin monomerekhez történő kötődése során, megemeli a pirén jel-intenzitását. Ez az eredmény igazolja az I-BAR nukleációs képességét, valamint egybeesik a polimerizációs sebességgel kapcsolatos eredményekkel is.

## IV.8. Vizsgálatok COS-7 sejt kultúráján

### IV. 8.1. IRSp53 valamint I-BAR fehérjék túlexpresszállása COS-7 sejtekben

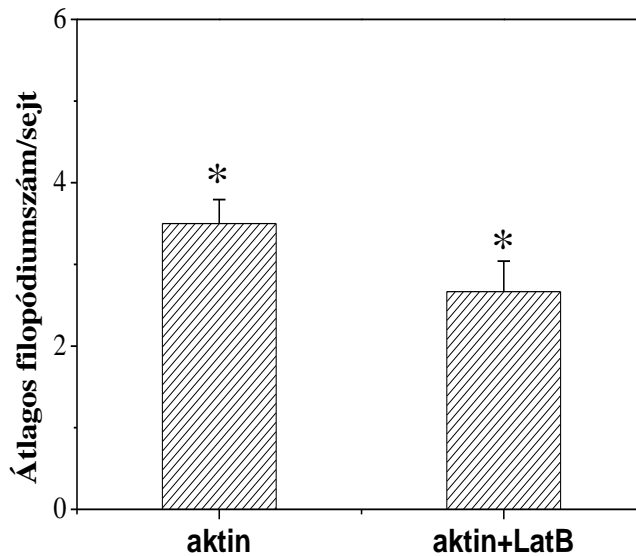
Az IRSp53 valamint I-BAR fehérjéket túlexpresszálltunk COS-7 sejt kultúrában és vizsgáltuk a sejteken létrejövő morfológiai változásokat, különös tekintettel a filopódiumok számára, hosszeloszlására. Ahhoz, hogy az aktin polimerizáció hatását is nyomon kövessük, a sejteket Latrunkulin B toxinnal kezeltük (10  $\mu$ M), ami gátolja az aktin monomerek nukleációját, ezáltal az aktin filamentumok leépülését eredményezik. A morfológiai változások megfigyelése inverz fluoreszcens, illetve konfokális mikroszkóppal történt.



21. ábra. Reprezentatív konfokális mikroszkópos felvételek EGFP-aktin (a, d), mCherry-I-BAR (b, e) és mCherry-IRSp53 fehérjével (c, f) túlexpresszállt COS-7 sejtek esetében Latrunkulin B kezelés előtt (a, b, c) és után (d, e, f) 30 perccel.

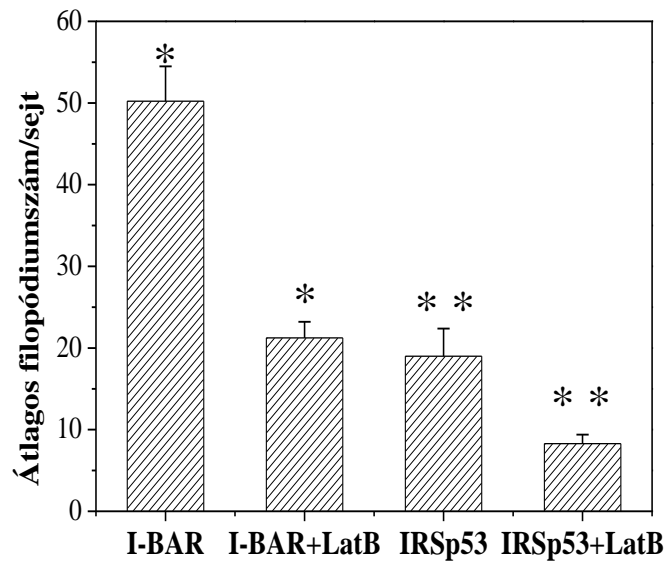
A fluoreszcens felvételeken láthatók a sejtekben megjelenő túlexpresszállt fehérjék (21. ábra), valamint a sejttesten megjelenő filopódiumok. F-aktin hiányában (LatB kezelés hatására) a sejtek alakja megváltozik, zsugorodik, méretük csökken, és általánosan kevesebb filopódium jelenik meg.

Az EGFP-aktinnal túlexpresszált COS-7 sejt kultúra alkalmas kontrollnak bizonyult, mert az aktin túltermelésére a filopódiumok száma nem változott. Transzfektálás nélkül (az eredmény nincs bemutatva) valamint EGFP-aktin túlexpresszálassal is átlagosan 3-4 filopódiumot figyeltünk meg sejtenként (22. ábra). A sejteket Latrunkulin B-vel kezelve, F-aktin jelenléte nélkül, az átlagos filopódiumszám kissé lecsökkent, átlagosan 3 filopódiumot számoltunk.



22. ábra: A filopódiumszám változása COS-7 sejtekben EGFP-aktin transzfektálást követően, valamint Latrunkulin B kezelés hatására. (n= 60), \*:  $p < 0,05$ .

Az I-BAR, illetve az IRSp53 fehérjék túlexpresszállása esetén a filopódiumok száma nagymértékben nőtt (23. ábra). Az I-BAR domén esetében átlagosan 50 filopódiumot figyeltünk meg sejtenként, ami közel kétszerese az IRSp53 fehérjét expresszált sejtekben tapasztaltak, ahol átlagosan 20 filopódium volt található.



23. ábra: A filopódiumszám változása COS-7 sejtekben mCherry-I-BAR illetve mCherry-IRSp53 transzfekciót követően, valamint Latrunkulin B kezelés hatására (n= 62), \*, \*\*:  $p < 0,05$ .

Ezeket az eredményeket az aktinnal transzfektált kontrollal összevetve, az I-BAR esetén 12-szeres, míg az IRSp53 estében 6-szoros növekedés volt megfigyelhető a filopódiumok számában. Ennek a magyarázata egyrészt az lehet, hogy az I-BAR domén - mint egy „kivágott” funkcionális egység az IRSp53 fehérjéből - kevesebb kontroll mechanizmus által szabályozott, mint a teljes hosszúságú IRSp53 fehérje. Másrészt az I-BAR domén inkább a filopódiumok inicializációjában játszhat szerepet. Az I-BAR túlexpresszálas eredményeként a filopódiumok a membrán több pontján is létrejönnek, megemelve ezzel az átlagos filopódiumszámot.

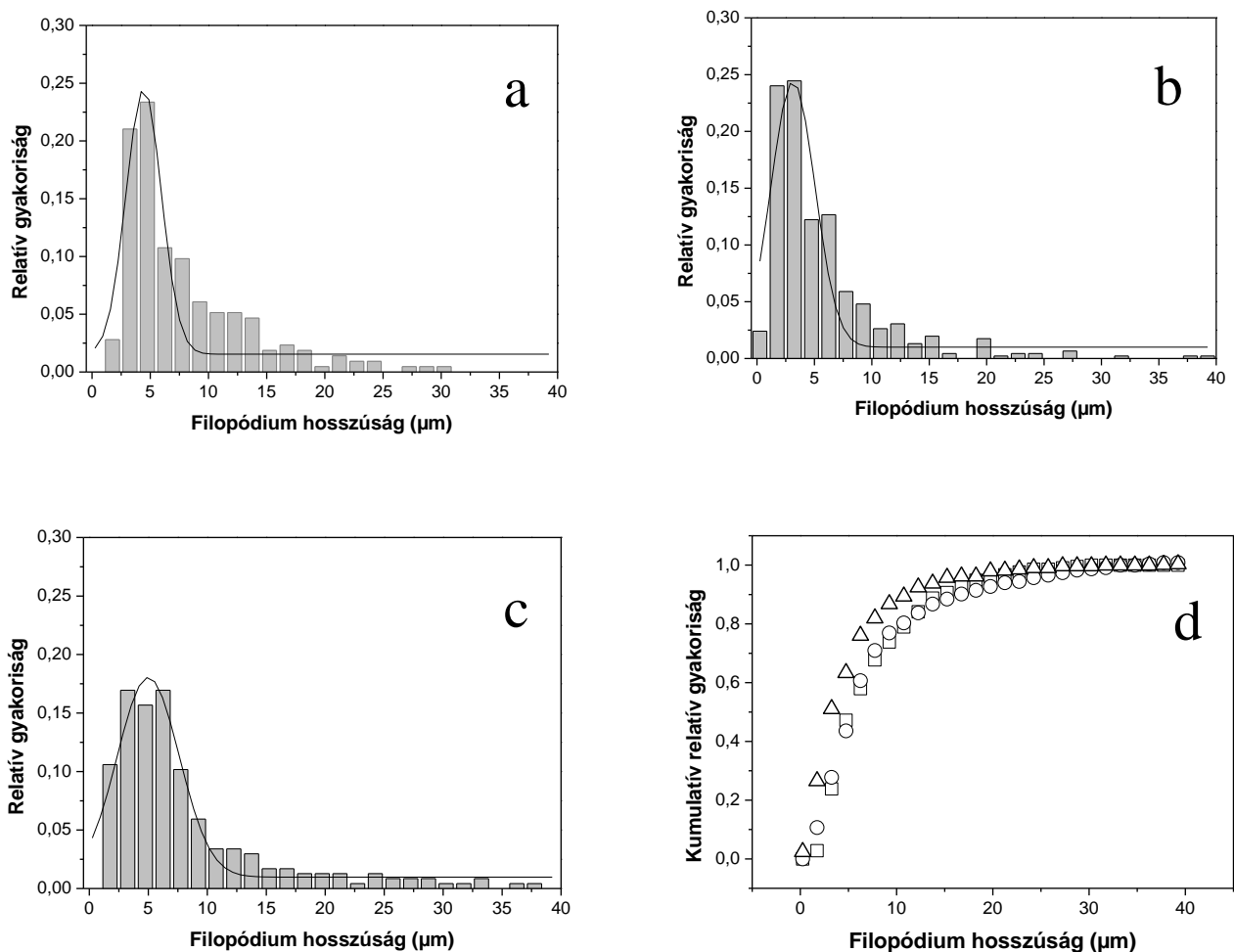
Latrunkulin B kezelés hatására, F-aktin nélkül a sejtnyúlványok száma az I-BAR estében a kiindulási szint 40%-ára, míg az IRSp53 estében felére csökken, amit a megemelkedett G-aktin koncentráció és az F-aktin hiány együttesen eredményez (23. ábra). A filopódiumok tehát F-aktin nélkül is – ugyan csökkent számban, de – megtalálhatóak a sejtek felszínén.

A sejteken megjelenő filopódiumok számát tehát az I-BAR domén és IRSp53 fehérje nagymértékben megnöveli, több kiindulási ponton kezdeményezve a filopódiumok

megjelenését. Az F-aktin jelenléte nem szükséges feltétele a filopódiumok jelenlétének, viszont annak hiányában a filopódiumok száma drasztikusan csökken.

#### IV. 8.2. Filopódium hosszeloszlás vizsgálata COS-7 sejtekben

Kísérleteink további részében vizsgáltuk a különböző fehérjék (I-BAR, IRSp53, aktin) hatását a filopódiumok hosszeloszlására. Az eredményekből hisztogramokat készítettünk, ahol a relatív gyakoriságot ábrázoltuk a filopódium hossz függvényében (24. ábra).



24. ábra: A filopódium hossz relatív gyakorisága COS-7 sejtekben túlexpresszáva EGFP-aktin (a), mCherry-I-BAR (b), mCherry-IRSp53 vektorokkal (c). A filopódium hossz kumulatív relatív gyakorisága (d), az EGFP-aktin (négyzet), mCherry-I-BAR (háromszög) és mCherry-IRSp53 (kör) esetében.

Az aktinnal túlexpresszált sejtek által létrehozott filopódiumok átlagosan 4,4  $\mu\text{m}$  hosszúnak adódtak. Az I-BAR fehérjét tartalmazó COS-7 sejtek esetében 3,1  $\mu\text{m}$ -esek voltak, míg az IRSp53 fehérje által létrehozott átlagos filopódiumhossz 5,0  $\mu\text{m}$  volt (6. táblázat).

<i>konstrukció</i>	<i>átlagos filopódium hossz (<math>\mu\text{m}</math>)</i>
EGFP-aktin	4,4 $\pm$ 0.2 *, **
mCherry-I-BAR	3,1 $\pm$ 0.2 *
mCherry-IRSp53	5,0 $\pm$ 0.2 **

6. táblázat: Átlagos filopódium hossz az EGFP-aktin, mCherry-I-BAR és mCherry-IRSP53 konstrukciókkal transzfektált COS-7 sejtek esetén (\*, \*\*:  $p < 0,05$ ).

Az eredmények összehasonlításához az egyes esetekben meghatároztuk a kumulatív relatív gyakoriság értékeit (24. ábra). Az ábrán jól látható, hogy az eloszlás az aktin illetve az IRSp53 fehérjéknél közelítőleg megegyezik, ezzel szemben az I-BAR domén esetében a hosszeloszlás kis mértékben a rövidebb filamentumok felé tolódik el. Az I-BAR túlexpresszállása tehát szignifikánsan megemeli a filopódiumok számát (több filopódium megjelenését inicializálva) és egyúttal a filopódiumok hosszának kismértékű csökkenését idézi elő. Eddigi megfigyeléseink szerint az I-BAR domén alapvetően a filopódiumok megjelenési helyének számát növeli, a hosszukat azonban nem befolyásolja.

Érdekes lett volna megvizsgálni a hosszeloszlást Latrunkulin B kezelés után is, ezt a mérésorozatot azonban nem sikerült kivitelezni. Latrunkulin B toxinnal történő kezelés hatására sokszor a citoskeletális hálózat nagymértékben leépül, ezekben az esetekben a filopódiumok kiindulási helye és végpontja nehezen azonosítható be, mint, ahogy azt a 21. ábra EGFP-aktin estében kapott mikroszkópos kép is jól mutatja.

## V. Összefoglalás

Korábbi tanulmányok bebizonyították, hogy az I-BAR kölcsönhat a lipid-membránokkal. Azt is megfigyelték, hogy jobban kötődik a negatív töltésű foszfolipidekhez, ezek közül is a PIP<sub>2</sub> tartalmú vezikulákhoz. Bár több tanulmány foglalkozott már az I-BAR széleskörű szerepével, annak különböző foszfolipidipidekkel való kölcsönhatását részletesen még nem tanulmányozták. Kísérleteink során célunk volt az I-BAR lipid kötését meghatározni, továbbá az aktinnak és az I-BAR-nak egymásra gyakorolt hatását vizsgálni.

Munkánkban FRET módszert alkalmaztunk arra, hogy nyomon kövessük az I-BAR különböző negatívan töltött (PS illetve PIP<sub>2</sub>) és nem töltött foszfolipidekhez (PC) való kötődését. Azt tapasztaltuk, hogy az I-BAR minden vizsgált foszfolipid típushoz képes kötődni, a kialakult kötést a lipid-kettősrétegben jelen lévő töltött foszfolipidek stabilizálják. A FRET transzferhatásfok a különböző lipidösszetételű vezikulák esetében 0,15 és 0,52 között alakult, – 200 μM lipid koncentrációnál – jelezve a létrejött kötődést. A 15% PIP<sub>2</sub>-t tartalmazó vezikulák esetében kaptuk a legmagasabb transzferhatásfok értéket, ezt követték a 4% PIP<sub>2</sub>-t, majd a kizárólag PS, illetve a PC tartalmú vezikulák. Fontos megjegyezni, hogy a FRET hatásfok értékéből közvetlenül nem tudunk kötés erősségére következtetni. Meghatároztuk az I-BAR és a vizsgált foszfolipidek kötését leíró egyensúlyi disszociációs állandókat ( $K_d$ ), amelyek lipidtípustól függően 79 – 169 μM tartományba esnek. A semleges töltésű PC lipideket tartalmazó vezikulák esetében találtuk a legkisebb, míg a PIP<sub>2</sub> esetében a legnagyobb affinitást. Fluoreszcencia kioltási kísérletekkel kimutattuk, hogy a fluorofór hozzáférhetősége a kioltó molekula számára csökkent a negatív töltések arányának illetve koncentrációjának növekedésével, aminek hátterében az erősebb I-BAR-lipid kölcsönhatás áll. Ezek az eredmények összhangban állnak a FRET eredményeinkkel.

A TNS fluorofórt tartalmazó micellákon végzett kísérletek az mutatták, hogy az I-BAR nem penetrál a PIP<sub>2</sub> tartalmú micellák középső régiójába, azok felszínéhez kötődik.

További FRET kísérletekkel megmutattuk, hogy az aktin gátolja vagy felerősíti az I-BAR és a foszfolipidek közti kölcsönhatást és ennek jellege az aktin polimerizációs állapotától függ. A G-aktin jelenléte csökkenti, míg az F-aktin növeli az I-BAR-membrán kapcsolat stabilitását. Feltételezéseink szerint az I-BAR-on a lipideknek és a G-aktinnak átfedő kötőhelye van, a G-aktin így sejtekben elősegítheti az I-BAR membránról történő disszociációját. Ez a mechanizmus szerepet játszhat pl. a filopódium vagy más sejtnyúlványok visszahúzódása során. Az F-aktin jelenléte ezzel szemben tovább stabilizálja az I-BAR-lipid

kapcsolatot, ami a kialakuló filopódium stabilitását növelheti. E feltételezett mechanizmus részleteinek feltárásához a későbbiekben sejt kultúráján további vizsgálatokat fogunk végezni.

Pirén-aktinon polimerizációs kísérleteket végeztünk. Kimutattuk, hogy az I-BAR aktin polimerizációra gyakorolt hatása függ az I-BAR koncentrációjától. Az aktin mellett jelen lévő – az aktinnal összemérhető vagy annál kisebb koncentrációjú – I-BAR az aktin polimerizációját lassítja, nagy (kb. 10-szeres) feleslegben viszont a polimerizációt gyorsítja. Ez az eredmény annak következménye, hogy az I-BAR G- és F-aktinhoz is hasonló affinitással képes kötődni. Az I-BAR domén 1:1 moláris arányban képes az aktinhoz kötődni, és ahhoz feleslegben adva (2-4-szeres mennyiségben) az aktin nukleációját, valamint polimerizációját idézi elő.

COS-7 sejt kultúráján végeztünk kísérleteket, ahol a sejtekben transzfektáltuk és túlexpresszáztuk az EGFP-aktin, mCherry I-BAR, mCherry-IRSp53 fehérjéket. Ahhoz, hogy követni tudjuk a G- és F-aktin jelenlétét, a sejteket Latrunkulin B toxinnal kezeltük, ami az aktin filamentumokat lebontva magas G-aktin koncentrációt eredményez. Az így bekövetkező morfológiai változásokat fluoreszcens illetve konfokális mikroszkópiával vizsgáltuk. A kísérletek során azt tapasztaltuk, hogy I-BAR domén túlexpresszálása jelentősen, kb. 12-szeresére növeli a filopódiumok számát. A teljes hosszúságú fehérje ezzel szemben kb. 6-szoros emelkedést eredményez. Mindez arra utal, hogy az IRSp53 fehérje I-BAR doménje a filopódiumok létrejöttének kulcsfontosságú szereplője. A teljes fehérje vélhetően, a szabályozó mechanizmusoknak köszönhetően mérsékelten indukálja a filopódiumok kialakulását. G-aktin jelenlétében – F-aktin jelenléte nélkül – a filopódiumok számában 2-3-szoros csökkenését tapasztaltuk mind az I-BAR domén, mind az IRSp53 túlexpresszálás esetén. Megállapítható, hogy az F-aktin jelenléte nem szükséges feltétele a filopódiumok létrejöttének, azok G-aktin jelenlétében is megtalálhatóak, igaz, alacsonyabb számban. Az I-BAR domén jelenléte megemeli az filopódiumok inicializációs pontjait, több filopódiumot eredményezve.

Kutatási eredményeinkkel szeretnénk hozzájárulni az aktin citoszkeleton szerepének tisztázásához a filopódiumok kialakulásában, feltérképezve a lezajló folyamatok molekuláris mechanizmusait. Eredményeinkkel továbbá bővebb információt kapunk mind az aktin, mind az IRSp53 fehérje összetett biológiai szerepéről is.



## VI. Perspektívák

Munkám során az IRSp53-I-BAR domén membránkötő sajátosságait vizsgáltam mesterséges lipid kettősréteghez (LUVET), főként fluoreszcencia spektroszkópiai módszerek alkalmazásával. Eredményeim arra utalnak, hogy az aktinnak meghatározó szerepe van a filopódiumok megjelenésében, annak szabályozásában, azonban a létrejöttük az I-BAR domén fehérje funkciójának eredménye.

Kísérleteket végeztünk COS-7 sejt kultúrákon, mivel számos tanulmány bizonyítja [2, 7, 38, 81, 82], hogy ezek a sejtek alkalmas modellek a sejtnyúlványok, elsősorban a filopódiumok és lamellipódiumok tanulmányozására. Az IRSp53 nagy mennyiségben az idegsejtekben fordul elő, ezért a továbbiakban célszerű lenne vizsgálatainkat idegsejtekre is kiterjeszteni. A fluoreszcencia spektroszkópiás kísérletek során kapott eredményeket is érdemes lenne a későbbiekben, további – sejt kultúráján végzett – vizsgálatokkal kiegészíteni. Géncsendesítés („silencing”) vagy gén kiütés („knock-out”) kísérletek tervezésével pontosítani lehetne a filopódiumok létrejöttének, vagy növekedésének további feltételeit.

Munkám célja az volt, hogy megértsük az IRSp53 illetve az I-BAR domén fehérje milyen módon képes kölcsönhatást kialakítani a sejtmembránnal illetve hogyan történik az ahhoz asszociálódó aktin hálózat szabályozása. Ezen fehérjék sejtben megjelenő dinamikai tulajdonságait további kísérletekkel lehetne vizsgálni. FRAP (fluoreszcencia visszatérés fotohalványítást követően), valamint FCS (fluoreszcens korrelációs spektroszkópia) kísérletekkel jellemezhető lenne az I-BAR és IRSp53 kötődése illetve dinamikai tulajdonságai a sejtmembránban. FRET/FLIM vizsgálatokat lehetne végezni COS-7 vagy idegsejtekben, összefüggést keresve a korábbi *in vitro* FRET kísérletek eredményeivel. Vizsgálni lehetne sejtben, hogy a filamentális és monomer aktin arányának eltolása, hogyan befolyásolja az I-BAR membránkötő tulajdonságait. Time-lapse mérésekkel (speckle mikroszkópia, FRAP) ki lehetne mutatni, hogy az I-BAR túlexpresszállása milyen hatással van az aktin dinamikára. Ezekkel párhuzamosan térbeli lokalizációs kísérleteket (SIM) is el lehetne végezni, amelyek bővebb információt szolgáltatnának az IRSp53/aktin illetve membrán abszolút és relatív lokalizációjáról a filopódiumban és a lamellipódiumban is.

Szövetspecifikus I-BAR domént tartalmazó fehérje (mint, pl. az ABBA fehérje) sejtben történő túlexpresszállásával választ kaphatnánk arra a kérdésre, hogy a korábban leírt funkciók mennyiben általános vagy esetleg specifikus tulajdonságai az I-BAR fehérjéknek. Érdemes

lenne az általunk vizsgált  $\alpha$ -aktin mellet pl.: az idegsejtekben megjelenő  $\beta$ -aktin szerepét is – a leírt funkciókat tekintve – meghatározni.

## VII. Rövidítések

BAR: Bin-amphiphysin-Rvs fehérjék

DMSO: dimethylsulfoxide

DTT: DL-Dithiothreitol

EDTA: ethylenedinitrilotetraacetic acid

Ena/VASP: enabled / vasodilator-stimulated phosphoprotein

F-aktin: filamentális aktin

FCS: fluoreszcencia korrelációs spektroszkópia

FRAP: fluoreszcencia visszatérése fotohalványítást követően

FRET: Förster-típusú Rezonancia Energia Transzfer

FLIM: fluoreszcencia élettartam mikroszkópia

G-aktin: monomer aktin

GSH: glutation

GST: glutation-S-transzferáz

GTP: guanozin-trifoszfát

IAEDANS: N-[[iodoacetyl)amino]ethyl]-5-naphthylamine-1-sulfonate

IAF: 5-(iodoacetamid) fluoreszcein

I-BAR: inverz BAR fehérjék

I-BAR: IRSp53/MIM homológia domén

IRSp53: inzulin receptor szubsztrát fehérje 53 kDa molekulatömeggel

K4E-I-BAR: 4 lizin mutáns I-BAR

LUVET: Large Unilamellar Vesicles (nagy unilamelláris vezikulák)

MIM: missing-in-metastasis fehérje

PBS: phosphate buffer saline

PC: foszfatidil-kolin

PIP<sub>2</sub>: L- $\alpha$ -foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát

PS: foszfatidil-szerin

SIM: strukturált megvilágítás mikroszkópia

TNS: 6-p-toluidinilnaftalin-2-szulfonát

## VIII. Irodalomjegyzék

1. Svitkina, T.M., et al., Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network. *J Cell Biol*, 2003. **160**(3): p. 409-21.
2. Millard, T.H., et al., Structural basis of filopodia formation induced by the IRSp53/MIM homology domain of human IRSp53. *Embo J*, 2005. **24**(2): p. 240-50.
3. May, R.C. and L.M. Machesky, Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *J Cell Sci*, 2001. **114**(Pt 6): p. 1061-77.
4. He, Z.Y., X.F. Lu, and B. Qu, [Protective effects of shenmai injection on the delayed injury of the cerebral neurons in rat induced by intracerebral hemorrhage]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 2005. **30**(7): p. 526-30.
5. Lu, W., L. Rong, and T. Chen, Global convergence of delayed neural network systems. *Int J Neural Syst*, 2003. **13**(3): p. 193-204.
6. Li, Y., et al., Effect of imidapril on heterogeneity of slow component of delayed rectifying K<sup>+</sup> current in rabbit left ventricular hypertrophic myocytes. *Acta Pharmacol Sin*, 2003. **24**(7): p. 681-6.
7. Saarikangas, J., et al., Molecular mechanisms of membrane deformation by I-BAR domain proteins. *Curr Biol*, 2009. **19**(2): p. 95-107.
8. Lubet, M.T. and J.R. Kettman, Regulation of the primary immune response to ovalbumin in mice: activation of T cells mediating delayed-type hypersensitivity, nonspecific help, and specific help, and their sensitivity to radiation. *J Immunol*, 1979. **123**(1): p. 426-33.
9. Zhao, H., A. Pykalainen, and P. Lappalainen, I-BAR domain proteins: linking actin and plasma membrane dynamics. *Curr Opin Cell Biol*, 2011. **23**(1): p. 14-21.
10. Abbas, Y.M., et al., Structural basis for viral 5'-PPP-RNA recognition by human IFIT proteins. *Nature*, 2013. **494**(7435): p. 60-4.
11. Ramirez-Weber, F.A. and T.B. Kornberg, Cytosomes: cellular processes that project to the principal signaling center in *Drosophila* imaginal discs. *Cell*, 1999. **97**(5): p. 599-607.
12. Rustom, A., et al., Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science*, 2004. **303**(5660): p. 1007-10.
13. Lehmann, M.J., et al., Actin- and myosin-driven movement of viruses along filopodia precedes their entry into cells. *J Cell Biol*, 2005. **170**(2): p. 317-25.

14. Romero, S., et al., *ATP-mediated Erk1/2 activation stimulates bacterial capture by filopodia, which precedes Shigella invasion of epithelial cells. Cell Host Microbe*, 2011. **9**(6): p. 508-19.
15. Koerten, H.K., J.S. Ploem, and W.T. Daems, *Ingestion of latex beads by filopodia of adherent mouse peritoneal macrophages. A scanning electron microscopical and reflection contrast microscopical study. Exp Cell Res*, 1980. **128**(2): p. 470-5.
16. Faix, J., et al., *Filopodia: Complex models for simple rods. Int J Biochem Cell Biol*, 2009. **41**(8-9): p. 1656-64.
17. Pollard, T.D. and J.A. Cooper, *Actin, a central player in cell shape and movement. Science*, 2009. **326**(5957): p. 1208-12.
18. Heasman, S.J. and A.J. Ridley, *Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008. **9**(9): p. 690-701.
19. Le Clainche, C. and M.F. Carrier, *Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. Physiol Rev*, 2008. **88**(2): p. 489-513.
20. Pollard, T.D. and G.G. Borisy, *Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. Cell*, 2003. **112**(4): p. 453-65.
21. 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.
22. Small, J.V., G. Isenberg, and J.E. Celis, *Polarity of actin at the leading edge of cultured cells. Nature*, 1978. **272**(5654): p. 638-9.
23. Narita, A., et al., *Direct determination of actin polarity in the cell. J Mol Biol*, 2012. **419**(5): p. 359-68.
24. Salbreux, G., G. Charras, and E. Paluch, *Actin cortex mechanics and cellular morphogenesis. Trends Cell Biol*, 2012. **22**(10): p. 536-45.
25. Morone, N., et al., *Three-dimensional reconstruction of the membrane skeleton at the plasma membrane interface by electron tomography. J Cell Biol*, 2006. **174**(6): p. 851-62.
26. Steffen, A., et al., *Filopodia formation in the absence of functional WAVE- and Arp2/3-complexes. Mol Biol Cell*, 2006. **17**(6): p. 2581-91.
27. Gomez, T.S., et al., *Formins regulate the actin-related protein 2/3 complex-independent polarization of the centrosome to the immunological synapse. Immunity*, 2007. **26**(2): p. 177-90.

28. Korobova, F. and T. Svitkina, Arp2/3 complex is important for filopodia formation, growth cone motility, and neuritogenesis in neuronal cells. *Mol Biol Cell*, 2008. **19**(4): p. 1561-74.
29. Nicholson-Dykstra, S.M. and H.N. Higgs, Arp2 depletion inhibits sheet-like protrusions but not linear protrusions of fibroblasts and lymphocytes. *Cell Motil Cytoskeleton*, 2008. **65**(11): p. 904-22.
30. 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.
31. Yang, C. and T. Svitkina, Filopodia initiation: focus on the Arp2/3 complex and formins. *Cell Adh Migr*, 2011. **5**(5): p. 402-8.
32. Small, J.V., et al., Assembling an actin cytoskeleton for cell attachment and movement. *Biochim Biophys Acta*, 1998. **1404**(3): p. 271-81.
33. Faix, J. and K. Rottner, The making of filopodia. *Curr Opin Cell Biol*, 2006. **18**(1): p. 18-25.
34. Mellor, H., The role of formins in filopodia formation. *Biochim Biophys Acta*, 2010. **1803**(2): p. 191-200.
35. Lewis, A.K. and P.C. Bridgman, Nerve growth cone lamellipodia contain two populations of actin filaments that differ in organization and polarity. *J Cell Biol*, 1992. **119**(5): p. 1219-43.
36. Pellegrin, S. and H. Mellor, The Rho family GTPase Rif induces filopodia through mDia2. *Curr Biol*, 2005. **15**(2): p. 129-33.
37. Schirenbeck, A., et al., The Diaphanous-related formin dDia2 is required for the formation and maintenance of filopodia. *Nat Cell Biol*, 2005. **7**(6): p. 619-25.
38. Mattila, P.K. and P. Lappalainen, Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008. **9**(6): p. 446-54.
39. Medalia, O., et al., Organization of actin networks in intact filopodia. *Curr Biol*, 2007. **17**(1): p. 79-84.
40. Hotulainen, P. and C.C. Hoogenraad, Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function. *J Cell Biol*, 2010. **189**(4): p. 619-29.
41. Korobova, F. and T. Svitkina, Molecular architecture of synaptic actin cytoskeleton in hippocampal neurons reveals a mechanism of dendritic spine morphogenesis. *Mol Biol Cell*, 2010. **21**(1): p. 165-76.

42. Peng, J., et al., Disruption of the Diaphanous-related formin *Drf1* gene encoding *mDial* reveals a role for *Drf3* as an effector for *Cdc42*. *Curr Biol*, 2003. **13**(7): p. 534-45.
43. 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.
44. Lu, M., et al., Delayed retraction of filopodia in gelsolin null mice. *J Cell Biol*, 1997. **138**(6): p. 1279-87.
45. Mejillano, M.R., et al., Lamellipodial versus filopodial mode of the actin nanomachinery: pivotal role of the filament barbed end. *Cell*, 2004. **118**(3): p. 363-73.
46. Menna, E., et al., *Eps8* regulates axonal filopodia in hippocampal neurons in response to brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *PLoS Biol*, 2009. **7**(6): p. e1000138.
47. Disanza, A., et al., Regulation of cell shape by *Cdc42* is mediated by the synergic actin-bundling activity of the *Eps8-IRSp53* complex. *Nat Cell Biol*, 2006. **8**(12): p. 1337-47.
48. Menna, E., et al., From filopodia to synapses: the role of actin-capping and anti-capping proteins. *Eur J Neurosci*, 2011. **34**(10): p. 1655-62.
49. Sarmiere, P.D. and J.R. Bamburg, Regulation of the neuronal actin cytoskeleton by ADF/cofilin. *J Neurobiol*, 2004. **58**(1): p. 103-17.
50. Govind, S., et al., *Cdc42Hs* facilitates cytoskeletal reorganization and neurite outgrowth by localizing the 58-kD insulin receptor substrate to filamentous actin. *J Cell Biol*, 2001. **152**(3): p. 579-94.
51. Krugmann, S., et al., *Cdc42* induces filopodia by promoting the formation of an *IRSp53:Mena* complex. *Curr Biol*, 2001. **11**(21): p. 1645-55.
52. Yamagishi, A., et al., A novel actin bundling/filopodium-forming domain conserved in insulin receptor tyrosine kinase substrate *p53* and missing in metastasis protein. *J Biol Chem*, 2004. **279**(15): p. 14929-36.
53. Ahmed, S., W.I. Goh, and W. Bu, I-BAR domains, *IRSp53* and filopodium formation. *Semin Cell Dev Biol*, 2010. **21**(4): p. 350-6.
54. Berg, J.S., et al., Myosin-X, a novel myosin with pleckstrin homology domains, associates with regions of dynamic actin. *J Cell Sci*, 2000. **113 Pt 19**: p. 3439-51.
55. Watanabe, T.M., et al., Myosin-X induces filopodia by multiple elongation mechanism. *J Biol Chem*, 2010. **285**(25): p. 19605-14.
56. Nambiar, R., R.E. McConnell, and M.J. Tyska, Myosin motor function: the ins and outs of actin-based membrane protrusions. *Cell Mol Life Sci*, 2010. **67**(8): p. 1239-54.

57. Albrecht-Buehler, G., *Filopodia of spreading 3T3 cells. Do they have a substrate-exploring function?* *J Cell Biol*, 1976. **69**(2): p. 275-86.
58. Forscher, P. and S.J. Smith, *Actions of cytochalasins on the organization of actin filaments and microtubules in a neuronal growth cone.* *J Cell Biol*, 1988. **107**(4): p. 1505-16.
59. Welnhofner, E.A., L. Zhao, and C.S. Cohan, *Actin dynamics and organization during growth cone morphogenesis in Helisoma neurons.* *Cell Motil Cytoskeleton*, 1997. **37**(1): p. 54-71.
60. 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.
61. Lai, F.P., et al., *Arp2/3 complex interactions and actin network turnover in lamellipodia.* *EMBO J*, 2008. **27**(7): p. 982-92.
62. Bernstein, B.W. and J.R. Bamburg, *ADF/cofilin: a functional node in cell biology.* *Trends Cell Biol*, 2010. **20**(4): p. 187-95.
63. Bugyi, B. and M.F. Carrier, *Control of actin filament treadmilling in cell motility.* *Annu Rev Biophys*, 2010. **39**: p. 449-70.
64. Sheetz, M.P., D.B. Wayne, and A.L. Pearlman, *Extension of filopodia by motor-dependent actin assembly.* *Cell Motil Cytoskeleton*, 1992. **22**(3): p. 160-9.
65. Okabe, S. and N. Hirokawa, *Actin dynamics in growth cones.* *J Neurosci*, 1991. **11**(7): p. 1918-29.
66. Mallavarapu, A. and T. Mitchison, *Regulated actin cytoskeleton assembly at filopodium tips controls their extension and retraction.* *J Cell Biol*, 1999. **146**(5): p. 1097-106.
67. Frost, A., V.M. Unger, and P. De Camilli, *The BAR domain superfamily: membrane-molding macromolecules.* *Cell*, 2009. **137**(2): p. 191-6.
68. Graham, T.R. and M.M. Kozlov, *Interplay of proteins and lipids in generating membrane curvature.* *Curr Opin Cell Biol*, 2010. **22**(4): p. 430-6.
69. Kaksonen, M., C.P. Toret, and D.G. Drubin, *Harnessing actin dynamics for clathrin-mediated endocytosis.* *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006. **7**(6): p. 404-14.
70. Bischoff, M., et al., *Cytonemes are required for the establishment of a normal Hedgehog morphogen gradient in Drosophila epithelia.* *Nat Cell Biol*, 2013. **15**(11): p. 1269-81.
71. Crecelius, A.R., et al., *ATP-mediated vasodilatation occurs via activation of inwardly rectifying potassium channels in humans.* *J Physiol*, 2012. **590**(Pt 21): p. 5349-59.



72. Lin, S.Y., et al., *Reversible hearing impairment: delayed complication of murine typhus or adverse reaction to azithromycin?* *J Med Microbiol*, 2010. **59**(Pt 5): p. 602-6.
73. Tan, D.H., et al., *Chlorpyrifos induces delayed cytotoxicity after withdrawal in primary hippocampal neurons through extracellular signal-regulated kinase inhibition.* *Biol Pharm Bull*, 2009. **32**(10): p. 1649-55.
74. Wang, L., W. Lu, and T. Chen, *Multistability and new attraction basins of almost-periodic solutions of delayed neural networks.* *IEEE Trans Neural Netw*, 2009. **20**(10): p. 1581-93.
75. Chi, W., et al., *The pentatricopeptide repeat protein DELAYED GREENING1 is involved in the regulation of early chloroplast development and chloroplast gene expression in Arabidopsis.* *Plant Physiol*, 2008. **147**(2): p. 573-84.
76. Zhang, F., et al., *Delayed liver injury and impaired hepatocyte proliferation after carbon tetrachloride exposure in BPOZ2-deficient mice.* *Toxicol Lett*, 2009. **188**(3): p. 201-7.
77. Lu, W. and T. Chen, *Almost periodic dynamics of a class of delayed neural networks with discontinuous activations.* *Neural Comput*, 2008. **20**(4): p. 1065-90.
78. Minich, L.L., et al., *Delayed diagnosis of Kawasaki disease: what are the risk factors?* *Pediatrics*, 2007. **120**(6): p. e1434-40.
79. Tan, A.H., N. Lu, and D. Xiao, *Integrating temporal difference methods and self-organizing neural networks for reinforcement learning with delayed evaluative feedback.* *IEEE Trans Neural Netw*, 2008. **19**(2): p. 230-44.
80. Lee, S.H., et al., *Structural basis for the actin-binding function of missing-in-metastasis.* *Structure*, 2007. **15**(2): p. 145-55.
81. Mattila, P.K., et al., *Missing-in-metastasis and IRSp53 deform PI(4,5)P2-rich membranes by an inverse BAR domain-like mechanism.* *J Cell Biol*, 2007. **176**(7): p. 953-64.
82. Suetsugu, S., et al., *The RAC binding domain/IRSp53-MIM homology domain of IRSp53 induces RAC-dependent membrane deformation.* *J Biol Chem*, 2006. **281**(46): p. 35347-58.
83. Scita, G., et al., *IRSp53: crossing the road of membrane and actin dynamics in the formation of membrane protrusions.* *Trends Cell Biol*, 2008. **18**(2): p. 52-60.
84. Funato, Y., et al., *IRSp53/Eps8 complex is important for positive regulation of Rac and cancer cell motility/invasiveness.* *Cancer Res*, 2004. **64**(15): p. 5237-44.

85. Lin, J., et al., *Differential regulation of cortactin and N-WASP-mediated actin polymerization by missing in metastasis (MIM) protein. Oncogene, 2005. 24(12): p. 2059-66.*
86. Yeh, T.C., et al., *Characterization and cloning of a 58/53-kDa substrate of the insulin receptor tyrosine kinase. J Biol Chem, 1996. 271(6): p. 2921-8.*
87. Alvarez, C.E., J.G. Sutcliffe, and E.A. Thomas, *Novel isoform of insulin receptor substrate p53/p58 is generated by alternative splicing in the CRIB/SH3-binding region. J Biol Chem, 2002. 277(27): p. 24728-34.*
88. Miyahara, A., et al., *Genomic structure and alternative splicing of the insulin receptor tyrosine kinase substrate of 53-kDa protein. J Hum Genet, 2003. 48(8): p. 410-4.*
89. Peter, B.J., et al., *BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. Science, 2004. 303(5657): p. 495-9.*
90. Oda, K., et al., *Identification of BAIAP2 (BAI-associated protein 2), a novel human homologue of hamster IRSp53, whose SH3 domain interacts with the cytoplasmic domain of BAI1. Cytogenet Cell Genet, 1999. 84(1-2): p. 75-82.*
91. Okamumoho, Y. and M. Yamada, *[Cloning and characterization of cDNA for DRPLA interacting protein]. Nippon Rinsho, 1999. 57(4): p. 856-61.*
92. Nakagawa, H., et al., *IRSp53 is colocalised with WAVE2 at the tips of protruding lamellipodia and filopodia independently of Mena. J Cell Sci, 2003. 116(Pt 12): p. 2577-83.*
93. Okamumoho, Y. and M. Yamada, *[Cloning and characterization of cDNA for DRPLA interacting protein]. Nihon Rinsho, 1999. 57(4): p. 856-61.*
94. Miki, H. and T. Takenawa, *WAVE2 serves a functional partner of IRSp53 by regulating its interaction with Rac. Biochem Biophys Res Commun, 2002. 293(1): p. 93-9.*
95. Miki, H., et al., *IRSp53 is an essential intermediate between Rac and WAVE in the regulation of membrane ruffling. Nature, 2000. 408(6813): p. 732-5.*
96. Fujiwara, T., et al., *Rho small G-protein-dependent binding of mDia to an Src homology 3 domain-containing IRSp53/BAIAP2. Biochem Biophys Res Commun, 2000. 271(3): p. 626-9.*
97. Sekerkova, G., et al., *Novel espin actin-bundling proteins are localized to Purkinje cell dendritic spines and bind the Src homology 3 adapter protein insulin receptor substrate p53. J Neurosci, 2003. 23(4): p. 1310-9.*

98. Soltau, M., D. Richter, and H.J. Kreienkamp, *The insulin receptor substrate IRSp53 links postsynaptic shank1 to the small G-protein cdc42*. *Mol Cell Neurosci*, 2002. **21**(4): p. 575-83.
99. Bockmann, J., et al., *ProSAP/Shank postsynaptic density proteins interact with insulin receptor tyrosine kinase substrate IRSp53*. *J Neurochem*, 2002. **83**(4): p. 1013-7.
100. Yanagida-Asanuma, E., et al., *Synaptopodin protects against proteinuria by disrupting Cdc42:IRSp53:Mena signaling complexes in kidney podocytes*. *Am J Pathol*, 2007. **171**(2): p. 415-27.
101. Frost, A., P. De Camilli, and V.M. Unger, *F-BAR proteins join the BAR family fold*. *Structure*, 2007. **15**(7): p. 751-3.
102. Suetsugu, S., et al., *Optimization of WAVE2 complex-induced actin polymerization by membrane-bound IRSp53, PIP(3), and Rac*. *J Cell Biol*, 2006. **173**(4): p. 571-85.
103. dos Remedios, C.G., et al., *Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments*. *Physiol Rev*, 2003. **83**(2): p. 433-73.
104. Ahuja, R., et al., *Cordon-bleu is an actin nucleation factor and controls neuronal morphology*. *Cell*, 2007. **131**(2): p. 337-50.
105. Prasain, N. and T. Stevens, *The actin cytoskeleton in endothelial cell phenotypes*. *Microvasc Res*, 2009. **77**(1): p. 53-63.
106. Paavilainen, V.O., et al., *Structural basis and evolutionary origin of actin filament capping by twinfilin*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(9): p. 3113-8.
107. 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.
108. Herman, I.M., *Actin isoforms*. *Curr Opin Cell Biol*, 1993. **5**(1): p. 48-55.
109. Sheterline, P., J. Clayton, and J. Sparrow, *Actin*. *Protein Profile*, 1995. **2**(1): p. 1-103.
110. Otterbein, L.R., P. Graceffa, and R. Dominguez, *The crystal structure of uncomplexed actin in the ADP state*. *Science*, 2001. **293**(5530): p. 708-11.
111. Redwood, C., et al., *Investigation of a truncated cardiac troponin T that causes familial hypertrophic cardiomyopathy: Ca(2+) regulatory properties of reconstituted thin filaments depend on the ratio of mutant to wild-type protein*. *Circ Res*, 2000. **86**(11): p. 1146-52.
112. Holmes, K.C., et al., *Atomic model of the actin filament*. *Nature*, 1990. **347**(6288): p. 44-9.

113. Miki, M., S.I. O'Donoghue, and C.G. Dos Remedios, *Structure of actin observed by fluorescence resonance energy transfer spectroscopy. J Muscle Res Cell Motil*, 1992. **13**(2): p. 132-45.
114. Khan, N.A. and R. Siddiqui, *Acanthamoeba affects the integrity of human brain microvascular endothelial cells and degrades the tight junction proteins. Int J Parasitol*, 2009. **39**(14): p. 1611-6.
115. Carlier, M.F., et al., *The hydrolysis of ATP that accompanies actin polymerization is essentially irreversible. FEBS Lett*, 1988. **235**(1-2): p. 211-4.
116. Neidl, C. and J. Engel, *Exchange of ADP, ATP and 1: N6-ethenoadenosine 5'-triphosphate at G-actin. Equilibrium and kinetics. Eur J Biochem*, 1979. **101**(1): p. 163-9.
117. Cooper, ed. *Structure and Organization of Actin Filaments. 2nd ed. The Cell: A Molecular Approach, ed. S. (MA). 2000, Sinauer Associates.*
118. 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.
119. Hope, M.J., et al., *Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure: characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. Biochim Biophys Acta*, 1985. **812**(1): p. 55-65.
120. Mayer, L.D., M.J. Hope, and P.R. Cullis, *Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure. Biochim Biophys Acta*, 1986. **858**(1): p. 161-8.
121. Olson, F., et al., *Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes. Biochim Biophys Acta*, 1979. **557**(1): p. 9-23.
122. Machesky, L.M., P.J. Goldschmidt-Clermont, and T.D. Pollard, *The affinities of human platelet and Acanthamoeba profilin isoforms for polyphosphoinositides account for their relative abilities to inhibit phospholipase C. Cell Regul*, 1990. **1**(12): p. 937-50.
123. Visegrady, B., et al., *A simple model for the cooperative stabilisation of actin filaments by falloidin and jasplakinolide. FEBS Lett*, 2005. **579**(1): p. 6-10.
124. Visegrady, B., et al., *The effect of falloidin and jasplakinolide on the flexibility and thermal stability of actin filaments. FEBS Lett*, 2004. **565**(1-3): p. 163-6.
125. Pollard, T.D., *A guide to simple and informative binding assays. Mol Biol Cell*, 2010. **21**(23): p. 4061-7.

126. Lakowicz, J.R., *Quenching of fluorescence. In Principles of Fluorescence Spectroscopy.*, ed. J.R. Lakowicz. 1983: Plenum Press, New York. 257–301.
127. Vinson, V.K., et al., *Interactions of Acanthamoeba profilin with actin and nucleotides bound to actin. Biochemistry*, 1998. **37**(31): p. 10871-80.
128. Albani, J.R., *Fluorescence origin of 6,P-toluidinyl-naphthalene-2-sulfonate (TNS) bound to proteins. J Fluoresc*, 2009. **19**(3): p. 399-408.
129. Langner, M., et al., *Electrostatics of phosphoinositide bilayer membranes. Theoretical and experimental results. Biophys J*, 1990. **57**(2): p. 335-49.
130. Schindelin, J., et al., *Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. Nat Methods*, 2012. **9**(7): p. 676-82.

## IX. Közlemények

### Az értekezés alapjául szolgáló közlemény:

**Kinga Futó**, Emőke Bódis, Laura M. Machesky, Miklós Nyitrai, Balázs Visegrády: Membrane binding properties of IRSp53-missing in metastasis domain (I-BAR) protein. *Biochimica et Biophysica Acta Molecular Biology of Lipids*, 2013. **1831**(11):1651-5.

IF: 4,134

### Egyéb közlemények:

Xinzi Yu, Tobias Zech, Laura McDonald, Esther Garcia Gonzalez, Ang Li, Iain Macpherson, Juliana Schwarz, Heather Spence, **Kinga Futó**, Paul Timpson, Colin Nixon, Yafeng Ma, Ines M. Anton, Balázs Visegrády, Robert H. Insall, Karin Oien, Karen Blyth, Jim C. Norman, and Laura M. Machesky: N-WASP coordinates the delivery and F-actin mediated capture of MT1-MMP at invasive pseudopods to drive matrix remodeling and cancer cell invasion. *Journal of Cell Biology*, 2012. **199**(3):527-44.

IF: 10,26

Összesített IF: 14, 394

### Az értekezés alapjául szolgáló konferencia előadások:

**Futó Kinga**, Visegrády Balázs: Az I-BAR domén szerepe a filopodium formálásban. 43. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2013

**Futó Kinga**: Az aktin szerepe az IRSp53 által indukált filopodium formálásban. A Magyar Anatómus Társaság, a Magyar Biofizikai Társaság, a Magyar Élettani Társaság, és a Magyar Mikrocirkulációs és Vaszkuláris Biológiai Társaság Vándorgyűlése, Debrecen, 2012

Balázs Visegrády, **Kinga Futó**, Laura M. Machesky: The role of the I-BAR domain in the filopodia formation. 8th European Biophysics Congress Satellite Conference, Pécs, 2011

Kardos Roland, Tóth Mónika, **Futó Kinga**, Elisa Nevalainen, Pekka Lappalainen, Nyitrai Miklós és Hild Gábor: Aktinkötő fehérjék hatása az aktin monomer dinamikai tulajdonságára. Magyar Biofizikai Társaság XXIII. Kongresszusa Pécs, 2009