

Ph.D. értekezés

**A Sarcomere length short fehérje  
Wiskott-Aldrich szindróma homológ  
régió 2 doménjeinek aktivitásai az aktin  
dinamika szabályozásában**

Tóth Mónika Ágnes

2019

Témavezető: Dr. Bugyi Beáta

Interdiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola D93

Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Sümegi Balázs<sup>†</sup>

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

Programvezető: Prof. Dr. Nyitrai Miklós



**PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM**  
**ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR**

# TARTALOMJEGYZÉK

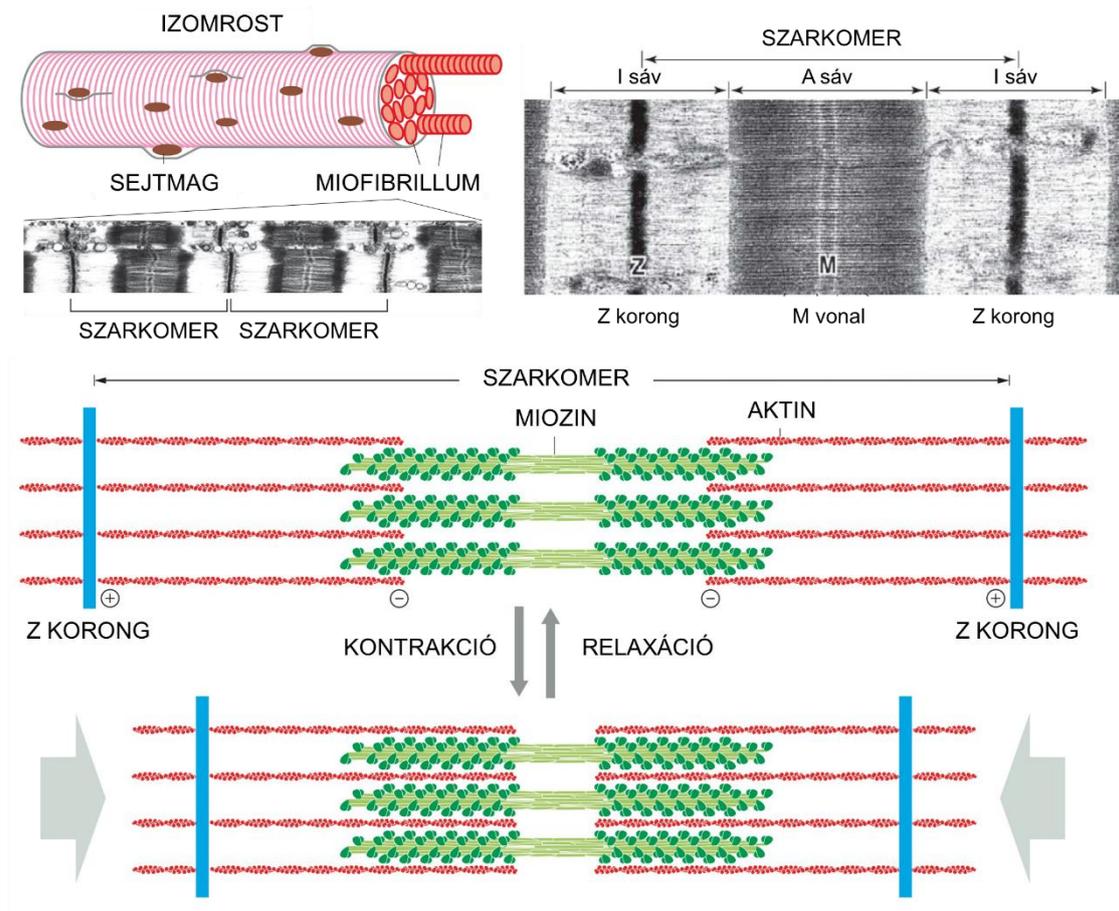
TARTALOMJEGYZÉK	2
1. BEVEZETÉS	4
1.1. A harántcsíkolt izom	4
1.1.1. A szarkomer szerkezete és az összehúzódás klasszikus modellje	5
1.2. Az aktin	6
1.3. A szarkomerikus vékony filamentumok összeszerelődésének modellje	9
1.4. Az aktin filamentumok kialakulását és dinamikáját szabályozó fehérjék a harántcsíkolt izom fejlődése során	11
1.4.1. WH2 domén fehérjék	13
1.4.1.1. Leiomodin	17
1.4.1.2. Sarcomere length short	19
2. CÉLKITŰZÉSEK	22
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	23
3.1. Fehérjék előállítása és módosítása	23
3.1.1. SALS-WH2 és SALS-Pro-WH2 fehérjeszakaszok	23
3.1.2. Aktin	24
3.1.3. Tropomiozin	24
3.1.4. Egyéb aktinkötő fehérjék: gelsolin, profilin, miozin II	25
3.2. Általános kísérleti körülmények	26
3.3. Fluoreszcencia spektroszkópiai vizsgálatok	26
3.3.1. Steady-state fluoreszcencia emisszió és anizotrópia	26
3.3.2. Fluoreszcencia rezonancia energia transzfer (FRET)	28
3.3.3. Pirén jelölt aktin alapú fluoreszcencia spektroszkópiai módszerek	28
3.3.3.1. Aktin filamentumok összeszerelődésének kinetikai vizsgálata	29
3.3.3.2. Aktin filamentumok szétszerelődésének kinetikai vizsgálata	29
3.3.3.3. Kritikus koncentráció meghatározása	29
3.3.3.4. Az aktin monomer : filamentum arány steady-state vizsgálata	30
3.4. Szedimentációs vizsgálatok	30
3.5. Teljes belső visszaverődésen alapuló fluoreszcencia mikroszkópia (TIRFM)	31
4. EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK	32
4.1. A SALS WH2 doménjeinek hatása az aktin dinamikára	32
4.1.1. A SALS WH2 doménjei kölcsönhatnak az aktin monomerekkel	32
4.1.2. A SALS WH2 doménjei gátolják az aktin monomerek filamentumba épülését	39
4.1.3. A SALS WH2 doménjei elősegítik az aktin filamentumok szétszerelődését	45

4.1.4. A SALS-WH2 kötődik az aktin filamentumok oldalához	47
4.2. Aktinkötő fehérjék hatásai a SALS WH2 doménjeinek aktin aktivitásaira	48
4.2.1. A profilin nincs hatással a SALS-WH2 aktin aktivitásaira	48
4.2.2. A tropomiozin befolyásolja a SALS-WH2 <i>severing</i> aktivitását	51
5. ÖSSZEFOGLALÁS	54
5.1. TOVÁBBI CÉLOK	57
6. A Ph.D. MUNKÁM SORÁN ELÉRT ÚJ EREDMÉNYEK	59
7. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	60
8. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS	62
9. IRODALOMJEGYZÉK	63
10. PUBLIKÁCIÓS LISTA	67

# 1. BEVEZETÉS

## 1.1. A harántcsíkolt izom

A harántcsíkolt izom izomsejtek kötegeiből épül fel. A vázizom esetében ezeket izomrostoknak hívjuk, mivel fejlődéstanilag több sejt összeolvadásából keletkeztek. Az izomrostok jellemzően 1 – 40 mm hosszú és 10 – 15  $\mu\text{m}$  széles, hengeres alakúak, szarkolemmával határoltak és több száz periférikus sejtmagot tartalmaznak (1. ábra). Az izomrostokat miofibrillumok alkotják, amelyeket repetitív módon rendeződő szarkomerek építenek fel. A szarkomerek a harántcsíkolt izom alapvető kontraktilis egységei. Az őket felépítő mechanokémiai gépezetet az aktin alapú (vékony) és miozin alapú (vastag) filamentumok alkotják, amely számos további szabályozó komponens térben és időben összehangolt működése révén kémiai energiát mechanikai munkává alakítva biztosítja az izomkontrakciót. A szarkomer szerkezeti sajátosságai jól ismertek, azonban a mai napig keveset tudunk ennek a rendkívül jól szervezett fehérjerendszernek az összeszerelődéséről [1-4].



1. ábra. A harántcsíkolt izom egységeinek szerveződési szintjei.

(+): szögcs vég (*barbed end*), (-): hegyes vég (*pointed end*). Az ábra forrása: [2, 5].

### 1.1.1. A szarkomer szerkezete és az összehúzódás klasszikus modelljei

A miofibrillumokat elektron-, vagy polarizációs mikroszkópiával vizsgálva azok az izomrostok hossztengeleire merőlegesen csíkozottságot mutatnak (harántcsíkolat), világosabb I (izotróp) és sötétebb A (anizotróp) szakaszok szabályos váltakozása révén (1. ábra). Az I sáv közepén sötét vonal formájában jelenik meg a Z korong. A két Z korong közötti szakasz alkotja a szarkomert. Az A sáv közepén a világos H zóna figyelhető meg, centrumában a sötétebb M vonallal. Ez a jellegzetes sávós szerkezet a szarkomert felépítő három fő fehérjerendszer rendkívül szabályos elhelyezkedésének köszönhető.

A miozin alapú vastag filamentumok építőköve a miozin II molekula. A miozin II két globuláris fejjel, egy rövid nyaki és egy hosszú farki résszel rendelkező nehézláncú (*myosin heavy chain*, MHC) dimer. A konzervált feji régió tartalmazza a motor domént, ami az adenosin nukleotid és az F-aktin kötéséért felelős. Az esszenciális és regulatórikus könnyű lánc (*myosin light chain*, MLC) kapcsolódva a feji és nyaki régiókhoz az MHC motor funkciójának szabályozásában vesz részt. A miozin II molekulák a vastag filamentumokban bipolárisan a szarkomer középső régiójában (A sáv), az M vonalhoz horgonyozva helyezkednek el.

Az aktin alapú vékony filamentumok szöges végei (*barbed end*, (+) vég) a Z koronghoz asszociáltak az  $\alpha$ -aktinin keresztkötő fehérje révén. Az aktin filamentumok (F-aktin) párhuzamosan rendeződve az I sávon keresztül nyúlnak hegyes végeikkel (*pointed end*, (-) vég) a vastag filamentumok irányába. A miozin II motor doménje és az aktin filamentumok közötti, a miozin adenosin nukleotid állapotától függő ciklikus kölcsönhatás a kereszthíd ciklus, és az erő kifejtés alapja. Az erő kifejtés következtében – a megfelelő erőátviteli elemek jelenlétében – a két filamentumrendszer egymáson elcsúszik, ami a szarkomer rövidülését eredményezi (csúszófilamentum modell). Az aktomiozin rendszer (feltételezve az ATP jelenlétét) konstitutívan aktív; a kontrakció térbeli és időbeli szabályozását így további molekuláris elemek biztosítják. A vékony filamentumok az aktin filamentumok és a hozzájuk kapcsolódó tropomiozin (Tpm) : troponin (Tn) komplex funkcionális egységei. A helikális szerkezetű tropomiozin dimerek a filamentum alegységei közötti árokba illeszkedve kapcsolódnak az F-aktin felszínéhez. A tropomiozin elhelyezkedéséből adódóan gátolni tudja az aktin-miozin kölcsönhatást. A három alegységből álló troponin komplex (TnT, TnC és TnI) tropomiozin-, és  $Ca^{2+}$ -kötő fehérje. A tropomiozin-troponin rendszer az aktomiozin kölcsönhatás, és ezáltal az izomkontrakció  $Ca^{2+}$ -függő szabályozását biztosítja (térbeli kizárásos modell).

A harmadik szarkomerikus filamentumrendszert a Z korong és M vonal között elhelyezkedő, a szarkomer mintegy felét lefedő óriásmolekula; a titin alkotja. A titin molekuláris rugóként a miofilamentumok passzív mechanikai tulajdonságaiban tölt be meghatározó szerepet. Ugyanakkor számos partnerfehérjéjét azonosították, ami a titin új és gyakran meglepő szerepére világított rá.

## 1.2. Az aktin

A vékony filamentumok építőköve az aktin fehérje. Az aktin az egyik legnagyobb mértékben konzervált citoskeletális fehérje. Az eukarióta sejtekben 6 izoformája létezik, melyek közül 2 nem-izom specifikus ( $\beta$ ,  $\gamma$  citoplazmatikus), 4 pedig az izomsejtekben fejeződik ki ( $\alpha$ -vázizom,  $\alpha$ -szívizom,  $\alpha$ -simaizom,  $\gamma$ -simaizom) [6, 7]. Az aktin két formában fordulhat elő: monomer (globuláris, G-aktin) és polimer (filamentális, F-aktin). A monomer 375 aminosavból áll és 42.3 kDa a relatív molekulatömege. Két fő doménre (a filamentumbeli elhelyezkedésük alapján belső és külső domének), illetve négy kisebb szubdoménre osztható: S1-4. Az S2 és S4 (hegyes (-) vég) közötti árokban található az elsődleges kation ( $\text{Ca}^{2+}$  vagy  $\text{Mg}^{2+}$ ) és adenzin nukleotid kötő hely. Míg az S1 és S3 (szöges (+) vég) közötti hasadék számos, az aktin sejtvázas szabályozásában résztvevő aktinkötő fehérje (*actin binding protein*, ABP) kötőhelyéül szolgálhat [8]. Az aktin monomerek polimerizációja révén alakulnak ki a filamentumok, amit két aktinlánc hélice alkot. Az aktin alegységek elhelyezkedése a filamentumban rendezett, ami az F-aktin szerkezeti polaritásának alapja (szöges (+), és hegyes (-) vég) [9]. Az ATP nagyobb affinitással kötődik a monomerhez, mint az ADP [10]. A G-aktin alacsony ATPáz aktivitással rendelkezik ( $0.6 \text{ h}^{-1}$ ); az ATP hidrolízist és a foszfát csoport disszociációját a monomerek filamentumba épülését kísérő szerkezeti változások katalizálják. Az aktin *in vitro* szerveződése különböző mechanizmusokon keresztül valósulhat meg (2. ábra).

### 1. De novo nukleáció és elongáció

Az aktin filamentumok kialakulásának folyamata a polimerizáció, három fő szakaszból áll (2. A-C ábra). A polimerizáció megfelelő biokémiai környezetben (például ionerősség növelése) *in vitro* spontán módon is végbemegy. A nukleáció szakaszában két, majd három aktin monomer asszociációja révén alakulnak ki a nukleuszok. A nukleáció a polimerizáció sebességmeghatározó lépése; termodinamikailag kedvezőtlen (relatív nagy pozitív szabadentalpia változás értékű) kinetikai gátat jelent [11]. A nukleuszokhoz további monomerek diffúziókontrollált beépülése a filamentumok hossznövekedését, elongációját eredményezi. Az asszociációs és disszociációs sebességi állandók eltérőek a filamentum két végén, ami annak kinetikai polaritását eredményezi. Az elongációs fázist követően a monomerek asszociációja és disszociációja a filamentum mindkét végén megfigyelhető, olyan módon, hogy a filamentum hossza időben nem változik (*steady-state*). Az egyensúlyt a szabad aktin monomerek állandó populációja (kritikus koncentráció,  $c_c$ ) jellemzi. A kritikus koncentráció a monomerek disszociációs ( $k_-$ ) és asszociációs ( $k_+$ ) sebességi állandóiból származtatható. Tekintve az aktin polimerizációhoz csatolt ATPáz aktivitását, ami az asszociáló és disszociáló alegységek eltérő adenzin nukleotid tartalmát eredményezheti, ez egy nem valós disszociációs egyensúlyi állandó. A kritikus koncentráció különbözik a

filamentumok szöges és hegyes végére nézve; értékei  $Mg^{2+}$ -ATP-G-aktin esetén rendre  $c_c(+)$  ~ 70 – 100 nM-nak, illetve  $c_c(-)$  ~ 600 nM-nak adódnak [12-14]. Az aktin spontán dinamikájában a szöges vég a meghatározó, így a steady-state szabad aktin koncentráció jellemzően  $c_c \sim 100 - 150$  nM.

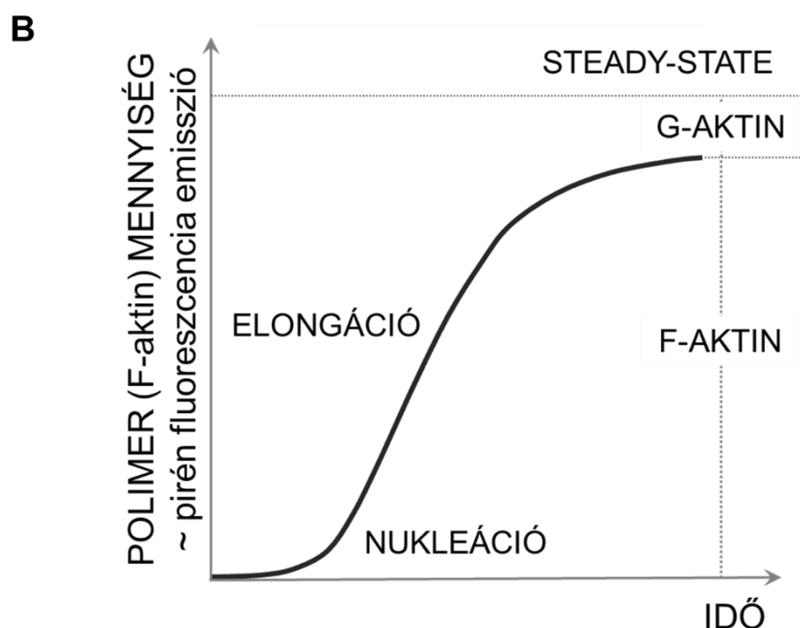
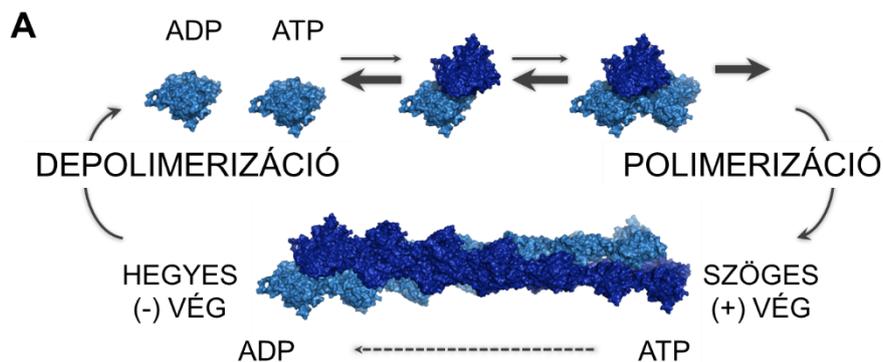
A polimerizáció során létrejött aktin filamentumok további spontán szerveződési szintjei ismertek.

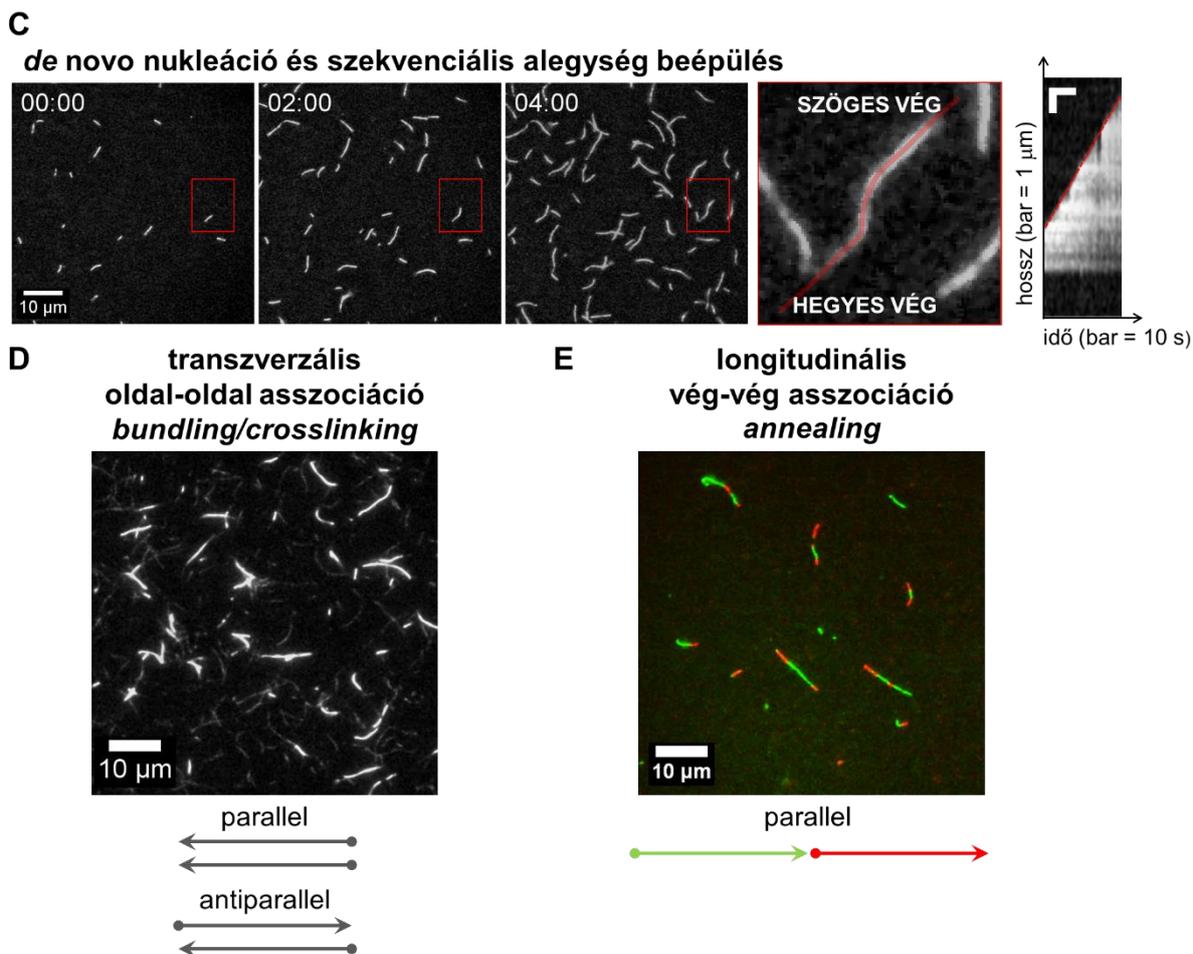
## 2. Transzverzális oldal-oldal asszociáció (bundling/crosslinking) (2. D ábra)

A polimerek egyik spontán asszociációs módja a filamentumok oldalirányú összekapcsolódása keresztkötés révén (*bundling/crosslinking*), ami az aktin hálózatok transzverzális megvastagodásához vezet. A hálózatokat alkotó filamentumok parallel és antiparallel irányítottságúak is lehetnek.

## 3. Longitudinális vég-vég asszociáció (annealing) (2. E ábra)

A polimerek egymás végeihez parallel irányítottsággal is kapcsolódhatnak (*annealing*), ami a filamentumok hossznövekedését eredményezi.





**2. ábra. Az aktin filamentumok spontán szerveződésének *in vitro* mechanizmusai.**

(A) A spontán aktin dinamika (ionerősség növelése által indukált) sematikus ábrázolása. (B) Az aktin filamentumok összeszerelődésének (polimerizáció) fázisai oldatban történő (*bulk*) pirén fluoreszcencia emisszió/viszkozimetria mérésekben. (C-E) Az aktin filamentumok összeszerelődésének megjelenítése egyedi aktin filamentumok szintjén, teljes belső visszaverődésen alapuló fluoreszcencia mikroszkópai technikával (TIRFM). (C) A filamentumok *de novo* nukleációja és elongációja. Egyedi aktin filamentumok elongációjának kimográf elemzése (utolsó ábra). Az aktin filamentumok kinetikai polaritása miatt a kísérleti körülmények között jellemzően a filamentumok szögese végén (*barbed end*) domináns a monomerek asszociációja. (D) Az aktin filamentumok spontán transzverzális oldal-oldal asszociációja (*bundling/crosslinking*). A vastagabb, nagyobb intenzitású szegmensek az oldalirányban összekapcsolódott filamentumoknak, míg a vékonyabb, alacsonyabb intenzitású szakaszok az egyedi filamentumoknak felelnek meg. (E) Az aktin filamentumok spontán longitudinális vég-vég asszociációja (*annealing*). Az eltérő spektrális tulajdonságú fluorofórokkal (Alexa488NHS és Alexa568 NHS) jelölt filamentumok vég-vég kapcsolódását a filamentumok hossznövekedése és inhomogén fluoreszcencia emissziója tükrözi. Az ábra forrása: [15].



### 1.3. A szarkomerikus vékony filamentumok összeszerelődésének modellje

A szarkomer szerkezete és működése viszonylag jól ismert, de a szarkomerogenezis folyamatáról és azon belül is a vékony filamentumok kialakulásának mechanizmusairól, valamint az egyéb szarkomerikus elemek hozzájárulásáról tudományos ismereteink a mai napig hiányosak. A szarkomer összeszerelődésének több modellje is létezik. Egy viszonylag új tanulmányban *Drosophila melanogaster* indirekt repülőizmok (*indirect flight muscle*, IFM) szarkomerikus struktúrájának érési folyamatát vizsgálták GFP-aktin időben szabályozott expressziója révén [16]. Az aktin filamentumokba való szerveződése alapján 3-fázisú modell feltételezhető, az alábbiak szerint (3. ábra):

**1. fázis** (3. ábra, C szakasz): A szarkomer fejlődésének kezdeti szakaszában (0 – 30 h, bebábozódást követően, *after puparium formation*, APF) az aktin filamentumok 'robbanásszerű' *de novo* polimerizációja figyelhető meg. Ennek eredményeképpen homogén eloszlású, közel párhuzamos orientációjú mikrofilamentum raktár alakul ki.

**2. fázis** (3. ábra, D szakasz): A kialakuló szarkomerikus egységeken belül a *de novo* polimerizációt az aktin monomerek foltszerű beépülése váltja fel (30 – 45 h APF). Az aktin beépülése mind a szöges (Z korongnál), mind pedig a hegyes végen (M vonal irányában) megfigyelhető, amely révén a filamentumok egyenletes hosszeloszlása alakul ki.

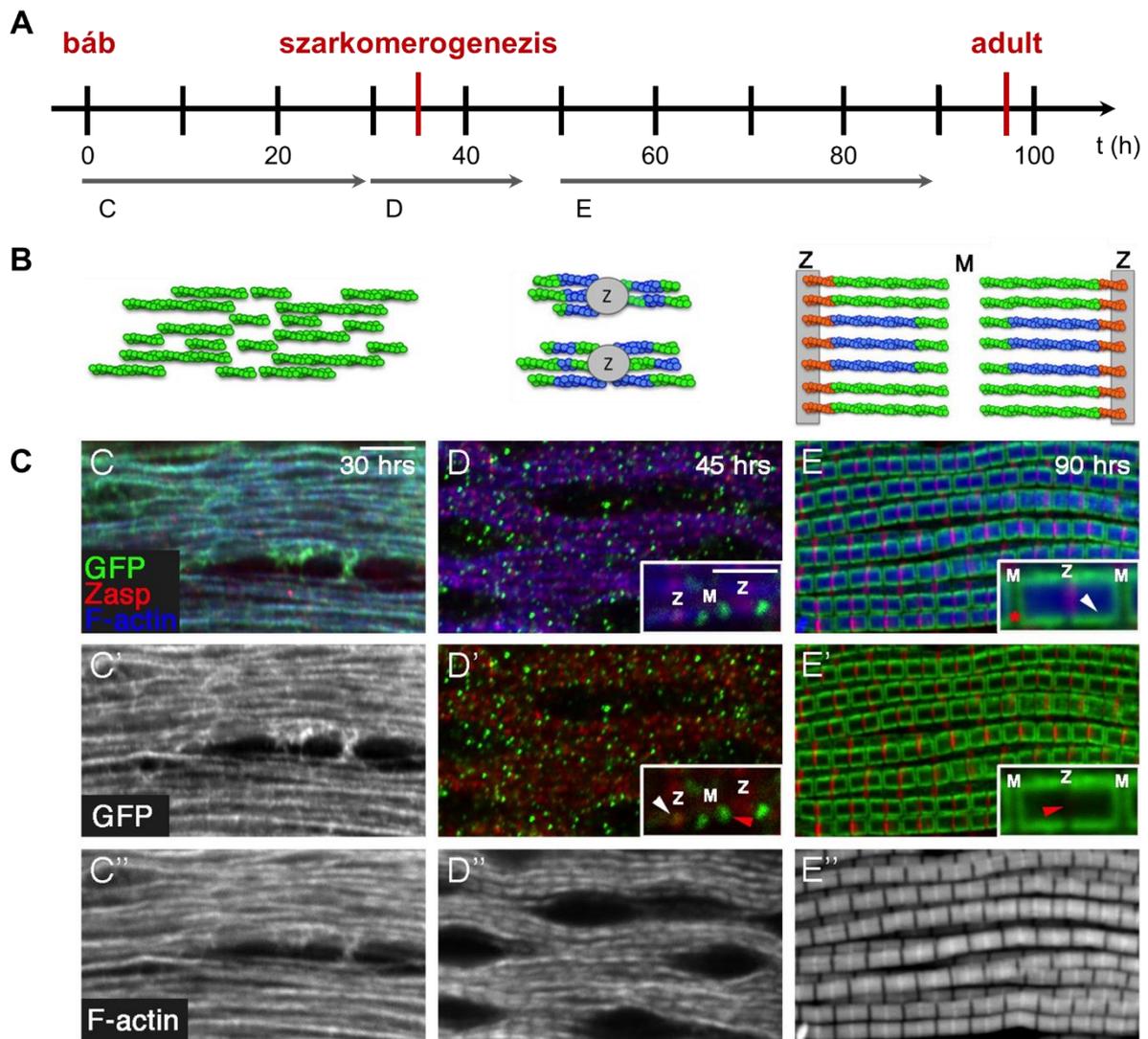
**3. fázis** (3. ábra, E szakasz): A késői szakaszokra (45 – 90 h APF) az aktin beépülésének három különböző módja jellemző:

3. 1. *A vékony filamentumok laterális hosszabbodása*: A hegyes végen történő elongáció következtében a vékony filamentumok meghosszabbodnak.

3. 2. *A szarkomerek sugár irányú vastagodása*: Az aktin beépülése a periférián jellemző, így az új aktin filamentumok keretszerűen szerelődnek össze a fejlődő szarkomerek körül, annak kerületi megvastagodását eredményezve.

3. 3. *Szöges vég dinamika (turnover)*: Az aktin kicserélődése a vékony filamentumokban, ami a szöges végre korlátozódik. Ez a folyamat nem járul hozzá a vékony filamentumok hossznövekedéséhez, inkább azok szerkezeti egységének fenntartásában lehet szerepe.

Érdekes megjegyezni, hogy a szarkomerikus vékony filamentumok összeszerelődése az *in vitro* spontán aktin filamentum szerveződési mechanizmusokat tükrözi (2. ábra). Ugyanakkor a vékony filamentumok hegyes végen történő hosszabbodása is megfigyelhető, ami ellentétes a nem-izom sejtekben, illetve tisztított fehérjerendszerekben az aktin filamentumokra általában jellemző szöges vég súlypontú növekedéssel. A fentiek alapján a fejlődési állapotnak megfelelő fázisok szerkezeti és dinamikai sajátosságai jól elkülönülnek, de a háttérükben álló molekuláris mechanizmusok részleteiben nem ismertek.



### 3. ábra. A szarkomerikus vékony filamentumok összeszerelődésének modellje.

(A) *Drosophila melanogaster* bábállapot fejlődésének időskálája; a  $t = 0$  h időpont a bebábozódásnak felel meg (*after puparium formation, APF*). (B) A harántcsíkolt izom fejlődése során az aktin monomerek beépülésének folyamatát bemutató sematikus ábra. Kezdeti erőteljes aktin polimerizáció és a keletkező vékony filamentumok párhuzamos orientációja (zöld: az újonnan beépülő aktin monomerek; 0 – 30 h). Az aktin monomerek foltszerű beépülése, mely során már a szarkomerikus alegységek körvonalazódnak (szarkomerogenezis; kék: az „öreg”, korábban beépült monomerek (30 – 45 h)). A vékony filamentumok hegyes végi elongációja, az aktin monomerek keretszerű beépülése a szarkomerek perifériáján és a vékony filamentumok szögcs vég dinamikája (narancssárga (45 – 90 h)). (C) *Drosophila* bábokból származó indirekt repülőizmok (IFM) konfokális mikroszkópiai felvételei. Az IFM fejlődése során az aktin monomerek beépülését a kialakuló szarkomerekbe GFP-aktin időben kontrollált expressziója révén követték nyomon. GFP-aktin88F: zöld, F-aktin: phalloidin festés (kék), Z korongok: antiZasp52 jelölés (piros). Az ábra forrása: [16].

#### 1.4. Az aktin filamentumok kialakulását és dinamikáját szabályozó fehérjék a harántcsíkolt izom fejlődése során

A szarkomer filamentum rendszereinek rendkívüli szervezettségét és az izomkontrakció precíz szabályozását szarkomerikus fehérjék széles tárháza koordinálja [1-3]. A vékony filamentumok kialakulásának és szerveződésének módjai összetett mintázatot mutatnak a szarkomerogenezis során, ami alapján különböző aktinkötő fehérjék bonyolult, összehangolt működése feltételezhető [3, 15, 16]. Az aktin spontán módon is képes filamentumokba, illetve azokból álló hálózatokba szerveződni *in vitro*. Ez tekinthető anarchikus, szabályozás nélküli filamentum szerveződésnek; ami élettani szempontból nem célravezető, másrészt a biológiai folyamatok időskálájához képest lassú. Így az aktin filamentumok összeszerelődése térben és időben kontrollált kell legyen a szarkomerogenezis során.

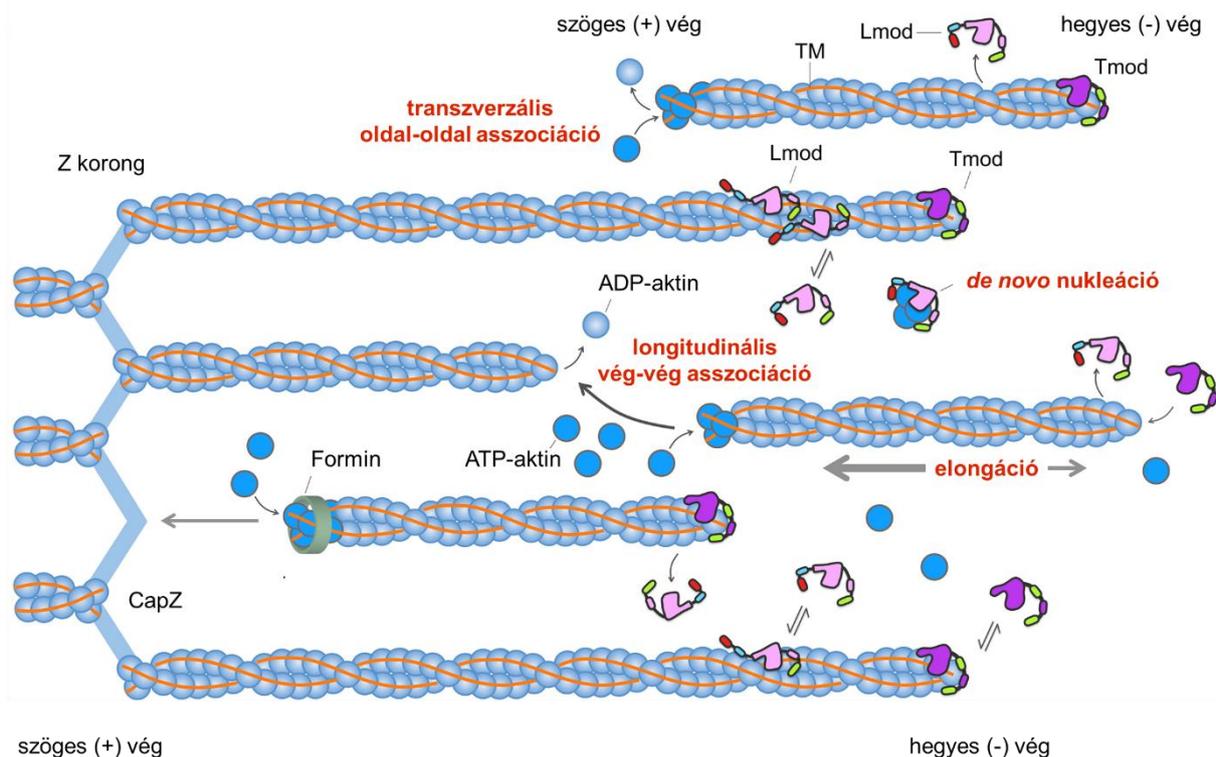
A thymosin  $\beta 4$  (T $\beta 4$ ) és a profilin monomerkötő fehérjék már az izomfejlődés korai szakaszaiban kifejeződnek gerincesek harántcsíkolt izmaiban [1, 2]. Biokémiai aktivitásaik alapján ezek a fehérjék az aktin polimerizációjának negatív szabályozói [17]. A profilin a G-aktin szöges végéhez kötődve gátolja a nukleációt, ugyanakkor a profilin : G-aktin komplex képes a filamentumokhoz asszociálni kizárólag azok szöges végén, így az összeszerelődés irányítottságát biztosítja. A profilin továbbá katalizálja az aktin által kötött adenzin nukleotid kicserélődését. A T $\beta 4$  prototipikus Wiskott-Aldrich szindróma homológ régió 2 (*Wiskott-Aldrich syndrome homology region 2*; WH2) domén fehérje a monomerek filamentumba szerveződését (nukleáció, elongáció) megakadályozza; szekvesztráló aktivitással rendelkezik. Mindezek alapján a profilinnek és T $\beta 4$ -nek a szarkomer monomer raktárának fenntartásában lehet szerepe.

A szarkomerikus aktin filamentumok dinamikus sajátságait több aktinkötő fehérjecsald koordinálja (4. ábra). A filamentumvégek dinamikáját sarkfehérjék korlátozzák [1, 2, 18]. A filamentumok szöges végét a Z korongnál a CapZ sarkázza, ami révén gátolja a filamentumok elongációját, ugyanakkor szerepe van a filamentumok szabályos regiszterbe való rendezésében is. A tropomodulin (Tmod) az aktin filamentumok hegyes végével alakít ki kölcsönhatást, gátolva azok elongációját és depolimerizációját. A Tmod aktivitását a tropomiozinnal kialakított kölcsönhatása pozitívan befolyásolja [19]. A Tmod túltermelése az izomszövetekben rövidebb aktin filamentumokat eredményez, ezzel szemben a *Tmod* gén kiütése vagy a sarkázó aktivitásának gátlása a filamentumok elongációját fokozza [19, 20].

A szarkomerikus vékony filamentumok kialakulásának kezdeti szakaszában megfigyelhető *de novo* aktin polimerizációt katalizáló faktorok identitása nem ismert. *In vitro* több aktinkötő fehérjecsaldot is azonosítottak, amik képesek elősegíteni a filamentumok képződését (*assembly promoting factors*, APFs); ezek a harántcsíkolt izomban is

expresszálódnak [1, 3, 19]. Az APF családba tartoznak a formin fehérjék (FHOD, FMNL, Dia, INF és a DAAM) és a WH2 domén tartalmú Leiomodin fehérje (Lmod). Biokémiai sajátosságuk alapján adódott az az attraktív elképzelés, mely szerint a formin és a Leiomodin fehérjék a szarkomerikus aktin filamentumok *de novo* nukleátorai, azonban e funkciójuk biológiai környezetben még nem bizonyított [3, 19]. Mutáns állatokban ugyan az aktin filamentumok mennyiségének csökkenése figyelhető meg, de a vékony filamentumok nem tűnnek el teljesen, ami arra utal, hogy a forminoknak és a Leiomodinnak a szarkomerikus aktin filamentumok szerkezetének kialakításában lehet szerepe, nem pedig a miofibrillogenezis kezdeti fázisaiban [19, 21].

A forminok hatásmechanizmusa sokrétű az aktin dinamikára *in vitro*, ami a konzervált formin homológ (*formin homology*, FH1, FH2) doménjeik mellett a változatos C-terminális régióknak köszönhető [12, 14, 22]. A forminok közös sajátossága, hogy nukleációs intermedierek stabilizálása révén katalizálják a *de novo* nukleációt, valamint processzív módon képesek a profilin : aktin filamentumba épülését a szöges végen elősegíteni; bizonyos forminok esetén a diffúziókontrollált asszociációs sebességet meghaladva. A filamentumok szöges végével kialakított kölcsönhatásaik révén azok dinamikáját a sapkafehérjékkel antagonisztikus módon szabályozzák [23]. A filamentum oldalkötő tulajdonságuk révén pedig azok transzverzális oldal-oldal asszociációját (keresztkötés) is elősegíthetik [24, 25]. A forminok expressziós mintázata és előfordulása az izomsejtekben formin típus-, illetve egyedfejlődési stádium függő [3]. Előfordulnak a Z korongnál a szöges végek környezetében, de megtalálhatóak a filamentumok hegyes végénél, továbbá az M vonalban is. Modell szervezetekben (ecetmuslica, egér) végzett vizsgálatok alapján a forminok expressziójának leszabályozása karakterisztikus és összetett morfológiai és működésbeli rendellenességeket eredményez, mind embrionális korban, mind pedig adult egyedekben: a vékony filamentumok és a Z korongok rendezetlensége, a harántcsíkolt mintázat elvesztése, és ezzel együtt az izomfunkció sérülése. Ez arra utal, hogy komplex feladatok ellátásán keresztül járulhatnak hozzá a szarkomer megfelelő funkcionalitásához. Az ecetmuslica Fhos (FHOD), a CapZ-vel antagonisztikus módon az aktin monomerek foltszerű beépülését mediálhatja a szöges végeken [16]. A DAAM az aktin filamentumok kialakulását segítheti elő az M vonal környezetében, valamint a tropomodulinnal antagonisztikus módon járulhat hozzá ezeknek a vékony filamentumok hegyes végéhez történő asszociációjához (longitudinális vég-vég asszociáció, *annealing*) [26]. Ugyanakkor a forminok keresztkötő aktivitásaik révén a filamentumok transzverzális oldal-oldal asszociációját is elősegíthetik, így a szarkomerek sugárirányú megvastagodásában is szerepük lehet. A *DAAM1* gént tartalmazó kromoszómarégió mikrodélációját azonosították örökletes szívelégtelenségben szenvedő páciensekben, ami alátámasztja a forminok szerepének fontosságát az izom fejlődésében és működésben [27].



**4. ábra. A szarkomerikus vékony filamentumok összeszerelődésének háttérben álló molekuláris kölcsönhatások/biokémiai aktivitások modellje.**

Lmod: Leiomodin, Tmod: tropomodulin, TM: tropomiozin. Az ábra forrása: [19].

#### 1.4.1. WH2 domén fehérjék

A WH2 (*Wiskott-Aldrich syndrome homology region 2*) domént először a WASP/Scar (*suppressor of cAMP receptor protein*)/WAVE (*WASP-family verprolin homologous protein*) fehérjékben írták le. Mára már számos WH2 domént tartalmazó fehérjecsald ismert, amelyek széleskörű taxonómiai és szöveti eloszlást mutatnak [28]. A WH2 domén fehérjék biológiai funkcióit tekintve az aktin hálózatok sokrétű szabályozásához járulnak hozzá [17, 29-34].

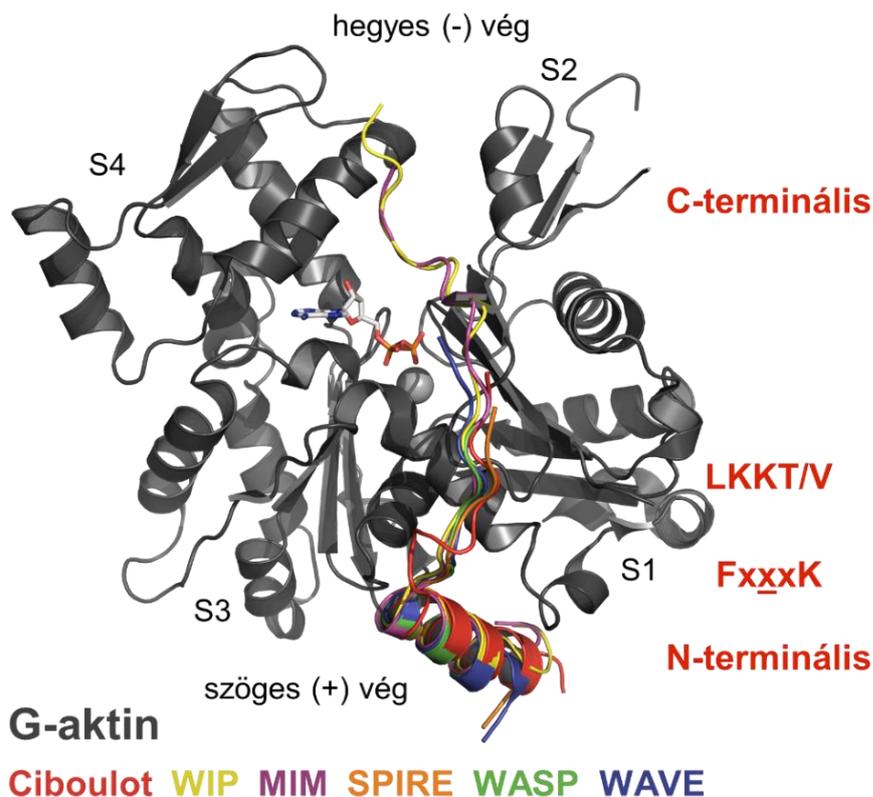
A WH2 domén rövid, néhány tíz (20 – 50) aminosavból álló aktinkötő régió (5. ábra). A domén sajátja egy központi konzervált LKKT/V aminosavakból álló régió. Ezt a domén N-terminálisán egy amfipatikus jellegű  $\alpha$ -hélix, a C-terminális irányban pedig egy FxxK aminosav mintájú szakasz veszi közre (5, 6. ábra). A domén C-terminálisa változatos mind hossz, mind pedig összetétel tekintetében (5, 6. ábra). A WH2 domének sajátja, hogy izoláltan, kötőpartner hiányában nem rendelkeznek másodlagos szerkezeti elemekkel, térbeli szerkezetük rendezetlen (*intrinsically disordered region, IDR*). A domén részleges *foldinga* – jellemzően az N-terminális régió – a partnerfehérjéjével; az aktinnal kialakított kölcsönhatása révén valósulhat meg [35, 36].

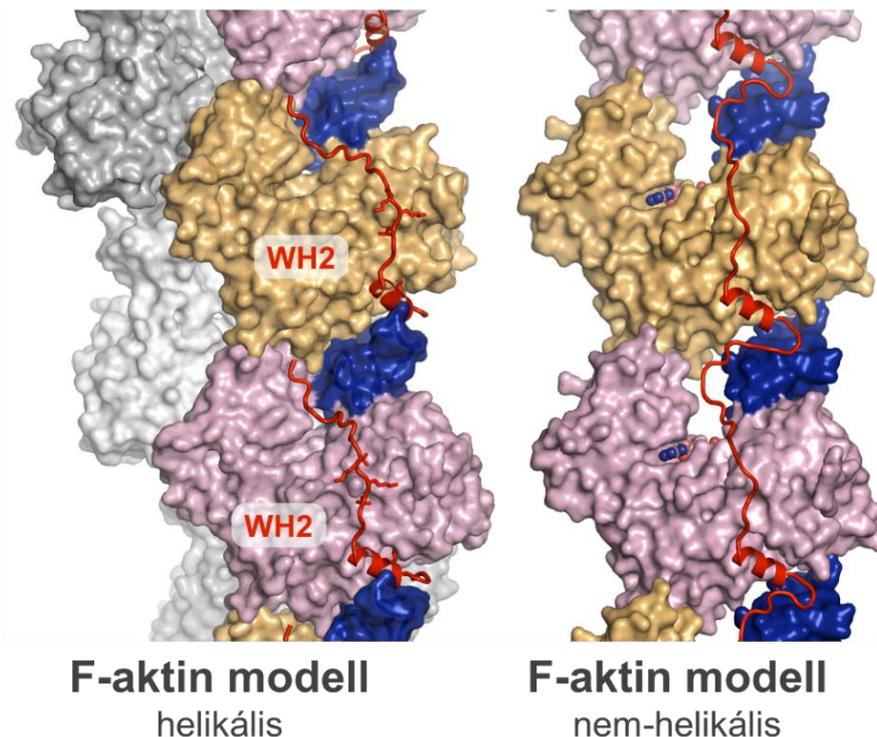
		N-terminális amfipatikus $\alpha$ hélix	FxxxK	C-terminális	
			LKKT/V		
hs	Thymosin $\beta$ 4	(1)	SDKPDMAEIEK--FDKSKLKKKTETQEK	NPLPSKETIEQEKQAGES	(43)
dm	CiboulotW1	(14)	PKVAENLKSQLEG--FNQDKLKNASTQEKI	IILPTAEDVAAEK-----	(51)
hs	WASP	(430)	GRGALLDQIRQG---I-QLNKTPGAPES	SALQP-----	(458)
hs	WIP	(29)	LNKTEQAGRNALLSDISKG---K-KLKKTVTND	RSAPILDKPKGAGAG	(69)
hs	Lmod1	(574)	SRDQLLAAIRSSNL-K-QLKKVEE-----	VP--KLLQ-----	(600)
hs	Lmod2	(521)	AHENLMEAIRGSSI-K-QLKRVE-----	VP--EALR-----	(547)
hs	Lmod3	(535)	PRDQLLNDIRHSSV-A-YLKPVQ-----	LP--KELA-----	(560)
dm	SALSW1	(399)	DWSEMMKEVESG---K-KLRHVACNDRS-Q	PILTCK-----	(429)
dm	SALSW2	(447)	SHNKLLKQIQGG---I-KLKPTKTNDRS-K	PVLDGL-----	(477)

hidrofób  
dublett/triplett

### 5. ábra. WH2 domének összehasonlító szekvencia elemzése.

A WH2 domén jellemző szakaszai: N-terminális hidrofób aminosav dublett/triplett (dőlt betű), konszenzus LKKT/V motívum (szürke kiemelés), aktinnal só hidakat képező aminosavak (kék), FxxxK régió központi aminosavai (aláhúzás). hs: *Homo sapiens*, dm: *Drosophila melanogaster*, Lmod: Leiomodin, WASP: *Wiskott-Aldrich syndrome protein*, WIP: *WASP-interacting protein*, SALS: *Sarcomere length short*. Szekvencia azonosítók: Thymosin $\beta$ 4 (NP\_066932.1), Ciboulot (NP\_525065.1), WASP (NP\_000368.1), WIP (O43312), Lmod1 (NP\_036266), Lmod2 (NP\_997046.1), Lmod3 (NP\_938012), SALS (NP\_001163588.1).





**6. ábra. WH2 domének G-aktinnal alkotott komplexeinek szerkezete és F-aktinnal alkotott komplexének szerkezeti modellje.**

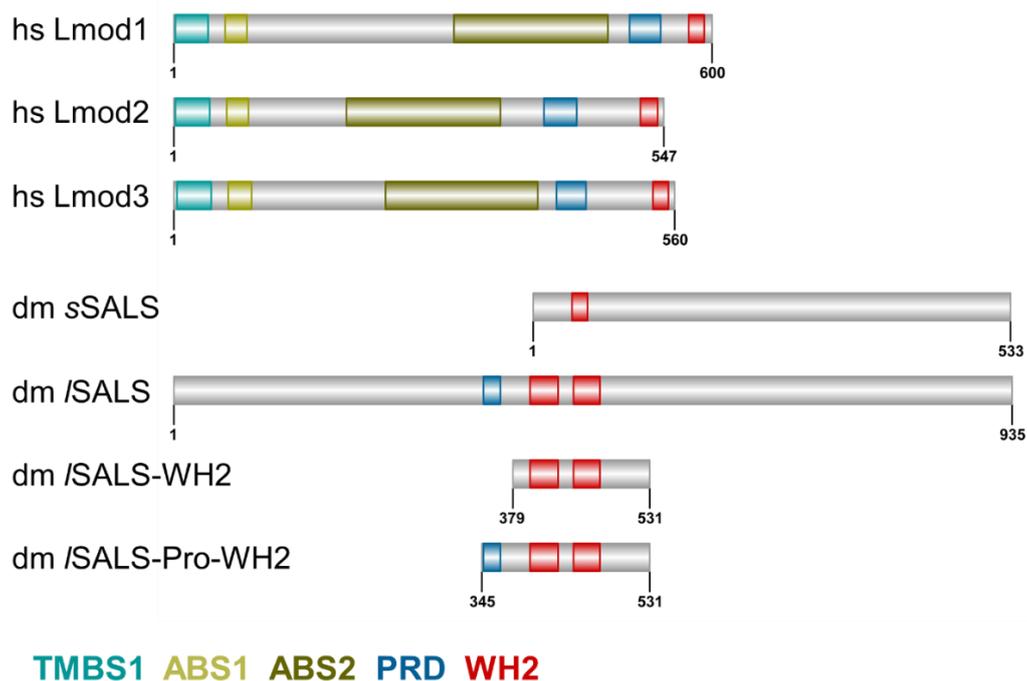
Ciboulot (PDB: 1SQK [35]), WIP: *WASP-interacting protein* (PDB: 2A41 [33]), MIM: *Missing in metastasis* (PDB: 2D1K [37]), Spire (PDB: 3MN7 [38]), WASP: *Wiskott-Aldrich syndrome protein* (PDB: 2A3Z [33]), WAVE: *WASP-family verprolin-homologous protein* (PDB: 2A40 [33]). Az ábrát a Pymol szoftverrel készítettük. Az ábra forrása: [17, 28].

Az aktin asszociált fehérjékben a WH2 domének előfordulhatnak izoláltan, tandem módon rendeződve (2 – 4 domén), vagy más típusú aktinkötő modulokkal övezve [31, 39]. A doménkörnyezettől függően a WH2 domén fehérjék mind az aktin monomerekkel, mind pedig a filamentumokkal kölcsönhathatnak; így a domének számától és aminosav összetételétől függő multifunkcionális sajátságokkal rendelkezhetnek. Az izolált WH2 domének 1 : 1 sztöchiometriájú, viszonylag nagy affinitású (nM –  $\mu$ M) komplexet képeznek a monomerekkel (6. ábra, felső panel). A domén amfipatikus  $\alpha$ -hélice az aktin molekula szögcs végével, az S1 és S3 által meghatározott hidrofób zsebbel alakít ki kölcsönhatást, amelyben meghatározó a WH2 domén hidrofób aminosav dublettje/triplettje (L, M, I) (5. ábra). A szögcs vég kölcsönhatás révén a WH2 : G-aktin asszociációja a filamentum hegyes végén gátolt. Az FxxxK központi aminosava (Lys), illetve az LKKT/V motívumtól C-terminális irányban található 5. aminosav (Arg) az aktin monomer Glu<sup>334</sup> és Glu<sup>93</sup> aminosavaival sóhidat képezhet, ami a komplex stabilitását fokozza. A WH2 domén C-terminális általában rendezetlen marad a komplexben is, és az aktin molekula hegyes vége felé nyúlik. A kölcsönhatás a WH2 : G-aktin komplex szögcs végén való asszociációját gátolhatja. A WH2 domén N-, és C-terminálisának aktinkötése a domén szekvesztráló aktivitásának szerkezeti alapjait jelenti. A tandem WH2

domén fehérjék képesek a filamentumok oldalához is kötődni (6. ábra, alsó panel). A fentiekben ismertetett szerkezeti megfontolások alapján a kölcsönhatás az F-aktin szerkezetét stabilizáló longitudinális kapcsolatok integritását sztérikusan megbonthatja, ami a filamentumok destabilizációjához és fragmentációjához (*severing* aktivitás) vezethet. Ugyanakkor a WH2 domén fehérjéket más típusú aktinkötő modulok jelenléte szinergikus kölcsönhatások révén *de novo* nukleációs aktivitással ruházhatja fel [39].

Meg kell jegyeznünk, hogy a WH2 domén fehérjék multifunkcionális természetére utaló megfigyelések elsősorban *in vitro*, rekombináns úton előállított fehérjéken végzett vizsgálatokon alapulnak. Az azonban nem tisztázott, hogy ezen fehérjék biológiai funkcióinak kialakításában mely aktivitások érhetők tetten.

A WH2 domén fehérjecsalád tagjai az izomműködésben is meghatározó szerepet játszanak; a vázizom szarkomerikus aktin filamentumainak összeszerelődésében és szerveződésében. A Leiomodin gerinces specifikus fehérje, míg a Sarcomere length short (SALS) *Drosophila melanogaster*-ben fordul elő (7. ábra) [16, 20, 21, 40]. Bár *in vivo* vizsgálatok alapján a két fehérje hasonló funkcionális sajátosságokkal rendelkezik, genetikai kapcsolat közöttük nem ismert [1, 16, 19].



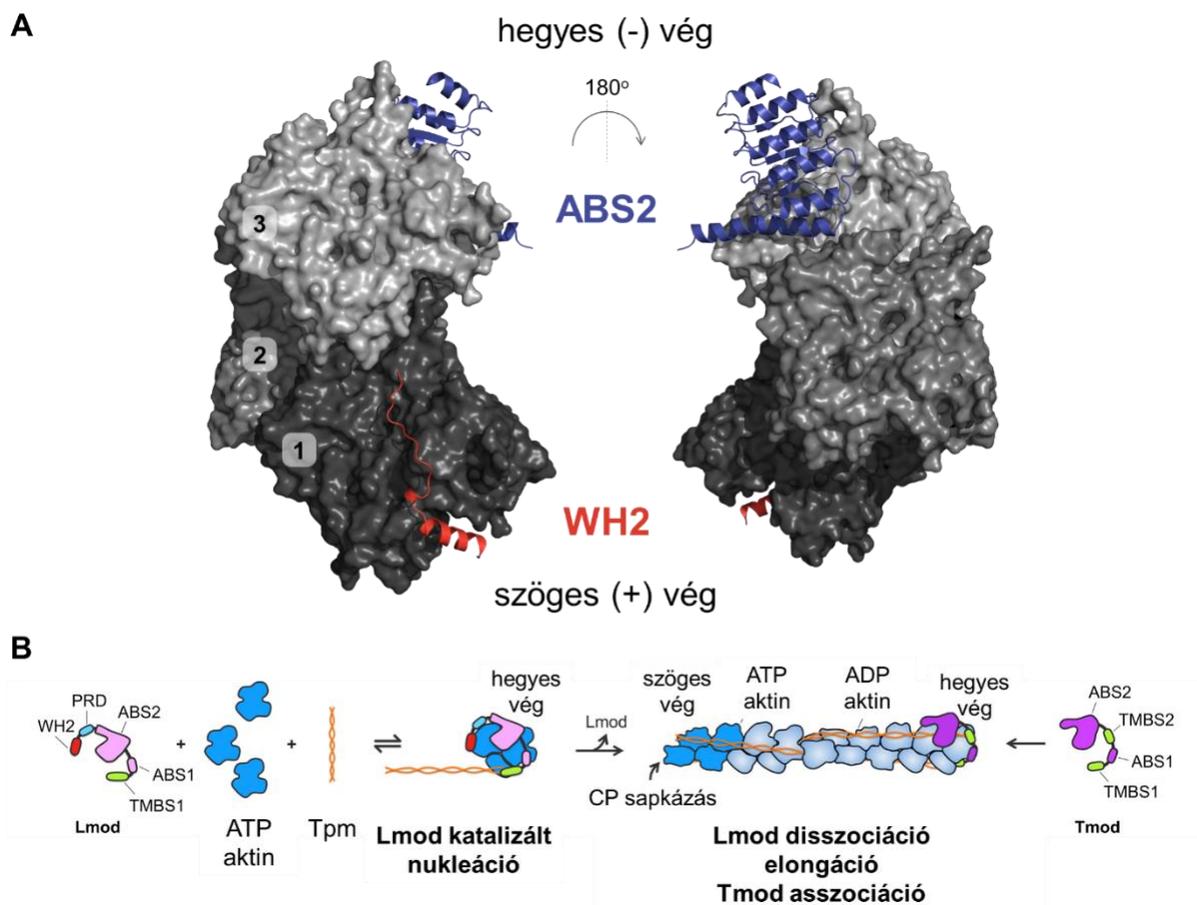
**7. ábra. A Leiomodin (Lmod) és a Sarcomere length short (SALS) fehérjék domén szerkezete.** hs: *Homo sapiens*, dm: *Drosophila melanogaster*, lSALS: long, hosszú izoforma, sSALS: short, rövid izoforma, TMBS: tropomiozinkötő hely, ABS: aktinkötő hely, PRD: prolin-gazdag régió, WH2: Wiskott-Aldrich szindróma homológ régió 2. A Ph.D. munkámban vizsgált SALS konstruktok domén szerkezetét is feltüntettük (SALS-WH2, SALS-Pro-WH2). Az ábrát az *Illustrator for Biological Sciences* (IBS) szoftver segítségével készítettük [41].



#### 1.4.1.1. *Leiomodin*

Leiomodin (Lmod1 – 3) izoformái a tropomodulin családdal rokon fehérjék, de mind szerkezetükben, biokémiai aktivitásaikban, mind pedig biológiai funkcióikban sok eltérést mutatnak [19]. A fehérjék szöveti eloszlását tekintve az Lmod1 jellemzően a simaizomban, endokrin szövetekben és a központi idegrendszerben, az Lmod2 és az Lmod3 pedig a szív-, illetve a vázizomban fejeződik ki. A harántcsíkolt izom specifikus Lmod2 és Lmod3 biológiai funkciója a szarkomerikus vékony filamentumok szerveződésében, azok hosszának szabályozásában érhető tetten. Az Lmod diszfunkciója több humán betegség hátterében áll (Lmod2: dilatált kardiomiopátia [42, 43], Lmod3: nemaline miopátia [40], Lmod1: autoimmun betegségek, simaizom citokontraktilitás zavara, Berdon szindróma (*megacystis-microcolon-intestinal hypoperistalsis syndrome*, MMIHS [44-46])).

A Tmod két aktin-, (ABS1, ABS2) és két tropomiozinkötő (TMBS1, TMBS2) doménnel rendelkezik. Az aktin filamentumok hegyes végével kialakított kölcsönhatásán keresztül a hegyes vég dinamikájának, és így a vékony filamentumok hosszának negatív szabályozója. A Tmod : F-aktin kölcsönhatás affinitását a fehérje tropomiozin kötése szignifikánsan növeli ( $K_D \sim 0.1 \mu\text{M}$  (tropomiozin hiányában) és  $\sim 10 \text{ nM}$  (tropomiozin jelenlétében)). Az Lmod szerkezetét illetően két aktin-, (ABS1, ABS2) és egy tropomiozinkötő (TMBS1) régió mellett a C-terminálisán egy prolin aminosavakban gazdag (*proline-rich domain*, PRD) szakaszt és egy WH2 domént tartalmaz (7. ábra). A PRD profilin kölcsönhatása nem ismert. A tropomodulinnal ellentétben az Lmod az aktin filamentumok összeszerelődését katalizálja *in vitro* a *de novo* nukleációs aktivitása révén, ami az ABS2 és WH2 domén szinergikus hatásához köthető. A tropomiozin kötése a fehérje ezen aktivitásának pozitív szabályozója. Az Lmod : G-aktin komplex röntgenkristallográfiával meghatározott szerkezete alapján a WH2 domén a 'klasszikus' kötési módot követve a monomer szöges végével alakít ki kölcsönhatást; míg az Lmod ABS2 aktinkötő régiója a monomer hegyes vége közelében az S2 szubdoménhez kötődik (8. ábra) [47]. A szerkezetvizsgálati és biokémiai adatok alapján feltételezett modell szerint az Lmod két aktinkötő doménje és az azokat összekötő régió flexibilitása révén három monomer egyidejű megkötése révén képes a nukleációt elősegíteni (8. ábra).



**8. ábra. A Leiomodin (Lmod) *de novo* nukleációs aktivitásának szerkezeti alapjai és sematikus modellje.**

(A) Az Lmod : aktin komplex szerkezeti modellje. Az aktin monomereket felszíni ábrázolás, a WH2 domént és az aktikötő régiót (ABS2) szalagdiagram jelöli. Az ábrát a Pymol szoftverrel készítettük. Lmod2 (PBD: 4WRT [47]). (B) Az Lmod nukleációs aktivitásának sematikus modellje. Az ábra forrása: [19]. Tmod: tropomodulin, TMBS: tropomiozinkötő hely, ABS: aktinkötő hely, PRD: prolin-gazdag régió, WH2: Wiskott-Aldrich szindróma homológ régió 2.

*In vivo* vizsgálatok alapján a szív-, és vázizom specifikus Lmod2 és Lmod3 a hegyes végek közelében, az M vonal irányában lokalizálódik, ugyanakkor a vékony filamentumok menti diffúz eloszlása is megfigyelhető [48]. Ez utóbbi összhangban van a fehérje *in vitro* felderített filamentum oldalkötő aktivitásával [49]. A funkcionális analízis szerint az Lmod2 túltermelése kardiomiocitákban hosszabb vékony filamentumokat, valamint a Tmod hegyes végi delokalizációját eredményezte [50, 51]. A fenotípus nem volt megfigyelhető a WH2 trunkált, vagy a TMBS1-ben mutációt hordozó konstruktok túltermelése esetén. A funkcióvesztéses vizsgálatokban az *Lmod2*<sup>-/-</sup> egerekből származó kardiomiociták vékony filamentumainak rövidülését figyelték meg [42]. A fehérje lokalizációs mintázata és a funkcionális vizsgálatok alapján felállított hipotézis szerint az Lmod képes a vékony filamentumok elongációját elősegíteni a hegyes végen, amelyben mind a WH2 doménje, mind

pedig a tropomiozin kötés fontos szerepet játszhat [19, 50, 51]. Az Lmod biológiai funkciója háttérben álló molekuláris mechanizmusok részletei azonban pontosan nem ismertek.

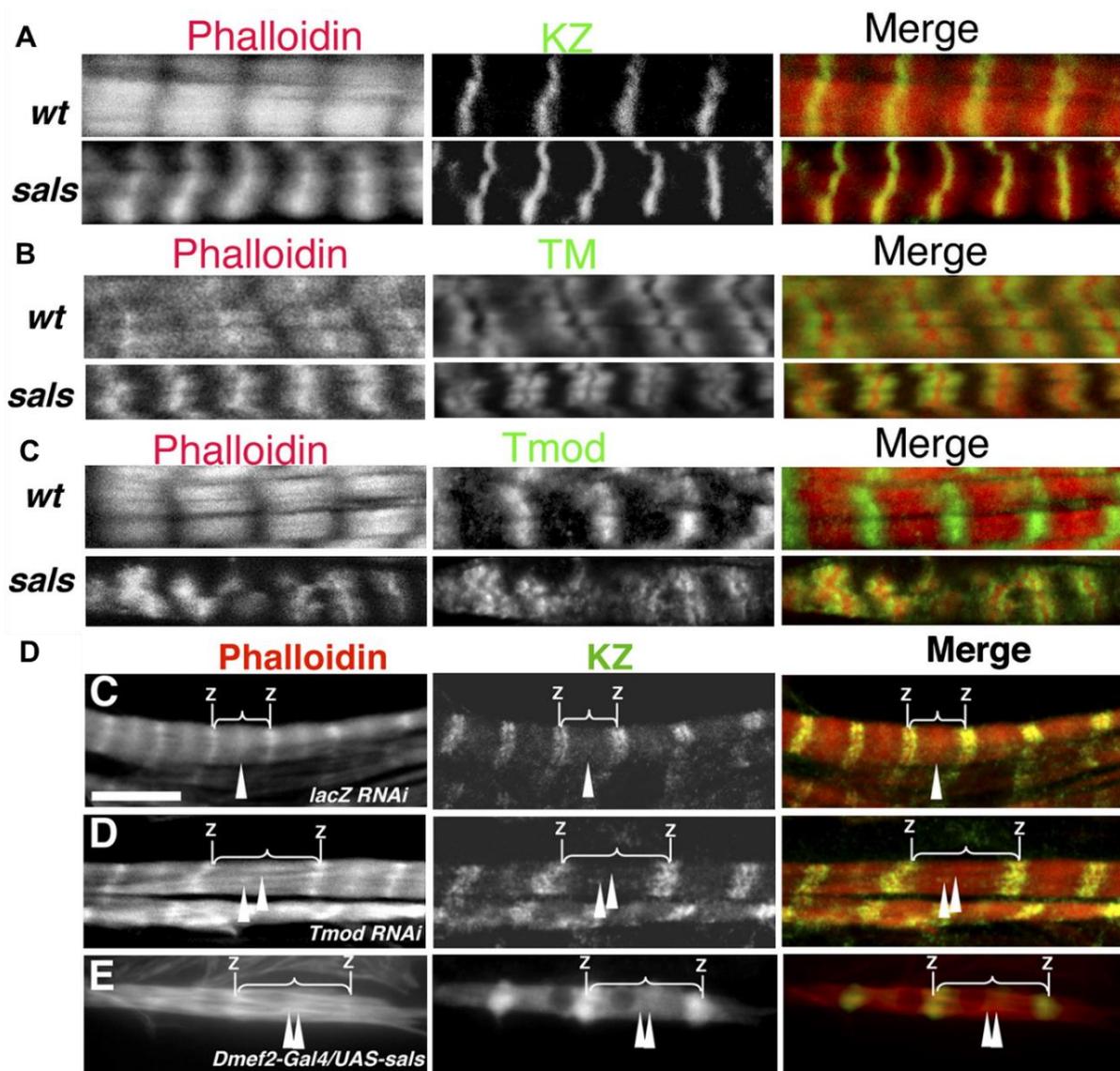
#### 1.4.1.2. *Sarcomere length short*

A *Sarcomere length short* (*sals*) gént 2007-ben azonosították RNS interferencia *screening* során *ecetmuslica* primer izomsejteken [20]. A SALS fehérjének két izoformája ismert; egy hosszú 935 aminosavból álló izom specifikus (*ISALS*) és egy rövid (533 as) nem-izom szövetekben megtalálható izoforma (*sSALS*) (7. ábra). A SALS gerinces ortológja nem ismert [1]. A hosszabb *ISALS* két WH2 doménnel (WH2-1: 399 - 416 as, WH2-2: 447 - 481 as) és azoktól N-terminális irányban egy prolinokban gazdag szakasszal rendelkezik (5, 7. ábra). A rövidebb *sSALS* a hosszú izoformának a C-terminális felét teszi ki egy WH2 doménnel. A fentiekén kívül más specifikus régiót nem azonosítottak a fehérjében.

SALS biológiai funkciójának vizsgálata érdekében *sals* mutáns (homozigóta *sals*<sup>f07849</sup> allélt hordozó) *ecetmuslica* lárvák izom defektusait vizsgálták különböző fejlődési stádiumokban. A *sals* mutáció már az embrionális korban letálisnak mutatkozott, ami a fehérje esszenciális funkciójára enged következtetni. A szarkomerikus defektusok miatt a *sals* mutáns lárvális izmok erő kifejtése sérült, a kikelést biztosító perisztaltikus mozgás gátolt volt, ami révén a lárvák a petében elpusztultak. A manuális disszekciót követően a lárvák ernyedtek és mozdulatlanok voltak. Az embrió fejlődésének 16. stádiumáig a *sals* mutáns embriók a vad típushoz hasonló izommorfológiát mutattak, ami arra utal, hogy a SALS nem az izomfejlődés korai eseményeiben – mioblasztok specifikációja vagy izomrosttá összeolvadása – kritikus. A 17. stádiumban azonban a *sals* mutáns embriók szarkomereinek egyértelmű rövidülése (~ 30%) és számuk növekedése volt azonosítható, ugyanakkor a harántcsíkt mintázat megfigyelhető volt (9. ábra). Az izomrostok vékonyabbá és szakadozottabbá váltak, bizonyos izomszövetekben a rostok teljes szétesése volt jellemző. Az izom elektronmikroszkópiás vizsgálata nemaline miopátiára jellemző sötétebb foltokat tárt fel. Immunfluoreszcencián alapuló mikroszkópiai vizsgálatok alapján a mutáció a vékony filamentumok szerkezetében okoz változásokat, a miozin II alapú vastag filamentumok szerveződésére nincs jelentős hatással (9. ábra). A SALS lokalizációjára vonatkozó vizsgálatok a fehérje komplex mintázatát tárták fel (10. ábra). A fejlődő *ecetmuslica* lárvák izomszövetében a vékony filamentumok elongációja során a SALS azok hegyes végéhez asszociált, az adult állatokban miután a vékony filamentumok elérték a végleges hosszukat azonban jellemzően a Z korong környékére helyeződik át. A fehérje túltermelése (*Dmef2-Gal4, UAS-sals*) rendellenes harántcsíkt mintázatot, valamint hosszabb szarkomerek kialakulását idézte elő (9. ábra). A fenotípus a *Tmod* csendesítésére is jellemző. A SALS mennyiségének csökkenése a *Tmod* túltermelés hatását fokozta, ami a két fehérje genetikai kölcsönhatására és antagonisztikus funkciójára utal a vékony filamentumok összeszerelődése során. A *sals* gén temporálisan

kontrollált csendesítése fiatal állatokban (50 h peterakást követően) a vékony filamentumok hegyes végi hossznövekedését szignifikánsan csökkentette, azonban a szarkomerek perifériás vastagodását nem befolyásolta [16].

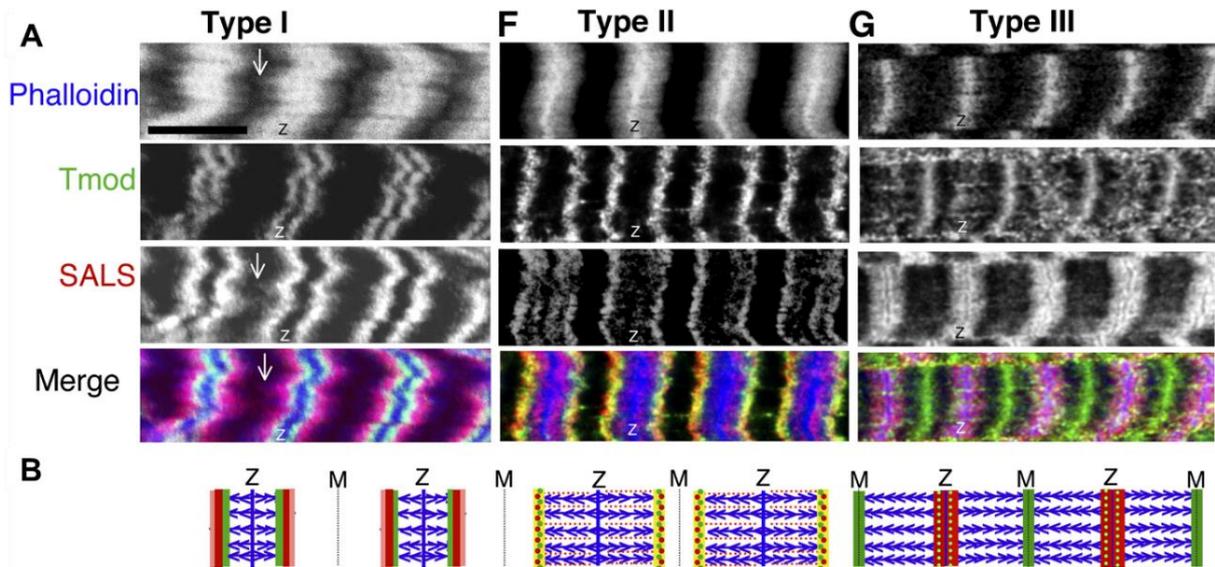
Mindezek alapján a SALS a szarkomerikus aktin hálózatok fontos szabályozójaként közvetett módon befolyásolja a vékony filamentumok hegyes vég elongációját a szarkomer érése során. A fenti megfigyelések alapján felállított hipotézis szerint a SALS a vékony filamentumok elongációját segíti elő a hegyes végeken. Mindazonáltal a SALS aktin kölcsönhatásai és azoknak a fehérje biológiai funkciójában betöltött szerepe még nem tisztázott.



**9. ábra.** A SALS fehérjének a szarkomerikus aktin filamentumok összeszerelődésére és szerkezeti rendezettségére kifejtett hatásait illusztráló mikroszkópi felvételek.

*Drosophila* embriókból (20 – 22 h, peterakást követően) származó miofibrillumok konfokális mikroszkópi felvételei. (A-C) A vad típusú miofibrillumok szarkomereire képest (*felső ábrások*, *wt*) a SALS fehérje hiányában képződött szarkomerikus aktin filamentumok rövidebbek és rendezetlenebb elrendeződést mutatnak (*alsó ábrások*, *sals*). (D) A vad típusú miofibrillumok

szarkomereikhez képest (*felső ábrások, lacZ RNAi*) a SALS fehérje túltermelése esetén képződött szarkomerikus aktin filamentumok hosszabbak és szabályos elrendeződést mutatnak (*alsó ábrások, Dmef2-Gal4/UAS-sals*). A középső ábrások a tropomodulin hiányában képződött szarkomereket mutatja (*Tmod RNAi*). A SALS túltermeléséhez hasonlóan a fenotípust hosszabb vékony filamentumok jellemzik, ami a Tmod és SALS antagonisztikus hatására utalhat. F-aktin: phalloidin festés (piros), szarkomerikus marker fehérjék (zöld) **(A)** KZ: Sallimus, *Drosophila* titin homológ – Z korong, **(B)** TM: tropomiozin (F-aktin), **(C)** Tmod: tropomodulin, (M vonal). Méretarány = 10  $\mu$ m. Az ábra forrása: [20].



**10. ábra. Az endogén SALS szarkomerikus lokalizációja.**

**(A)** *Drosophila* embriókból (második stádiumú lárva (L2), 3. számú ventrális hosszanti testfal izom (VL3), A3 szelvény) származó miofibrillumok konfokális mikroszkópiai felvételei. *Type I*: szabálytalan vékony filamentumok, a SALS jellemzően az M vonal irányában lokalizálódik; *Type II*: egységesebb hosszúságú vékony filamentumok, a SALS az M vonal irányában és az aktin filamentumok mentén lokalizálódik; *Type III*: a SALS elsősorban a Z korong közelében lokalizálódik. Méretarány = 10  $\mu$ m. **(B)** A SALS szarkomerikus lokalizációjának sematikus ábrája. F-aktin (kék), tropomodulin (Tmod, zöld), SALS (piros), SALS-Tmod kolokalizáció (sárga). Az ábra forrása: [20].

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

A szarkomer szerkezeti sajátosságai viszonylag jól ismertek, azonban kialakulásának folyamata, a vékony filamentumok összeszerelődésének és szerveződésének háttérében álló komplex események és szabályozó fehérjék, illetve azok pontos működési mechanizmusa részleteiben nem tisztázott. A vékony filamentumok összeszerelődésük tekintetében szokatlan sajátosságot mutatnak, amennyiben az *in vitro* és nem-izom sejtekben domináns szöges vég növekedéssel szemben a hegyes vég dinamikája tűnik az elongáció vonatkozásában meghatározónak. Ebben a tekintetben a WH2 domén fehérjék, mint a humán Leiomodin és a *Drosophila* specifikus Sarcomere length short, fontos szerepet tölthetnek be a szarkomerikus aktin filamentumok dinamikai szabályozásában. Habár a két fehérje között genetikai rokonság nem ismert, biológiai aktivitásaik alapján funkcionális homológiát, valamint az aktinra gyakorolt hatásmechanizmusuk konzerváltságát sejthetünk.

A Ph.D. munkám során érdeklődésem középpontjában a SALS fehérje biológiai funkcióinak háttérében álló molekuláris mechanizmusok feltárása állt. A WH2 domén ismert aktinkötő motívum, ezért elsőként a SALS két WH2 doménjének és az aktin kölcsönhatásának *in vitro* biokémiai és biofizikai jellemzését tűztem ki célul. A SALS a WH2 doménjei mellett rendelkezik egy prolin-gazdag régióval, ami az aktinkötő profilinnal alakíthat ki kölcsönhatást, és befolyásolhatja a SALS aktin dinamikára kifejtett hatását *in vitro*. Így a WH2 domének jellemzése mellett munkám kiterjedt a prolin-gazdag régió szerepének vizsgálatára is.

A következő kérdésekre kerestem a választ:

- Hogyan hat kölcsön a SALS az aktinnal?
- Hogyan befolyásolja a SALS az aktin dinamikát?
- A WH2 domén tartalmú fehérjékhez hasonlóan a SALS esetében is megfigyelhetünk funkcionális sokszínűséget?
- Milyen szarkomerikus fehérjék befolyásolhatják a SALS működését?

A célkitűzéseim megvalósítására kutatásaim során a SALS WH2 doménjeit (SALS-WH2), valamint a prolin-gazdag régióját is tartalmazó fragmentumát (SALS-Pro-WH2) állítottam elő rekombináns úton, és azok aktin monomerekkel és filamentumokkal kialakított *in vitro* kölcsönhatásainak jellemzését végeztem el biokémiai és biofizikai módszerekkel.

## 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 3.1. Fehérjék előállítása és módosítása

#### 3.1.1. SALS-WH2 és SALS-Pro-WH2 fehérjeszakaszok

A SALS-WH2 (379 – 531 aminosav) és a SALS-Pro-WH2 (345 – 531 aminosav) konstruktok (7. ábra) cDNS-ét pGEX-2T plazmidba klónozva együttműködő partnerünk (Dr. Mihály József, Magyar Tudományos Akadémia, Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Genetikai Intézet) bocsátotta rendelkezésünkre. A SALS fragmentumokat GST (*Glutathion S-Transferáz*) fúziós fehérjeként állítottuk elő. A plazmidokat (5  $\mu$ l) *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS (Novagen) kompetens sejtekbe (100  $\mu$ l) transzformáltuk (inkubáció: 30 min jégen, 45 s 42 °C-on, 2 min jégen). A sejtekhez *Luria Broth* (Lennox) EZMix™ (LB) tápoldatot adtunk (37 °C, 2 h, rázatás: 250 rpm). Ampicillin tartalmú (100  $\mu$ g/ml) táptalajra való szélesztést követően 37 °C-on inkubáltuk éjszakán át. Az integrálódott plazmiddal rendelkező, a rezisztencia markert tartalmazó sejtekből kis kultúrát készítettünk: LB tápoldatot (100 ml + 100  $\mu$ g/ml ampicillin) oltottunk be egy teleppel és inkubáltuk (37 °C, éjszakán át, rázatás: 250 rpm). A megfelelő mennyiségű sejt előállításához 2  $\times$  2 liter LB tápoldathoz (+ 100  $\mu$ g/ml ampicillin) 25 ml kis kultúrát adtunk és inkubáltuk (37 °C, rázatás: 180 rpm) a sejtszuszpenzió OD<sub>600</sub> = 0.5 érték eléréséig. A fehérjeexpressziót izopropil- $\beta$ -D-1-tiogalaktopiranozid (IPTG, 1 mM) oldat hozzáadásával indukáltuk (20 °C, éjszakán át, rázatás: 180 rpm). A sejteket centrifugálással gyűjtöttük össze (Hermle Z36HK: 221.21V01 rotor, 10 000 g, 15 min, 4 °C), meghatároztuk a nedves sejtömeget és felhasználásig – 80 °C-on tároltuk.

A fehérje preparálásához a felolvasztott sejteket lízis pufferben (PBS pH7.4, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5% TritonX-100, 0.15 mM PMSF, 2 mM DTT, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mg/ml DNáz I, 0.5 mg/ml lizozim, 0.4 M NaCl, proteáz inhibitor koktél (Sigma–Aldrich, P8465)) mechanikusan és szonikátor segítségével feltártuk. Ultracentrifugálást (Sorvall: T1250 rotor, 100 000 g, 1 h, 4 °C) követően a sejtszuszpenzióból a SALS-WH2/SALS-Pro-WH2 (SALS) fehérjét affinitás kromatográfiai módszerrel választottuk el. A felülúszót *Glutathion Sepharose* (GSH) (Thermo Fisher) gyöngyökkel inkubáltuk (4 °C, éjszakán át). PBS és SALS pufferrel (10 mM TRIS pH7.5, 10 mM NaCl, 1 mM DTT, 1% szacharóz) történő mosás után trombinos hasítást végeztünk. A fehérjéket SALS pufferrel eluáltuk. SDS poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE) segítségével kiválasztottuk a SALS-ot tartalmazó frakciókat. A trombin eltávolításához a szuszpenziót *Benzamidine Sepharose 4 Fast Flow* (GE Healthcare) gyöngyökkel inkubáltuk (4 °C, 1 h), majd a fehérjét SALS pufferrel eluáltuk. Gélelektroforézis után összegyűjtöttük a SALS-ot tartalmazó frakciókat és koncentráltuk (Amicon ULTRA 5 MWCO). A fehérjéket ultracentrifugálás (Beckman Optima™ MAX-TL: MLA80 rotor, 300 000 g, 30 min, 4 °C) után folyékony nitrogénben lefagyasztottuk és

felhasználásig – 80 °C-on tároltuk. Általában 5 – 6 g baktérium pelletből 1 – 1.2 mg/ml fehérjét tisztítottunk. A fehérje koncentrációt UV-VIS abszorpciós spektroszkópia segítségével határoztuk meg. Az extinkciós koefficienseket és molekula tömegeket a szekvenciák alapján állapítottuk meg (ExPASy ProtParam, <http://web.expasy.org/protparam/> (1. táblázat)). Kontrollként a liofilizált fehérjepreparátum száraz tömegét is meghatároztuk. A liofilizálás eredménye alátámasztotta az abszorpciós spektroszkópia segítségével mért koncentráció értékeket. A BCA (*bicinchoninic acid assay*, QuantiPro™ BCA Assay Kit, Sigma-Aldrich) esszé nem volt alkalmazható a fehérje koncentráció meghatározására. A SALS fehérje fragmentumok savas természetéből adódóan az esszében alkalmazott festék feltételezhetően nem tud megfelelő mértékben kötődni, ezért kisebb koncentráció értékeket kaptunk a spektroszkópai módszer során meghatározottakhoz képest [52].

### 3.1.2. Aktin

A  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP-G-aktint nyúl vázizomból nyert acetone-extrahált izomforgácsból preparáltuk standard eljárás szerint [53], *Sephadex G-200* (GE Healthcare) gélfiltrációs kromatográfia alkalmazásával kiegészítve. Izolálás után az aktint G pufferben tároltuk (4 mM Tris-HCl pH7.8, 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.2 mM ATP, 0.005%  $\text{NaN}_3$ , 0.5 mM  $\beta$ -merkaptoetanol). Kísérleteinkben az aktin által kötött  $\text{Ca}^{2+}$   $\text{Mg}^{2+}$ -ra való cseréjét 200  $\mu\text{M}$  EGTA és 50  $\mu\text{M}$   $\text{MgCl}_2$  hozzáadásával végeztük (5 – 10 min, 22 °C). A polimerizációt 50 mM KCl és 1 mM  $\text{MgCl}_2$  hozzáadásával indukáltuk. A fluoreszcencia spektroszkópai és a teljes belső visszaverődésen alapuló fluoreszcencia mikroszkópai (TIRFM) vizsgálatokhoz az aktint különböző fluorofórokkal jelöltük standard protokollok alapján [22, 24, 54, 55]. Az aktin monomer Cys<sup>374</sup>-es aminosavának jelöléséhez a következő festékeket használtuk: N-(1-pirén)-jódacetamid (pirén, Sigma-Aldrich), jódacetaminoetil-1-naftilamin-5-szulfonsav (IAEDANS, Life technologies), 5-(jódacetamid)fluorescein (IAF, Sigma-Aldrich); a Lys<sup>328</sup> aminosav jelöléséhez használt festék: Alexa Fluor® 488 karboxilsav szukcinimidil észter (Alexa488NHS, Invitrogen) (2. táblázat). A koncentrációt és a jelölési arányt, a korrekciós faktorokat figyelembe véve UV-VIS spektroszkópai eljárással határoztuk meg (1., 2. táblázat). A jelölési arány a legtöbb fluorofór esetében ~ 80%, míg az Alexa488NHS esetében ~ 40% volt.

### 3.1.3. Tropomiozin

Tropomiozin előállításához nyúl vázizomból nyert acetone-extrahált izomforgácsot használtunk, a fehérjét standard eljárások szerint állítottuk elő [55-57]. A szennyező fehérjék eltávolításához hidroxipatit-affinitás kromatográfiát alkalmaztunk (*CHT Ceramic Hydroxyapatite, Type I*, 20  $\mu\text{m}$ , Bio-Rad), a tropomiozint 1 mM (1 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  és  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  megfelelő arányú elegye pH7.0, 1 M KCl, 2.5 mM DTT) és 300 mM (300 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  és 300 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  megfelelő arányú elegye pH7.0, 1 M KCl, 2.5 mM DTT) közötti nátrium



foszfát grádienssel eluáltuk. A tropomiozint tartalmazó frakciókat összegyűjtöttük és Tpm pufferben (10 mM Tris-HCl pH7.8, 0.5 mM DTT) dializáltuk (4 °C, éjszakán át). A fehérjét tartalmazó oldatot koncentráltuk (Amicon ULTRA 10 MWCO), majd ultracentrifugálást (Beckman Optima™ MAX-TL: MLA80 rotor, 300 000 g, 30 min, 4 °C) követően a fehérje koncentrációt UV-VIS spektroszkópiai eljárás segítségével határoztuk meg. A tropomiozint folyékony nitrogénben lefagyasztottuk és a felhasználásig – 80 °C-on tároltuk. A tropomiozint Alexa Fluor®C<sub>5</sub> 568 maleimiddel (Alexa568C5 maleimid, Invitrogen) jelöltük DTT-mentes pufferkörnyezetben (2. táblázat). A festéket 10 × moláris feleslegben adtuk a fehérjét tartalmazó oldathoz, majd éjszakán át 4 °C-on inkubáltuk. A reakciót 10 mM DTT hozzáadásával állítottuk le. A nem kötött festék molekulákat PD10 (GE Healthcare) oszlop segítségével távolítottuk el. A fehérje koncentrációt és a jelölési arányt, a korrekciós faktort figyelembe véve UV-VIS spektroszkópia segítségével határoztuk meg (1., 2. táblázat).

### 3.1.4. Egyéb aktinkötő fehérjék: gelsolin, profilin, miozin II

A humán gelsolint (GSN), az egér profilin1 (profilin) és a nyúl vázizom miozin II fehérjéket korábban leírtak alapján preparáltuk [58, 59]. Kísérleteinkhez a profilint Alexa Fluor®C<sub>5</sub> 568 maleimiddel (Alexa568C5 maleimid, Invitrogen) jelöltük a tropomiozin esetén részletezett protokoll szerint. A miozin II motor aktivitását N-étilmaleimid jelöléssel (NEM) inaktiváltuk [60].

fehérje	aminosav	MW (Da)	$\epsilon_{280nm}$	$\epsilon_{290nm}$
SALS	935	104907.0	28670 (M <sup>-1</sup> × cm <sup>-1</sup> )	28420 (M <sup>-1</sup> × cm <sup>-1</sup> )
SALS-WH2	379 – 531	17116.7	7115 (M <sup>-1</sup> × cm <sup>-1</sup> )	6990 (M <sup>-1</sup> × cm <sup>-1</sup> )
SALS-Pro-WH2	345 – 531	21051.4	7115 (M <sup>-1</sup> × cm <sup>-1</sup> )	6990 (M <sup>-1</sup> × cm <sup>-1</sup> )
Aktin	375	42300	0.63 (mg × ml <sup>-1</sup> × cm <sup>-1</sup> )	1.11 (mg × ml <sup>-1</sup> × cm <sup>-1</sup> )
Profilin	140	14800	1.13 (mg × ml <sup>-1</sup> × cm <sup>-1</sup> )	-
Gelsolin	782	85697.52	115280 (M <sup>-1</sup> × cm <sup>-1</sup> )	-
Tropomiozin	284	33000	0.3 (mg × ml <sup>-1</sup> × cm <sup>-1</sup> )	-

1. táblázat. A vizsgált fehérjék, fehérjeszakaszok jellemzői.

alkalmazott fluorofór	MW (Da)	$\lambda_{max}$ (nm)	$\epsilon_{\lambda,max}$ ( $M^{-1} \times cm^{-1}$ )	korrekciós faktor ( $KF_{280\text{ nm}}$ )*
IAEDANS	434.25	336	6100	0.21
IAF	515.25	495	60000	0.23
pirén	297	344	22000	0.127
Alexa488NHS	643	495	71000	0.11
Alexa568C5-maleimid	880.92	577	91300	0.46

## 2. táblázat. A fluoreszcencia spektroszkópiai és TIRF mikroszkópiai kísérletekben alkalmazott fluorofórok.

\*A fluoreszcens jelölő hozzájárulását a fehérje 280 nm-en mért abszorpciójához az alábbi összefüggés alapján korrigáltuk:  $A_{280\text{ nm}, \text{ korrigált}} = A_{280\text{ nm}, \text{ mért}} - KF_{280\text{ nm}} \times A_{\lambda_{max}}$ , ahol  $KF_{280\text{ nm}}$ : korrekciós faktor 280 nm-en.

### 3.2. Általános kísérleti körülmények

A koncentrációfüggést vizsgáló méréseknél az egyes koncentrációkhoz külön mintákat készítettünk. A méréseket 20 °C-on végeztük. A dolgozatban megadott koncentrációk a végkoncentrációt jelentik. Az állandó pufferkörülmeny biztosítása érdekében a mintákban az egyes fehérjékre a tárolópuffer és a fehérje térfogatának összege állandó volt és a teljes mintatérfogat maximum 50%-át tette ki. Dolgozatban bemutatott eredmények legalább két független mérésből származnak, a pontos mintaszám az ábraalírásokban került feltüntetésre.

### 3.3. Fluoreszcencia spektroszkópiai vizsgálatok

#### 3.3.1. Steady-state fluoreszcencia emisszió és anizotrópia

Steady-state fluoreszcencia emisszió és anizotrópia mérésekben vizsgáltuk a SALS WH2 doménjeinek aktin monomerekkel kialakított kölcsönhatását, IAEDANS és Alexa488NHS jelölt G-aktint alkalmazva. A spontán polimerizáció gátlása érdekében az aktint (1  $\mu\text{M}$  vagy 20  $\mu\text{M}$ ) Latrunculin A (LatA)-val (4  $\mu\text{M}$  vagy 20  $\mu\text{M}$ ) inkubáltuk (4 °C, 30 min). A SALS konstruktokat ezt követően adtuk a mintákhoz (inkubáció: 4 °C, éjszakán át). Méréseinket Horiba Jobin Yvon spektrofluoriméteren végeztük (IAEDANS-G-aktin:  $\lambda_{ex} = 350\text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 460\text{ nm}$ ; Alexa488NHS-G-aktin:  $\lambda_{ex} = 488\text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 516\text{ nm}$ ; rések:  $slit_{ex} = 5\text{ nm}$ ,  $slit_{em} = 5\text{ nm}$ ). Az IAEDANS-G-aktin fluoreszcencia emisszióját SALS hiányában és jelenlétében mértük. A kvantitatív analízis érdekében az IAEDANS-G-aktin fluoreszcencia

emisszió értékeit az emissziós spektrum 400 – 600 nm közötti görbe alatti területéből határoztuk meg. A relatív fluoreszcencia emissziót ( $I = \frac{I_{SALS}}{I_{aktin}}$ ) a SALS jelenlétében ( $I_{SALS}$ ), illetve hiányában ( $I_{aktin}$ ) mért fluoreszcencia emisszió hányadosaként számoltuk. A maximum hullámhosszat ( $\lambda$ ) a fluoreszcencia emisszió maximális értékéhez tartozó hullámhossza alapján határoztuk meg. A relatív maximum hullámhosszat ( $\lambda = \frac{\lambda_{SALS}}{\lambda_{aktin}}$ ) a SALS jelenlétében ( $\lambda_{SALS}$ ), illetve hiányában ( $\lambda_{aktin}$ ) mért maximum hullámhossz hányadosaként számoltuk. A relatív fluoreszcencia emisszió és maximum hullámhossz értékeit a [SALS] függvényében ábrázoltuk. A SALS : G-aktin komplex disszociációs egyensúlyi állandóját ( $K_D$ ) az *1a* és *1b* *egyenlet* alapján határoztuk meg.

$$\frac{I_{max}-I}{I_{max}-I_{min}} = \frac{A_0+S_0+K-\sqrt{(A_0+S_0+K)^2-4A_0S_0}}{2A_0} \quad (1a \text{ egyenlet})$$

$$\frac{\lambda-\lambda_{min}}{\lambda_{max}-\lambda_{min}} = \frac{A_0+S_0+K-\sqrt{(A_0+S_0+K)^2-4A_0S_0}}{2A_0} \quad (1b \text{ egyenlet})$$

Az egyenletekben szereplő  $A_0$  és  $S_0$  az IAEDANS-G-aktin és a SALS koncentrációját jelöli,  $I_{max}$  és  $\lambda_{min}$  a SALS hiányában mért relatív fluoreszcencia emisszió és maximum hullámhossz,  $I_{min}$  és  $\lambda_{max}$  a SALS telítési koncentrációjának megfelelő értékeket jelöli.

Az IAEDANS-, és Alexa488NHS-G-aktin steady-state anizotrópiáját ( $r$ ) a [SALS] függvényében ábrázoltuk. A SALS : G-aktin komplex disszociációs egyensúlyi állandóját ( $K_D$ ) az *1c egyenlet* alapján határoztuk meg.

$$\frac{r-r_A}{r_{AS}-r_A} = \frac{A_0+S_0+K-\sqrt{(A_0+S_0+K)^2-4A_0S_0}}{2A_0} \quad (1c \text{ egyenlet})$$

ahol  $A_0$  és  $S_0$  a G-aktin és SALS koncentrációját jelöli,  $r_A$  a G-aktin steady-state anizotrópiája SALS hiányában,  $r_{AS}$  pedig a G-aktin steady-state anizotrópiája a SALS telítési koncentrációja mellett.

A SALS és a tropomiozin kölcsönhatását steady-state anizotrópia mérésekben vizsgáltuk, Alexa568C5 maleimid jelölt tropomiozin alkalmazásával (1  $\mu$ M). Méréseinket Horiba Jobin Yvon spektrofluoriméteren végeztük ( $\lambda_{ex} = 350$  nm,  $\lambda_{em} = 460$  nm; rések: slit<sub>ex</sub> = 5 nm, slit<sub>em</sub> = 5 nm). A pufferkörnyezet ionerősségét KCl oldattal állítottuk be (alacsony ionerősség: 10 mM NaCl; közepes ionerősség: 50 mM KCl és 10 mM NaCl; magas ionerősség: 100 mM KCl és 10 mM NaCl). A 10 mM NaCl a SALS tárolópufferének hozzájárulása. Az ionok közötti elektrosztatikus kölcsönhatás erősségét jellemző ionerősséget

az ionok moláris koncentrációjának ( $c_i$ ) és töltésének ( $z_i$ ) ismeretében számoltuk a 2. egyenlet alapján.

$$[\text{ionerősség}] = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n c_i z_i^2 \quad (2. \text{ egyenlet})$$

### 3.3.2. Fluoreszcencia rezonancia energia transzfer (FRET)

A SALS : G-aktin komplex sztöchiometriájának megállapítása érdekében FRET méréseket végeztünk. Donorként (D) IAEDANS, akzeptorként (A) IAF jelölt aktint használtunk. A kísérlet összeállításakor korábbiakban kidolgozott protokoll szerint jártunk el [54]. A donor és akceptor jelölt monomereket 1 (1  $\mu\text{M}$ ) : 9 (9  $\mu\text{M}$ ) = donor : akceptor arányban kevertük össze G pufferben, F pufferben (G puffer + 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 50 mM KCl), gelsolin (5  $\mu\text{M}$ ), vagy SALS-WH2 (10  $\mu\text{M}$ ) jelenlétében. A fluoreszcencia emissziót Horiba Jobin Yvon spektrofluoriméteren mértük ( $\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 400 \text{ nm} - 600 \text{ nm}$ ; rések:  $\text{slit}_{\text{ex}} = 5 \text{ nm}$ ,  $\text{slit}_{\text{em}} = 5 \text{ nm}$ ). Az abszorpciós spektrumok méréséhez Jasco UV-VIS spektrofotométert használtunk. A fluoreszcencia emissziót korrigáltuk a minta önabszorpciójából származó *inner filter* effektusra a 3a egyenlet szerint [61]:

$$F_{\text{korrigált}} = F_{\text{mért}} \times 10^{\frac{OD_{\text{ex}}}{d_{\text{ex}}} + \frac{OD_{\text{em}}}{d_{\text{em}}}} \quad (3a \text{ egyenlet})$$

Az egyenletben  $OD_{\text{ex}}$  és  $OD_{\text{em}}$  a gerjesztési és emissziós hullámhosszon mért optikai denzitás,  $d_{\text{ex}}$  és  $d_{\text{em}}$  a kivetta geometriai paraméterei által meghatározott fényút hossza a mintában a gerjesztési és emissziós hullámhosszokon. A korrekciót követően a donor akceptor hiányában ( $F_D$ ) és annak jelenlétében ( $F_{DA}$ ) mért fluoreszcencia emisszióját a spektrum 440 nm és 460 nm közötti integráljaként számoltuk. Az energia transzfer hatásfokát ( $E$ ) az alábbi egyenlet alapján határoztuk meg:

$$E = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D} \quad (3b \text{ egyenlet})$$

### 3.3.3. Pirén jelölt aktin alapú fluoreszcencia spektroszkópai módszerek

A SALS konstruktok hatását az aktin monomer : filamentum egyensúlyra pirén jelölt aktin alkalmazásával vizsgáltuk. A pirén sajátja, hogy fluoreszcencia intenzitása az aktin filamentumok mennyiségével arányosan növekszik, ami lehetőséget ad az aktin dinamika steady-state és kinetikai jellemzésére. A kinetikai kísérleteket Safas Xenius FLX, a steady-state méréseket Horiba Jobin Yvon spektrofluoriméteren végeztük ( $\lambda_{\text{ex}} = 365 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 407 \text{ nm}$ ).

### 3.3.3.1. Aktin filamentumok összeszerelődésének kinetikai vizsgálata

A  $Mg^{2+}$ -ATP-G-aktin (2.5  $\mu$ M, 5% pirén jelölt) polimerizációját 1 mM  $MgCl_2$  és 50 mM KCl hozzáadásával indukáltuk SALS hiányában és jelenlétében. Az aktin filamentumok összeszerelődésének kinetikáját a pirén fluoreszcencia emissziójának időbeli változásán keresztül követtük nyomon. A kvantitatív elemzés érdekében a polimerizáció sebességét ( $v$ ) a pirén tranzienst kezdeti szakaszára (0 – 500 s) illesztett egyenes meredekségéből határoztuk meg és ábrázoltuk a SALS koncentrációjának függvényében ( $[S]$ ). Az adatokat az alábbi egyenlet (4. egyenlet) segítségével illesztettük [62]:

$$\frac{v}{v_0} = 1 - \frac{[SA]}{[A_0]} \quad (4. \text{ egyenlet})$$

ahol  $v_0$  a polimerizáció sebessége SALS hiányában,  $[A_0]$  és  $[SA]$  az aktin és a SALS : G-aktin komplex koncentrációját jelöli.

A SALS konstruktor hatását az aktin filamentumok hegyes vég dinamikájára gelsolin : aktin magok (*seeds*,  $GA_2$ ) alkalmazásán alapuló polimerizációs kísérletekben vizsgáltuk. A  $GA_2$  komplex létrehozásához gelsolint (0.5  $\mu$ M) és G-aktint (1.1  $\mu$ M) inkubáltunk G pufferben  $CaCl_2$  jelenlétében (2.5 mM) [24]. Az aktin monomerek (1.2  $\mu$ M, 5% pirén jelölt)  $GA_2$  magokhoz (33 nM) történő asszociációjának kinetikáját követtük nyomon SALS hiányában és különböző koncentrációi mellett.

### 3.3.3.2. Aktin filamentumok szétszerelődésének kinetikai vizsgálata

$Mg^{2+}$ -ATP-G-aktint (1  $\mu$ M, 50% pirén jelölt) polimerizáltuk (1 mM  $MgCl_2$ , 50 mM KCl) éjszakán át. A filamentumokat F pufferben (G puffer + 1 mM  $MgCl_2$ , 50 mM KCl) a szöges végek kritikus koncentrációja alá (20 nM-ra) hígítottuk a SALS különböző koncentrációi, gelsolin (0.1  $\mu$ M és 0.5  $\mu$ M) vagy Latrunculin A (20  $\mu$ M) mellett. Az aktin filamentumok szétszerelődésének kinetikáját a fluoreszcencia emisszió csökkenésének időbeli nyomon követésével vizsgáltuk. A relatív pirén fluoreszcencia emissziót a görbék 1-re normálásával (a  $t = 0$  s időpillanatban mért emisszió értékével) származtattuk. A tropomiozin jelenlétében végzett mérések során az aktin filamentumokat tropomiozinnal (4.5  $\mu$ M) inkubáltuk (4 °C, éjszakán át) a SALS hozzáadását megelőzően.

### 3.3.3.3. Kritikus koncentráció meghatározása

Az egyensúlyi állapotban lévő szabad aktin monomerek mennyiségét a kritikus koncentráció ( $c_c$ ) jellemzi; értéke ~ 100 – 150 nM, amit az aktin filamentumvégek spontán dinamikája határoz meg. A filamentumok kinetikai polaritása miatt a szöges és hegyes vég

kritikus koncentrációja eltérő ( $c_c(+)$  ~ 70 – 100 nM,  $c_c(-)$  ~ 600 nM). A kritikus koncentráció meghatározása érdekében különböző koncentrációjú  $Mg^{2+}$ -ATP-G-aktint (5% pirén jelölt) polimerizáltunk (1 mM  $MgCl_2$ , 50 mM KCl), majd SALS-WH2 (0.5  $\mu$ M és 1.5  $\mu$ M) vagy gelsolin (0.01  $\mu$ M) hozzáadását követően a mintákat inkubáltuk (4 °C, éjszakán át). A pirén steady-state fluoreszcencia emisszióját mértük és ábrázoltuk az aktin koncentrációjának függvényében ( $J(c)$  ábrázolás). A  $J(c)$  ábrázolás karakterisztikus töréspontjához tartozó aktin koncentráció a nempolimerizált aktin monomerek mennyiségét adja meg. Ez a kritikus koncentráció (szabad G-aktin) és a szabályozó fehérjék által kötött monomerek mennyiségének összegéből tevődik össze. A SALS által kötött monomerek koncentrációját ([SA]) az 5. egyenlet alapján számolhatjuk [62]:

$$[SA] = \frac{c_c}{c_c + K_D} [S_0] \quad (5. \text{ egyenlet})$$

ahol a  $[S_0]$  a SALS-WH2 koncentrációja,  $K_D$  a SALS-WH2 : G-aktin komplex disszociációs egyensúlyi állandója és  $c_c$  a kritikus koncentráció.

#### 3.3.3.4. Az aktin monomer : filamentum arány steady-state vizsgálata

$Mg^{2+}$ -ATP-G-aktint (2.5  $\mu$ M, 50% pirén jelölt) polimerizáltuk (1 mM  $MgCl_2$ , 50 mM KCl) phalloidin (Ph, 2.5  $\mu$ M), jasplakinolide (Jaspla, 2.5  $\mu$ M) vagy tropomiozin (Tpm, 6  $\mu$ M) hiányában, illetve jelenlétében (4 °C, éjszakán át). Ezt követően a Ph-F-aktint, Jaspla-F-aktint vagy Tpm-F-aktint a SALS-WH2 különböző koncentrációi mellett inkubáltuk (4 °C, éjszakán át). A pirén steady-state fluoreszcencia emisszióját mértük. A relatív pirén fluoreszcencia emissziót az intenzitás 1-re normálásával (a [SALS] = 0  $\mu$ M esetén mért emisszió értékével) származtattuk és ábrázoltuk a SALS-WH2 koncentrációjának függvényében.

#### 3.4. Szedimentációs vizsgálatok

A SALS monomer : filamentum egyensúlyra gyakorolt hatását, valamint F-aktin kölcsönhatását ultracentrifugáláson alapuló koszedimentációs módszerrel vizsgáltuk. F-aktint (1, 1.5 és 2.5  $\mu$ M) vagy phalloidin-F-aktint (1  $\mu$ M) inkubáltuk (4 °C, éjszakán át) a SALS különböző koncentrációi mellett. A minták ultracentrifugálását (Beckman Optima™ MAX-TL: TLA 100 rotor, 300.000 g, 30 min, 20 °C) követően az üledéket (*pellet*, P) és a felülúszót (*supernatant*, SN) szétválasztottuk. Az üledék és a felülúszó fehérjetartalmát SDS-PAGE analízissel vizsgáltuk. A *Coomassie blue*-val előhívott fehérjekomponensek intenzitását a *Syngene bioimaging system* program segítségével határoztuk meg. Az intenzitásokat az egyes fehérjék molekulatömegeivel korrigáltuk. Az értékeket kalibrációs görbe segítségével aktin monomer és aktin filamentum koncentrációkká ([G-aktin], [F-aktin]) konvertáltuk, majd

ábráztuk a SALS koncentrációjának függvényében. Az adatsorra illesztett egyenes meredekségének abszolút értéke ( $|[SA]/[S_0]|$ ) az 5. *egyenlet* alapján származtatható:  $c_c/(c_c+K_D)$  és hozható kapcsolatba a kritikus koncentrációval ( $c_c$ ), valamint a SALS-WH2 : G-aktin komplex disszociációs egyensúlyi állandójával ( $K_D$ ).

### 3.5. Teljes belső visszaverődésen alapuló fluoreszcencia mikroszkópia (TIRFM)

A TIRFM kísérletek előkészítésekor fedőlemezekből (18 × 18 mm és 24 × 60 mm; N #1.5) 50 µl nagyságú áramlási cellákat hoztunk létre. Az üvegfelszínt egyszeres térfogatnyi N-etilmaleimid (NEM) miozin II-vel inkubáltuk, majd kétszeres térfogatnyi miozin pufferrel (0.5 M KCl tartalmú F puffer) és szintén kétszeres térfogatnyi 0.1% BSA-val (F pufferben oldva) mostuk. Végezetül kétszeres térfogatnyi TIRFM pufferrel ((0.5% metilcellulóz, 10% BSA, 1 mM 1,4-diazabiciklo-[2,2,2]oktán (DABCO)) és 100 mM DTT-vel (F pufferben oldva) ekvilibráltuk. A TIRFM vizsgálatok során Alexa488NHS-Mg<sup>2+</sup>-ATP-G-aktin (0.5 µM, 10% Alexa488NHS jelölt) polimerizációjának kinetikáját követtük nyomon SALS-WH2 hiányában és jelenlétében. A képalkotáshoz lézer alapú (491 nm) TIRFM rendszerrel felszerelt *Olympus IX81* invertált mikroszkópot használtunk (ApoTIRFM 60× NA1.45, *Hamatsu* CCD kamera, *Cell<sup>R</sup> acquisition* szoftver). A képeket 10 másodperces időközönként rögzítettük. A *time-lapse* felvételeket *Fiji* (<http://fiji.sc/Fiji>) programmal értékeltük ki. A *Multiplugkymograph plugin* segítségével határoztuk meg az aktin filamentumok növekedési sebességét, feltételezve, hogy 1 µm filamentum 370 alegységet tartalmaz [63]. Az aktin filamentumok növekedési sebességét ( $v$ ) a 6. *egyenlet* segítségével adtuk meg:

$$v = k_+([G_0] - c_c(+)) \quad (6. \text{ egyenlet})$$

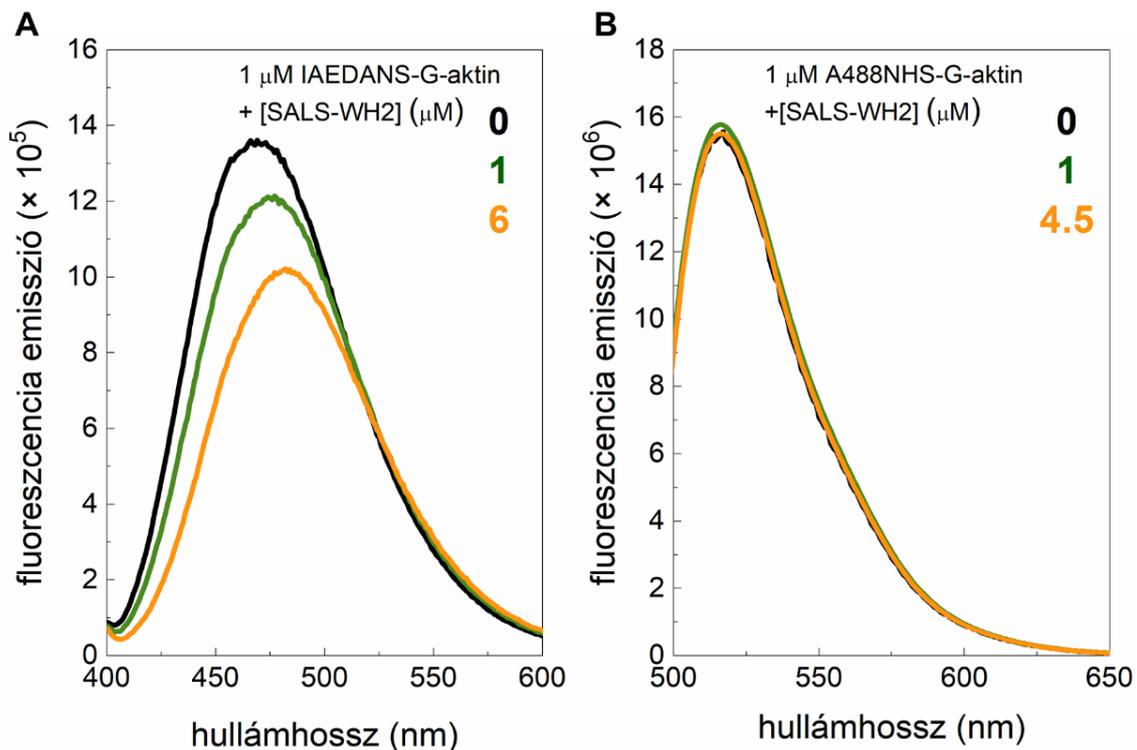
ahol  $k_+$  a monomerek filamentumba épülését jellemző asszociációs sebességi állandó a szöges végen,  $[G_0]$  az aktin koncentráció és  $c_c(+)$  a szöges vég kritikus koncentrációja. Az aktin filamentumok növekedési sebességét ( $v$ ) a SALS-WH2 koncentrációjának ( $[S_0]$ ) függvényében ábráztuk, az adatokat a 4. *egyenlet*tel illesztettük.

## 4. EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

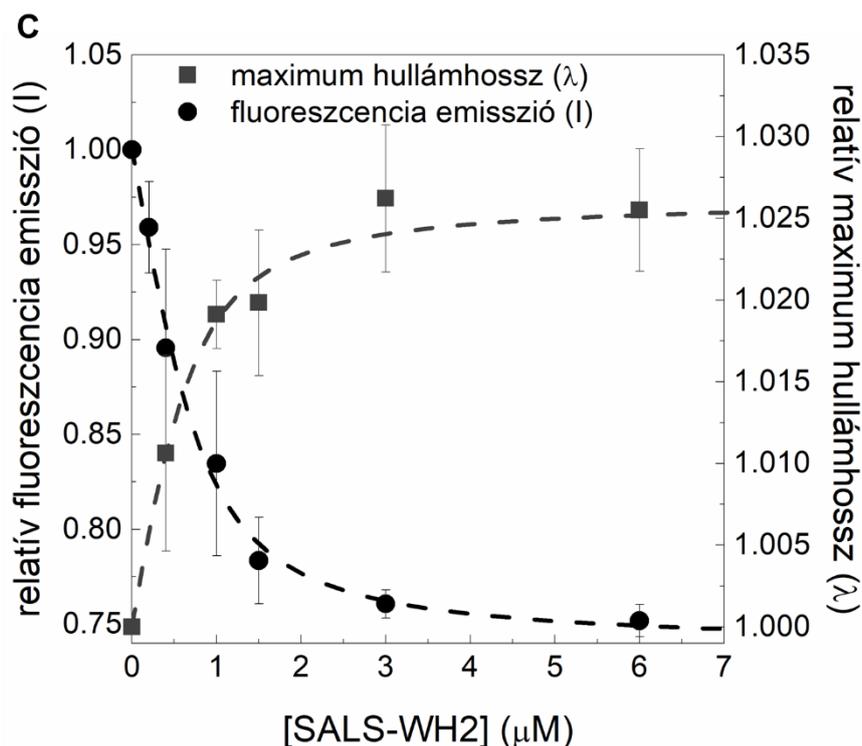
### 4.1. A SALS WH2 doménjeinek hatása az aktin dinamikára

#### 4.1.1. A SALS WH2 doménjei kölcsönhatnak az aktin monomerekkel

*In vitro* vizsgálataink során elsőként arra kerestük a választ, hogy a SALS tandem WH2 doménjei (SALS-WH2, 7. ábra) más WH2 doménekhez hasonlóan képesek-e kölcsönhatást kialakítani az aktin monomerekkel. Ennek érdekében IAEDANS jelölt  $Mg^{2+}$  és ATP kötött aktin monomerek ( $Mg^{2+}$ -ATP-G-aktin,  $1 \mu M$ ) fluoreszcencia emisszióját mértük SALS-WH2 hiányában és különböző koncentrációinak jelenlétében (11. A ábra). Az IAEDANS-G-aktin fluoreszcencia emissziójának csökkenését és a maximum emisszióhoz tartozó hullámhossz (maximum hullámhossz) növekedését figyeltük meg növekvő mennyiségű SALS-WH2 hozzáadását követően. Telítési SALS-WH2 koncentráció mellett az emisszió mintegy 25%-kal csökkent, a maximum hullámhossz vöröseltolódása pedig  $\sim 10$  nm-nek adódott (11. A ábra). A fluorofór spektrális sajátosságainak változása arra utal, hogy a SALS WH2 doménjei kölcsönhatnak az aktin monomerekkel. A fluoreszcencia emisszió (a spektrum integrálja  $400 - 600$  nm között) és a maximum hullámhossz értékeit a SALS-WH2 koncentráció függvényében ábrázoltuk, majd az adatokat az 1a és 1b egyenlettel illesztettük. A SALS-WH2 : G-aktin komplex disszociációs egyensúlyi állandója ( $K_D$ ) mindkét adatsorból  $\sim 0.23 \mu M$ -nak adódott (11. C ábra). A fentiekkel ellentétben az Alexa488NHS jelölt  $Mg^{2+}$ -ATP-G-aktin ( $1 \mu M$ ) fluoreszcencia paramétereire (fluoreszcencia emisszió, maximum hullámhossz) a SALS-WH2 nem volt hatással (11. B ábra).



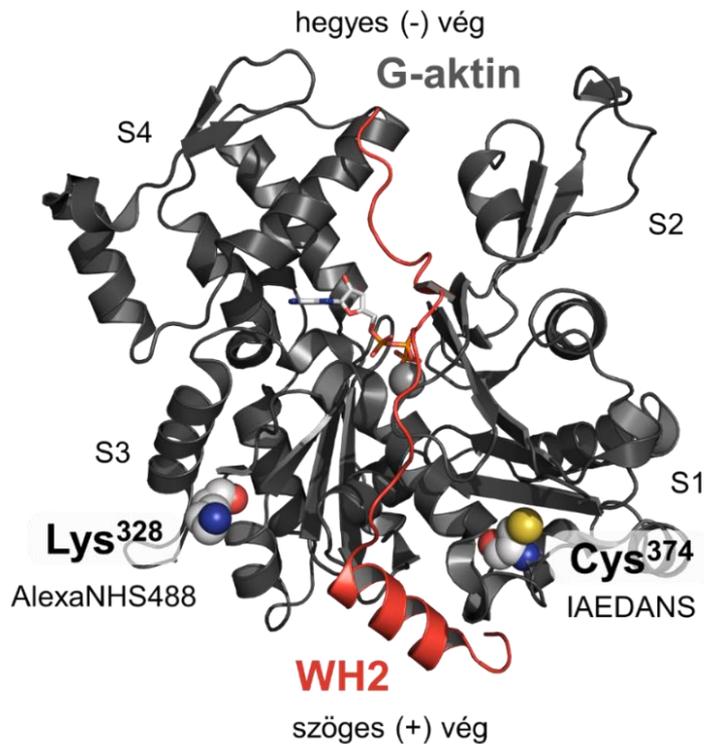




**11. ábra.** (A) IAEDANS-G-aktin és (B) Alexa488NHS-G-aktin fluoreszcencia emissziós spektrumai SALS-WH2 hiányában és jelenlétében. Megjegyzés: A [SALS-WH2] függvényében az IAEDANS fluoreszcencia emisszió csökkenő tendenciát mutat és az emisszió maximumához tartozó hullámhossz (maximum hullámhossz) vöröseltolódása figyelhető meg. [IAEDANS-G-aktin] = 1 μM, [Alexa488NHS-G-aktin] = 1 μM, [LatA] = 4 μM. (C) A relatív fluoreszcencia emisszió és maximum hullámhossz értékei a SALS-WH2 koncentráció függvényében. A fluoreszcencia paramétereit az (A) és a (B) paneleken bemutatott mérési eredményekből származtattuk. A pontsorozatnak megfelelő színű szaggatott vonalak az illesztett görbék jelzik (1a és 1b egyenlet). Az illesztés alapján a disszociációs egyensúlyi állandó  $K_D = 0.24 \pm 0.1 \mu\text{M}$ -nak (fluoreszcencia emisszió-[SALS-WH2]) és  $K_D = 0.22 \pm 0.2 \mu\text{M}$ -nak (maximum hullámhossz-[SALS-WH2]) adódott. Átlag  $\pm$  SD, n = 2 - 3.

Ismert, hogy az IAEDANS az aktin monomer Cys<sup>374</sup>-es aminosavához kapcsolódik (12. ábra). A tömegspektrometriai elemzés az Alexa488NHS kötőhelyeként a monomer Lys<sup>328</sup>-as aminosavát azonosította (12. ábra). A fluoreszcencia spektroszkópai vizsgálataink eredményei alapján feltételezzük, hogy a SALS-WH2 aktin monomerhez való kötődése az IAEDANS lokális környezetét igen, míg az Alexa488NHS körüli fehérjeszegmenst közvetlenül nem befolyásolja. Több fehérje WH2 doménjének G-aktinnal alkotott komplexének röntgenkristallográfiás szerkezete ismert (6., 12. ábra) [33, 35-38, 47]. A WH2 : G-aktin komplex szerkezeti stabilitásában meghatározó a domén N-terminális amfipatikus  $\alpha$ -hélice és az aktin monomer szöges vége; az S1 és S3 szubdomének által meghatározott hidrofób zsebbel kialakított kölcsönhatás. A WH2 domén C-terminálisa a monomer felszínén a hegyes vég irányába nyúlik. A Cys<sup>374</sup> aminosav az S3 szubdoménben; a WH2 domén kötőhelyével átfedésben helyezkedik el, míg a Lys<sup>328</sup> a WH2 domén kötőhelyétől távolabb található (12. ábra). Ezen szerkezeti ismeretek alapján magyarázhatjuk a fluoreszcencia spektroszkópai

eredményeinket: a Cys<sup>374</sup>-hez kapcsolt IAEDANS szterikusan gátolhatja a SALS-WH2 monomerkötését, míg a Lys<sup>328</sup>-hoz kapcsolt Alexa488NHS nincs hatással arra. Összességében a fentiek arra utalnak, hogy a SALS WH2 doménjei a WH2 doménekre jellemző kötési módot alakítanak ki az aktin monomerekkel.

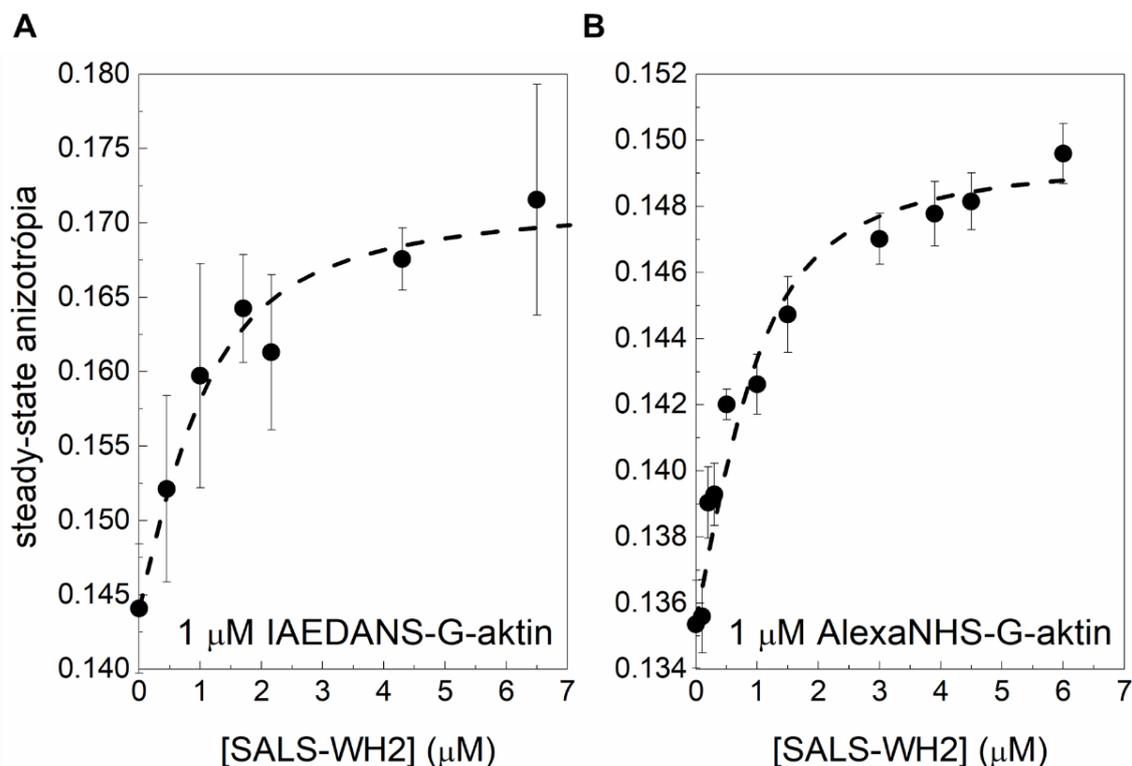


**12. ábra. A Cys<sup>374</sup> és Lys<sup>328</sup> aminosavak és a WH2 domén relatív pozíciója a WH2 : G-aktin komplexben.**

Az ábrához a WIP (*WASP-interacting protein*) WH2 : G-aktin röntgenkristallográfiával meghatározott szerkezetét használtuk (PDB: 2A41 [33]). Az ábrát a Pymol szoftverrel készítettük.

A SALS-WH2 : G-aktin kölcsönhatás vizsgálatára steady-state anizotrópia (anizotrópia) méréseket is végeztünk, IAEDANS és Alexa488NHS jelölt Mg<sup>2+</sup>-ATP-G-aktin (1 μM) alkalmazásával (13. ábra). Kísérleti körülmények, úgy mint ionok jelenléte, aktinkötő fehérjék aktivitásai a monomer-filamentum átalakulást katalizálhatják, ami a fluoreszcensen jelölt aktin méretnövekedése miatt az anizotrópia növekedését eredményezheti. Ez jelen esetben mérési artefakt; nem a vizsgálni kívánt kölcsönhatást, a SALS-WH2 monomerekhez való kötődését tükrözi. Így az aktin monomer formában tartása érdekében méréseink során a G-aktinhoz Latrunculin A-t (4 μM, LatA) adtunk. A LatA : G-aktin komplex disszociációs egyensúlyi állandója (K<sub>D</sub> = 0.2 μM), a G-aktin (1 μM) és a LatA (4 μM) koncentrációja alapján a monomerek ~ 95%-a volt kötött formában, azaz a szabad G-aktin koncentrációját ~ 50 nM-nak becsültük. Ez a szöges vég kritikus koncentrációjánál alacsonyabb (c<sub>c</sub>(+) ~ 70 – 100 nM), így polimerizáció nem következik be [64, 65]. Vizsgálatainkban az anizotrópia SALS-WH2 koncentrációjától függő növekedését tapasztaltunk mindkét fluorofór esetén, ami a SALS-WH2

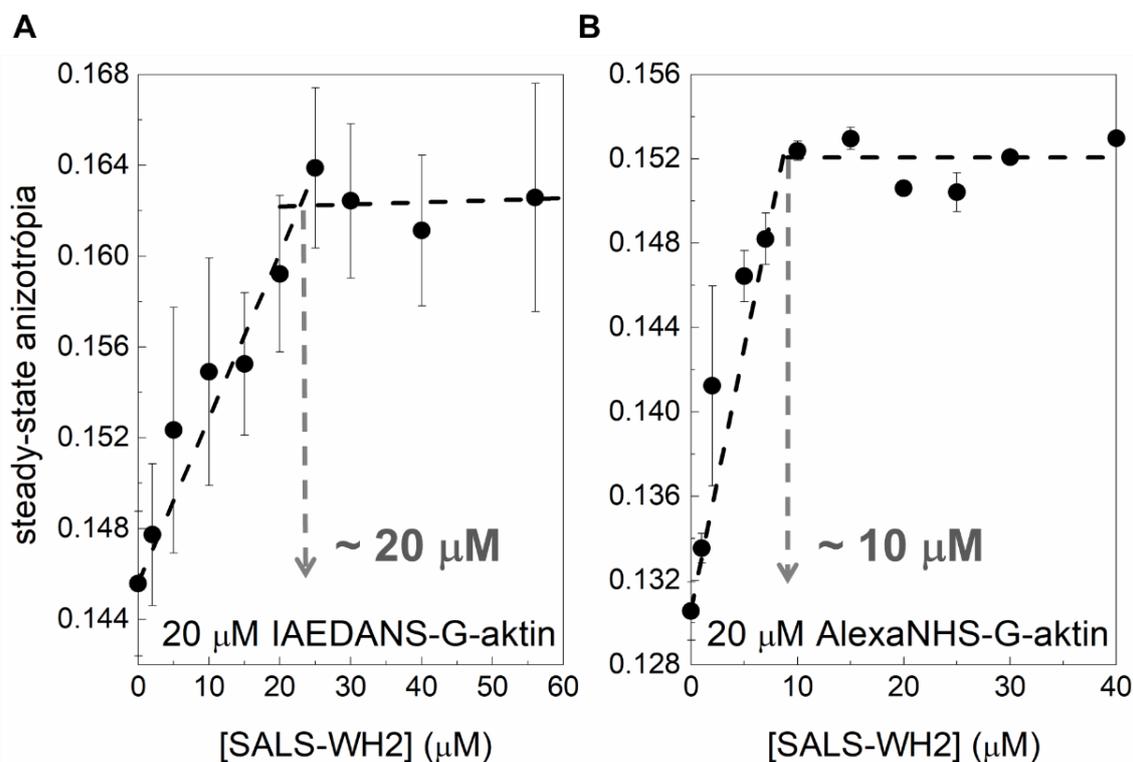
G-aktinnal kialakított kölcsönhatására utal (13. ábra). Az adatok illesztéséből (1c egyenlet) a SALS-WH2 : G-aktin komplex disszociációs egyensúlyi állandója ( $K_D$ ) mindkét esetben  $\sim 0.4 \mu\text{M}$ -nak adódott, összhangban a spektrumanalízis során kapott eredménnyel (11. C ábra).



**13. ábra.** (A) IAEDANS-G-aktin és (B) Alexa488NHS-G-aktin steady-state anizotrópiája SALS-WH2 hiányában és jelenlétében.  $[\text{IAEDANS-G-aktin}] = 1 \mu\text{M}$ ,  $[\text{Alexa488NHS-G-aktin}] = 1 \mu\text{M}$ ,  $[\text{LatA}] = 4 \mu\text{M}$ . A szaggatott vonalak az illesztett görbékét jelzik (1c egyenlet). Az illesztésekből megállapított disszociációs egyensúlyi állandók:  $K_D = 0.48 \pm 0.2 \mu\text{M}$  (IAEDANS-G-aktin) és  $K_D = 0.34 \pm 0.2 \mu\text{M}$  (AlexaNHS488-G-aktin). Átlag  $\pm$  SD,  $n = 2 - 3$ .

Mind a fluoreszcencia emisszió, mind pedig az anizotrópián alapuló vizsgálatok eredményei arra engednek következtetni, hogy a SALS-WH2 képes direkt kölcsönhatást kialakítani az aktin monomerekkel. Tekintve, hogy a konstrukt két WH2 doménnel rendelkezik a továbbiakban a komplex sztöchiometriájának meghatározására irányuló vizsgálatokat végeztünk. A sztöchiometriai mérésekben az IAEDANS és Alexa488NHS jelölt G-aktin koncentrációját úgy választottuk meg ( $20 \mu\text{M}$ ), hogy az jóval ( $> 10 \times K_D$ ) meghaladja a komplex disszociációs egyensúlyi állandóját ( $K_D$ ). A titrálás során kapott anizotrópia –  $[\text{SALS-WH2}]$  függvény nem kvadratikussá, inkább lineáris, töréspont felé hajló tendenciát követett (14. ábra). A töréspontot tartozó, a komplex sztöchiometriáját jellemző  $[\text{SALS-WH2}]$  alapján a SALS-WH2 : G-aktin arány IAEDANS jelölt monomerek esetén 1 : 1-nek, míg Alexa488NHS jelölt monomerek alkalmazása esetén 1 : 2-nek adódott (14. ábra). A sztöchiometriai méréseink, összhangban a fluorofórok emissziójának spektrális sajátosságain alapuló

következtetésekkel (11. ábra) arra utalnak, hogy a fluorofór helyzete befolyásolja a SALS WH2 doménjeinek aktinkötését. Figyelembe véve, hogy a Lys<sup>328</sup>-hoz kapcsolt Alexa488NHS, a WH2 domének kötőhelyétől távol a kötést feltételezhetően nem befolyásolja, arra következtettünk, hogy a SALS mindkét WH2 doménje képes egy - egy monomerrel kölcsönhatást kialakítani.



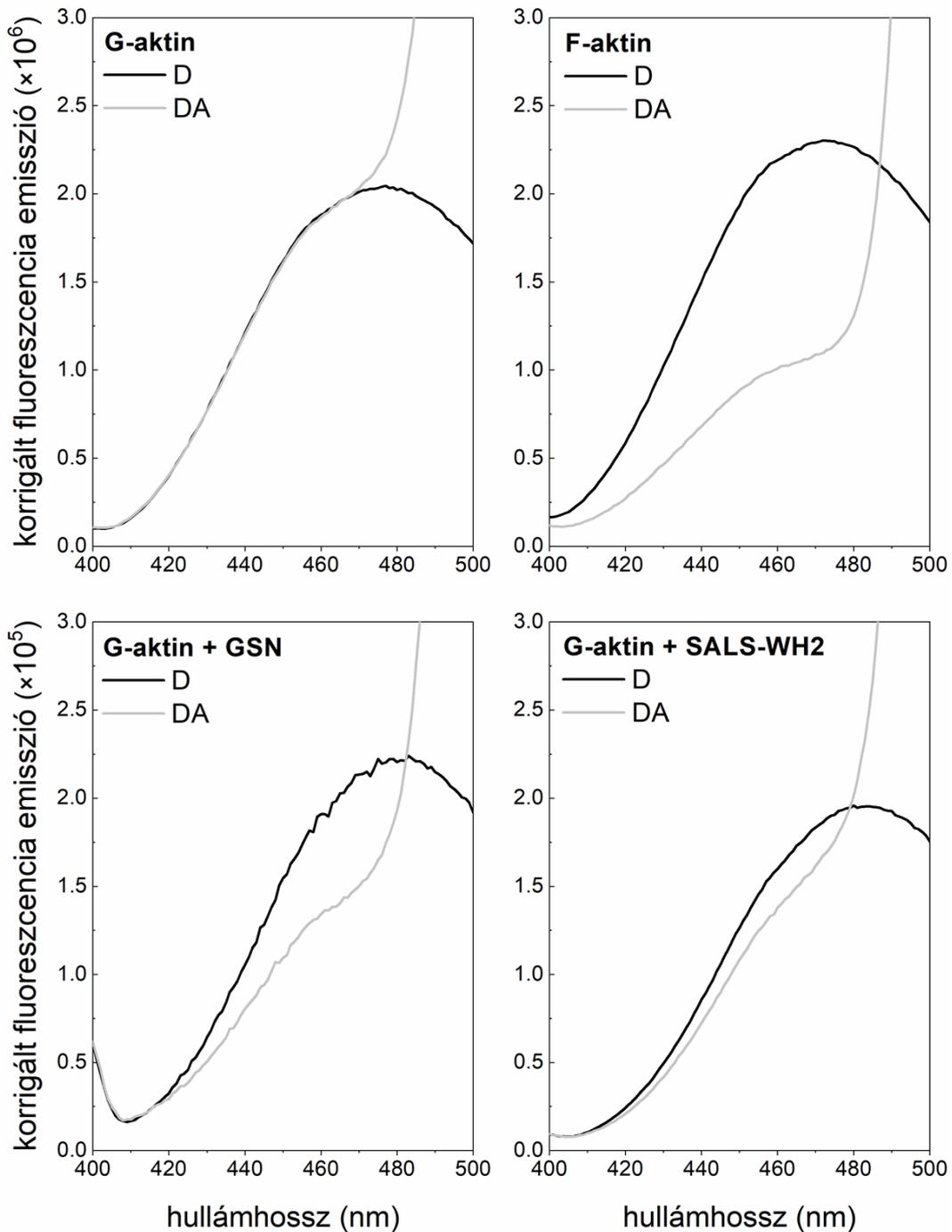
**14. ábra.** (A) IAEDANS-G-aktin és (B) Alexa488NHS-G-aktin steady-state anizotrópiája SALS-WH2 hiányában és jelenlétében. [IAEDANS-G-aktin] = 20 μM, [Alexa488NHS-G-aktin] = 20 μM, [LatA] = 20 μM. *Megjegyzés: a sztöchiometriai mérésekben az adatokra két egyenes illeszthető, amelyek töréspontjai a SALS-WH2 : G-aktin mólarányokról adnak információt; értékük függött az alkalmazott fluorofórtól. Átlag ± SD, n = 2 - 3.*

A komplex sztöchiometriájának további vizsgálatára fluoreszcencia rezonancia energia transzfer (FRET) méréseket végeztünk (15., 16. ábra). A G-aktinhoz kapcsolt IAEDANS (donor), illetve IAF (akceptor) közötti intermonomer FRET hatásfokát (E) határoztuk meg (3b *egyenlet*). Az esszé validálására kontroll méréseket végeztünk eltérő biokémiai környezetben (3. táblázat).

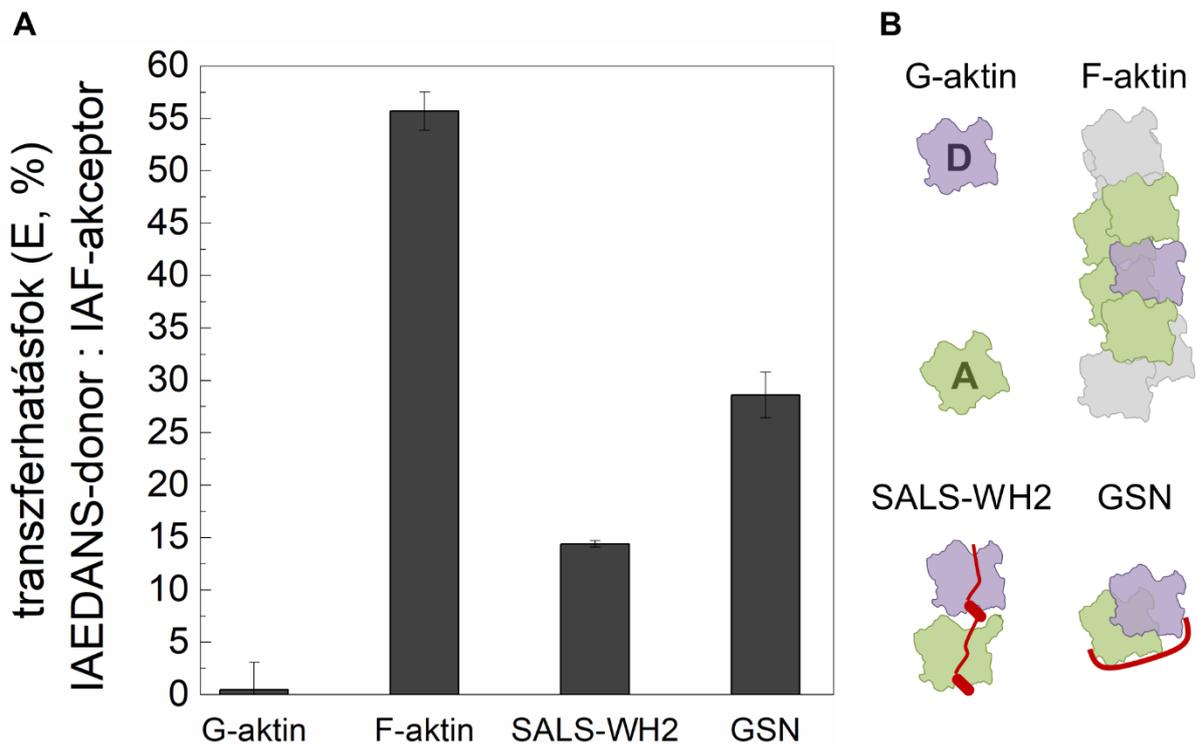
biokémiai környezet	aktin alegység természete
G puffer	monomer forma (G-aktin)
F puffer (G puffer + 50 mM KCl, 1 mM MgCl <sub>2</sub> )	filamentális forma (F-aktin)
gelsolin	dimer forma 1 gelsolin : 2 aktin monomer (GA <sub>2</sub> )

### 3. táblázat. A FRET mérések során alkalmazott biokémiai körülmények.

G pufferben az aktin monomer formában van jelen, így a vártnak megfelelően az energia transzfer hatásfoka ~ 0% volt. F pufferben az aktin jelentős része (a kritikus koncentráció figyelembe vételével ~ 9.9  $\mu$ M, ami 99%-nak felel meg) filamentális formában található, ennek megfelelően viszonylag magas ~ 55%-os intermonomer transzferhatásfokot számoltunk. Egy gelsolin molekula két aktin monomer egyidejű megkötésére képes (GA<sub>2</sub> komplex, dimer forma), nagy affinitású kölcsönhatáson keresztül ( $K_D \sim$  nM) [66, 67]. A GA<sub>2</sub> komplexnek megfelelő transzferhatásfok ~ 28%-nak adódott. SALS-WH2 (10  $\mu$ M) jelenlétében a transzferhatásfok ~ 14% volt. Ez elmarad a GA<sub>2</sub> komplex esetén mért értéktől, de szignifikánsan nagyobb, mint a monomerre jellemző transzferhatásfok. Az alacsonyabb hatásfokot több tényezőnek tudhatjuk be; egyrészt a méréseinkben alkalmazott fehérjekoncentrációk mellett az aktin mintegy 8%-a alkotott komplexet a SALS WH2 doménjeivel (nagyobb [SALS-WH2] beállítására a törzsoldat koncentrációja és a mintatérfogat miatt nem volt lehetőség). Ugyanakkor az alkalmazott fluorofórok a G-aktin Cys<sup>374</sup>-es aminosavához kapcsolódva is befolyásolhatták a SALS-WH2 kölcsönhatást. Másrészt az alacsonyabb hatásfok magyarázható azzal is, hogy a SALS WH2 doménjei között egy viszonylag hosszú (16 aminosav) linker régió található. Ennek következtében a SALS-WH2 által kötött aktin monomerek más orientációban/pozícióban lehetnek, mint a gelsolin : aktin komplex esetén, ami a donor-akceptor távolságot és így a transzferhatásfokot befolyásolhatja (16. B ábra). A fenti fluoreszcencia spektroszkópai eredményeink alapján feltételezzük, hogy a SALS-WH2 két aktin monomerrel alakít ki kölcsönhatást.



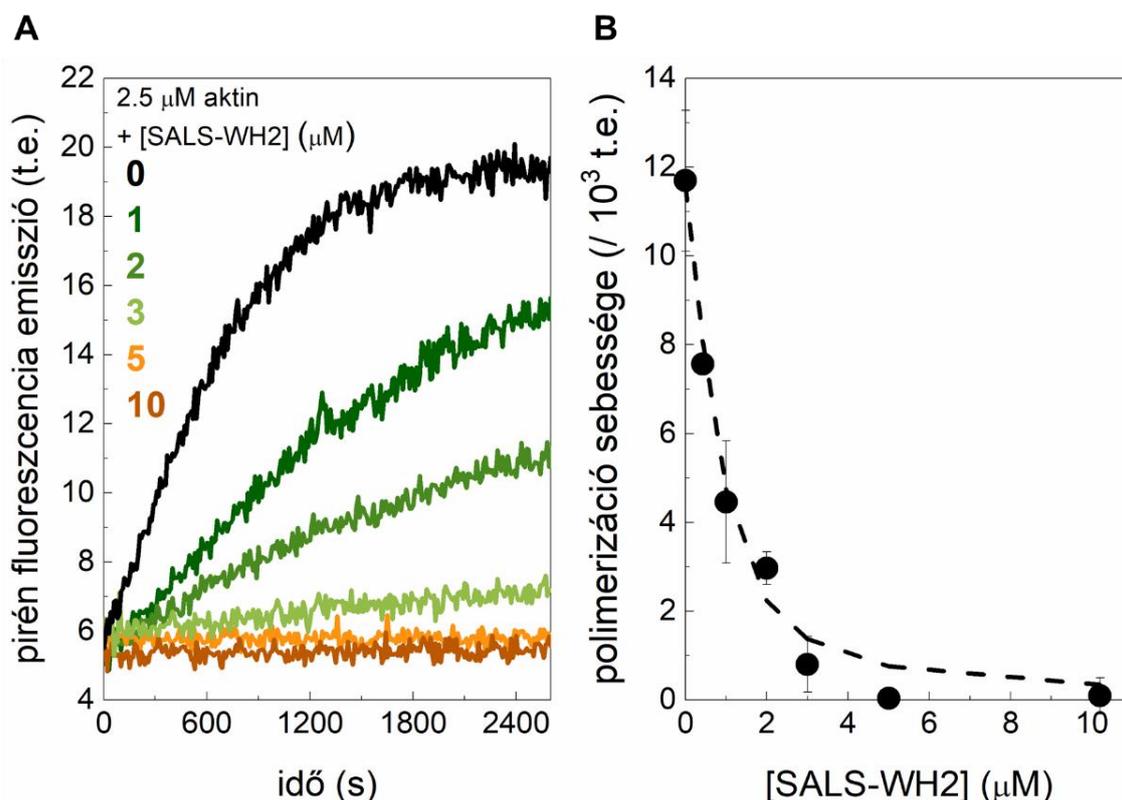
**15. ábra.** IAEDANS-G-aktin (donor) fluoreszcencia emissziója IAF-G-aktin (akceptor) hiányában (D) és jelenlétében (DA). Körülmények: G-aktin - G puffer (aktin monomer), F-aktin - F puffer (aktin filamentum), GSN - gelsolin (5  $\mu\text{M}$ ,  $\text{GA}_2$  komplex), SALS-WH2 (10  $\mu\text{M}$ , SALS-WH2 : G-aktin komplex). [IAEDANS-G-aktin] = 1  $\mu\text{M}$ , [G-aktin] = 9  $\mu\text{M}$ /[IAF-G-aktin] = 9  $\mu\text{M}$ .



**16. ábra.** (A) IAEDANS-G-aktin (donor) és IAF-G-aktin (akceptor) közötti FRET hatásfoka (E) az egyes körülmények között. Az energiáttranszfer hatásfokát a 15. ábrán bemutatott adatokból származtattuk (3b egyenlet). Átlag  $\pm$  SD,  $n = 2 - 3$ . (B) A donor (D) és az akceptor (A) jelölt aktin monomerek elhelyezkedésének sematikus ábrája a különböző kísérleti körülmények között.

#### 4.1.2. A SALS WH2 doménjei gátolják az aktin monomerek filamentumba épülését

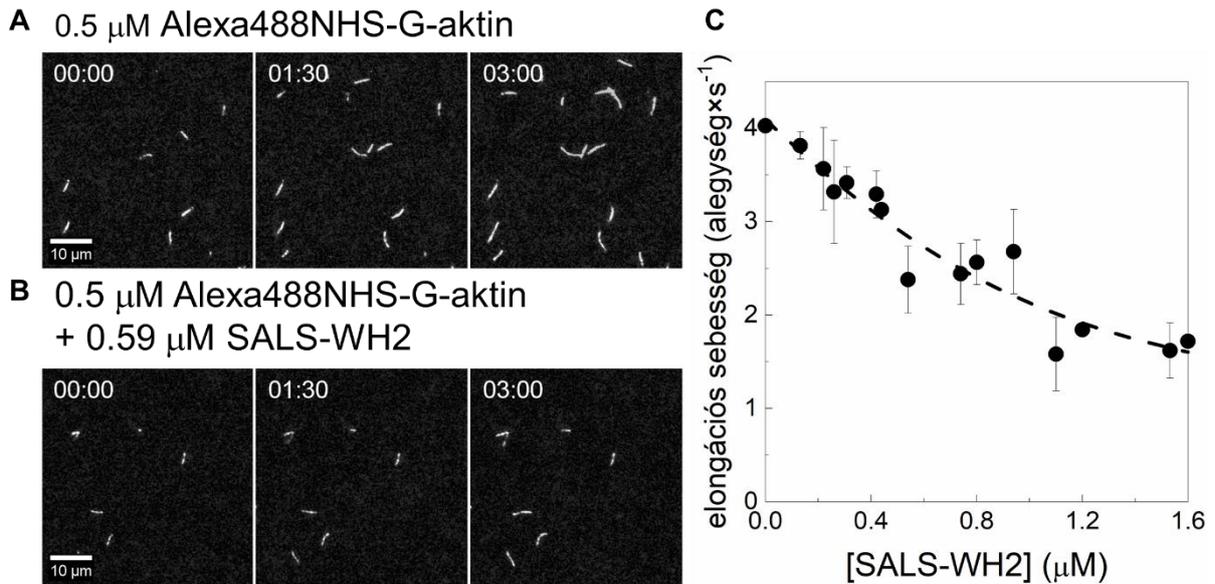
A SALS fehérjével kapcsolatos *in vivo* vizsgálatok azt a hipotézist vetették fel, hogy a fehérje elősegíti a szarkomerikus vékony filamentumok elongációját a hegyes végen [16, 20]. A hipotézis tesztelésére a SALS WH2 doménjeinek, mint aktinkötő régióknak a hatásait vizsgáltuk a filamentumok összeszerelődésére. A polimerizáció kinetikáját pirén jelölt aktin ( $2.5 \mu\text{M}$ , 5% pirén jelölt) alapú fluoreszcencia spektroszkópiai mérésekben követtük nyomon SALS-WH2 hiányában és jelenlétében. A SALS-WH2 koncentrációfüggő módon gátolta a filamentumképződést (17. A ábra). A pirén transziensekből meghatározott polimerizációs sebességet ( $v$ , a kezdeti lineáris 0 - 500 s-os szakaszra illesztett egyenes meredeksége) a [SALS-WH2] függvényében ábrázolva a féltelítési koncentráció  $IC_{50} = 0.30 \pm 0.1 \mu\text{M}$ -nak adódott (17. B ábra, 4. egyenlet). Ez az érték közel azonos a steady-state fluoreszcencia spektroszkópiai mérésekben meghatározott  $K_D$  értékkel (11., 13. ábra), ami arra utal, hogy a SALS-WH2 polimerizációt gátló hatása a monomerekkel kialakított kölcsönhatásán alapul.



**17. ábra.** (A) Pirén jelölt aktin fluoreszcencia emissziójának időbeli változása SALS-WH2 hiányában és jelenlétében. [pirén-aktin] = 2.5 μM (5% pirén jelölt). (B) A kezdeti polimerizációs sebesség a [SALS-WH2] függvényében. A szaggatott vonal az adatokra illesztett görbét jelöli (4. egyenlet). Az illesztés alapján a féltelítési koncentráció  $IC_{50} = 0.30 \pm 0.1 \mu\text{M}$ -nak adódott. Átlag  $\pm$  SD, n = 2 - 3.

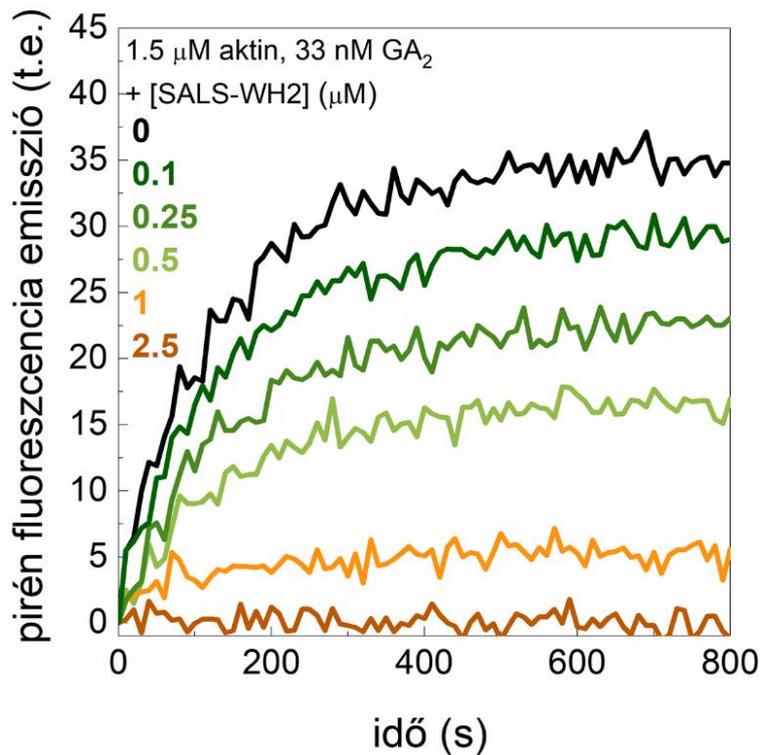
A SALS-WH2 polimerizációra kifejtett hatását egyedi aktin filamentumokon TIRFM segítségével is megvizsgáltuk (18. ábra). Kontroll mérésekben, SALS-WH2 hiányában a spontán módon képződő filamentumok elongációs sebessége  $v = 4.1 \pm 0.5 \text{ alegység} \times \text{s}^{-1}$ -nak adódott. Figyelembe véve a kritikus koncentrációt ( $c_c = 0.15 \mu\text{M}$ ) (20. ábra), valamint a teljes aktin koncentrációt ( $[G_0] = 0.5 \mu\text{M}$ ) ez az érték megfelel a monomerek filamentumba épülését jellemző asszociációs sebességi állandónak a szöges végen ( $k_+ \sim 11 \mu\text{M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$ ) (6. egyenlet) [12-14]. A SALS-WH2 koncentrációfüggő módon gátolta a filamentumok elongációját, a féltelítési koncentráció  $IC_{50} \sim 0.4 \mu\text{M}$ -nak adódott, összhangban a fluoreszcencia spektroszkópiai kísérleteinkkel (18. C ábra). Ugyan kvantitatív elemzést nem végeztünk, de a TIRFM felvételek arra utalnak, hogy a SALS-WH2 jelenlétében nem csak a filamentumok hossza változott, de számuk is csökkent (18. A, B ábra). Eredményeink arra engednek következtetni, hogy a SALS WH2 doménjei gátolják mind az aktin filamentumok nukleációját, mind pedig azok elongációját. A SALS-WH2 polimerizációt gátló aktivitása így ellentétes a teljes hosszúságú fehérje feltételezett, filamentum összerelődést elősegítő aktivitásával [16, 20].





**18. ábra.** (A, B) Alexa488NHS jelölt aktin összeszerelődéséről TIRFM technikával készült videó montázs képei (A) SALS-WH2 hiányában és (B) annak jelenlétében (0.59  $\mu\text{M}$ ). [Alexa488NHS-aktin] = 0.5  $\mu\text{M}$  (10% Alexa488NHS jelölt). Méretarány = 10  $\mu\text{m}$ , idő = min : s, LUT: gray. (C) A TIRFM kísérletekből származtatott elongációs sebesség a [SALS-WH2] függvényében. A szaggatott vonal az adatokra illesztett görbét jelöli (4. egyenlet). Az illesztés alapján a féltelítési koncentráció  $\text{IC}_{50} = 0.38 \pm 0.3 \mu\text{M}$ -nak adódott. Átlag  $\pm$  SD,  $n = 2 - 3$ .

Tekintve az alkalmazott aktin koncentrációt (0.5  $\mu\text{M}$ ) és a filamentumvégek kritikus koncentrációját ( $c_c = 0.15 \mu\text{M}$ ) a fenti vizsgálataink jellemzően a szöges végek kinetikai paramétereiről adnak információt. Éppen ezért a SALS-WH2 polimerizációra kifejtett hatásait a filamentum hegyes végére szelektíven is megvizsgáltuk. A fluoreszcencia spektroszkópián alapuló kinetikai méréseinkben a polimerizációt gelsolin-aktin magokról (1 gelsolin : 2 G-aktin,  $\text{GA}_2$  komplex) indukáltuk (19. ábra). Ismert, hogy a gelsolin a filamentumok szöges végéhez kötődve, azt sapkázva gátolja a monomerek beépülését, így  $\text{GA}_2$  jelenlétében a monomerek asszociációja kizárólag a hegyes végen történik [24, 67]. Eredményeink szerint a SALS-WH2 koncentrációfüggő módon gátolta a filamentumok hegyes vég polimerizációját is (19. ábra). Mindez arra utal, hogy a SALS izolált WH2 doménjei nem elégségesek a hegyes végen történő filamentum összeszerelődés elősegítéséhez.



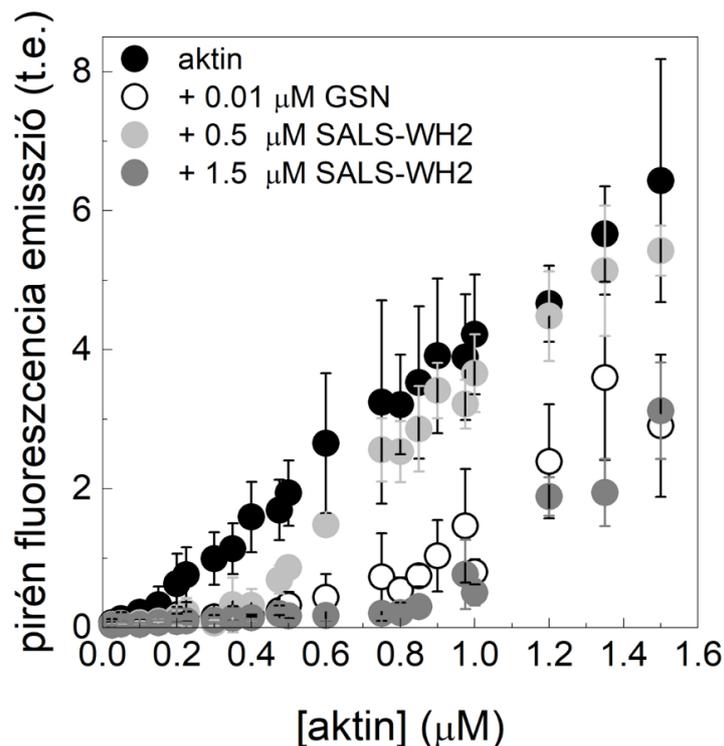
**19. ábra.** Pirén jelölt aktin fluoreszcencia emissziójának időbeli változása SALS-WH2 hiányában és jelenlétében. [pirén-aktin] = 1.5  $\mu\text{M}$  (5% pirén jelölt), [ $\text{GA}_2$ ] = 33 nM.

#### 4.1.2.1. A SALS WH2 doménjei szekvesztráló aktivitással rendelkeznek

A SALS-WH2 polimerizációra kifejtett gátló hatása eredhet a monomerekkel kialakított kölcsönhatásán alapuló szekvesztráló aktivitásából és/vagy a filamentumokkal kialakított kölcsönhatásán alapuló szögcsapódásból. A szekvesztráció során a SALS-WH2 : G-aktin komplex 'nempolimerizáló', azaz nem képes filamentumokba épülni; sem a szögcsapódás, sem pedig a hegyes végen. A szekvesztráció eredményeként, biokémiai megfontolások alapján, a steady-state G-aktin koncentráció a szabad G-aktin (kritikus koncentráció,  $c_c$ ) és a szekvesztrált monomerek ([SA]) mennyiségének összege; ez utóbbit a S : A komplexet jellemző disszociációs egyensúlyi állandó ( $K_D$ ) és a szekvesztráló fehérje koncentrációja ( $[S_0]$ ) határozza meg (5. egyenlet). A szögcsapódás révén a SALS-WH2 a filamentumvéghez kötődve gátolhatja a monomerek asszociációját és disszociációját. Hasonlóan a szekvesztráló aktivitáshoz, ez is a steady-state G-aktin koncentráció változásával járhat, de a filamentumvégek kritikus koncentrációja ( $c_c$ ) által meghatározott módon. A fenti megfontolások nyomán, a SALS-WH2 aktivitásának háttérben álló mechanizmus tisztázása érdekében a steady-state monomer : filamentum arányt mértük fluoreszcencia spektroszkópiai és szedimentációs kísérletekben.

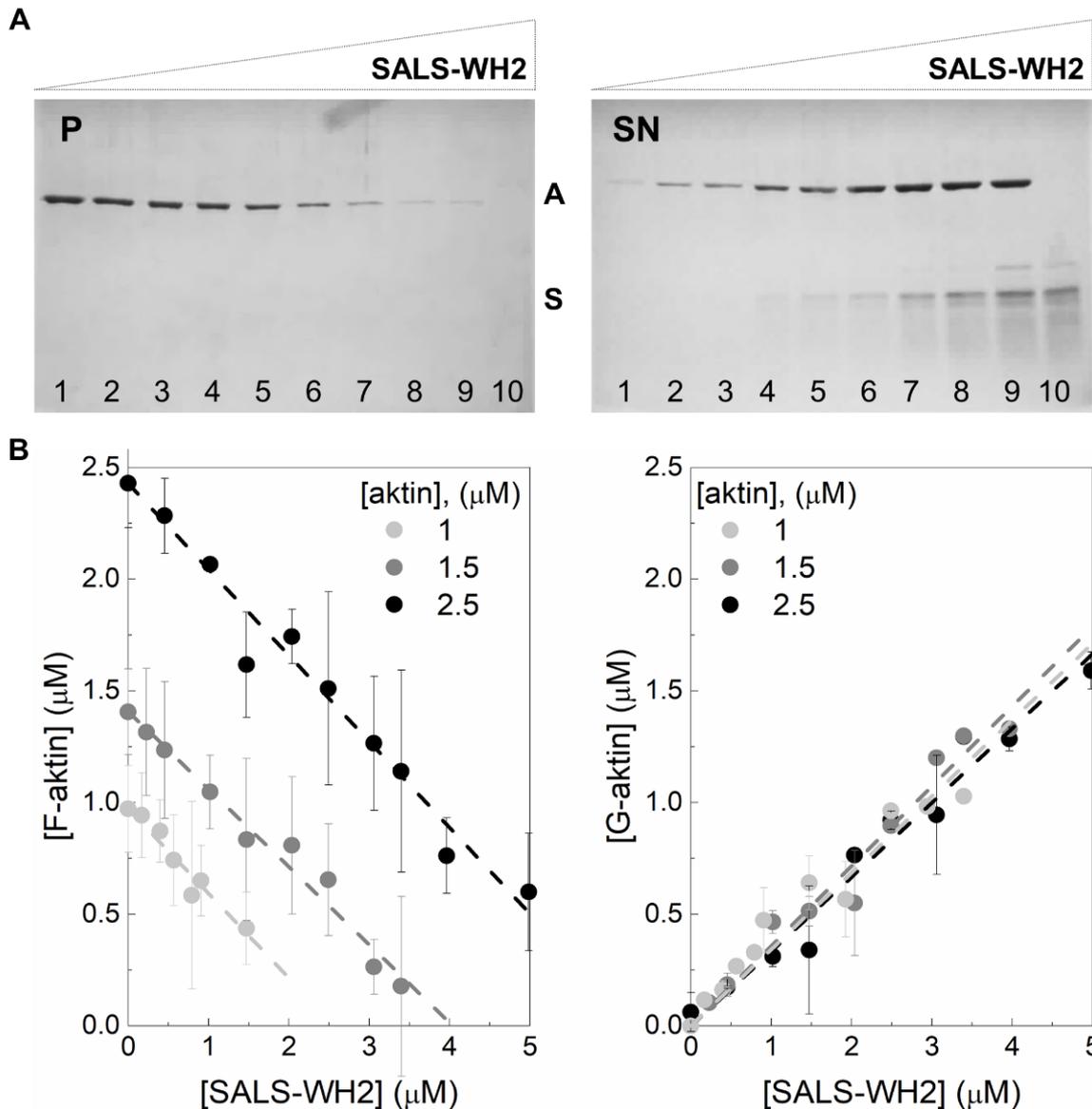
A SALS-WH2 filamentumvég dinamikára kifejtett hatását kritikus koncentráció mérésekben vizsgáltuk (20. ábra). Aktint (5% pirén jelölt) polimerizáltunk növekvő

koncentrációban SALS-WH2 hiányában és jelenlétében. A pirén fluoreszcencia emissziót mértük és ábrázoltuk az [aktin] függvényében ( $J(c)$  ábrázolás, 20. ábra). A  $J(c)$  ábrázolás karakterisztikus töréspontjához tartozó aktin koncentráció a steady-state 'nempolimerizált' aktin mennyiségének felel meg. Ez a steady-state szabad G-aktin (kritikus koncentráció,  $c_c$ ) és a szabályozó fehérjék által kötött ( $[SA]$ ), szekvesztrált monomerek mennyiségének összegéből tevődik össze. A SALS-WH2 hiányában a töréspont a jellemzően a szögcs vég által dominált spontán dinamikára karakterisztikus kritikus koncentrációnak felelt meg, ami  $c_{c(+)} \sim 0.15 \mu\text{M}$  volt (20. ábra) [12-14]. A filamentumok szögcs végét sapkázó gelsolin jelenlétében a töréspont a hegyes vég dinamikáját jellemző kritikus koncentráció, azaz nagyobb aktin koncentrációk felé tolódott:  $c_{c(-)} \sim 0.6 \mu\text{M}$  (20. ábra) [67]. SALS-WH2 jelenlétében ( $0.5 \mu\text{M}$  vagy  $1.5 \mu\text{M}$ ) a  $J(c)$  ábrázolás párhuzamosan futott a spontán dinamikát jellemző adatsorral, azonban a töréspont  $\sim 0.3 \mu\text{M}$ , illetve  $\sim 0.8 \mu\text{M}$ -nál jelent meg (20. ábra). A steady-state G-aktin koncentráció ezen értékei összhangban vannak a szögcs vég kritikus koncentrációjával ( $c_{c(+)} \sim 0.15 \mu\text{M}$ ), a SALS-WH2 : G-aktin disszociációs egyensúlyi állandójával ( $K_D \sim 0.4 \mu\text{M}$ ), valamint a SALS koncentrációjával ( $[S_0] = 0.5 \mu\text{M}$ , illetve  $[S_0] = 1.5 \mu\text{M}$ ) (5. egyenlet). Érdemes megjegyezni, hogy a szögcs végek sapkázása esetén a hegyes végre jellemző kritikus koncentrációt ( $c_{c(-)} \sim 0.6 \mu\text{M}$ ) feltételezve a fenti megfontolások alapján (5. egyenlet) a töréspontok lényegesen nagyobb aktin koncentrációknak feleltek volna meg ( $\sim 0.9 \mu\text{M}$  és  $\sim 1.5 \mu\text{M}$ ). Ez a megfigyelés arra utal, hogy a SALS-WH2 jelenlétben a 'nempolimerizált' aktin mennyisége a fehérje szekvesztráló aktivitása és nem a szögcs végek sapkázása révén növekedett.



**20. ábra.** A pirén jelölt aktin fluoreszcencia emissziója az aktin koncentráció függvényében; aktinkötő fehérjék hiányában, valamint gelsolin és SALS-WH2 jelenlétében. [GSN] = 0.01  $\mu$ M, [SALS-WH2] = 0.5  $\mu$ M és 1.5  $\mu$ M. Átlag  $\pm$  SD, n = 2 - 3.

A szekvesztráló aktivitás további alátámasztására koszedimentációs vizsgálatokat végeztük (21. ábra). Aktin filamentumokat (1, 1.5 és 2.5  $\mu$ M) inkubáltunk SALS-WH2-vel, a mintákat ultracentrifugáltuk majd az üledék (P) és a felülúszó (SN) fehérjetartalmát SDS-PAGE segítségével elemeztük. Az üledékben lévő aktin (F-aktin) mennyisége csökkent, míg ezzel párhuzamosan a felülúszóban lévő aktin (monomerek és/vagy kisebb oligomerek) mennyisége növekedett a SALS-WH2 koncentrációjának növelésével (21. A ábra). A pelletben és a felülúszóban lévő aktin mennyiségét a [SALS-WH2] függvényében ábrázolva párhuzamos lefutású lineáris tendenciát figyeltünk meg mindhárom aktin koncentráción (21. B ábra). Az illesztett egyenesek meredekségének abszolút értéke ( $\frac{c_c}{c_c + K_D}$ , 5. egyenlet)  $0.36 \pm 0.02$ -nak adódott, ami összhangban van az eddigi kísérleti eredményekből számolt SALS-WH2 : G-aktin komplex disszociációs egyensúlyi állandójával ( $K_D \sim 0.4 \mu$ M) és a szöges végek kritikus koncentrációjával ( $c_{c(+)} \sim 0.15 \mu$ M) (5. egyenlet). Eddigi következtetéseinkkel összhangban a szedimentációs vizsgálatok eredményei arra utalnak, hogy a SALS-WH2 polimerizációra kifejtett gátló hatása nem a filamentum végek sapkázásával, hanem a monomerekkel kialakított kölcsönhatásán alapuló szekvesztráló aktivitásával magyarázható.

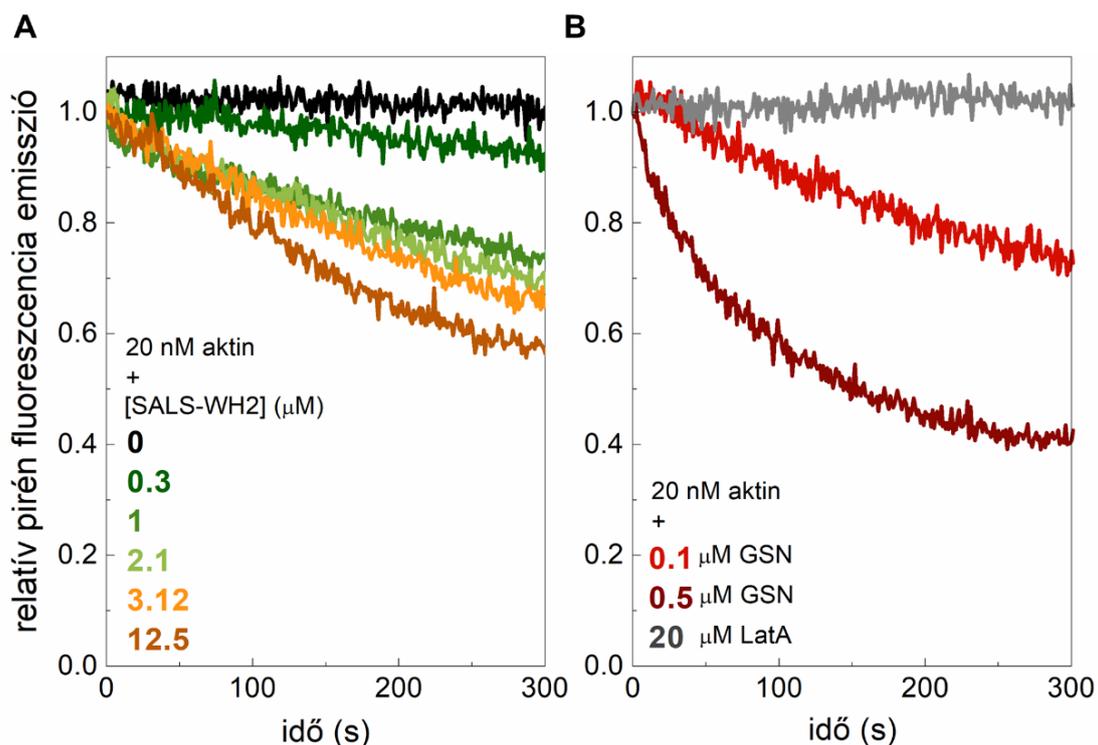


**21. ábra.** (A) Ultracentrifugáláson alapuló koszedimentációs módszer segítségével szétválasztott minták üledék (P) és felülúszó (SN) fehérjetartalmának megjelenítése *Coomassie blue*-val festett SDS-poliakrilamid gélen (10%-os). [aktin] = 2.5  $\mu\text{M}$  (1–9 sor) és 0  $\mu\text{M}$  (10. sor), [SALS-WH2] = 0, 1, 2, 2.8, 4.2, 5, 6, 9, 12  $\mu\text{M}$  (1–9 sor) és 12  $\mu\text{M}$  (10. sor). A: aktin, S: SALS-WH2. (B) Az SDS-PAGE analízisből származtatott F-aktin és G-aktin steady-state mennyisége a [SALS-WH2] függvényében. [aktin] = 1, 1.5 és 2.5  $\mu\text{M}$ . A megfelelő színű szaggatott vonalak a pontokra illesztett egyeneseket jelzik. meredekségük abszolút értékeinek átlaga  $|0.36| \pm 0.02$ -nek adódott. Átlag  $\pm$  SD, n = 2 - 3.

#### 4.1.3. A SALS WH2 doménjei elősegítik az aktin filamentumok szétszerelődését

Míg az aktin monomerekkel izolált WH2 domének is kölcsönhatnak, addig a több aktinkötő hellyel rendelkező WH2 domén fehérjék – például tandem módon szerveződő WH2 domének, vagy a WH2 doménekkal szomszédos aktinkötő régiók révén – képesek a filamentumok oldalával is kölcsönhatást kialakítani (6. ábra). Ennek funkcionális következménye lehet a filamentum szerkezetét stabilizáló longitudinális kapcsolatok

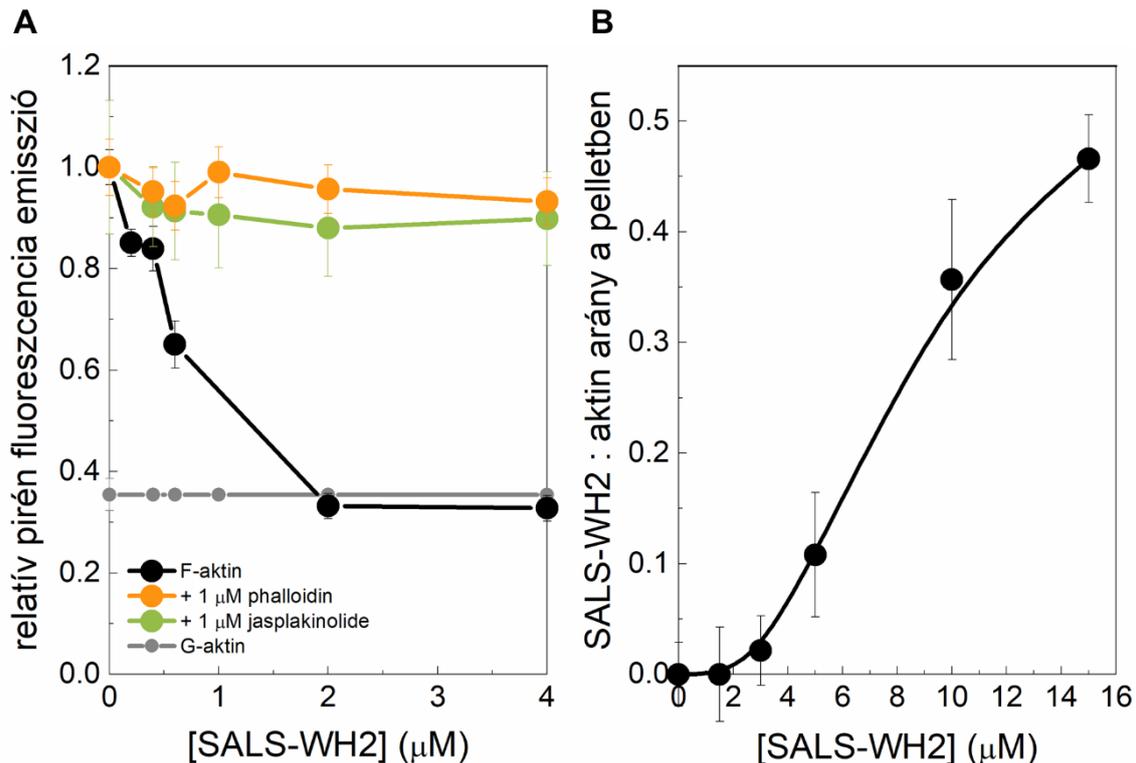
gyengülése, ami a filamentumok destabilizációját és fragmentációját eredményezi (*severing* aktivitás) [17]. A SALS WH2 doménjeinek *severing* aktivitását hígítás indukálta depolimerizációs kísérletekben vizsgáltuk. Aktin filamentumokat (50% pirén jelölt) a kritikus koncentráció alá (20 nM) hígítva a pirén fluoreszcencia emissziójának csökkenésén keresztül a spontán depolimerizáció kinetikáját követhetjük nyomon, amit a disszociációs sebességi állandók alapján a szöges vég dominál (22. *ábra*). Eredményeink szerint a SALS-WH2 koncentrációfüggő módon elősegítette az aktin filamentumok szétszerelődését (22. *A ábra*). Kontrollként LatA (szekvesztráló aktivitás) és gelsolin (*severing* aktivitás) jelenlétében is elvégeztük méréseinket (22. *B ábra*). A LatA csak szekvesztráló tulajdonsággal bír, így aktív módon nem képes elősegíteni a filamentumok szétszerelődését [64]. Ezzel szemben a gelsolin a *severing* aktivitása révén az aktin filamentumok depolimerizációját katalizálja [67]. Mérési eredményeink megfelelnek a LatA és a gelsolin aktivitásai alapján várt depolimerizációs kinetikának (22. *B ábra*). A SALS-WH2 hatásának nagyságrendje alapján arra következtettünk, hogy a SALS-WH2 képes az aktin filamentumok szerkezetét destabilizálni, azok depolimerizációját aktívan elősegíteni. Így a szekvesztráló aktivitása mellett *severing* tulajdonsággal is rendelkezik.



**22. ábra.** (A) Az aktin filamentumok szétszerelődésének kinetikája SALS-WH2 hiányában és jelenlétében. [pirén-aktin] = 0.02 μM (50% pirén jelölt). (B) Kontroll: az aktin filamentumok szétszerelődésének kinetikája [LatA] = 20 μM, vagy [GSN] = 0.1 μM és 0.5 μM jelenlétében.

#### 4.1.4. A SALS-WH2 kötődik az aktin filamentumok oldalához

A *severing* aktivitás a WH2 domének közvetlen filamentum oldalkötését feltételezi, a továbbiakban erre vonatkozó vizsgálatokat végeztünk. Elsőként a SALS-WH2 hatását a monomer : filamentum arányra steady-state fluoreszcencia spektroszkópiai kísérletekben vizsgáltuk (2.5  $\mu$ M, 5% pirén jelölt). Méréseinkben a steady-state pirén fluoreszcencia emisszió csökkenését tapasztaltuk a SALS-WH2 koncentrációjától függő módon, ami – fenti eredményeinkkel összhangban – arra utal, hogy a SALS-WH2 aktin aktivitásai révén a monomer : filamentum arány a monomer irányába tolódik el (23. A ábra). Kísérleteinket phalloidin-, vagy jasplakinolide-stabilizált aktin filamentumokkal elvégezve ez az effektus nem volt megfigyelhető, ami arra utal, hogy a toxinok a SALS-WH2 hatását negatívan befolyásolják (23. A ábra). Ezt az eredményt kihasználva koszedimentációs módszerrel vizsgáltuk a SALS-WH2 filamentum oldalkötő képességét. Kontroll kísérleteink alapján a SALS-WH2 nem pelletálódik aktin hiányában (21. A ábra, 10. sor). Ugyanakkor phalloidin-stabilizált F-aktin (1  $\mu$ M) jelenlétében a SALS-WH2 koncentrációfüggő módon megjelent a pelletben, ami arra utal, hogy a SALS-WH2 közvetlenül képes a filamentumokhoz kötődni. A kvantitatív elemzéshez a pelletek fehérjetartalmát (SALS-WH2 : aktin arány) SDS-PAGE analízis segítségével határoztuk meg és ábrázoltuk a [SALS-WH2] függvényében (23. B ábra). A steady-state fluoreszcencia spektroszkópiai kísérlet eredményéhez hasonlóan (23. A ábra), a szedimentációs kísérletekben nem csökkent a phalloidin-stabilizált aktin filamentumok mennyisége növekvő SALS-WH2 koncentráció mellett (23. B ábra). Fontos megjegyezni, hogy a pelletben megjelenő SALS-WH2 mennyisége magasabb ( $\sim \mu$ M), mint ami a filamentum végkötésnek tulajdonítható ( $\sim$  nM). Ez a SALS-WH2 filamentum oldalkötésére utal. A telítési görbe maximumához tartozó SALS-WH2 : aktin arány  $\sim 0.5$ -nek adódott (23. B ábra). Ez az érték megegyezik a steady-state anizotrópia mérésekben megállapított 1 SALS-WH2 : 2 aktin sztöchiometriával (Alexa488NHS-G-aktin esetén 14. B ábra), ami arra utal, hogy a SALS mindkét WH2 doménje kötődik az aktin filamentumok oldalához. Mindezek alapján arra következtettünk, hogy a SALS WH2 doménjei képesek közvetlenül az aktin filamentumok oldalához kötődni, ami révén elősegítik az aktin filamentumok szétszerelődését, tehát *severing* aktivitással bírhatnak.



**23. ábra.** (A) Pirén jelölt aktin relatív fluoreszcencia emissziója növekvő SALS-WH2 koncentrációk mellett phalloidin, vagy jasplakinolide hiányában és jelenlétében. [F-aktin] = 1  $\mu\text{M}$  (5% pirén jelölt), [phalloidin] = 1  $\mu\text{M}$ , [jasplakinolide] = 1  $\mu\text{M}$ . A G-aktinhoz tartozó relatív pirén fluoreszcencia emissziót szürke teli körök jelölik. (B) A SALS-WH2 : aktin arány a pelletben a [SALS-WH2] függvényében. Az adatok ultracentrifugáláson alapuló koszedimentációs kísérletekből származnak. [F-aktin] = 2.5  $\mu\text{M}$ , [phalloidin] = 2.5  $\mu\text{M}$ . Átlag  $\pm$  SD, n = 2 - 3.

#### 4.2. Aktinkötő fehérjék hatásai a SALS WH2 doménjeinek aktin aktivitásaira

Az irodalomban fellelhető modellek alapján a SALS a szarkomerikus filamentumok hossznövekedését segíti elő a hegyes végen [16, 20]. Eredményeink alapján az izolált tandem WH2 domének ugyan képesek mind az aktin monomerekkel, mind pedig a filamentumokkal kölcsönhatni *in vitro*, de szekvesztráló és *severing* aktivitásaik révén a monomer : filamentum arányt a monomer irányába tolják el, ami a feltételezett *in vivo* funkcióval ellentétes. Hipotézisünk szerint így más aktinkötő fehérjék és/vagy a SALS más régiói alapvetőek a fehérje biológiai funkciójához. A továbbiakban erre vonatkozó vizsgálatokat végeztünk.

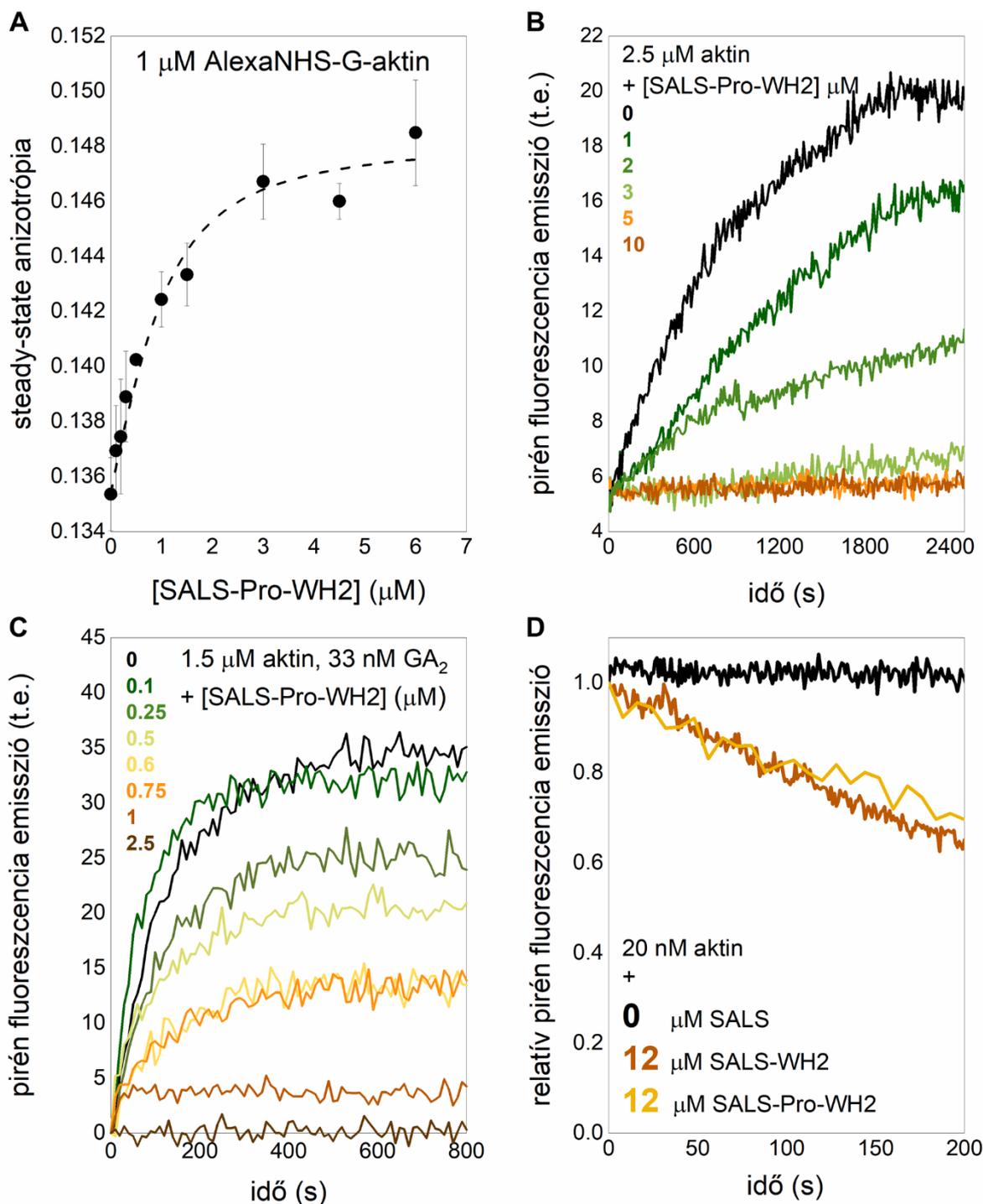
##### 4.2.1. A profilin nincs hatással a SALS-WH2 aktin aktivitásaira

A SALS rendelkezik egy prolin aminosavakban gazdag szakasszal, amely a két WH2 doméntől N-terminális irányban található (7. ábra). A prolin-gazdag régió gyakori motívum aktinkötő fehérjékben; mint például a forminokban, ami az aktinkötő profilinnal biztosíthat kölcsönhatást. Ez által a fehérje aktin dinamikára kifejtett hatása módosulhat [22-24, 59, 68, 69]. A SALS prolin-gazdag régiójának vizsgálata érdekében a WH2 domének mellett a prolin-

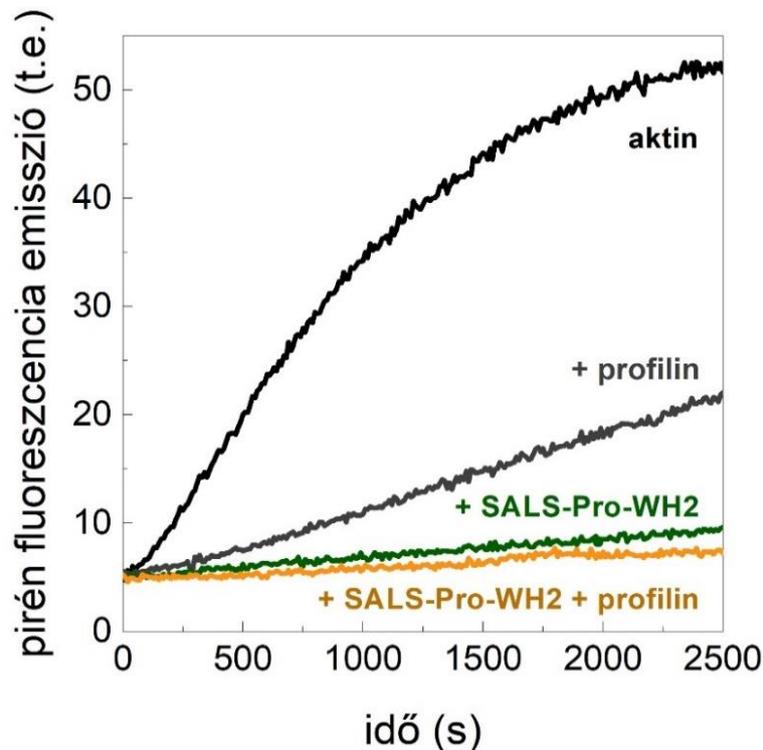


gazdag régiót is tartalmazó konstrukt (SALS-Pro-WH2) biokémiai aktivitásait tanulmányoztuk (7. ábra).

Steady-state anizotrópia (1  $\mu\text{M}$  Alexa488NHS jelölt aktin) és pirén aktin alapú kinetikai mérésekben azt találtuk, hogy profilin hiányában a SALS-Pro-WH2 monomer kölcsönhatása ( $K_D = 0.7 \pm 0.21 \mu\text{M}$ ), az aktin filamentumok össze-, és szétszerelődésére kifejtett hatásai kvalitatív és kvantitatív módon is megegyeztek a SALS-WH2 esetében megfigyelt aktivitásokkal (24. ábra). Eredményeink alapján tehát profilin hiányában a prolin-gazdag régió nem befolyásolja a WH2 domének aktin aktivitásait. A prolin-gazdag régió profilin kötését steady-state anizotrópia kísérletekben vizsgáltuk, Alexa568C5 maleimid jelölt profilin alkalmazásával (2  $\mu\text{M}$ ). Méréseinkben nem tapasztaltunk szignifikáns anizotrópia változást ( $r = 0.15 \pm 0.01$ ) SALS-Pro-WH2 jelenlétében (20  $\mu\text{M}$ ), ami arra utal, hogy a SALS-Pro-WH2 nem hat kölcsön a profilinnal. Funkcionális vizsgálataink alapján a SALS-Pro-WH2 hasonlóan gátolja az aktin monomerek filamentumba épülését profilin jelenlétében, mint annak hiányában (25. ábra). Ezen kísérleti eredmények alapján arra következtettünk, hogy a SALS fehérje prolin-gazdag szakasza nem hat kölcsön a profilinnal és így a profilin nem befolyásolja a WH2 domének eddig leírt hatását az aktin dinamikára.



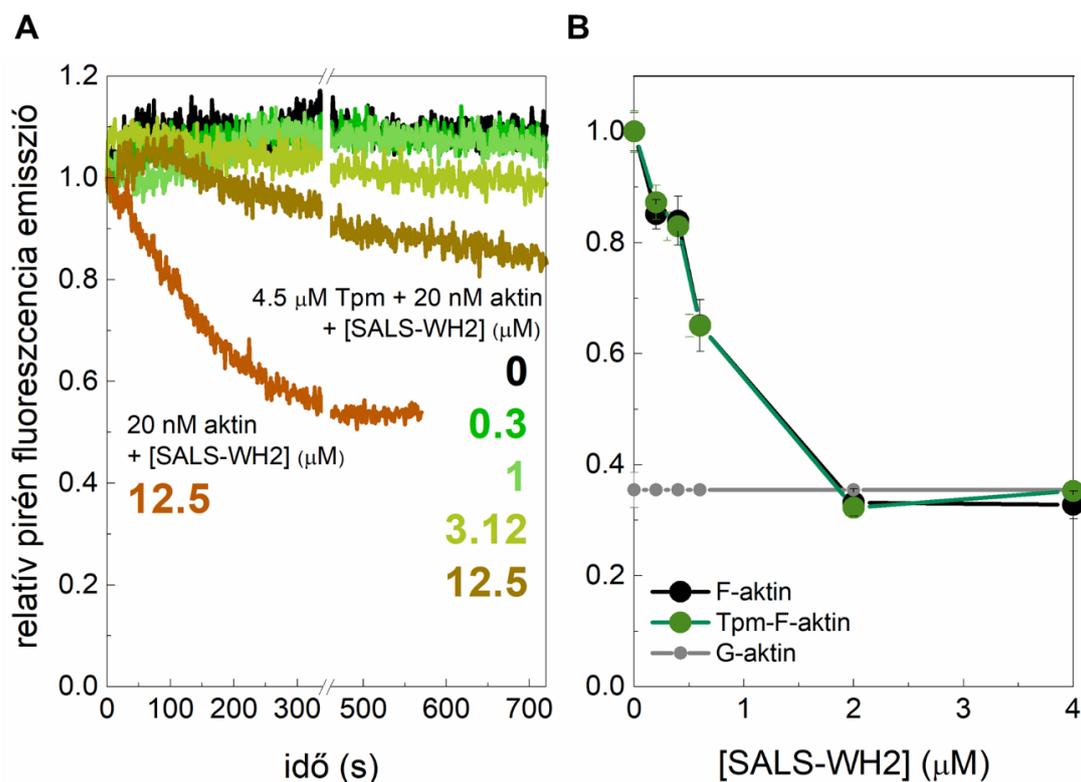
**24. ábra.** (A) Alexa488NHS-G-aktin steady-state anizotrópiája SALS-Pro-WH2 hiányában és jelenlétében. [Alexa488NHS-G-aktin] = 1  $\mu\text{M}$ , [LatA] = 4  $\mu\text{M}$ . A szaggatott vonal az illesztett görbét jelzi (*1c* egyenlet). Az illesztésből megállapított disszociációs egyensúlyi állandó  $K_D = 0.4 \pm 0.2 \mu\text{M}$ -nak adódott. Átlag  $\pm$  SD,  $n = 2 - 3$ . (B) Pirén jelölt aktin fluoreszcencia emissziójának időbeli változása SALS-Pro-WH2 hiányában és jelenlétében. [pirén-aktin] = 2.5  $\mu\text{M}$  (5% pirén jelölt). (C) Pirén jelölt aktin fluoreszcencia emissziójának időbeli változása SALS-Pro-WH2 hiányában és jelenlétében. [pirén-aktin] = 1.5  $\mu\text{M}$  (5% pirén jelölt), [ $\text{GA}_2$ ] = 33 nM. (D) Az aktin filamentumok szétszerelődésének kinetikája SALS-WH2/SALS-Pro-WH2 hiányában és jelenlétében. [pirén-aktin] = 0.02  $\mu\text{M}$  (50% pirén jelölt), [SALS-WH2/SALS-Pro-WH2] = 12  $\mu\text{M}$ .



**25. ábra.** Pirén jelölt aktin fluoreszcencia emissziójának időbeli változása profilin és/vagy SALS-Pro-WH2 hiányában és jelenlétében. [pirén-aktin] = 2.5  $\mu$ M (5% pirén jelölt), [profilin] = 7.3  $\mu$ M, [SALS-Pro-WH2] = 6.1  $\mu$ M.

#### 4.2.2. A tropomiozin befolyásolja a SALS-WH2 severing aktivitását

A szarkomer aktin alapú vékony filamentumainak funkcionalitásában a tropomiozin meghatározó szerepet játszik. Kísérleteinkben így megvizsgáltuk, hogy a tropomiozin befolyásolja-e a SALS-WH2 aktin filamentumokkal kialakított kölcsönhatásait. Hígítás indukálta depolimerizáción alapuló kinetikai mérésekben azt tapasztaltuk, hogy a SALS-WH2 kevésbé hatékonyan képes a Tpm-kötött aktin filamentumok (Tpm : F-aktin) szétszerelődését elősegíteni, mint tropomiozin hiányában (26. A ábra). Steady-state pirén fluoreszcencia emisszió alapuló kísérleteink alapján azonban SALS-WH2 hatására tropomiozin jelenlétében is szétszerelődnek az aktin filamentumok (26. B ábra). Mindez arra utal, hogy a tropomiozin lassítja ugyan a SALS WH2 doménjeinek depolimerizációs aktivitását, de teljesen nem gátolja azt.



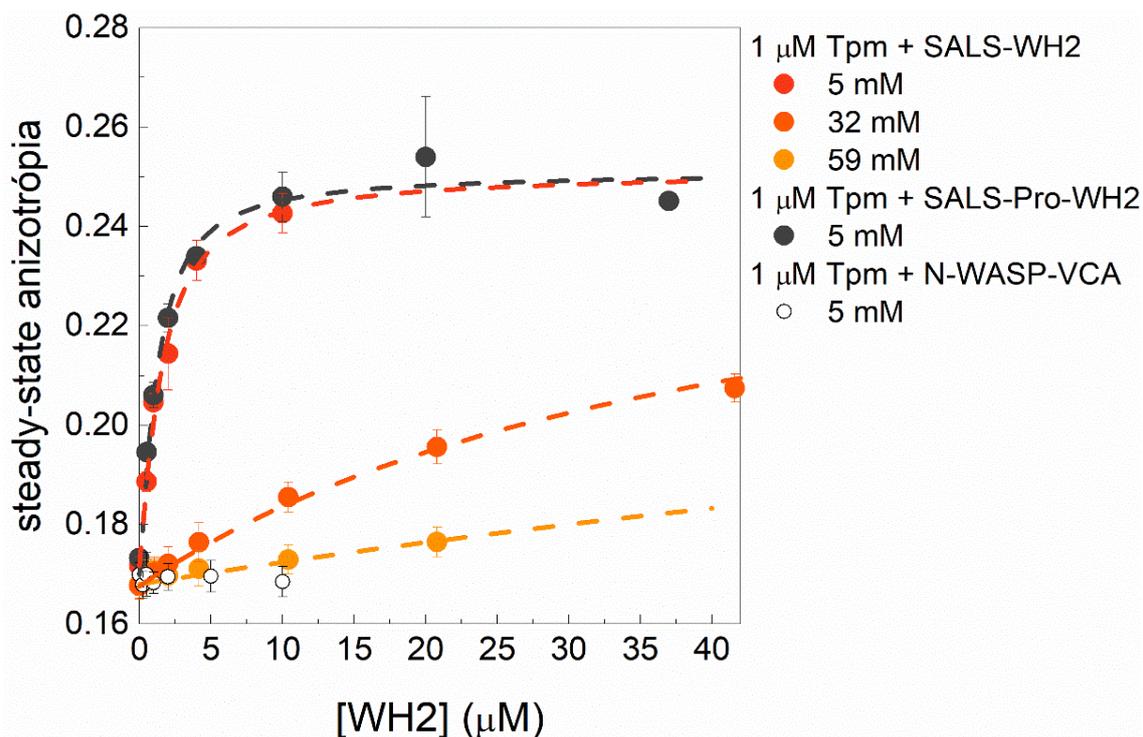
**26. ábra (A)** A tropomiozin (Tpm) kötött aktin filamentumok szétszerelődésének kinetikája SALS-WH2 hiányában és jelenlétében [pirén-aktin] = 0.02  $\mu\text{M}$  (50% pirén jelölt), [tropomiozin] = 4.5  $\mu\text{M}$ . Összehasonlításként barna görbe jelöli a tropomiozin nélküli mintát [SALS-WH2] = 12.5  $\mu\text{M}$  jelenlétében (22. A ábrával azonos adatsor). **(B)** A tropomiozin (Tpm) kötött F-aktin (Tpm : F-aktin) relatív pirén fluoreszcencia emissziója SALS-WH2 hiányában és jelenlétében. [F-aktin] = 1  $\mu\text{M}$  (5% pirén jelölt), [tropomiozin] = 4.5  $\mu\text{M}$ . A G-aktinhoz tartozó relatív pirén fluoreszcencia emissziót szürke teli körök jelölik. Átlag  $\pm$  SD, n = 2 - 3.

A Tpm hatásának háttérben álló mechanizmusok vizsgálata érdekében további kísérleteket végeztünk. Tropomiozin (1  $\mu\text{M}$  Alexa568C5 maleimid jelölt) steady-state anizotrópiáját mértük SALS-WH2 vagy SALS-Pro-WH2 hiányában és jelenlétében (27. ábra). Az anizotrópia növekedése SALS koncentrációfüggést mutatott, ami a két fehérje direkt interakciójára utal. A kölcsönhatás természetének vizsgálatára kísérleteinket megismételtük alacsony (5 mM), közepes (32 mM) és magas (59 mM) ionerősség mellett (2. egyenlet). A SALS : Tpm komplex disszociációs egyensúlyi állandóját az 1c egyenletnek megfelelően határoztuk meg. Az ionerősség növelése a kötést szignifikánsan gyengítette, ami a kölcsönhatás elektrosztatikus jellegére utal (27. ábra, 4. táblázat). Kísérleteinket más WH2 domén tartalmú fehérje, az Arp2/3 komplex aktivátorának, az N-WASP VCA (V: WH2, C: central, A: acidic) doménjével is elvégeztük. A VCA domén egy WH2 domént tartalmaz. Eredményeink alapján a Tpm steady-state anizotrópiája még alacsony ionerősség esetén sem változott az N-WASP-VCA jelenlétében (27. ábra). Ez arra enged következtetni, hogy a SALS-

WH2 : Tpm kölcsönhatásban nem a SALS WH2 doménjei, hanem a konstrukt más szakasza játszhat szerepet.

fehérje	ionerősség (mM)	$K_D \pm SD$ ( $\mu\text{M}$ )
SALS-WH2	5	$1.1 \pm 0.2$
	32	$41.3 \pm 7.7$
	59	> 100
SALS-Pro-WH2	5	$0.7 \pm 0.4$
N-WASP-VCA	5	nem meghatározott

4. táblázat. A SALS konstruktok tropomiozin kölcsönhatására irányuló steady-state anizotrópia mérésekben alkalmazott ionerősség és a SALS : Tpm komplex disszociációs egyensúlyi állandója.



27. ábra. Alexa568C5 maleimid jelölt tropomiozin (Tpm) steady-state anizotrópiája SALS-WH2/SALS-Pro-WH2 hiányában és jelenlétében, alacsony (5 mM), közepes (32 mM) és magas (59 mM) ionerősség mellett. [Alexa568C5 maleimid Tpm] = 1  $\mu\text{M}$ . A szaggatott vonalak az illesztett görbéket jelzik (*lc egyenlet*). Az illesztés alapján megállapított disszociációs egyensúlyi állandók: SALS-WH2:  $K_D = 1.1 \pm 0.2 \mu\text{M}$  (5 mM),  $K_D = 41.3 \pm 7.7 \mu\text{M}$  (32 mM),  $K_D > 100 \mu\text{M}$  (59 mM); SALS-Pro-WH2:  $K_D = 0.7 \pm 0.4 \mu\text{M}$  (5 mM); N-WASP-VCA:  $K_D =$  nem meghatározott. Átlag  $\pm$  SD,  $n = 2 - 3$ .

## 5. ÖSSZEFOGLALÁS

A Ph.D. munkám során a *Drosophila melanogaster* SALS fehérje WH2 doménjeinek és prolin-gazdag régiójának biokémiai aktivitásait vizsgáltam *in vitro*. Az eredmények alapján a SALS izolált tandem WH2 doménjei (SALS-WH2) *bona fide* WH2 doménként az aktin dinamika multifunkcionális szabályozói, ami az aktin monomerekkel és filamentumokkal kialakított kölcsönhatásokon alapul (29. ábra). Megfigyeléseink összhangban vannak korábbi kutatások eredményeivel, melyek felvetik, hogy a teljes hosszúságú SALS fehérje képes kötődni mind a monomerekhez, mind pedig a filamentumokhoz *in vitro* [20].

A SALS-WH2 mikromolár alatti affinitással ( $K_D \sim 0.4 \mu\text{M}$ ) köt az aktin monomerekhez, aminek funkcionális következményeként a monomereket szekvesztrálja, ezáltal gátolja azok filamentumba épülését. A SALS-WH2 : G-aktin kölcsönhatást az aktin Cys<sup>374</sup> aminosavához kapcsolt IAEDANS spektrális tulajdonságainak (fluoreszcencia emisszió csökkenése, maximum hullámhossz vöröseltolódása) szignifikáns változása kísérte (11. A, C ábra). Ennek hátterében az állhat, hogy a WH2 domének kötődése a fluorofór lokális környezetét befolyásolja, ami az IAEDANS oldószer számára való elérhetőségét fokozza. Hasonló hatást írtak le más WH2 domén/T $\beta$ 4 fehérjék esetén [65, 70]. Az IAEDANS-szel ellentétben az Alexa488NHS alkalmazásakor a fluoreszcencia emisszió spektrális sajátosságai nem változtak (11. B ábra). Az Alexa488NHS a monomer Lys<sup>328</sup>-as aminosavához kapcsolódva távolabb esik a WH2 domének kötőhelyétől. Megfigyeléseink alapján tehát a SALS WH2 doménjei a WH2 doménekre jellemző 'klasszikus' – szerkezetvizsgálati módszerekkel meghatározott – módon kapcsolódhatnak az aktin monomerekhez; a domén N-terminális amfipatikus  $\alpha$ -hélice a G-aktin S1 és S3 alegysége közötti hidrofób árokba ékelődik be (6, 12. ábra) [35, 36]. Fontos megjegyezni, hogy a SALS-WH2 : G-aktin komplex sztöchiometriája függ az alkalmazott fluorofórtól. Az IAEDANS elhelyezkedéséből adódóan negatívan befolyásolva a WH2 domének kötődését alacsonyabb sztöchiometriát eredményezhet a jelölésmentes rendszerhez képest, ami az irodalomban fellelhető ellentmondásokat magyarázhatja [71]. Mindezek alapján az Alexa488NHS jelölő alkalmasabb a WH2 domén : G-aktin komplex sztöchiometriájára irányuló vizsgálatokban. Ugyanakkor eredményeink a spektroszkópiai mérésekben alkalmazott fluoreszcens jelölők körültekintő használatára is felhívják a figyelmet.

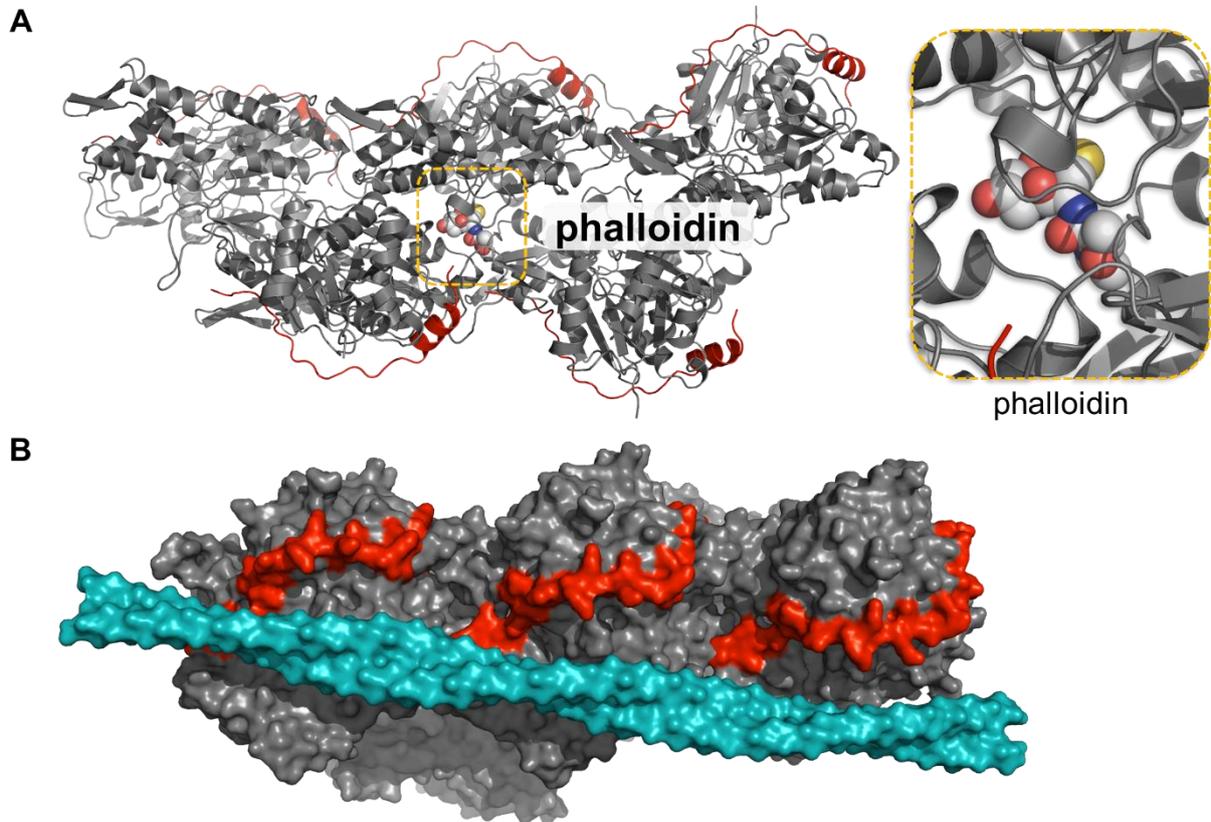
A steady-state anizotrópia és FRET mérési eredményeinkből arra következtettünk, hogy a SALS mindkét WH2 doménje képes egy - egy aktin monomer megkötésére (14–16. ábra). A SALS WH2-doménjeinek összehasonlító szekvencia analízise alátámasztja ezt a megállapításunkat és előrejelzi a szekvesztráló mechanizmust (5. ábra) [36]. A SALS WH2 doménjeinek N-terminális része rendelkezik egy konzervált, hidrofób aminosavak alkotta (Met, Leu, Val, vagy Ile) dublettel/triplettel, ami a G-aktin hidrofób zsebével való kölcsönhatásban

vehet részt. A SALS WH2 doménjeiben az FxxxK linker központi aminosava lizin/izoleucin, valamint a konszenzus LKKT/V motívum utáni 5. aminosav arginin. Ismert, hogy a WIP (*WASP interacting protein*) és a Ciboulot fehérjék WH2 doménjeiben ezek az aminosavak só hidakat képeznek az aktin Glu<sup>334</sup>, illetve Glu<sup>93</sup> aminosavaival [36]. Ezek a kölcsönhatások a WH2 domén C-terminális részének dinamikáját korlátozhatják, ami a domént szekvesztráló aktivitással ruházhatja fel. Továbbá a SALS egy viszonylag hosszú C-terminális szakasszal rendelkezik, ami a G-aktin felszínén a hegyes vég felé nyúlva a monomer hegyes végével alakíthat ki kölcsönhatást. Ilyen módon a SALS a monomer szöges és hegyes végét is kötve annak filamentumba épülését gátolhatja. Annak ellenére, hogy a SALS mindkét WH2 doménje képes aktin kötésre, a SALS-WH2 nukleációs aktivitással nem rendelkezik. Ebből a szempontból a SALS WH2 doménjei a Spire, Cordon Bleu, N-WASP vagy VopL/F WH2 domén fehérjékre hasonlítanak, amelyek az aktin monomereket szekvesztrálják ugyan, de a nukleációt csak a WH2 motívumokat övező más természetű aktinkötő modulok révén képesek elősegíteni [31, 39, 65, 72-74].

A teljes hosszúságú SALS fehérje elemzése során leírták, hogy a gelsolin által – a szöges végen – sapkázott filamentumok összeszerelődését gátolja, ami a SALS és a filamentumok hegyes vége közötti kölcsönhatására utal [20]. A kísérleti eredményeink szerint a SALS-WH2 azonos mértékű gátló hatást fejt ki mind a szöges végek, mind pedig a hegyes végek dominálta filamentum összeszerelődésre (17–19. ábra). Ebből arra következtethetünk, hogy a gátló hatást a szekvesztráló aktivitás és nem a SALS-WH2 filamentumvéghez való kötése magyarázza.

A SALS-WH2 multifunkcionális sajátosságának másik aspektusa a *severing* aktivitásában érhető tetten. Hígítás indukálta depolimerizációs kísérleteink egyértelműen arra utalnak, hogy a SALS-WH2 direkt módon képes elősegíteni a filamentumok szétszerelődését, a hatás mértéke alapján a *severing* aktivitásnak megfelelő hatékonysággal (22. ábra). A SALS-WH2 *severing* aktivitásának előfeltétele a filamentumok oldalához való kötése. Ebben a tekintetben fontos megfigyelésünk, hogy a SALS-WH2 kötődik a phalloidin-, vagy a jasplakinolide-stabilizált aktin filamentumokhoz, de nem képes azok szétszerelődését elősegíteni. Ez lehetőséget adott a SALS-WH2 közvetlen filamentum oldalkötésének kvantitatív vizsgálatára. Ismert, hogy a phalloidin kötőhelye az F-aktin belsejében, az alegységek által meghatározott árokban található (28. ábra, felső ábra) [75]. A WH2 domének feltételezett kötőhelyei a filamentum külső felszínén helyezkednek el (6., 28. ábra, alsó ábrásor) [17, 38, 76-78]. Ezen szerkezeti megfontolások nem zárják ki a SALS-WH2 és a phalloidin egyidejű F-aktin kötését. A phalloidin a filamentum szerkezetét stabilizálja [79], ami magyarázatul szolgálhat a toxinnak a SALS-WH2 *severing* aktivitására kifejtett közvetlen gátló hatására. A phalloidin stabilizáló hatásának következtében a monomerek filamentumhoz való asszociációja és arról való disszociációja gátolt [79], ami a SALS-WH2

szekvesztráló aktivitását indirekt módon ugyan, de negatívan befolyásolja. A toxinoknak az aktin dinamikában tetten érhető kettős hatása a SALS-WH2 monomer : filamentum egyensúlyra kifejtett hatását gátolja, ami összhangban van a megfigyeléseinkkel.



### F-aktin WH2 Tpm

**28. ábra.** A phalloidin, a tropomiozin (Tpm) és a WH2 domének F-aktinnal alkotott komplexének szerkezeti sajátosságai. **(A)** A phalloidin : F-aktin (röntgenkristallográfiával meghatározott, PDB: 6C1D [75]) és **(B)** a Tpm : F-aktin (krio-elektronmikroszkópiával meghatározott, PDB: 3J8A [80]) komplex szerkezetére a WIP-WH2 : G-aktin (röntgenkristallográfiával meghatározott, PDB: 2A41 [33]) szerkezetét illesztettük. Az ábrát a Pymol szoftverrel készítettük.

Az F-aktin kanonikus szarkomerikus partner fehérje a tropomiozin gátolta a SALS-WH2 által mediált *severing* kinetikáját (26. A ábra). Ugyanakkor egyensúlyi állapotban a monomerek mennyisége azonos volt, mind tropomiozin jelenlétében, mind annak hiányában (26. B ábra). A phalloidinnal ellentétben a tropomiozin nem/kis mértékben befolyásolja filamentumvégek dinamikáját, így nincs hatással a szekvesztráció révén felhalmozódó monomerek mennyiségére [81, 82]. Ezek alapján a tropomiozin a SALS-WH2 szekvesztráló aktivitására nem, csak *severing* aktivitására lehet hatással. Az F-aktin : Tpm komplex nagyfelbontású szerkezete alapján a tropomiozin filamentumok oldalához való kötése sztérikus módon gátolhatja a SALS-WH2 F-aktin kötését és ez által *severing* aktivitását (28. B ábra) [80]. Azonban a tropomiozin-kötött filamentumokról spontán módon disszociált monomerek a SALS-WH2-mediált szekvesztráció számára elérhetőek. Következtetéseink szerint ez



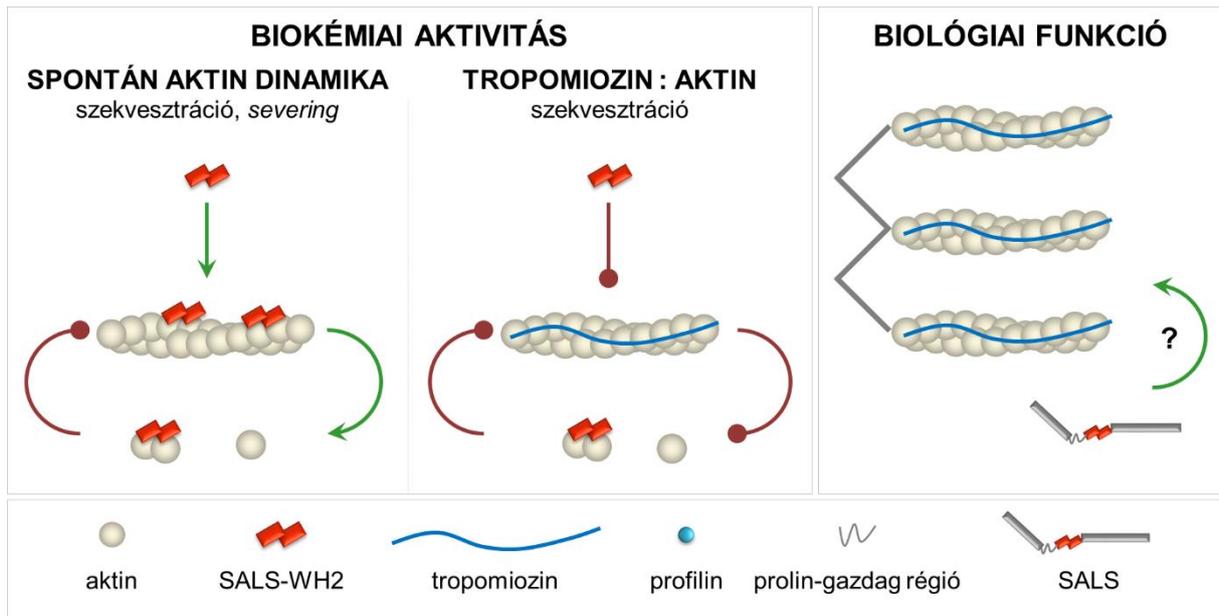
magyarázhatja azt, hogy aktin monomerek steady-state koncentrációjára a tropomiozin nincs hatással SALS-WH2 jelenlétében. Érdekes megfigyelésünk, hogy a SALS kötődik a tropomiozinhoz, a komplex stabilitása feltételezhetően elektrosztatikus kölcsönhatásokon alapul (27. ábra). Eredményeink arra utalnak, hogy a kötésben nem a WH2 domének, hanem a konstrukt más szekvenciárszletei meghatározóak. A tropomiozinkötés a SALS és a Leiomodin közös sajátsága [19, 21]. Az Lmod-Tpm kölcsönhatás az Lmod N-terminálisán található TMBS1 kötőhelyen keresztül valósul meg (7. ábra). Ismert, hogy a Lmod tropomiozin kötése a nukleációs aktivitását fokozza [19, 21].

A SALS más WH2 domén fehérjékhez hasonlóan (mint például az Arp2/3 aktivátorai, VASP, MIM, WIP, Cordon Bleu és a Leiomodin [34]) tartalmaz egy prolin-gazdag régiót a WH2 doménektől N-terminális irányban. Ismert, hogy az Arp2/3 aktivátor fehérjéi és a VASP esetében a prolin-gazdag régió profilin kötése révén a WH2 domének aktin kötésével koordináltan elősegíti a profilin : aktin filamentumba épülését [12, 33]. Eredményeink szerint a SALS prolin-gazdag szakasza nem képes profilint kötni és nem befolyásolja a WH2 domének aktivitását, sem profilin jelenlétében sem hiányában (24–25. ábra). Ez arra utal, hogy a SALS esetén a prolin-gazdag szakasz a fehérje flexibilis szerkezeti elemeként funkcionálhat.

## 5.1. TOVÁBBI CÉLOK

A fentiek alapján az izolált SALS-WH2 aktivitásai nem rekonstruálják a teljes hosszúságú fehérje aktin dinamikában tetten érhető hatásait (29. ábra) [16, 20]. Ez arra enged következtetni, hogy a SALS más régiói vagy más szarkomerikus elemek is nélkülözhetetlenek a fehérje megfelelő biológiai funkcióihoz. A hipotézis vizsgálatára célom a teljes hosszúságú fehérje előállítás, valamint aktin kölcsönhatásainak leírása. A SALS kötőpartnereként azonosítottuk a tropomiozint. Kutatásaimban azt is vizsgálom, hogy a tropomiozin miként befolyásolja a SALS aktin aktivitásait.

A Ph.D. dolgozatban nem részletezett bioinformatikai elemzéseink rávilágítottak arra, hogy nem csak a WH2 domének, de a teljes hosszúságú SALS is rendezetlen szerkezeti sajátságokkal bír; *intrinsically disordered protein* (IDP). *In silico* analízisünket előkísérleteink eredményei is alátámasztják (fluoreszcencia kioltás, GuHCl-indukálta kémiai denaturáció, termoanalitikai vizsgálatok). Jövőbeli kutatásaim során a SALS rendezetlen természetének vizsgálatát tűztem ki célul. A szerkezeti sajátságok mellett célom a teljes hosszúságú fehérje biokémiai aktivitásainak vizsgálata, további, potenciálisan kölcsönható szarkomerikus partnerfehérjék azonosítása, valamint ezen interakciók jellemzése.



**29. ábra.** A SALS WH2 doménjeinek biokémiai aktivitásainak és a teljes hosszúságú fehérje feltételezett biológiai funkciójának sematikus ábrázolása.

## 6. A Ph.D. MUNKÁM SORÁN ELÉRT ÚJ EREDMÉNYEK

A SALS WH2 doménjei kölcsönhatnak mind az aktin monomerekkel, mind pedig a filamentumokkal. A szekvesztráló és severing aktivitásaik révén a monomer : filamentum arányt a monomer irányába tolják el.

- A SALS-WH2 a G-aktin kötés tekintetében a WH2 doménekre jellemző szerkezeti sajátosságokat követi.
- A SALS-WH2 : G-aktin kölcsönhatást mikromolár alatti affinitás jellemzi.
- A SALS-WH2 : G-aktin komplex sztöchiometriája 1 : 2, azaz a SALS mindkét WH2 doménje képes egy-egy aktin monomert megkötni.
- SALS-WH2 monomer kölcsönhatásának funkcionális következménye a szekvesztráló aktivitás, ami révén gátolja a monomerek filamentumba épülését, annak szöges és hegyes végén egyaránt.
- A SALS WH2 doménjei képesek kölcsönhatást kialakítani az aktin filamentumok oldalával.
- SALS-WH2 filamentum kölcsönhatásának funkcionális következménye a severing aktivitás, ami révén elősegíti az aktin filamentumok szétszerelődését.
- A SALS prolin-gazdag régiója nem képes profilint kötni és nem befolyásolja a WH2 domének aktin aktivitásait.
- A tropomiozin gátolja a SALS WH2 doménjeinek az aktin filamentumok szétszerelődésére kifejtett hatását.
- A SALS-WH2 kötődik a tropomiozinhoz, a kölcsönhatás elektrosztatikus természetű.

A SALS WH2 doménjeinek felderített biokémiai tulajdonságai nem rekonstruálják a teljes hosszúságú fehérjének a szarkomerikus vékony filamentumok dinamikájára kifejtett hatását. Így a SALS biológiai funkciója a WH2 domének aktivitásának finomhangolását feltételezi, amelyben a SALS további régiói, illetve más szarkomerikus fehérjék játszhatnak szerepet.

## 7. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ATP: adenzin trifoszfát

ADP: adenzin difoszfát

as: aminosav

A: akceptor

Alexa488NHS: Alexa Fluor® 488 karboxilsav szukcinimidil észter

Alexa568C5-maleimid: Alexa Fluor®C<sub>5</sub> 568 maleimid

ABP: actin binding protein, aktinkötő fehérje

APF: assembly promoting factor

F-aktin: aktin filamentum

Arp2/3 komplex: Actin-related protein 2/3 komplex

BCA: bicinchoninic acid assay

BSA: marha szérum albumin

D: donor

DAAM: disheveled-associated activator of morphogenesis

DABCO: 1,4-diazabicyklo-[2,2,2]oktán

Dia: diaphanous-related formin

DLM: drosophila longitudinal muscle

DTT: ditioteritol

FH: formin homológ

FHOD: FH1/FH2 domain-containing protein, FH1/FH2 domén tartalmú fehérje

FHOS: formin homology 2 domain-containing protein, formin homológ 2 tartalmú fehérje

FMNL: formin-like protein

FRET: fluoreszcencia rezonancia energia transzfer

GA<sub>2</sub>: gelsolin : aktin komplex

G-aktin: aktin monomer

GFP: green fluorescent protein, zöld fluoreszkáló fehérje

GSH: glutation szefaróz

GSN: gelsolin

GST: glutation S-transzferáz

IAEDANS: jódacetaminoetil-1-naftilamin-5-szulfonsav

IAF: 5-(jódacetamid)fluoreszcein

IDR: intrinsically disordered region

IDP: intrinsically disordered protein

IFM: indirect flight muscle, indirekt repülőizom

IPTG: izopropil-β-D-tiogalaktopiranozid

Jaspla: jasplakinolide  
LatA: latrunculinA  
Lmod: leiomodulin  
MHC: myosin heavy chain  
MLC: myosin light chain  
MIM: missing in metastasis  
NEM: N-ethylmaleimid  
PH: phalloidin  
PRD: proline-rich domain, prolin-gazdag domén  
Pirén: N-(1-pirén)-jódacetamid  
SALS: sarcomere length short  
SDS-PAGE: nátrium dodecil szulfát poliakrilamid gélelektroforézis  
T $\beta$ 4: thymosin $\beta$ 4  
TIRFM: total internal reflection fluorescence microscopy, teljes belső visszaverődésen alapuló fluoreszcencia mikroszkópia  
TMBS: tropomyosin binding site, tropomiozin kötőhely  
Tmod: tropomodulin  
Tn: troponin  
Tpm: tropomiozin  
WASP: Wiskott-Aldrich syndrome protein  
WH2: Wiskott-Aldrich syndrome homology region 2, Wiskott-Aldrich szindróma homológ régió  
2  
WIP: WASP interacting protein  
wt: wild type, vad típus

## 8. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek **Dr. Bugyi Beátának**. Az ő tanítása és példamutatása lévén válhattam jobb kutatóvá. Köszönöm türelmét és szakmai irányítását, valamint javító kritikáit minek segítségével elkészíthettem Ph.D. dolgozatomat. Köszönöm, hogy a csapata tagja lehetek és remélem még sok eredményes közös munka áll előttünk, mivel nyomot hagyhatunk a tudományos világban.

Köszönettel tartozom **Prof. Dr. Nyitrai Miklósnak**, hogy lehetőséget adott a Biofizikai Intézetben elkezdni tudományos pályámat, valamint azért, hogy szigorú, de mindig pozitív szemlélettel egyengette utamat Ph.D. hallgatói éveim során.

Szeretnék köszönetet mondani **Dr. Mihály Józsefnek** (Magyar Tudományos Akadémia, Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Genetikai Intézet) és csapata tagjainak, kiemelten **Mih Edének**, hogy elkészítették és rendelkezésünkre bocsátották a SALS konstruktok plazmidjait.

Köszönöm **Dr. Vig Andrea Teréznek** és **Dr. Huber Tamásnak**, hogy a kezdetektől mellettem álltak és szakmai tanácsaikkal segítették munkámat.

Köszönöm **Dr. Kengyel András Miklósnak** a sok szakmai segítséget.

Köszönöm továbbá a Biofizikai Intézet minden dolgozójának a mindennapi munka során nyújtott hasznos segítségüket és tanácsaikat.

Köszönöm szüleimnek, hogy hittek bennem és megteremtették tanulmányaim elvégzéséhez a biztos hátteret.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm férjemnek **Dr. Szűts Baláznak** értékes észrevételeit, azt hogy biztosította dolgozatom megírásához a nyugodt környezetet és szeretetével átlendített a nehézségeken.

## 9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Ono, S., *Dynamic regulation of sarcomeric actin filaments in striated muscle*. Cytoskeleton (Hoboken), 2010. **67**(11): p. 677-92.
2. Henderson, C.A., et al., *Overview of the Muscle Cytoskeleton*. Compr Physiol, 2017. **7**(3): p. 891-944.
3. Sanger, J.W., et al., *Assembly and Maintenance of Myofibrils in Striated Muscle*. Handb Exp Pharmacol, 2017. **235**: p. 39-75.
4. Gokhin, D.S. and V.M. Fowler, *A two-segment model for thin filament architecture in skeletal muscle*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013. **14**(2): p. 113-9.
5. Alberts, B., et al., *Essential cell biology*. 2014.
6. Perrin, B.J. and J.M. Ervasti, *The actin gene family: function follows isoform*. Cytoskeleton (Hoboken), 2010. **67**(10): p. 630-4.
7. Ampe, C. and M. Van Troys, *Mammalian Actins: Isoform-Specific Functions and Diseases*. Handb Exp Pharmacol, 2017. **235**: p. 1-37.
8. Dominguez, R., *Actin-binding proteins--a unifying hypothesis*. Trends Biochem Sci, 2004. **29**(11): p. 572-8.
9. Woodrum, D.T., S.A. Rich, and T.D. Pollard, *Evidence for biased bidirectional polymerization of actin filaments using heavy meromyosin prepared by an improved method*. J Cell Biol, 1975. **67**(1): p. 231-7.
10. 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.
11. Sept, D. and J.A. McCammon, *Thermodynamics and kinetics of actin filament nucleation*. Biophysical journal, 2001. **81**(2): p. 667-674.
12. Bugyi, B. and M.F. Carlier, *Control of actin filament treadmilling in cell motility*. Annu Rev Biophys, 2010. **39**: p. 449-70.
13. Pollard, T.D., *Rate constants for the reactions of ATP- and ADP-actin with the ends of actin filaments*. J Cell Biol, 1986. **103**(6 Pt 2): p. 2747-54.
14. Pollard, T.D., *Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 2007. **36**: p. 451-77.
15. Bugyi, B., *Actin and actin binding proteins*, in *Muscle contraction: a Hungarian perspective*, M.S. Kellermayer, Editor. 2018, Semmelweis Publishers: Budapest.
16. Shwartz, A., et al., *The Drosophila formin Fhos is a primary mediator of sarcomeric thin-filament array assembly*. Elife, 2016. **5**.
17. Renault, L., B. Bugyi, and M.F. Carlier, *Spire and Cordon-bleu: multifunctional regulators of actin dynamics*. Trends Cell Biol, 2008. **18**(10): p. 494-504.
18. Littlefield, R., A. Almenar-Queralt, and V.M. Fowler, *Actin dynamics at pointed ends regulates thin filament length in striated muscle*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(6): p. 544-51.
19. Fowler, V.M. and R. Dominguez, *Tropomodulins and Leiomodins: Actin Pointed End Caps and Nucleators in Muscles*. Biophys J, 2017. **112**(9): p. 1742-1760.
20. Bai, J., J.H. Hartwig, and N. Perrimon, *SALS, a WH2-domain-containing protein, promotes sarcomeric actin filament elongation from pointed ends during Drosophila muscle growth*. Dev Cell, 2007. **13**(6): p. 828-42.
21. Chereau, D., et al., *Leiomodin is an actin filament nucleator in muscle cells*. Science, 2008. **320**(5873): p. 239-43.
22. Vig, A.T., et al., *The activities of the C-terminal regions of the formin protein disheveled-associated activator of morphogenesis (DAAM) in actin dynamics*. J Biol Chem, 2017. **292**(33): p. 13566-13583.
23. 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.

24. Barko, S., et al., *Characterization of the biochemical properties and biological function of the formin homology domains of Drosophila DAAM*. J Biol Chem, 2010. **285**(17): p. 13154-69.
25. Harris, E.S., et al., *Mechanistic differences in actin bundling activity of two mammalian formins, FRL1 and mDia2*. J Biol Chem, 2006. **281**(20): p. 14383-92.
26. Molnar, I., et al., *DAAM is required for thin filament formation and Sarcomerogenesis during muscle development in Drosophila*. PLoS Genet, 2014. **10**(2): p. e1004166.
27. Bao, B., et al., *Deletion of a single-copy DAAM1 gene in congenital heart defect: a case report*. BMC Med Genet, 2012. **13**: p. 63.
28. Bugyi, B., *Wiskott-aldrich szindróma fehérje homológ 2 domén: a kirakós sokoldalú eleme*. Biokémia, 2015. **XXXIX**(2): p. 25-35.
29. Renault, L., C. Deville, and C. van Heijenoort, *Structural features and interfacial properties of WH2, beta-thymosin domains and other intrinsically disordered domains in the regulation of actin cytoskeleton dynamics*. Cytoskeleton (Hoboken), 2013. **70**(11): p. 686-705.
30. Paunola, E., P.K. Mattila, and P. Lappalainen, *WH2 domain: a small, versatile adapter for actin monomers*. FEBS Lett, 2002. **513**(1): p. 92-7.
31. Husson, C., et al., *Multifunctionality of the beta-thymosin/WH2 module: G-actin sequestration, actin filament growth, nucleation, and severing*. Ann N Y Acad Sci, 2010. **1194**: p. 44-52.
32. Dominguez, R., *The beta-thymosin/WH2 fold: multifunctionality and structure*. Ann N Y Acad Sci, 2007. **1112**: p. 86-94.
33. Chereau, D., et al., *Actin-bound structures of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP)-homology domain 2 and the implications for filament assembly*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(46): p. 16644-9.
34. Carrier, M.F., et al., *Control of actin assembly by the WH2 domains and their multifunctional tandem repeats in Spire and Cordon-Bleu*. Int Rev Cell Mol Biol, 2011. **290**: p. 55-85.
35. Hertzog, M., et al., *The beta-thymosin/WH2 domain; structural basis for the switch from inhibition to promotion of actin assembly*. Cell, 2004. **117**(5): p. 611-23.
36. Didry, D., et al., *How a single residue in individual beta-thymosin/WH2 domains controls their functions in actin assembly*. Embo j, 2012. **31**(4): p. 1000-13.
37. Lee, S.H., et al., *Structural basis for the actin-binding function of missing-in-metastasis*. Structure, 2007. **15**(2): p. 145-55.
38. Ducka, A.M., et al., *Structures of actin-bound Wiskott-Aldrich syndrome protein homology 2 (WH2) domains of Spire and the implication for filament nucleation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(26): p. 11757-62.
39. Dominguez, R., *The WH2 Domain and Actin Nucleation: Necessary but Insufficient*. Trends Biochem Sci, 2016. **41**(6): p. 478-490.
40. Yuen, M., et al., *Leiomodin-3 dysfunction results in thin filament disorganization and nemaline myopathy*. J Clin Invest, 2014. **124**(11): p. 4693-708.
41. Liu, W., et al., *IBS: an illustrator for the presentation and visualization of biological sequences*. Bioinformatics, 2015. **31**(20): p. 3359-3361.
42. Pappas, C.T., et al., *Knockout of Lmod2 results in shorter thin filaments followed by dilated cardiomyopathy and juvenile lethality*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(44): p. 13573-8.
43. Pappas, C.T., et al., *Cardiac-specific knockout of Lmod2 results in a severe reduction in myofilament force production and rapid cardiac failure*. J Mol Cell Cardiol, 2018. **122**: p. 88-97.
44. Dong, Q., M. Ludgate, and G. Vassart, *Cloning and sequencing of a novel 64-kDa autoantigen recognized by patients with autoimmune thyroid disease*. J Clin Endocrinol Metab, 1991. **72**(6): p. 1375-81.
45. Halim, D., et al., *Loss of LMOD1 impairs smooth muscle cytocontractility and causes megacystis microcolon intestinal hypoperistalsis syndrome in humans and mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(13): p. E2739-e2747.



46. Johnson, T.P. and R. Tyagi, *Nodding syndrome may be an autoimmune reaction to the parasitic worm Onchocerca volvulus*. 2017. **9**(377).
47. Chen, X., et al., *Mechanisms of leiomodien 2-mediated regulation of actin filament in muscle cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(41): p. 12687-92.
48. Boczkowska, M., et al., *How Leiomodien and Tropomodulin use a common fold for different actin assembly functions*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 8314.
49. Szatmari, D., et al., *Cardiac leiomodien2 binds to the sides of actin filaments and regulates the ATPase activity of myosin*. 2017. **12**(10): p. e0186288.
50. Ly, T., et al., *The N-terminal tropomyosin- and actin-binding sites are important for leiomodien 2's function*. Mol Biol Cell, 2016. **27**(16): p. 2565-75.
51. Tsukada, T., et al., *Leiomodien-2 is an antagonist of tropomodulin-1 at the pointed end of the thin filaments in cardiac muscle*. J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 18): p. 3136-45.
52. Olson, B.J. and J. Markwell, *Assays for determination of protein concentration*. Curr Protoc Protein Sci, 2007. **Chapter 3**: p. Unit 3.4.
53. 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.
54. Bugyi, B., et al., *Formins regulate actin filament flexibility through long range allosteric interactions*. J Biol Chem, 2006. **281**(16): p. 10727-36.
55. Bugyi, B., D. Didry, and M.F. Carlier, *How tropomyosin regulates lamellipodial actin-based motility: a combined biochemical and reconstituted motility approach*. Embo j, 2010. **29**(1): p. 14-26.
56. Eisenberg, E. and W.W. Kielley, *Troponin-tropomyosin complex. Column chromatographic separation and activity of the three, active troponin components with and without tropomyosin present*. J Biol Chem, 1974. **249**(15): p. 4742-8.
57. Smillie, L.B., *Preparation and identification of alpha- and beta-tropomyosins*. Methods Enzymol, 1982. **85 Pt B**: p. 234-41.
58. Nag, S., et al., *Ca<sup>2+</sup> binding by domain 2 plays a critical role in the activation and stabilization of gelsolin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(33): p. 13713-8.
59. Perelroizen, I., et al., *Interaction of profilin with G-actin and poly(L-proline)*. Biochemistry, 1994. **33**(28): p. 8472-8.
60. Reisler, E., *[10] Sulfhydryl modification and labeling of myosin*, in *Methods in Enzymology*. 1982, Academic Press. p. 84-93.
61. Lakowicz, J.R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 2006: Springer US.
62. Hertzog, M. and M.F. Carlier, *Functional characterization of proteins regulating actin assembly*. Curr Protoc Cell Biol, 2005. **Chapter 13**: p. Unit 13 6.
63. Hanson, J., and Lowy., J. , *The structure of F-actin and of actin filaments isolated from muscle*. Journal of Molecular Biology, 1963(6): p. 46-60.
64. Coue, M., et al., *Inhibition of actin polymerization by latrunculin A*. FEBS Lett, 1987. **213**(2): p. 316-8.
65. Bosch, M., et al., *Analysis of the function of Spire in actin assembly and its synergy with formin and profilin*. Mol Cell, 2007. **28**(4): p. 555-68.
66. Way, M., et al., *Expression of human plasma gelsolin in Escherichia coli and dissection of actin binding sites by segmental deletion mutagenesis*. J Cell Biol, 1989. **109**(2): p. 593-605.
67. Nag, S., et al., *Gelsolin: the tail of a molecular gymnast*. Cytoskeleton (Hoboken), 2013. **70**(7): p. 360-84.
68. Didry, D., M.F. Carlier, and D. Pantaloni, *Synergy between actin depolymerizing factor/cofilin and profilin in increasing actin filament turnover*. J Biol Chem, 1998. **273**(40): p. 25602-11.
69. Gutsche-Perelroizen, I., et al., *Filament assembly from profilin-actin*. J Biol Chem, 1999. **274**(10): p. 6234-43.
70. De La Cruz, E.M., et al., *Thymosin-beta(4) changes the conformation and dynamics of actin monomers*. Biophys J, 2000. **78**(5): p. 2516-27.

71. Husson, C., et al., *Cordon-Bleu uses WH2 domains as multifunctional dynamizers of actin filament assembly*. Mol Cell, 2011. **43**(3): p. 464-77.
72. Namgoong, S., et al., *Mechanism of actin filament nucleation by Vibrio VopL and implications for tandem W domain nucleation*. Nat Struct Mol Biol, 2011. **18**(9): p. 1060-7.
73. Pernier, J., et al., *Dimeric WH2 domains in Vibrio VopF promote actin filament barbed-end uncapping and assisted elongation*. Nat Struct Mol Biol, 2013. **20**(9): p. 1069-76.
74. Yu, B., et al., *Mechanism of actin filament nucleation by the bacterial effector VopL*. Nat Struct Mol Biol, 2011. **18**(9): p. 1068-74.
75. Menten, A., et al., *High-resolution cryo-EM structures of actin-bound myosin states reveal the mechanism of myosin force sensing*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018. **115**(6): p. 1292-1297.
76. Zahm, J.A., et al., *The bacterial effector VopL organizes actin into filament-like structures*. Cell, 2013. **155**(2): p. 423-34.
77. Rebowski, G., et al., *X-ray scattering study of actin polymerization nuclei assembled by tandem W domains*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(31): p. 10785-90.
78. Avvaru, B.S., J. Pernier, and M.F. Carlier, *Dimeric WH2 repeats of VopF sequester actin monomers into non-nucleating linear string conformations: An X-ray scattering study*. J Struct Biol, 2015. **190**(2): p. 192-9.
79. Coluccio, L.M. and L.G. Tilney, *Phalloidin enhances actin assembly by preventing monomer dissociation*. J Cell Biol, 1984. **99**(2): p. 529-35.
80. von der Ecken, J., et al., *Cryo-EM structure of a human cytoplasmic actomyosin complex at near-atomic resolution*. Nature, 2016. **534**(7609): p. 724-8.
81. Broschat, K.O., *Tropomyosin prevents depolymerization of actin filaments from the pointed end*. J Biol Chem, 1990. **265**(34): p. 21323-9.
82. Kis-Bicskei, N., et al., *Purification of tropomyosin Br-3 and 5NM1 and characterization of their interactions with actin*. Cytoskeleton (Hoboken), 2013. **70**(11): p. 755-65.

## 10. PUBLIKÁCIÓS LISTA

### **Az értekezés alapjául szolgáló közlemények**

Mónika Ágnes Tóth, Andrea Majoros, Andrea Teréz Vig, Ede Migh, Miklós Nyitrai, József Mihály, Beáta Bugyi: Biochemical Activities of the Wiskott-Aldrich Syndrome Homology Region 2 Domains of Sarcomere Length Short (SALS) Protein. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* **291**: pp. 667 - 680. (2016)

Impakt faktor: 4.573

Nyilvános idézők összesen: 13, Független: 8

### **Az értekezéshez kapcsolódó előadások**

Tóth Mónika Ágnes, Bugyi Beáta, Nyitrai Miklós, Mihály József, Migh Ede: SALS, egy WH2 domén fehérje szerepe a szarkomer aktin hálózatában. *43. Membrán - Transzport konferencia*, Sümeg, 2013. 05. 21 - 24.

Tóth Mónika Ágnes, Bugyi Beáta, Nyitrai Miklós, Mihály József, Migh Ede: SALS, egy WH2 domén fehérje szerepe a szarkomer aktin hálózatában. *II. Interdiszciplináris Doktorandusz Konferencia*, Pécs, 2013. 05. 15 – 17.

Mónika Ágnes Tóth, Beáta Bugyi, Miklós Nyitrai, József Mihály, Ede Migh: SALS, a WH2-protein in sarcomeric actin assembly. *Novel Biophysical Approaches in the Investigation of the Cytoskeleton, The 27th European Cytoskeletal Forum Meeting*, Pécs, 2012. 11. 3 - 7.

Mónika Ágnes Tóth, Beáta Bugyi: SALS, a WH2-protein in sarcomeric actin assembly. *Summer school on Actin Dynamics*, Regensburg, Németország, 2012. 09. 29 – 10. 05.

Tóth Mónika Ágnes, Bugyi Beáta, Nyitrai Miklós, Mihály József, Migh Ede: A SALS szerepe a szarkomer aktin hálózatának szabályozásában. *A Magyar Élettani Társaság, a Magyar Anatómusok Társasága, a Magyar Biofizikai Társaság és a Magyar Mikrocirkulációs és Vaszkuláris Biológiai Társaság Kongresszusa*, Debrecen, 2012. 06. 10 - 13.

### **Az értekezéshez kapcsolódó poszterek**

Mónika Ágnes Tóth, Péter Gaszler, Judit Viktória Fórizs, Andrea Teréz Vig, Ede Migh, József Mihály, Beáta Bugyi: Biochemical activities of the Wiskott-Aldrich syndrome homology region 2 domains of Sarcomere Length Short protein. *Annual Conference of the Hungarian Biochemical Society*, Szeged, 2016. 08. 28 - 31.

Mónika Ágnes Tóth, Péter Gaszler, Andrea Teréz Vig, Ede Migh, József Mihály, Beáta Bugyi: Biochemical activities of the Wiskott-Aldrich syndrome homology region 2 domains of Sarcomere Length Short protein. *European Cytoskeletal Forum*, Cambridge, UK, 2016. 06. 20 - 23.

Tóth Mónica Ágnes, Majoros Andrea, Mihály József, Migh Ede, Nyitrai Miklós, Bugyi Beáta: SALS, egy WH2 domén fehérje szerepe a szarkomer aktin hálózatában. *44. Membrán-Transzport konferencia*, Sümeg, 2014. 05. 20 - 23.

Mónika Ágnes Tóth, József Mihály, Ede Migh, Lajos Kalmár, Miklos Nyitrai, Beáta Bugyi: SALS, a WH2 domain protein in sarcomeric actin organization. *ASCB Annual Meeting*, New Orleans, USA, 2013. 12.14 - 18.

### **Az értekezésben nem szereplő közlemények**

Andre Teréz Vig, István Földi, Szilárd Szikora, Ede Migh, Rita Gombos, Mónika Ágnes Tóth, Tamás Huber, Réka Pintér, Gábor Csaba Talián, József Mihály, Beáta Bugyi: The activities of the C-terminal regions of the formin protein disheveled-associated activator of morphogenesis (DAAM) in actin dynamics. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* **292**: (33) pp. 13566 - 13583. (2017)

Impakt faktor: 4.125

Nyilvános idézők összesen: 6, Független: 3

Boglárka Uzsoki, Mónika Tóth, István Hernádi: Novelty response of rats determines the effect of prefrontal alpha-2 adrenoceptor modulation on anxiety. *NEUROSCIENCE LETTERS* **499**: (3) pp. 219 - 223. (2011)

Impakt faktor: 2.98

Nyilvános idézők összesen: 2, Független: 2

### **Az értekezéshez nem kapcsolódó előadások**

Andrea Vig, Péter Gaszler, Mónika Ágnes Tóth, Beáta Bugyi: The CT region of DAAM has a supporting role in FH2-mediated actin dynamics regulation. *5<sup>th</sup> Interdisciplinary Doctoral Conference*, Pécs, 2016. 05. 27 - 29.

Kardos Roland, Tóth Mónica Ágnes, Futó Kinga, Elisa Nevalainen, Pekka Lappalainen, Nyitrai Miklós és Hild Gábor: Aktinkötő fehérjék hatása az aktin monomer dinamikai tulajdonságára. *23. Magyar Biofizikai Társaság Kongresszusa*, Pécs, 2009. 08. 23 – 26.

### **Az értekezéshez nem kapcsolódó posztetek**

Péter Gaszler, Andrea Vig, Judit Viktória Fórizs, Mónika Ágnes Tóth, István Földi, József Mihály, Beáta Bugyi: The CT region of DAAM has a supporting role in FH2-mediated actin dynamics regulation. *Annual Conference of the Hungarian Biochemical Society, Szeged, 2016.* 08. 28 - 31.

Andrea Vig, Péter Gaszler, Mónika Ágnes Tóth, István Földi, József Mihály, Beáta Bugyi: The CT region of DAAM has a supporting role in FH2-mediated actin dynamics regulation. *European Cytoskeletal Forum, Cambridge, UK, 2016.* 06. 20 - 23.

Tóth Mónika, Kokas Ágnes, Türmer Katalin, Vig Andrea, Huber Tamás, Hild Gábor, Nyitrai Miklós, Bugyi Beáta: Tropomiozin izoformák hatása a nukleációs faktorokra. *41. Membrán Transzport Konferencia, Sümeg, 2011.* 05. 17. - 20.

Türmer Katalin, Tóth Mónika, Kokas Ágnes, Nyitrai Miklós, Belágyi József: A nukleotidok és a kationok szerepe az aktin struktúrájában, illetve konformációs változásaiban. *41. Membrán Transzport Konferencia, Sümeg, 2011.* 05. 17. - 20.

Kokas Ágnes, Tóth Mónika, Türmer Katalin, Kollár Veronika, Kardos Roland, Nyitrai Miklós, Hild Gábor: Twinfilin-1 hatása az aktin szerkezeti és dinamikai tulajdonságaira. *41. Membrán Transzport Konferencia, Sümeg, 2011.* 05. 17. - 20.

Talián Csaba Gábor, Kokas Ágnes, Tóth Mónika, Türmer Katalin, Nyitrai Miklós: A neuronális tropomiozin Br-3 izoforma hatása az aktin dinamikára. *41. Membrán Transzport Konferencia, Sümeg, 2011.* 05. 17. - 20.

Réka Dudas, Kinga Futó, Mónika Tóth, József Orbán, Miklós Nyitrai, Gábor Hild: Effect of ADP-actin filaments on the ATPase activity of two myosin S1 isoforms. *11. Conference on Methods and Applications of Fluorescence, Budapest, 2009.* 09. 6 – 9.

Livia Czimbalek, Szilvia Barkó, Kinga Futó, Mónika Tóth, Tünde Kupi, Gábor Hild, Miklós Nyitrai: Characterisation of the nuclear actin in the human oesophagus tumor cells (HEp-2). *11. Conference on Methods and Applications of Fluorescence, Budapest, 2009.* 09. 6 – 9.

Czimbalek Lívía, Barkó Szilvia, Futó Kinga, Tóth Mónika, Kupi Tünde, Hild Gábor and Nyitrai Miklós: HEp-2 tumor sejtek magjában jelenlévő aktin karakterizálása. *Magyar Biofizikai Társaság Kongresszusa*, Pécs, 2009. 08. 23 - 26.

Uzsoki Boglárka, Tóth Mónika, Bohner Katalin, Hernádi István: Újdonság kereső / kerülő patkányok szorongásvizsgálata: Alfa-2 adrenoreceptor antagonisták hatása. *11. MITT Konferencia*, Szeged, 2007. 01. 24 - 27.

Boglárka Uzsoki, Mónika Tóth, László Kovács, Gábor Vas, Tamás Atlasz and István Hernádi: Reverse effects of the alpha-2A adrenoceptor agonist guanfacine on rats with different response to novelty. *5th Forum of European Neuroscience*, Bécs, 2006. 07. 8 -12.

Uzsoki Boglárka, Tóth Mónika, Vas Gábor, Kovács László, Atlasz Tamás, Hernádi István: Patkányok idegenkörnyezetre adott válaszlai meghatározzák az alfa-2A noradrenerg receptor agonista guanfacine magatartási hatásait. *70. Magyar Élettani Társaság*, Szeged, 2006. 06. 07 - 09.

Uzsoki Boglárka, Kovács László, Tóth Mónika, Vas Gábor, Hernádi, István: The effect of prefrontaly applied guanfacine on the anxiety of rats with different response to novelty an elevated plus maze study. *IBRO International Workshop*, Budapest, 2006. 01. 26 – 28.

**A közlemények összesített impakt faktora: 11.678**

**Nyilvános idézők összesen: 21**

**Független idézők összesen: 13**