

Ph.D. értekezés

Tropomiozinok izoforma függő hatása az aktin dinamikájára

Varnyuné Kis-Bicskei Nikolett



Témavezető: Dr. Talián Csaba Gábor

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM
Általános Orvostudományi Kar
Biofizika Intézet

Pécs, 2019

Interdiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola: D93

Iskolavezető: Dr. Sümegi Balázs

Doktori Program: B-130

Funkcionális fehérjedinamika vizsgálata biofizikai módszerekkel

Programvezető: Dr. Nyitrai Miklós

Témavezető: Dr. Talián Csaba Gábor

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ADF:	aktin depolimerizáló faktor
ADP:	adenozin difoszfát
Arp2/3:	actin-related protein 2/3
ATP:	adenozin-trifoszfát
ATPáz:	adenozin trifoszfátáz
BCA:	bicinchoninsav, koncentráció meghatározási módszer egyik alapja
Ca ²⁺ -G-aktin:	kalcium iont kötő monomer aktin
cDNS:	komplementer dezoxiribonukleinsav, mRNS-ről átírt DNS szál
DMSO:	dimetil-szulfoxid
DNáz:	dezoxiribonukleáz
DTT:	DL-Dithiothreitol
EDTA:	etilén-diamin-tetraacetát
EGTA:	etilén-glikol-bisz (β-aminoetil-éter)- N,N,N',N'-tetraecetsav
EDC:	etilkarbodiimid hidroklorid
F-aktin:	filamentális aktin
G-aktin:	globuláris monomer aktin
HEPES:	4-(2-hidroxietyl)-1-piperazin-etánszulfonsav
His-tag:	polihisztidin régió
IPTG:	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside magyar helyesírás
K _D :	disszociációs egyensúlyi állandó
k ⁺ :	adott végre jellemző asszociációs sebességi állandó
k ⁻ :	adott végre jellemző disszociációs sebességi állandó
k _d :	disszociációs sebességi állandó
k _a :	asszociációs sebességi állandó
MEA:	β-merkaptóetanol
Mg ²⁺ :	magnézium ion
MgCl ₂ :	magnézium klorid
Mg-G-aktin:	magnézium iont kötő monomer aktin

mRNS:	hírvívő ribonukleinsav
NaH ₂ PO ₄ :	nátrium-dihidrogén-foszfát
NaN ₃ :	nátrium azid
NHS:	N-hidroxiszukcinimid
N-VASP:	neurális Wiskott-Aldrich szindróma fehérje
OD ₆₀₀ :	600nm-en mért optikai denzitás
PAGE:	poliakrilamid gélelektroforézis
PCR:	polimeráz láncreakció
P _i :	szervetlen foszfát
pirén:	N-(1-pirén)-jodoacetamid, fluorofór jelölő
pirén-aktin:	pirén fluorofórral jelölt aktin
PMSF:	fenil-metil-szulfonil-fluorid
S:	tropomiozin és aktin aránya a pelletben
SDS:	nátrium-dodecilszulfát
SPR:	„Surface Plasmon Resonance” Felületi plazmon rezonancia
skTM:	vázizom tropomiozin
S _{max} :	tropomiozin és aktin arány maximális értéke telítési koncentrációban
Tpm:	tropomiozin
VCA:	verpolin homológia, Arp2/3 komplexet aktiváló domén
WASP:	Wiscott-Aldrich szindróma fehérje
WAVE:	WASP család verpolin-homológia fehérje
WH2:	Wiskott-Aldrich szindróma fehérje homológia 2

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések jegyzéke	3
Tartalomjegyzék	5
I. Irodalmi áttekintés	7
I. 1. Citoszkeletális rendszer	7
I. 2. Aktin	7
I. 2.1. aktin molekula szerkezete	7
I. 2.2. aktin filamentum	9
I. 3. Aktinkötő fehérjék:	13
I. 3.1. Tropomiozinok:	14
I. 3.2. Nukleációs faktorok:	18
I. 3.3. Gelsolin:	20
II. Célkitűzések	24
III. Anyagok és módszerek	26
III. 1. Kísérletekhez használt fehérjék előállítása	26
III. 1.1. Aktin preparálása:	26
III. 1.2. Pirén-jelölt aktin előállítása:	26
III. 1.3. Tropomiozin Tpm1.12 és Tpm3.1 klónozása:	27
III. 1.4. Tropomiozin Tpm1.12 és Tpm3.1 preparálása:	28
III. 1.5. skTM preparálása:	29
III. 1.6. Gelsolin preparálása:	29
III. 1.7. VCA-Arp2/3 tisztítása:	30
III. 1.8. TEV preparálás:	31
III. 2. Alkalmazott módszerek	32
III. 2.1. Fluoreszcencia mérések:	32
III. 2.2. Aktin polimerizációjának vizsgálata:	32
III. 2.3. Aktin depolimerizációjának vizsgálata:	33
III. 2.4. Koszedimentációs vizsgálatok:	34
III. 2.5. Felületi plazmon rezonancia (SPR):	35
IV. Eredmények	36
IV. 1. Tpm1.12 és Tpm3.1 izoformák klónozása	36
IV. 2. Tpm1.12 és Tpm3.1 kötődése az aktin filamentumhoz	39
IV. 3. Tpm1.12 és Tpm3.1 hatása az aktin filamentumra	40

IV. 3.1. Az egyes izoformák aktin filamentum felépülésére gyakorolt hatásai	40
IV. 3.2. Tpm1.12 és Tpm3.1 hatása az Arp2/3 komplex által katalizált aktin filamentum felépülésre	42
IV. 3.3. Az egyes izoformák aktin filamentum szétszerelődésére gyakorolt hatásai	43
IV. 4. Gelsolin és tropomiozin kölcsönhatása	46
IV. 4.1. Tropomiozin kötődése gelsolinhoz	46
IV. 4.2. Gelsolin hatása az aktin filamentumra	48
IV. 4.3. Gelsolin polimerizációra gyakorolt hatásának változása tropomiozin jelenlétében	49
IV. 4.4. Gelsolin által kiváltott aktin filamentum szétesés tropomiozin jelenlétében	51
IV. 4.5. Tropomiozin védő hatása gelsolinnal szemben az aktin filamentumon.....	57
V. Megbeszélés	60
VI. Összefoglalás.....	66
VII. Irodalmi hivatkozások.....	67
VIII. Köszönetnyilvánítás	80
IX. Értekezés alapjául szolgáló közlemények	81

I. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

I. 1. CITOSZKELETÁLIS RENDSZER

Az élő sejtek felépítésében részt vevő molekulák többnyire jellegzetes, szupramolekuláris szerkezetekbe szerveződnek. Ilyen például a fehérje alegységekből felépülő citoskeleton. Ez az eukarióta sejtek citoplazmájában előforduló fehérjerendszer meghatározza a sejtek alakját és mozgását. A citoskeleton szerveződése és kölcsönhatásai valamennyi eukarióta sejtben megtalálhatóak. Az eukarióta sejtek dinamikus fehérjevázrendszere specifikus fehérjepolimer filamentumokból felépülő rugalmas objektum, melynek fizikai tulajdonságai fontos szerepet játszanak a különböző mozgásformákban.

A citoskeletonális polimerek alegységeit nem kovalens, hanem másodlagos kötések kapcsolják össze, így a rendszer dinamikus, vagyis a felépülés és leépülés folyamatai állandóan jelen vannak. Az ellentétes irányú folyamatok aktuális sebességét a környezeti tényezők, mint a szabad filamentumvégek száma, asszociált fehérjék jelenléte és számos egyéb körülmény (pl.: pH, hőmérséklet, stb.) befolyásolja. A citoskeleton 3 fő filamentális rendszerből, illetve a hozzájuk kötődő fehérjékből áll. Ez alapján megkülönböztetünk mikrofilamentumokat, intermedier filamentumokat és mikrotubulusokat. A mikrofilamentumokat aktinból felépülő fonalak és a hozzájuk kötődő fehérjék alkotják. A mikrotubulusok merev polimerláncok, melyek eukarióta sejtekben tubulinból és a kapcsolódó fehérjékből épülnek fel, és különösen nagy mennyiségben található az idegsejtekben. Az intermedier filamentumok mechanikailag igen ellenállóak, és fontos szerepet játszanak a szöveti integritás fenntartásában. Szemiflexibilis polimereknek tekinthetőek, melyek csekély polimerizációs-depolimerizációs dinamizmust mutatnak (Bugyi et al. 2008; Vartiainen 2008).

I. 2. AKTIN

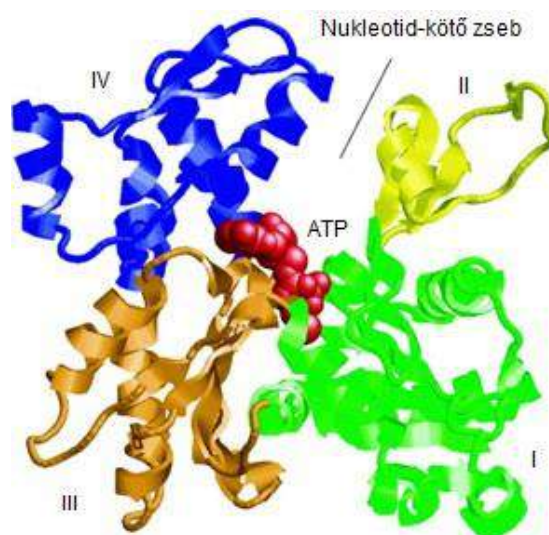
I. 2.1. AKTIN MOLEKULA SZERKEZETE

Az aktin az eukarióta sejtekben legnagyobb mennyiségben előforduló fehérje. 1942-ben Straub F. Brúnó magyar kutató és munkatársai fedezték fel nyúl vázizom

preparálása során. Később Straubnak sikerült a preparálást tökéletesíteni: acetonnal tisztította meg az aktomiozin komplexet. Az aktin izolálásának alapját napjainkban is ez a módszer képezi (Straub 1942).

A mikrofilamentumot alapvetően aktin alkotja, amelynek feladata a sejtek alakjának és mozgásának meghatározása, de szerepet játszik a sejten belüli transzportfolyamatokban, sejtmozgásokban, endo- és exocitózisban, fagocitózisban, és citokinézisben (Chowdhury, Popoff, and Zorec 2000; Pollard and Cooper 1986). A sejtmozgások közül fontos szerepe van a lamellipodium, filopodium képzésben, továbbá az intracelluláris folyamatok közül egyes vezikulumok mozgásáért felelős (Pollard 1995; Pollard, Blanchoin, and Mullins 2000; Pollard and Borisy 2003). Az aktin megtalálható a sejtmagban is, ahol a transzkripcióban és a jelátvitelben játszik szerepet (Castano et al. 2010; Grzanka, Grzanka, and Orlikowska 2004). Az aktin szerkezeti elemei főként β -lemez és β -kanyar struktúrák, továbbá a fehérje 40%-a tartalmaz α -hélixet.

Az aktin monomer 375 aminosavból felépülő, 42,3kDa molekulatömegű globuláris fehérje (Elzinga et al. 1973), amely szerkezetileg két doménre és doménenként két-két szubdoménre osztható. A két domén között található hasadékban pedig kation- és nukleotid-kötő helyek vannak (Kabsch et al. 1990).

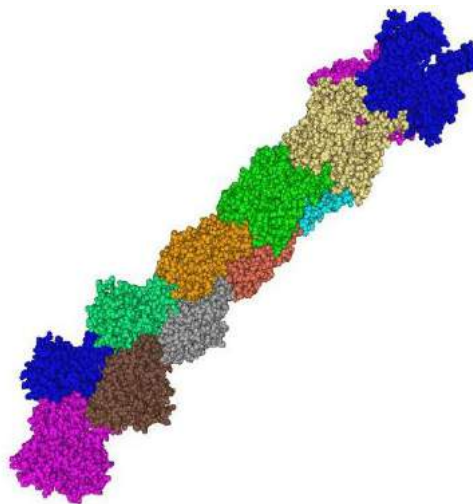


1. ábra: Aktin monomer szerkezete (Wear and Cooper 2004)

A két domén mérete és tömege is eltérő. Az 1-es és 2-es szubdomént együtt kis, a 3-as és 4-es szubdomént nagy doménnek nevezzük. A domének összekapcsolódási helyén ún. csuklópánt vagy „hinge” régió található, amely lehetővé teszi a két domén helyzetének változtatását. A molekula ezáltal tud nyitott és zárt szerkezetet felvenni, a kötött nukleotidtól függően. A kötött kétértékű kation a Mg^{2+} -ion vagy Ca^{2+} -ion lehet (Estes et al. 1992), amely a nukleotiddal együtt kötődik az aktinhoz. *In vivo* körülmények között a Mg^{2+} -ion a domináns, de laboratóriumi körülmények között Ca^{2+} -ionnal telítve állítják elő az aktint, mert az stabilizálja a fehérjét. A nukleotid-kötő helyhez ATP, vagy annak hidrolízisével keletkező $ADP+P_i$, illetve ADP kötődhet. A monomer aktin ATP jelenlétében tovább képes funkcionalitását megőrizni, mint az ADP-t kötő vagy nukleotid-mentes aktin, mely utóbbi hamar denaturálódik.

I. 2.2. AKTIN FILAMENTUM

Az ATP-t kötő monomer aktin molekulák összekapcsolódhatnak és filamentumot formálhatnak. A filamentum szerkezetét és kialakulását illetően több elmélet keletkezett, melyek közös eleme a 12nm széles kettős hélix szerkezet (Milligan, Whittaker, and Safer 1990). Az első elmélet szerint a filamentum egy balmenetes hélix, ahol a periódus 2,75nm, és monomerenként 166° -os szögelfordulást feltételez (Moore, Huxley, and DeRosier 1970). A másik elmélet szerint az aktin filamentum felfogható két protofilamentum összekapcsolódásából származó jobbmenetes alfa-hélixnek, ahol 13 monomer adja a 72nm-es menetemelkedés periódusát (Holmes et al. 1990).



2. ábra: Aktin filamentum. Az egyes monomereket különböző színek jelölik
(Protein Data Bank: 3G37-es kód)

A fizikai-kémiai körülmények meghatározzák a monomerek beépülési sebességét, vagyis asszociációs sebességi állandóját, és a monomerek leválási sebességét, vagyis disszociációs sebességi állandóját. Ahogy növekszik a filamentum, a szabad monomerek felhasználódnak és csökken a szabad monomerek koncentrációja a filamentum vég környezetében, amíg el nem ér egy konstans értéket. Ebben a koncentrációban a monomerek beépülési sebessége megegyezik a leválási sebességükkel. Ezt nevezzük kritikus koncentrációnak (C_k), ami kiszámolható az alábbi egyenlettel:

$$C_k = \frac{k_d}{k_a} = \frac{1}{K}$$

k_a : monomerek asszociációs sebességi állandója

k_d : monomerek disszociációs sebességi állandója

K : egyensúlyi állandó

A filamentum szerkezeti polarizáltsága miatt azonban a kritikus koncentráció a két végen nem egyforma, a "mínusz" (hegyes) végen nagyobb, mint a "plusz" (szöges) végen. Ennél alacsonyabb aktin koncentráció mellett az aktin adott körülmények között nem képes polimerizálni, e feletti érték esetén az asszociációs és disszociációs folyamatok a filamentum növekedéséhez vezetnek. Vázizomból preparált, magnéziumot kötő ATP-aktin szöges vége esetén ez a koncentráció 120nM (Pollard 2007). Ezt az értéket számos tényező befolyásolhatja, mint pl. az aktin-kötő fehérjék, vagy a környezet ion- és nukleotid tartalma.

A filamentum tehát a monomerek összekapcsolódása, azaz a polimerizáció révén alakul ki. A folyamat 3 lépésre bontható. Először a lag fázis során polimerizációs centrumok alakulnak ki. Aktin esetében a monomerek elsőként dimereket, majd trimereket képeznek. Ezt nevezzük nukleusznak. A dimerek illetve trimerek instabilitása miatt a nukleáció fázisa egy lassú folyamat. A komplexet jellemző sebességi állandó dimer esetén $K_D = 10^5 \mu\text{M}$, trimerek esetén $K_D = 10^{-100} \mu\text{M}$ (Pollard and Cooper 1986).

A következő szakaszt nevezzük elongációnak vagy log fázisnak, mely során további monomerek kapcsolódnak a filamentumhoz. Amíg a nukleáció fázisa viszonylag lassú, addig a nukleuszokból induló filamentum felépülése egy sokkal gyorsabb folyamat, mely a filamentumok hosszanti növekedését eredményezi. Amikor aktin monomerek épülnek be a filamentumba, az általuk kötött ATP molekula ADP+P_i-vé hidrolizál. A sebességi állandók értékei a filamentum két végén különbözőek. Az egyik végen sokkal

gyorsabb a monomerek beépülése és leépülése, ezt nevezzük plusz vagy szöges végnek, míg a másik végén lassabb, ezt nevezzük mínusz vagy hegyes végnek.

A 2-es és 4-es szubdomének alkotják a hegyes, az 1-es és 3-as szubdomének a szöges véget. Pollard és munkatársai megfigyelték, hogy az ATP-t kötő szöges végén a $C_k=0,12\mu\text{M}$, a hegyes végén $C_k=0,6\mu\text{M}$. ATP-t kötő szöges végre jellemző asszociációs sebességi állandó $k_a=11,6\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, a disszociációs sebességi állandó pedig $k_d=1,4\text{s}^{-1}$ (2. ábra). Megfigyelései arra következtetnek, hogy az aktin dinamikája erősen függ a filamentum végén levő kötött és a közelében rendelkezésre álló szabad nukleotidtól (Fujiwara, Vavylonis, and Pollard 2007; Pollard 1986).

kötött nukleotid	vég	k^+ , $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	k^- , s^{-1}	k^-/k^+ , μM
Mg-ADP-actin*	szöges	2.9 ± 0.21	$5.4 \pm 0.14^+$	1.8 ± 0.14
	szöges		$(4.9 \pm 0.73)^-$	$(1.7 \pm 0.27)^\$$
	hegyes	0.09 ± 0.03	$0.25 \pm 0.04^+$	2.8 ± 1.0
Mg-ADP-P _i -actin*	szöges	3.4 ± 0.08	$0.2 \pm 0.1^+$	0.06 ± 0.03
	szöges		$(0.2 \pm 0.25)^-$	$(0.07 \pm 0.07)^\$$
	hegyes	0.11 ± 0.04	$0.02 \pm 0.02^+$	0.18 ± 0.30
Mg-ATP-actin ^β	szöges	11.6 ± 1.2	1.4 ± 0.8	0.12 ± 0.07
	hegyes	1.3 ± 0.2	0.8 ± 0.3	0.6 ± 0.17

* TIRF mikroszkóppal mért adatok

+ disszociációs folyamat közvetlen megfigyelése

- disszociációs sebesség illesztést követő becslése

§ becsült adatokból számolt értékek

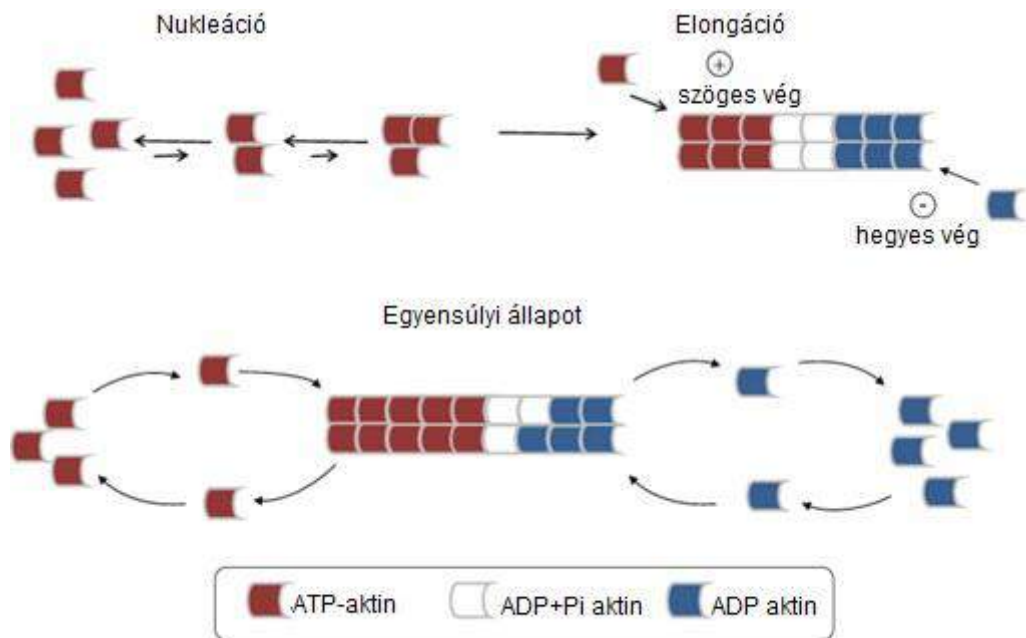
β korábban mért adatok

1. táblázat: *Filamentum végekre jellemző sebességi állandók ATP és ADP kötés esetén (Fujiwara et al. 2007)*

A beépülő monomerek 3-as és 4-es szubdoménje a filamentum tengelye felé, az 1-es és 2-es szubdomén a filamentum külső oldala felé fordul, így meghatározza a kötődő fehérjék reakcióképes felszínét (Holmes et al. 1990; Miki, O'Donoghue, and Dos Remedios 1992).

A hegyes végén a protomerek inkább ADP-t, a szöges végén inkább ATP-t illetve ADP+P_i-t kötnek. Ez a kötési különbség a filamentum egyirányú növekedéséhez vezet. A fehérjék a hegyes végről a szöges vég felé áramlanak, míg be nem áll egy dinamikus egyensúly, amely során a filamentum átlagos hossza állandó marad, mivel ugyanannyi idő alatt asszociálnak és disszociálnak a monomerek a filamentum végeiről. Ez azonban

csak a két vég kritikus koncentrációja közötti tartományban teljesül. Ezt a folyamatot taposómalomnak vagy treadmillnek is szokták nevezni (3. ábra).



3. ábra: Aktin polimerizáció folyamata (Kustermans, Piette, and Legrand-Poels 2008)

Az aktin polimerizációja egy megfordítható folyamat, vagyis a filamentum képes depolimerizálódni is. Ez nem tekinthető a polimerizáció ellentétének, mivel az aktin nem képes ADP+P_i-ből ATP-t előállítani. Míg az ATP forma egy stabil, rigidebb és inkább a filamentum meghosszabbítását segítő szerkezet, addig az ADP-kötés kevésbé merev protomer térszerkezetet eredményez (Janmey et al. 1990; Nyitrai et al. 2000), így a filamentum hajlékonyabbá válik és inkább a depolimerizációs leépülés felé tolódik az egyensúlya (M. F. Carlier 1991; M.-F. Carlier 1991; Nyitrai et al. 2000; Pollard, Goldberg, and Schwarz 1992). Az ATP-kötés és hidrolízis kulcsfontosságú szerepet tölt be az aktin filamentum felépítése és dinamikai tulajdonságainak meghatározása szempontjából (Cooper and Schafer 2000).

A sejtekben az aktin filamentumok kötegekké és hálózatokká szerveződnek és ebben a formában látják el a feladatukat. A kötegekben fehérjék által keresztkötött párhuzamos szálak találhatók. A hálózatokban a különböző orientációjú filamentumokból alakul ki egy gélszerű szerkezet. Az aktinköteg-képző fehérjék

kisméretű és merev szerkezetű molekulák. A köteggépző fehérjétől függ a filamentumok távolsága, s ez által mechanikai stabilitása. Például a fimbrin azonos polaritású szálakból szorosan pakolt köteget hoz létre, mely a sejtnyúlványok képződésében fontos. Ezzel szemben az α -aktinin sokkal szeparáltabb, flexibilis kötegeket hoz létre. A hálózatképző fehérjék nagyok és flexibilisek, akár merőleges filamentumokat is kereszt köthetnek. Az aktinhálózatok a plazmamembrán alatt helyezkednek el és a sejt felszínét erősítik.

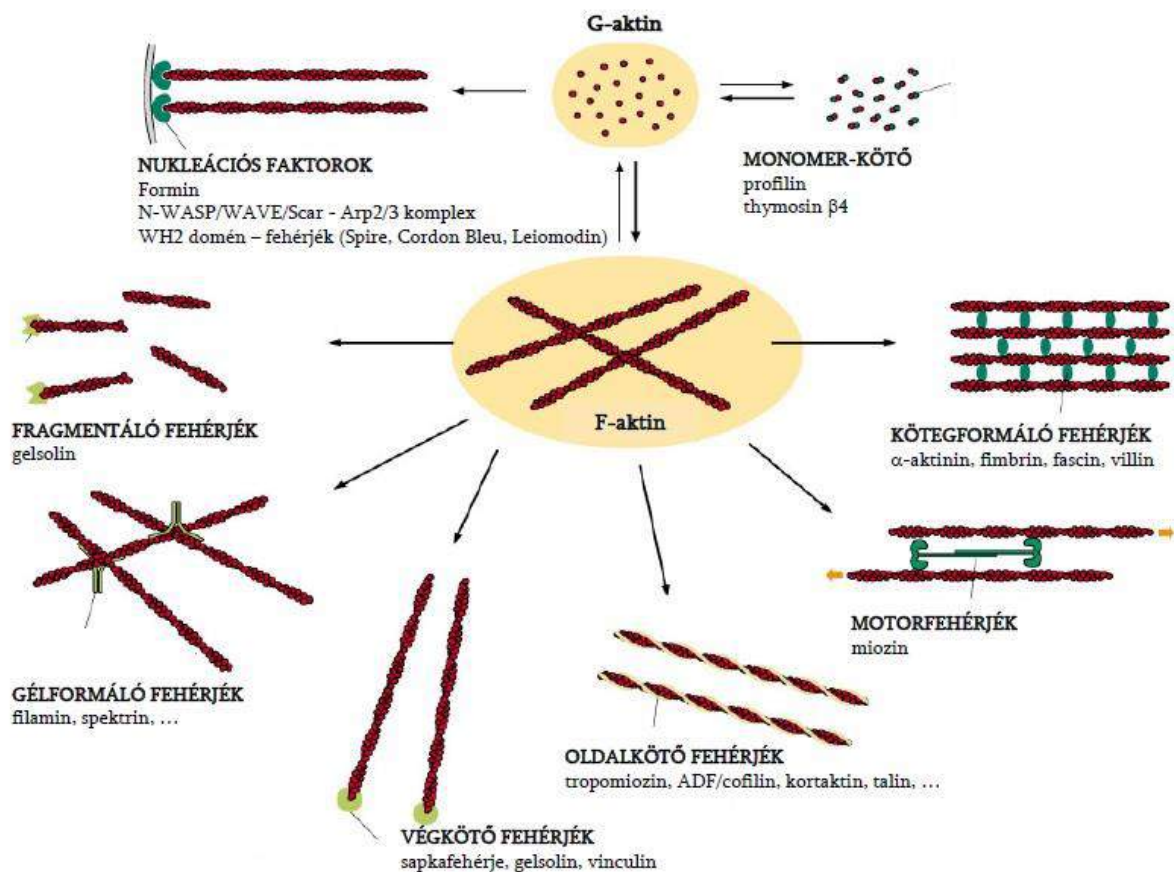
A mikrofilamentális szerkezet létrejöttében az aktin filamentumok kialakulásának helyét, idejét, irányultságát, a hálózat bonyolultságának mértékét és még sok jellemzőjét (pl.: rigiditását, más fehérjék kapcsolódását) számos aktinkötő fehérje szabályozza.

I. 3. AKTINKÖTŐ FEHÉRJÉK:

Az aktin monomerhez illetve filamentumhoz specifikusan kapcsolódó fehérjéket kötődésük és funkciójuk szerint csoportosíthatjuk.

Kapcsolódásuk szerint megkülönböztetünk monomerhez és filamentumhoz asszociálódó fehérjéket (4. ábra). Monomerhez kapcsolódva a profilin katalizálja a nukleotid cserét, a thymosin $\beta 4$ pedig szekvesztrálja a megkötött monomert, vagyis megakadályozza annak filamentumba épülését. A nukleációs faktorként a formin az Arp2/3 komplex és a WH2 domén-fehérjék gyorsítják a filamentumok kialakulását.

A filamentumhoz kapcsolódó fehérjék közül a végkötő fehérjéket sapka fehérjéknek is szokás nevezni, ilyen például a gelsolin, és a vinculin. Ezek a fehérjék lényegében lezárják a filamentumnak azon végét, amelyhez kapcsolódtak, ott sem polimerizáció, sem depolimerizáció nem történik. A filamentum oldalához kapcsolódó fehérje például az ADF/cofilin, a tropomiozin vagy a kortaktin. Szintén filamentumhoz kapcsolódik a miozin, mely motorfehérjeként funkcionál. Köteggéformáló fehérje a villin, fimbrin, fascin és az α -aktinin. A filamentumok feldarabolásáért a fragmentáló fehérjék a felelősek, mint a gelsolin. Gélformáló fehérje pedig a filamin és a spektrin (4. ábra).



4. ábra: Aktinkötő fehérjék (Alberts et al. 2014)

I. 3.1. TROPOMIOZINOK:

A tropomiozin szerkezetileg a mikrofilamentum alapeleme az aktin mellett (Vindin and Gunning 2013).

A tropomiozin megnyúlt, α -helikális szerkezetű párhuzamos láncú ún. coiled-coil formában előforduló fehérje, mely dimereket alkot. Az egyes dimerek vég-vég kapcsolódással húzódnak az aktinszál mindkét oldalán annak hossz tengelye mentén (Coulton et al. 2008). Egy tropomiozin dimer 7 aktin alegységgel van kölcsönhatásban (Flicker, Phillips, and Cohen 1982). A tropomiozinok pontos funkcióit még ma sem tárták fel teljesen, így még sok információra van szükségünk, hogy világos képet kapjunk pontos szerepükről. Kémiai kísérletekkel nehezen vizsgálható fehérje, ugyanis hajlamos aggregálódni. Ezen kívül a tropomiozin dimerek csak kis affinitással ($K_d \sim 10^{-3}M$) kötődnek az aktin filamentumhoz (Wegner 1979). A legtöbb aktinkötő fehérjével ellentétben a tropomiozinok ionos kölcsönhatásokon keresztül kapcsolódnak az aktinhoz,

így lényegében „úsznak” az aktin filamentum felszínén (von der Ecken et al. 2014). A tropomiozinnek számos izoformája létezik és az egyes izoformáknak számos funkcióját leírták már, mégis sok izoforma pontos feladata ismeretlen napjainkban is. Emlősök esetében négy tropomiozin gén ismert, melyről több mint 40 mRNS íródik át, majd ezekből 25 különböző tropomiozin fehérje keletkezhet. Ezek közül a méréseinkhez fontos izoformákat az 5. ábra mutatja. Az egyes izoformák különböző tér- és időbeli mintázatot mutatnak a neurogenesis során. Az izoformák expressziója és lokalizációja szigorúan szabályozott mind szöveti, mind sejten belüli szinten és gyakran függ a fejlődési állapotuktól (Gunning et al. 2005; Gunning, O’neill, and Hardeman 2008). Ez azt sugallja, hogy funkciójuk specializálódott a különböző neuronális érési folyamatokhoz.

Tpm1 gén (genelD: 24851) Génstruktúra					
rövid név	közismert név	egyéb alternatív név	hivatalos fehérje név	csatlakozási szám teljes hosszúságú szekvencia	exonok
Tpm1.1	Tm sk α	α Tm, fast skTm, cardiac Tm, striated Tm	Tpm1.1st (a.b.b.a)	Human: NP_001018005.1 Mouse: NP_001157720.1 Rat: NP_001288265.1	1a.2b.3.4.5.6b.7.8.9a 1a.2b.3.4.5.6b.7.8.9a
Tpm1.6	Tm2	–	Tpm1.6cy (a.b.b.d)	Human: NP_001018004.1 Mouse: NP_077745.2 Rat: NP_001029241.1	1a.2b.3.4.5.6b.7.8.9d 1a.2b.3.4.5.6b.7.8.9d
Tpm1.8	Tm5a	–	Tpm1.8cy (b.-.b.d)	Human: NP_001288218.1 Mouse: NP_001157724.1 Rat: NP_001029245.1	1b. . . . 3.4.5.6b.7.8.9d 1b. . . . 3.4.5.6b.7.8.9d
Tpm1.12	TmBr3	Tmbr3, Tmbr3-1 Tm α -1.6	Tpm1.12br (b.-.b.c)	Human: NP_001018008.1 Mouse: NP_001157728.1 Rat: NP_001288665.1	1b. . . . 3.4.5.6b.7.8.9c 1b. . . . 3.4.5.6b.7.8.9c
Tpm3 gén (genelD:24851) Génstruktúra					
rövid név	közismert név	egyéb alternatív név	hivatalos fehérje név	csatlakozási szám teljes hosszúságú szekvencia	exonok
Tpm3.1	Tm5NM1	–	Tpm3.1cy(b.-.a.d)	Human: NP_705935.1 Mouse: NP_001240667.1 Rat: NP_775134.1	1b. . . . 3.4.5.6a.7.8.9d 1b. . . . 3.4.5.6a.7.8.9d
Tpm3.2	Tm5NM2	–	Tpm3.2cy(b.-.b.d)	Human: NP_001036816.1 Mouse: NP_001240669.1 Rat: none	1b. . . . 3.4.5.6b.7.8.9d 1b. . . . 3.4.5.6b.7.8.9d

5. ábra: Méréseink során használt izoformák használatban lévő nevei és génszerkezete (Geeves, Hitchcock-DeGregori, and Gunning 2014)

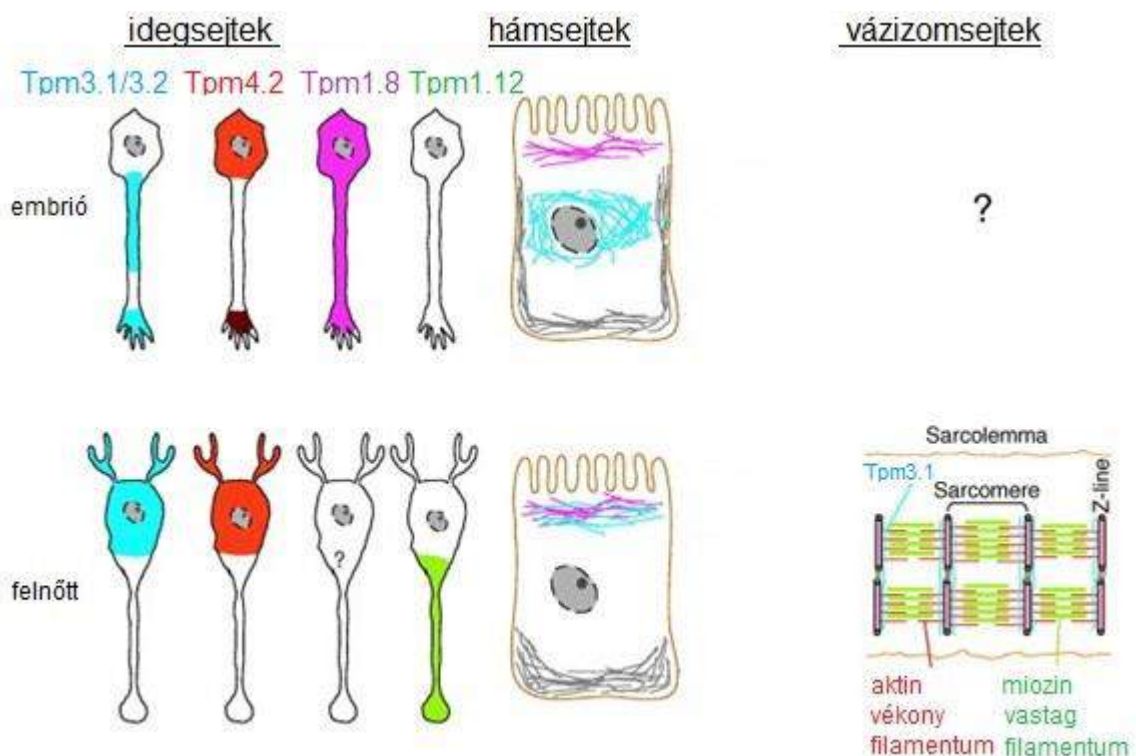
A harántcsíkolt izomban az aktin filamentum a vázizom (szkeletális) tropomiozinnal és a troponin-kompleksszel együtt alkotja a vékony filamentumot. A troponin komplex három alegységből áll: T, I és C. A T alegység a tropomiozin és az aktin egymáshoz viszonyított helyzetét határozza meg. Az I alegység Ca^{2+} ionok hiányában a tropomiozinon keresztül gátolja a miozin aktin filamentumhoz kapcsolódását. Kalciummentes közegben, vagyis kisebb, mint 10^{-6} M Ca^{2+} jelenlétében, amikor a TnC nem köt kalciumot, az inhibitoros TnI alegység elfedi az aktin miozin kötésre alkalmas régióját, így az izom relaxált állapotban van. Ha a kalcium szintje eléri a 10^{-6} M értéket, a TnC Ca^{2+} -ot köt, eltávolodik a vékony filamentumtól és elhúzza magával az inhibitoros TnI alegységet is. Ez lehetővé teszi, hogy a tropomiozin molekulák visszaálljanak olyan helyzetbe, melyben szabaddá válnak a miozin kötőhelyek az aktin filamentum mentén. Az aktin-miozin kölcsönhatás, a kereszthíd kialakul. Megtörténhet az izom kontrakció.

A tropomiozinok előfordulnak mind állati mind gomba sejtekben. Idegrendszerben először Fine és munkatársai 1973-ban azonosították (Fine et al. 1973). Sejtbiológiai vizsgálatok azt mutatták, hogy a tropomiozin izoformák meghatározzák a különböző aktin filamentum populációk funkcióit (Gunning et al. 2015).

Megfigyelték, hogy patkányban a Tpm1.12 (régi néven TMBR3) a 16 napos embrióban jelenik meg először, majd a születés idején alacsony szinten fordul elő a kisagyban, később folyamatosan növekszik a harmadik születési hétig (Weinberger et al. 1993).

A Tpm3.1 (régi néven TM5NM1) típus hasonlóan a Tpm3.2-höz (régi néven TM5NM2) a γ -génen kódolódik. A két típus mindössze a 6-os exonban tér el egymástól. A Tpm3.1-nél 6a, a Tpm3.2-nél 6b exon fordul elő. Mindkét izoforma a rövid tropomiozinok csoportjába tartozik, ellentétben például a Tpm1.6 és Tpm1.7 izoformával. Gateva és munkatársai TIRF mikroszkóppal vizsgálták az egyes típusok overexpresszió során tapasztalt hatásokat a filamentumra. Az említett hosszabb izoformák szoros kapcsolatban vannak az aktin filamentummal, és védik azt az ADF/cofilinnel szemben. Ugyanakkor nincsenek hatással a nem izom típusú miozin IIa-ra, ellentétben a Tpm3.1 és Tpm3.2 rövid izoformák segítik a miozin IIa ATPáz aktivitását, de nem védik a filamentumot az ADF/cofilin-től. Ez is bizonyítja, hogy az egyes tropomiozin izoformák határozzák meg a mikrofilamentum populáció számos sajátosságát (Gateva et al. 2017).

Rágcsálók embriójában megfigyelték, hogy a Tpm3.1/Tpm3.2 mind mRNS, mind fehérje szinten jelen van a differenciálódó neuronok axon pólusaiban egészen a ~7. napig (Hannan et al. 1995), majd néhány nap elteltével az axonba helyeződik át. A szülés előtti 15-17 nap körül ezen tropomiozinok mRNS-e eltűnik az axonból, ami egybeesik a Tpm1.12 megjelenésével. Fehérje szinten a Tpm3.1 és aTpm1.12 közötti váltás a 17. embrionális nap körül jelenik meg. Hasonló eredményeket kaptak csirkében is, ami azt mutatja, hogy más evolúciós szinten sem változik a folyamat (Weinberger et al. 1996). További tanulmányokban specifikus antitestek segítségével kimutatták, hogy míg a Tpm3.2 az axon nyúlványban fordul elő (Schevzov et al. 1997), addig a Tpm3.1 a növekedési kúp külső régióiban azonosítható (Schevzov et al. 2005). A Tpm3.1-et és Tpm1.12-öt, a funkciójuk közötti eddig megfigyelt különbségek és azok jobb megértése miatt választottuk munkánk alanyainak.



6. ábra: Néhány tropomiozin izoforma előfordulása az egyes sejttípusokban (Gunning et al. 2005)

A Tpm3.1 izoformáról kimutatták, hogy egerekben szabályozza a sejt méretét és a sejtproliferációt (Schevzov et al. 1997), továbbá hámsejtekben szükséges a sejt-sejt kapcsolat stabilitásához (Caldwell et al. 2014). A Tpm3.1 stabilizálja a fokális adhéziót

azáltal, hogy befolyásolja a paxillin foszforilációját (Bach et al. 2009). Elősegíti a stresszrostok kialakulását, amelyek képesek ezáltal ellenállni az aktin filamentum depolimerizálódásának (Creed et al. 2008). Tpm3.1 és Tpm3.2 hiánya a vázizom morfológiai és funkcionális jellemzőire is hatással van. A Tpm3.1 elvesztése a T-tubulusokból, azok súlyos morfológiai károsodásával jár (Vlahovich et al. 2009).

Látható, hogy a tropomiozin izoformák funkciója igen sokrétű. Ennek feltérképezése még sok munkát ad a kutatóknak, ami előrébb lendíti ennek az egyszerűnek tűnő fehérjének a pontos megismerését.

I. 3.2. NUKLEÁCIÓS FAKTOROK:

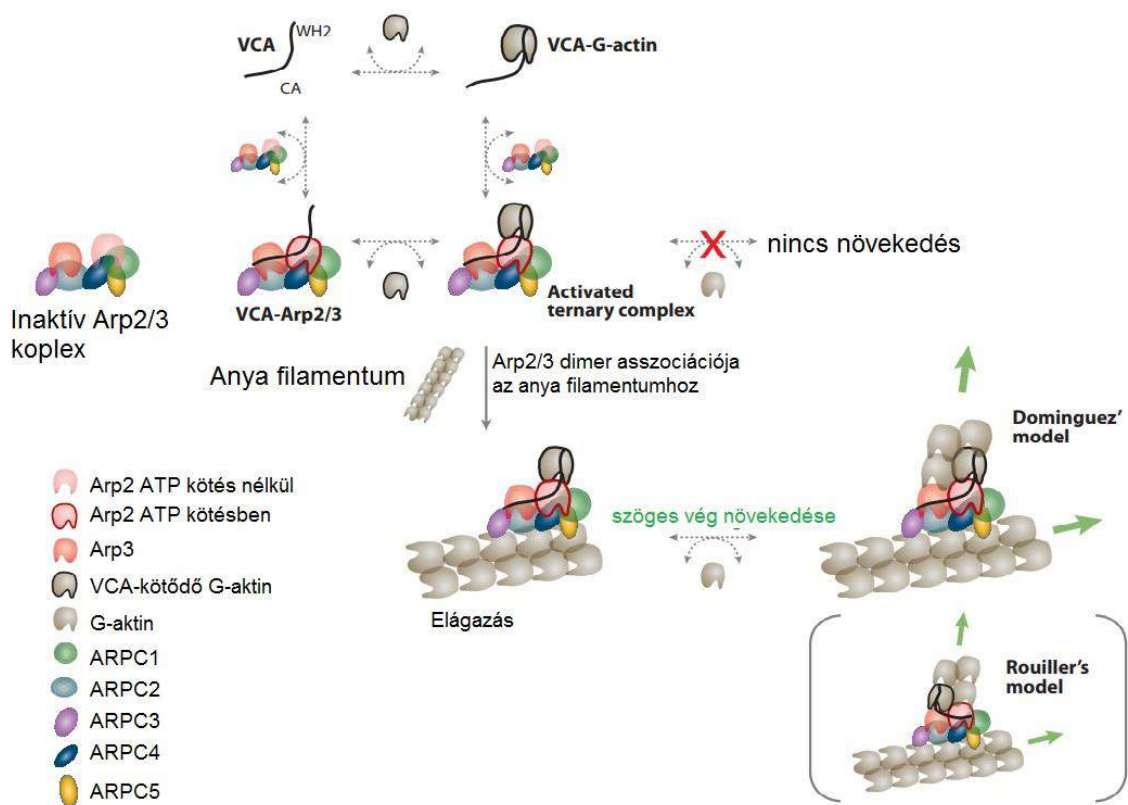
A nukleáció a spontán polimerizáció leglassabb szakasza, így ennek sebessége meghatározza az egész polimerizációs folyamat kinetikáját. Napjainkban négy fő összeszerelő faktor ismert, melyek képesek aktin monomerekből új aktin láncok képződését elindítani a nukleáció katalizálása révén. Ezek a formin fehérjék (Pruyne et al. 2002; Sagot, Klee, and Pellman 2002), a Spire (Quinlan et al. 2005), a Cordon-bleu (Ahuja et al. 2008) és az Arp2/3 komplex (Mullins, Heuser, and Pollard 1998; Welch et al. 1997; Welch and Mitchison 1998). A formin, a Cordon-bleu és Spire fehérjék elágazás mentes láncok kialakításáért felelnek. Amíg a Spire a mínusz véghez kötődik (Quinlan et al. 2005), addig a forminok és a Cordon-bleu a plusz véghez kapcsolódnak (Ahuja et al. 2008; Pruyne et al. 2002; Sagot et al. 2002). Az Arp2/3 komplex az elágazó láncú filamentumok kialakításáért felelős és az aktin filamentumok mínusz végéhez kötődik (Mullins et al. 1998).

VCA-Arp2/3:

Az elsőként felfedezett nukleációs faktor az Arp2/3 („Actin-Related Proteins”) fehérjekomplex volt (Pollard 2007). Az Arp2/3 (actin-related protein) komplex egy 7 alegységből álló nukleációs faktor. Az Arp2 és Arp3 alegységek az aktin monomerhez hasonló szerkezetet mutatnak, beleértve az ATP-kötő zsebet is, azaz az aktinnal rokon fehérjének tekinthetők (Machesky et al. 1994). Mindkét alegység képes ATP-t kötni, azonban jóval kisebb affinitással mint az aktin. Az ATP-t ADP+P_i-re hidrolizálni csak az Arp2 alegység képes. A komplex önmagában nem képes aktin monomerekből új láncok képződését elindítani, hanem a már létező filamentumok oldalához kötődve segíti elő

újabb filamentumok nukleációját, melyek a szöges végükön növekedhetnek filamentummá.

Az Arp2/3 komplex ismert aktivátorai a WASP (Wiscott-Aldrich Syndrome Protein), az N-VASP, a Scar/WAVE illetve a Cortactin fehérjék. Mindegyikük közös jellemzője, hogy tartalmaznak egy ún. VCA régiót, mely aktiválja az Arp2/3 komplexet. Az Arp2/3 komplexhez kapcsolódik a VCA, ezáltal megváltozik a komplex konformációja és egy szabad aktin monomert köt. A képződött trimer rákapcsolódik a már polimerizálódott filamentum oldalára, ahol a további monomerek kapcsolódása egy oldalágat eredményez (Bugyi and Carlier 2010). Így elmondhatjuk, hogy a komplex által rövid, de elágazásokban gazdag filamentum hálózat alakul ki a membrán közeli területeken (Higgs and Pollard 2001).



7. ábra: Arp2/3 komplex aktiválódása (Bugyi and Carlier 2010)

I. 3.3. GELSOLIN:

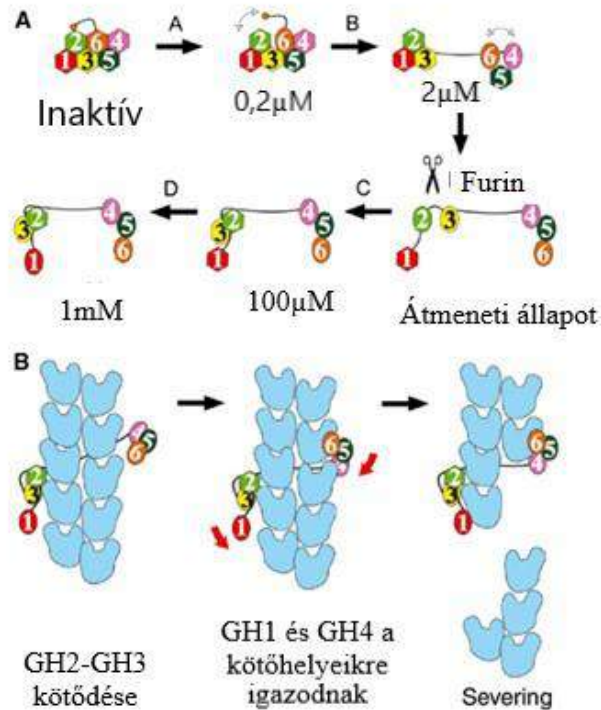
A gelsolin egy 82 kDa méretű fehérje, mely a gelsolin szupercsalád fehérjéi közé tartozik a CapG, adnexin, flightless I, advillin, villin, villin-szerű fehérje, szupervillin mellett (Schleicher et al. 1988; Sklyarova et al. 2002). A gelsolin 6 gelsolin-homológia domént tartalmaz, melyek elnevezése az N terminálistól a C terminális felé haladva sorrendben: GH1-GH6. A gelsolin mind intracellulárisan (pl.: citoszolban, mitokondriumban), mind extracellulárisan (pl.: vérplazmában) megtalálható (Koya et al. 2000).

A gelsolin valójában az aktin dinamikájának egy többfunkciós szabályozója. Egyrészt a már kialakult filamentumokat darabolja szét a protomerek mentén (severing). Másrészt hasítást követően sapkaféjeként az újonnan keletkezett plusz véghez kötődik, így megakadályozza annak növekedését, ezáltal a mínusz vég depolimerizációja lesz a domináns, ami a filamentum rövidüléséhez vezet. Mindemellett képes aktin monomerek megkötésére is. Egy gelsolin molekula két aktin monomert tud megkötni (Li et al. 2012; McGough et al. 2003; Silacci et al. 2004).

A gelsolin Ca^{2+} -kötő helyekkel rendelkezik, és a Ca^{2+} ion kapcsolódása által aktiválódik a fehérje. Az inaktív állapotban lévő gelsolin olyan szerkezetet vesz fel, hogy az összes aktinkötő régiója gátolva van (Burtnick et al. 1997). A GH6-os régió rendelkezik egy helikális szerkezetű farok résszel, mely reteszként szolgál, és a Ca^{2+} ion koncentrációjától függően elzárja vagy kinyitja az aktin-kötő helyeket. Ca^{2+} ion kötődésekor a gelsolin aktiválódik, és konformáció-változáson megy át. A GH6 régió észleli a Ca^{2+} iont és a gelsolin a GH1-GH3 és a GH4-GH6 közti régióban eltávolodik egymástól (8. ábra), így felszabadítja a GH1, a GH2 és a GH4 aktin-kötő helyeit (Burtnick et al. 2004; Choe et al. 2002; Robinson et al. 1999). Ahhoz, hogy a gelsolin aktiválódási folyamata befejeződjön, további Ca^{2+} ionok kötődése szükséges a fehérje C-terminális felében (Ashish et al. 2007; Ditsch and Wegner 1995; Grzanka et al. 2004; Khaitlina, Walloscheck, and Hinssen 2004; Kinoshian et al. 1998; J. G. Kiselar et al. 2003; Janna G Kiselar et al. 2003; Lin et al. 2000; Pope, Maciver, and Weeds 1995).

Figyelembe kell vennünk, hogy az aktin megváltoztatja a gelsolin Ca^{2+} -kötő aktivitását, és kiváltja az aktiváló konformációs változásokat (Pope, Gooch, and Weeds 1997; Weeds et al. 1995). Alacsony pH mellett csökken az aktiváláshoz szükséges Ca^{2+} ion igény. A gelsolin filamentum daraboló hatásához szükséges Ca^{2+} ion koncentráció

pH=8,0 esetén 1mM, ezzel szemben pH=5,0 –nél már elegendő 40nM (Garg et al. 2011; Lamb et al. 1993; Lueck et al. 2000). Ezeket a gelsolin félmaximális hatásához szükséges koncentrációknak tekinthetjük.



8. ábra: Ca^{2+} ion indukálta gelsolin aktiválás és gelsolin aktin severingelő hatása. A számok a Ca^{2+} ion koncentrációt mutatják, a már Ca^{2+} iont kötő doméneket ovális alakkal ábrázolja. Kék szín jelzi az aktin protomereket (Burtnick et al. 2004)

Orlova és munkatársai rávilágítottak, hogy a filamentumok belső kooperativitással rendelkeznek, melynek eredményeként a különböző aktin-kötő fehérjék és ligandumok nagy hatótávolságú kölcsönhatásokon keresztül az egész filamentumra hatással lehetnek (Drewes and Faulstich 1993; Muhrad et al. 1994; Orlova et al. 2004; Orlova, Prochniewicz, and Egelman 1995). Kimutatták, hogy a filamentumok szöges végéhez kapcsolódó gelsolin hatására megváltozik a filamentumok konformációs állapota (Orlova et al. 1995). A létrejött konformáció változás a kötőhelyektől távolabbi régiókra is kiterjed, ami nagyfokú kooperatív kölcsönhatás következtében alakul ki. Ismert, hogy az aktin filamentum belső kooperativitása következményekkel jár például az izomban (pl.; hivatkozás).

Egerekben végzett vizsgálatok azt mutatják, hogy a gelsolin a többi aktin-daraboló fehérjéhez hasonlóan nem expresszálódik szignifikáns mértékben a korai embrionális szakaszban. Felnőtt egyedekben azonban különösen fontos. Gelsolin gént nem hordozó egerekben kimutatták, hogy normális embrionális fejlődésen mennek keresztül, de vérlemezkéjük deformációja csökkentette a mobilitást, így lassult a sebgyógyulás (Witke et al. 1995).

A tropomiozinok befolyásolják az aktinkötő fehérjék kapcsolatát a filamentummal, valamint az aktin szálak kölcsönhatását egymással (Blanchoin et al. 2001; Bugyi, Didry, and Carlier 2010; Hsiao et al. 2016). Az Arp2/3 és a cofilin viszont szabályozza a tropomiozin aktin filamentumhoz való kötődését. Hsiao és munkatársai azt találták, hogy *in vitro* körülmények között az Arp2/3 által létrehozott aktinhálózathoz a tropomiozin nem képes kötődni. Ha cofilin is jelen van, az elősegíti a foszfát disszociációját, ezáltal darabolja a filamentumot, még több hegyes véget létrehozva, amihez a tropomiozin kapcsolódhat és így megvédi a filamentumot a további cofilin hasítástól (Hsiao et al. 2016). Jelenlegi bizonyítékok azt sugallják, hogy a gelsolin egy evolúciósan ősből aktin szabályozó, mint a tropomiozin (Ghoshdastider et al. 2013; Gunning et al. 2015), így a tropomiozinok későbbi megjelenése lehetővé teszi az aktin filamentumok populációinak meghatározását. A gelsolin azon képessége, hogy az aktin filamentumot feldarabolja, szabályozza a filamentumhoz kötődni képes tropomiozin izoformákat. Korábbi tanulmányok azt is kimutatták, hogy a simaizom tropomiozin gátolhatja a gelsolin severing funkcióját, míg a nem izom tropomiozin izoformák különböző módon viselkedhetnek (Dabrowska et al. 1996; Ishikawa, Yamashiro, and Matsumura 1989). Ennek ellentmond Khaitlina és munkatársainak az eredményei, akik azt találták, hogy a tropomiozin csak akkor nyújt jelentős védelmet a gelsolinnal szemben, ha más aktinkötő-fehérjék is jelen vannak (caldesmon, nebulin). Ugyanakkor a gelsolin aktivitásának csökkenését a tropomiozin-gelsolin kapcsolódás okozhatja. Azt tapasztalták, hogy a gelsolin G3 és G4-es régiója kötődik a tropomiozinhoz. Nem polimerizáló körülmények között a tropomiozin nem gátolta az aktin:gelsolin komplex 2:1 arányú kialakulását és a gelsolin nukleációs aktivitására sem volt hatással. Ha a tropomiozin komplexet képez a gelsolinnal, annak filamentum daraboló képessége 80%-kal csökken. Ugyanakkor ha a tropomiozin az aktinhoz kapcsolódik, nem védi a filamentumot a gelsolin daraboló hatásától. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a tropomiozin nem csak a filamentum kötődésén keresztül, hanem oldatban, gelsolinhoz kötődve is befolyásolhatja az aktin

dinamikáját. Ez a funkciója a tropomiozinnak talán funkcionális jelentőséggel bírhat a citoskeletális rendszer átrendeződése folyamán (Khaitlina, Fitz, and Hinssen 2013). Ez is mutatja, hogy a tropomiozinok teljesen különböző funkcionális sajátosságokat biztosítanak az aktin filamentum számára.

II. CÉLKITŰZÉSEK

A tropomiozinokat évtizedek óta sokat tanulmányozzák, mégis az egyes izoformákra jellemző fiziko-kémiai tulajdonságok és funkcionalitásuk különbségei kevésbé ismertek. Az expressziós mintázatok szigorúan szabályozott változása összefüggésben állhat az egyes Tpm-variánsok idegsejten belüli szerepével a mikrofilamentumok dinamikájának és a nyúlványfejlődésnek az összehangolása terén.

A tropomiozin izoformák kötődése az aktin filamentumhoz nagyfokú kooperativitást mutat, melynek során a szomszédos tropomiozinok N- és C- terminálisai specifikusan kapcsolódnak egymáshoz. Az aminosavszekvencia kisebb változtatása is befolyásolhatja az aktinhoz való kötődést és ennek következtében a tropomiozin funkcióját. Ahhoz, hogy jobban megértsük a Tpm1.12 és Tpm3.1 izoformák működését a sejten belül, aktinnal való kölcsönhatásukat kívántuk vizsgálni biokémiai és biofizikai megközelítésben.

Céljainkat röviden az alábbi pontokba soroltuk:

- 1) Az átfedő exonhasználat miatt nem lehetséges teljesen specifikus ellenanyagokat vagy „antisense” próbákat létrehozni, ezért bakteriális expressziós rendszerben egyedi tropomiozin izoformákat kívántunk előállítani. Célul tűztük ki, hogy neuronspecifikus, tag-mentes Tpm1.12 és Tpm3.1 rekombináns fehérjéket készítsünk.
- 2) Elsőként a klónozott Tpm1.12 és Tpm3.1 izoformák aktin filamentumhoz való kötődését kívántuk meghatározni koszedimentációs esszé segítségével.
- 3) Az egyes izoformáknak az aktin filamentum felépülésére gyakorolt hatását polimerizációs tesztek segítségével kívántuk vizsgálni.
- 4) Korábbi tanulmányok már vizsgálták néhány tropomiozin hatását a VCA-Arp2/3 komplexre, mely során felfedezték, hogy a Tpm1.8 és a Tpm1.6 is gátolja a komplex nukleációs hatását (Blanchoin et al. 2001; Bugyi et al. 2010). Kutatásaink célja közt szerepelt a Tpm1.12 és Tpm3.1 izoformák hatásának megismerése a VCA-Arp2/3 komplex által katalizált aktin polimerizációra.

- 5) Annak megismerésére, hogy ezen tropomiozinok mennyire stabilizálják az aktin filamentumot, depolimerizációs tesztekét kívántunk végezni
- 6) Szintén korábbi mérések már bebizonyították a gelsolin és tropomiozin kötődését (Khaitlina et al. 2013; Koepf and Burtnick 1992), valamint a gelsolin aktin filamentumra kifejtett hatását. Ezért kíváncsiak voltunk, hogy a Tpm1.12 és Tpm3.1 képes-e kötődni a gelsolinhoz.
- 7) Vizsgálni kívántuk, hogy ezen tropomiozinok védelmet nyújtanak-e az aktin filamentum számára a gelsolin depolimerizáló hatásával szemben.
- 8) Továbbá kíváncsiak voltunk, hogy miként változik a gelsolin aktivitása, ha a tropomiozinnal komplexet képez. Befolyásolja-e az aktin filamentum végek dinamikáját, polimerizációját és depolimerizációját ha a gelsolin komplexet képez a tropomiozinnal?

III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

III. 1. KÍSÉRLETEKHEZ HASZNÁLT FEHÉRJÉK ELŐÁLLÍTÁSA

III. 1.1. AKTIN PREPARÁLÁSA:

Az aktint nyúl hátsó vázizmaiból preparáltuk több lépésen keresztül (Spudich and Watt 1971). A vázizomból először ún. acetonforgácsot készítettünk, majd azt feloldottuk A-pufferben, melynek összetétele: 4mM Tris/HCl, 0,2mM ATP, 0,1mM CaCl₂, 0,005% NaN₃, 0,5mM 2-merkaptotanol vagy DTT, pH:7,3. Jégen kevertettük fél órán át, majd leszűrtük 4 rétegű steril gézlapon. A leszűrt forgáccsal megismételtük ezt a lépést majd a két szűrletet összeöntve lecentrifugáltuk (Beckmann MLA-80 rotor, 4°C, 100.000g, 30 perc). A centrifugálás után a felülúszót 2 órán át szobahőmérsékleten polimerizáltuk 50mM KCl, és 2mM MgCl₂ hozzáadásával, majd 0,8M KCl hozzáadásával lassú, folyamatos kevertetés mellett megtisztítottuk a miozin szennyeződéstől. Ezt követően újra lecentrifugáltuk (Beckmann MLA-80 rotor, 4°C, 100.000g, 30 perc). A pelletet 2 órán át jégen duzzasztottuk, majd homogenizáltuk és egy éjszakán át dializáltuk A-pufferben. Következő nap egy újabb centrifugálást követően (Beckmann MLA-80 rotor, 4°C, 100.000g, 30 perc) tovább tisztítottuk az esetleges további fehérje szennyeződésektől Superdex G75 (GE Healthcare) gélfiltrációs oszlopon. Az aktin koncentrációjának meghatározását Shimadzu UV-2100 spektrofotométerrel végeztük, amely során az aktin extinkciós együtthatójának 0,63 ml·mg·cm⁻¹ értéket vettük a 290 nm-en és 1,11ml·mg⁻¹·cm⁻¹ 280nm-en mért abszorbancia esetén (Houk and Ue 1974).

III. 1.2. PIRÉN-JELÖLT AKTIN ELŐÁLLÍTÁSA:

Fluoreszcencia mérések során az aktint pirenil-jódacetamid (továbbiakban „pirén”) jelöltük (Kouyama and Mihashi 1981). A pirén kovalensen kötődik az aktin 374-es pozícióban lévő cisztein aminosavához (Criddle, Geeves, and Jeffries 1985). A pirén monomer aktin kötődés esetén alacsonyabb jelet ad, mint amikor filamentumban lévő aktinhoz kötődik, így tudjuk követni a filamentum felépülését. Filamentális aktin esetében a pirénmolekulák rendezetten egymás közelében maradnak és ez nagyobb fluoreszcencia jelet ad.

A jelölés előtt az aktint dializáljuk MEA-mentes A-pufferben, majd kihígítjuk 1mg/ml-re, és polimerizáljuk 100mM KCl és 2mM MgCl₂ jelenlétében 2 órán át szobahőmérsékleten. Ezt követően 1,1 tömegszázalékban (0,0011mg/ml) adunk hozzá 5mg/ml koncentrációjú DMSO-ban feloldott pirént, majd szobahőn jelöljük 18 órán keresztül fénytől elzárva, állandó, lassú kevertetés mellett. A jelölést követően a mintát centrifugáltuk (Beckmann MLA-80 rotor, 80.000rpm, 4°C-on, 45 perc), majd a pelletet duzzasztottuk 1 órán keresztül A-pufferben, majd homogenizáltuk. Az aktin oldat térfogatának minimum 200-szoros mennyiségű A-pufferben dializáltuk, ezáltal biztosítottuk a be nem kötött festék molekulák eltávolítását az aktin molekulák mellől, így minimálisra csökkent a szabad pirén molekulák mennyisége az oldatban. Végül tisztító centrifugálás következett (Beckmann MLA-80 rotor, 80.000rpm, 4°C-on, 30 perc).

A pirén-jelölt-aktin koncentrációjának meghatározásához a pirén extinkciós koefficienseként $2,2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ -nek vettük 344 nm-en. A mérések során 5%-os jelölési koncentrációkat alkalmaztunk, melyet úgy értünk el, hogy megfelelő arányban kevertük össze a jelölt és jelöletlen G-aktin oldatunkat, figyelembe véve, hogy a jelölt oldatunk is tartalmazott jelöletlen aktin molekulákat.

III. 1.3. TROPOMIOZIN TPM1.12 ÉS TPM3.1 KLÓNOZÁSA:

Egér Tpm1.12 tropomiozin konstrukciót pET28a plazmidba klónoztunk, mely az N-terminálison egy FXa-proteáz felismerőhelyet tartalmazott. A Tpm3.1 fehérje esetében teljes mRNS-ből kiinduló reverz transzkripció és PCR segítségével cDNS-t állítottunk elő. A PCR primerek a következők voltak: Tpm1.12 esetében a forward primer: 5'-TAT TTT CAG ATG GCG GGG AGT AGC TCG CT -3'; reverse primer: 5'- TCT AAG CTT TTA ATC CTC ATT CAG GGC CA -3'. Tpm3.1 esetében a forward primer: 5'-TAT TTT CAG ATG GCC GGG ACC ACC ACC ATC -3'; a reverse primer 5'- TCT AAG CTT TTA CAT CTC GTT CAG GT -3'. A *HindIII* restrikciós endonukleáz felismerő hely aláhúzással van jelölve. A PCR program a következő volt: 95°C-on 5 perc, 38 ciklus, 95°C-on 30 s denaturáció, 50°C-on 1 percig annealing és 72°C-on 1 percig szintézis, majd 72°C-on 5 percig. Egy második PCR körben egy *EcoRI* restrikciós endonukleáz (aláhúzva), valamint egy ProTEV proteáz hasítóhelyet (kettős aláhúzás) klónoztunk az N-terminális szekvenciához az alábbi forward primer segítségével: 5'- CTC GAA TTC

GAA AAC CTG TAT TTT CAG ATG -3', míg a reverse primer az előző maradt. Az ekkor alkalmazott PCR program: 95°C-on 5 perc, 40 ciklus, 95°C-on 30s denaturáció, 58°C-on 1 percig annealing és 72°C-on 1 percig szintézis, majd 72°C-on 5 percig. Az inszert nukleinsav-sorrendjét szekvenálással ellenőriztük. A PCR terméket 6xHis/pET28a expressziós plazmidba klónoztuk az *EcoRI* és *HindIII* hasítóhelyek közé. A rekombináns fehérjét *E.coli* BL21 (DE3) sejtekben expresszáltuk 30 µg/ml kanamicin szelekciós antibiotikum mellett. A kiskultúrát 3l Luria Broth tápközegben növesztettük OD₆₀₀ 0,6-0,8 közé 37°C-on, majd 1mM IPTG-vel indukáltuk 4 órán át 37°C-on. Ezt követően a tápoldatot lecentrifugáltuk és a pelletet -20°C-on tároltuk.

III. 1.4. TROPOMIOZIN TPM1.12 ÉS TPM3.1 PREPARÁLÁSA:

A klónozott *E.coli* BL21 (DE3) sejteket kiolvasztottuk feltáró pufferben, melynek összetétele: 50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 10mM imidazol, 10mM 2-merkaptóetanol, 1% Triton X, pH=8,0. A sejtekhez hozzáadtunk továbbá 0,2mM PMSF, 5mM MgCl₂, 2µg/ml DNáz enzimet, valamint 1x proteáz inhibitor keveréket (Sigma). Az elegyet homogenizáló csőben 15-20-szor homogenizáltuk jégen és 5x1 percig szonikáltuk (80% intenzitás, 0,4ms impulzus). Ezt követően centrifugáltuk (Sorvall T-1250 rotor, 4°C, 6000g, 15 perc) a mintát, majd a felülúszót feltáró pufferrel ekvibrált Ni-NTA oszlopra kötöttük 1 óra 4°C-os kevertetés mellett. Imidazol koncentrációs sorral (5, 10, 20, 40, 250mM) eluáltuk a fehérjét az oszlopról majd elektroforézissel ellenőriztük a mintákat. A tropomiozint tartalmazó frakciókat egy éjszakán át dializáltuk 1mM Na-foszfát puffer, 1M KCl és 2,5mM DTT, pH=7,0 jelenlétében, előkészítve ezzel a hidroxipatit CHT anion cserélő oszlopon való tisztításra. Az oszlopról 300mM Na-foszfát puffer, 1M KCl, 2,5mM DTT, pH=7,0 pufferrel eluáltuk, majd a fehérjéket tartalmazó frakciókat újra dializáltuk 100mM KCl, 5mM Tris, 10mM 2-merkaptóetanol pH=7,8 jelenlétében. Ezután TEV-proteáz segítségével a tropomiozinnal lehasítottuk a His-tag régiót. Tpm1.12 esetében a térfogat 30-ad, Tpm3.1 esetén a térfogat 50-ed része a TEV-proteáz. Az emésztést 3 órán át 37°C-on végezzük, majd újabb Ni-NTA oszlopon való tisztítással elválasztottuk a tropomiozint a His-taget és TEV-proteáz tartalmazó frakciókat. Végül egy tisztító centrifugálást (Beckmann MLA-80 rotor, 100.000g, 4°C, 35 perc) követően ellenőriztük agaróz gélen az esetleges DNS-szennyeződést, majd BCA fehérje esszé kittel megmértük a koncentrációját. A tisztítást követően a tropomiozinokat 0°C-on 10mM Tris-HCl, 100mM KCl, 1mM DTT, pH=7,8 pufferben tároltuk.

III. 1.5. SKTM PREPARÁLÁSA:

Az aktin preparálás során a kioldás után megmaradt, kinyomkodott forgácsot használtuk fel (Smillie 1982). A forgácsot éjszakán át kevertettük 4°C-on az alábbi pufferben: 5mM TRIS, 1M KCl, 0,5mM DTT, pH=7,0. Az áztatott forgácsot másnap 3 rétegű gézlapon átszűrtük és kinyomkodtuk. A szűrleten pH-vágásokat végeztünk. Az oldat pH-ját 0,1M-os HCl hozzáadásával levittük pH=4,6-ra, eközben a pH-t folyamatosan mértük. Kicsapódás után az oldatot jégen, hűtőben kevertettük 30 percig. A mintát centrifugáltuk (Sorvall, T-1250 rotor, 6000 g, 20 perc, 4°C). A pelletet visszaoldottuk az eredeti térfogat 80%-ának megfelelő 5mM TRIS, 1M KCl, 0,5mM DTT, pH=8,0 pufferben. Az oldat pH-ját 1M-os KOH hozzáadásával felvittük pH=8,0-ra, eközben a pH-t folyamatosan mértük. Az oldatot jégen, hűtőben kevertettük 30 percig, amit újabb centrifugálás követett (Sorvall, T-1250 rotor, 6000 g, 10 perc, 4°C). A továbbiakban a felülúszóval még kétszer megismételtük a pH-vágást, melyet ammónium-szulfátos kicsapás követett. Az utolsó felülúszóhoz 31,2g/100 ml ammónium-szulfátot adtunk, ügyelve, hogy a pH-t állandó értéken tartsuk. Újabb centrifugálást (11000 g, 30 perc, 4°C) követően felülúszóhoz 7,34g/100 ml ammónium-szulfátot adtunk állandó pH értéken tartva. 30 perces kevertetést követően centrifugáltuk (11000g, 1 óra, 4°C). A pelletet 5mM TRIS, 1mM DTT pH=7,8 pufferben visszaoldottuk és egy éjszakán át dializáltuk 1mM Na-foszfát puffer, 1M KCl és 2,5mM DTT, pH=7,0 jelenlétében, előkészítve ezzel a hidroxipatit CHT anion cserélő oszlopon való tisztításra. Az oszlopról 300mM Na-foszfát puffer, 1M KCl, 2,5mM DTT, pH=7,0 pufferrel eluáltuk, majd a fehérjéket tartalmazó frakciókat újra dializáltuk 100mM KCl, 5mM Tris, 10mM 2-merkaptotanol pH=7,8 jelenlétében. Végül megmértük a koncentrációját fotométer segítségével. 278nm-en mért abszorbancia esetén extinkciós koefficiensnek 0,24 ml·mg⁻¹·cm⁻¹-et használtuk (Spudich and Watt 1971).

III. 1.6. GELSOLIN PREPARÁLÁSA:

Gelsolin előállításához a teljes hosszúságú His-tag régiót tartalmazó szekvencia pET21d(+) vektorba klónozott plazmid rendelkezésünkre állt (Nag et al. 2009). A plazmidot *E.coli* BL21 (DE3) sejtekben transzformáltuk, majd sejt kultúrát növesztettünk 30 µg/ml kanamicin szelekciós antibiotikum mellett. A kiskultúrát 3l Luria Broth

tápközegben növesztettük OD₆₀₀ 0,6-0,8 közé 37 °C-on, majd 1 mM IPTG-vel indukáltuk egy éjszakán át 25 °C-on. Ezt követően a tápoldatot lecentrifugáltuk és a pelletet -20°C-on tároltuk.

A lefagyasztott baktérium pelleteket felolvasztottuk az alábbi feltárási pufferben: 5mM Tris-HCl, 1mM ATP, 1mM PMSF, 7mM 2-merkaptoetanol, 5mM imidazol, 300mM NaCl, pH=8,0. Továbbá hozzáadtunk 30µg/ml DNázt, 1x proteáz inhibitor keveréket. Az elegyet addig kevertettük, amíg az homogén nem lett, majd üveghomogenizátorral homogenizáltuk és végül 5·1 percig szonikáltuk (80% intenzitás, 0,4ms impulzus). Ezt követően centrifugáltuk (Beckman- Coulter MLA-80 rotor, 440.000g, 35 perc, 4°C). A felülúszót Ni-NTA oszlopra kötöttük 1 órán át kevertetés mellett, majd feltárási pufferrel készített imidazol koncentráció sorral eluáltuk és elektroforézissel ellenőriztük, hogy mely frakciók tartalmazzák a fehérjét. A fehérjét tartalmazó frakciókat dializáltuk 20mM Tris-HCl, 1mM EGTA, pH=8,0 pufferben, majd Source 15Q ioncserélő oszlopra vittük, ahol az alábbi pufferekkel mosva az oszlopot tovább tisztítottuk:

Puffer1: 20mM Tris-HCl, 20mM NaCl, 1mM EGTA, pH=8,0;

puffer2: 10mM Tris-HCl, 0,1mM EGTA, pH=8,0;

puffer3: 20mM Tris-HCl, 2mM CaCl₂, pH=8,0;

puffer4: 20mM Tris-HCl, 1M NaCl, 0,1mM EGTA, pH=8,0.

A gelsolint tartalmazó frakciókat dializáltuk 5mM HEPES, 50mM NaCl, 0,1mM EGTA, pH=8,0 pufferben előkészítve ezzel a gélfiltrálásra, melyet Superdex 200 oszlopon végeztünk. A gelsolin koncentrációjának meghatározását Shimadzu UV-2100 spektrofotométerrel végeztük, amely során a gelsolin extinkciós együtthatójának $1,29\text{ml}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ értéket vettük a 280 nm-en mért abszorbancia esetén.

III. 1.7. VCA-ARP2/3 TISZTÍTÁSA:

A VCA és Arp2/3 komplex tisztítását Egile és munkatársai, 1999-ben megjelent cikkében található módon végeztük. A tisztítást Leipoldné Vig Andrea végezte.

III. 1.8. TEV PREPARÁCIÓ:

TEV proteáz előállításához His-tag régiót tartalmazó, kanamicin rezisztenciával rendelkező szekvencia pET24 vektorba klónozott plazmid (TEV-235) rendelkezésünkre állt.

A vektort *E.coli* BL21 (DE3) sejtekbe transzformáltuk 33µg/ml kanamicin jelenlétében. A sejt kultúrát OD₆₀₀= 0,6 értékig növesztettük majd 1mM IPTG-vel 4 órán át 30°C-on expresszáltuk. Ezt követte a centrifugálás, majd a pelletet felhasználásig - 20°C-on tároltuk.

A fehérje tisztítás első lépéseként a pelletet 25ml lízis pufferben felolvasztottuk (50mM Na-foszfát, 100mM NaCl, 25mM imidazol, 10% glicerin, pH=8,0). Hozzáadunk további 5µl/ml DN-ázt, 5mM MgCl₂-ot, 10 µl/ml lizozimot és 1x proteáz inhibitor keveréket. Az elegyet 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd szonikáltuk 6x25 másodpercig 30 másodperces szünetekkel (80% intenzitás, 0,4ms impulzus). Az oldatot centrifugáltuk (1 óra, 4°C, 30.000rpm) majd a felülúszót lízis pufferrel equilibrált Ni-NTA oszlopra kötöttük 1 óra 4°C kevertetés mellett. Az oszlopról elúciós puffer mosással szedtük le a fehérjét (50mM Na-foszfát, 100mM NaCl, 500mM imidazol, 10% glicerin, pH=8,0). A fehérjét tartalmazó frakciókat anion cserélő Source 15Q oszlopon tovább tisztítottuk az alábbi pufferekkel: puffer1: 50mM Na-foszfát, 100mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM DTT, 10 glicerin, pH=8,0; puffer2: 50mM Na-foszfát, 1M NaCl, 1mM EDTA, 1mM DTT, 10% glicerin, pH=8,0. Ezt követően a mintánkat centrifugáltuk (Beckmann, MLA-80 rotor, 80.000rpm, 40 perc, 4°C), majd megmértük a koncentrációját Shimadzu UV-2100 spektrofotométerrel, amely során a TEV proteáz extinkciós együtthatójának 1,19 ml·mg⁻¹·cm⁻¹ értéket vettük a 280 nm-en mért abszorbancia esetén.

III. 2. ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

III. 2.1. FLUORESZCENCIA MÉRÉSEK:

A fluoreszcencia mérésekhez egyrészt a FLX-Xenius (SAFAS) többutas és a Jobin Yvon spektrofluorimétert használtuk. A polimerizációs és depolimerizációs teszteket az idő függvényében mértük szobahőmérsékleten (22°C) 365nm gerjesztési és 407nm emissziós hullámhosszakot beállítva. A kapott eredményeket legalább 3 független mérés átlagából számoltuk.

III. 2.2. AKTIN POLIMERIZÁCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA:

Polimerizáció során a monomer aktinok összeépülésével filamentális aktin alakul ki. A polimerizáció több lépésben történik. Az aktin monomerek elsőként nukleuszt alkotnak, melyekből elindulhat a filamentum polimerizációja. Ezt a folyamatot a pirén-jelölés által tudjuk nyomon követni. Minél több aktin alakul filamentummá, a pirén-emittált jel intenzitása nő, így az idő függvényében nyomon követhető a filamentumok növekedése. A vizsgálatokhoz 365nm-es gerjesztési és 407nm-es emittált hullámhosszakot alkalmaztunk. A mérések során 5 μ M 5%-ban jelölt G-aktint polimerizáltunk 2mM MgCl₂-ot és 100mM KCl-ot tartalmazó A-pufferrel különböző fehérjék jelenlétében, illetve azok nélkül.

Azoknál a vizsgálatoknál, ahol aktin polimerizációt mértünk önmagában vagy tropomiozin és/vagy Arp2/3 jelenlétében, a Ca²⁺-G-aktint Mg-G-aktinra cseréltük 0,2mM EGTA és 0,05mM MgCl₂ (végső koncentrációk) jelenlétében 5-10 perc szobahőmérsékletes inkubálással.

A gelsolin hatásának vizsgálatánál aktint polimerizáltunk különböző gelsolin koncentrációk, illetve különböző tropomiozinok jelenlétében. Méréseinket úgy is megismételtük, hogy 0,3 μ M gelsolint és a 10 μ M tropomiozint 30 percen át szobahőn előinkubáltuk, hogy komplexet képezhessenek egymással, majd ezt követően adtuk a Ca²⁺-G-aktinhoz.

Az eredmények kiértékeléséhez a kapott görbéket normalizáltuk (így egy pontból induló, 0 és 1 között változó görbéket kaptunk), majd egyenest illesztettünk a

polimerizációs folyamat lineáris szakaszára (0,45-0,55 között, gelsolin mérés esetén 0,05-0,25 között) és meghatároztuk az egyenesek meredekségét.

III. 2.3. AKTIN DEPOLIMERIZÁCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA:

Annak megállapítására, hogy az aktin monomerek milyen sebességgel disszociáltak le az aktin filamentumról különböző körülmények között kritikus koncentráció alá történő hígításon alapuló depolimerizációs tesztet végeztünk. Ennek során 10 μ M 70-80%-ban jelölt G-aktint polimerizáltuk 100mM KCl, és 2mM MgCl₂ mellett. Hasonlóan a polimerizációs tesztekhez itt is gerjesztési hullámhossznak 365nm-t és emissziós hullámhossznak 407nm-t választottunk.

Azon vizsgálatoknál, ahol az aktin depolimerizációt önmagában, tropomiozin jelenlétében vagy Arp2/3 hatását a depolimerizációra vizsgáltuk, a Ca²⁺-G-aktint Mg-G-aktinra cseréltük 0,2mM EGTA és 0,05mM MgCl₂ (végső koncentrációk) jelenlétében 5-10 perc szobahőmérsékletes inkubálással, majd ezt követte a polimerizálás. Ezt követően a polimerizált F-aktin mintát hígítottuk ki a kritikus koncentráció alá 100nM-ra polimerizációs pufferrel (A-puffer, 100mM KCl, 2mM MgCl₂), és figyeltük a pirén jel változását.

A gelsolin hatásának vizsgálata során Ca²⁺-G-aktint használtunk és polimerizáltunk tropomiozin jelenlétében vagy anélkül. Ezt követően adtuk hozzá a gelsolint, majd ezt a polimerizált F-aktin mintát hígítottuk ki a kritikus koncentráció alá 100nM-ra polimerizációs pufferrel (A-puffer, 100mM KCl, 2mM MgCl₂). Egyes kísérletekben a gelsolin és a tropomiozint előinkubáltuk, hogy komplexet képezzenek, majd ezt követően adtuk az aktinhoz.

A pirén emittált jel csökkenése által detektáltuk a monomerek disszociációját ugyanazon hullámhosszon, mint a polimerizációs tesztek esetében. Az eredmények kiértékeléséhez a kapott görbék lineáris szakaszára (első 50 másodperc, illetve gelsolin mérésénél első 120 másodperc) egyenest illesztettünk, és meghatároztuk a meredekségüket.

III. 2.4. KOSZEDIMENTÁCIÓS VIZSGÁLATOK:

20 μ M Mg-G-aktint polimerizáltunk 2mM MgCl₂ és 100mM KCl mellett, majd polimerizációs pufferrel kihígítottuk 5 μ M-osra tropomiozin nélkül, illetve különböző tropomiozin koncentrációk jelenlétében. A mintákat (60 μ l) éjszakán át inkubáltuk 4°C-on, ezután lecentrifugáltuk (440.000 g-vel 4°C-on 30 perc). A pelletet és felülúszót SDS-PAGE gélen elemeztük. A gélét Coomassie Blue festékkel kezeltük. A fehérjemennyiségeket denzitometriás méréssel határoztuk meg. A pelletben lévő TM:aktin arányt a teljes TM koncentráció függvényében ábrázoltuk. Az adatok kiértékeléséhez a következő egyenletet alkalmaztuk:

$$S = \frac{1}{2} * \left[([TM]_0 + [A]_0 + K_d) * \frac{S_{\max}}{[A]_0} - \sqrt{\left(([TM]_0 + [A]_0 + K_d) * \frac{S_{\max}}{[A]_0} \right)^2 - 4 * \frac{S_{\max}^2}{[A]_0} * [TM]_0} \right]$$

Az S a TM:aktin aránya a pelletben, S_{max} a TM:aktin arány maximális értéke telítési koncentrációban, [TM]₀ és [A]₀ az adott tropomiozin és az aktin koncentrációja a mintákban, illetve a K_d az adott tropomiozin:F-aktin komplex disszociációs egyensúlyi állandója.

Gelsolinos mérések esetében két mérésorozatot készítettünk. Egyrészt 2 μ M gelsolint adtunk 25 μ M filamentális aktinhoz és inkubáltuk 1 órán át. Ezt követően a mintát kihígítottuk 10 μ M aktin, 0,8 μ M gelsolin koncentrációra különböző tropomiozinokkal (Tpm1.12 végkoncentrációja 40 μ M; Tpm3.1 végkoncentrációja 40 μ M és az skTM végkoncentrációja 10 μ M volt), illetve tropomiozin nélkül polimerizációs pufferrel, majd inkubáltuk újabb 2 órán át. Másrészt 10 μ M filamentális aktint inkubáltunk először különböző tropomiozinnal, illetve a nélkül. A tropomiozin koncentrációk ugyanazok voltak, mint az első esetben. Ezt követően adtunk a mintához 0,8 μ M gelsolint és újabb 1 órán át hagytuk inkubálódni. Mindkét sorozatot centrifugáltuk (Beckman-Coulter, TLA-100 rotor, 440,000g, 30 perc, 4°C). A gélét Coomassie Blue festékkel kezeltük. A fehérjemennyiségeket denzitometriás méréssel határoztuk meg.

A kiértékelés során az aktint tartalmazó mintában a leülepedő aktinra, az aktint és gelsolint tartalmazó mintában a leülepedő gelsoloinra normalizáltuk az eredményeinket. A mérési eredmények 3 független mérési sorozat átlagából adódnak. Az adatok megadása a 3 mérés átlagában és azok szórásában (Standard Deviation) történt.

III. 2.5. FELÜLETI PLAZMON REZONANCIA (SPR):

Fehérje kölcsönhatások és fehérjekötések egyik vizsgálati módszere a felületi plazmon rezonancia. A mérés során valós időben követhetjük a kötődés kinetikáját, és kiszámíthatjuk az interakció termodinamikai paramétereit is.

Biacore 3000 műszer alkalmazásával vizsgáltuk a tropomiozin és a gelsolin kölcsönhatását. Az egyes tropomiozin izoformákat közvetlenül CMD500L érzékelő chipre immobilizáltuk a fehérjék amin csoportján keresztül. A felületet először 35µl EDC/NHS oldattal (200mM EDC; 50M NHS) injektáltuk, majd a tropomiozint 30µg/ml-re hígítottuk az immobilizációs pufferrel (10mM Na-acetát, pH=3,5) és injektáltuk a felületen 7 percig. 10µl/perc áramlási sebesség mellett. A felesleges reaktív helyeket ezután blokkoltuk 1M etanol-amin (pH=8,5) injektálásával 7 percig 5µl/perc áramlási sebesség mellett. A kontroll felületet aktiváltuk, majd etanol-aminnal blokkoltuk. A tropomiozinok immobilizálását követően a gelsolint hígítottuk a folyó pufferben (10mM HEPES; 150mM NaCl; 3mM EDTA; 0,005% P20 felületaktív anyag; pH=7,4) különböző koncentrációkban (0,5; 1; 2; 3; 4; 5; és 7,5µM) 10µl/perc áramlási sebességgel.

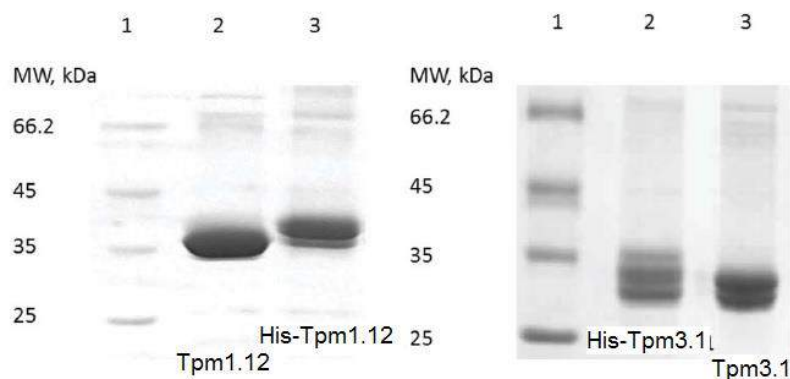
A gelsolin és a tropomiozin közötti asszociációs szakaszokat 7 percig követtük nyomon, a gelsolin nélküli disszociációs szakaszokat 6 percen keresztül. Ezt követően meghatároztuk a kölcsönhatások kinetikai paramétereit és a disszociációt. Az érzékelő chipet minden egyes kötés vizsgálat után regeneráltuk 10mM glicin-HCl (pH=2,1) injektálásával. A kinetikai paramétereket a BIAevaluation 3.1 szoftverrel értékeltük ki, feltételezve, hogy a gelsolin:tropomiozin dimer kölcsönhatás aránya 1:1 a fehérjék között.

IV. EREDMÉNYEK

IV. 1. TPM1.12 ÉS TPM3.1 IZOFORMÁK KLÓNOZÁSA

A tropomiozinok aktinra gyakorolt hatásának in vitro vizsgálatához rekombináns fehérjéket állítottunk elő. A tropomiozinok aktin filamentumhoz való kapcsolódása nagyfokú kooperativitást mutat, melyben fontos szerepe van a szomszédos tropomiozinok N- és C-terminálisai között létrejövő vég-vég kapcsolódásoknak. Az aminosav szekvenciában történő kisebb módosítások is már befolyásolhatják az aktinhoz való kapcsolódásukat, így a funkciójukat is. Ezért a Tpm1.12 és Tpm3.1 rekombináns fehérjék előállításánál ügyeltünk, hogy csak az eredeti szekvencia részeket kódoljuk. A klónozás során teljes hosszúságú egér tropomiozin izoformák előállítása volt a cél, melyek szekvenciáit a 9. ábrán hasonlítjuk össze.

A Tpm1.12 738 nukleotidból épül fel, melyen 245 aminosav kódolódik. A Tpm3.1-et 747 nukleotid bázispár kódolja, és 248 aminosavból áll. Mindkét izoforma esetén az adatbázisban közölt szekvenciához képest van egy eltérés, ami lehet természetes is (Tpm1.12 esetén az M91T aminosav, a Tpm3.1 esetén az E230G aminosav), mely egy pontmutációnak feltételezhető. A teljes tropomiozin szekvenciákat pET28a plazmidba klónoztuk és *E.coli*-ban expresszáltuk Luria-Broth tápközegben. Ekkor a fehérjénk még His-tag régiót tartalmazott, melynek segítségével azt Ni-NTA oszlopon sikeresen megtisztítottuk a szennyező fehérjék többségétől. Ahhoz, hogy a maradék szennyeződéstől is megszabadítsuk hidroxipatit affinitáskromatográfiás módszerrel tovább tisztítottuk. A His-tag régiót TEV proteázzal lehasítottuk és eltávolítottuk a fehérje mellől. Az esetleges DNS szennyeződést agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük. A fehérjék tisztaságát, valamint a sikeres hasítást SDS poliakrilamid gélen ellenőriztük, melyet a következő gélfotón is láthatunk (10.ábra).

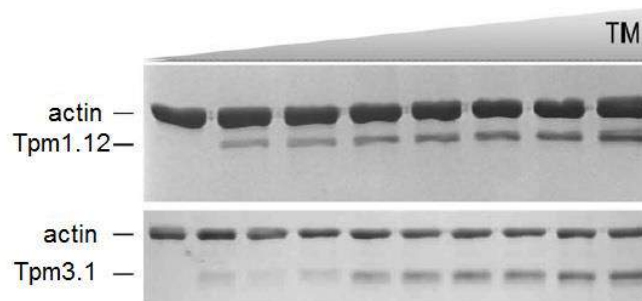


10. ábra: *Tpm1.12* és *Tpm3.1* gélfotói

Ismert molekulásúlyú marker segítségével meghatároztuk az egyes izoformák molekulatömegét SDS poliakrilamid gélfuttatást követően. Ez alapján a Tpm1.12 molekulaméretét 37 kDa-ra, a Tpm3.1 31kDa-ra becsültük. A szekvencia alapján is meghatároztuk az elméleti molekulatömeget Protparam program segítségével, ahol a izoformára Tpm1.12 28,313 kDa, a Tpm3.1 fehérjére 28,948 kDa eredményt kaptunk. Ezt az számítást tömegspektrometriás méréssel is alátámasztottuk. Mérései alapján a Tpm1.12 28,301kDa méretű, a Tpm3.1 28,949kDa méretű.

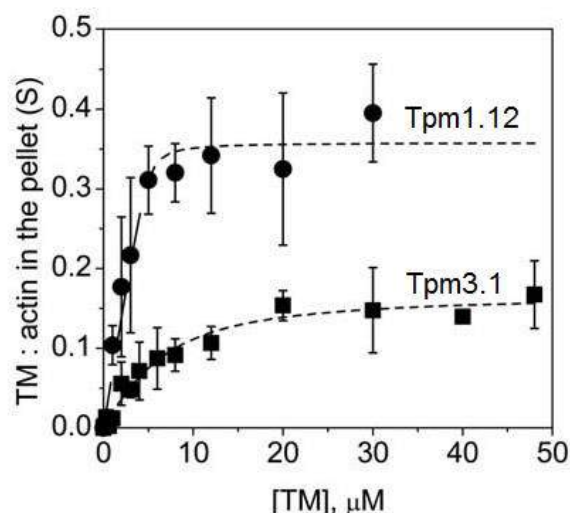
IV. 2. TPM1.12 ÉS TPM3.1 KÖTŐDÉSE AZ AKTIN FILAMENTUMHOZ

Rekombináns tropomiozin izoformák aktin filamentumhoz (F-aktin) való kötődését koszedimentációs esszé segítségével vizsgáltuk. A mérés során 5 μ M F-aktinhoz növekvő koncentrációban adtuk az egyes tropomiozinokat, majd éjjelen át tartó inkubálást követően centrifugálással pelletáltuk a mintákat (11. ábra). A kiértékeléshez minden mintát SDS-PAGE gélen megfuttattunk és Comassie-Blue festést követően megmértük a leülepedett tropomiozin és aktin mennyiségét GeneTools program segítségével.



11. ábra: Koszedimentációs-esszé az egyes tropomiozin izoformák növekvő koncentrációjában

Kontrollként a tropomiozinok ülepedését F-aktin nélkül is megmértük. Az aktin nélkül pelletálódott tropomiozinok mennyiségét minden egyes koncentrációban számszerűsítettük és ezzel korrigáltuk az aktint is tartalmazó tropomiozin mintákat. Az így kapott tropomiozin:F-aktin kötési arányokat ábrázoltuk a tropomiozin koncentrációjának függvényében (12. ábra). Az adatokból az adott izoformára jellemző disszociációs egyensúlyi állandó volt meghatározható. Ezek alapján a Tpm1.12 disszociációs egyensúlyi állandója (K_D) $3,5 \pm 0,9 \mu\text{M}$, a Tpm3.1 esetén pedig $0,1 \pm 0,1 \mu\text{M}$.



12. ábra: TM:F-aktin kötési arányok a TM koncentrációk függvényében

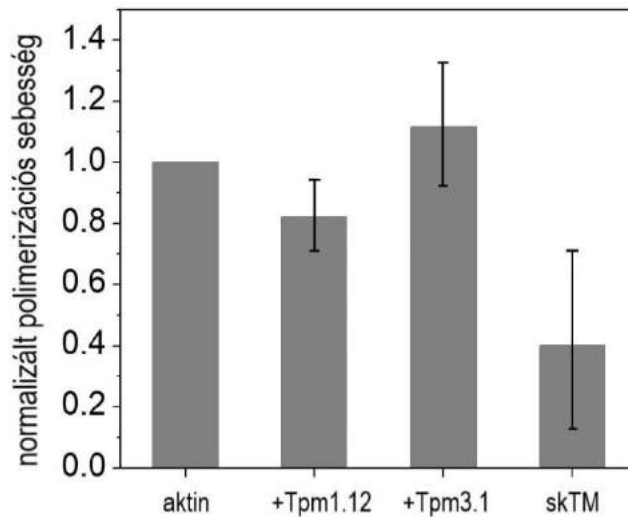
IV. 3. TPM1.12 ÉS TPM3.1 HATÁSA AZ AKTIN FILAMENTUMRA

IV. 3.1. AZ EGYES IZOFORMÁK AKTIN FILAMENTUM FELÉPÜLÉSÉRE GYAKOROLT HATÁSAI

A tropomiozinok különböző izoformái másképp hatnak az aktin filamentum felépülésére. Nyúl vázizomból preparált szkeletális tropomiozin lassítja az aktin polimerizációt azáltal, hogy stabilizálja a filamentumokat, így megakadályozza azok spontán mechanikai törését. A törés által több, szabad filamentum vég keletkezik, melyen végbemehet a polimerizáció. Ezt akadályozza meg a vázizom tropomiozin (Lal and Korn 1986; Wawro et al. 2008). Ezzel ellentétben a nem izom specifikus Tpm1.8 (régi nevén Tm5a) és a Tpm1.6 (régi nevén Tm2) 30-40%-kal növeli az aktin polimerizáció sebességét, ami azt sugallja, hogy specifikus hatása van a szöges vég dinamikájára (Wawro et al. 2008).

Mivel a vázizom tropomiozin egy már nagyon jól ismert viselkedésű izoforma ezért a méréseink során ezt választottuk kontroll mintának.

Polimerizációs esszék segítségével vizsgáltuk, hogy az általunk tisztított izoformák milyen hatással vannak az aktin monomerek filamentumba való beépülésére. A normalizált polimerizációs görbék 0,45-0,55 közötti lineáris szakaszára egyenest illesztettünk és meghatároztuk a meredekségüket (13. ábra).



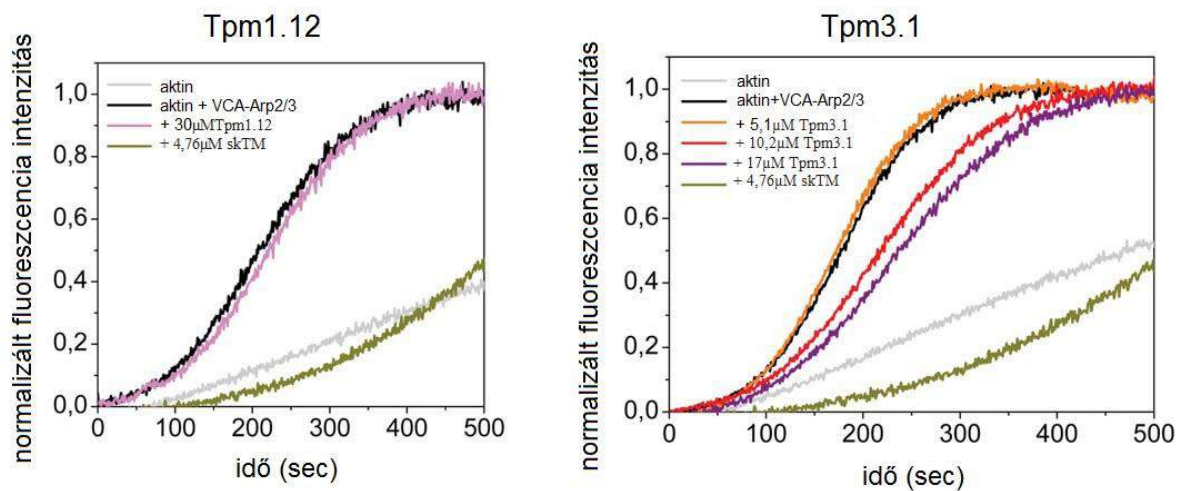
13. ábra: Polimerizációs sebességek az egyes TM izoformákkal

Összhangban a korábbi mérésekkel, vázizom tropomiozin (skTM) esetén azt tapasztaltuk, hogy az általunk használt $6\mu\text{M}$ skTM $\sim 60\%$ -kal lassítja az $5\mu\text{M}$ aktin polimerizációját. Figyelembe vettük, hogy az skTM aktinhoz való kötődése $K_D=0,5\mu\text{M}$, ami azt jelenti, hogy az általunk használt $6\mu\text{M}$ skTM koncentráció az összes aktin kötőhelyet lefedi.

Tpm1.12 esetén $40\mu\text{M}$ és Tpm3.1 esetén $17\mu\text{M}$ az alkalmazott koncentráció, ami több mint 10-szerese a korábban meghatározott K_D értéknek. Ennek ellenére, a két izoforma csak kis mértékben befolyásolta az aktin polimerizációját. Míg a Tpm1.12 az skTM-hez hasonlóan csökkentette a polimerizáció sebességét, addig a Tpm3.1 növelte azt.

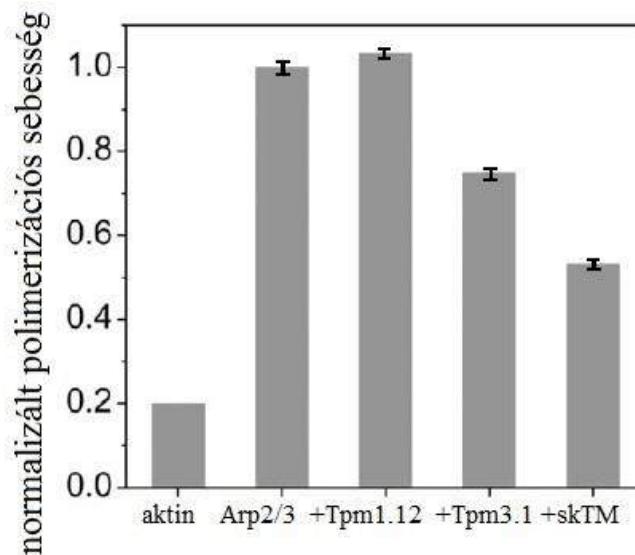
IV. 3.2. TPM1.12 ÉS TPM3.1 HATÁSA AZ ARP2/3 KOMPLEX ÁLTAL KATALIZÁLT AKTIN FILAMENTUM FELÉPÜLÉSRE

Korábbi tanulmányok már kimutatták, hogy egyes tropomiozin izoformák képesek gátolni az Arp2/3 komplex által katalizált aktin nukleációját. Egyrészt a tropomiozin és az ADF közötti antagonizmus jelentős változást okoz az aktin filamentumvég morfológiájában és dinamikájában. Másrészt a tropomiozin gátolja a filamentum elágazódását. (Blanchoin et al. 2001; Bugyi et al. 2010). Sejtbiológiai vizsgálatok kimutatták, hogy a Tpm1.12 és Tpm3.1 ellentétes hatást gyakorol a lamellipódium kialakulására és a sejt migrációra (Bryce et al. 2003).



14. ábra: Tropomiozinok hatása a VCA-Arp2/3 által kifejtett nukleációra

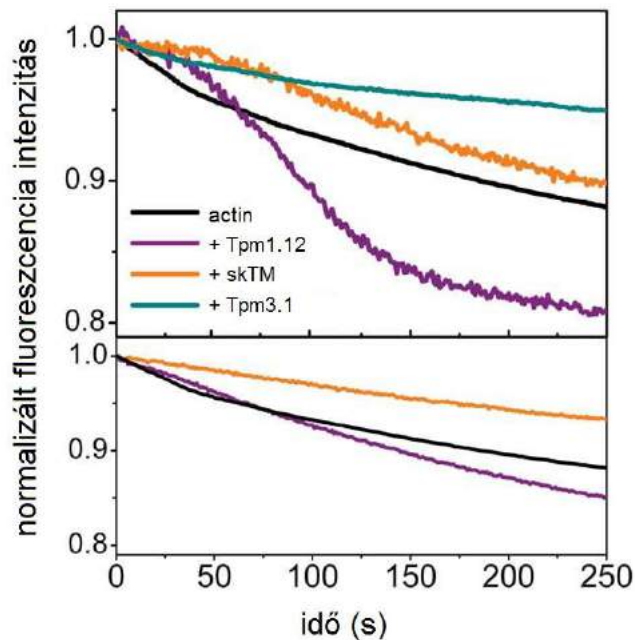
A Tpm1.12 és Tpm3.1 Arp2/3 komplexre kifejtett hatását polimerizációs vizsgálatokkal ellenőriztük. Az eredmények azt mutatták, hogy a Tpm1.12 nincs hatással a VCA-Arp2/3 által kifejtett nukleációra. Ezzel ellentétben a Tpm3.1 az skTM-hez hasonlóan gátolja a komplex nukleációs hatását, azonban az általunk alkalmazott legmagasabb koncentrációban is mindössze ~25%-kal csökkentette azt (14. és 15. ábra). A méréseket és kiértékelésüket Dr. Bugyi Beáta és Leipoldné Vig Andrea végezték.



15. ábra: Aktin polimerizációs sebessége Arp2/3, valamint az egyes tropomiozinok jelenlétében

IV. 3.3. AZ EGYES IZOFORMÁK AKTIN FILAMENTUM SZÉTSZERELŐDÉSÉRE GYAKOROLT HATÁSAI

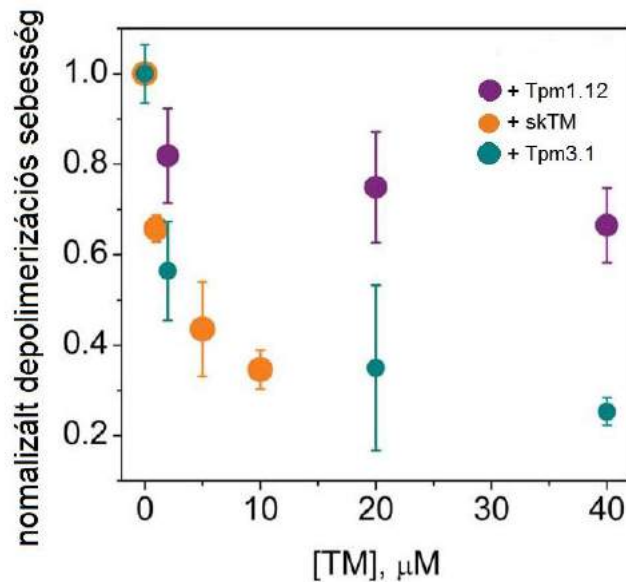
A tropomiozinok strukturális stabilizációs hatásuk révén képesek gátolni az aktin filamentum leépülését (Broschat 1990). Ennek vizsgálatára depolimerizációs esszét alkalmaztunk, melyben $2\mu\text{M}$ 50%-ban jelölt F-aktint hígítottunk 50nM végkoncentrációjúra különböző tropomiozinok jelenlétében. Ez a módszer biztosítja, hogy az aktin végkoncentrációja kisebb legyen, mint a szöges vég kritikus koncentráció, így a szöges végen is az aktin monomerek leválása lesz a domináns. A filamentum depolimerizációjának kinetikáját a pirén fluoreszcencia jel monitorozásával követtük nyomon (16.ábra).



16. ábra: Aktin filamentum depolimerizációja tropomiozin jelenlétében

Méréseinket polimerizációs puffer közegben végeztük, csak a hozzáadott fehérjék fajtája változott. Tropomiozin nélküli minták esetén a csökkenés jellegét egy egyfázisú görbével írhatjuk le. Ezt mutatja a fenti 16. ábra felső paneljében látható fekete görbe. Ha a filamentumokat előinkubáltuk $10\mu\text{M}$ skTM, $40\mu\text{M}$ Tpm1.12, $40\mu\text{M}$ Tpm3.1 jelenlétében a görbe kétfázisúvá válik. Az első fázis körülbelül 50 másodpercig tart, és alacsonyabb depolimerizációs sebesség jellemzi, mint a tropomiozin nélküli mintát. A második fázist egy gyorsabb depolimerizációs szakasz jellemzi. Ezen mérések során a hígító puffer nem tartalmazott tropomiozint, így a hígítás során (40-szeres hígítást alkalmaztunk) a tropomiozin koncentrációja csökkent. A tropomiozin kihígulása miatt új egyensúlyi állapot jött létre, mely során a legtöbb tropomiozin disszociált a filamentumról. Ezek alapján arra következtettünk, hogy az első szakasz a még filamentumon lévő tropomiozinnal kötött filamentum depolimerizációját mutatja, a második szakasz pedig a tropomiozin disszociációját követő depolimerizációt. Ezt a feltételezésünket megerősíteni kívántuk, így a méréseket megismételtük olyan hígító puffert alkalmazva, mely ugyanazon tropomiozin koncentrációt tartalmaz, mint az aktin mintánk ($10\mu\text{M}$ skTM vagy $40\mu\text{M}$ Tpm1.12). Ezen körülmények között kapott egyfázisú

depolimerizációs görbéket mutatja a 16. ábra alsó panelje, alátámasztva ezzel a korábbi feltételezésünket. Méréseinkből arra következtethettünk, hogy mind a három tropomiozin izoforma lassította az aktin filamentum depolimerizációját. Továbbá a tropomiozinok disszociációja az aktin filamentumról egy lassú, körülbelül néhány 10 másodperces folyamat.



17. ábra: Depolimerizáció sebessége különböző tropomiozin koncentráció jelenlétében

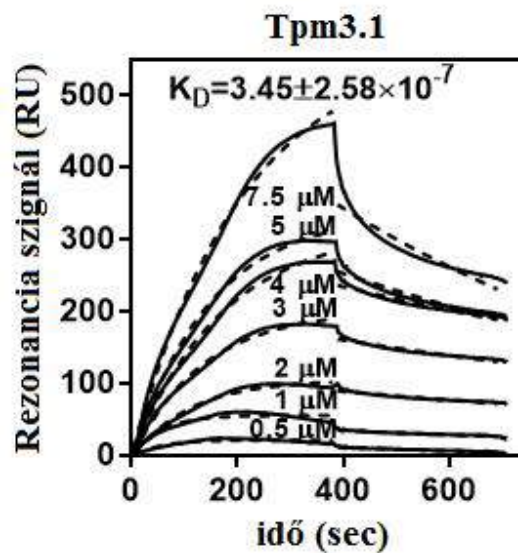
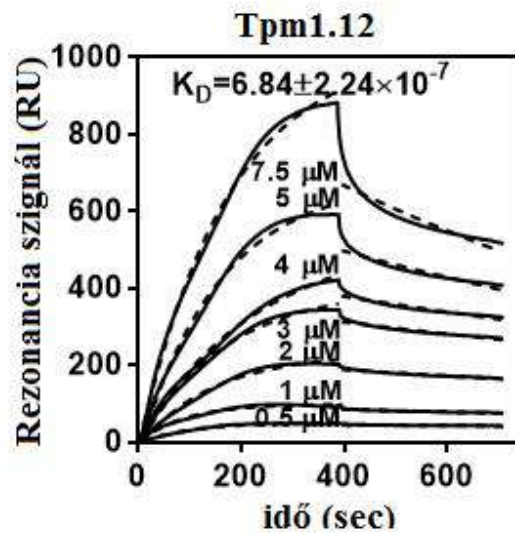
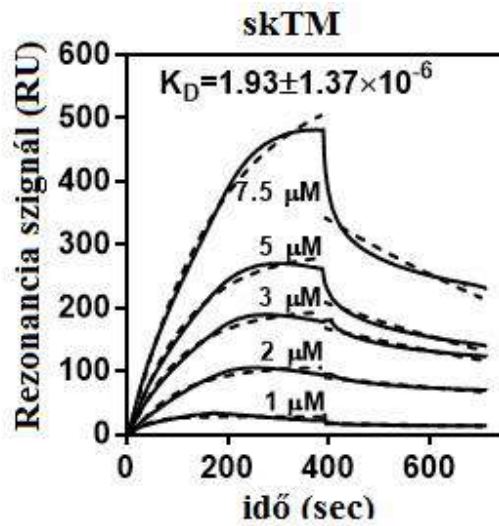
A depolimerizációs méréseket különböző tropomiozin koncentrációk mellett inkubált aktinnal is elvégeztük. A kapott görbék első 50 másodpercére egyenest illesztettünk és annak meredekségéből meghatároztuk a depolimerizáció sebességét. Az eredményeket a 17. ábra foglalja össze. Az adatok azt mutatták, hogy az egyes tropomiozinok csökkentik a filamentum depolimerizációját, még hozzá koncentráció függésben. Ugyanakkor látható, hogy a Tpm3.1 és az skTM körülbelül kétszer nagyobb hatást mutatott a filamentum depolimerizációjára, mint a Tpm1.12, ami korrelál az egyes izoformák affinitásával is. Ezt próbáljuk kiküszöbölni a telítési koncentrációk alkalmazásával.

IV. 4. GELSOLIN ÉS TROPOMIOZIN KÖLCSÖNHATÁSA

IV. 4.1. TROPOMIOZIN KÖTŐDÉSE GELSOLINHOZ

A gelsolin egyes tropomiozin izoformákhoz való kötési affinitását felületi plazmon rezonanciával (SPR- Surface Plasmon Resonance) vizsgáltuk. A tropomiozinokat amin csoportjuknál az érzékelő chipre immobilizáltuk, majd különböző koncentrációban gelsolint juttattunk a felülethez. Az egyes szenzogramokon láthatóak a gelsolin asszociációs (amikor gelsolint tartalmazó pufferral kezeltük a mintát) és disszociációs (amikor gelsolin nélküli puffert alkalmaztunk) görbéi (18. ábra).

A szenzogramokra exponenciális függvényt illesztettünk és meghatároztuk az asszociációs (k_a) és a disszociációs sebességi állandót (k_d). A kettő hányadosából pedig kiszámítottuk a disszociációs állandót $K_D=k_d/k_a$ egyenlet segítségével. A számolásokat mindegyik tropomiozin izoformával elvégeztük. Így a kapott disszociációs konstansok a következők lettek: skTM esetén $K_D=1,9\pm 1,4\mu\text{M}$; Tpm1.12 esetén $K_D=0,7\pm 0,2\mu\text{M}$; Tpm3.1 esetén $K_D=0,3\pm 0,2\mu\text{M}$. Ezek a K_D értékek viszonylag nagy affinitást jeleznek a tropomiozinok és gelsolin között, amiből arra következtethetünk, hogy a gelsolin-tropomiozin kölcsönhatásoknak funkcionális jelentősége lehet.

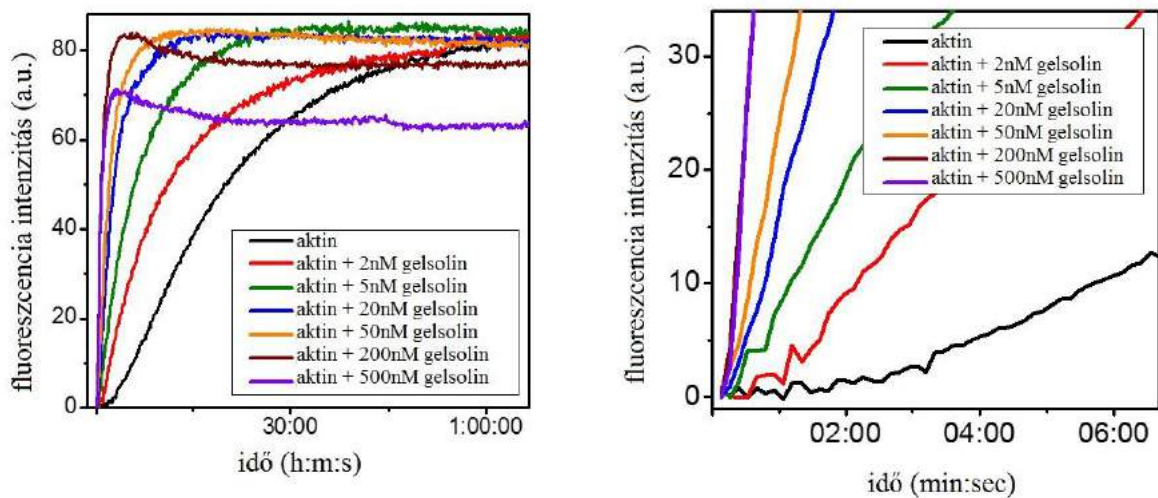


18. ábra: Egyes tropomiozin izoformák SPR mérései különböző gelsolin koncentrációkkal

IV. 4.2. GELSOLIN HATÁSA AZ AKTIN FILAMENTUMRA

Megvizsgáltuk, hogy a tropomiozin-gelsolin kapcsolódás befolyásolja-e ezen fehérjék aktivitását. A gelsolinról ismert, hogy filamentum severing funkciója által növeli a polimerizáció sebességét a szöges végek számának megnövelésével (Yin et al. 1981).

Elsőként Ca^{2+} iont kötő aktinnal megvizsgáltuk annak polimerizációját növekvő gelsolin koncentráció (2-500nM) jelenlétében (19. ábra). Első mérésünk során a puffer sótartalma (100mM KCl, 2mM MgCl_2) által kiváltott polimerizációt néztük. Megfigyelhető, hogy a kezdeti nukleációs fázis körülbelül 1-2 percig tart, majd ezt követi az elongációs fázis, mígnem lassan elér egy egyensúlyi állapotot. Ehhez képest a gelsolint is tartalmazó mintáknál az aktin összeépülése egy gyorsabb folyamat, melyet a görbe nagyobb meredeksége is tükröz. A nukleációnak megfelelő lag fázis egyre rövidebb lett a gelsolin koncentrációjának növekedésével, valamint a polimerizációs sebesség a gelsolin koncentrációjának növekedésével egyre nagyobb (20. ábra) Ez az eredmény összhangban áll a már korábbi vizsgálatokkal (Yin et al. 1981).

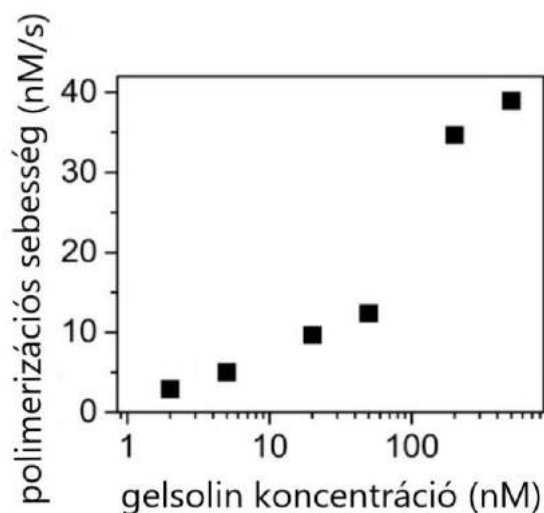


19. ábra: Gelsolin által indukált aktin polimerizáció

Az aktinhoz képest magasabb gelsolin koncentráció esetén ($> 200\text{nM}$) a kezdeti polimerizáció gyorsabb mint a depolimerizáció, így kialakul egy az egyensúlyi állapothoz képest magasabb csúcs. Ez a jelenség a gelsolin aktin monomereket kötő és filamentum severing funkciója miatt alakulhat ki. Relatív alacsonyabb gelsolin koncentrációban ez a jelenség nem domináns, mivel a gelsolin jelentős része a nukleáció módosulására, a

kialakult filamentumok sapkázására fordítódik. Megnövekedett gelsolin-aktin arány több szabad gelsolint eredményez, mely az elongáció során kialakult filamentumokat darabolhatja, ezáltal több rövidebb filamentum alakul ki. A kialakult egyensúlyi állapotot mutató plató fázis magassága a hozzáadott gelsolin mennyiségével arányosan kisebb lesz. Ez valószínűleg tükrözi a gelsolin által megkötött aktin monomerek mennyiségét, melyek így nem képesek a filamentumba épülni. Ezáltal csökkent fluoreszcencia intenzitást mérhetünk.

Mindezen tapasztalatok azt mutatják, hogy a rekombináns gelsolin a korábbi tanulmányokban tapasztalhatóhoz hasonlóan viselkedik.



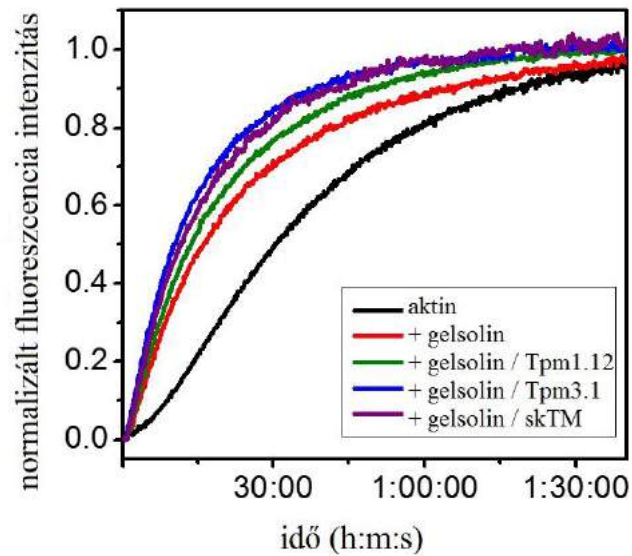
20. ábra: Aktin polimerizációs sebessége gelsolin koncentrációjának függésében

IV. 4.3. GELSOLIN POLIMERIZÁCIÓRA GYAKOROLT HATÁSÁNAK VÁLTOZÁSA TROPOMIOZIN JELENLÉTÉBEN

Korábbi kutatások kimutatták, hogy a simaizom tropomiozin gátolja a gelsolin filamentum daraboló funkcióját, de nincs hatással az aktin nukleációjára (Khaitlina et al. 2013).

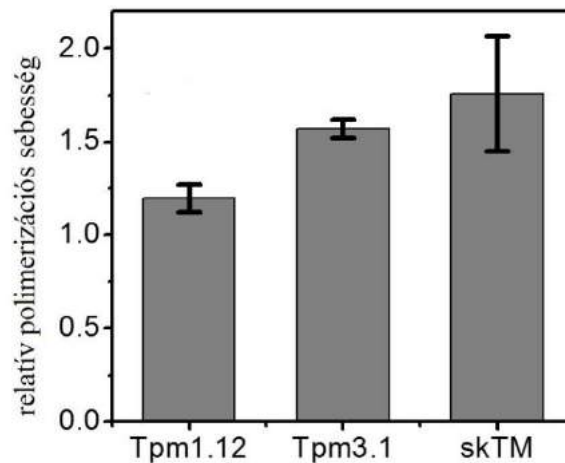
Megvizsgáltuk, hogy az általunk használt tropomiozin izoformák befolyásolják-e a gelsolin polimerizációra kifejtett hatását. A mérés során megnéztük, hogyan változik a polimerizáció gelsolin és gelsolin-tropomiozin komplex jelenlétében. Utóbbi mérés során a gelsolint 30 percig előinkubáltuk a tropomiozinnal 100 μ M Ca²⁺ jelenlétében.

A gelsolin által megnövekedett aktin polimerizációs sebesség mindegyik tropomiozin jelenlétében tovább növekedett (21. ábra).



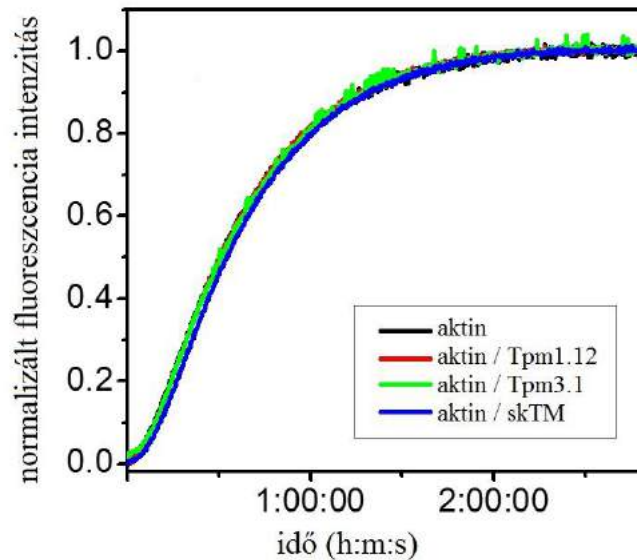
21. ábra: aktin polimerizáció gelsolin és gelsolin-tropomiozin komplex jelenlétében

A legkisebb hatást a Tpm1.12-nél észleltük, közepes hatást fejtett ki a Tpm3.1 és legnagyobb hatással az skTM volt a polimerizációra (22. ábra).



22. ábra: Az egyes tropomiozin izoformák hatása az aktin polimerizációs sebességére

Kontroll mérések során gelsolin nélkül vizsgáltuk a tropomiozinok hatását az aktin polimerizációra. Azt találtuk, hogy az alkalmazott koncentrációban egyik tropomiozin izoforma sem befolyásolja a Ca^{2+} -aktin polimerizációját (23. ábra).



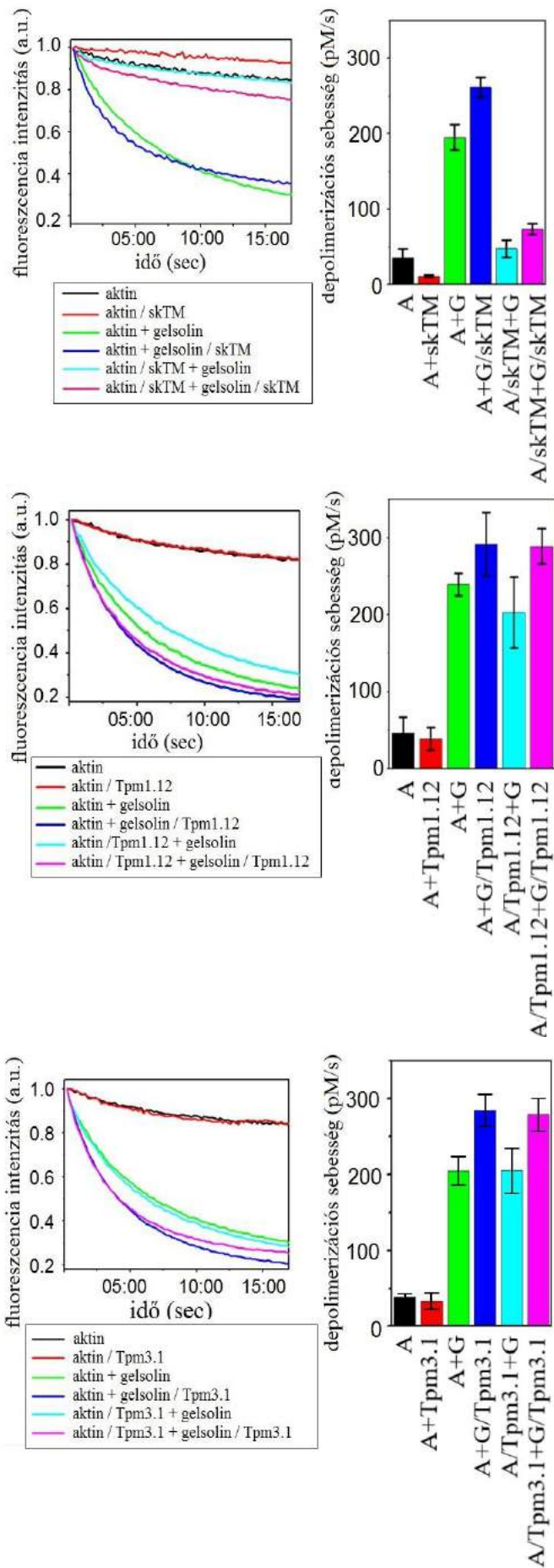
23. ábra: Tropomiozinok hatása a Ca^{2+} -aktin polimerizációra gelsolin jelenléte nélkül

A gyorsabb polimerizáció egyik magyarázata lehet, hogy a tropomiozin elősegíti a gelsolin nukleáló hatását. Másik lehetséges magyarázat, hogy a tropomiozinok növelik a gelsolin filamentum daraboló hatását, amely így több szabad filamentum véget jelent a beépülő aktin monomerek számára.

IV. 4.4. GELSOLIN ÁLTAL KIVÁLTOTT AKTIN FILAMENTUM SZÉTESÉS TROPOMIOZIN JELENLÉTÉBEN

Ahhoz, hogy megvizsgáljuk a tropomiozinok hatását a gelsolin által okozott filamentum severing szempontjából, depolimerizációs tesztet végeztünk. A mérésekhez pirén-jelölt aktin filamentumokat hígítottunk a szöges vég kritikus koncentrációja ($\sim 0,12\mu\text{M}$) alá (Bugyi and Carlier 2010; Pollard 2007). Ilyen körülmények között a szabad aktin monomerek beépülése elhanyagolható, és megfigyelhető a monomerek spontán disszociációja a filamentumról.

Az aktin filamentumok spontán leépülése viszonylag lassú folyamat. Ez betudható az aktin alegységek disszociációjának alacsony sebességi állandójának, és a filamentumok alacsony koncentrációjának. Ezt láthatjuk a 24. ábrán fekete színnel jelölve.



24. ábra: Tropomiozinok hatása a gelsolin filamentum feldaraboló funkciójára

A gelsolin filamentum daraboló funkciója növeli a mínusz végek számát, de a plusz végeket lesapkázza, ami a depolimerizáció nettó sebesség növekedését eredményezi (zöld színnel jelölve). Ez az eredmény összhangban van már korábbi eredményekkel (Tóth et al. 2016).

Ha a tropomiozinokat előinkubáljuk a gelsolinnal, és ezt követően adjuk a rendszerhez, akkor a depolimerizáció sebessége még magasabb lesz, mint csak gelsolin esetében. Ezt láthatjuk a 24. ábrán sötétkék színnel jelölve.

Ha a tropomiozinokat gelsolin nélkül adjuk a filamentumokhoz, akkor azok nem növelik a nettó depolimerizáció sebességét. Ezt piros színnel jelöltük az ábrákon. Ezen kívül megfigyelhető, hogy a Tpm1.12 és Tpm3.1 kis mértékben, az skTM sokkal nagyobb mértékben védte a filamentumokat a depolimerizációval szemben. Ez az eredmény korábbi depolimerizációs méréseinkkel is korrelál, mely során Mg^{2+} -aktin depolimerizációját vizsgáltuk. Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a tropomiozinnal komplexet képező gelsolin nagyobb aktivitással rendelkezik a filamentum feldarabolására, mint önmagában a gelsolin.

Abban az esetben, ha az aktin filamentumokat előinkubáltuk Tpm1.12-vel vagy Tpm3.1-gyel és ezt követően adtuk hozzá a gelsolint, a depolimerizáció sebessége hasonlóan változott, mint amikor nem inkubáltuk elő az aktint tropomiozinnal. Ezzel ellentétben, ha ugyanezt a mérést elvégeztük skTM-mel, akkor az skTM teljes mértékben megakadályozta a gelsolin funkcióját (világoskék és zöld színekkel jelöltük).

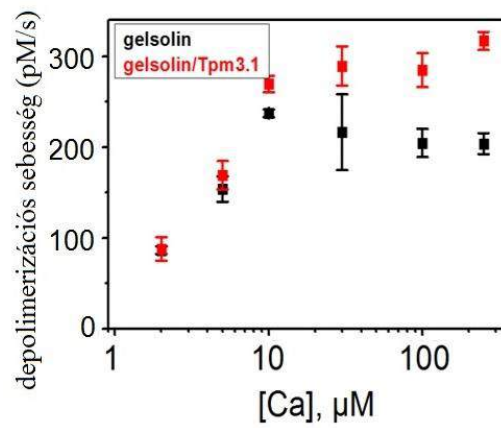
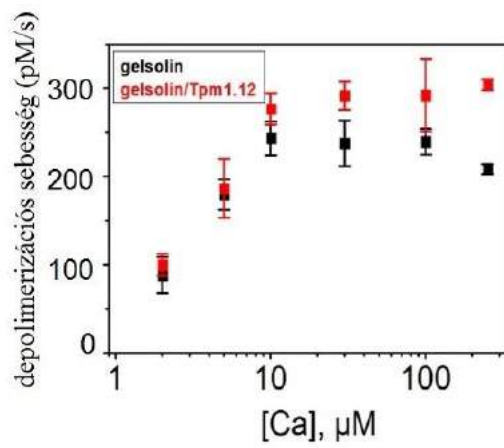
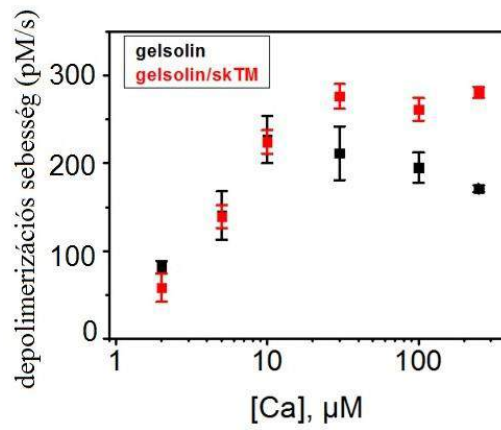
Amikor a tropomiozinnal előinkubált aktin filamentumokhoz tropomiozin-gelsolin komplexet adtunk, a depolimerizáció sebessége minden izoforma esetében nagyobb volt, mint amikor csak a gelsolint adtuk a rendszerhez (világoskék és rózsaszínnel jelöltük).

Az skTM esetében a gelsolin depolimerizációs hatása sokkal kisebb, ha a filamentum elő volt inkubálva skTM-mel. Ez igaz akkor is, ha a rendszerhez csak gelsolint adtunk, és akkor is ha skTM-gelsolin komplexet adtunk. Ez a különbség csak gelsolin hozzáadása esetén ~4-szeres, gelsolin-skTM komplex hozzáadása esetén ~3,6-szoros.

Ez a különbség az általunk vizsgált nem-izom típusú izoformák esetén nem jelenik meg, ami arra enged minket következtetni, hogy a tropomiozinok jelenléte különböző

módon befolyásolja az aktin filamentum sorsát a gelsolin által befolyásolt depolimerizációban.

Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk a kalcium-koncentráció hatását a gelsolin aktivitására, elvégeztünk egy mérési sorozatot melyben a szabad Ca^{2+} ion koncentrációt változtattuk. Azt tapasztaltuk, hogy a Ca^{2+} koncentráció befolyásolja mind a gelsolin, mind a gelsolin-tropomiozin komplex aktivitását (25. ábra). Mindkét esetben a depolimerizáció sebessége $10\mu\text{M}$ Ca^{2+} koncentrációig emelkedett, majd efelett telítettséget mutatott. Alacsony Ca^{2+} koncentrációnál a komplexben és önmagában alkalmazott gelsolin nem mutat különbséget, de magasabb Ca^{2+} koncentrációnál a tropomiozinnal komplexben alkalmazott gelsolin magasabb depolimerizációs sebességet mutat, mint az önmagában alkalmazott gelsolin. A legmagasabb alkalmazott Ca^{2+} koncentrációknál a csak gelsolinos minták kismértékű csökkenést mutattak, de a komplexben alkalmazott minták nem követték ezt a tendenciát.

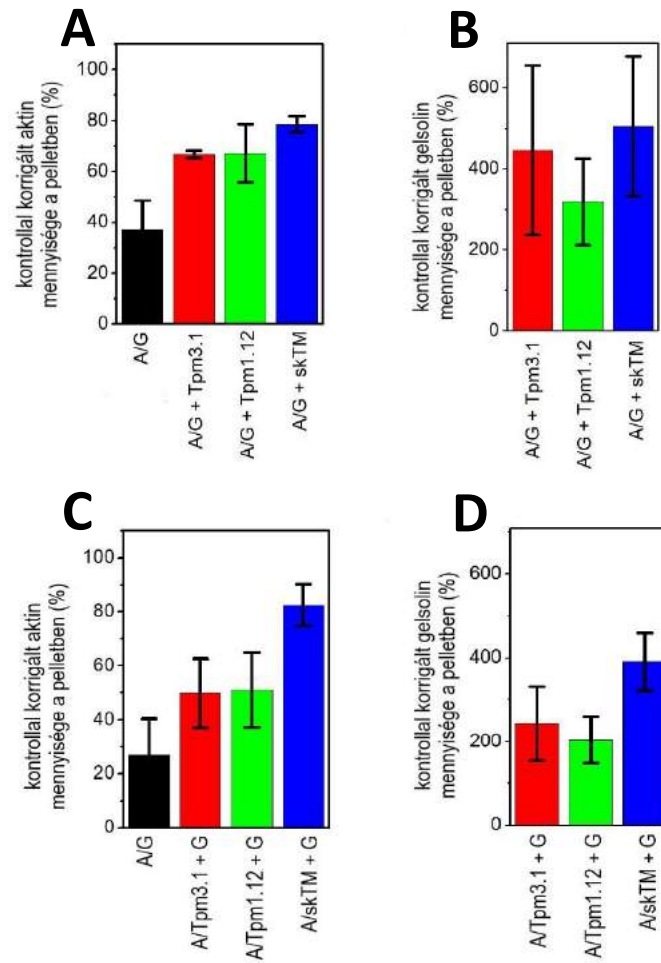


25. ábra: Gelsolin által kiváltott depolimerizációs sebesség változása Ca^{2+} függésben

IV. 4.5. TROPOMIOZIN VÉDŐ HATÁSA GELSOLINNAL SZEMBEN AZ AKTIN FILAMENTUMON

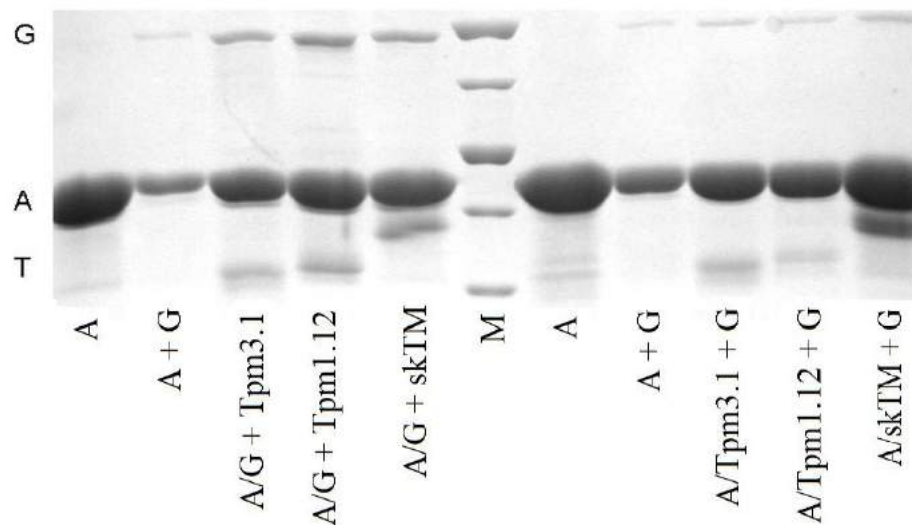
Az aktin, gelsolin és tropomiozin kölcsönhatások további jellemzésére ülepedési, vagyis koszedimentációs tesztekét végeztünk. A három fehérjét tartalmazó mintáinkat centrifugáltuk, majd ezt követően a pelleteket és a felülúszókat SDS-poliakrilamid gélen való futtatást követően elemeztük. A vizsgálat során két megközelítést alkalmaztunk. Elsőként az aktin filamentumokat gelsolinnal inkubáltuk, hogy elegendő idő legyen a filamentumok leépüléséhez, majd ezt követően adtuk a rendszerhez a tropomiozint. A második esetben az aktin filamentumokat tropomiozinnal inkubáltuk, hogy elegendő ideje legyen a tropomiozinnak a filamentumra kötődni, majd ezt követően adtuk hozzá a gelsolint.

Amikor a $10\mu\text{M}$ F-aktinhoz $0,8\mu\text{M}$ gelsolint adtunk a pelletben lévő aktin mennyisége $\sim 35\text{-}40\%$ -ra csökkent a kontrollhoz képest (26. ábra A paneljében látható). Amikor a mintákhoz tropomiozint adtunk, a pelletben lévő aktin mennyisége megnövekedett.



26. ábra: A koszedimentációs tesztek kiértékelése

Ez arra utal, hogy a tropomiozinok részben megvédték az aktin filamentumokat a gelsolin depolimerizációs hatásától. Nem vettük figyelembe azt a lehetőséget, hogy a pelletben lévő aktin mennyisége a tropomiozin jelenléte miatt is lehetséges, mert korábbi méréseinkben ezt a jelenséget nem tapasztaltuk. Amikor összehasonlítottuk a tropomiozinnal is kezelt mintákat a csak gelsolint tartalmazó mintákkal, azt tapasztaltuk, hogy a gelsolin mennyisége 2-5-szörösére változott (26. ábra B panelje mutatja). Kontroll mérésenként elvégeztük a kísérletet aktin jelenléte nélkül. Azt találtuk, hogy a tropomiozin nincs hatással a gelsolin ülepedésére.



27. *ábra*: SDS-PAGE gél fotó (A: aktin, G: gelsolin, T:tropomiozin, M: Marker fentről lefelé haladva: 100 kDa, 70 kDa, 50 kDa, 40 kDa, 30 kDa)

A második esetben, amikor tropomiozinnal előinkubáltuk a filamentumokat még mielőtt gelsolint adtunk volna hozzá, azt láttuk, hogy az F-aktin mennyisége~2-3-szorosára nőtt, ahhoz képest, amikor nem volt jelen a tropomiozin (26. ábra C panelje mutatja). Ebből arra következtethetünk, hogy a tropomiozinnak védő hatása van a gelsolin által kiváltott depolimerizációval szemben. A gelsolin mennyisége ebben a sorozatban is ~2-4-szerese volt a tropomiozinnal kezelt minták esetében, mint ahol csak aktinnal volt jelenlétben.

A relatív gelsolin tartalom magasabb volt a tropomiozinnal is kezelt mintákban mint amikor csak aktin volt jelen. A tropomiozinok hatására az ülepedő aktin mennyisége hasonló arányban nőtt, mint a gelsoliné az első esetben, és kisebb arányban a második esetben.

Mindkét kísérleti körülményt megismételtük és megfuttattuk SDS-PAGE gélen is. Ezt mutatja a 27. ábra. Az első 5 futtatás az első kísérleti körülményt az utolsó 5 futtatás a második kísérleti körülményt mutatja. Láthatjuk, hogy az ülepedett aktin mennyisége a csak gelsolin+aktin jelenlétében a legkevesebb, majd a tropomiozinok hozzáadásával növekszik.

V. MEGBESZÉLÉS

Rekombináns Tpm1.12 és Tpm3.1 fehérjéket állítottunk elő és tisztítottunk natív (tagmentes) formában, mert a polipeptidlánc bármilyen végmódosítása kiszámíthatatlan, káros következményekkel járhat (Bharadwaj et al. 2004). Megállapítottuk, hogy mindkét izoforma köti az aktin filamentumot, azonban ezek affinitása különböző. A Tpm1.12 aktinhoz való affinitása ($K_D = 3,48 \pm 0,92 \mu\text{M}$) körülbelül hétszer gyengébb, mint az skTM-é ($K_D = 0,5 \mu\text{M}$) (Boussouf et al. 2007), a Tpm3.1 affinitása ($K_D = 0,10 \pm 0,16 \mu\text{M}$) pedig valamivel erősebb. Ezek a kötési erősségek összhangban állnak a korábbi eredményekkel, amelyek azt mutatják, hogy a tropomiozinok affinitása az aktin filamentumhoz erősen függ azok N- és C-végeinek exonkombinációjától (Moraczewska, Nicholson-Flynn, and Hitchcock-DeGregori 1999). A vizsgált tropomiozin izoformák esetében a Tpm3.1 1b1d exonpárja magasabb affinitást mutat, mint a szövetből tisztított, acetilezett skTM 1a9a exonpárja, valamint sokkal alacsonyabb affinitást mutat a Tpm1.12 1b9c exonpárja (5. ábra). Ugyan az skTm más génről származik, de a középső szakasz mind a 3 izoforma esetén megegyezik. Eredményeink azt a nézetet támasztják alá, miszerint a tropomiozinok N- és C-terminálisai a vég-vég kapcsolódásaik által fontos meghatározói az aktinhoz való affinitásnak. Az alacsony affinitású Tpm1.12 kötődése a filamentumhoz összhangban van korábbi eredményekkel, melyben agyi izoformákat izoláltak szövetből és ezek kötődése körülbelül tízszer kisebb affinitást mutatott, mint az skTM (Broschat and Burgess 1986). Azt is figyelembe kell venni, hogy a nem-izom specifikus tropomiozinokat izomspecifikus α -aktin izoformával vizsgáltuk. Nem-izom sejtekben a tropomiozinok nem-izom típusú specifikus β és γ aktinhoz kapcsolódnak. (Weinberger et al. 1996). Bizonyos izoforma függő funkciók specifikusak lehetnek az aktin-tropomiozin párokra, amelyek nagyobb kötési affinitással rendelkeznek az optimális működés érdekében. Például izomspecifikus kölcsönhatásokat már kimutattak profilin és formin izoformákkal (Neidt, Scott, and Kovar 2009). Sok aktinkötő fehérje monomer vagy filamentális aktinnal való kölcsönhatására más fehérjék antagonistá vagy szinergista hatást válthatnak ki. Például a caldesmonról, ami kalcium/calmodulin szabályozott aktin-kötő fehérje, ismert, hogy fokozza az alacsony molekulatömegű tropomiozinok aktinhoz való kötődését (Yamashiro-Matsumura and Matsumura 1988).

Mivel a caldesmon az agyban expresszálódik (Ueki et al. 1987), azt gondoljuk, hogy ez szintén elősegítheti a Tpm1.12 kötődését az aktinhoz.

Az skTM telítési koncentrációban alkalmazva csökkenti a filamentum végek számát azáltal, hogy csökkenti az aktin monomerek filamentumba való asszociációs és disszociációs sebességi állandóit (Broschat 1990; Lal and Korn 1986). Azt tapasztaltuk, hogy a Tpm1.12-nek kisebb befolyása van az aktin polimerizációs és depolimerizációs sebességére. Ez magyarázható azzal, hogy a Tpm1.12 kisebb mértékben csökkenti az aktin monomerek asszociációs sebességi állandóját a filamentum végekhez, mint az skTM. Ezt alátámasztva koszedimentációs vizsgálatokat is elvégeztünk, melyeknél azt találtuk, hogy az aktin mennyisége a felülúszóban független volt az alkalmazott Tpm1.12 koncentrációjától. Ez alapján a polimerizációs körülmények ugyanolyanok voltak Tpm1.12 jelenlétében és annak hiányában, vagyis a Tpm1.12 nem változtatta meg a kritikus koncentrációt. Előfordulhat, hogy azért ugyanakkora a kritikus koncentráció, mert a sebesség változása nem a sebességi állandók révén történik.

Depolimerizációs kísérletekben azt találtuk, hogy a tropomiozin aktinról való disszociációja egy lassú, 50-100 másodpercen belüli folyamat. A tropomiozin-aktin komplex mikromoláris disszociációs egyensúlyi állandója azt sugallja, hogy a tropomiozin filamentumhoz való kapcsolódása egy $10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ sebességű folyamat. Ebben az esetben a mi kísérleti körülményeink között a tropomiozin aktinhoz kötődése másodperces időskálán fordul elő. A Tpm1.12 teljes hatását a polimerizációra nem tudtuk megfigyelni ezekben a kísérletekben, mert valószínűleg a Tpm1.12 lassabban kötődik az aktin filamentumhoz mint a filamentum végek növekedési üteme. Depolimerizációs kísérletekben a mérések elvégzése előtt az aktint előinkubáltuk tropomiozinnal. Ezek a megfontolások magyarázzák a kis különbségeket a várt változatlan kritikus koncentrációban. Depolimerizációs adataink szerint a Tpm1.12 aktinhoz való asszociációja körülbelül 60-szor lassabb, mint az aktin monomereké. Megállapítottuk, hogy a Tpm3.1 gyenge hatást gyakorol az aktin asszociációjára, miközben körülbelül ugyanolyan mértékben gátolja az aktin depolimerizációját mint az skTM. Korábbi vizsgálatokban a Tpm1.8 és a Tpm1.6 hasonlóan viselkedtek, mint a Tpm3.1 (Kostyukova and Hitchcock-DeGregori 2004; Wawro et al. 2008). A tropomiozin C-terminálisa a filamentum szöges vége felé mutat, és ez a rész a Tpm3.1, Tpm1.6 és Tpm1.8 esetében is a 9d exon, azonban az skTM 9a exonnal, a Tpm1.12 pedig 9c exonnal rendelkezik. A tropomiozinok N-terminálisai a hegyes vég felé mutatnak, és az skTM

valamint a Tpm1.6 1a2b exonnal, a Tpm1.8, Tpm1.12 és a Tpm3.1 pedig 1b exonnal rendelkezik. Ezek alapján elmondhatjuk, hogy az aktin filamentum végdinamikájára nem egyszerű összefüggések vonatkoznak. A különböző tropomiozinok aktin kötése különböző mértékű ($Tpm1.8/Tpm3.1 > skTM > Tpm1.6 > Tpm1.12$). A tropomiozinok N- és C-terminálisainak kölcsönhatásai meghatározzák az aktin affinitását (Moraczewska et al. 1999).

A Tpm1.12 C-terminális 9c exonja jelentős ok lehet a Tpm1.12 alacsony affinitású kötésére és a mérsékelt hatásra az aktin dinamikájára. Mivel a nagy affinitással kötődő Tpm3.1 és a kis affinitással kötődő Tpm1.12 is 1b exonnal rendelkezik az N-terminálison, valószínűsíthető, hogy a C-terminális 9c exon okozza a kis affinitást.

A korábban vizsgált tropomiozin izoformákhoz hasonlóan (nyúl skTM, csirke skTM, Tpm1.8 és Tpm1.6) (Blanchoin et al. 2001; Bugyi et al. 2010) a Tpm3.1 is gátolta a VCA-Arp2/3 komplex által katalizált nukleációt. Ezzel szemben azt találtuk, hogy a Tpm1.12 nem volt hatással a VCA-Arp2/3 aktivitására. A Tpm1.12 és Tpm3.1 különböző viselkedése a komplexre összhangban van a sejtvizsgálatokból származó megfigyelésekkel. B35 neuroepitéliumban expresszált Tpm1.12 indukálta a lamellipódium kialakulását, a Tpm3.1 ezzel szemben csökkentette a lamellipódiumot (Bryce et al. 2003). Az agyban az Arp2/3 komplex részt vesz mind a poszt- mind a preszinaptikus aktin struktúrák citoskeletális szervezésében, melyek szintén kapcsolódnak a Tpm1.12-vel is (Hotulainen et al. 2009; Hotulainen and Hoogenraad 2010; Spillane et al. 2012). A tropomiozin gátló hatása az Arp2/3 komplexre nem tulajdonítható az ATP hidrolízis vagy a foszfát felszabadulás különbözőségeinek, sem a leányfilamentumok elágazásainak. Inkább a két fehérjének az aktin filamentumhoz való versengéséből ered (Blanchoin et al. 2001; Bugyi et al. 2010), melynek pontos molekuláris háttere nem ismert. Korábbi vizsgálatok azt mutatták, hogy a tropomiozin aktin filamentum körüli egyensúlyi helyzete állhat az izoforma-specifikusság hátterében (Lehman et al. 2000). A különböző tropomiozinok eltérő hatása az Arp2/3 komplexre származhat az egyes izoformák különböző pozícióiból az aktin filamentumon. Ez feltételezi, hogy a Tpm1.12 eltérő tengely körüli helyzetet foglal el a filamentumon, mint azok, amelyek gátolják a komplex hatását. Azonban nem lehet kizárni, hogy a különbözőségeket a vég-vég kapcsolódások és a szerkezeti, kinetikai jellemzők okozzák. Az aktin-tropomiozin izoforma-függő kölcsönhatás fontos szerepet játszhat az aktin-

kötőhelyek versenyében más aktinkötő fehérjékkel, például az Arp2/3 komplexszel, és így a tropomiozin biológiai funkciójának szabályozásában.

Kimutattuk, hogy mindhárom tropomiozin izoforma (skTM, Tpm1.12, Tpm3.1) kötődik a gelsolinhoz, és kölcsönhatásukat viszonylag szoros affinitás jellemzi ($K_D \sim 0,3\text{-}2\mu\text{M}$).

Megállapítottuk, hogy a tropomiozinok védik az aktin filamentumot a gelsolin depolimerizáló, filamentum severing aktivitásától. Ez a hatás is erősen függött a tropomiozin izoformájától. Az skTM volt a leghatékonyabb, míg a két nem izom típusú izoforma - Tpm1.12 és Tpm3.1 - kismértékű vagy semmilyen jelentős hatást nem gyakoroltak a gelsolin depolimerizáló aktivitására. Tekintettel arra, hogy a tropomiozin-aktin komplex szerkezete izoformaspecifikus (Lehman et al. 2000), azt feltételezzük, hogy az egyes tropomiozin izoformák térbelileg gátolhatják a gelsolin és az aktin kötődését, míg más izoformák nem versengenek a gelsolinnal az aktinért. Sejtekben a tropomiozinok különböző pozíciója az aktin filamentum felszínén további befolyásoló tényezője lehet a tropomiozin funkciók sokszínűségének.

A tropomiozin és a gelsolin kötődése kevésbé izoformaspecifikus, ami arra enged minket következtetni, hogy a kötési kölcsönhatások egy közös tropomiozin szekvenciára támaszkodnak. Azt tapasztaltuk, hogy a tropomiozinnal kötésben lévő gelsolin depolimerizáló aktivitása nagyobb, mint önállóan, még akkor is, ha az aktin filamentumokat tropomiozinnal telítettük. A depolimerizációs tesztekben alkalmazott alacsony aktin és tropomiozin koncentráció gátolja ezen fehérjék kapcsolódását, így a megnövekedett gelsolin aktivitást a tropomiozin-gelsolin komplex hatásával magyarázhatjuk. Az eredmények arra utalnak, hogy a tropomiozin kötődése szerkezeti változásokat indukál a gelsolinban, ami megváltoztatja az interakció módját és az aktivitást a filamentumokkal. Korábbi vizsgálatokban igazolták, hogy a gelsolin csökkenti a filamentumvég-kölcsönhatásokat (Nyakern-Meazza et al. 2002). Ez a jelenség magyarázható a gelsolin-tropomiozin komplexnél megfigyelt depolimerizáció sebességének növekedésével.

Eredményeink látszólag ellentétesek egy korábban közölt megfigyeléssel, ahol az izomspecifikus tropomiozin izoformák csökkentették a gelsolinnak azon hatását, hogy növeli az aktin depolimerizációs sebességét. További eltérés, hogy mi a kísérleteinkben a tropomiozin védő hatását figyeltük meg gelsolinnal szemben, amennyiben az aktin

filamentumokat tropomiozinnal hoztuk kölcsönhatásba, ami ellentmond a korábbi megfigyeléseknek (Khaitlina et al. 2013). Ezeket az eltéréseket nem könnyű értelmezni. Eredményeink azt mutatták, hogy az aktin filamentum telítése tropomiozinnal gátolja a gelsolin aktivitását a depolimerizációs vizsgálatokban és a koszedimentációs tesztekben, mely összhangban van az irodalmi adatokkal (Ishikawa et al. 1989).

Mindkét vizsgálatban pirénjelölt aktin hígításon alapuló depolimerizációs vizsgálatot alkalmaztak, azonban jelentős különbség figyelhető meg. Kísérleteink során az aktin filamentumokat 100nM-ra hígítottuk, ami egy igazi depolimerizációs rendszer, melyet a pirén fluoreszcencia változásával követünk nyomon. Ezzel szemben Khaitlina és munkatársai 600nM gelsolinnal sapkázott aktin filamentumot használtak, amely a hegyes végek kritikus koncentrációja körüli érték (Pollard 2007), de jóval meghaladja a szöges végek kritikus koncentrációját, ezért a pirén fluoreszcencia változását a polimerizációs események torzíthatják.

A gelsolin és a tropomiozin evolúciójának szempontjából a jelenlegi bizonyítékok azt sugallják, hogy a gelsolin az ősi aktinszabályozó (Ghoshdastider et al. 2013; Gunning et al. 2015). A tropomiozinok későbbi megjelenése lehetővé teszi az aktin filamentumok populációinak specializálódását. Adataink azt mutatják, hogy az izom aktin szerkezetek az izomsejtekben található általános citoplazmatikus aktin filamentumokhoz viszonyítva stabilizálódnak.

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a vizsgált tropomiozinok kettős hatással vannak a gelsolinra az aktin filamentumok dinamikáját tekintve. Ha a tropomiozinok komplexben vannak az aktin filamentumokkal, azok izoforma-függő módon gátolják a gelsolin depolimerizációs hatását. Ezzel ellentétben, ha a tropomiozinok kötődnek a gelsolinhoz, ezt a tevékenységet szintén izoforma-függő módon fokozzák. További vizsgálatokra van szükség annak bizonyítására, hogy a gelsolin-tropomiozin komplexek élettani szerepet játszanak-e az élő sejtek aktin dinamikájának szabályozásában.

Ezek a megfigyelések hozzájárulhatnak az élő sejtekben elhelyezkedő, nagyszámú tropomiozin izoforma szükségességének és különböző funkcióinak megértéséhez. További vizsgálatokra van szükség annak bizonyítására is, hogy a gelsolin-tropomiozin komplexek élettani szerepet játszanak-e az élő sejtek aktin dinamikájának szabályozásában, és hogy az ebben a munkában alkalmazott kalciumkoncentrációk *in vivo* relevánsak-e. Bár több információra van szükség, hogy megértsük ezeknek a

tropomiozinoknak a pontos szerepét nem izom sejtekben, a jelenlegi megfigyelések azt sugallják, hogy a funkciók lényegesen különbözőek egymástól. Az aktin filamentum különböző funkcióit valószínűleg nagyban befolyásolják az egyes tropomiozin izoformák N- és C-terminálisainak kölcsönhatásai. A különböző sejtípusokban előforduló különböző tropomiozin izoformák ezáltal tudják diverzifikálni az alapvetően egységes aktin citoszkeleton működését, ezáltal különböző alrendszerek alakulnak ki, melyek fiziológias kapcsolatok lehetőségét is biztosíthatják.

VI. ÖSSZEFOGLALÁS

Az alábbiakat tekintem saját új eredményeimnek:

- 1) A méréseink elvégzéséhez sikeresen klónoztuk a neuron-specifikus natív, tagmentes Tpm1.12 és Tpm3.1 izoformákat *E.coli* bakteriális rendszerben, és elegendő mennyiségű és megfelelő tisztaságú fehérjét sikeresen tisztítottunk.
- 2) Megállapítottuk, hogy mindkét izoforma kötődik az aktin filamentumhoz, azonban különböző affinitással.
- 3) Az aktin filamentum felépülésére mindkét izoforma kismértékű befolyással bír. Míg a Tpm1.12 kis mértékben csökkentette, addig a Tpm3.1 kis mértékben növelte a polimerizáció sebességét.
- 4) Depolimerizációs vizsgálataink során megállapítottuk, hogy mindkét izoforma koncentrációfüggésben csökkenti a filamentum leépülésének sebességét. Továbbá megállapítottuk, hogy a tropomiozinok disszociációja az aktin filamentumról egy lassú, körülbelül néhány 10 másodperces folyamat.
- 5) Felületi plazmon rezonancia (SPR) mérésekkel megállapítottuk, hogy mindhárom vizsgált tropomiozin kötődik a gelsolinhoz. A kötési affinitás Tpm1.12 esetén $K_D = 0,7 \pm 0,2 \mu\text{M}$, Tpm3.1 esetén $K_D = 0,3 \pm 0,2 \mu\text{M}$.
- 6) A tropomiozinnal komplexet képező gelsolin erőteljesebben fokozza a filamentum depolimerizációját mint önmagában csak a gelsolin.
- 7) A vázizom tropomiozinnak védő hatása van a gelsolin által kiváltott depolimerizációval szemben.
- 8) A Ca^{2+} koncentráció növekedése mikromólos tartományban fokozza mind a gelsolin, mind a gelsolin-tropomiozin komplex aktivitását.

VII. IRODALMI HIVATKOZÁSOK

- Ahuja, Rashmi, Roser Pinyol, Nicole Reichenbach, Laura Custer, Michael M. Kessels, and Britta Qualmann. 2008. "Morphology." 131(2):337–50.
- Alberts, Bruce, Dennis Bray, Karen Hopkin, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter. 2014. *Essential Cell Biology, 4th Edition [Hardcover]*.
- Ashish, Matthew S. Paine, Paul B. Perryman, Lin Yang, Helen L. Yin, and Joanna K. Krueger. 2007. "Global Structure Changes Associated with Ca²⁺ Activation of Full-Length Human Plasma Gelsolin." *Journal of Biological Chemistry* 282(35):25884–92.
- Bach, C. T. T., S. Creed, J. Zhong, M. Mahmassani, G. Schevzov, J. Stehn, L. N. Cowell, P. Naumanen, P. Lappalainen, P. W. Gunning, and G. M. O'Neill. 2009. "Tropomyosin Isoform Expression Regulates the Transition of Adhesions To Determine Cell Speed and Direction." *Molecular and Cellular Biology* 29(6):1506–14.
- Bharadwaj, Shantaram, Sarah Hitchcock-DeGregori, Andrew Thorburn, and G. L. Prasad. 2004. "N Terminus Is Essential for Tropomyosin Functions: N-Terminal Modification Disrupts Stress Fiber Organization and Abolishes Anti-Oncogenic Effects of Tropomyosin-1." *Journal of Biological Chemistry* 279(14):14039–48.
- Blanchoin et al. 2001. "Inhibition of the Arp2/3 Complex-Nucleated Actin Polymerization and Branch Formation by Tropomyosin." *Current Biology* 11(16):1300–1304.
- Boussouf, Sabrina E., Robin Maytum, Kornelia Jaquet, and Michael A. Geeves. 2007. "Role of Tropomyosin Isoforms in the Calcium Sensitivity of Striated Muscle Thin Filaments." *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 28(1):49–58.
- Broschat, K. O. 1990. "Tropomyosin Prevents Depolymerization of Actin Filaments from the Pointed End." *Journal of Biological Chemistry* 265(34):21323–29.
- Broschat, K. O. and D. R. Burgess. 1986. "Low M(r) Tropomyosin Isoforms from

- Chicken Brain and Intestinal Epithelium Have Distinct Actin-Binding Properties.” *Journal of Biological Chemistry* 261(28):13350–59.
- Bryce et al. 2003. “Ca²⁺-Dependent Binding and Activation of Dormant Ezrin by Dimeric S100P.” *Molecular Biology of the Cell* 14(February):2372–84.
- Bugyi, Beáta and Marie-France Carlier. 2010. “Control of Actin Filament Treadmilling in Cell Motility.” *Annual Review of Biophysics* 39(1):449–70.
- Bugyi, Beáta, Christophe Le Clainche, Guillaume Romet-Lemonne, and Marie France Carlier. 2008. “How Do in Vitro Reconstituted Actin-Based Motility Assays Provide Insight into in Vivo Behavior?” *FEBS Letters* 582(14):2086–92.
- Bugyi, Beáta, Dominique Didry, and Marie France Carlier. 2010. “How Tropomyosin Regulates Lamellipodial Actin-Based Motility: A Combined Biochemical and Reconstituted Motility Approach.” *EMBO Journal* 29(1):14–26.
- Burtnick, Leslie D., Edward K. Koepf, Jonathan Grimes, E. Yvonne Jones, David I. Stuart, Paul J. McLaughlin, and Robert C. Robinson. 1997. “The Crystal Structure of Plasma Gelsolin: Implications for Actin Severing, Capping, and Nucleation.” *Cell* 90(4):661–70.
- Burtnick, Leslie D., Dunja Urosev, Edward Irobi, Kartik Narayan, and Robert C. Robinson. 2004. “Structure of the N-Terminal Half of Gelsolin Bound to Actin: Roles in Severing, Apoptosis and FAF.” *EMBO Journal* 23(14):2713–22.
- Caldwell, Benjamin J., Christine Lucas, Anthony J. Kee, Katharina Gaus, Peter W. Gunning, Edna C. Hardeman, Alpha S. Yap, and Guillermo A. Gomez. 2014. “Tropomyosin Isoforms Support Actomyosin Biogenesis to Generate Contractile Tension at the Epithelial Zonula Adherens.” *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)* 71(12):663–76.
- Carlier, M. F. 1991. “Actin: Protein Structure and Filament Dynamics.” *Journal of Biological Chemistry* 266(1):1–4.
- Carlier, Marie-France. 1991. “Nucleotide Hydrolysis in Cytoskeletal Assembly.” *Current Opinion in Cell Biology* 3(1):12–17.
- Castano, E., V. V. Philimonenko, M. Kahle, J. Fukalová, A. Kalendová, S. Yildirim, R. Dzijak, H. Dingová-Krásna, and P. Hozák. 2010. “Actin Complexes in the Cell

- Nucleus: New Stones in an Old Field.” *Histochemistry and Cell Biology* 133(6):607–26.
- Choe, Han, Leslie D. Burtnick, Marisan Mejillano, Helen L. Yin, Robert C. Robinson, and Senyon Choe. 2002. “The Calcium Activation of Gelsolin: Insights from the 3Å Structure of the G4–G6/Actin Complex.” *Journal of Molecular Biology* 324(4):691–702.
- Chowdhury, H. H., M. R. Popoff, and R. Zorec. 2000. “Actin Cytoskeleton and Exocytosis in Rat Melanotrophs.” *Pflugers Archiv : European Journal of Physiology* 439(3 Suppl):R148-9.
- Cooper, J. A. and D. A. Schafer. 2000. “Control of Actin Assembly and Disassembly at Filament Ends.” *Current Opinion in Cell Biology* 12(1):97–103.
- Coulton, Arthur T., Kezia Koka, Sherwin S. Lehrer, and Michael A. Geeves. 2008. “Role of the Head-to-Tail Overlap Region in Smooth and Skeletal Muscle Beta-Tropomyosin.” *Biochemistry* 47(1):388–97.
- Creed, Sarah J., Nicole Bryce, Perttu Naumanen, Ron Weinberger, Pekka Lappalainen, Justine Stehn, and Peter Gunning. 2008. “Tropomyosin Isoforms Define Distinct Microfilament Populations with Different Drug Susceptibility.” *European Journal of Cell Biology* 87(8):709–20.
- Criddle, A. H., Michael A. Geeves, and T. Jeffries. 1985. “The Use of Actin Labelled with N-(1-Pyrenyl)Iodoacetamide to Study the Interaction of Actin with Myosin Subfragments and Troponin/Tropomyosin.” *The Biochemical Journal* 232(2):343–49.
- Dabrowska et al. 1996. “Myosin Mg²⁺ -ATPase Activity.” 759:753–59.
- Ditsch, Andrea and Albrecht Wegner. 1995. “Two Low Affinity Ca²⁺ Binding Sites of Gelsolin That Regulate Association with Actin.” *European Journal of Biochemistry* 229(2):512–16.
- Drewes, Gerard and Heinz Faulstich. 1993. “Cooperative Effects on Filament Stability in Actin Modified at the C-terminus by Substitution or Truncation.” *European Journal of Biochemistry* 212(1):247–53.
- von der Ecken, Julian, Mirco Müller, William Lehman, Dietmar J. Manstein, Pawel A.

- Penczek, and Stefan Raunser. 2014. "Structure of the F-Actin–Tropomyosin Complex." *Nature* 519:114.
- Elzinga, M., J. H. Collins, W. M. Kuehl, and R. S. Adelstein. 1973. "Complete Amino-Acid Sequence of Actin of Rabbit Skeletal Muscle." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 70(9):2687–91.
- Estes, James E., Lynn A. Selden, Henry J. Kinosian, and Lewis C. Gershman. 1992. "Tightly-Bound Divalent Cation of Actin." *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 13(3):272–84.
- Fine, R. E., A. L. Blitz, S. E. Hitchcock, and B. Kaminer. 1973. "Tropomyosin in Brain and Growing Neurones." *Nature: New Biology* 245(145):182–86.
- Flicker, P. F., G. N. Jr Phillips, and C. Cohen. 1982. "Troponin and Its Interactions with Tropomyosin. An Electron Microscope Study." *Journal of Molecular Biology* 162(2):495–501.
- Fujiwara, I., D. Vavylonis, and T. D. Pollard. 2007. "Polymerization Kinetics of ADP- and ADP-Pi-Actin Determined by Fluorescence Microscopy." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(21):8827–32.
- Garg, Renu, Nagesh Peddada, Amin Sagar, Deepak Nihalani, and Ashish. 2011. "Visual Insight into How Low PH Alone Can Induce Actin-Severing Ability in Gelsolin under Calcium-Free Conditions." *Journal of Biological Chemistry* 286(23):20387–97.
- Gateva, Gergana, Elena Kremneva, Theresia Reindl, Tommi Kotila, Konstantin Kogan, Laurène Gressin, Peter W. Gunning, Dietmar J. Manstein, Alphée Michelot, and Pekka Lappalainen. 2017. "Tropomyosin Isoforms Specify Functionally Distinct Actin Filament Populations In Vitro." *Current Biology* 27(5):705–13.
- Geeves, Michael A., Sarah E. Hitchcock-DeGregori, and Peter W. Gunning. 2014. "A Systematic Nomenclature for Mammalian Tropomyosin Isoforms." *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 36(2):147–53.
- Ghoshdastider, Umesh, David Popp, Leslie D. Burtnick, and Robert C. Robinson. 2013. "The Expanding Superfamily of Gelsolin Homology Domain Proteins." *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)* 70(11):775–95.

- Grzanka, Alina, Dariusz Grzanka, and Magdalena Orlikowska. 2004. "Fluorescence and Ultrastructural Localization of Actin Distribution Patterns in the Nucleus of HL-60 and K-562 Cell Lines Treated with Cytostatic Drugs." *Oncology Reports* 11(4):765–70.
- Gunning, P., G. O’neill, and E. Hardeman. 2008. "Tropomyosin-Based Regulation of the Actin Cytoskeleton in Time and Space." *Physiological Reviews* 88(1):1–35.
- Gunning, P. W., E. C. Hardeman, P. Lappalainen, and D. P. Mulvihill. 2015. "Tropomyosin - Master Regulator of Actin Filament Function in the Cytoskeleton." *Journal of Cell Science* 128(16):2965–74.
- Gunning, Peter W., Galina Schevzov, Anthony J. Kee, and Edna C. Hardeman. 2005. "Tropomyosin Isoforms: Divining Rods for Actin Cytoskeleton Function." *Trends in Cell Biology* 15(6):333–41.
- Hannan, A. J., G. Schevzov, P. Gunning, P. L. Jeffrey, and R. P. Weinberger. 1995. "Intracellular Localization of Tropomyosin mRNA and Protein Is Associated with Development of Neuronal Polarity." *Molecular and Cellular Neurosciences* 6(5):397–412.
- Higgs, H. N. and T. D. Pollard. 2001. "Regulation of Actin Filament Network Formation through ARP2/3 Complex: Activation by a Diverse Array of Proteins." *Annual Review of Biochemistry* 70:649–76.
- Holmes, Kenneth C., David Popp, Werner Gebhard, and Wolfgang Kabsch. 1990. "Atomic Model of the Actin Filament." *Nature* 347:44.
- Hotulainen, Pirta and Casper C. Hoogenraad. 2010. "Actin in Dendritic Spines: Connecting Dynamics to Function." *Journal of Cell Biology* 189(4):619–29.
- Hotulainen, Pirta, Olaya Llano, Sergei Smirnov, Kimmo Tanhuanpää, Jan Faix, Claudio Rivera, and Pekka Lappalainen. 2009. "Defning Mechanisms of Actin Polymerization and Depolymerization during Dendritic Spine Morphogenesis." *Journal of Cell Biology* 185(2):323–39.
- Houk, T. Willia. and Kathleen Ue. 1974. "The Measurement of Actin Concentration in Solution: A Comparison of Methods." *Analytical Biochemistry* 62(1):66–74.
- Hsiao et al. 2016. "HHS Public Access." 25(12):148–55.

- Ishikawa, R., S. Yamashiro, and F. Matsumura. 1989. "Differential Modulation of Actin-Severing Activity of Gelsolin by Multiple Isoforms of Cultured Rat Cell Tropomyosin. Potentiation of Protective Ability of Tropomyosins by 83-KDa Nonmuscle Caldesmon." *Journal of Biological Chemistry* 264(13):7490–97.
- Janmey, Paul A., Soren Hvidt, George F. Oster, Jennifer Lamb, Thomas P. Stossel, and John H. Hartwig. 1990. "Effect of ATP on Actin Filament Stiffness." *Nature* 347:95.
- Kabsch, W., H. G. Mannherz, D. Suck, E. F. Pai, and K. C. Holmes. 1990. "Atomic Structure of the Actin:DNase I Complex." *Nature* 347(6288):37–44.
- Khaitlina, Sofia, Helene Fitz, and Horst Hinssen. 2013. "The Interaction of Gelsolin with Tropomyosin Modulates Actin Dynamics." *FEBS Journal* 280(18):4600–4611.
- Khaitlina, Sofia, Markus Walloscheck, and Horst Hinssen. 2004. "Calcium-Induced Conformational Changes in the C-Terminal Half of Gelsolin Stabilize Its Interaction with the Actin Monomer." *Biochemistry* 43(40):12838–45.
- Kinosian, Henry J., Jay Newman, Bryan Lincoln, Lynn A. Selden, Lewis C. Gershman, and James E. Estes. 1998. "Ca²⁺regulation of Gelsolin Activity: Binding and Severing of F-Actin." *Biophysical Journal* 75(6):3101–9.
- Kiselar, J. G., P. A. Janmey, S. C. Almo, and M. R. Chance. 2003. "Visualizing the Ca²⁺-Dependent Activation of Gelsolin by Using Synchrotron Footprinting." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(7):3942–47.
- Kiselar, Janna G, Paul A. Janmey, Steven C. Almo, and Mark R. Chance. 2003. "Structural Analysis of Gelsolin Using Synchrotron Protein Footprinting." *Molecular & Cellular Proteomics : MCP* 2(10):1120–32.
- Koepf, Edward K. and Leslie D. Burtnick. 1992. "Interaction of Plasma Gelsolin with Tropomyosin." *FEBS Letters* 309(1):56–58.
- Kostyukova, Alla S. and Sarah E. Hitchcock-DeGregori. 2004. "Effect of the Structure of the N Terminus of Tropomyosin on Tropomodulin Function." *Journal of Biological Chemistry* 279(7):5066–71.
- Kouyama, Tsutomu and Koshin Mihashi. 1981. "Fluorimetry Study of

- N???(1???Pyrenyl)Iodoacetamide???Labelled F???Actin: Local Structural Change of Actinfile:///E:/Munka/PhD/KBN/Irodalomjegyzék/Bryce 2003, Specification of Actin Filament Function and Molecular Composition by Tropomyosin Isoforms.Pdf P.” *European Journal of Biochemistry* 114(1):33–38.
- Koya, Richard Chikara, Hisakazu Fujita, Shigeomi Shimizu, Makoto Ohtsu, Masato Takimoto, Yoshihide Tsujimoto, and Noboru Kuzumaki. 2000. “Gelsolin Inhibits Apoptosis by Blocking Mitochondrial Membrane Potential Loss and Cytochrome c Release.” *Journal of Biological Chemistry* 275(20):15343–49.
- Kustermans, Gaelle, Jacques Piette, and Sylvie Legrand-Poels. 2008. “Actin-Targeting Natural Compounds as Tools to Study the Role of Actin Cytoskeleton in Signal Transduction.” *Biochemical Pharmacology* 76(11):1310–22.
- Lal, A. A. and E. D. Korn. 1986. “Effect of Muscle Tropomyosin on the Kinetics of Polymerization of Muscle Actin.” *Biochemistry* 25(5):1154–58.
- Lamb, Jennifer a, Philip G. Allen, Bertrand Y. Tuan, and A. Janmeygll. 1993. “Modulation of Gelsolin Function.” *Journal of Biological Chemistry* 268(12):8999–9004.
- Lehman, W., V. Hatch, V. Korman, M. Rosol, L. Thomas, R. Maytum, M. A. Geeves, J. E. Van Eyk, L. S. Tobacman, and R. Craig. 2000. “Tropomyosin and Actin Isoforms Modulate the Localization of Tropomyosin Strands on Actin Filaments.” *Journal of Molecular Biology* 302(3):593–606.
- Li, Guo Hua, Pamela D. Arora, Yu Chen, Christopher A. McCulloch, and Peter Liu. 2012. “Multifunctional Roles of Gelsolin in Health and Diseases.” *Medicinal Research Reviews* 32(5):999–1025.
- Lin et al. 2000. “June 19, 2000 JBC- M0:03732 (3.” 03732.
- Lueck, Andreas, Helen L. Yin, David J. Kwiatkowski, and Philip G. Allen. 2000. “Calcium Regulation of Gelsolin and Adseverin: A Natural Test of the Helix Latch Hypothesis.” *Biochemistry* 39(18):5274–79.
- Machesky, Laura M., S. J. Atkinson, C. Ampe, J. Vandekerckhove, and Thomas D. Pollard. 1994. “Purification of a Cortical Complex Containing 2 Unconventional Actins from *Acanthamoeba* by Affinity-Chromatography on Profilin-Agarose.”

- Journal of Cell Biology* 127(1):107–15.
- McGough, Amy M., Chris J. Staiger, Jung Ki Min, and Karen D. Simonetti. 2003. “The Gelsolin Family of Actin Regulatory Proteins: Modular Structures, Versatile Functions.” *FEBS Letters* 552(2–3):75–81.
- Miki, Masao, Séan I. O’Donoghue, and Cristobal G. Dos Remedios. 1992. “Structure of Actin Observed by Fluorescence Resonance Energy Transfer Spectroscopy.” *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 13(2):132–45.
- Milligan, R. A., M. Whittaker, and D. Safer. 1990. “Molecular Structure of F-Actin and Location of Surface Binding Sites.” *Nature* 348(6298):217–21.
- Moore, P. B., H. E. Huxley, and D. J. DeRosier. 1970. “Three-Dimensional Reconstruction of F-Actin, Thin Filaments and Decorated Thin Filaments.” *Journal of Molecular Biology* 50(2):279–92.
- Moraczewska, J., K. Nicholson-Flynn, and S. E. Hitchcock-DeGregori. 1999. “The Ends of Tropomyosin Are Major Determinants of Actin Affinity and Myosin Subfragment 1-Induced Binding to F-Actin in the Open State.” *Biochemistry* 38(48):15885–92.
- Muhlrad, A., P. Cheung, B. C. Phan, C. Miller, and E. Reisler. 1994. “Dynamic Properties of Actin. Structural Changes Induced by Beryllium Fluoride.” *Journal of Biological Chemistry* 269(16):11852–58.
- Mullins, R. D., J. A. Heuser, and T. D. Pollard. 1998. “The Interaction of Arp2/3 Complex with Actin: Nucleation, High Affinity Pointed End Capping, and Formation of Branching Networks of Filaments.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95(11):6181–86.
- Nag, Shalini, Qing Ma, Hui Wang, Sakesit Chumnarnsilpa, Wei Lin Lee, Mårten Larsson, Balakrishnan Kannan, Maria Hernandez-Valladares, Leslie D. Burtnick, and Robert C. Robinson. 2009. “Ca²⁺ Binding by Domain 2 Plays a Critical Role in the Activation and Stabilization of Gelsolin.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(33):13713–18.
- Neidt, Erin M., Bonnie J. Scott, and David R. Kovar. 2009. “Formin Differentially Utilizes Profilin Isoforms to Rapidly Assemble Actin Filaments.” *Journal of*

- Biological Chemistry* 284(1):673–84.
- Nyakern-Meazza, Maria, Kartik Narayan, Clarence E. Schutt, and Uno Lindberg. 2002. “Tropomyosin and Gelsolin Cooperate in Controlling the Microfilament System.” *Journal of Biological Chemistry* 277(32):28774–79.
- Nyitrai, Miklós, Gábor Hild, Nóra Hartvig, József Belágyi, and Béla Somogyi. 2000. “Conformational and Dynamic Differences between Actin Filaments Polymerized from ATP- or ADP-Actin Monomers.” *Journal of Biological Chemistry* 275(52):41143–49.
- Orlova, Albina, Ewa Prochniewicz, and Edward H. Egelman. 1995. “Structural Dynamics of F-Actin: II. Cooperativity in Structural Transitions.” *Journal of Molecular Biology* 245(5):598–607.
- Orlova, Albina, Alexander Shvetsov, Vitold E. Galkin, Dmitry S. Kudryashov, Peter a Rubenstein, Edward H. Egelman, and Emil Reisler. 2004. “Actin-Destabilizing Factors Disrupt Filaments by Means of a Time Reversal of Polymerization.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(51):17664–68.
- Pollard, T. D., L. Blanchoin, and R. D. Mullins. 2000. “Molecular Mechanisms Controlling Actin Filament Dynamics in Nonmuscle Cells.” *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 29:545–76.
- Pollard, T. D. and J. A. Cooper. 1986. “Actin and Actin-Binding Proteins. A Critical Evaluation of Mechanisms and Functions.” *Annual Review of Biochemistry* 55:987–1035.
- Pollard, T. D., I. Goldberg, and W. H. Schwarz. 1992. “Nucleotide Exchange, Structure, and Mechanical Properties of Filaments Assembled from ATP-Actin and ADP-Actin.” *Journal of Biological Chemistry* 267(28):20339–45.
- Pollard, Thomas D. 1986. “Rate Constants for the Reactions of ATP-and ADP-Actin with the Ends of Actin Filaments.” *Journal of Cell Biology* 103(6):2747.
- Pollard, Thomas D. 1995. “Missing Link for Intracellular Bacterial Motility ?” 5(8):837–40.
- Pollard, Thomas D. 2007. “Regulation of Actin Filament Assembly by Arp2/3 Complex

- and Formins.” *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 36:451–77.
- Pollard, Thomas D. and Gary G. Borisy. 2003. “Cellular Motility Driven by Assembly and Disassembly of Actin Filaments.” *Cell* 112(4):453–65.
- Pope, Brian J., John T. Gooch, and Alan G. Weeds. 1997. “Probing the Effects of Calcium on Gelsolin.” *Biochemistry* 36(50):15848–55.
- Pope, Brian, Sutherland Maciver, and Alan Weeds. 1995. “Localization of the Calcium-Sensitive Actin Monomer Binding Site in Gelsolin to Segment 4 and Identification of Calcium Binding Sites.” *Biochemistry* 34(5):1583–88.
- Pruyne, David, Marie Evangelista, Changsong Yang, Erfei Bi, Sally Zigmond, Anthony Bretscher, and Charles Boone. 2002. “Role of Formins in Actin Assembly: Nucleation and Barbed-End Association.” *Science (New York, N.Y.)* 297(5581):612–15.
- Quinlan, Margot E., John E. Heuser, Eugen Kerkhoff, and R. Dyche Mullins. 2005. “Drosophila Spire Is an Actin Nucleation Factor.” *Nature* 433(7024):382–88.
- Robinson, Robert C., Marisan Mejillano, Vincent P. Le, Leslie D. Burtnick, Helen L. Yin, and Senyon Choe. 1999. “Domain Movement in Gelsolin: A Calcium-Activated Switch.” *Science* 286(5446):1939 LP – 1942.
- Sagot, Isabelle, Saskia K. Klee, and David Pellman. 2002. “Yeast Formins Regulate Cell Polarity by Controlling the Assembly of Actin Cables.” *Nature Cell Biology* 4(1):42–50.
- Schevzov, G., P. Gunning, P. L. Jeffrey, C. Temm-Grove, D. M. Helfman, J. J. Lin, and R. P. Weinberger. 1997. “Tropomyosin Localization Reveals Distinct Populations of Microfilaments in Neurites and Growth Cones.” *Molecular and Cellular Neurosciences* 8(6):439–54.
- Schevzov, Galina, Bernadette Vrhovski, Nicole S. Bryce, Sarah Elmir, Min Ru Qiu, Geraldine M. O’Neill, Nan Yang, Nicole M. Verrills, Maria Kavallaris, and Peter W. Gunning. 2005. “Tissue-Specific Tropomyosin Isoform Composition.” *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 53(5):557–70.
- Schleicher, M., E. Andre, H. Hartmann, and A. A. Noegel. 1988. “Actin-Binding

- Proteins Are Conserved from Slime Molds to Man.” *Developmental Genetics* 9(4–5):521–30.
- Silacci, P., L. Mazzolai, C. Gauci, N. Stergiopoulos, H. L. Yin, and D. Hayoz. 2004. “Gelsolin Superfamily Proteins: Key Regulators of Cellular Functions.” *Cellular and Molecular Life Sciences* 61(19–20):2614–23.
- Sklyarova, Tatyana, Veerle De Corte, Kris Meerschaert, Liesbeth Devriendt, Berlinda Vanloo, Juliet Bailey, Lynnette J. Cook, Mark Goethals, Jozef Van Damme, Magda Puype, Joël Vandekerckhove, and Jan Gettemans. 2002. “Fragmin60 Encodes an Actin-Binding Protein with a C2 Domain and Controls Actin Thr-203 Phosphorylation in *Physarum Plasmodia* and *Sclerotia*.” *Journal of Biological Chemistry* 277(42):39840–49.
- Smillie, L. B. 1982. “Preparation and Identification of Alpha- and Beta-Tropomyosins.” *Methods in Enzymology* 85 Pt B:234–41.
- Spillane et al. 2012. “NIH Public Access.” 71(9):747–58.
- Spudich, James A. and Susan Watt. 1971. “The Regulation of Rabbit Skeletal Muscle Contraction.” *Journal of Biological Chemistry* 246(15):4866–71.
- Straub, Fb. 1942. “Actin.” *Studies from the Institute of Medical Chemistry University Szeged* 2:1–15.
- Tóth, Mónika Ágnes, Andrea Kinga Majoros, Andrea Teréz Vig, Ede Migh, Miklós Nyitrai, József Mihály, and Beáta Bugyi. 2016. “Biochemical Activities of the Wiskott-Aldrich Syndrome Homology Region 2 Domains of Sarcomere Length Short (SALS) Protein.” *Journal of Biological Chemistry* 291(2):667–80.
- Ueki, N., K. Sobue, K. Kanda, T. Hada, and K. Higashino. 1987. “Expression of High and Low Molecular Weight Caldesmons during Phenotypic Modulation of Smooth Muscle Cells.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84(24):9049–53.
- Vartiainen, Maria K. 2008. “Nuclear Actin Dynamics - From Form to Function.” *FEBS Letters* 582(14):2033–40.
- Vindin, Howard and Peter Gunning. 2013. “Cytoskeletal Tropomyosins: Choreographers of Actin Filament Functional Diversity.” *Journal of Muscle*

Research and Cell Motility 34(3–4):261–74.

- Vlahovich, Nicole, Anthony J. Kee, Chris Van der Poel, Emma Kettle, Delia Hernandez-Deviez, Christine Lucas, Gordon S. Lynch, Robert G. Parton, Peter W. Gunning, and Edna C. Hardeman. 2009. “Cytoskeletal Tropomyosin Tm5NM1 Is Required for Normal Excitation–Contraction Coupling in Skeletal Muscle” edited by T. D. Pollard. *Molecular Biology of the Cell* 20(1):400–409.
- Wawro, Barbara, Norma J. Greenfield, Martin A. Wear, John A. Cooper, N. Henry, and Sarah E. Hitchcock-degregori. 2008. “NIH Public Access.” *Cell* 46(27):8146–55.
- Wear, Martin A. and John A. Cooper. 2004. “Capping Protein: New Insights into Mechanism and Regulation.” *Trends in Biochemical Sciences* 29(8):418–28.
- Weeds, A. G., J. Gooch, P. McLaughlin, B. Pope, M. Bengtsson, and R. Karlsson. 1995. “Identification of the Trapped Calcium in the Gelsolin Segment 1-Actincomplex: Implications for the Role of Calcium in the Control of Gelsolin Activity.” *FEBS Letters* 360(3):227–30.
- Wegner, Albrecht. 1979. “Equilibrium of the Actin-Tropomyosin Interaction.” *Journal of Molecular Biology* 131(4):839–53.
- Weinberger, Ron P., Robert C. Henke, Ornella Tolhurst, Peter L. Jeffrey, and Peter Gunning. 1993. “Induction of Neuron-Specific Tropomyosin MRNAs by Nerve Growth Factor Is Dependent on Morphological Differentiation.” *Journal of Cell Biology* 120(1):205–15.
- Weinberger, Ron, Galina Schevzov, Peter Jeffrey, Kylie Gordon, Mark Hill, and Peter Gunning. 1996. “The Molecular Composition of Neuronal Microfilaments Is Spatially and Temporally Regulated.” *The Journal of Neuroscience* 16(1):238–52.
- Welch, M. D. and T. J. Mitchison. 1998. “Purification and Assay of the Platelet Arp2/3 Complex.” *Methods in Enzymology* 298:52–61.
- Welch, Matthew D., Angela H. DePace, Suzie Verma, Akihiro Iwamatsu, and Timothy J. Mitchison. 1997. “The Human Arp2/3 Complex Is Composed of Evolutionarily Conserved Subunits and Is Localized to Cellular Regions of Dynamic Actin Filament Assembly.” *Journal of Cell Biology* 138(2):375–84.
- Witke, Walter, Arlene H. Sharpe, John H. Hartwig, Toshifumi Azuma, Thomas P.

- Stossel, and David J. Kwiatkowski. 1995. "Hemostatic, Inflammatory, and Fibroblast Responses Are Blunted in Mice Lacking Gelsolin." *Cell* 81(1):41–51.
- Yamashiro-Matsumura, S. and F. Matsumura. 1988. "Characterization of 83-Kilodalton Nonmuscle Caldesmon from Cultured Rat Cells: Stimulation of Actin Binding of Nonmuscle Tropomyosin and Periodic Localization along Microfilaments like Tropomyosin." *Journal of Cell Biology* 106(6):1973–83.
- Yin, H. L., J. H. Hartwig, K. Maruyama, and T. P. Stossel. 1981. "Ca²⁺ Control of Actin Filament Length. Effects of Macrophage Gelsolin on Actin Polymerization." *Journal of Biological Chemistry* 256(18):9693–97.

VIII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretettel mondok köszönetet mindazoknak, akik segítettek abban, hogy a Ph.D. értekezésem elkészülhetett.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Nyitrai Miklósnak, a Biofizika Intézet intézetvezető egyetemi tanárának, PTE ÁOK dékánjának, hogy lehetőséget adott, hogy a Biofizika Intézetben dolgozhassak és, aki mind szakmailag mind emberileg támogatta és segítette munkámat.

Köszönöm szakmai irányítását és tanácsait témavezetőmnek Dr. Talián Csaba Gábornak, aki végig kísérte kutatásaimat és szakmai tanácsaival a megfelelő mederbe terelte azt.

Külön köszönettel tartozom Dr. Bugyi Beátának, aki többször is segített mind elméleti mind szakmai tanácsaival.

A fellületi plazmon rezonancia (SPR) mérések elvégzéséért köszönettel tartozom Dr. Bécsi Bálintnak és Dr. Erdődi Ferencnek a Debreceni Egyetem Orvostani Vegytani Intézet munkatársainak.

Tömegspektrometriás mérés elvégzéséért köszönettel tartozom Márk Lászlónak, a PTE ÁOK Orvosi és Biokémiai Intézet munkatársának.

Köszönöm Hüseyin Besirnek (EMBL) a TEV proteáz plazmidot.

Hálával tartozom Brunner Jánosnénak és Hoffmanné Simon Évának, hogy munkámat segítették a fehérjetisztítás és PCR munkák során, valamint, hogy segítségükkel több mérési technikát is elsajátíthattam.

Hálával tartozom férjemnek, szüleimnek és barátaimnak, hogy mindvégig türelmesen támogattak és bátorítottak doktori kutatásaim során.

Végezetül szeretnék köszönetet mondani a Biofizika Intézet minden munkatársának, akikkel együtt dolgozhattam, és akiktől már kezdetektől fogva rengeteget tanulhattam.

IX. ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

- 1) Kis-Bicskei, Nikolett, Andrea Vig, Miklos Nyitrai, Beata Bugyi, and Gabor C. Talian. 2013. “Purification of Tropomyosin Br-3 and 5NM1 and Characterization of Their Interactions with Actin.” *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)* 70(11):755–65.

IF:3.007

- 2) Kis-Bicskei N, Bécsi B, Erdódi F, Robinson RC, Bugyi B, Huber T, Nyitrai M, Talián GC. 2018. „Tropomyosins Regulate the Severing Activity of Gelsolin in Isoform-Dependent and Independent Manners.” *Biophys J.*;114(4):777-787. doi: 10.1016/j.bpj.2017.11.3812.

IF:2.84



Purification of Tropomyosin Br-3 and 5NM1 and Characterization of Their Interactions with Actin

Nikolett Kis-Bicskei,¹ Andrea Vig,¹ Miklós Nyitrai,^{1,2,3} Beáta Bugyi,^{1,2*} and Gábor C. Talián^{1*}¹Department of Biophysics, University of Pécs, Medical School, Pécs, Hungary²Szentágothai Research Center, Functional Protein Dynamics Research Group, Pécs, Hungary³Hungarian Academy of Sciences, Office for Subsidized Research Units, Budapest, Hungary

Received 3 May 2013; Revised 17 August 2013; Accepted 4 September 2013

Monitoring Editor: Christophe Ampe

Tropomyosins were first identified in neuronal systems in 1973. Although numerous isoforms were found and described since then, many aspects of their function and interactions remained unknown. Tropomyosin isoforms show different sorting pattern in neurogenesis. As one example, TM5NM1/2 is present in developing axons, but it is replaced by TMBR-3 in mature neurons, suggesting that these tropomyosin isoforms contribute differently to the establishment of the functional features of the neuronal actin networks. We developed a method for the efficient purification of TMBR-3 and TM5NM1 as recombinant proteins using bacterial expression system and investigated their interactions with actin. We found that both isoforms bind actin filaments, however, the binding of TM5NM1 was much stronger than that of TMBR-3. TMBR-3 and TM5NM1 modestly affected actin assembly kinetics, in an opposite manner. Consistently with the higher affinity of TM5NM1 it inhibited actin filament disassembly more efficiently than TMBR-3. Similarly to other previously studied tropomyosins TM5NM1 inhibited the Arp2/3 complex-mediated actin assembly. Notably, TMBR-3 did not influence the Arp2/3 complex-mediated polymerization. This is a unique feature of TMBR-3, since so far it is the only known tropomyosin supporting the activity of the Arp2/3 complex, indicating that TMBR-3 may colocalize and work simultaneously with Arp2/3 complex in neuronal cells. © 2013 Wiley Periodicals, Inc.

Key Words: actin; tropomyosin; actin nucleation factors; purification; fluorescence spectroscopy

*Address correspondence to: Gábor C. Talián; Department of Biophysics, University of Pécs, Medical School, Szigeti str. 12, Pécs H-7624, Hungary. E-mail: gabor.c.talian@aok.pte.hu or Beáta Bugyi; Department of Biophysics, University of Pécs, Medical School, Szigeti str. 12, Pécs H-7624, Hungary. E-mail: beata.bugyi@aok.pte.hu

Published online 00 Month 2013 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

Introduction

The microfilament system orchestrates a great number of diverse cellular processes, including the establishment of cell geometry, cell motility, intracellular transport, contractility, cytokinesis and transformation. Structurally, the basic building blocks of microfilaments are actin and tropomyosin (TM) [Vindin and Gunning, in press]. Both actin and tropomyosin exist in several isoforms, which assemble into distinct compartments with different molecular composition, morphology, and function [Gunning et al., 1998; Perrin and Ervasti, 2010].

Tropomyosins are elongated, rod-shaped molecules with extensive α -helical conformation, forming parallel-chained coiled-coil dimers. The individual dimers assemble into helical polymers in a head-to-tail manner, cooperatively associating along the longitudinal axis of the actin filament on both sides [Flicker et al., 1982; Coulton et al., 2008]. Tropomyosins are present in all animal and fungal cells. In mammals four tropomyosin genes are known that produce more than 40 different mRNAs and about 25 protein isoforms [Gunning et al., 2005, 2008]. Traditionally, tropomyosin isoforms involved in the contractile apparatus of muscle cells are referred to as muscle isoforms, while isoforms associated to the cell cytoskeleton are referred to as nonmuscle or cytoskeletal tropomyosins. The expression and localization of tropomyosin isoforms are strictly regulated at both tissue and subcellular level, and often depend on the developmental state as well [Gunning et al., 2005, 2008]. Since the first discovery of TMs in the nervous system several neuronal isoforms have been described [Fine et al., 1973]. The TMBR-1, 2, and 3 are encoded by the α -TM gene [Lees-Miller et al., 1990]. TMBR-2 and 3 are short, while TMBR-1 is a long isoform, as characterized by the use of exon 1a and 2b or exon 1b at the N-terminus, respectively (Fig. 1A). The γ -Tm gene also encodes tropomyosin isoforms present in neurons, like TM5NM1 and TM5NM2, both of them are short isoforms, carrying exon 1b (Fig. 1A). These isoforms exhibit different subcellular

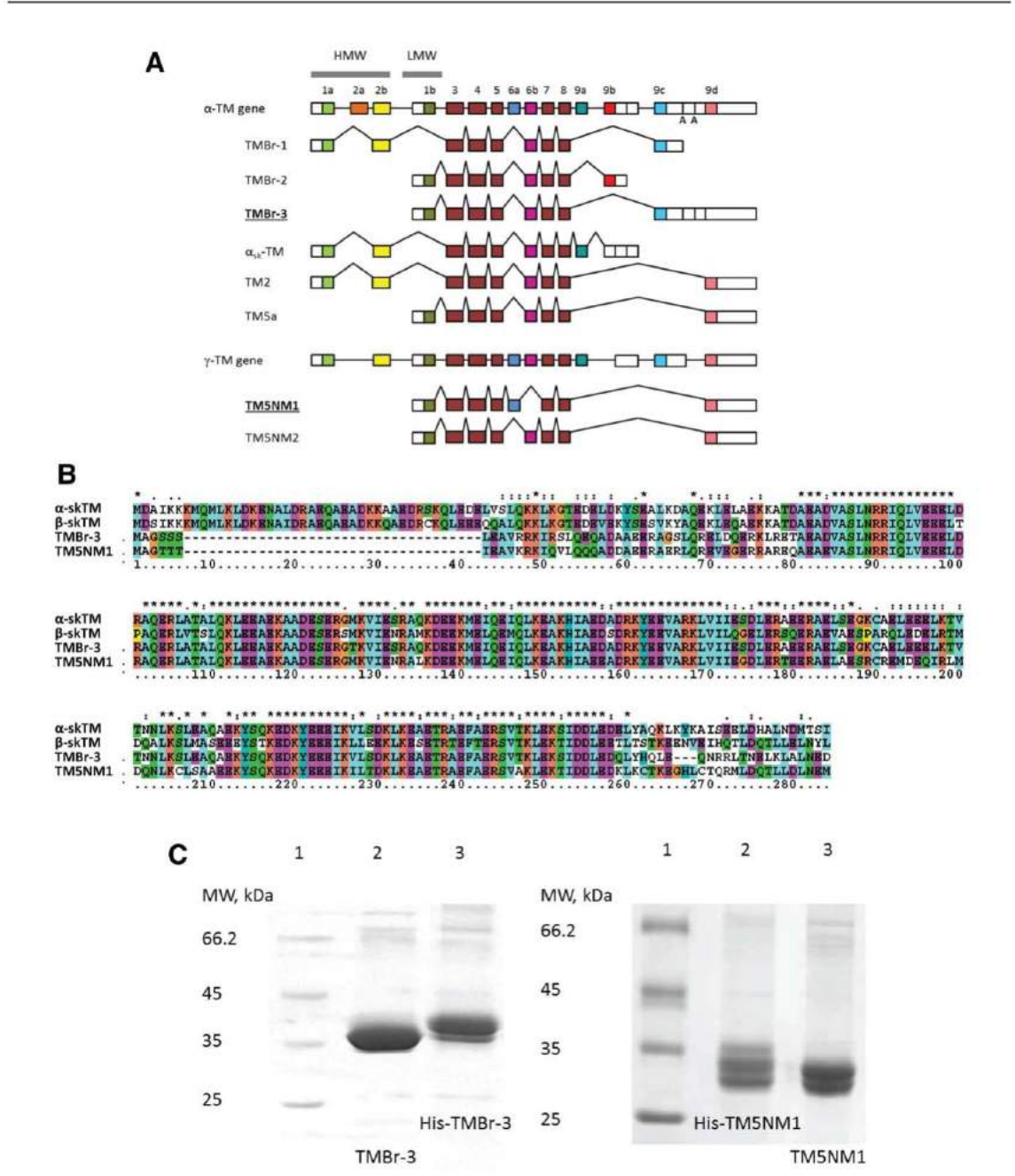


Fig. 1. (A) Exon organization of different tropomyosin isoforms. HMW: high molecular weight tropomyosins, containing exon 1a and 2; LMW: low molecular weight tropomyosins, containing exon 1b. (B) Sequence alignment of different tropomyosin isoforms; from top to bottom: alpha skeletal TM (*Oryctolagus cuniculus*), beta skeletal TM (*Oryctolagus cuniculus*), TMBr-3 (*Mus Musculus*), TM5NM1 (*Mus musculus*). The sequences were aligned using ClustalX. (C) SDS-PAGE of the purified TMBr-3 and TM5NM1 proteins before and after TEV protease digestion. Lane 1: MW: molecular weight marker (Fermentas).

distributions and developmental profiles, as well, suggesting their functional specialization for different neuronal processes. TM5NM1/2 is abundantly present in early rodent embryos at both mRNA and protein level at the site of the

axon pole in the differentiating neurons, similarly to the 7-day old cultured primer cortical neurons [Hannan et al., 1995]. Some days later the TM5NM1/2 proteins exhibit a predominantly axonal localization. TMBr-3 appears only in

the 16-day rat embryo, its amount is very low at birth in the rat cerebellum, then continuously increases until the third postnatal week. In PC12 cells cultured on substratum the mRNA expression of TMBr-3 highly correlated with the induction of the neuronal morphological differentiation [Weinberger et al., 1993]. Around the 15–17 prenatal days the TM5NM1/2 mRNA disappears from the axon, which coincides with the appearance of TMBr-3. The isoform change between the TM5NM1/2 and TMBr-3 also happens at the protein level around the 17 embryonic day, resulting in the repositioning of TM5NM1/2 into the somatodendritic compartment of the mature neurons. Similar results were obtained in chicken, as well, indicating that such a switch in the isoform composition is conserved through the evolution of the higher vertebrates [Weinberger et al., 1996]. Further studies with more specialized antibodies have demonstrated that TM5NM2 localized to the axon shaft [Schevzov et al., 1997], while TM5NM1 to the outer region of the growth cone in the early embryos [Schevzov et al., 2005]. TMBr-3 was absent from the growth cones [Schevzov et al., 1997; Had et al., 1994] and its distribution in cultured embryonic neurons was diffuse, showing no association with specific microfilament structures [Stamm et al., 1993]. The results also suggested that the function of TM5NM1 and TMBr-3 was associated with the differentiation, growth, and maintenance of the specialized neuronal processes. In stably transfected B35 neuroepithelial cell clones overexpressing TMBr-3 very few stress fibers, decreased cell surface and increased cell motility with lamellipodium formation was observed. In contrast, TM5NM1 had opposite effects on most of these processes which was dominantly counteracted by TMBr-3 when cotransfected. Also, TMBr-3 and TM5NM1 differently regulated the access of actin to its binding partners, such as myosin and actin depolymerizing factor (ADF)/cofilin [Bryce et al., 2003]. Altogether, the above results indicate that these tropomyosin isoforms can define functionally distinct microfilament compartments.

Despite the extensive studies on tropomyosins, the physicochemical properties and the molecular bases of the isoform-specific functional differences are not well understood. To better understand the cellular functioning of TMBr-3 and TM5NM1 isoforms we aimed to characterize their interactions with actin using biophysical and biochemical approaches. Here we report the purification of the recombinant TMBr-3 and TM5NM1 and the *in vitro* characterization of their interactions with actin. We showed that both isoforms bind actin filaments, however, the affinity of TM5NM1 was much higher than that of TMBr-3. Both tropomyosins have minor effect on actin polymerization; TMBr-3 slightly decreased the rate of actin assembly, while TM5NM1 slightly increased it. Consistently with the higher affinity of TM5NM1 it inhibited actin filament disassembly more effectively than TMBr-3. TM5NM1 inhibited the Actin-related protein (Arp) 2/3 complex-mediated

actin assembly as detected for other previously studied tropomyosins. Interestingly, TMBr-3 by not influencing the Arp2/3 complex-mediated polymerization seems to be a unique tropomyosin isoform, since so far it is the only known tropomyosin supporting the activity of the Arp2/3 complex.

Results

Expression and Purification of TMBr-3 and TM5NM1

We produced the TMBr-3 and TM5NM1 tropomyosin isoforms as recombinant proteins in sufficient amount for *in vitro* characterization of their interactions with actin. Binding of tropomyosin isoforms to actin filaments can exhibit a high degree of cooperativity, in which the formation of so called head-to-tail interactions between the N-, and C-termini of neighboring tropomyosin molecules are crucial. Minor modifications in the amino acid sequence can affect actin binding and consequently the function of tropomyosins. Therefore, we aimed to purify TMBr-3 and TM5NM1 isoforms as recombinant proteins without any excess amino acids of the original sequences. The full length coding sequences of the corresponding mouse tropomyosin isoforms were used for protein production (Fig. 1B). TMBr-3 consists of 738 nucleotides (including the stop codon) encoding 245 amino acids. Compared with GenBank sequences it contains a M91T amino acid change. TM5NM1 is 747 base pair long encoding 248 amino acids, carrying an E230G amino acid change. The significance of these alterations is not known. The full coding sequences of mouse TMBr-3 and TM5NM1 were cloned into pET28a plasmid in *E. coli* and expressed in Luria-Broth medium. The His-tagged proteins were purified from the bacterial pellet using Ni-NTA and hydroxyapatite affinity. The His-tag was removed by TEV protease digestion. According to our cloning scheme, the TEV protease cleavage occurred directly before the first methionine of the protein sequence. The average yield of the purified protein was 3–5 mg/L of *E. coli* culture. The recombinant TMBr-3 and TM5NM1 proteins produced a band on Coomassie-stained SDS-PAGE gel with an apparent molecular mass of approximately 37 and 31 kDa, respectively (Fig. 1C). The molecular mass of TMBr-3 and TM5NM1 estimated from the sequence were 28.313 and 28.948 kDa, respectively (ProtParam). Mass spectrometry gave very similar results to the sequence analysis [28.301 and 28.949 kDa for TMBr-3 and TM5NM1, respectively (data not shown)].

Binding of TMBr-3 and TM5NM1 to Actin Filaments

To test the ability of recombinant TMBr-3 and TM5NM1 to bind actin filaments (F-actin) cosedimentation assays were performed. Increasing amounts of TMBr-3 or TM5NM1

were incubated with F-actin (5 μM) overnight and the samples were pelleted. The SDS-PAGE analysis revealed that the amount of these tropomyosin isoforms cosedimented with F-actin was increased in a concentration dependent manner, suggesting that both TMBr-3 and TM5NM1 bound to actin filaments (Fig. 2A). As controls, TMBr-3 and TM5NM1 at different concentrations were also centrifuged in the absence of F-actin. We found that a small amount of tropomyosin appeared in the pellet even without F-actin (data not shown). The amounts of the pelleted tropomyosin in the absence of actin were quantified at each concentration and used for the correction of the TMBr-3 and TM5NM1 bands obtained with the actin-containing samples. The corrected TM:F-actin band intensity ratios were plotted as a function of tropomyosin concentration (Fig. 2B). Hyperbola fit (Eq. 1) to the data gave dissociation equilibrium constants (K_d) of $3.5 \pm 0.9 \mu\text{M}$ and $0.1 \pm 0.1 \mu\text{M}$ for the binding of TMBr-3 and TM5NM1 to F-actin, respectively. Although the latter estimate clearly indicates a very tight binding affinity, relatively large errors attributed to the calculated mean. The large error appears probably due to the very tight binding and relatively large applied protein concentrations. To overcome this problem one should decrease the actin

concentration in similar experiments. In this work we avoided doing this because it would cause a much larger relative contribution from monomeric actin to the actin pool.

Effects of TMBr-3 and TM5NM1 on Actin Filament Assembly

Tropomyosins can affect actin filament assembly in an isoform-dependent manner. Muscle tropomyosins, such as recombinant striated muscle and tissue purified rabbit skeletal $\alpha\beta$ TM, slowed down actin polymerization, presumably by their protective effects against the spontaneous mechanical breakage of the actin filaments producing less free ends for the polymerization [Lal and Korn, 1986; Wawro et al., 2007]. In contrast, nonmuscle TM5a and TM2 enhanced actin polymerization by $\sim 30\text{--}40\%$, suggesting a specific effect on barbed end dynamics [Wawro et al., 2007]. To study the effect of TMBr-3 and TM5NM1 on the kinetics of actin assembly, polymerization assays were performed. To quantify our observations the polymerization rates were derived by linear fitting to the 0.45–0.55 range of the normalized pyrene traces. In agreement with previous observations, we found that 6 μM skeletal muscle tropomyosin (skTM) slowed down the assembly of 5 μM actin by $\sim 60\%$ (Fig. 3). Note that considering the affinity of skTM to actin ($K_d = 0.5 \mu\text{M}$) the 6 μM skTM saturated the binding sites on actin in equilibrium. 40 μM TMBr-3 and 17 μM TM5NM1 (more than 10-fold greater than the corresponding K_d values) had only minor effect on actin polymerization (Fig. 3). Similarly to skTM, TMBr-3 reduced the rate of actin assembly. While TM5NM1 slightly enhanced actin assembly rate.

Effects of TMBr-3 and TM5NM1 on Actin Filament Disassembly

Tropomyosins can inhibit the disassembly of actin filaments by their structural stabilization effect [Broschat, 1990]. To study depolymerization, actin (2 μM , containing 50%

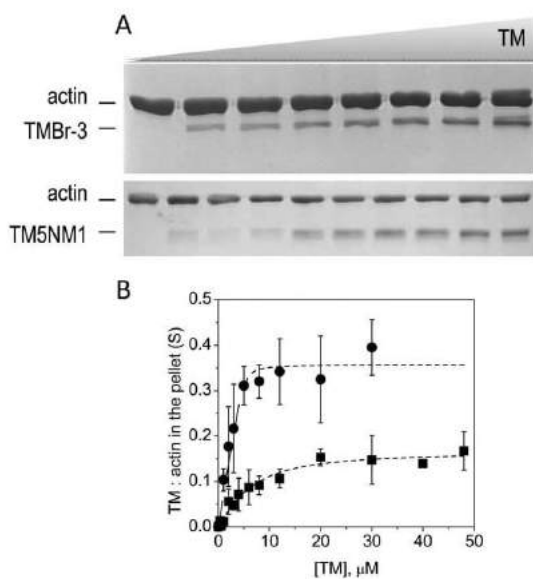


Fig. 2. (A) TMBr-3 (upper panel) or TM5NM1 (lower panel) at different concentrations in the presence of 5 μM actin was sedimented, and analyzed on SDS-PAGE by densitometric evaluation. TMBr-3 concentrations are as follows: 0, 2, 4, 6, 8, 12, 30 and 40 μM , for TM5NM1 the concentrations are 0, 1, 2, 3, 5, 8, 12, 20, 30 μM . (B) Stoichiometric ratio of tropomyosin to actin in the pellet (S) was plotted as the function of the total tropomyosin concentration (TMBr-3: squares, TM5NM1: circles). Dashed line shows the hyperbola fit to the data using Eq. (1). Data were derived from three independent experiments and the errors are given as standard deviations.

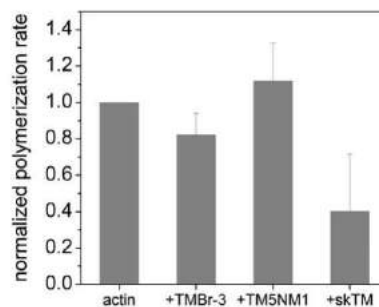


Fig. 3. Normalized rate of actin polymerization 5 μM G-actin (5% pyrene labeled) in the absence and presence of different tropomyosin isoforms, as indicated. The tropomyosin concentrations are as follows; 40 μM TMBr-3, 17 μM TM5NM1 and 6 μM skTM. Data were derived at least from three independent experiments and the errors are given as standard deviations.

pyrene labeled actin) was first polymerized and then diluted into polymerization buffer to reach final concentration of 50 nM. This strategy ensures that after dilution the actin concentration is less than the critical concentration, which results in actin filament disassembly dominated by barbed end dynamics. The depolymerization kinetics of actin filaments was followed by monitoring pyrene fluorescence. In the absence of tropomyosin the transients showed single decreasing phase (Fig. 4A upper panel; black curve). When filaments were preincubated with either 10 μ M skTM, 40 μ M TMBr-3, or 40 μ M TM5NM1 two phases were observed (Fig. 4A upper panel). The first phase (for approximately 50 s) showed slower depolymerization than in the absence of tropomyosin. Then a second, faster phase appeared. In these experiments the buffer to which actin was diluted did not contain tropomyosin. Consequently, after the dilution (40 \times) the tropomyosin concentration has decreased substantially. Due to the alteration of the conditions a new equilibrium was established and most of the tropomyosin dissociated from the filaments. We attribute the first phases of the transients to the depolymerization of actin filaments in the actin-tropomyosin complex, while the second observed phase corresponded to the depolymerization after the dissociation of tropomyosin. To confirm this explanation we repeated the experiments by diluting the actin filaments into buffers containing tropomyosin at the same concentration as in the actin samples (10 μ M skTM or 40 μ M TMBr-3). The transients obtained under these conditions (Fig. 4A lower panel) were single phased corroborating our conclusions regarding the effect of dissociation of tropomyosin from actin. These observations showed that all the investigated tropomyosins slowed down the depolymerization of actin filaments, and also suggested that dissociation of tropomyosin was slow and occurred on the few tens of seconds time scale. The depolymerization experiments were repeated at various tropomyosin concentrations. The first 50 sec of the transients were fitted with linear functions and the slopes were used to estimate the depolymerization rates. The data showed that these tropomyosin isoforms decreased the depolymerization rate in a concentration dependent manner (Fig. 4B). However, skTM and TM5NM1 had an approximately two-fold greater effect on actin depolymerization than TMBr-3, in correlation with the different affinities of these tropomyosins.

Effects of TMBr-3 and TM5NM1 on the Arp2/3 Complex-Catalyzed Actin Assembly

Previous biochemical studies revealed that some tropomyosin isoforms inhibit the Arp2/3 complex-catalyzed actin assembly [Blanchoin et al., 2001; Bugyi et al., 2010]. Cell biological studies revealed that TMBr-3 and TM5NM1 had opposite effect on lamellipodia formation and cell migration [Bryce et al., 2003]. To study the effect of TMBr-3 and TM5NM1 on Arp2/3 complex activity

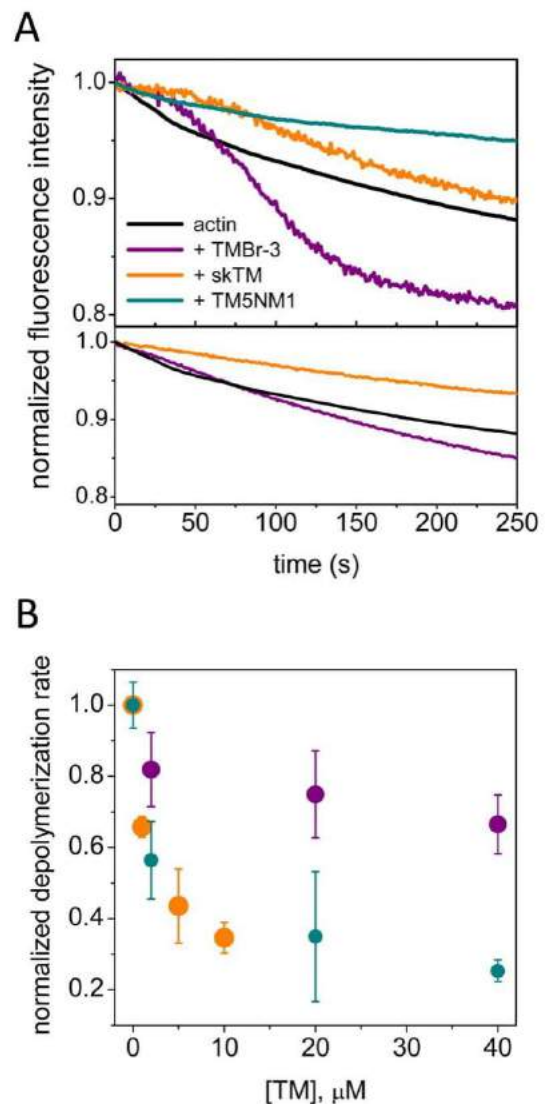


Fig. 4. (A) Depolymerization kinetics of 50 nM F-actin in the absence (black line) or presence of TMBr-3 (40 μ M; purple line), TM5NM1 (40 μ M; dark cyan line) or skTM (10 μ M; orange line). The upper panel shows the results obtained when actin was diluted to buffer containing no tropomyosin. The lower panel shows examples of data from experiments in which the dilution was carried out into tropomyosin containing buffer. Fifty nanomolar F-actin in the absence of tropomyosins (black line) or in the presence of TMBr-3 (40 μ M; purple line) or skTM (10 μ M; orange line). (B) Normalized depolymerization rates of actin filaments (derived from data similar to those presented in Fig. 4A) as a function of tropomyosin concentration ([TM]). The results are shown for TMBr-3 (purple circles), TM5NM1 (dark cyan circles) and skTM (orange circles). Data were obtained from at least three independent experiments and the errors are given as standard deviations.

polymerization assays were performed. We found that similarly to skTM, TM5NM1 inhibited the VCA-Arp2/3 complex-catalyzed actin assembly in a concentration-dependent manner (Fig. 5B). At the highest TM5NM1 concentration we applied the inhibition was ~25% (Fig. 5B). Interestingly, we found that TMBR-3 had no effect on Arp2/3 complex-catalyzed actin assembly (Fig. 5A).

Discussion

We produced TMBR-3 and TM5NM1 as recombinant proteins in a nontagged form, without any excess amino acids to the native sequence, because any extension at the polypeptide ends may cause unpredictable, even deleterious effects [Bharadwaj et al., 2004]. We successfully purified these tropomyosin isoforms in sufficient amount for *in vitro* characterization of their interactions with actin. We found that both TMBR-3 and TM5NM1 bind actin filaments, however, their affinities for actin differ (Fig. 2). TMBR-3 binds F-actin with approximately seven-fold lower affinity ($K_d = 3.48 \pm 0.92 \mu\text{M}$) than skTM ($K_d = 0.5 \mu\text{M}$) [Boussouf et al., 2007], while TM5NM1 has somewhat

tighter affinity ($K_d = 0.10 \pm 0.16 \mu\text{M}$) than skTM. These differences in the binding strength are consistent with previous results, showing that the affinity of tropomyosins to actin strongly depends on the specific combination of exons encoding the N-, and C-terminus of tropomyosins [Moraczewska et al., 1999]. For the tropomyosin isoforms studied in this paper, the 1b1d exon pair (Fig. 1A) is expected to endow the TM5NM1 isoform with the highest affinity, exons 1a9a with acetylation (for tissue purified skTM) results in somewhat lower affinity, while the 1b9c exon combination in TMBR-3 results in poor binding to actin filaments. Our results support the view that the N- and C-termini of tropomyosins are important determinants of actin affinity by establishing the ability of tropomyosin isoforms to form end-to-end polymers along the actin filament. The lower affinity of TMBR-3 binding to actin filaments is also consistent with previous findings in showing that brain isoforms isolated from tissue bind actin with approximately 10-fold lower affinity than muscle isoforms [Broschat and Burgess, 1986]. It would also explain the previous results showing that saturation of the actin filaments by TMBR-3 cannot be reached by adding up to 10 μM of

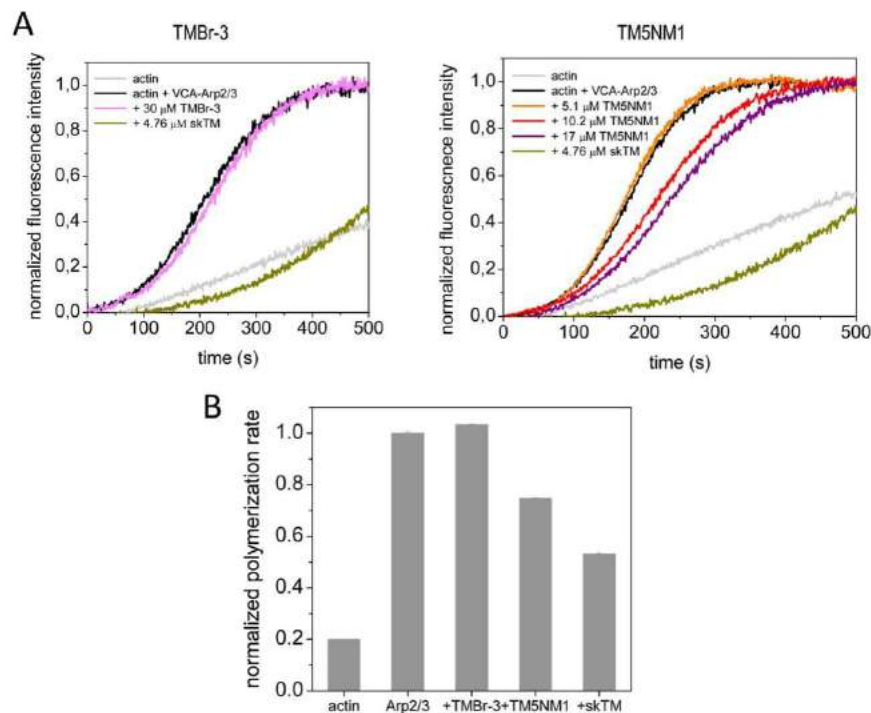


Fig. 5. (A) Time courses of VCA-Arp2/3 complex catalyzed actin assembly monitored by the change in pyrene fluorescence in the absence (black line) and presence of different tropomyosin isoforms, as indicated. Left panel: the TMBR-3 concentration is 30 μM (magenta line). Right panel: the TM5NM1 concentrations are 5.1 μM (orange line), 10.2 μM (red line) and 17 μM (purple line). The skTM concentration is 4.76 μM (dark yellow line). [G-actin] = 2.5 μM (5% pyrene labeled), [Arp2/3 complex] = 100 nM, [VCA] = 200 nM. Light gray curve shows the kinetics of spontaneous actin assembly. **(B)** Normalized rate of VCA-Arp2/3 complex catalyzed actin polymerization (derived from data similar to those presented in Fig. 5A) in the absence and presence of different tropomyosin isoforms, as indicated. The tropomyosin concentrations are as follows; 40 μM TMBR-3, 17 μM TM5NM1, and 4.76 μM skTM.

tropomyosin without troponin or myosin [Moraczewska et al., 1999]. It should be also considered that in nonmuscle cells tropomyosins associate exclusively with nonmuscle β and γ actin isoforms, rather than the muscle specific α isoform that was used in our study [Weinberger et al., 1996]. Some isoform-dependent features can establish specific actin and tropomyosin pairs with higher binding affinity and preferential binding for optimal functioning. As example, isoform-specific interactions were already shown for profilin and formin isoforms [Neidt et al., 2009]. The interaction of many actin-binding proteins with monomeric or filamentous actin can be antagonistically or synergistically altered by the presence of other proteins. As a relevant example, caldesmon—a calcium/calmodulin regulated actin-binding protein—is known to enhance the binding of low molecular weight tropomyosins to actin [Yamashiro-Matsumura and Matsumura, 1988]. Since caldesmon is expressed in brain [Ueki et al., 1987], we speculate that it may also promote the association of the TMBR-3 isoforms to actin filaments.

SkTM at saturating amount slows down both actin assembly and disassembly, by reducing the association and dissociation rate constants of actin monomers to and from the filaments (Figs. 3 and 4) [Lal and Korn, 1986; Broschat, 1990]. We found that TMBR-3 had a similar but smaller effects on the rate of actin polymerization and depolymerization (Figs. 3 and 4). This observation may be explained by assuming that TMBR-3 decreases the rate constant for the association of actin monomers to the ends of the filaments to a lower extent than skTM. To corroborate this assumption in cosedimentation assays we found that the amount of actin in the supernatants were independent of the TMBR-3 concentration (data not shown). Accordingly, under polymerizing conditions the concentration of the monomeric actin was the same in the absence and presence of TMBR-3, indicating that TMBR-3 did not change the critical concentration. Based on the unchanged critical concentration one would expect that TMBR-3 has the same magnitude of effect on the association and dissociation rates of the actin monomers. It was thus expected that TMBR-3 has the same effect on the association rate constant, which correlates with the slight inhibition of actin assembly by TMBR-3 (Fig. 3). In depolymerization experiments we found evidence that the dissociation of the tropomyosin from actin is slow, occurring within 50–100 sec. Thus, the corresponding micromolar dissociation equilibrium constant of the TM-actin complex suggest that tropomyosin association to the filaments must also be slow falling into the $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ range. In this case the binding of tropomyosin would occur on a second time-scale under our experimental conditions, which is comparable with the rate of actin filament growth. Therefore, in these measurements we did not observe the full effect of TMBR-3 on the polymerization rate. In the depolymerization experiments actin was preincubated with tropomyosin and the equilibrium

has been reached prior to the measurements. These considerations can explain the small deviation of the experimental data from the expectations based on the unchanged critical concentration. Our data also implicated that TMBR-3 association to actin filaments is approximately 60-fold slower than that of actin monomers. We found that TM5NM1 slightly stimulated actin assembly, while inhibited actin disassembly at the same extent as skTM (Figs. 3 and 4). In previous studies TM5a and TM2 isoforms behaved similarly to TM5NM1, by increasing the polymerization rate and inhibiting the depolymerization rate [Kostyukova and Hitchcock-DeGregori, 2004; Wawro et al., 2007]. The C-terminus of tropomyosin points toward the barbed end of the actin filament, and this part is common for TM5NM1, TM5a, and TM2 (exon 9d) but differ for skTM and TMBR-3 (exon 9a or 9c, respectively) (Fig. 1A). While the N-terminus facing toward the pointed end is the same for skTM and TM2 (exons 1a2b) or TM5a, TMBR-3, and TM5NM1 (exon 1b) (Fig. 1A). Although sequence and hence structure-specific effects of the individual tropomyosin termini can be assumed to have impact on actin filament end dynamics, no simple correlations seem to exist. Considering the magnitude of the effects of different tropomyosins (TM5a/TM5NM1 > skTM > TM2 > TMBR-3) this raises the possibility of the importance of actin affinity, which in turn is determined by the head-to-tail interactions of the tropomyosin ends [Moraczewska et al., 1999]. In that respect the C-terminal exon 9c of TMBR-3 (shared with TMBR-1 isoform) may have a significant concern on the observed low binding strength and the moderate effects on actin dynamics.

Similarly to all the previously studied tropomyosin isoforms (rabbit skTM, chicken striated muscle TM, TM5a, and TM2) [Blanchoin et al., 2001; Bugyi, 2010], TM5NM1 inhibited the VCA-Arp2/3 complex catalyzed actin assembly (Fig. 5). In contrast, we found that TMBR-3 did not have any effect of the nucleation catalyzing activity of the VCA-Arp2/3 complex machinery (Fig. 5). This is a unique feature of TMBR-3, since so far this is the only tropomyosin isoform, which allows Arp2/3 complex-dependent actin assembly. The different effects of TMBR-3 and TM5NM1 on Arp2/3 complex-catalyzed actin assembly is in good agreement with the observations from cellular studies. In B35 neuroepithelial cells the expression of TMBR-3 or TM5NM1 cells resulted in opposite effects on the leading edge region and lamellipodia formation; excess TMBR-3 induced lamellipodia formation, while TM5NM1 decreased lamellipodia [Bryce et al., 2003]. Also, in the brain the Arp2/3 complex machinery is involved in the cytoskeletal organization of both post- and presynaptic actin structures that can be also associated with TMBR-3 [Had et al., 1994; Hotulainen et al., 2009; Hotulainen and Hooogenraad, 2010; Spillane et al., 2011]. The inhibitory effect of tropomyosins on Arp2/3 complex activity is not attributed to differences in the ATP hydrolysis and phosphate release rate or debranching of daughter filaments,

it rather results from a competitive binding of the two proteins to actin filaments [Blanchoin et al., 2001; Bugyi, 2010]. The exact molecular origin of the competitive binding between tropomyosin and Arp2/3 complex is not known. Structural modeling revealed that the actin filament binding sites of skTM and Arp2/3 complex partially overlap [Rouiller et al., 2008], suggesting that the functional inhibition results from steric hindrance. No structural data are available for TMBR-3 and TM5NM1 yet. However, previous studies showed that the azimuthal equilibrium position of the tropomyosins around the actin filament can be isoform-specific [Lehman et al., 2000]. Thus, the different effects of tropomyosins on the activity of the Arp2/3 complex can originate from the different positions of the different tropomyosin isoforms on actin filaments. This assumes that TMBR-3 occupies positions on the actin filament different from those tropomyosins that inhibit the activity of the Arp2/3 complex. On the other hand, it cannot be excluded that differences in the structural and kinetic features of the head-to-tail complex formation, which is an important determinant of actin filament binding, can cause the differences in the effects of tropomyosins on the interaction of actin with the Arp2/3 complex machinery. In conclusion, we propose that distinct tropomyosin isoforms can have different kinetic and structural features and flexibility to occupy and maintain a characteristic localization on the actin filament. This isoform dependent nature of the tropomyosin-actin interactions is also important in the competition for shared binding sites with other actin-binding proteins, such as the Arp2/3 complex, which plays essential roles in the manifestation and regulation of the biological functions of tropomyosins.

Although more information will be required to understand the exact roles of these tropomyosins in nonmuscle cells, the current observations suggest that their functions differ substantially. In future studies it would also be important to investigate whether the presence of other actin-regulatory proteins, such as caldesmon, ADF/cofilins, myosins, β and γ actin isoforms have an impact on the interaction of the TMBR-3 and TM5NM1 with actin.

Materials and Methods

Molecular Cloning and Protein Preparation

The mouse TMBR-3 tropomyosin construct was generated from a previously cloned sequence in pET28a plasmids containing an N-terminal FXa protease recognition site. TM5NM1 was cloned de novo from total mRNA starting with reverse transcription and PCR to produce cDNA. We designed target-specific PCR primers: the forward primer was 5'- TAT TTT CAG ATG GCG GGG AGT AGC TCG CT -3' and the reverse primer was 5'- TCT AAG CTT TTA ATC CTC ATT CAG GGC CA -3' for TMBR-3, and 5'- TAT TTT CAG ATG GCC GGG ACC ACC ACC ATC -3' and 5'- TCT AAG CTT TTA CAT CTC GTT

CAG GT -3' for TM5NM1. The introduction of a HindIII restriction endonuclease site is underlined. The thermal cycler conditions were as follows: 95°C for 5 min, 38 cycles of 95°C for 30 s denaturation, 50°C for 1 min annealing, and 72°C for 1 min synthesis, then 72°C for 5 min. For TM5NM1 we applied 10 cycles at 42°C for 1 min and 30 cycles at 51°C for 1 min as annealing. In a second round PCR an EcoRI restriction endonuclease (underlined) and a ProTEV protease site (double underlined) were tailored N-terminal to the coding sequence using the 5'- CTC GAA TTC GAA AAC CTG TAT TTT CAG ATG -3' forward primer and the above reverse primers. The thermal cycler conditions were: 95°C for 5 min, 40 cycles of 95°C for 30 sec denaturation, 58°C for 1 min annealing, and 72°C for 1 min synthesis, then 72°C for 5 min. The PCR product was cloned into 6xHis/pET28a expression plasmid (NovaGen) between the EcoRI and HindIII restriction sites. The recombinant protein was expressed in *E. coli* BL21 (DE3) cells using 30 μ g/ml kanamycin as selection antibiotics. A preculture in 5 ml was prepared over night at 37°C, and used to inoculate 3L Luria Broth medium. The cells were grown to OD₆₀₀ 0.6–0.8 at 37°C and induced by 1 mM IPTG (Sigma) for 4 h. Bacterial pellet was resuspended in lysis buffer (50 mM NaH₂PO₄ buffer pH 8.0, 500 mM NaCl), containing 2 μ g/ml DNase, 5 mM MgCl₂, 1 \times complete protease inhibitor mix (Sigma), and 0.2 mM PMSF, lysed by five cycles of freeze-thaw and sonication (5 \times 1 min), then centrifuged (6000 \times g for 15 min at 4°C, Sorvall, T-1250 rotor). The supernatant was loaded to Ni-NTA chelating column (QIAGEN) equilibrated with lysis buffer, and eluted with 5, 10, 20, 40, and 250 mM imidazole (Sigma) in lysis buffer. The peak fractions were pooled and dialyzed against hydroxyapatite column buffer (1 mM Na-phosphate buffer pH 7.0, 1 M KCl, 2.5 mM DTT). The sample was loaded on a hydroxyapatite CHT column (Bio-Rad), and eluted with 300 mM Na-phosphate buffer, pH 7.0, 1 M KCl and 2.5 mM DTT. The peak fractions were pooled and dialyzed against storage buffer (5 mM Tris pH 7.5, 100 mM KCl, 1 mM DTT). The His-tag was cleaved by TEV protease at 37°C, adjusting the amount of protease and the time of incubation empirically. The digested protein was again purified on a Ni-NTA column to remove the His-tag and the TEV protease. The flow-through was concentrated, ultracentrifuged (676,000 \times g for 20 min at 4°C, Beckman-Coulter, MLA-130 rotor), and the concentration was measured using a BCA kit (Sigma). Protein preparations were stored at 0°C in 5 mM Tris pH 7.5, 100 mM KCl and 1 mM DTT.

TEV protease was purified using a 6 \times His-tag pET24 (TEV-235) plasmid construction (a kind gift of Hüseyin Besir, EMBL) in *E. coli* BL21 DE3 cells. Freshly transformed bacteria were plated on LB-agar containing 30 μ g/ml kanamycin, and 60 ml preculture was grown over night at 37°C. It was then used in 2% to inoculate 3 l LB medium grown to OD₆₀₀ 0.6–0.8 at 37°C. The temperature was reduced to 30°C for 45 min, and expression was

induced by adding 1 mM IPTG for 4 h at 30°C. Bacterial pellet was resuspended in lysis buffer (50 mM Na-phosphate buffer pH 8.0, 100 mM NaCl, 25 mM imidazole, 10% glycerol) containing 2 µg/ml DNase, 5 mM MgCl₂, 1× complete protease inhibitor mix (Sigma), 0.2 mM PMSF and 500 µg/ml lysozyme. It was incubated for 10 min at RT and cells were further lysed by sonication (6 × 25 sec). The sample was centrifuged (100,000 × *g* for 1 h at 4°C, Sorvall, T-1250 rotor), and the supernatant was loaded on Ni-NTA column equilibrated with lysis buffer. The column was incubated at 4°C for 2 h then washed with 15 ml lysis buffer and 10 ml elution buffer (50 mM Na-phosphate buffer pH 8.0, 100 mM NaCl, 500 mM imidazole, 10% glycerol). The latter fraction was dialyzed against IEX running buffer (50 mM Na-phosphate buffer pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10% glycerol), and further purified on anion exchange source 15Q column with IEX elution buffer (50 mM Na-phosphate buffer pH 8.0, 1 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10% glycerol). The peak fractions were pooled and checked on SDS-PAGE and ultracentrifuged (676,000 × *g* for 20 min at 4°C, Beckman-Coulter, MLA-130 rotor). The protein concentration was determined photometrically using $\epsilon_{280} = 1.19 \text{ ml} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. The final glycerol content was adjusted to 50% and the samples were stored at -20°C.

Actin was prepared from rabbit hind leg muscle [Spudich and Watt, 1971] and gel filtered in a Superdex G75 (GE Healthcare) column in buffer A (4 mM Tris pH 7.5, 0.2 mM ATP, 0.1 mM CaCl₂, 0.5 mM MEA, 0.005% NaN₃). G-actin was stored on ice in buffer A until used. Before polymerization CaCl₂ was exchanged for MgCl₂ with EGTA.

Arp2/3 complex from bovine brain and recombinant GST-tagged human VCA were purified as described previously [Egile et al., 1999].

skTM was purified from the remnants of the actin acetone powder [Smillie, 1982], then applied to hydroxyapatite chromatography, and stored frozen in 5 mM Tris pH 7.8 and 1 mM DTT. For the fluorescent measurements actin was labeled with pyrenyl-iodoacetamide as described previously (pyrene, Invitrogen) [Kouyama and Mihashi, 1981]. The protein concentrations were measured photometrically using $\epsilon_{280} = 1.11 \text{ ml} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ and $\epsilon_{290} = 0.63 \text{ ml} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ extinction coefficients for actin and $\epsilon_{280} = 0.3 \text{ ml} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ for skTM.

Co-Sedimentation Assays

Twenty micromolar Mg-G-actin in buffer A was polymerized with 2 mM MgCl₂ and 100 mM KCl, then the F-actin solution was diluted to 5 µM in the absence or presence of different concentrations of tropomyosin in polymerization buffer [buffer A supplemented with 2 mM MgCl₂ and 100 mM KCl (final concentrations)]. Samples (60 µl) were incubated over night at 4°C, then pelleted (440,000 × *g* for 30 min at

4°C, Beckman-Coulter, TLA-100 rotor). Pellets and supernatants were separated and analyzed by SDS-PAGE [Laemmli, 1970]. The protein bands on the gel were quantified using densitometry (GeneTools) after Coomassie staining. Control experiments showed that Coomassie stains actin and these tropomyosin isoforms equally (data not shown). The TM : actin ratio in the pellet was calculated and plotted as a function of tropomyosin concentration. The data were fit using the following equation:

$$S = \frac{1}{2} * \left[\left(([TM]_0 + [A]_0 + K_d) * \frac{S_{\max}}{[A]_0} \right) - \sqrt{\left(\left(([TM]_0 + [A]_0 + K_d) * \frac{S_{\max}}{[A]_0} \right)^2 - 4 * \frac{S_{\max}^2}{[A]_0} * [TM]_0 \right)} \right] \quad (1)$$

where *S* is the TM: actin ratio in the pellet, *S*_{max} is the maximum value of *S* measured at saturating TM concentration, *[TM]*₀ and *[A]*₀ are the total concentration of TM and actin in the samples, respectively and *K*_d is the dissociation equilibrium constant of the TM-F-actin complex.

Fluorescence Measurements

Fluorescence experiments were performed using a Perkin-Elmer or a Jobin Yvon spectrofluorimeter (Horiba Scientific). In all the experiments the actin-bound calcium was replaced with magnesium by adding 0.2 mM EGTA and 0.05 mM MgCl₂ (final concentrations) and incubating the samples for 5–10 min at room temperature. Pyrene fluorescence was excited and the emission was detected at 365 nm and 407 nm, respectively. Measurements were carried out at 22°C. When concentration dependence was measured the total volume of tropomyosin and its storing buffer was always kept constant and represented 40% of the total volume of the sample.

Polymerization Assays.

Five micromolar Mg-G-actin in buffer A (containing 5% pyrene labeled actin) was polymerized in the presence of 2 mM MgCl₂, 100 mM KCl (final concentrations) and different amounts of tropomyosin. Polymerization kinetics was followed by measuring the changes in pyrene fluorescence in time. The fluorescence transients were normalized and the polymerization rates were determined by fitting the linear part (0.45–0.55) of the data. Average rates from at least three independent measurements were calculated.

Depolymerization Assays.

Ten micromolar Mg-G-actin in buffer A (containing 50% pyrene labeled actin) was polymerized over night by adding 2 mM MgCl₂ and 100 mM KCl (final concentrations) in the absence or presence of tropomyosin. The F-actin solution was diluted to 50 nM into polymerization buffer.

Depolymerization kinetics was followed by measuring the decrease in pyrene fluorescence in time. Depolymerization rates were estimated by linear fitting the first 50 sec of the pyrene transients. Average rates from at least three independent measurements were calculated. Normalized depolymerization rates were calculated as the ratio of the depolymerization rate in the absence of tropomyosin to the depolymerization rate in the presence of tropomyosin.

Acknowledgments

This study was supported by a grant from the Hungarian Science Foundation (OTKA grants K77840 (MN), NN10776 (MN) and PD 83648 (BB), K109689 (BB)) and grants from the Hungarian National Office for Research and Technology (GVOP grants GVOP-3.2.1.-2004-04-0190/3.0 and GVOP-3.2.1.-2004-04-0228/3.0 (MN)). This work was also supported by 'Science, Please! Research Team on Innovation' (SROP-4.2.2/08/1/2008-0011), by University of Pécs, Medical School (KA No: 2011/34039/OTKA2011-8) and by National Innovation Office "Baross Gábor" Programme (REG-DD-09-1-2009-0009 Tirm_09). BB is a Bolyai Fellow of the Hungarian Academy of Sciences. We wish to thank Éva Hoffmann for her skills and contribution to the protein preparations. We thank Tamás Huber for his help in TEV protease expression and purification. We highly appreciate the help from László Márk (Department of Biochemistry and Medical Chemistry, University of Pécs) who carried out the mass spectrometry analysis.

References

Bharadwaj S, Hitchcock-DeGregori S, Thorburn A, Prasad GL. 2004. N terminus is essential for tropomyosin functions: N-terminal modification disrupts stress fiber organization and abolishes anti-oncogenic effects of tropomyosin-1. *J Biol Chem* 279(14):14039–14048.

Blanchoin L, Pollard TD, Hitchcock-DeGregori SE. 2001. Inhibition of the Arp2/3 complex-nucleated actin polymerization and branch formation by tropomyosin. *Curr Biol* 11(16):1300–1304.

Boussouf SE, Maytum R, Jaquet K, Geeves MA. 2007. Role of tropomyosin isoforms in the calcium sensitivity of striated muscle thin filaments. *J Muscle Res Cell Motil* 28(1):49–58.

Broschat KO. 1990. Tropomyosin prevents depolymerization of actin filaments from the pointed end. *J Biol Chem* 265(34):21323–21329.

Broschat KO, Burgess DR. 1986. Low Mr tropomyosin isoforms from chicken brain and intestinal epithelium have distinct actin-binding properties. *J Biol Chem* 261(28):13350–13359.

Bryce NS, Schevzov G, Ferguson V, Percival JM, Lin JJ, Matsumura F, Bamberg JR, Jeffrey PL, Hardeman EC, Gunning P, et al. 2003. Specification of actin filament function and molecular composition by tropomyosin isoforms. *Mol Biol Cell* 14(3):1002–1016.

Bugyi B, Didry D, Carlier MF. 2010. How tropomyosin regulates lamellipodial actin-based motility: a combined biochemical and reconstituted motility approach. *Embo J* 29(1):14–26.

Coulton AT, Koka K, Lehrer SS, Geeves MA. 2008. Role of the head-to-tail overlap region in smooth and skeletal muscle beta-tropomyosin. *Biochemistry* 47(1):388–397.

Egile C, Loisel TP, Laurent V, Li R, Pantaloni D, Sansonetti PJ, Carlier MF. 1999. Activation of the CDC42 effector N-WASP by the Shigella flexneri IcsA protein promotes actin nucleation by Arp2/3 complex and bacterial actin-based motility. *J Cell Biol* 146(6):1319–1332.

Fine RE, Blitz AL, Hitchcock SE, Kaminer B. 1973. Tropomyosin in brain and growing neurones. *Nat New Biol* 245(145):182–186.

Flicker PF, Phillips GN Jr., Cohen C. 1982. Troponin and its interactions with tropomyosin. An electron microscope study. *J Mol Biol* 162(2):495–501.

Gunning P, Weinberger R, Jeffrey P, Hardeman E. 1998. Isoform sorting and the creation of intracellular compartments. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14:339–372.

Gunning PW, Schevzov G, Kee AJ, Hardeman EC. 2005. Tropomyosin isoforms: divining rods for actin cytoskeleton function. *Trends Cell Biol* 15(6):333–341.

Gunning P, O'Neill G, Hardeman E. 2008. Tropomyosin-based regulation of the actin cytoskeleton in time and space. *Physiol Rev* 88(1):1–35.

Had L, Faivre-Sarrailh C, Legrand C, Mery J, Brugidou J, Rabic A. 1994. Tropomyosin isoforms in rat neurons: the different developmental profiles and distributions of TM-4 and TMB-3 are consistent with different functions. *J Cell Sci* 107 (Pt 10):2961–2973.

Hannan AJ, Schevzov G, Gunning P, Jeffrey PL, Weinberger RP. 1995. Intracellular localization of tropomyosin mRNA and protein is associated with development of neuronal polarity. *Mol Cell Neurosci* 6(5):397–412.

Hotulainen P, Hoogenraad CC. 2010. Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function. *J Cell Biol* 189(4):619–629.

Hotulainen P, Llano O, Smirnov S, Tanhuanpaa K, Faix J, Rivera C, Lappalainen P. 2009. Defining mechanisms of actin polymerization and depolymerization during dendritic spine morphogenesis. *J Cell Biol* 185(2):323–339.

Kostyukova AS, Hitchcock-DeGregori SE. 2004. Effect of the structure of the N terminus of tropomyosin on tropomodulin function. *J Biol Chem* 279(7):5066–5071.

Kouyama T, Mihashi K. 1981. Fluorimetry study of N-(1-pyrenyl)-iodoacetamide-labelled F-actin. Local structural change of actin protomer both on polymerization and on binding of heavy meromyosin. *Eur J Biochem* 114(1):33–38.

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259):680–685.

Lal AA, Korn ED. 1986. Effect of muscle tropomyosin on the kinetics of polymerization of muscle actin. *Biochemistry* 25(5):1154–1158.

Lees-Miller JP, Goodwin LO, Helfman DM. 1990. Three novel brain tropomyosin isoforms are expressed from the rat alpha-tropomyosin gene through the use of alternative promoters and alternative RNA processing. *Mol Cell Biol* 10(4):1729–1742.

Lehman W, Hatch V, Korman V, Rosol M, Thomas L, Maytum R, Geeves MA, Van Eyk JE, Tobacman LS, Craig R. 2000. Tropomyosin and actin isoforms modulate the localization of tropomyosin strands on actin filaments. *J Mol Biol* 302(3):593–606.

Moraczewska J, Nicholson-Flynn K, Hitchcock-DeGregori SE. 1999. The ends of tropomyosin are major determinants of actin affinity and myosin subfragment 1-induced binding to F-actin in the open state. *Biochemistry* 38(48):15885–15892.

Neidt EM, Scott BJ, Kovar DR. 2009. Formin differentially utilizes profilin isoforms to rapidly assemble actin filaments. *J Biol Chem* 284(1):673–684.

-
- Perrin BJ, Ervasti JM. 2010. The actin gene family: function follows isoform. *Cytoskeleton (Hoboken)* 67(10):630–634.
- Rouiller I, Xu XP, Amann KJ, Egile C, Nickell S, Nicastro D, Li R, Pollard TD, Volkman N, Hanein D. 2008. The structural basis of actin filament branching by the Arp2/3 complex. *J Cell Biol* 180(5):887–895.
- Schevzov G, Gunning P, Jeffrey PL, Temm-Grove C, Helfman DM, Lin JJ, Weinberger RP. 1997. Tropomyosin localization reveals distinct populations of microfilaments in neurites and growth cones. *Mol Cell Neurosci* 8(6):439–454.
- Schevzov G, Vrhovski B, Bryce NS, Elmir S, Qiu MR, O'Neill G M, Yang N, Verrills NM, Kavallaris M, Gunning PW. 2005. Tissue-specific tropomyosin isoform composition. *J Histochem Cytochem* 53(5):557–570.
- Smillic LB. 1982. Preparation and identification of alpha- and beta-tropomyosins. *Methods Enzymol* 85(Pt B):234–241.
- Spillane M, Ketschek A, Jones SL, Korobova F, Marsick B, Lanier L, Svitkina T, Gallo G. 2011. The actin nucleating Arp2/3 complex contributes to the formation of axonal filopodia and branches through the regulation of actin patch precursors to filopodia. *Dev Neurobiol* 71(9):747–758.
- Spudich JA, Watt S. 1971. 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* 246(15):4866–4871.
- Stamm S, Casper D, Lees-Miller JP, Helfman DM. 1993. Brain-specific tropomyosins TMBr-1 and TMBr-3 have distinct patterns of expression during development and in adult brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(21):9857–9861.
- Ueki N, Sobue K, Kanda K, Hada T, Higashino K. 1987. Expression of high and low molecular weight caldesmons during phenotypic modulation of smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 84(24):9049–9053.
- Vindin H, Gunning P. Cytoskeletal tropomyosins: choreographers of actin filament functional diversity. *J Muscle Res Cell Motil.* (in press).
- Wawro B, Greenfield NJ, Wear MA, Cooper JA, Higgs HN, Hitchcock-DeGregori SE. 2007. Tropomyosin regulates elongation by formin at the fast-growing end of the actin filament. *Biochemistry* 46(27):8146–8155.
- Weinberger RP, Henke RC, Tolhurst O, Jeffrey PL, Gunning P. 1993. Induction of neuron-specific tropomyosin mRNAs by nerve growth factor is dependent on morphological differentiation. *J Cell Biol* 120(1):205–215.
- Weinberger R, Schevzov G, Jeffrey P, Gordon K, Hill M, Gunning P. 1996. The molecular composition of neuronal microfilaments is spatially and temporally regulated. *J Neurosci* 16(1):238–252.
- Yamashiro-Matsumura S, Matsumura F. 1988. Characterization of 83-kilodalton nonmuscle caldesmon from cultured rat cells: stimulation of actin binding of nonmuscle tropomyosin and periodic localization along microfilaments like tropomyosin. *J Cell Biol* 106(6):1973–1983.

Tropomyosins Regulate the Severing Activity of Gelsolin in Isoform-Dependent and Independent Manners

Nikolett Kis-Bicskei,¹ Bálint Bécsi,^{2,3} Ferenc Erdődi,^{2,3} Robert C. Robinson,^{4,5} Beáta Bugyi,^{1,6} Tamás Huber,¹ Miklós Nyitrai,^{1,7,*} and Gábor Csaba Talián¹

¹Department of Biophysics, Medical School, University of Pécs, Pécs, Hungary; ²Department of Medical Chemistry and ³MTA-DE Cell Biology and Signaling Research Group, University of Debrecen, Faculty of Medicine, Debrecen, Hungary; ⁴Institute of Molecular and Cell Biology, Agency for Science, Technology and Research, Singapore, Singapore; ⁵Research Institute for Interdisciplinary Science, Okayama University, Okayama, Japan; ⁶Szentágotthai Research Center, University of Pécs, Pécs, Hungary; and ⁷MTA-PTE Nuclear-Mitochondrial Interactions Research Group, Pécs, Hungary

ABSTRACT The actin cytoskeleton fulfills numerous key cellular functions, which are tightly regulated in activity, localization, and temporal patterning by actin binding proteins. Tropomyosins and gelsolin are two such filament-regulating proteins. Here, we investigate how the effects of tropomyosins are coupled to the binding and activity of gelsolin. We show that the three investigated tropomyosin isoforms (Tpm1.1, Tpm1.12, and Tpm3.1) bind to gelsolin with micromolar or submicromolar affinities. Tropomyosin binding enhances the activity of gelsolin in actin polymerization and depolymerization assays. However, the effects of the three tropomyosin isoforms varied. The tropomyosin isoforms studied also differed in their ability to protect pre-existing actin filaments from severing by gelsolin. Based on the observed specificity of the interactions between tropomyosins, actin filaments, and gelsolin, we propose that tropomyosin isoforms specify which populations of actin filaments should be targeted by, or protected from, gelsolin-mediated depolymerization in living cells.

INTRODUCTION

The actin cytoskeleton is a filamentous protein scaffold and a polymerizing motor underlying a plethora of essential cellular processes. These include cell motility, cytokinesis, endocytosis, contractility, and determination of cell shape and size. Most actin filaments are highly dynamic structures that participate in particular intracellular subsystems with distinct protein compositions and functions (1). These structures are governed by a large number of diverse actin-binding proteins (ABPs) that regulate the kinetics of events between filament ends and monomeric actin, establish the supramolecular organization of the microfilament system, and influence the binding of other protein partners to filaments.

In animal and fungal cells, most microfilaments are decorated with tropomyosins (Tpm) that, in addition to conferring actin isoform diversity, substantially contribute to the formation of the individual filament subcompartments (2,3). In mammals, four Tpm genes were demonstrated to

produce >40 mRNA variants and ~25 isoforms at the protein level (4,5). Tropomyosins are always present as polar coiled-coil dimers that cooperatively polymerize in a head-to-tail manner and bind along the groove of the actin filament (6). Although the expression and localization of Tpm isoforms are strictly regulated according to cell type, developmental state, and pathologic condition (7), the origin and function of their diversity is not well understood. In rat neurons, the localization patterns of Tpm3.1/Tpm3.2 (formerly TM5NM1/TM5NM2) and Tpm1.12 (formerly TMBR-3) isoforms coded for by the *Tpm3* and *Tpm1* genes, respectively, undergo an isoform switch in the axon, which has been confirmed in chicken neurons (8). In early embryos and at the end of the first week of culture of primary cortical neurons, *Tpm3.1/Tpm3.2* mRNA and protein are present at the differentiating axonal pole, then, a few days later, principally relocate to the developing axons (9). Around the 16th embryonic day, *Tpm3.1/Tpm3.2* mRNA is lost from the axons and the protein repositions into the somatodendritic compartment. This change of localization is accompanied by the continuous appearance of the Tpm1.12 isoform in the axons, where it resides in the mature neurons (8). In the growth cone of the developing nerve cells, the presence

Submitted July 12, 2017, and accepted for publication November 29, 2017.

*Correspondence: miklos.nyitrai@aok.pte.hu

Editor: Enrique De La Cruz.

<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.11.3812>

© 2018 Biophysical Society.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).



of only Tpm3.1, and not Tpm1.12, has been demonstrated (10,11). These differences in the developmental profiles of the two Tpm isoforms are also reflected by their diverse cellular effects upon overexpression (12). In a B35 neuroepithelial cell line, Tpm1.12 reduced the cell size and the number of stress fibers, but promoted lamellipodium formation and cell motility. Tpm3.1 overexpression yielded contrasting impacts and enhanced the phosphorylation of the myosin II regulatory light chain and recruited the myosin IIA heavy chain to stress fibers, thus increasing contractility. Exogenous Tpm3.1 expression was accompanied by a higher extent of actin-depolymerizing factor (ADF) phosphorylation and desorption of ADF from the stabilized stress fibers. These findings demonstrate that the properties of the Tpm isoform that binds to the actin filament can be a deciding factor in the manifested molecular composition and cellular function.

Gelsolin belongs to a superfamily of structurally related ABPs (13). These proteins share common building blocks, the gelsolin-homology domains (14). Gelsolin was discovered as a factor inhibiting the sol-gel transition of the cortical actin cytoskeleton in macrophages (15). In the cytoplasm, gelsolin generally exists as a single isoform. In vitro, gelsolin is able to both nucleate and sever actin filaments, and it also caps the actin-filament barbed ends (16–18). These activities require the binding of Ca^{2+} to several conserved sites of the protein characterized by different affinities (13). Calcium binding unlatches the compact globular structure of gelsolin (19), allowing it to extend into a conformation with active binding sites for G-actin and F-actin on gelsolin-homology domains 1, 4, and 2–3 (19–21).

Tropomyosins have been shown to inhibit the ability of gelsolin to disassemble actin filaments (22). High-molecular-weight Tpm from fibroblasts and skeletal muscle when bound to F-actin prevented gelsolin from severing the actin filaments. The effect of the short Tpm isoforms was weaker but was potentiated by addition of caldesmon (22). It was shown that skeletal Tpm (Tpm1.1; in this article referred to as skeletal muscle Tpm (skTM)) promoted desorption of gelsolin from its complexes with β -actin and its sedimentation with actin filaments. Quantitative data suggested that upon formation of the Tpm-actin complexes, actin filaments undergo a conformational change that increases the dissociation of gelsolin (23). Skeletal Tpm can be chemically linked to gelsolin or retained on a gelsolin column in the presence of Ca^{2+} , which suggests a direct binding between the two proteins (24). This link was corroborated by the effect of skeletal and smooth muscle Tpm in protecting gelsolin from specific proteolytic cleavage by thermolysin (25). In this latter study, skeletal and smooth muscle Tpm were only able to protect actin filaments from severing when pre-incubated with gelsolin, but not when directly associated to actin filaments. A model was proposed in which free Tpm forms a complex with gelsolin, which passively removes it from the available pool (25).

To further extend the investigations of Tpm isoforms on the activities of gelsolin, in this study, we carried out experiments addressing the combined effects of gelsolin and Tpm on the polymerization properties of actin. Here, we found that the three investigated Tpm (skTM, Tpm1.12, and Tpm3.1) bind tightly to gelsolin. We show that the activity of gelsolin is enhanced in complexes with Tpm, resulting in higher polymerization and depolymerization rates, and that binding of Tpm to actin filaments prevented the depolymerizing activity of gelsolin to different extents depending on the Tpm isoform. We found that skeletal Tpm displayed a strong protective effect against severing by gelsolin. The other two Tpm isoforms did not show a significant effect. These interactions between actin and gelsolin specified by Tpm isoform lead to a simple model where Tpm isoforms can selectively mark actin filaments for targeting by, or protection against, gelsolin-mediated depolymerization.

MATERIALS AND METHODS

Protein purification

Tpm1.12 and Tpm3.1 isoforms were cloned into a pET28a expression plasmid, and Tpm expression in *Escherichia coli* BL21 (DE3) cells, and purification was carried out as described previously (26), with slight modifications. The lysis buffer for the resuspended bacterial pellets additionally contained 10 mM imidazole, 1 mM β -mercaptoethanol, 1% Triton-X 100, and 2 mM CaCl_2 , and the lysate was centrifuged at $440,000 \times g$ for 1 h at 4°C. The protein concentration was measured using a BCA protein assay kit (Sigma, St. Louis, MO), and the protein preparations were stored at 0°C in 10 mM Tris, 10 mM KCl, and 1 mM dithiothreitol (pH 7.8).

For the preparation of gelsolin, a His-tagged full-length sequence in a pET21d(+) vector was used (27). Plasmid DNA was transformed into *E. coli* BL21 (DE3) cells; a fresh colony was grown in Luria broth at 37°C until $\text{OD}_{600} = 0.6\text{--}0.8$ and then induced with 1 mM isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside overnight at 25°C. The cells were collected by centrifugation (Sigma 4-16KS tabletop centrifuge, $6000 \times g$, 5 min, 4°C), lysed in 5 mM Tris, 300 mM NaCl, 5 mM imidazole, 1 mM ATP, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 7 mM β -mercaptoethanol, 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DNase, and protease inhibitor cocktail (P8465, Sigma-Aldrich) (pH 8.0), then sonicated and ultracentrifuged ($440,000 \times g$, 35 min, 4°C; MLA80, Beckman-Coulter, Brea, CA). The supernatant was applied to an Ni-NTA column (Macherey-Nagel, Düren, Germany), washed with lysis buffer, and eluted with 250 mM imidazole in lysis buffer. Fractions containing gelsolin were dialyzed (20 mM Tris and 1 mM EGTA (pH 8.0)) and further purified on a Source 15Q anion exchange column with the application of 50 mL buffer I (20 mM Tris, 20 mM NaCl, and 1 mM EGTA (pH 8.0)), 50 mL buffer II (10 mM Tris and 0.1 mM EGTA (pH 8.0)), 50 mL buffer III (20 mM Tris and 2 mM CaCl_2 (pH 8.0)), and a 100 mL linear gradient of buffer III and buffer IV (20 mM Tris, 1 M NaCl, and 0.1 mM EGTA (pH 8.0)). The gelsolin-containing fractions from the last elution step were dialyzed (5 mM HEPES, 50 mM NaCl, and 0.1 mM EGTA (pH 8.0)), loaded on a Superdex 200 gel filtration column equilibrated with dialysis buffer, and eluted. Purified gelsolin was collected, concentrated (4-16KS tabletop centrifuge (Sigma Aldrich) and Vivaspin 10K cut-off tubes (Sartorius, Göttingen, Germany), $3000 \times g$, 4°C) and stored at -80°C . The protein concentration was measured by spectrophotometry ($\epsilon_{280} = 1.29 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Actin was prepared from rabbit hind leg muscle (28) and gel filtered on a Superdex G75 (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) column in buffer A

(4 mM Tris, 0.2 mM ATP, 0.1 mM CaCl₂, 0.5 mM β-mercaptoethanol, and 0.005% NaN₃ (pH 7.8)). G-actin was stored on ice in buffer A. For the fluorescence measurements, actin was labeled with pyrenyl-iodoacetamide as described previously (pyrene; Invitrogen, Carlsbad, CA) (29). Skeletal muscle Tpm (skTM, Tpm1.1) was retrieved from the insoluble residue of the acetone powder from the actin preparation (30), then further purified by hydroxyapatite chromatography and stored frozen in 5 mM Tris and 1 mM dithiothreitol (pH 7.8). The protein concentrations were measured photometrically using $\epsilon_{280} = 1.11 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ and $\epsilon_{290} = 0.63 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ extinction coefficients for actin, and $\epsilon_{280} = 0.3 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for skTM.

Surface plasmon resonance

The interactions of Tpm with gelsolin were analyzed by surface-Plasmon-resonance (SPR)-based binding technique using the Biacore 3000 instrument (Biacore, GE Healthcare). The Tpm isoforms were directly immobilized onto the sensor chip (CMD500L; XanTec Bioanalytics, Düsseldorf, Germany) via primary amine groups of the proteins using the amine coupling method as recommended by the manufacturer. The surface was first activated by an injection of 35 μL *N*-ethyl-*N'* (dimethylaminopropyl) carbodiimide/*N*-hydroxysuccinimide (Biacore, GE Healthcare) solution (200 mM *N*-ethyl-*N'* (dimethylaminopropyl) carbodiimide and 50 mM *N*-hydroxysuccinimide); then, the Tpm was diluted to 30 μg/mL in the immobilization buffer (10 mM Na-acetate (pH 3.5)) and injected over the surface for 7 min at a 10 μL/min flow rate. Excess reactive sites were subsequently blocked by injection of 1 M ethanolamine (pH 8.5) (Biacore, GE Healthcare) for 7 min at a flow rate of 5 μL/min. The control surface was activated and then blocked with ethanolamine. After the immobilization of the Tpm, gelsolin was diluted in actin polymerization buffer (4 mM Tris, 0.2 mM ATP, 0.1 mM CaCl₂, 0.5 mM β-mercaptoethanol, 0.005% NaN₃, 2 mM MgCl₂, and 100 mM KCl (pH 7.8)) and injected over the surfaces at various concentrations (0.5, 1, 2, 3, 4, 5, and 7.5 μM) at a flow rate of 10 μL/min.

The association phases of the interactions between gelsolin and the Tpm were monitored for 7 min and the dissociation phases in polymerization buffer without the gelsolin were monitored for 6 min to determine the kinetic parameters of association and dissociation for the interactions. The sensor chips were regenerated after each binding assay by a brief injection of 10 mM glycine-HCl (pH 2.1). The binding of gelsolin to the immobilized proteins was monitored as a sensorgram where the resonance unit values were plotted against time. The resonance unit measured at the control surface was subtracted from the data obtained for the protein surfaces. Kinetic parameters were evaluated by the BIAevaluation 3.1 software (Biacore, GE Healthcare) assuming a 1:1 gelsolin/Tpm dimer interaction between the proteins.

Fluorescence measurements

Fluorescence experiments were performed with an FLX-Xenius (SAFAS) multichannel spectrofluorimeter. Pyrene fluorescence was excited at 365 nm, and the emission was detected at 407 nm. Polymerization and depolymerization kinetics were followed by measuring the changes of pyrene fluorescence with time at room temperature. The final concentration of CaCl₂ was 100 μM, if not indicated otherwise. Actin and other protein components were gently mixed in a 0.6 mL Eppendorf tube immediately before adding them into the cuvettes, which resulted in a few seconds of dead time. Average rates from at least three independent measurements were calculated. Data are given as the mean ± SE throughout.

Polymerization assays

Ca²⁺-G-actin labeled with pyrene (5%) was polymerized in buffer A complemented with 2 mM MgCl₂ and 100 mM KCl (final concentrations),

and different amounts of Tpm. The gelsolin/Tpm complexes were made up in stocks of 0.3 μM gelsolin and 10 μM Tpm for further dilution, and let stand for at least 30 min at room temperature. The progress of actin assembly was monitored by measuring the increase in pyrenyl fluorescence emission. The net rate of actin polymerization was calculated by linear fitting to the segment of the curves between 0.05 and 0.25 normalized fluorescence intensity.

Dilution-induced depolymerization assays

Ca²⁺-G-actin in buffer A at 10 μM concentration labeled by pyrene (70–80%) was polymerized for 1 h by adding 2 mM MgCl₂ and 100 mM KCl (final concentrations); then, Tpm were added and the samples were incubated for 1 h at room temperature. These F-actin samples were then diluted to 100 nM with Ca²⁺-free polymerization buffer supplemented with 0.1 M CaCl₂ to obtain the desired Ca²⁺ concentrations. The gelsolin/Tpm complexes were prepared as described in the previous section and added in the dilution step. Depolymerization rates were estimated by linear fitting to the first 120 s of the normalized pyrene transient curves.

Co-sedimentation assays

The co-sedimentation of gelsolin with actin and Tpm was studied in two complementary experiments. 1) First, 2 μM gelsolin was added to 25 μM F-actin and incubated for 1 h; then, the samples were diluted to 10 μM actin concentration and 0.8 μM gelsolin with different Tpm isoforms (40 μM Tpm1.12, 40 μM Tpm3.1, or 10 μM skTM), with a control sample diluted in polymerization buffer only, and let stand for 2 h. 2) Alternatively, 10 μM F-actin was incubated for 2 h with or without the same concentrations of Tpm as in protocol 1; then, the samples were treated with 0.8 μM gelsolin for 1 h. All measurements were performed using polymerization buffer containing 0.1 mM CaCl₂. Samples (100 μL) were pelleted by ultracentrifugation (Beckman-Coulter, TLA-100, 440,000 × *g* for 30 min at 20°C); then, pellets and supernatants were separated and analyzed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (31). The gels were stained with Coomassie Blue and images were made with ultraviolet illumination (Syngene Bioimaging System, Haryana, India). The protein bands on the gels were quantified using densitometry (software by GeneTools, Philomath, OR). The relative amounts of actin in the pellets were calculated by dividing the actin content of the samples by the actin content of the control sample containing only actin, which was prepared under the same conditions. The relative amounts of gelsolin in the pellets were derived by dividing the gelsolin content of the samples by the gelsolin content of the control sample containing only actin and gelsolin, which was prepared under the same conditions. Data from three independent measurements are given as the mean ± SE.

Statistical analysis

Statistical significance levels were obtained by two-tailed *t*-probe in Microsoft Excel. By convention, *p* ≥ 0.05 was considered as statistically not significant.

RESULTS AND DISCUSSION

Tpm bind gelsolin

Previous studies indicated that Tpm can bind directly to gelsolin (24,25). We have carried out SPR-based binding experiments to determine the binding affinity of gelsolin for skeletal muscle and non-muscle Tpm isoforms. Tpm isoforms were immobilized by amine coupling on the surface

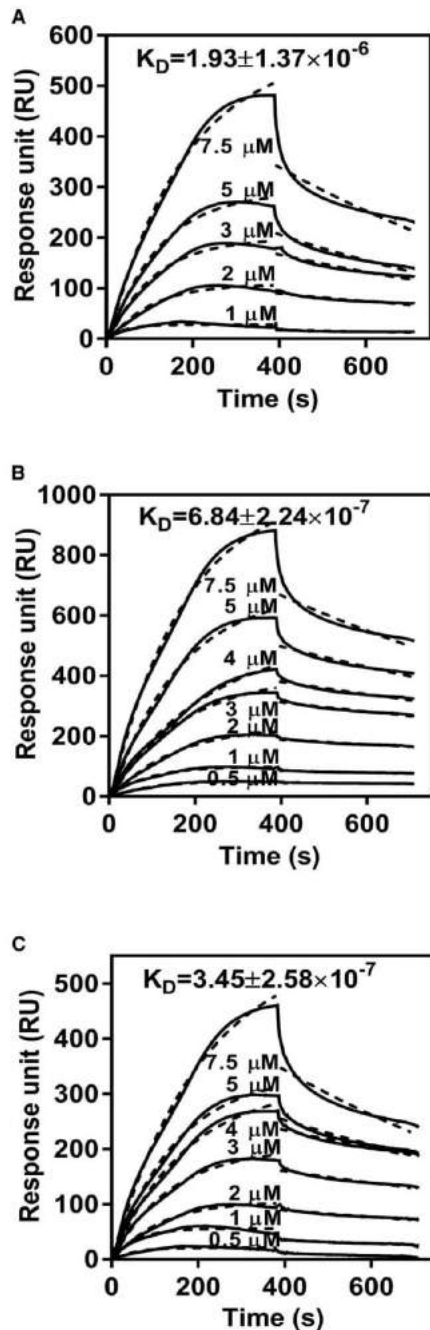


FIGURE 1 Binding of gelsolin to Tpm immobilized on a CMD500L sensor chip at 25°C. The Tpm isoforms were immobilized on the surface of a CMD500L sensor chip by the amine coupling method, and the reference surface was blocked with 1 M ethanolamine solution. The immobilized Tpm isoforms are (A) skTM, (B) Tpm1.12, and (C) Tpm3.1. The

of sensor chips, and then gelsolin was run over the surfaces at different concentrations. The SPR sensorgrams obtained in these experiments, including the association (with injected gelsolin) and dissociation (when gelsolin is exchanged for polymerization buffer) phases are presented in Fig. 1. The sensorgrams were fitted with single-exponential functions to determine the corresponding second-order association (k_a) and first-order dissociation rate constants (k_d), and the ratios of these parameters (k_d/k_a) were used to calculate the corresponding dissociation constants (K_D s) for the interaction of gelsolin with skTM (Fig. 1 A: $K_D = 1.9 \pm 1.4 \mu\text{M}$), Tpm1.12 (Fig. 1 B: $K_D = 0.7 \pm 0.2 \mu\text{M}$), and Tpm3.1 (Fig. 1 C: $K_D = 0.3 \pm 0.2 \mu\text{M}$). These K_D values indicate relatively tight affinities between gelsolin and the Tpm's, which fall within the range one would expect for physiologically significant protein-protein interactions, indicating that the binding of gelsolin to Tpm's probably has functional consequences.

Gelsolin accelerates actin polymerization in vitro

Next, we tested whether the binding of Tpm's to gelsolin affects the corresponding activities of these proteins. Gelsolin is known to accelerate the polymerization of actin through nucleation followed by pointed-end elongation (18). First, we characterized the recombinant gelsolin in a nucleation assay. Polymerization of Ca-actin was carried out in the absence or presence of gelsolin at different concentrations (2–500 nM) (Fig. 2 A). Salt-induced actin polymerization is described by the initial slow nucleation step (1–2 min), an ascending elongation phase, and a steady-state phase, where the addition and dissociation of actin monomers are in equilibrium. Addition of nanomolar concentrations of gelsolin increased the initial rate of actin assembly, as reflected by the increasing slope of the curves (Fig. 2, B and C). The time required for the slow lag phase, corresponding to the nucleation step, became shorter with increasing gelsolin concentrations. This observation was consistent with the known nucleating activity of gelsolin (18).

At higher gelsolin concentrations (>200 nM), the polymerization curves displayed an overshoot, which may be explained by the severing and monomer-sequestering activities of gelsolin. When the proportion of gelsolin relative to actin was low these effects were not dominant, since most of the gelsolin was consumed for nucleation, resulting in capped filaments. Increasing the gelsolin/actin ratio possibly leaves more free gelsolin to sever the elongating filaments,

interactions between gelsolin and Tpm isoforms were assayed by injecting the gelsolin over the Tpm and reference surfaces at the indicated concentrations for 7 min; then, the dissociation phase was recorded by changing the gelsolin solution to polymerization buffer for 6 min. Kinetic parameters and equilibrium dissociation constants (K_D) for the interactions were derived by the BIAevaluation 3.1 software. Dashed lines indicate the fits for the experimental curves assuming a 1:1 interaction model between the binding partners. The K_D values in molar are indicated on the figures.

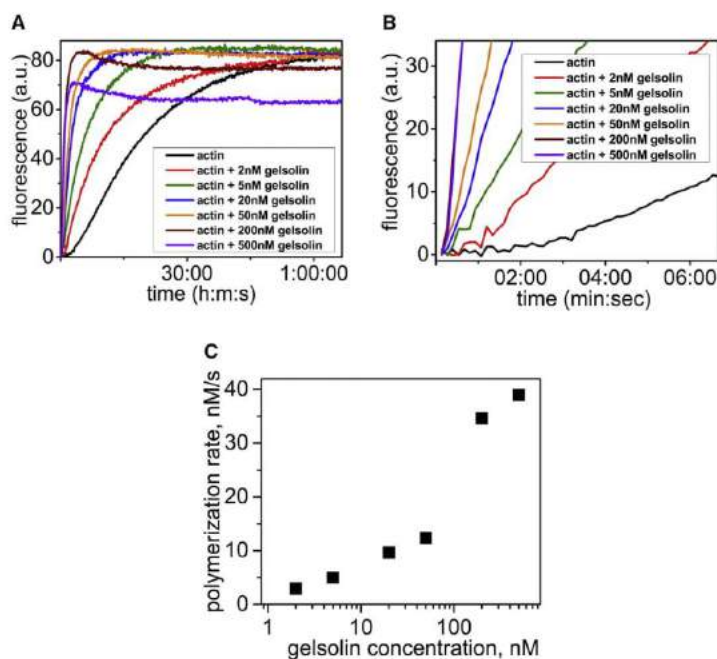


FIGURE 2 Gelsolin increases the rate of actin polymerization. (A) Gelsolin was added to $3 \mu\text{M}$ G-actin at different final concentrations and polymerization was followed by pyrene fluorescence. Data are representative curves from experiments repeated four times. (B) The same results as in (A) are plotted on a shorter timescale to demonstrate the disappearance of the initial lag phase of nucleation as an effect of gelsolin. (C) Representative actin polymerization rates calculated from the slope of the initial 5–25% segment relative to the plateau fluorescence intensity. To see this figure in color, go online.

rendering them shorter. The height of the steady-state plateau phase decreased proportionally to the amount of gelsolin added (Fig. 2 A). This likely reflects gelsolin sequestration of actin monomers, preventing their incorporation into filaments and resulting in lower fluorescence intensity. All these observations indicate that the recombinant gelsolin behaves as expected based on previous reports.

Tpms enhance the effect of gelsolin on actin polymerization

Smooth muscle Tpm was reported to inhibit the severing of actin filaments by gelsolin and to have no effect on its actin nucleating activity (25). We investigated whether other Tpm isoforms can influence the effects of gelsolin on actin polymerization. Actin was polymerized in the presence of gelsolin or gelsolin-Tpm complexes. In the latter cases, gelsolin and Tpm were pre-incubated for 30 min in the presence of $100 \mu\text{M}$ Ca^{2+} . The rate of gelsolin-mediated actin polymerization was increased by all Tpm isoforms (Fig. 3 A). To quantify the effects of Tpms, we calculated the elongation rates from the initial 5–25% segments of the transients relative to the maximal fluorescence intensity. The smallest effect on actin assembly was observed with Tpm1.12 (20%; Fig. 3 B), a medium effect with Tpm3.1 (57%), and the largest with skTM (76%). The statistical significance level for all three Tpm isoforms was $p < 0.005$. In control experiments, we found that in the absence of gelsolin, Tpms at the

applied concentrations did not influence the rate of actin polymerization (Fig. 3 C). One possibility for the faster polymerization kinetics is that Tpms may promote the nucleating activity of gelsolin. Another possible mechanism by which Tpms may increase the rate of actin polymerization is to enhance the severing activity of gelsolin that is expected to produce more free filament ends for the monomer association.

Tpms alter the rate of actin filament disassembly catalyzed by gelsolin

To investigate the effect of Tpms on the severing activity of gelsolin, depolymerization measurements were carried out. We used pre-formed pyrene-labeled actin filaments that were subsequently diluted to concentrations below the critical concentration of the barbed end ($\sim 0.12 \mu\text{M}$) (32,33). Under these conditions, the incorporation of free actin monomers was negligible, so spontaneous subunit dissociation from the filament ends could be monitored. The spontaneous disassembly kinetics of actin filaments was relatively slow due to the low rate constants for dissociation of actin subunits and also to the low concentration of filament ends (Fig. 4, left column, black lines). Severing by gelsolin increases the number of pointed ends but caps the barbed ends, resulting in a higher net rate of depolymerization (Fig. 4, left column, green lines) that was consistent with previous observations (34). When

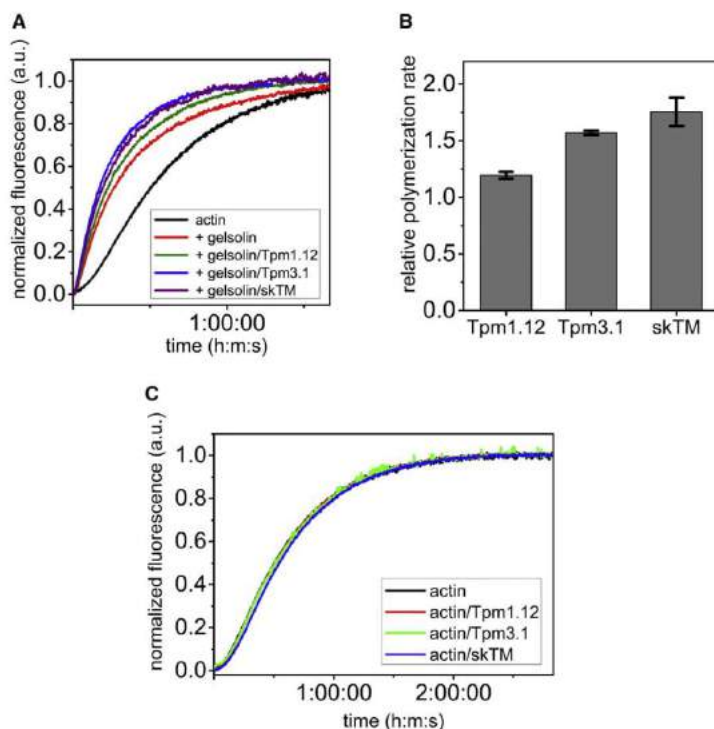


FIGURE 3 Tropomyosins enhance the effect of gelsolin on actin polymerization. (A) In these assays, 2 μM actin was polymerized alone or in the presence of either 4.5 nM gelsolin or 4.5 nM gelsolin preincubated with different Tpm isoforms. Gelsolin and Tpm were prepared in stock solutions for 30 min after mixing them at 300 nM and 10 μM concentrations, respectively. (B) The enhancement of the polymerization rate with Tpm-complexed gelsolin over gelsolin alone was calculated from the slope of the 5–25% segment of the pyrenyl traces relative to the plateau fluorescence intensity ($n = 6$; data are represented as the mean \pm SE). The statistical significance level for all three Tpm isoforms was $p < 0.005$. (C) Polymerization curves for the same amount of actin as in (A) with and without Tpm and without gelsolin. To see this figure in color, go online.

pre-incubated gelsolin-Tpm complexes were added to the actin filaments, the rate of decrease in fluorescence was more pronounced than that observed with gelsolin alone, for all three isoforms of Tpm, suggesting higher rates of depolymerization (Fig. 4, left column, green and blue lines, and middle column). When Tpm was added to the actin filaments at saturating concentrations in the absence of gelsolin, they did not result in an enhancement of the spontaneous depolymerization rate (Fig. 4, left column, black and red lines, and middle column). Moreover, Tpm1.12 and Tpm3.1 slightly inhibited this process, whereas skTM had a much stronger protective effect. These observations are in correlation with our previous results showing that Tpm decrease the rate of the spontaneous depolymerization of Mg^{2+} -F-actin (26). Taken together, these observations lead us to conclude that gelsolin in complex with Tpm has a higher activity for severing actin filaments than gelsolin alone.

The addition of gelsolin to actin filaments saturated with Tpm1.12 or Tpm3.1 had little influence on the rate of depolymerization (Fig. 4, left column, black and cyan lines, and middle column). In contrast, skTM seemed to completely prevent the gelsolin effect, resulting in low dissociation rates that were similar to those observed with actin alone. When gelsolin that had been pre-incubated with Tpm was added to actin filaments previously

saturated by Tpm, every isoform increased the depolymerization rate as compared to that measured with free gelsolin on Tpm-bound actin filaments (Fig. 4, left column, cyan and magenta lines, and middle column). However, in the case of skTM-decorated actin filaments, the depolymerizing effect of gelsolin, either free or bound by Tpm, significantly lagged behind what was obtained for Tpm-free filaments (to approximately the same extent with gelsolin and gelsolin/skTM; ~ 4 - and 3.6-fold, respectively). Since this was not the case for the non-muscle Tpm isoforms, it suggests that the presence of Tpm may differentially influence the fate of the actin filaments related to the gelsolin-mediated depolymerization.

One may also speculate that the final Tpm concentration in the samples was below the level that can keep Tpm in complex with actin and/or gelsolin and their dissociation had resulted in the different abilities to protect filaments from depolymerization. In this respect, skeletal Tpm required the lowest concentration to saturate F-actin, but in contrast gave the highest protective effect. Therefore, we carried out depolymerization experiments also by diluting samples into buffers containing additional Tpm (data not shown). The final Tpm concentrations were calculated considering the dissociation constants and were kept above the saturation levels of both actin filaments and gelsolin (5 μM skTM, 5 μM Tpm1.12, and 3 μM Tpm 3.1). We

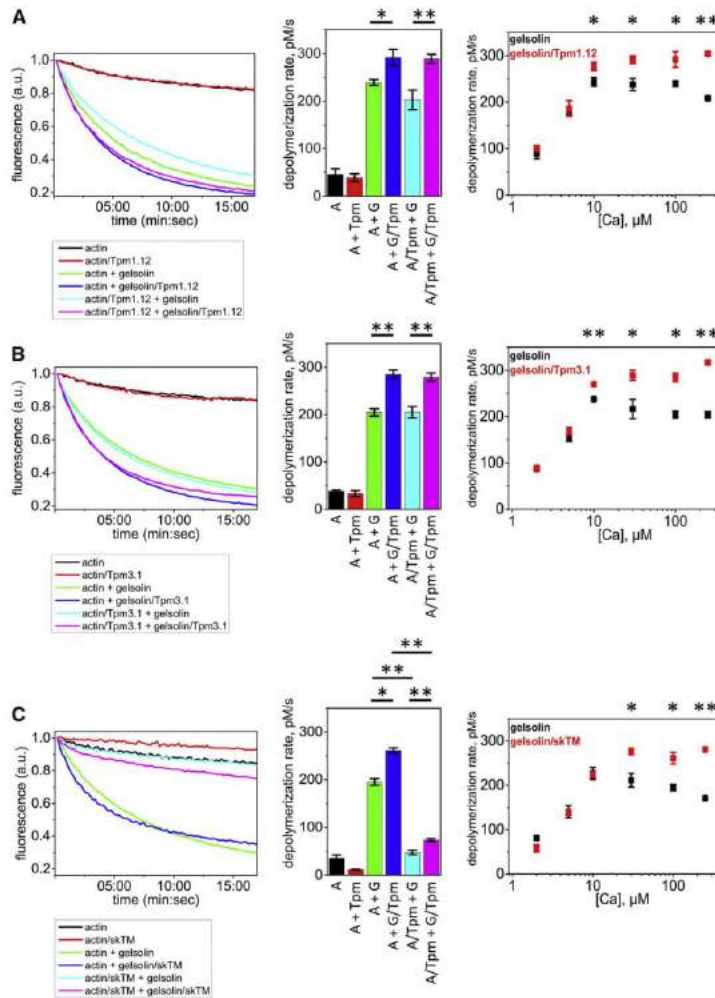


FIGURE 4 Tropomyosins enhance the actin-filament severing activity of gelsolin. For the depolymerization assays, 3 μM actin was polymerized alone or in the presence of 30 μM Tpm1.12, 30 μM Tpm3.1, or 10 μM skTM. The samples were diluted into polymerization buffer to a final concentration of 100 nM to induce spontaneous depolymerization. Gelsolin (300 nM) was prepared with or without 10 μM Tpm and was added to a 4 nM final concentration concomitant with the dilution of F-actin. Results are shown for Tpm1.12 (A), Tpm3.1 (B), and skTM (C). In these experiments, buffers for dilution were prepared from calcium-free polymerization buffer supplemented with 0.1 M CaCl_2 to the desired concentration. In the left column, representative depolymerization curves of parallel measurements are plotted. In the middle column, net depolymerization rates are shown calculated from the initial nearly linear 2-min parts of the dissociation curves. (The color scheme is *black*, actin; *red*, actin/Tpm; *green*, actin + gelsolin; *blue*, actin + gelsolin/Tpm; *cyan*, actin/Tpm + gelsolin; *magenta*, actin/Tpm + gelsolin/Tpm.) In the right column, dependence of the depolymerization rate on calcium concentration is plotted for gelsolin alone or gelsolin/Tpm complexes added to F-actin upon dilution. Data are given as the mean \pm SE; $n = 4\text{--}6$. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. To see this figure in color, go online.

found that the results with or without additional Tpm differed by a statistical significance level of $p < 0.05$ only in two cases, first when F-actin was mixed with the gelsolin/skTM complex, and second when gelsolin was added to the actin/Tpm3.1 complex. In all other cases, any increase in protection was statistically not significant. These observations suggest that individual Tpm isoforms bound to actin filaments do have different abilities to inhibit the severing activity of gelsolin. Furthermore, the data indicate that on the timescale of the depolymerization rate measurements the dissociation of the Tpm complexes with actin or gelsolin is negligible.

To study the effect of calcium concentration on the severing activity of gelsolin, we completed a series of experiments varying the free calcium concentrations. The disas-

sembly of actin filaments was dependent on the calcium concentration both with gelsolin alone and with gelsolin in complex with Tpm. The depolymerization rate increased up to 10 μM Ca^{2+} in both cases, and above this concentration, the rates showed saturation (Fig. 4, right column). The Tpm showed no effect at the lowest calcium ion concentration (2 μM), indicating that they do not activate gelsolin. In the low-calcium ascending phase the effect of gelsolin alone was not different from that of the gelsolin/Tpm complexes, but in the saturating calcium region, the latter had a higher depolymerization rate than gelsolin alone at all Ca^{2+} concentrations tested. At the highest calcium concentrations (100 and 250 μM), the activity of gelsolin declined slightly again, but the gelsolin/Tpm complexes did not show a similar tendency.

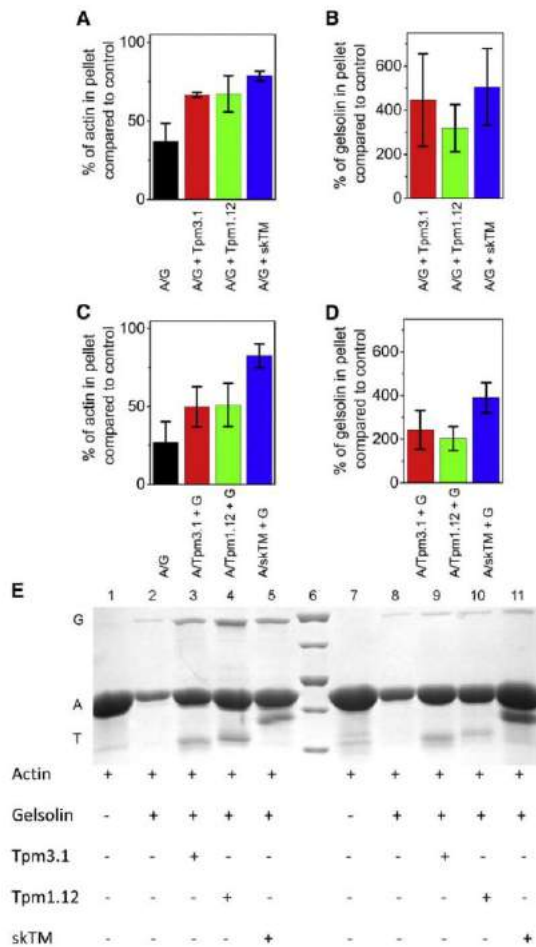


FIGURE 5 Tropomyosins differently protect actin filaments from depolymerization by gelsolin. (A and B) In the co-sedimentation study, 25 μ M F-actin was treated with 2 μ M gelsolin for 1 h, then diluted to 10 μ M (gelsolin to 0.8 μ M) in the presence of either 40 μ M Tpm1.12, 40 μ M Tpm3.1, or 10 μ M skTM. The samples were incubated for 2 h, then ultracentrifuged, and the pellets were analyzed by densitometry. Controls containing only actin filaments and complexes of actin with gelsolin were also prepared. (A) Bars represent the relative sedimented actin content compared with F-actin alone (The color scheme is black, actin/gelsolin; red, actin/gelsolin + Tpm3.1; green, actin/gelsolin + Tpm1.12; blue, actin/gelsolin + skTM). (B) Bars indicate the relative gelsolin content compared with the actin/gelsolin sample (colors are the same as for A). (C and D) In the reverse experiment, first, 10 μ M F-actin was prepared for 2 h alone or with 40 μ M Tpm1.12, 40 μ M Tpm3.1, or 10 μ M skTM, and then, 0.8 μ M gelsolin was added for 1 h. Bars and colors are the same as in (A) and (B). Data are given as the mean \pm SE; n = 3. (E) Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis of the co-sedimentation samples representing the changes in the protein contents. Samples 1–5 were subjected to experimental setup 1 (for A and B) and samples 7–11 to experimental setup 2 (for C and D). Samples 1 and 7 were actin, samples 2 and 8 were actin + gelsolin, sample 3 was actin/gelsolin + Tpm3.1, sample 4 was actin/gelsolin + Tpm1.12, sample 5 was actin/gelsolin + skTM, column 6 is a molecular weight marker (bands from the top to bottom are 100, 70, 50,

Tropomyosins protect actin filaments from gelsolin in co-sedimentation experiment

To further describe the interactions between actin, gelsolin, and Tpm we carried out co-sedimentation experiments. The samples containing these three proteins were centrifuged and the pellets and supernatants were analyzed using sodium dodecyl sulfate polyacrylamide-gel electrophoresis. Two experimental strategies were applied. First, actin filaments were incubated with gelsolin to provide enough time for their depolymerization, and then Tpm was added to the samples. In the second set of experiments, actin was incubated with Tpm to allow equilibrium for filament complex formation and gelsolin was added afterward.

When gelsolin (0.8 μ M) was added to 10 μ M F-actin, it reduced the pelleted actin to \sim 35–40% (Fig. 5 A). When Tpm was subsequently added to the samples, the amount of actin in the pellets increased, suggesting that the Tpm isoforms partially rescued the actin filaments from the severing effect of gelsolin. The possibility that the accumulation of pelleted actin resulted from de novo filament assembly driven by Tpm was not considered, since Tpm does not promote this process (26). When the gelsolin content in the pellets of the Tpm-treated samples was compared with the samples containing only actin and gelsolin, there was a two- to fivefold increase in gelsolin in all cases (Fig. 5 B). In control experiments, Tpm without actin did not influence the sedimentation of gelsolin (data not shown).

When Tpm was added to the actin filaments before the administration of gelsolin, a two- to threefold increase in the amount of pelleted F-actin was observed compared to that in the absence of Tpm (Fig. 5 C). This suggests that Tpm has also a prior protective effect against the severing activity of gelsolin. These results are consistent with our observations in the fluorescence spectroscopy measurements (Fig. 4). The amount of gelsolin sedimented was again two- to fourfold higher with actin and Tpm than with actin alone. The relative increment of the gelsolin content in the Tpm-treated samples exceeded that of the F-actin alone when the first strategy was applied but was not significant with the second (Fig. 5 D). This suggests that gelsolin is not able to bind to Tpm molecules decorating actin filaments. In contrast, it seems possible for gelsolin bound to Tpm to incorporate into existing actin filaments (see previous section).

CONCLUSIONS

Previous studies extended the experimental evidence for the importance of Tpm isoforms in specifying the functional

40, and 30 kDa), sample 9 was actin/Tpm3.1 + gelsolin, sample 10 was actin/Tpm1.12 + gelsolin, and sample 11 was actin/skTM + gelsolin. Proteins on the gel are marked as G (gelsolin), A (actin), or T (Tpm). To see this figure in color, go online.

properties of actin filaments (5,7). According to those studies, Tpm function relies on the ability of Tpm isoforms to affect the interaction of ABPs with actin filaments, which is manifested through steric- or allosteric-mechanism-based competitive binding of Tpm isoforms and ABPs, such as Arp2/3 complex (26,32,35,36), ADF/cofilins (37), α -actinin (3), and myosins (3). In this work, we extended the investigations of the Tpm isoform specificity of actin interactions by addressing the binding of gelsolin and Tpm and its functional consequences in actin dynamics regulation.

We found that Tpm could potentially protect the actin filaments from the depolymerizing/severing activity of gelsolin. This effect showed strong dependence on the bound Tpm isoform. The skeletal muscle Tpm1.1/1.2 isoform was the most efficient, whereas the two non-muscle short isoforms—Tpm3.1 and Tpm1.12—had little or no significant influence on the depolymerizing activity of gelsolin. Considering that the overall structure of the Tpm-actin copolymer is isoform specific (38), we propose that some Tpm isoforms can structurally interfere with the binding of gelsolin to actin, whereas others have no competitive effect on the actin binding of gelsolin. Examples for such cases are provided in Fig. 6. In the cell, the position of the various Tpm on the actin-filament surface will likely be further modulated by the interaction of Tpm with other ABPs.

We demonstrated that all three Tpm isoforms bind to gelsolin and that their interactions are characterized by similar and relatively tight affinities ($K_D \sim 0.3\text{--}2.0 \mu\text{M}$). From this aspect, gelsolin binding to Tpm has only little specificity for Tpm isoforms, which suggests that the binding interactions rely on a common Tpm sequence pattern. As a functional consequence, we showed that gelsolin is

more efficient in disassembling actin filaments when it is in complex with Tpm than in its free form, even if the actin filaments are saturated by Tpm. The low concentrations of actin and Tpm in the depolymerization tests restrict their binding to a negligible level, so the observed effects of enhanced gelsolin activity can only be explained as a direct impact of Tpm on the gelsolin in their complex. We could exclude the mechanism where Tpm first binds gelsolin and then serves only to deliver gelsolin to the sides of actin filaments. These findings suggest that the binding of Tpm induces structural changes in gelsolin, which modify its interaction mode and activity with actin filaments. The increase in the rate of depolymerization observed for the gelsolin-Tpm complexes can be explained by the enhanced filament cutting efficiency of gelsolin and/or the weakened filament-end interactions proposed in a previous study (23). Our findings are seemingly in contrast to formerly reported observations where muscle Tpm isoforms decreased the gelsolin-catalyzed depolymerization rate of actin filaments (25). Also, we have opposite results with the Tpm-decorated actin filaments where a protective effect was observed against the gelsolin activity. These discrepancies are not easy to interpret. Our results showing that saturation of F-actin with Tpm inhibits gelsolin activity were uniform in our depolymerization assays and bulk co-sedimentation tests, and are in accordance with literature data (22).

Both studies used the pyrenyl-actin-based dilution-induced disassembly assay, but a marked difference has to be noted. In our experiments, actin filaments were diluted to 100 nM, which is a true depolymerizing regime; therefore, the change in pyrene fluorescence reflects only disassembly. In contrast, Kaithlina et al. (33) used 600 nM gelsolin-capped actin filaments, which is around the critical

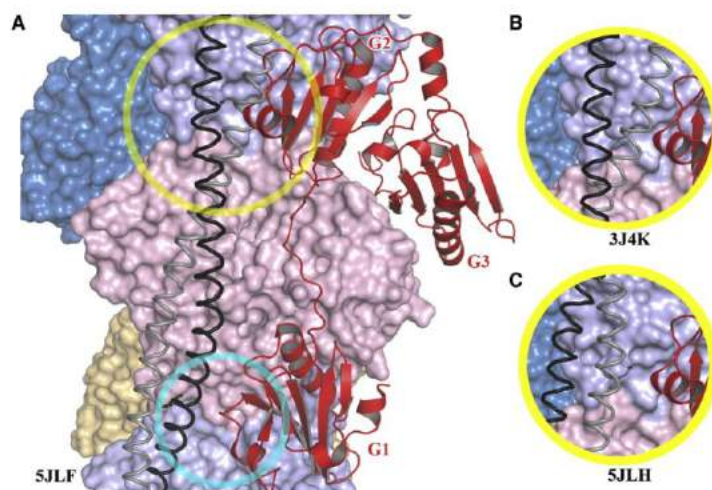


FIGURE 6 Models of Tpm (gray and black coils) and gelsolin G1–G3 (red ribbons) binding to an actin filament (subunits represented as surfaces in pastel shades). (A) Gelsolin domains from the G1–G3/actin x-ray structure (PDB: 3FFK) (27) docked onto the cryo-EM structure of 3.5 Å mouse sTM/actin (PDB: 5JLF) (42) through superimposition of an actin protomer structure (pink). In this model, G1 does not sterically clash with Tpm (cyan circle), but G2 has significant overlap (yellow circle). (B and C) Close-ups of the Tpm/G2 interaction (yellow circle) generated from the 8 Å cryo-EM structure of chicken gizzard Tpm/actin (PDB: 3J4K) (43) (B) and from the cryo-EM structure of 3.9 Å human cytoplasmic Tpm3/actin/myosin (PDB: code 5JLH) (42) (C). These models are not intended to be accurate representations of a gelsolin/actin/Tpm interaction, but rather to indicate that the known position of Tpm on actin are in locations that could have a variety of competitive effects on gelsolin binding. Thus, the positional placement of Tpm on the surface of the actin filament will dictate whether gelsolin can simultaneously bind to the same actin filament. To see this figure in color, go online.

concentration of pointed ends but well above the critical concentration of barbed ends; therefore, the changes in pyrene fluorescence could be distorted by assembly events.

Our results are in accordance with the general assumption about the functional significance of the Tpm diversity. It is proposed that Tpm work as key regulators of the microfilament system (39) to specify spatially and functionally individual actin subsets, with distinct regulation of the interactions with other ABPs. The Tpm isoform composition of the actin filaments would be, then, a principal factor that defines the location, supramolecular organization, and role of actin filaments in cellular physiology. On the other hand, other ABPs also can specify which Tpm isoforms bind to the growing actin filaments, as shown for formin proteins (40).

In terms of the emergence of gelsolin and Tpm in evolution (14,41), current evidence suggests that gelsolins are the more ancient actin regulators. Thus, the later appearance of Tpm seems to allow specification of populations of actin filaments, which with respect to gelsolin have different activities. In particular, our data suggest that muscle actin structures will be stabilized relative to general cytoplasmic actin filaments in muscle cells.

Taken together, our work demonstrates that the studied Tpm have dual effects on the actin-assembly-promoting activity of gelsolin. When Tpm are in complex with actin filaments, they inhibit depolymerization by gelsolin in an isoform-dependent manner. In contrast, when Tpm are bound to gelsolin they enhance this activity in an isoform-independent fashion. These observations provide an important contribution toward understanding the necessity and different functions of the large number of Tpm isoforms located and active in living cells. It requires further studies to demonstrate whether gelsolin-Tpm complexes play a physiological role in the regulation of actin dynamics in living cells and how the calcium concentrations applied in this work are relevant in vivo.

ACKNOWLEDGMENTS

We express our special thanks to Ilona Brunner and Éva Simon for their technical skills and essential contributions to the protein preparation. This scientific contribution is dedicated to the 650th anniversary of the foundation of the University of Pécs, Hungary.

This work was supported by grants from the National Research, Development and Innovation Office and the European Union (GINOP-2.3.3-15-2016-00025, GINOP-2.3.2-15-2016-00049, and EFOP-3.6.1-16-2016-00004) and by the Hungarian Science Foundation (OTKA grants K112794 to M.N., K109689 to B.B., and K109249 to F.E.). This research was supported in addition by the European Union and the State of Hungary, co-financed by the European Social Fund in the framework of TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 "National Excellence Program" and the New National Excellence Program of the Ministry of Human Capacities (to B.B. and T.H.), and by the ÚNKP-16-4 and ÚNKP-17-4 New National Excellence Program of the Ministry of Human Capacities (to B.B.). R.C.R. was supported by the Biomedical Research Council, Agency for Science, Technology and Research (A*STAR), Singapore.

REFERENCES

- Perrin, B. J., and J. M. Ervasti. 2010. The actin gene family: function follows isoform. *Cytoskeleton (Hoboken)*. 67:630–634.
- Vindin, H., and P. Gunning. 2013. Cytoskeletal tropomyosins: choreographers of actin filament functional diversity. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 34:261–274.
- Gateva, G., E. Kremneva, ..., P. Lappalainen. 2017. Tropomyosin isoforms specify functionally distinct actin filament populations in vitro. *Curr. Biol.* 27:705–713.
- Cooley, B. C., and G. Bergtrom. 2001. Multiple combinations of alternatively spliced exons in rat tropomyosin-*a* gene mRNA: evidence for 20 new isoforms in adult tissues and cultured cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 390:71–77.
- Gunning, P. W., G. Schevzov, ..., E. C. Hardeman. 2005. Tropomyosin isoforms: divining rods for actin cytoskeleton function. *Trends Cell Biol.* 15:333–341.
- Flicker, P. F., G. N. Phillips, Jr., and C. Cohen. 1982. Troponin and its interactions with tropomyosin. An electron microscope study. *J. Mol. Biol.* 162:495–501.
- Gunning, P., G. O'Neill, and E. Hardeman. 2008. Tropomyosin-based regulation of the actin cytoskeleton in time and space. *Physiol. Rev.* 88:1–35.
- Weinberger, R., G. Schevzov, ..., P. Gunning. 1996. The molecular composition of neuronal microfilaments is spatially and temporally regulated. *J. Neurosci.* 16:238–252.
- Hannan, A. J., G. Schevzov, ..., R. P. Weinberger. 1995. Intracellular localization of tropomyosin mRNA and protein is associated with development of neuronal polarity. *Mol. Cell. Neurosci.* 6:397–412.
- Shevzov, G., P. Gunning, ..., R. P. Weinberger. 1997. Tropomyosin localization reveals distinct populations of microfilaments in neurites and growth cones. *Mol. Cell. Neurosci.* 8:439–454.
- Shevzov, G., B. Vrhovski, ..., P. W. Gunning. 2005. Tissue-specific tropomyosin isoform composition. *J. Histochem. Cytochem.* 53:557–570.
- Bryce, N. S., G. Schevzov, ..., R. P. Weinberger. 2003. Specification of actin filament function and molecular composition by tropomyosin isoforms. *Mol. Biol. Cell.* 14:1002–1016.
- Nag, S., M. Larsson, ..., L. D. Burtnick. 2013. Gelsolin: the tail of a molecular gymnast. *Cytoskeleton (Hoboken)*. 70:360–384.
- Ghoshdastider, U., D. Popp, ..., R. C. Robinson. 2013. The expanding superfamily of gelsolin homology domain proteins. *Cytoskeleton (Hoboken)*. 70:775–795.
- Yin, H. L., and T. P. Stossel. 1979. Control of cytoplasmic actin gel-sol transformation by gelsolin, a calcium-dependent regulatory protein. *Nature.* 281:583–586.
- Finidori, J., E. Friederich, ..., D. Louvard. 1992. In vivo analysis of functional domains from villin and gelsolin. *J. Cell Biol.* 116:1145–1155.
- Harris, H. E., and A. G. Weeds. 1984. Plasma gelsolin caps and severs actin filaments. *FEBS Lett.* 177:184–188.
- Yin, H. L., J. H. Hartwig, ..., T. P. Stossel. 1981. Ca²⁺ control of actin filament length. Effects of macrophage gelsolin on actin polymerization. *J. Biol. Chem.* 256:9693–9697.
- Burtnick, L. D., E. K. Koepf, ..., R. C. Robinson. 1997. The crystal structure of plasma gelsolin: implications for actin severing, capping, and nucleation. *Cell.* 90:661–670.
- Robinson, R. C., M. Mejillano, ..., S. Choe. 1999. Domain movement in gelsolin: a calcium-activated switch. *Science.* 286:1939–1942.
- McLaughlin, P. J., J. T. Gooch, ..., A. G. Weeds. 1993. Structure of gelsolin segment 1-actin complex and the mechanism of filament severing. *Nature.* 364:685–692.
- Ishikawa, R., S. Yamashiro, and F. Matsumura. 1989. Differential modulation of actin-severing activity of gelsolin by multiple isoforms of cultured rat cell tropomyosin. Potentiation of protective ability

- of tropomyosins by 83-kDa nonmuscle caldesmon. *J. Biol. Chem.* 264:7490–7497.
23. Nyakern-Meazza, M., K. Narayan, ..., U. Lindberg. 2002. Tropomyosin and gelsolin cooperate in controlling the microfilament system. *J. Biol. Chem.* 277:28774–28779.
 24. Koepf, E. K., and L. D. Burtnick. 1992. Interaction of plasma gelsolin with tropomyosin. *FEBS Lett.* 309:56–58.
 25. Khaïtlina, S., H. Fitz, and H. Hinssen. 2013. The interaction of gelsolin with tropomyosin modulates actin dynamics. *FEBS J.* 280:4600–4611.
 26. Kis-Bicskei, N., A. Vig, ..., G. C. Talián. 2013. Purification of tropomyosin Br-3 and 5NM1 and characterization of their interactions with actin. *Cytoskeleton (Hoboken)*, 70:755–765.
 27. Nag, S., Q. Ma, ..., R. C. Robinson. 2009. Ca²⁺ binding by domain 2 plays a critical role in the activation and stabilization of gelsolin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106:13713–13718.
 28. Spudich, J. A., and S. Watt. 1971. 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.* 246:4866–4871.
 29. Kouyama, T., and K. Mihashi. 1981. Fluorimetry study of N-(1-pyrrenyl)iodoacetamide-labelled F-actin. Local structural change of actin protomer both on polymerization and on binding of heavy meromyosin. *Eur. J. Biochem.* 114:33–38.
 30. Smillie, L. B. 1982. Preparation and identification of alpha- and beta-tropomyosins. *Methods Enzymol.* 85:234–241.
 31. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680–685.
 32. Bugyi, B., and M. F. Carlier. 2010. Control of actin filament treadmill in cell motility. *Annu. Rev. Biophys.* 39:449–470.
 33. Pollard, T. D. 2007. Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 36:451–477.
 34. Tóth, M. A., A. K. Majoros, ..., B. Bugyi. 2016. Biochemical activities of the wiskott-aldrich syndrome homology region 2 domains of sarcomere length short (SALS) protein. *J. Biol. Chem.* 291:667–680.
 35. Hsiao, J. Y., L. M. Goins, ..., R. D. Mullins. 2015. Arp2/3 complex and cofilin modulate binding of tropomyosin to branched actin networks. *Curr. Biol.* 25:1573–1582.
 36. Blanchoin, L., T. D. Pollard, and S. E. Hitchcock-DeGregori. 2001. Inhibition of the Arp2/3 complex-nucleated actin polymerization and branch formation by tropomyosin. *Curr. Biol.* 11:1300–1304.
 37. Robaszkiewicz, K., Z. Ostrowska, ..., J. Moraczewska. 2016. Tropomyosin isoforms differentially modulate the regulation of actin filament polymerization and depolymerization by cofilins. *FEBS J.* 283:723–737.
 38. Lehman, W., V. Hatch, ..., R. Craig. 2000. Tropomyosin and actin isoforms modulate the localization of tropomyosin strands on actin filaments. *J. Mol. Biol.* 302:593–606.
 39. Gunning, P. W., E. C. Hardeman, ..., D. P. Mulvihill. 2015. Tropomyosin—master regulator of actin filament function in the cytoskeleton. *J. Cell Sci.* 128:2965–2974.
 40. Johnson, M., D. A. East, and D. P. Mulvihill. 2014. Formins determine the functional properties of actin filaments in yeast. *Curr. Biol.* 24:1525–1530.
 41. Gunning, P. W., U. Ghoshdastider, ..., R. C. Robinson. 2015. The evolution of compositionally and functionally distinct actin filaments. *J. Cell Sci.* 128:2009–2019.
 42. von der Ecken, J., S. M. Heissler, ..., S. Raunser. 2016. Cryo-EM structure of a human cytoplasmic actomyosin complex at near-atomic resolution. *Nature.* 534:724–728.
 43. Sousa, D. R., S. M. Stagg, and M. E. Stroupe. 2013. Cryo-EM structures of the actin:tropomyosin filament reveal the mechanism for the transition from C- to M-state. *J. Mol. Biol.* 425:4544–4555.