

PhD értekezés tézisei

Tropomiozinok izoforma függő hatása az aktin dinamikájára

Varnyuné Kis-Bicskei Nikolett



PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM
Általános Orvostudományi Kar
Biofizika Intézet

Pécs, 2019

PhD értekezés tézisei

Tropomiozinok izoforma függő hatása az aktin dinamikájára

Varnyuné Kis-Bicskei Nikolett

témavezető: Dr. Talián Csaba Gábor

Doktori Iskola: Interdiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola D93
Iskolavezető: Prof. Dr. Sümegi Balázs (†)
Program: Funkcionális fehérjedinamika vizsgálata biofizikai módszerekkel
(B-130)
Programvezető: Prof. Dr. Nyitrai Miklós
Témavezető: Dr. Talián Csaba Gábor



PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM
Általános Orvostudományi Kar
Biofizika Intézet

Pécs, 2019

I. Bevezetés

I.1. Aktin

A mikrofilamentum számos különféle sejt folyamatot működtet. Ilyen a sejt alakjának meghatározása vagy a sejtmobilitás, de szerepe van többek között az intracelluláris transzportban, a citokinézisben és a transzformációban is. Alapvetően az aktin és a tropomiozin (TM) építi fel a mikrofilamentumot (Vindin and Gunning 2013). Az aktint Straub Brúnó fedezte fel Szent-Györgyi laboratóriumában 1942-ben.

Az aktin molekulásúlya 42,3 kDa és 375 aminosav építi fel. Sejtekben két formában található meg, monomer vagy globuláris (G-aktin) és polimer vagy filamentális (F-aktin) formában. Monomer formából filamentummá való átalakulást polimerizációnak hívjuk. A filamentum végekről aktin monomerek leválása is lehetséges, ezt nevezzük depolimerizációnak. A polimerizáció három fő szakaszra bontható. Első szakasz a nukleáció, mely során két, majd három monomer összekapcsolódásával képződik a nukleusz. A polimerizáció következő szakasza a diffúzió vezérelt elongáció, ahol a monomerek filamentumba való beépülése a domináns. Az utolsó fázis egy dinamikus egyensúly, mely során a filamentum mindkét végén monomerek épülnek be és válnak le különböző kinetikával. Az egyik végen a monomerek beépülése dominál, míg a másik végen inkább a leválásuk a domináló, és mindeközben a filamentum hossza nem változik. A filamentum növekvő végén elhelyezkedő protomerek ATP-t kötnek, míg a rövidülő végén lévő protomerek ADP-t kötnek.

I.2. Aktin-kötő fehérjék

Tropomiozin

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). Emlősök esetében négy tropomiozin gén ismert, melyről több mint 40 mRNS íródik át, majd ezekből 25 különböző tropomiozin fehérje keletkezhet. Általában az izomsejtekben előforduló izomösszehúzásában résztvevő tropomiozinokat izom izoformáknak, a sejt

citoszkeletonjához kapcsolódó tropomiozinokat nem-izom vagy citoszkeletonális izoformáknak nevezzük. Az egyes izoformák expressziója és lokalizációja szövetben és sejtben egyaránt szigorúan szabályozott és gyakran a fejlődési állapottól is függ (Gunning et al. 2005; Gunning, O’neill, and Hardeman 2008). Az idegrendszerben először Fine és munkatársai fedezték fel (Fine et al. 1973). Azóta számos idegrendszerben előforduló izoformát leírtak már.

A Tpm1.11 és Tpm1.12 rövid, míg a Tpm1.10 hosszú izoforma, előzőeknél az 1b, míg utóbbinál az 1a és 2b exon figyelhető meg az N-terminálison. A γ -TM gén kódolja a neuronokban előforduló tropomiozinokat, mint a Tpm3.1 és Tpm3.2, melyek rövid típusú izoformák 1b exonnal. Ezek az izoformák eltérő sejten belüli eloszlást és fejlődési profilt mutatnak, ami arra utal, hogy különböző idegrendszeri folyamatokhoz specializálódtak.

Gelsolin

A gelsolin szerkezetileg az aktin-kötő fehérjék családjába tartozik (Nag et al. 2013). 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. Egy gelsolin molekula 2 aktin monomert képes megkötni (McGough et al. 2003; Silacci et al. 2004). Citoplazmában a gelsolin általában egyetlen izoformában létezik. In vitro a gelsolin képes mind nukleálni, mind elválasztani az aktin monomereket és lefedni az aktin szöges végét (Finidori et al. 1992; Harris and Weeds 1984; Yin et al. 1981). A gelsolinról felfedezték, hogy gátolja makrofágokban a sol-gél átmeneteket (Yin and Stossel 1979).

Gelsolin képes Ca^{2+} ionok megkötésére, több kötőhellyel is rendelkezik, melyek különböző affinitással rendelkeznek (Nag et al. 2013). Ca^{2+} kötődés során felszabadul a gelsolin kompakt szerkezete és szabaddá válnak a G-aktin és F-aktin kötőhelyek (Burtnick et al. 1997; McLaughlin et al. 1993; Robinson et al. 1999).

II. Célkitűzések

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) 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) 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) 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. Fehérjék előállítása

III.1.1. Aktin preparálás

Kísérleteinkben nyúl vázizom aktint állatottunk elő ((Spudich and Watt 1971), majd Superdex G75 (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) oszlopon gélfiltráltuk A-pufferben (4 mM Tris, 0,2 mM ATP, 0,1 mM CaCl₂, 0,5 mM β-mercaptoethanol, and 0,005% NaN₃ (pH 7,8)). A G-aktint jégen tároltuk A-pufferben. Fluoreszcencia méréseinkhez az aktint pirénnel (pyrenyl-iodoacetamide, (pyrene; Invitrogen, Carlsbad, CA)) jelöltük már korábban leírt módszerrel (Kouyama and Mihashi 1981).

III.1.2. Tpm1.12 és Tpm3.1 klónozása és tisztítása

Tpm1.12 és Tpm3.1 izofomrákat pET28a plazmidba klónoztuk, majd Escherichia coli B121 (DE3) sejtekbe transzformáltuk, majd a tisztítást egy korábban leírtak szerint végeztük kisebb módosításokkal (Kis-Bicskei et al. 2013). Az újrasszuspendált baktériumpelletek lízispufferje 10 mM imidazolt, 1 mM β-merkaptotetanolt, 1% Triton-X 100-at és 2 mM CaCl₂-t tartalmaz, és a lizátumot 440 000 x g-vel 1 órán át 4°C-on centrifugáljuk. A fehérjekoncentrációt BCA protein assay kit (Sigma, St. Louis, MO) alkalmazásával mértük, és a fehérjekészítményeket 0°C-on tároltuk 10 mM Tris-ben, 10 mM KCl-ben és 1 mM ditiotreitoltban (pH 7,8).

III.1.3. skTM tisztítása

Az skTM-et az aktin-aceton por maradványaiból tisztítottuk (Smillie 1982), majd hidroxipapatit-kromatográfiás módszerrel tisztítottuk, és fagyasztva tároltuk 5 mM Tris-ben (pH 7,8) és 1mM DTT-ben. Fluoreszcencia méréseinkhez pirénnel (pyrenyl-iodoacetamide, (pyrene; Invitrogen, Carlsbad, CA)) jelöltük már korábban leírt módszerrel (Kouyama and Mihashi 1981). Fehérje koncentrációját fotometriás módszerrel határoztuk meg az alábbi extinkciós koefficienseket használva: aktin esetén $\epsilon_{280}=1.11 \text{ ml}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ és $\epsilon_{290}=0.63 \text{ ml}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, skTM esetén $\epsilon_{280}=0.3 \text{ ml}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

III.1.4. VCA-Arp2/3 tisztítása

Szarvasmarha-agyból származó Arp2/3 komplexet és a rekombináns GST-taggel ellátott humán VCA-t a korábban leírtak szerint tisztítottuk (Egile et al. 1999).

III.1.5. Gelsolin tisztítása

Gelsolin előállításához His-taggel ellátott teljes hosszúságú szekvenciát használtunk pET21d(+) vektorba klónozva (Nag et al. 2009). A plazmid DNS-t *Escherichia coli* BL21 (D3) sejtekbe transzformáltuk. Fehérje koncentrációt ismét fotometriás módszerrel határoztuk meg ($\epsilon_{280}=1.29 \text{ ml} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

III.1.6. TEV proteáz tisztítása

A TEV proteázt 6x His-tag pET24 (TEV-235) plazmid-konstrukcióval (Hüseyin Besir, EMBL ajándéka) tisztítottuk az *Escherichia coli* BL21 DE3 sejtekben. A fehérje koncentrációt fotometrikusan meghatároztuk $\epsilon_{280} = 51,19 \text{ ml} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ alkalmazásával. A végső glicerin-tartalmat 50% -ra állítottuk be, és a mintákat -20°C -on tároltuk.

III.2. Mérési módszerek

III.2.1. Koszedimentációs esszé

$20\mu\text{M}$ Mg-G-aktint polimerizáltunk 2mM MgCl_2 és 100mM KCl mellett, majd polimerizációs pufferrel kihígítottuk $5\mu\text{M}$ -osra tropomiozin nélkül, illetve különböző tropomiozin koncentrációk jelenlétében. A mintákat ($60\mu\text{l}$) 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 gél Coomassie Blue festékekkel 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 méréssorozatot készítettünk. Egyrészt $2\mu\text{M}$ gelsolint adtunk $25\mu\text{M}$ filamentális aktinhoz és inkubáltuk 1 órán át. Ezt követően a mintát kihígítottuk $10\mu\text{M}$ aktin, $0,8\mu\text{M}$ gelsolin koncentrációra különböző tropomiozinokkal (Tpm1.12 végkoncentrációja $40\mu\text{M}$; Tpm3.1 végkoncentrációja $40\mu\text{M}$ és az skTM végkoncentrációja $10\mu\text{M}$ volt), illetve tropomiozin nélkül polimerizációs pufferrel, majd inkubáltuk újabb 2 órán át. Másrészt $10\mu\text{M}$ filamentális aktint inkubáltunk először különböző tropomiozinnal, illetve a nélkül. A tropomiozin koncentrációk ugyanazok voltak, mint az első esetben. Ezt követően adtunk a mintához $0,8\mu\text{M}$ gelsolint és újabb 1 órán át hagytuk inkubálódni. Mindkét sorozatot centrifugáltuk (Beckman-Coulter, TLA-100 rotor, $440,000g$, 30 perc, 4°C). A gélt 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.2.2. Fluoreszcencia mérések

Fluoreszcencia kísérleteinket PerkinElmer vagy Jobin Yvon spektroszkóppal végeztük (Horiba Scientific). Az adatokat mindig legalább három független mérés átlagából számoltuk és átlag $\pm\text{SE}$ -ben tüntettük fel.

III.2.2.1. Polimerizációs esszé

$5\mu\text{M}$ Mg-G-aktint A-pufferben polimerizáltunk (amely 5% pirén jelölt aktint tartalmaz) 2mM MgCl_2 , 100mM KCl (végső koncentráció) és különböző tropomiozin jelenlétében. A polimerizáció kinetikáját a pirén fluoreszcencia időbeli változásainak mérésével követtük. A fluoreszcencia tranzienseket normalizáltuk és a polimerizációs sebességet az adatok lineáris szakaszának ($0,45$ - $0,55$) meghatározásával határoztuk meg. Legalább 3 független mérés eredményét használtuk a kiértékeléshez.

III.2.2.2. Depolimerizációs esszé

10 μM Mg-G-aktint az A pufferben (amely 50% pirén-jelölt aktint tartalmaz) polimerizáltuk egy éjszakán keresztül 2 mM MgCl_2 és 100 mM KCl (végső koncentráció) hozzáadásával tropomiozin hiányában vagy jelenlétében. Az F-aktin oldatot 50 nM-re hígítottuk polimerizációs pufferben. A depolimerizációs kinetikát a pirén fluoreszcencia időbeli csökkenésének mérése követte. A depolimerizációs sebességet a pirén tranziensek első 50 másodperces lineáris meghatározásával becsültük meg. Kiszámítottuk legalább három független mérés átlagát. A normalizált depolimerizációs sebességeket úgy számoltuk, hogy a tropomiozin hiányában a depolimerizációs sebesség aránya a tropomiozin jelenlétében kialakuló depolimerizációs sebességgel arányos.

III.2.3. 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 35 μl EDC/NHS oldattal (200mM EDC; 50M NHS) injektáltuk, majd a tropomiozint 30 $\mu\text{g/ml}$ -re hígítottuk az immobilizációs pufferrel (10mM Na-acetát, pH=3,5) és injektáltuk a felületen 7 percig. 10 $\mu\text{l/perc}$ áramlási sebesség mellett. A felesleges reaktív helyeket ezután blokkoltuk 1M etanol-amin (pH=8,5) injektálásával 7 percig 5 $\mu\text{l/perc}$ 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 7,5 μM) 10 $\mu\text{l/perc}$ 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 kötési 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.

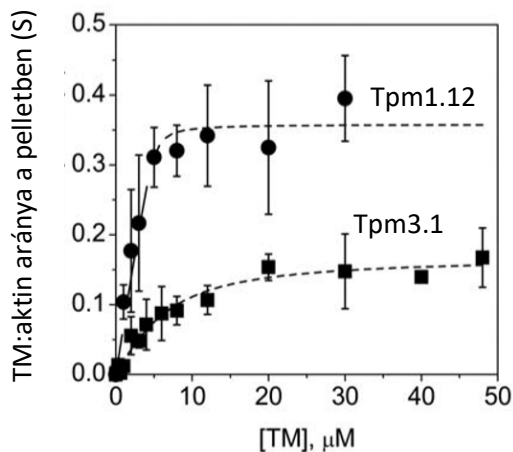
IV. Eredmények és megbeszélés

IV.1. Tpm1.12 és Tpm3.1 expressziója és tisztítása

A klónozás során teljes hosszúságú egér tropomiozin izoformák előállítására volt a cél. A fehérjék tisztaságát, valamint a sikeres hasítást SDS poliakrilamid gélen ellenőriztük. Ismert molekulahúlyú marker segítségével meghatároztuk az egyes izoformák molekulatömegét SDS poliakrilamid gélfuttatást követően. Ez alapján a Tpm1.12 molekulaméretét 31 kDa-ra, a Tpm3.1 37 kDa-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. Az aminosav szekvenciában történő kisebb módosítások is már befolyásolhatják az aktinhoz való kapcsolódásukat, így a funkciójukat is (Bharadwaj et al. 2004). 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 előállítására volt a cél. Sikeresen klónoztuk és megtisztítottuk ezeket a tropomiozin izoformákat az aktinnal való kölcsönhatásuk in vitro jellemzéséhez.

IV.2. Tpm1.12 és Tpm3.1 kötődése az aktin filamentumhoz

A mérés során 5 μ M F-aktinhoz növekvő koncentrációban adtuk az egyes tropomiozinokat, majd éjjelen át tartó inkubálást követően centrifugálással pelletáltuk a mintákat. 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 (1. ábra).



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

Az adatokból az adott izoformára jellemző disszociációs egyensúlyi állandó volt meghatározható. Ezek alapján a Tpm1.12 körülbelül hétszer kisebb affinitással ($K_D = 3,5 \pm 0,9 \mu\text{M}$) kötődik az F-aktinhoz, mint az skTM ($K_D = 0,5 \mu\text{M}$) (Boussouf and Geeves 2007), míg a Tpm3.1 esetén ez a különbség sokkal kisebb ($K_D = 0,1 \pm 0,1 \mu\text{M}$). Ez a kötődési különbség összhangban áll a korábbi eredményekkel, és azt mutatják, hogy a tropomiozinok aktinhoz való kötődése erősen függ a tropomiozinok N- és C- terminálisait kódoló exonok speciális kombinációjától (Moraczewska, Nicholson-Flynn, and Hitchcock-DeGregori 1999).

Eredményeink alátámasztják azt a nézetet, miszerint a tropomiozinok N- és C-terminálisai meghatározóak az aktinhoz való kötődés hatékonyságában, mivel meghatározzák a tropomiozin azon képességét, hogy polimereket képezzenek végig az aktin-filamentum mentén. A Tpm1.12 aktin-filamentumhoz történő kötődésének alacsonyabb affinitása megegyezik a korábbi megállapításokkal is, melyek azt mutatják, hogy a szövetből izolált agyi izoformák kb 10-szer alacsonyabb affinitással kötik meg az aktint, mint az izom-izoformák (Broschat and Burgess 1986).

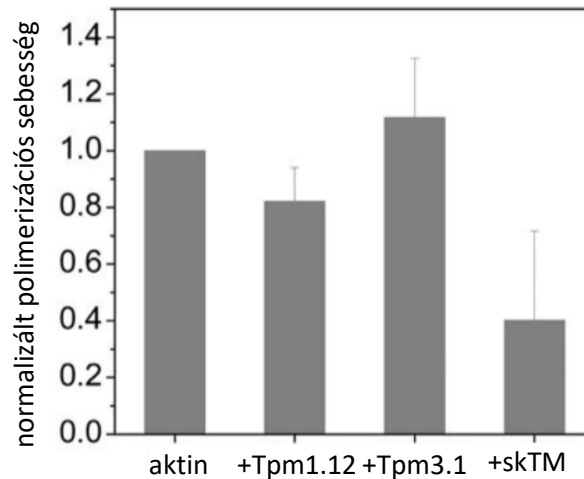
IV.3. Tpm1.12 és Tpm3.1 hatása az aktin filamentum összeszerelésére

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.

Összhangban a korábbi mérésekkel, vázizom tropomiozin (skTM) esetén azt tapasztaltuk, hogy az általunk használt $6 \mu\text{M}$ skTM ~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.

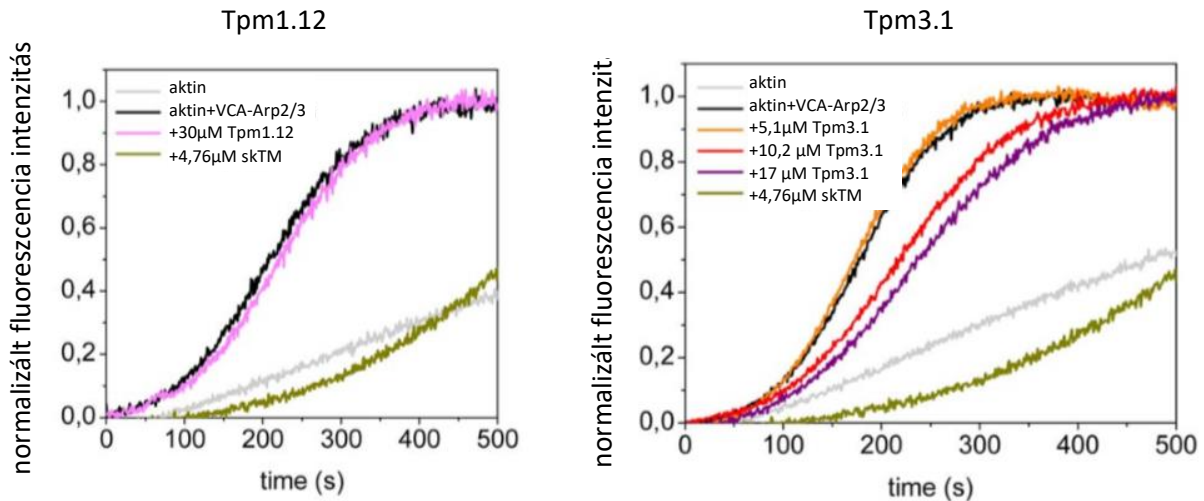
Tpm1.12 esetén $40\mu\text{M}$ és Tpm3.1 esetén $17\mu\text{M}$ az alkalmazott koncentráció, ami több mint 10-szerese a korábban meghatározott K_D értéknek. Ennek ellenére, a két izoforma csak kis mértékben befolyásolta az aktin polimerizációját. Míg a Tpm1.12 az skTM-hez hasonlóan csökkentette a polimerizáció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



2. ábra: Normalizált polimerizációs sebességek az egyes tropomiozinok jelenlétében

IV.4.: Tpm1.12 és Tpm3.1 hatása az Arp2/3 komplex által katalizált aktin összeszerelésére

A korábbi biokémiai vizsgálatok azt mutatták, hogy egyes tropomiozin izoformák gátolják az Arp2/3 komplex által katalizált aktin összeállítást (Blanchoin et al. 2001; Bugyi, Didry, and Carlier 2010). A sejtbiológiai vizsgálatok azt mutatták, hogy a Tpm1.12 és a Tpm3.1 ellentétes hatással volt a lamellipódia kialakulására és a sejtek migrációjára (Bryce et al. 2003). A Tpm1.12 és a Tpm3.1 hatásainak vizsgálatára Arp2/3 komplex aktivitású polimerizációs vizsgálatokat végeztünk. Megállapítottuk, hogy hasonlóan az skTM-hez, a Tpm3.1 gátolja a VCA-Arp2/3 komplex által katalizált aktin összeállítást koncentrációfüggő módon. A legmagasabb Tpm3.1 koncentrációnál a gátlás $\sim 25\%$ volt. Érdekes módon azt találtuk, hogy a Tpm1.12 nem volt hatással az Arp2/3 komplex által katalizált aktin-összeállításra (3. ábra).

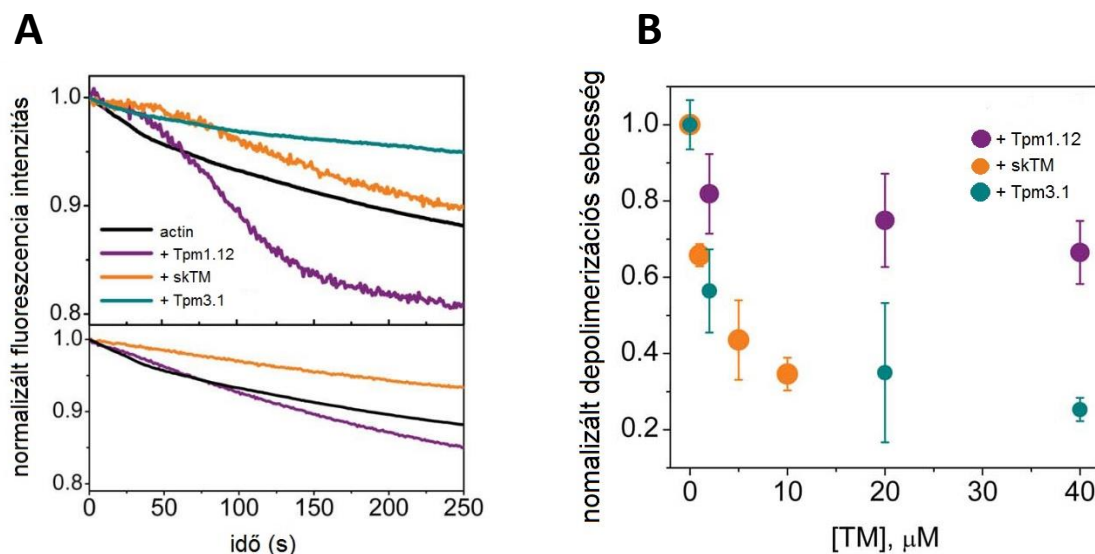


3. ábra: Aktin polimerizációs sebessége Arp2/3, valamint az egyes tropomiozinok jelenlétében

IV.5. Tpm1.12 és Tpm3.1 hatása az aktin filamentum szétszerelésére

A depolimerizáció tanulmányozására az aktint (2M, 50% pirén-jelölt aktint tartalmaz) először polimerizáltuk, majd a polimerizációs pufferbe 50nM végkoncentrációra hígítottuk. Ez biztosítja, hogy hígítás után az aktin koncentrációja alacsonyabb legyen, mint a kritikus koncentráció, ami az aktinfilamentum szétszerelését eredményezi, amiben a szögcs vég szétszerelése a domináló. Az aktin filamentumok depolimerizációs kinetikáját a pirén fluoreszcencia monitorozásával követtük. Tropomiozin hiányában egyszeri csökkenő görbét figyeltünk meg (4A, felső panel, fekete vonal). Amikor előinkubáltuk az aktint 10µM skTM-mel, 40µM Tpm1.12-vel vagy 40µM Tpm3.1-gyel két fázis volt megfigyelhető (4A ábra felső panel). Az első fázis (kb. 50 másodperc) lassabb depolimerizációt mutatott, mint a tropomiozin hiányában megfigyelt esetben. Ezután jelent meg a második, gyorsabb fázis. Ezekben az esetekben az a puffer amelyhez az aktint hígítottuk, nem tartalmazott tropomiozint. Következésképpen hígítás után (40x) a tropomiozin koncentrációja jelentősen csökkent. A körülmények megváltozása miatt új egyensúlyt alakítottak ki, és a tropomiozin nagy része disszociálódott a filamentumokról. A kapott görbék első fázisait az aktin filamentum depolimerizációjának tulajdonítottuk az aktin-tropomiozin komplexben, míg a második szakasz megfelel a tropomiozinok disszociációját követő aktin depolimerizációnak. Ennek a magyarázatnak a megerősítéséhez megismételtük a kísérleteket úgy, hogy az aktin filamentumokat ugyanolyan koncentrációjú tropomiozint tartalmazó pufferbe hígítottuk, mint az aktin mintákban volt (10µM skTM, 40µM Tpm1.12, 40µM Tpm3.1). Ebben az esetben

szintén csak egy fázis volt megfigyelhető a mérések során (4A. ábra alsó panel), ezzel megerősítve a tropomiozin aktinról való disszociációjának következtetéseit. Ezek a megfigyelések mutatták, hogy az összes vizsgált tropomiozin lelassította az aktin-filamentumok depolimerizációját, és arra utaltak, hogy a tropomiozin disszociációja egy lassú és néhány tíz másodperces időtartamon belül zajlik. A depolimerizációs kísérleteket különböző tropomiozin koncentrációkban megismételtük. A kapott görbék első 50 másodpercét lineáris függvényekkel rögzítettük és a meredekségüket használtuk a depolimerizációs sebesség becslésére. Az adatok azt mutatták, hogy ezek a tropomiozin izoformák koncentrációfüggő módon csökkentették a depolimerizációs sebességet (4B. ábra). Az skTM és a Tpm3.1 körülbelül kétszer nagyobb hatással volt az aktin depolimerizációjára, mint a Tpm1.12.



4. ábra: (A): Aktin filamentum depolimerizációja tropomiozin jelenlétében (B): Depolimerizáció sebessége különböző tropomiozin koncentráció jelenlétében

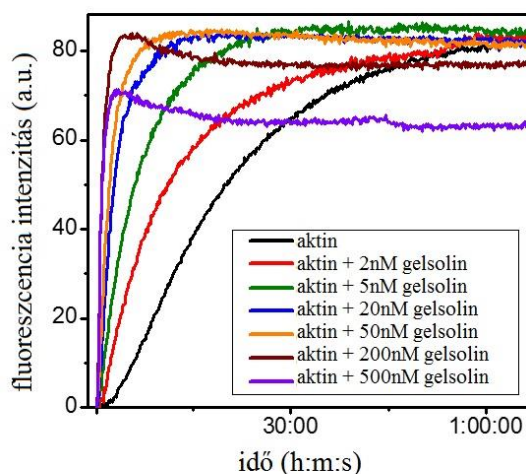
IV.6.: Tropomiozinok kötődése gelsolinhoz

A gelsolin egyes tropomiozin izoformákhoz való kötési affinitását felületi plazmon rezonanciával (SPR- Surface Plasmon Resonance) vizsgáltuk. A tropomiozinokat aminos csoportjuknál az érzékelő chipre immobilizáltuk, majd különböző koncentrációban gelsolint juttattunk a felülethez. 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.

IV.7.: Gelsolin hatása az aktin polimerizációra

Megvizsgáltuk, hogy a tropomiozin-gelsolin kapcsolódás befolyásolja-e ezen fehérjék aktivitását. Elsőként Ca^{2+} iont kötő aktinnal megvizsgáltuk annak polimerizációját növekvő gelsolin koncentráció (2-500nM) jelenlétében. 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 (5. ábra) Ez az eredmény összhangban áll a már korábbi vizsgálatokkal (Yin et al. 1981).



5. ábra: Gelsolin által indukált aktin polimerizáció

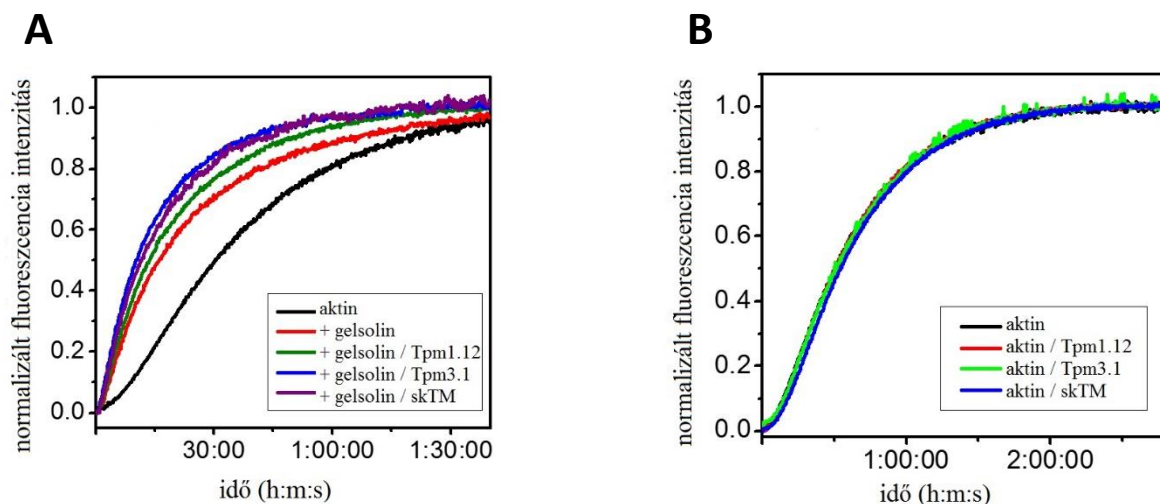
Az aktinhoz képest magasabb gelsolin koncentráció esetén ($> 200\text{nM}$) a kezdeti polimerizáció gyorsabb mint a depolimerizáció, így kialakul egy az egyensúlyi állapothoz

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.

IV.8.: Gelsolin polimerizációra gyakorolt hatása tropomiozinok jelenlétében

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 $100\mu\text{M}$ Ca^{2+} jelenlétében. A gelsolin által megnövekedett aktin polimerizációs sebesség mindegyik tropomiozin jelenlétében tovább növekedett (6A ábra). A legkisebb hatást a Tpm1.12-nél észleltük, közepes hatást fejtett ki a Tpm3.1 és legnagyobb hatással az skTM volt a polimerizációra. A legkisebb hatást az aktin-összeszerelésére a Tpm1.12-nél, a közepes hatást a Tpm3.1-nél (57%), a legnagyobb a skTM-mel (76%) figyeltük meg. 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.

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.



6. ábra: (A): aktin polimerizáció gelsolin és gelsolin-tropomiozin komplex jelenlétében, (B): Tropomiozinok hatása a Ca^{2+} -aktin polimerizációra gelsolin jelenléte nélkül

IV.9.: Gelsolin által kiváltott aktin filamentum szétesés tropomiozin jelenlétében

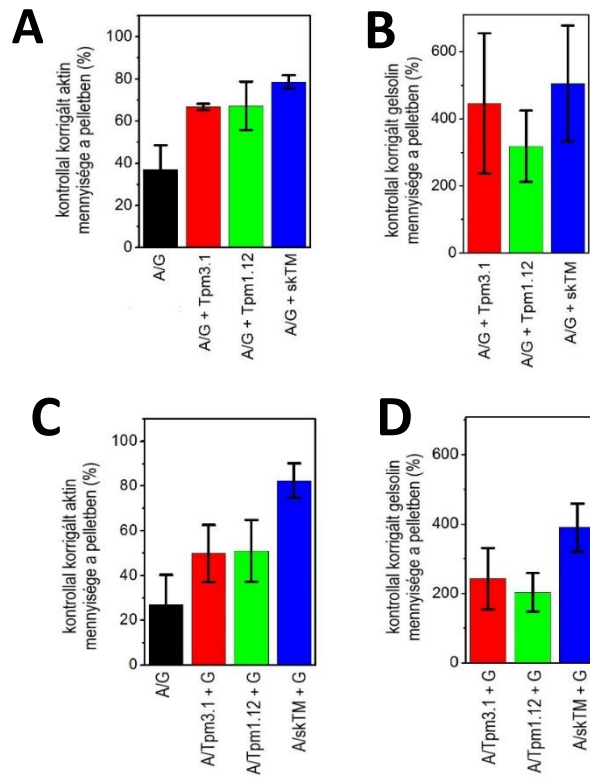
Ahhoz, hogy megvizsgáljuk a tropomiozinok hatását a gelsolin által okozott filamentum severing szempontjából, depolimerizációs tesztekét végeztünk. A mérésekhez pirén-jelölt aktin filamentumokat hígítottunk a szöges vég kritikus koncentrációja ($\sim 0,12\mu M$) alá (Bugyi and Carlier 2010; Pollard 2007). 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. A gelsolin filamentum daraboló funkciója növeli a mínusz végek számát, de a plusz végeket lesapkázza, ami a depolimerizáció nettó sebesség növekedését eredményezi. 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. Ha a tropomiozinokat gelsolin nélkül adjuk a filamentumokhoz, akkor azok nem növelik a nettó depolimerizáció sebességet. 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. 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.

IV.10.: Tropomiozin védő hatása gelsolinnal szemben az aktin filamentumon

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 (7. ábra A paneljében látható). Amikor a mintákhoz tropomiozint adtunk, a pelletben lévő aktin mennyisége megnövekedett. Ez arra utal, hogy a tropomiozinok részben megvédték az aktin filamentumokat a gelsolin depolimerizációs hatásától. Amikor összehasonlítottuk a tropomiozinnal is kezelt mintákat a csak gelsolint tartalmazó mintákkal, azt tapasztaltuk, hogy a gelsolin mennyisége 2-5-szörösére változott (7. ábra B panelje mutatja). Kontroll mérésenként elvégeztük a kísérletet aktin jelenléte nélkül. Azt találtuk, hogy a tropomiozin nincs hatással a gelsolin ülepedésére.



7. ábra: A koszedimentációs tesztek kiértékelése

V. Összefoglalás

Az alábbiakat tekintem saját új eredményeimnek:

- 1) A méréseink elvégzéséhez sikeresen klónoztuk a neuron-specifikus natív, tag-mentes 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.

VI. Irodalmi hivatkozások

- 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. and Michael A. Geeves. 2007. "Tropomyosin and Troponin Cooperativity on the Thin Filament." *Advances in Experimental Medicine and Biology* 592:99–109.
- 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, 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.
- 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.
- Egile, C., T. P. Loisel, V. Laurent, R. Li, D. Pantaloni, P. J. Sansonetti, and M. F. Carlier. 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." *The Journal of Cell Biology* 146(6):1319–32.

- Fine, R. E., A. L. Blitz, S. E. Hitchcock, and B. Kaminer. 1973. "Tropomyosin in Brain and Growing Neurons." *Nature: New Biology* 245(145):182–86.
- Finidori, J., E. Friederich, D. J. Kwiatkowski, and D. Louvard. 1992. "In Vivo Analysis of Functional Domains from Villin and Gelsolin." *Journal of Cell Biology* 116(5):1145–55.
- 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, 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.
- Harris, H. E. and A. G. Weeds. 1984. "Plasma Gelsolin Caps and Severs Actin Filaments." *FEBS Letters* 177(2):184–88.
- 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.
- Kouyama, Tsutomu and Koshin Mihashi. 1981. "Fluorimetry Study of N-(1-Pyrenyl)Iodoacetamide-Labelled F-Actin: Local Structural Change of Actin." [file:///E:/Munka/PhD/KBN/Irodalomjegyzék/Bryce 2003, Specification of Actin Filament Function and Molecular Composition by Tropomyosin Isoforms.Pdf](http://file:///E:/Munka/PhD/KBN/Irodalomjegyzék/Bryce%202003,%20Specification%20of%20Actin%20Filament%20Function%20and%20Molecular%20Composition%20by%20Tropomyosin%20Isoforms.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.
- 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.
- McLaughlin, P. J., J. T. Gooch, H. G. Mannherz, and A. G. Weeds. 1993. "Structure of Gelsolin Segment 1-Actin Complex and the Mechanism of Filament Severing." *Nature* 364(6439):685–92.
- 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.
- Nag, Shalini, Mårten Larsson, Robert C. Robinson, and Leslie D. Burtnick. 2013. “Gelsolin: The Tail of a Molecular Gymnast.” *Cytoskeleton* 70(7):360–84.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Smillie, L. B. 1982. “Preparation and Identification of Alpha- and Beta-Tropomyosins.” *Methods in Enzymology* 85 Pt B:234–41.
- Spudich, James A. and Susan Watt. 1971. “The Regulation of Rabbit Skeletal Muscle Contraction.” *Journal of Biological Chemistry* 246(15):4866–71.
- 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.
- 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.
- 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.

Yin, H. L. and T. P. Stossel. 1979. “Control of Cytoplasmic Actin Gel-Sol Transformation by Gelsolin, a Calcium-Dependent Regulatory Protein.” *Nature* 281(5732):583–86.