

Минимальная математическая модель формирования псевдоподия нейтрофилов в процессе хемотаксиса

A minimal mathematical model of neutrophil pseudopodium formation during chemotaxis

Ю. Коробкина¹, А. Гарсия², А.Н. Свешникова^{1,2,3,4}

J. Korobkin¹, A. Garcia², A.N. Sveshnikova^{1,2,3,4}

1. Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук, ул. Средняя Калитниковская, 30, Москва, 109029, Россия
2. Физический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1/2, Москва, 119991, Россия
3. Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева, ул. Саморы Машелы, 1, Москва, 117198, Россия
4. Кафедра нормальной физиологии Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова, ул. Трубецкая, 8/2, Москва, 119991, Россия

Автор для переписки: juliajessika@gmail.com

1. Center for Theoretical Problems of Physico-Chemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, 30 Srednyaya Kalitnikovskaya str., Moscow, 109029, Russia
2. Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University, 1/2 Leninskie gory, Moscow, 119991, Russia
3. National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitry Rogachev, 1 Samory Mashela St, Moscow, 117198, Russia
4. Department of Normal Physiology, Sechenov First Moscow State Medical University, 8/2 Trubetskaya St., Moscow, 119991, Russia

Получено: 22.09.2021

Принято к публикации: 30.09.2021

Опубликовано: 30.12.2024

EDN: PGWFSM

DOI: 10.65189/2949-0758-2024-3-2-18-25

Аннотация

Направленное движение нейтрофилов обеспечивается быстрой полимеризацией актина с образованием выступа, растущего вперед - псевдоподии. В нашей предыдущей работе мы наблюдали нарушение движения нейтрофилов у пациентов с синдромом Вискотта-Олдрича (WAS) по сравнению со здоровыми донорами.

В этой работе мы попытались объяснить нарушение хемотаксиса нейтрофилов у пациентов путем экспериментального наблюдения и компьютерного моделирования линейных скоростей роста псевдоподий на переднем конце клетки. Хемотаксис нейтрофилов наблюдали с помощью TIRF-микроскопии в плоскопараллельных проточных камерах. Вычислительная модель включала в себя сетевую двумерную стохастическую полимеризацию актина, управляемую близостью к клеточной мембране, с ветвлением актина, управляемым белками Arp2/3 и WASP.

Наблюдаемая линейная скорость образования псевдоподий нейтрофилов составила $0,22 \pm 0,04$ мкм/с у здоровых доноров и $0,23 \pm 0,08$ мкм/с у пациентов с WAS. Модель хорошо описывала скорость формирования псевдоподий у здоровых

доноров. Для описания данных пациентов с WAS было применено изменение скорости ветвления (известно, что оно регулируется WASP) на порядок, что существенно не изменило линейную скорость роста переднего края псевдоподии.

Мы пришли к выводу, что предложенная математическая модель формирования псевдоподий нейтрофилов может хорошо описывать экспериментальные данные, но данные об общем измененном движении нейтрофилов у пациентов с WAS не могут быть объяснены скоростями роста псевдоподий.

Ключевые слова: Цитоскелет, Нейтрофилы, Актин, Хемотаксис, Синдром Вискотта-Олдрича

Annotation

The directed movement of neutrophils is provided by the rapid polymerization of actin with the formation of a protrusion growing forward. In our previous work we observed impaired neutrophil movement for patients with Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) compared to healthy donors.

In this work, we set out to explain the impairment of neutrophil chemotaxis in patients by observation and computer modeling of the linear growth rates of

the anterior pseudopodia. The neutrophil chemotaxis was observed by means of low-angle fluorescent microscopy in parallel-plate flow chambers. The computational model was constructed as a network-like 2D stochastic polymerization of actin guided by the proximity of cell membrane with branching governed by Arp2/3 and WASP proteins.

The observed linear velocity of neutrophil pseudopodium formation was $0.22 \pm 0.04 \mu\text{m/s}$ for healthy donors and $0.23 \pm 0.08 \mu\text{m/s}$ for WAS patients. The model described the velocity of the pseudopodium formation for healthy donors well. For the description of WAS patients data, a variation of branching velocity (governed by WASP) by an order of magnitude was applied, which did not significantly alter the linear protrusion growth velocity.

We conclude that the proposed mathematical model of neutrophil pseudopodium formation could describe the experimental data well, but the data on overall neutrophil movement could not be explained by the velocities of the pseudopodium growth.

Key words: Cytoskeleton, Neutrophils, Actin, Chemotaxis, Wiskott-Aldrich Syndrome

Введение

Нейтрофилы представляют собой самую многочисленную популяцию лейкоцитов в крови человека и являются первыми клетками, которые попадают в очаги воспаления[1]. Чтобы выполнять свои функции, нейтрофилы должны улавливать внеклеточные химические градиенты и перемещаться в направлении более высоких концентраций хемоаттрактантов, исходящих из мест повреждения. Этот процесс называется хемотаксисом или управляемой миграцией клеток[2]. Хемотаксис нейтрофилов характеризуется чувствительностью к градиенту хемоаттрактантов, поляризацией и подвижностью клеток[3]. Действие хемоаттрактанта опосредовано через рецепторы, связанные с G-белком (GPCR), и другие рецепторы, которые индуцируют асимметричную локализацию и активацию ключевых сигнальных молекул.

Для направленного перемещения нейтрофилов должна произойти перестройка актинового цитоскелета. В частности, полимеризация актина происходит на растущем по направлению к источнику хемоаттрактанта клеточном выступе. Этот выступ иногда называют псевдоподиями (или, у нейтрофилов, ламеллиподиями).

Псевдоподии нейтрофилов состоят из ядра, богатого актином, окруженного адгезивными и каркасными белками. Глобулярные (G) мономеры актина полимеризуются с образованием фибриллярного (F) актина, который имеет решающее значение для миграции клеток[4,5].

F-актин - это ориентированные нити, которые растут на так называемом зазубренном конце и выдвигают переднюю часть клетки вперед, что стимулирует миграцию клеток. Нуклеация и полимеризация актина регулируются форминами (например, mDia1 и mDia2) и комплексом Arp2/3[5,6]. Формины регулируют рост линейных актиновых филаментов[7,8]. Комплекс Arp2/3 образует ответвления от существующих актиновых филаментов под углом 70° и, таким образом, создает дендритную актиновую сеть[2].

Динамику движения нейтрофилов можно рассматривать как показатель состояния нейтрофилов. Недавно мы предложили экспериментальную модель для оценки состояния нейтрофилов у пациентов в условиях растущих тромбов *ex vivo*[3]. В этой работе мы изучали движение нейтрофилов у детей с синдромом Вискотта–Олдрича (WAS) - редким врожденным иммунодефицитом, характеризующимся нарушением иммунной регуляции и аномалиями цитоскелета. Иммунные клетки пациентов с WAS демонстрируют более низкие скорости хемотаксиса[3,9]. Известно, что комплекс Arp2/3 (Actin-related proteins 2/3) активируется семейством белков WASP (белок синдрома Вискотта–Олдрича) [13], но влияние мутаций WASp на формирование ламеллиподий пока не ясно.

Математическое моделирование было применено для описания роста актинового цитоскелета в ламеллиподиях[10], филоподиях[11] и выступах пресинаптической мембраны[12]. Существует несколько возможных подходов к моделированию образования псевдоподий нейтрофилов, таких как моделирование концентрации актина как непрерывной величины[13] или стохастическое моделирование отдельных белков. Поскольку было показано, что мембранные выступы нейтрофилов по своей сути являются пластинчатыми[14], для описания роста мембранных выступов можно было бы использовать двумерную (2D) геометрию.

Здесь мы предприняли первую попытку связать воедино наблюдаемые изменения в движении нейтрофилов у пациентов с WAS и известные механизмы полимеризации актина и образования псевдоподий нейтрофилов. Мы измерили линейные скорости роста псевдоподий нейтрофилов у пациентов с WAS и здоровых доноров с помощью флуоресцентной микроскопии. Удивительно, но разница между этими значениями не была статистически значимой. Чтобы объяснить наблюдаемые явления, мы построили минимальную математическую модель, способную количественно описать рост выпячивания мембраны нейтрофилов. В соответствии с экспериментальными данными,

изменение скорости ветвления на порядок не оказало существенного влияния на общую скорость роста протрузии. Это указывает на то, что наблюдаемое нарушение хемотаксиса у пациентов с WAS не может быть объяснено нарушением формирования псевдоподий.

Материалы и Методы

Материалы

Источники материалов были следующие: DiOC-6, бычий сывороточный альбумин (BSA), фибриноген человека (Sigma-Aldrich, St Louis, MO); фибриллярный коллаген I типа (Chrono- Log Corporation; Havertown; USA).

Методы

Флуоресцентная микроскопия

Плоскопараллельные проточные камеры собирались, как описано ранее[15], параметры канала составляли: 0,2 x 18 x 0,206 мм. Покровные стекла покрывали фибриллярным коллагеном типа I (0,2 мг/мл) в течение 1 часа 30 минут при температуре 37°C, промывали дистиллированной водой, инкубировали с BSA и затем собирали с ними проточные камеры.

Кровь брали у здоровых взрослых добровольцев (n=5, мужчины и женщины в возрасте 18-35 лет) или у пациентов с синдромом Вискотта-Олдрича (n= 3) в вакуумные пробирки Sarstedt-Monovette© с гирудином (525 АТО/мл крови).

В цельную кровь предварительно вводили DiOC6 (1 мкМ). Кровь перфузировали через проточные камеры над поверхностью, покрытой коллагеном (0,2 мг/мл), с пристеночной скоростью сдвига 100 с⁻¹, как описано в [3]. Рост тромбов, а также адгезию и движение лейкоцитов наблюдали в режиме DIC/эпифлуоресценции с помощью инвертированного микроскопа Nikon Eclipse Ti-E (объектив 100x/1,49 NA TIRF oil). Расположение нейтрофилов определяли на основе флуоресценции DiOC6. В качестве альтернативы использовали конфокальный режим с микроскопом Z1 (Carl Zeiss, Йена, Германия; 100-кратный объектив; Axio Observer). Для оценки флуоресценции DiOC6 в нейтрофилах использовали лазер с длиной волны 488 нм. Ранее было показано, что прикрепляющимися клетками в этой экспериментальной установке являются исключительно нейтрофилы[3].

Анализ данных

Для получения изображений на микроскопе использовалось программное обеспечение Nikon NIS-Elements, для обработки изображений - ImageJ[16] (<http://imagej.net/ImageJ>). Для ручного отслеживания псевдоподий гранулоцитов

использовался плагин ImageJ manual tracking.

Статистика

Все эксперименты проводились, по крайней мере, в трех повторах с тромбоцитами от разных доноров. Статистический анализ проводился с использованием Python 3.6; все подробности статистики приведены в подписях к рисункам.

Результаты

1. Экспериментальное измерение линейных скоростей образования псевдоподий

Чтобы измерить скорость образования псевдоподии на переднем крае, была проведена серия экспериментов, в ходе которых наблюдали движение нейтрофилов во время роста тромба в цельной гирудированной крови (без применения какого-либо внешнего хемоаттрактанта). Измерения проводились только для движущихся нейтрофилов. Линейная скорость выступа была измерена с помощью следующего алгоритма: а) была выбрана движущаяся клетка с одной отчетливой псевдоподией; б) была определена центральная линия в направлении роста псевдоподии; в) координаты растущего “выступа” вдоль этой линии были получены с помощью программного обеспечения ImageJ; г) по этим координатам были рассчитаны мгновенная и средняя скорости роста псевдоподии (рис. 1А). У здоровых доноров средняя скорость роста псевдоподии составила 0,22 ± 0,04 мкм/с, в то время как у пациентов с WAS средняя скорость роста псевдоподии составила 0,23 ± 0,08 мкм/с. Согласно критерию Манна-Уитни, разница между данными у здоровых контролей и пациентов с WAS была статистически незначимой.

2. Построение расчетной модели полимеризации актина

Для описания наблюдаемых экспериментальных данных мы построили минимальную стохастическую математическую модель реорганизации актинового цитоскелета при образовании псевдоподий. В этой модели мы описали следующие события: полимеризацию и деполимеризацию F-актина, а также разветвление растущей актиновой сети (рис. 2А). Поскольку полимеризация актина в псевдоподии происходит только в узких отдельных областях на кончиках [17], мы не учитывали взаимодействие между различными псевдоподиями, составляющими растущий выступ. В модели клеточная плазматическая мембрана “проталкивалась” растущими концами F-актина. Критическое число концов актина, необходимых для проталкивания (Nact), было выбрано в соответствии с экспериментальными данными. Вероятности полимеризации, разветвления и деполимеризации актина были рассчитаны на основе известных скоростей реакций для ферментов человека.

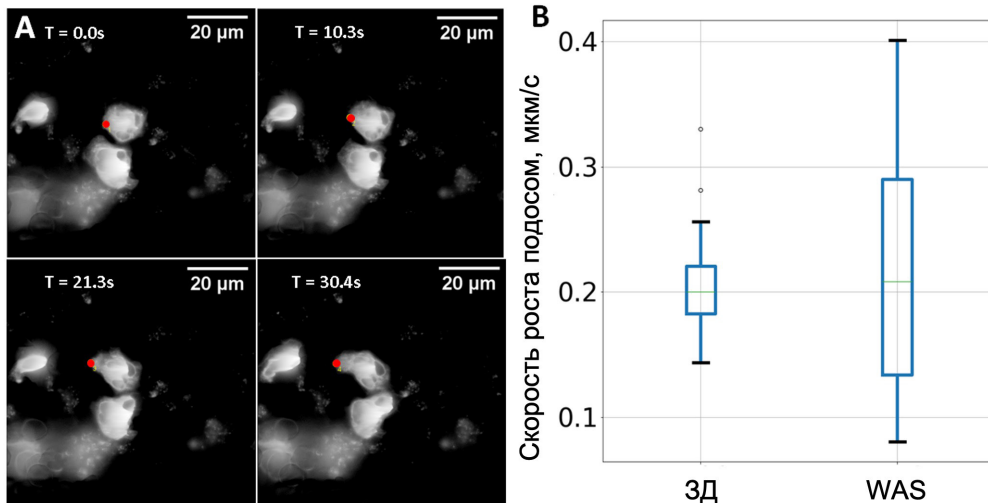


Рисунок 1. Экспериментальное измерение скорости образования псевдоподии. Типичные изображения растущей псевдоподии. Кончики псевдоподии отмечены красными кружками. (Б) Скорости образования псевдоподии у здоровых контролей и пациентов с WAS. У здоровых контролей средняя скорость роста псевдоподий составила $0,22 \pm 0,04$ мкм/с. У пациентов с WAS средняя скорость роста псевдоподий составила $0,23 \pm 0,08$ мкм/с. Разница между контролем и скоростью роста псевдоподий была незначительной.

Актин существует в двух состояниях, связанных либо с АТФ, либо с АДФ. Мономерный актин гидролизует АТФ очень медленно, а полимерный - быстро и необратимо[18]. Вновь собранная часть нити содержит в основном протомеры АТФ, в то время как более старые нити содержат в основном АДФ-протомеры[18]. Обогащенный ADP конец нити (отрицательный или заостренный) легче разбирается. Одиночные актиновые нити в устойчивом состоянии добавляют новые АТФ-субъединицы на зазубренный конец, уравновешенный диссоциацией ADP-актина на заостренном конце.

Здесь мы не принимаем во внимание диссоциацию АДФ-актина, поскольку в настоящей работе нас интересует только динамика свежесобранного актина в узкой области вблизи клеточной мембраны. Типичная длина актиновых нитей колеблется от 100 нм до нескольких микрон [19], и полимеризация актина в модели происходит только в узкой области передней кромки шириной в несколько десятков нм, поэтому заостренные концы вряд ли попадут в интересующую область.

В дальнейших уравнениях $[F]$ обозначает концентрацию F-актина, $[G]$ - обозначение G-актина, k_{on} - константа скорости полимеризации актина, k_{off} - скорость деполимеризации актина, k_b - скорость ветвления, $[Arp]$ - концентрация Arp2/3.

Следующие уравнения были использованы для определения скорости прикрепления и отсоединения G-актина, а также вероятностей разветвления актиновых нитей:

1. Следующие уравнения описывают полимеризацию актина:

Для определения скорости прикрепления мономера актина к филаменту, состоящему из N нитей $F_N + G \rightarrow F_{N+1}$, мы имеем следующее

уравнение:

$$\frac{d[F]}{dt} = k_{on}[G][F]$$

После разделения переменных получаем:

$$\frac{d[F]}{F} = k_{on}[G]dt$$

После интегрирования получаем:

$$\ln \frac{F_{N+1}}{F_N} = k_{on}[G]dt$$

где dt временной интервал.

$$\frac{F_N}{F_{N+1}} = \exp(-k_{on}[G]dt)$$

$$\frac{\Delta F}{F_{N+1}} = 1 - \frac{1}{\exp(k_{on}[G]dt)}$$

Вероятность полимеризации описывается следующим выражением:

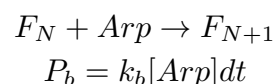
$$P_{on} = 1 - \frac{1}{\exp(k_{on}[G]dt)}$$

Таким же образом описывается возможность деполимеризации актина:

$$F_N + G \leftarrow F_{N+1}$$

$$P_{off} = 1 - \frac{1}{\exp(k_{off}dt)}$$

2. Для реакции ветвления мы используем простую аппроксимацию, чтобы получить выражение для возможности ветвления:



Причины, по которым не было выбрано простое приближение для полимеризации и деполимеризации, перечислены в SI 1.

Предполагалось, что центр полимеризации расположен на максимальном расстоянии, на котором возможна полимеризация F-актина (рис. 2Б). Как было показано, филоподии могут служить матрицей для формирования ламеллиподий[20]. Филоподии представляют собой мембранные

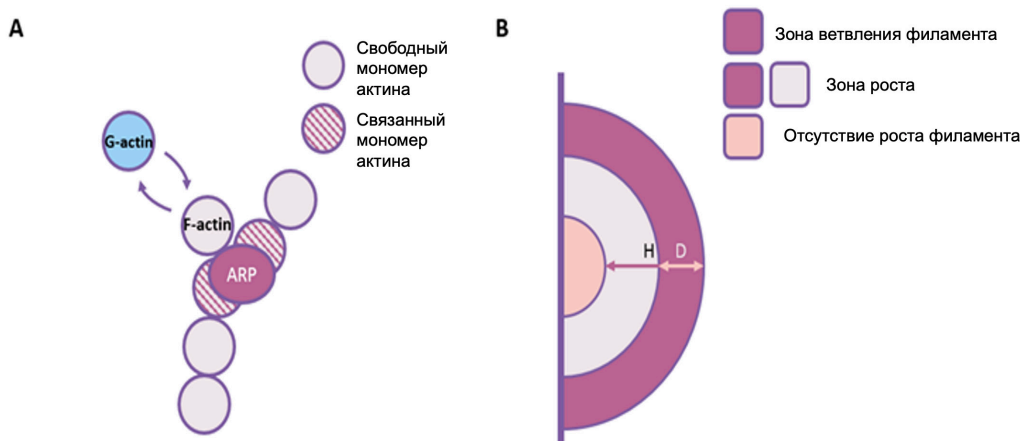


Рисунок 2. Схема модели.

выступы диаметром 60-200 нм, содержащие параллельные пучки из 10-30 актиновых нитей[21]. Первоначально на клеточной мембране образуется подмножество из 10 нитей F-актина, состоящих из 2 субъединиц. Начальный диаметр равен 100 нм.

На каждом временном шаге для каждой ветви F-актина генерируется случайное число g_i из $U(0,1)$. Если g_i меньше, чем вероятность роста ветви F-актина (P_{on}), к ветви добавляется один мономер G-актина. Таким же образом были смоделированы деполимеризация и разветвление каждой ветви.

В некоторых случаях рост ветвей может быть затруднен из-за их давления на клеточную мембрану. В этой модели допускается перекрытие ветвей из-за трехмерности реальных ламеллиподий и низкой плотности (<7% по объему) актиновой сетки в ламеллиподиях, что приводит к редким перекрытиям [22]. Вариант модели с ограниченным перекрытием описан на S2 и рис. S1. Выводы, сделанные из этого варианта, существенно не отличаются от модели с разрешенным перекрытием ветвей.

Чтобы описать ускорение полимеризации актина фосфоинозидами[23], мы предполагаем,

что полимеризация актина происходит только в том случае, если кончик ответвления находится не дальше, чем на фиксированном расстоянии H от клеточной мембраны (рис. 2Б). Аналогичным образом, принимая во внимание тот факт, что активаторами комплекса Arp2/3, которые делают Arp2/3 способным катализировать нуклеацию актиновых филаментов, обычно являются мембраноассоциированные белки[24], филаменты могут ветвиться, только если расстояние от клеточной мембраны меньше D . Число толкающих ветвей клеточной мембраны, N_{act} , было установлено равным 241/мкм [20]. Предполагалось, что при достижении порогового числа нитей, прилегающих к мембране, вся мембрана начнет двигаться.

Значения параметров приведены в таблице 1.

Ветвление нитей было смоделировано следующим образом. Принимая во внимание, что комплекс Arp2/3 способен связываться с четырьмя мономерами актина, соответствующими паре гранул на F-актине, мы предположили, что новая ветвь может образовываться из пары сегментов. В модели каждый сегмент может находиться либо в “свободном”, либо в “занятом” состоянии растущей дочерней ветви (рис. 2А). Кроме того,

Параметр	Значение	Ссылка	Комментарий
k_{on}	$7.4 (s \times \mu M)^{-1}$	[25]	Скорость связывания актина
k_{off}	$0.89 s^{-1}$	[25]	Скорость деполимеризации актина
$[Arp]$	$1.0 \mu M$	[26]	Концентрация Arp 2/3
N	5	Определено по [27]	Начальное число филаментов
N_{act}	$241/\mu M$	[28]	Минимальная плотность «толкающего» филамента

Таблица 1.

нить может расти только в том случае, если абсолютное значение угла между направлением нормали к клеточной мембране и новой ветвью превышает 70° . Другими словами, ветви должны расти вперед.

3. Оценка и валидация параметров вычислительной модели.

Построенная вычислительная модель описывала формирование сети актина (рис. 3А). На первом этапе мы убедились, что скорость роста отдельной нити соответствует литературным данным [29]. В модели скорость роста отдельных нитей составляла 8 субъединиц в секунду при концентрации G-актина 1 мкМ (данные не показаны), что соответствует заявленной скорости 1 мкм/мин. После этого было выполнено варьирование параметров, чтобы получить значения параметров k , D и H , которые позволили бы получить скорость выпячивания, наиболее близкую к экспериментальным. Наилучшее соответствие было получено для набора значений параметров:

$$k = 9000 \text{ (M} \times \text{s)}^{-1}, D = H = 7.$$

В модели скорость протрузии была оценена как 0,23 мкм/с. Вдоль переднего края плотность актиновых нитей достигает максимума в центре и уменьшается по направлению к краям, что согласуется с экспериментальными данными, полученными в работе [30]. Плотность актиновых филаментов, равная 1300 мкм

F-актина/мкм³, также хорошо соответствовала экспериментальным данным [28].

4. Адаптация вычислительной модели к данным о пациентах с синдромом Вискотта-Олдрича

Чтобы учесть влияние мутаций, приводящих к потере функции WASP, мы снизили скорость ветвления модели на один порядок и предположили, что если локализация WASP нарушена, ветвление актина и полимеризация могут происходить дальше от мембраны. В модели скорость роста протрузии не показала какой-либо существенной зависимости ни от скорости разветвления k , ни от расстояния разветвления от мембраны H в большом интервале значений параметра. При $H > 6$ скорость протрузии изменилась не более чем на 15%. При $k > 3000 \text{ (M} \times \text{s)}^{-1}$ скорость протрузии изменилась не более чем на 20%. Однако была обнаружена сильная зависимость скорости роста ламеллиподий от числа актиновых нитей, необходимых для толкания мембраны, N_{act} (рисунок 3D). Когда N_{act} был изменен с 241 до 482 мкм/с, рост ламеллиподий прекратился.

Обсуждение

В данной работе мы изучили динамику роста выступа клеточной мембраны при подвижности нейтрофилов. Мы провели экспериментальные измерения скорости роста выступа клеточной мембраны у здоровых доноров. Полученная скорость хорошо согласуется с существующими

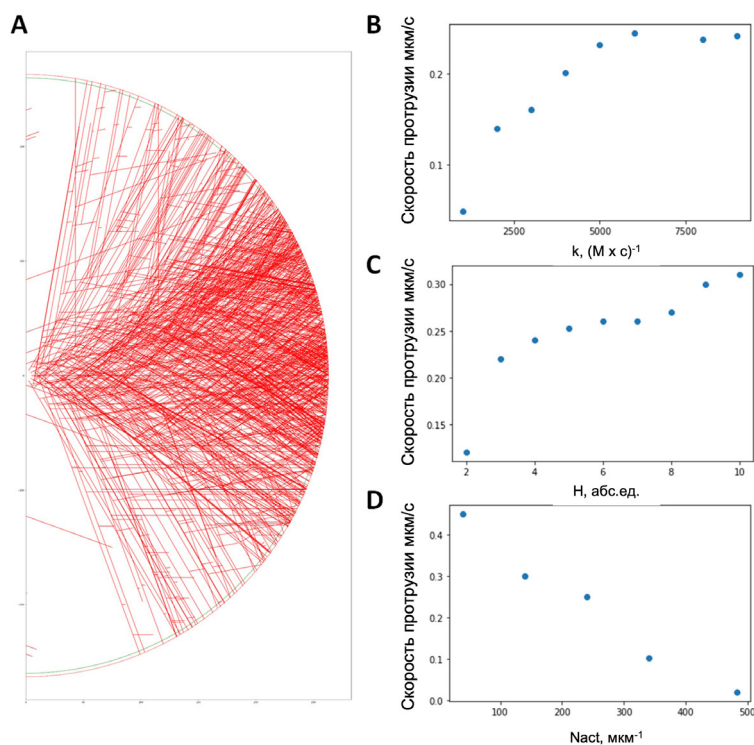


Рисунок 3. Результаты компьютерного моделирования. (А) Типичная актиновая сеть, предсказанная моделью для параметров $k = 9000 \text{ (M} \times \text{s)}^{-1}$, $D = H = 7$ актиновых единиц. (В) Зависимость скорости роста псевдоподии от скорости ветвления k . (С) Зависимость скорости роста псевдоподии от расстояния от разветвления до мембраны H .

данными о хемотаксических клетках, таких как макрофаги [31] или дендритные клетки [27]. Кроме того, мы измерили линейную скорость образования псевдоподий у нейтрофилов пациентов с WAS (рис. 1). Удивительно, но разница между здоровыми донорами и пациентами не была существенной.

Чтобы объяснить наблюдаемые явления, мы построили минимальную вычислительную модель, способную количественно описать образование выпячивания мембраны нейтрофилов (псевдоподий). Модель была схожа по конструкции с математическими моделями Чена [10] и Винклера [32], которые построили модели формирования ламеллиподий в неуточненной мигрирующей клетке. Молекулярный механизм, включенный в модель, был основан на известных данных о регуляции образования псевдоподий нейтрофилов [33, 34, 35]. Соответствие скорости выпячивания мембраны, предсказанной моделью, экспериментальным данным указывает на достоверность предполагаемых механизмов.

Хотя ранее мы [3] и другие команды [36] наблюдали нарушение движения нейтрофилов у пациентов с WAS, скорость роста псевдоподий у них была аналогична скорости у здоровых доноров. Выполненное здесь варьирование параметров показало, что изменение скорости ветвления или расстояния до мембраны, необходимого для ветвления, не привело к существенному изменению общей скорости псевдоподии. В совокупности эти данные указывают на то, что нарушение хемотаксиса у пациентов с WAS не может быть объяснено отсутствием WASP у этих пациентов, что в целом соответствует существующим данным [37].

Однако сильная зависимость роста ламеллиподий от количества пучков актина, необходимых для проталкивания мембраны, позволяет предположить нарушение формирования псевдоподий как один из возможных механизмов снижения подвижности клеток у пациентов с мутациями в белках, обеспечивающих движение, например, MYH9 [38].

Благодарности

Авторы выражают благодарность Дарье Морозовой (ЦТП ПХФ РАН) за ценные обсуждения и экспериментальную помощь.

Финансирование

Это исследование было поддержано Российским фондом фундаментальных исследований, гранты № 17-00-00138 и 21-51-10005 и школой цифровой медицины МГУ им. М.В. Ломоносова.

Список литературы

1. Pühr-Westerheide, D. et al. Neutrophils promote venular thrombosis by shaping the rheological environment for platelet aggregation. *Sci. Rep.* 9, 15932 (2019).
2. Szatmary, A. C., Nossal, R., Parent, C. A. & Majumdar, R. Modeling neutrophil migration in dynamic chemoattractant gradients: assessing the role of exosomes during signal relay. *Mol. Biol. Cell* 28, 3457–3470 (2017).
3. Daria S. Morozova, Alexey A. Martyanov, Sergei I. Obydennyi, Julia-Jessica D. Korobkin, Alexey V. Sokolov, Ekaterina V. Shamova, Irina V. Gorudko, Anna Shcherbina, Mikhail A. Panteleev, A. N. S. Ex vivo observation of granulocyte activity during thrombus formation. *bioRxiv* 2020.07.13.199174 (2020).
4. Pollard, T. D. & Borisy, G. G. Cellular Motility Driven by Assembly and Disassembly of Actin Filaments. *Cell* 112, 453–465 (2003).
5. Ridley, A. J. Life at the Leading Edge. *Cell* 145, 1012–1022 (2011).
6. Insall, R. H. & Machesky, L. M. Actin Dynamics at the Leading Edge: From Simple Machinery to Complex Networks. *Dev. Cell* 17, 310–322 (2009).
7. Paul, A. S. & Pollard, T. D. Review of the mechanism of processive actin filament elongation by formins. *Cell Motil. Cytoskeleton* 66, 606–617 (2009).
8. Goode, B. L. & Eck, M. J. Mechanism and Function of Formins in the Control of Actin Assembly. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 593–627 (2007).
9. Zicha et al. Chemotaxis of macrophages is abolished in the Wiskott-Aldrich syndrome. *Br. J. Haematol.* 101, 659–665 (1998).
10. Chen, X. et al. Predictive assembling model reveals the self-adaptive elastic properties of lamellipodial actin networks for cell migration. *Commun. Biol.* 3, 616 (2020).
11. Erban, R., Flegg, M. B. & Papoian, G. A. Multiscale Stochastic Reaction–Diffusion Modeling: Application to Actin Dynamics in Filopodia. *Bull. Math. Biol.* 76, 799–818 (2014).
12. Bonilla-Quintana, M., Wörgötter, F., Tetzlaff, C. & Fauth, M. Modeling the Shape of Synaptic Spines by Their Actin Dynamics. *Front. Synaptic Neurosci.* 12, (2020).
13. Marée, A. F. M., Jilkine, A., Dawes, A., Grieneisen, V. A. & Edelstein-Keshet, L. Polarization and Movement of Keratocytes: A Multiscale Modelling Approach. *Bull. Math. Biol.* 68, 1169–1211 (2006).
14. Fritz-Laylin, L. K. et al. Actin-based protrusions of migrating neutrophils are intrinsically lamellar and facilitate direction changes. *Elife* 6, (2017).
15. Nechipurenko, D. Y. et al. Clot Contraction Drives the Translocation of Procoagulant Platelets to Thrombus Surface. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 39, 37–47 (2019).
16. Schindelin, J. et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9, 676–682 (2012).
17. Weiner, O. D. et al. Spatial control of actin

- polymerization during neutrophil chemotaxis. *Nat. Cell Biol.* 1, 75–81 (1999).
18. Johnson, H. E. et al. F-actin bundles direct the initiation and orientation of lamellipodia through adhesion-based signaling. *J. Cell Biol.* 208, 443–455 (2015).
 19. Mattila, P. K. & Lappalainen, P. Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 446–454 (2008).
 20. Wu, C.-Y. et al. The role of phosphoinositide-regulated actin reorganization in chemotaxis and cell migration. *Br. J. Pharmacol.* 171, 5541–5554 (2014).
 21. Suetsugu, S. Activation of nucleation promoting factors for directional actin filament elongation: Allosteric regulation and multimerization on the membrane. *Semin. Cell Dev. Biol.* 24, 267–271 (2013).
 22. Kuhn, J. R. & Pollard, T. D. Real-Time Measurements of Actin Filament Polymerization by Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy. *Biophys. J.* 88, 1387–1402 (2005).
 23. Mullins, R. D., Heuser, J. A. & Pollard, T. D. The interaction of Arp2/3 complex with actin: Nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 6181–6186 (1998).
 24. Joosten, B., Willemse, M., Fransen, J., Cambi, A. & van den Dries, K. Super-Resolution Correlative Light and Electron Microscopy (SR-CLEM) Reveals Novel Ultrastructural Insights Into Dendritic Cell Podosomes. *Front. Immunol.* 9, (2018).
 25. Abraham, V. C., Krishnamurthi, V., Taylor, D. L. & Lanni, F. The Actin-Based Nanomachine at the Leading Edge of Migrating Cells. *Biophys. J.* 77, 1721–1732 (1999).
 26. Crevenna, A. H. et al. Electrostatics Control Actin Filament Nucleation and Elongation Kinetics. *J. Biol. Chem.* 288, 12102–12113 (2013).
 27. Ofer, N., Mogilner, A. & Keren, K. Actin disassembly clock determines shape and speed of lamellipodial fragments. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 20394–20399 (2011).
 28. Kapellos, T. S. et al. A novel real time imaging platform to quantify macrophage phagocytosis. *Biochem. Pharmacol.* 116, 107–119 (2016).
 29. Schmeiser, C. & Winkler, C. The flatness of Lamellipodia explained by the interaction between actin dynamics and membrane deformation. *J. Theor. Biol.* 380, 144–155 (2015).
 30. Mócsai, A., Walzog, B. & Lowell, C. A. Intracellular signalling during neutrophil recruitment. *Cardiovasc. Res.* 107, 373–385 (2015).
 31. Wong, K., Pertz, O., Hahn, K. & Bourne, H. Neutrophil polarization: Spatiotemporal dynamics of RhoA activity support a self-organizing mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 3639–3644 (2006).
 32. Ku, C.-J., Wang, Y., Weiner, O. D., Altschuler, S. J. & Wu, L. F. Network Crosstalk Dynamically Changes during Neutrophil Polarization. *Cell* 149, 1073–1083 (2012).
 33. Ochs, H. et al. The Wiskott-Aldrich syndrome: studies of lymphocytes, granulocytes, and platelets. *Blood* 55, 243–252 (1980).
 34. Blundell, M. P., Worth, A., Bouma, G. & Thrasher, A. J. The Wiskott-Aldrich syndrome: The actin cytoskeleton and immune cell function. *Dis. Markers* 29, 157–75 (2010).
 35. Zehrer, A. et al. A Fundamental Role of Myh9 for Neutrophil Migration in Innate Immunity. *J. Immunol.* 201, 1748–1764 (2018).