

PhD értekezés

# A DAAM formin hatása az aktin dinamikájára

**Barkó Szilvia**



Témavezető: Dr. Nyitrai Miklós

Pécsi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Biofizikai Intézet

Pécs

2012

Interdiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola D93

Iskolavezető: Dr. Sümegi Balázs

Program: B-130: Funkcionális fehérjedinamika vizsgálata biofizikai módszerekkel

Programvezető: Dr. Nyitrai Miklós

Témavezető: Dr. Nyitrai Miklós

## *Köszönetnyilvánítás*

*Szeretettel mondok köszönetet mindazoknak, akik segítettek abban, hogy a kutatói pályára lépjek.*

*Mindenekelőtt családomnak, szüleimnek támogatásukért és biztatásukért. Mellettük Veress Erzsébet tanárnőnek, hogy megszerettette velem a matematikát, és a reál tudományágak irányába terelt.*

*Köszönetet mondok Professzor Dr. Nyitrai Miklósnak, aki helyet biztosított nekem a Biofizikai Intézetben, és akinek mind szakmailag, mind emberileg nagyon sokat köszönhetek.*

*Hálás szívvel köszönöm Huber Tamásnak megértését és türelmét, amellyel minden nap támogat céljaim elérésében.*

*Mellettük köszönettel tartozom a Biofizikai Intézet valamennyi munkatársának, akikkel az évek során együtt dolgozhattam. Különösen nagy hálával tartozom Papp Gábornak, Ujfalusi Zoltánnak és Brunner Jánosné Ilikének, akiktől már a kezdetektől fogva rengeteget tanultam.*

# TARTALOMJEGYZÉK

---

---

I. Irodalmi áttekintés .....	7
I.1. Az aktin .....	7
I.2. A profilinek .....	11
I.3. A forminok .....	12
I.3.1. A forminok történeti háttere .....	12
I.3.2. A formin családok és szerkezetük .....	12
I.3.3. A formin homológia domének hatása az aktin dinamikájára .....	17
I.3.4. A DAAM formin család .....	22
II. Célkitűzések és kérdések .....	24
III. Anyagok és módszerek .....	26
III.1. A kísérletekhez használt fehérjék előállítása .....	26
III.1.1. Az aktin preparálása .....	26
III.1.2. A formin fragmentumok és a profilin előállítása .....	27
III.2. Kísérleti módszerek .....	29
III.2.1. Az aktin polimerizációjának vizsgálata .....	29
III.2.2. Az aktin depolimerizációjának vizsgálata .....	30
III.2.3. Kritikus koncentráció mérése .....	31
III.2.4. A formin fragmentumok aktinhoz való kötődésének vizsgálata .....	32
III.2.5. Mikroszkópos megfigyelések .....	33

IV. Eredmények .....	35
IV.1. A DAAM FH2 doménje hatással van az aktin polimerizációjára .....	35
IV.2. Az FH1 domén jelenléte önmagában nem befolyásolja a DAAM FH2 által a polimerizációra kifejtett hatást .....	37
IV.3. A DAAM FH2 és FH1FH2 konstrukciók gátolják az aktin depolimerizációját .....	39
IV.4. Az alkalmazott DAAM konstrukcióknak nincsen jelentős hatásuk az aktin kritikus koncentrációjára .....	41
IV.5. A DAAM fragmentumok aktin filamentumhoz való affinitása mikromoláris nagyságrendű .....	46
IV.6. A DAAM FH2 és FH1FH2 fragmentumok hatása az aktin filamentumok kötegelődésére és hosszeloszlására.....	48
IV.6.1. A DAAM FH2 és FH1FH2 fragmentumok aktin kötegeket képeznek.....	48
IV.6.2. A DAAM fragmentumok rövid aktin filamentumokat képeznek .....	53
IV.6.3. Az DAAM FH1FH2 konstrukció hatással van az aktin filamentumok vég-vég kapcsolódására.....	56
IV.7: A DAAM FH1FH2 konstrukció profilinnel való kölcsönhatásáért az FH1 domén felelős .....	58
IV.7.1: A profilin a DAAM FH1 doménjével kölcsönhatva képes a polimerizáció gyorsítására.....	58
IV.7.2: A DAAM fragmentumok lecsökkentik a monomerek disszociációját a filamentumról profilin jelenlétében is .....	60
IV.7.3: A DAAM FH1 doménje kölcsönhat profilinnel a kritikus aktin koncentráció fenntartásában .....	61
V. Eredmények összefoglalása .....	62
VI. Továbbvezető gondolatok.....	64

VII. Irodalomjegyzék .....	67
VIII. Ábrák és táblázatok jegyzéke .....	76
VIII.1. Ábrák jegyzéke .....	76
VIII.2. Táblázatok jegyzéke .....	78
IX. Rövidítések jegyzéke .....	79
X.Függelék .....	80
A kísérletek során alkalmazott formin-konstrukciók szekvenciája .....	80
XI. Publikációk listája.....	81

# I. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

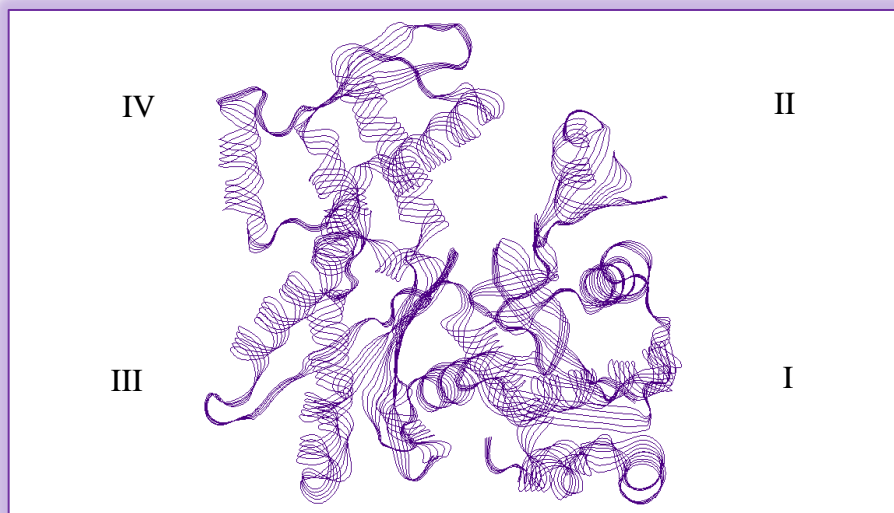
---

## I.1. AZ AKTIN

---

Az aktin az eukarióta sejtek egyik fő sejtvázas alkotó fehérjéje [1, 2]. Főként a citoplazmában lokalizálódik, de a sejtmagban is megtalálható [3-5]. Legmagasabb koncentrációban a harántcsíkolt izomszövetben van jelen, itt az alfa-izofорма fordul elő a legnagyobb arányban [6].

A sejtben két megjelenési típusa ismert: a monomer forma a globuláris, más néven G-aktin, [7] a másik a polimer, filamentális forma, amit F-aktinnak neveznek [8]. A monomer szerkezete az *1. ábrán* látható. Egy monomer négy alegységre osztható, melyek egy központi nukleotid-kötő árkot fognak körül. A kötött nukleotid ATP, ADP-P<sub>i</sub> vagy ADP lehet [9, 10]. A kötött nukleotid hatással van a monomer konformációjára [11], ahogyan ez más fehérjék esetében is megfigyelhető [12, 13].



*1. ábra. A monomer aktin szerkezete. A római számok az alegységeket jelentik. (PDB kód: 3HBT; Jmol programmal szerkesztve: <http://jmol.sourceforge.net/>)*

A monomer formából aktin filamentummá való átalakulás folyamata a polimerizáció, az ezzel ellentétes pedig a depolimerizáció. A polimerizáció bekövetkezése szempontjából alapvető sebesség-meghatározó lépés az aktin monomerek nukleációja. A folyamatban a monomerek először dimereket, majd trimereket képeznek. Ezek, az összefoglaló néven „nukleusz”-oknak nevezett formák meglehetősen instabilak, könnyen újra monomerekké eshetnek szét. Képződésük a többi polimerizációs lépéshez képest lassú, emiatt ez a lépés meghatározza a polimerizáció sebességét.

A nukleáció szempontjából fontos paraméter az aktin kritikus koncentrációja. Ez az aktin monomereknek azt a koncentráció-értékét jelöli, amely fölött spontán lejátszódik a nukleáció, illetve a polimerizáció folyamata. A különböző aktin-kötő fehérjéknek hatásuk lehet erre a koncentráció értékre.

Mai ismereteink szerint a nukleáció elősegítésére három lehetőség van [14]:

1. Olyan szerkezetű nukleációs faktor révén, amelynek szerkezete az aktin nukleuszhoz hasonló (egy kialakult aktin nukleusz „mimikálása” révén).
2. Több aktin monomer megkötésével, amelyekből a nukleációs faktor alakítja ki a nukleuszt.
3. A spontán kialakuló nukleuszok stabilizációja által.

Eddigi ismereteink szerint eukarióta sejtekben az aktin nukleációját három fehérjecsald végzi, melyek mindegyike megfeleltethető egy-egy nukleációs típusnak.

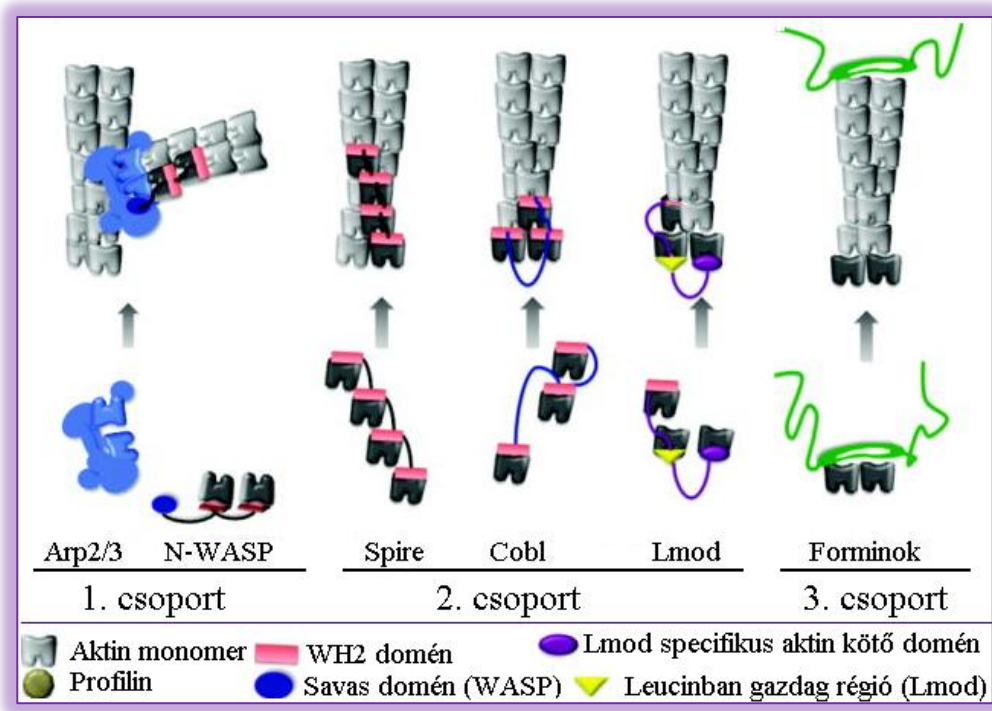
Az elsőként felfedezett aktin nukleációs faktorok az Arp 2/3 típusú fehérjék voltak, amelyek a nukleációt elősegítő fehérjékkel (NPFs: Nucleation Promoting Factors) kölcsönhatva a nukleusz mimikálásával segítik elő a nukleációt. Jellemző módon rövid, elágazásokat is tartalmazó filamentumokat hoznak létre azáltal, hogy a már kialakult aktin filamentumon hoznak létre oldalágakat [15, 16].

A második csoportba tartoznak az úgynevezett WH2-domén tartalmú fehérjék, melyek az előbb említett nukleációt elősegítő fehérjékkel állnak rokonságban. A Spire, Cordon-bleu (Cobl), és Leiomodin (Lmod) családok tartoznak ide, valamint számos bakteriális nukleátor fehérje [17-22]. Az ezek által nukleált aktin filamentumokon nem figyelhető meg elágazódás.



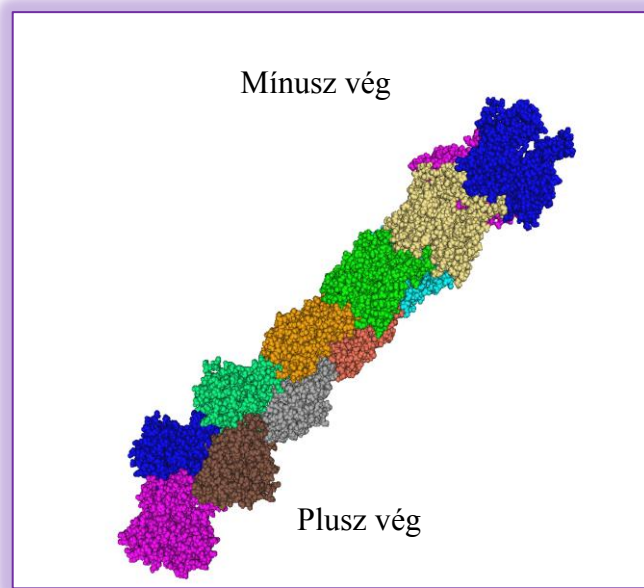
A harmadik nagy aktin nukleációs csoportot képviseli a forminok családja, mely típus szintén elágazódás-mentes filamentumok felépülését segíti elő: kontraktilis gyűrűk, aktin-kötegek épülnek fel a közreműködésükkel [23-25].

Az említett három nukleációs faktor működése látható vázlatosan a 2. ábrán.



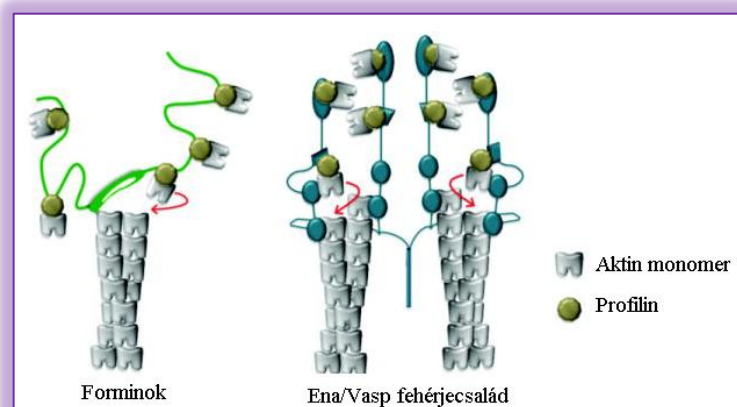
2. ábra. Az aktin nukleációjában szerepet játszó fehérje családok [14].

A polimerizáció következő lépése az elongáció folyamata. Ennek során a már kialakult nukleációs magokból épül fel az aktin filamentum. Ez a monomerek filamentumba való beépülését jelenti. Az egyensúlyi aktin filamentumhossz elérése után is lezajlik a protomerek beépülése és leválása a filamentumok mindkét végén, az úgynevezett taposómalom mechanizmusnak megfelelően. E szerint az aktin monomerek beépülése és leválása a filamentum mindkét végén, de eltérő mértékben megtörténhet. Ennek az az oka, hogy az aktin filamentum polaritással rendelkező szerkezet, az egyik vég egy gyorsan növekvő plusz vég („barbed end”), a másik egy lassabban növekvő, mínusz vég („pointed end”). Ennek a szerkezet, Cn3D programmal szerkesztve (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/CN3D/cn3d.shtml>) látható a 3. ábrán.



3. ábra. A filamentális aktin szerkezete, a polaritás feltüntetésével. A különböző színekből álló részek az egyes monomereket jelölik. (PDB kód:3G37)

Azok a fehérjék, amelyek az elongáció sebességét befolyásolják, az aktin elongációs faktorok. Mostani ismeretek szerint az Ena/Vasp fehérjék és a forminok tartoznak ide. Tehát a forminoknak a nukleációban és az elongációban is jelentős szerepük van. Ahogy az a 4. ábrán látható, az elongáció gyorsításában mindkét típus esetén szerepet játszik a profilin fehérjecsald [25]. Ennek a csoportnak legfontosabb tulajdonságait a következő fejezetben tárgyaljuk.



4. ábra. A forminok és az Ena/Vasp fehérjecsald befolyásolják az aktin filamentumok elongációját [11].

---

## I.2. A PROFILINEK

---

Az aktin a sejtben szinte kizárólagosan valamilyen kötőfehérjéhez kapcsolódva található meg, igen nagy részben profilinok tartják monomer formában. 1976-ban, borjú lépből történő aktin preparálás közben fedezte fel Carlsson ezt a 12-15 kDa-os fehérjét, mely az aktin monomerekkel stabil, 1:1 arányú komplexet képezett [26]. Még ugyanebben az évben Tilney használta a „profilamentous actin” elnevezést annak a nagy mennyiségű, nem polimerizált aktinnak a leírására, amely ismeretlen komplex formájában a preparátumában maradt [27]. A ma használatos profilin elnevezés is innen ered.

A profilin minden eukarióta szervezetben megtalálható, sőt, még egyes vírusokban is kimutatták a fehérjét kódoló gént [28]. Intracelluláris koncentrációja 4  $\mu\text{M}$ -tól (sertés simaizom) 100  $\mu\text{M}$ -ig terjedhet (amóba) [29]. Érdekes, hogy míg a gerincesek törzsében és egyes gerinctelen törzsekben előforduló profilin-homológok egymással összehasonlítva meglehetősen eltérő szekvenciával rendelkeznek, addig az általuk felvett háromdimenziós szerkezet és funkció igen konzervatív [30, 31]. Mindemellet csaknem minden profilin megegyezik abban, hogy képesek globuláris aktint, foszfoinozitolokat, és prolinban gazdag szekvenciákat kötni [32-34]. Általános tulajdonságuk még, hogy az aktinon a nukleotid kicserélődést elősegítik [35], és az aktin monomereket szekvesztrálhatják [36]. A profilin-aktin komplexből az aktin beépülése a filamentum plusz végén lehetséges [37].

A gerincesek esetében két profilin izoformáról tudunk: az egyik bázikus (profilin I), a másik savas (profilin II). Ezek az aktint kötő régiójukban mindösszesen öt aminosavban különböznek [38]. A különböző profilin izoformák prolinban gazdag fehérjékhez más-más affinitással kötődnek. A profilin II-ben a 29-es tirozin egy extra kölcsönhatást (hidrogén hidat) képezhet a prolinban gazdag fehérje-részlettel, míg a másik izoformában ezen a helyen szereplő szerin nem képes erre. Mindez, az aminosavak együttes töltésének különbözőségével, magyarázatként szolgálhat az eltérő affinitásra [38]. A forminok legtöbb típusa rendelkezik prolinban gazdag részt tartalmazó doménnal, úgynevezett FH1-gyel. A prolinok száma meghatározó fontossággal bír a kötés erőssége szempontjából [39].

## I.3. A FORMINOK

---

### I.3.1. A FORMINOK TÖRTÉNETI HÁTTERE

---

A forminokkal kapcsolatos első leírás egy egerekben felfedezett *ld* („limb deformity”) mutációhoz kapcsolódik. A kezdeti általános megfigyelések szerint ezek a recesszív mutációk gátolják az epitheliális-mezenchimális átalakulást és a metanefrikus (embrionális) vese kialakulását.

Az első két allélt még a hatvanas években leírták, de a megfelelő gént Woychik és munkatársai csak 1985-ben azonosították először egerekben [40]. Megfigyeléseik szerint transzgenikus egerek inszerciós mutagenézise során az *fmn* (formin) génben történő mutáció okozza a végtag-deformitást [40]. Később ugyanez a munkacsoport jellemezte a gént molekuláris szinten, és a „formin” nevet is ők adták a génről átíródó fehérjéknek [41].

### I.3.2. A FORMIN CSALÁDOK ÉS SZERKEZETŰK

---

A forminoknak öt különböző allélje ismert, melyek megközelítőleg 400 bázispárnyi területen foglalnak helyet a kettős kromoszómán, mintegy 24 exon által kódolva. Csaknem minden eukarióta formin fehérje tartalmaz egy FH1 (formin-homológia 1) domént [42], amely prolinban gazdag összetételű és a forminoknak a profilinhez, illetve SH3-domént tartalmazó fehérjékhez való kötődésében van szerepe. Ezen kívül minden formin szerkezetében található egy FH2 domén, amely az aktinhez való kötésért felel [43]. A forminok szerkezetében ez utóbbi domén a leginkább konzervatív, és a különböző formin-családokban legszélesebb körben vizsgált és karakterizált rész.

A forminok csoportosításával kapcsolatban már több elképzelés is napvilágot látott [42, 44, 45]. Az FH2 domén homológiája alapján az emlős forminokat hét csoportba sorolhatjuk, ezt mutatja az 5. ábra. Ezen az ábrán a szövetes (metazoan) illetve nem szövetes (non-metazoan) élőlények legjellemzőbb formin-típusai láthatóak.

Az emlősökben előforduló formin-típusok a következők: (a formin neve előtt szereplő *m* betű utal az eredetre: *mouse*, illetve *mammalian*):

***Dia*** → Diaphanous forminok (mDia1, mDia2 és mDia3)

***FRL*** → „formin related gene in leukocytes” (mFRL1 mFRL2, és mFRL3)

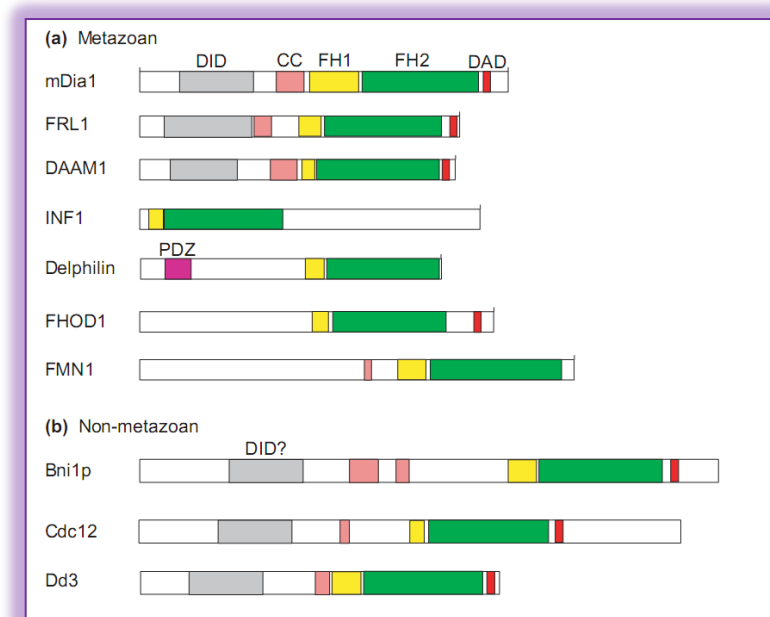
***DAAM*** → „dishevelled-associated activator of morphogenesis” (mDAAM1 és mDAAM2)

***INF*** → „inverted formin” (mINF1 és mINF2)

***Delphinin*** → (mDelphinin)

***FHOD*** → „formin homology domain-containing protein” (mFHOD1 és mFHOD2)

***FMN*** → forminok (azok az elsőként leírt forminok tartoznak ide, amelyek hiánya (illetve a kódoló gének hibája) végtag deformitást okoz)



5. ábra. Az egyes formin családok doménszerkezete [46].

Ezek közül három, a Dia, a DAAM és az FRL csoportok mutatnak hasonlóságot az FH2 doménon kívül is. Ezeket összefoglaló néven "*diaphanous-related*" forminoknak (*DRF*) nevezik [46, 47]. Ezek a jelenleg legintenzívebben tanulmányozott forminok. Szerkezeti felépítésükre általánosan jellemző egy konzervatív domén szerkezet, amelynek tagjai az N-től a C-terminálisig haladva az 1. táblázatban vannak felsorolva [46, 48].

1. táblázat. A forminok családjának jellemző doménjei.

<i>Domén rövidítése</i>	<i>Domén neve</i>
<i>GBD</i>	<u>G</u> TPase <u>B</u> inding <u>D</u> omain
<i>DID</i>	<u>D</u> iaphanous <u>I</u> nhibitory <u>D</u> omain
<i>DD</i>	<u>D</u> imerization <u>D</u> omain
<i>CC</i>	<u>C</u> oiled- <u>c</u> oil segment
<i>FH1</i>	<u>F</u> ormin <u>H</u> omology Domain <u>1</u>
<i>FH2</i>	<u>F</u> ormin <u>H</u> omology Domain <u>2</u>
<i>FH3</i>	<u>F</u> ormin <u>H</u> omology Domain <u>3</u>
<i>DAD</i>	<u>D</u> iaphanous <u>A</u> utoregulatory <u>D</u> omain

A DRF fehérjék funkcionálisan két részre oszthatóak:

A ***C-terminális részükön*** található az aktin nukleációjában és elongációjában szerepet játszó rész, amely három szerkezeti és funkcionális elemet tartalmaz:

-*FH1 domén*: a profilinek megkötésében van szerepe;

-*FH2 domén*: a funkcionálisan aktin-kötő rész;

-*FH3 domén*: a formin sejten belüli lokalizációjában lehet szerepe [49];

-*DAD*: nagyon rövid, mindössze 17 aminosavból álló szakasz, amelynek a formin inaktív állapotban tartásában van alapvető jelentősége.

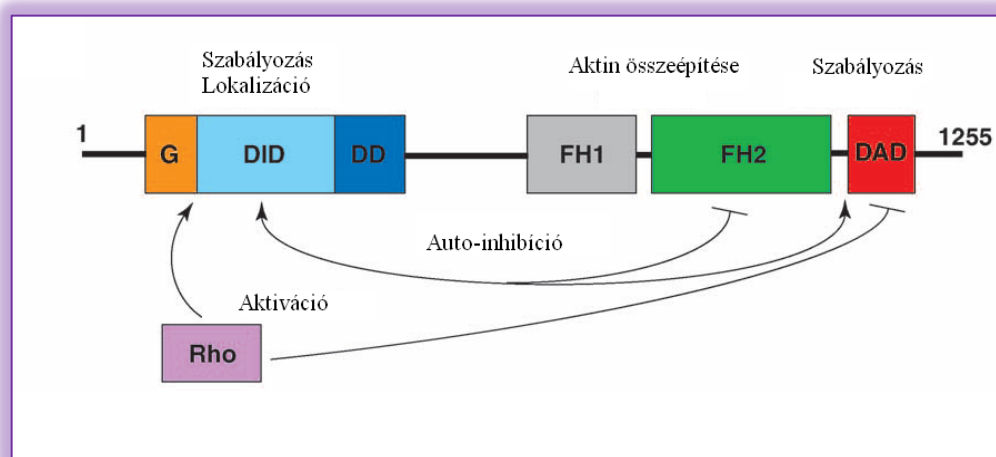
Az *N-terminális felőli oldalon* szabályozó elemek találhatóak, melyeknek a DAD doménhoz való kapcsolódásban, és ez által a formin autoinhibíciós állapotának fenntartásában, illetve annak szabályozásában van szerepük.

-*GBD*: ez köti a Rho GTP-ázokat a GTP-kötő állapotban;

-*DID*: ehhez kapcsolódik a C terminális DAD szegmense, illetve szintén köt Rho GTP-ázokat is;

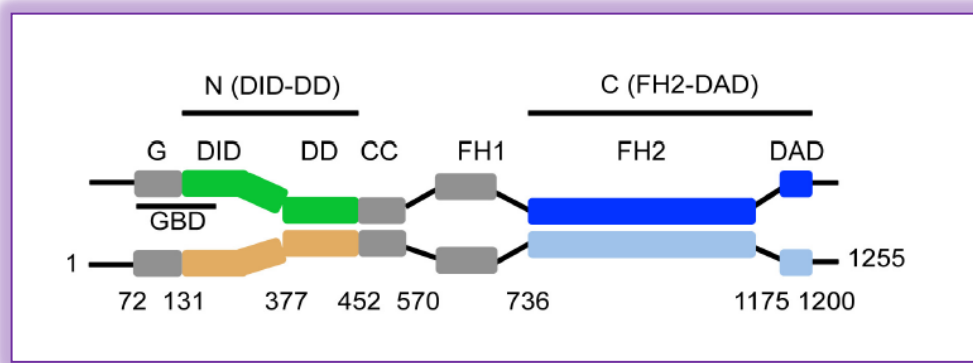
-*DD* és *CC*: ezek szabályozzák az N-terminális régiók dimerizációját [50], ezen kívül a *CC* szegmensnek szerepe lehet a sejten belüli lokalizációban is, mivel képes kölcsönhatni más specifikus kötőfehérjékkel is [51-53].

A DRF fehérjék valószínűsíthető szabályozó fehérjéi a Rho-család GTP-ázai, ahogyan az a 6. ábrán látható [54-56].



6. ábra. A DRF-ek autoregulációja [57].

A DRF csoport esetében alapvetően kétféle konformációról beszélhetünk. Az inaktív állapotban egyfajta autoinhibíció révén a formin „önmagába záródik”, ezáltal nem látja el a funkcióját. Megfelelő aktiváló molekula kapcsolódása révén azonban felvesz egy nyitott konformációt, amelyben dimerizálódni képes egy másik forminnal. Ennek egy lehetséges módját mutatja a 7. ábra, az mDia1 formin esetében.



7. ábra. A DRF család dimerizációjának lehetséges mechanizmusa, az mDia1 formin példáján bemutatva [57].



---

### I.3.3. A FORMIN HOMOLÓGIA DOMÉNEK HATÁSA AZ AKTIN DINAMIKÁJÁRA

---

A forminok meglehetősen konzervatív szerkezettel rendelkeznek és széles körben megtalálhatóak az élővilágban [46]. Egyik csoportjukat képviselik az ún. Diaphanous (Dia) forminok, ezek kapcsán fedezte fel Castrillon és Wassermann a formin homológia doméneket [57].

---

#### I.3.3/A: AZ FH1 DOMÉN

---

Ez a domén a formin funkcióját képes modulálni azáltal, hogy kölcsönhat egyes szabályozó fehérjékkel, mint például az Src-homológ 3 (SH3) [58, 59], vagy WW-domén tartalmú fehérjék [60]. Az FH1 domén egy vagy több rövid, magas prolintartalmú szekvenciát tartalmaz, amelyek képesek kötődni profilinokhoz is [61]. A prolinban gazdag szakaszok hosszától, illetve számától függően tehát lehetséges, hogy egy FH1 domén több profilint is köt egyidejűleg. Mivel pedig a profilin prolin-, és aktin-kötő helye egymástól független, a profilin az FH1 domén mellett aktint is köthet [25, 62, 63]. Mindez lehetővé teszi, hogy az FH1 domének akár több profilin-aktin komplexet is ki tudnak kötni a növekvő filamentum végéhez [64].

Az FH1 domén *in vitro* vizsgálatokban nélkülözhető a polimerizációhoz, ugyanakkor modulálja az FH2 domén hatását [62, 65]. Általánosságban elmondható, hogy a forminok önmagukban csökkentik az elongáció sebességét, viszont felgyorsítják azt profilin jelenlétében [63, 66, 67].

Jó példa erre a hasadó élesztő Cdc12 forminja. Ez a fehérje (akár az FH2, akár az FH1FH2 domént vizsgálva) képes az aktin nukleációjára, de a filamentum csak a mínusz végen növekszik [63]. Profilin jelenlétében viszont, az FH1FH2 konstrukció esetében, a kismértékű nukleációt gátló hatás mellett a filamentumok a plusz végükön is tudnak növekedni, hasonlóan a szabad aktin filamentumhoz. A jelenséget „profilin gating”-nek nevezték el [63].

Az egér mDia1 FH1FH2 konstrukciója ennél jóval hatékonyabb polimerizációt is lehetővé tesz profilin jelenlétében. Ez a fehérje a filamentum plusz végén történő beépülést kismértékben gátolja, azonban profilin jelenlétében a filamentumok hosszabbodásának sebessége 5-10-szeresére növekszik a szabad aktinhoz képest [68].

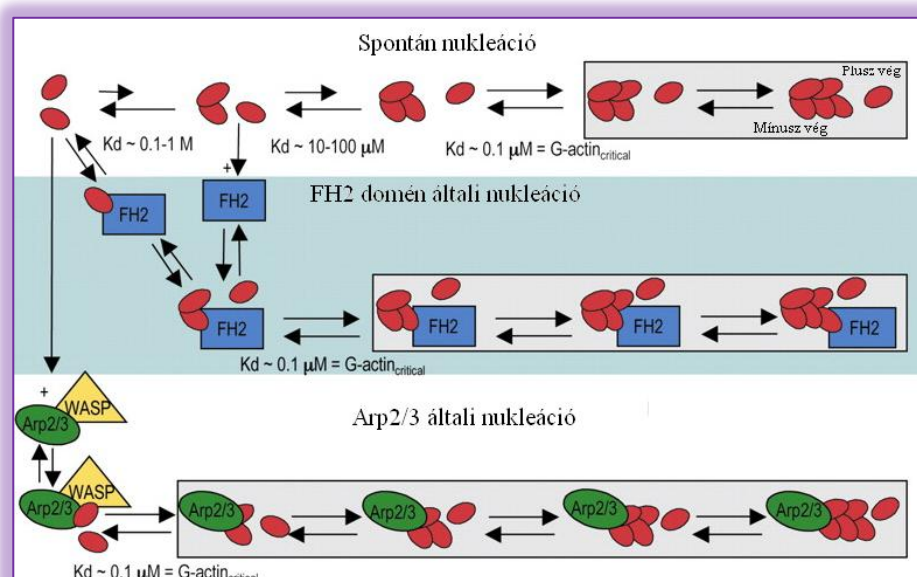
### I.3.3/B: AZ FH2 DOMÉN

Az FH2 domén a leginkább konzervatív szakasz a formin családon belül. A különböző fajokból származó FH2 domének felépítésére jellemző, hogy fánk alakú, fej-farok dimereket képeznek. A domén szerkezete már ismert, röntgenkristallográfiás vizsgálatokból [69-72].

A forminok az FH2 doménjukon keresztül képesek az aktin filamentum plusz végéhez kapcsolódni, és több módon is befolyásolhatják az aktin polimerizációját:

#### 1.) Elősegítik az újonnan kialakuló filamentumok nukleációját

Ezt az FH2 dimerek az a tulajdonsága teszi lehetővé, hogy stabil komplexet képesek képezni két aktin molekulával. Ezáltal az energetikailag kevésbé kedvező nukleációs lépést felgyorsítja, ahogyan azt a 8. ábra mutatja.



8. ábra. A forminok FH2 doménje elősegíti a de novo aktin nukleációt [73].

## 2.) Megváltoztatják a filamentum elongációs és depolimerizációs sebességét

Az FH2 domén kötődése az aktin filamentum plusz végéhez gátolja az újabb aktin monomerek beépülését, valamint leválását is [23, 58, 73, 74]. Az elongáció gátlásnak mértéke, és profilintól való függése a különböző forminok esetében igen eltérő. Erre jellemző adatok láthatóak a 2. táblázatban. Megjegyzésként hozzáfűzném, hogy a profilin jelenlétében, formin-mentes rendszerben mért elongációs ráta más szerzők adatai alapján inkább kisebb,  $7 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$  értéknek adódik [75]. Ez a profilin aktin plusz végére való hatásának tulajdonítható.

2. táblázat. A formin-profilin kölcsönhatás szerepe a filamentum plusz végének dinamikájában [68].

	<i>Plusz vég elongációja (aktin alegység <math>\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}</math>)</i>	
	Profilin hiányában	Profilin jelenlétében
<i>Aktin önmagában</i>	10	10
<i>Cdc12</i>	0	12,5
<i>mDia2</i>	2	15
<i>Bni1</i>	5-7,5	25
<i>mDia1</i>	9	45-100

A különböző forminok FH2 doménjei által okozott eltérő mértékű elongációt gátló hatás magyarázata az lehet, hogy ennek a doménnek legalább kétféle állapota létezhet: egy nyitott és egy zárt. A nyitott állapotban az aktin alegység kötődhet a filamentumhoz, a zárt állapotban nem. Az egyensúly a két állapot között meglehetősen nagymértékű változatosságot mutat a különböző forminok esetén. Otomo és munkatársai [71] modellje alapján (a mért elongációs sebességek ismeretében) a nyitott/zárt konformáció aránya nullától (példa erre a Cdc12 formin) 0,9-ig (mDia1 esetében) terjedhet [66, 68, 71, 74, 76, 77].

A forminoknak az aktin filamentumok depolimerizációjára is van hatása. Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy az mDia, illetve a Cdc12 FH1FH2 konstrukciója

lecsökkenti az aktin filamentumok depolimerizációjának sebességét [63, 76], míg például az INF2 megnöveli azt [78].

### 3.) *Gátolják a sapkafehérjék kötődését az aktinhoz*

A sapkafehérjék a sejt legtöbb aktin filamentumának pozitív végét védik, megakadályozva ezzel más aktin-kötő fehérjék kapcsolódását, illetve a filamentumok elongációját [79, 80].

Abban az esetben, ha formin kötődik a filamentum végéhez, a sapkafehérjék már nem képesek kötödni és gátolni az elongáció folyamatát. Mivel sem a sapkafehérjék, sem a forminok nem gyors kinetikával kötődnek az aktinhoz, ebből következően fiziológiai időskálán a kifejtett hatást az szabja meg, hogy melyik fehérje kötődik először [81].

Az FH2 doménnek az aktinhoz való kötődésére jellemző a processzivitás: nem kötődik és válik le a filamentum plusz végéről minden alkalommal, amikor új monomer adódik a filamentumhoz, hanem állandó kapcsolatban marad azzal. Ezt a megfigyelést fluoreszcens mikroszkópiai megfigyelések is alátámasztják [76]. Ennek megfelelően hatásukat szivárgó („leaky”) sapkázásnak is nevezik, mert nem gátolják teljesen a monomerek beépülését, mint teszik azt a sapka fehérjék. Eddigi ismereteink szerint ez alól egyedüli kivételt képez a már említett Cdc 12 FH1FH2, amely tipikus sapkafehérjeként működik, hiszen blokkolja a plusz végen történő beépülést és leválást, valamint megnöveli az aktin filamentum kritikus koncentrációját [81]. Mindazonáltal azonban általános megfigyelés, hogy a forminok FH2 doménjének az aktin filamentum kritikus koncentrációjára csak kis hatása van [23, 58, 62, 73, 74, 76].

### 4.) *Hatásuk lehet az aktin vég-vég kapcsolódására*

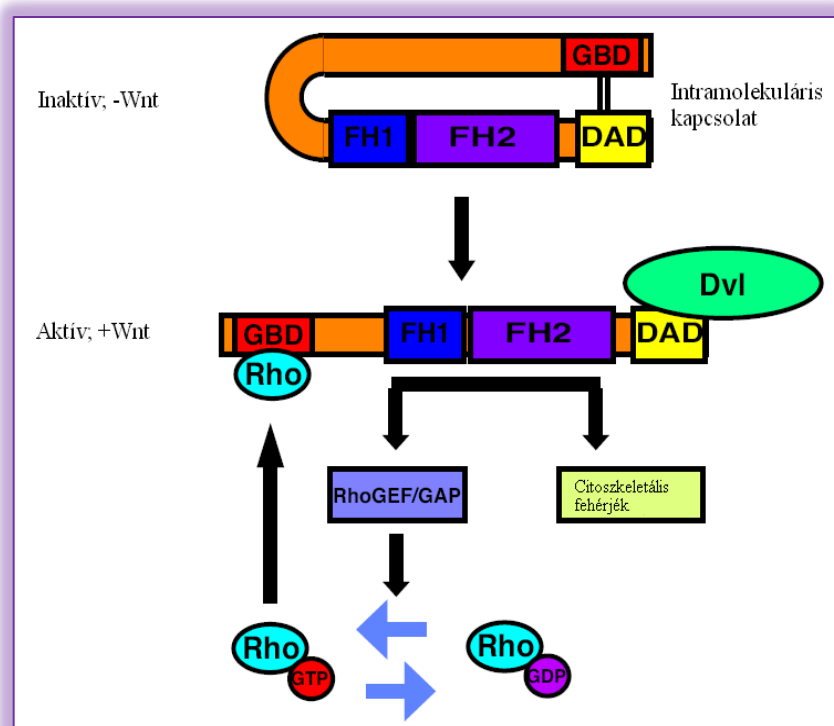
Több mint negyven évvel ezelőtt Kawamura és Maruyama [82] írta elsőként le azt a jelenséget, amikor egy aktin filamentum egyik végével egy másik filamentum végéhez kapcsolódik. Kísérleteikben aktin filamentumokat szonikáltak, vagyis ultrahang segítségével összetörtek, és a filamentumok végeinek összekapcsolódásával magyarázták az eredeti, fragmentációt megelőző hosszeloszlás újbóli kialakulását. Ezt a folyamatot nevezték el „annealing”-nek. Az élő szervezetben ez egy kulcsfontosságú folyamat, igen gyorsan lezajlik például mozgásban lévő sejtek ún. „leading edge” részén (a sejtmembrán azon területe, ahol a mozgáshoz szükséges sejtnyúlványok kialakulnak), ahol a PIP<sub>2</sub> (foszfatidil-inozitol biszfoszfát) gátolja a sapkafehérjék

kötődését [83]. Hasonlóképpen, a kofilin által felszabdalt rövid filamentum darabkák is gyorsan be tudnak épülni a filamentum plusz végén [84]. Emiatt a végek összekapcsolódásának folyamata minden, az aktint szabályozó fehérje hatását befolyásolhatja, mivel az „annealing” folyamán a filamentumok szabad végeinek száma és hossza is változik [85].

A forminoknak, mint aktin-kötő fehérjéknek is lehet hatásuk az összeépülés folyamatára. Bizonyos típusaik esetében már voltak erre vonatkozó megfigyelések, amelyek szerint a forminok általában gátolják a filamentumok vég-vég kapcsolódását [63, 86].

## I.3.4. A DAAM FORMIN CSALÁD

A DAAM fehérjét 2001-ben fedezték fel, egy, a PCP („*Planar Cell Polarity*”, *szövetek síkbeli polaritása*) jelátvitelben szerepet játszó kötőpartnere révén. A kötőfehérjét Dishevelled-nek nevezik, innen kapta a nevét a DAAM („*Dishevelled-associated activator of morphogenesis*”) [87]. A Dishevelled fehérje PDZ doménjéhez kötődve szerepet játszik a  $\beta$ -catenin független Wnt-jelátvitelben, amelynek az embrionális fejlődésben, sejt differenciációban, valamint az őssejt proliferáció folyamataiban van szerepe. Ezen folyamatokon belül a citoszkeleton átszervezésében van alapvető jelentősége [88]. A DAAM gén szekvenciájának vizsgálata során derült fény arra, hogy formin homológia doméneket tartalmaz, és a DRF forminok közé tartozik. Általános szerkezeti felépítésére az ott megjelölt séma vonatkozik, ami a 6. ábrán is látható. Sejten belüli aktivációját a jelátvitel folyamán a 9. ábrán bemutatott folyamat írja le.



9. ábra. A DAAM formin aktivációja a Wnt jelátvitel során [89].

A DAAM forminok funkciója igen sokrétű. Egyes megfigyelések szerint a PCP jelátvitelben játszott szerepük nem elsődleges [89]. Matusek és munkatársai leírták, hogy a *Drosophila melanogaster* trachea rendszerében az aktin citoskeleton normális szerveződéséhez elengedhetetlenek [89]. Ugyanez a munkacsoport bizonyította be, hogy a DAAM (meglehetősen konzervatív módon) a fejlődő idegrendszer axonjaiban a filopódiumok szervezésében játszik szerepet.

A későbbiekben a DAAM vonatkozásában több cikk is született, melyek szerint az idegrendszer működésében játszott szerepe alapvető jelentőségű. Megfigyelték például, hogy hatása van a hippocampális neuronok dendritképzésére, és a szinapszisokban is nagy mennyiségben előfordul [90]. Ezt követően kimutatták, hogy az axonok növekedésében, morfológiájának kialakításában is alapvető jelentősége van [91], valamint, hogy a központi idegrendszer neuronális sejtdifferenciálódásában is szerepet játszik [92].

Emellett előzetes *in vivo* megfigyelések arra engedtek következtetni, hogy a DAAM formin a *Drosophila melanogaster* repülőizmának szarkomerjében az aktin filamentumok mínusz végéhez lokalizálódik (Mihály és munkatársai; nem publikált eredmények). Mivel a forminokról ismert elongációt gátló, ezáltal átlagosan rövidebb filamentumokat létrehozó hatásuk, feltételezhető, hogy a DAAM forminnak szerepe van rövidebb filamentum darabkáknak a vékony filamentum mínusz végén való beépülésében.

## II. CÉLKITŰZÉSEK ÉS KÉRDÉSEK

---

A forminok biokémiai és biofizikai vizsgálata már évtizedek óta folyik. Bizonyos, intenzívebben tanulmányozott formin családokról (pl. Dia forminok) már átfogó ismereteink vannak. A DAAM esetében az *in vitro* megfigyelések munkám megkezdésekor még hiányoztak. A DAAM-mal kapcsolatos *in vivo* megfigyelések háttérében álló mechanizmusok megértése érdekében szükségessé vált ennek a forminnak a biokémiai és biofizikai jellemzése.

Mivel több más forminnak az aktinnal való kölcsönhatását már nagy vonalakban leírták, ezen a nyomvonalon haladva terveztük megvizsgálni a DAAM kiválasztott fragmentumainak hatását az aktin dinamikájára. A választott két konstrukció közül az első, a későbbiekben DAAM FH2-nek nevezett fehérje az aktin-kötésért felelős, konzervatív fehérje részletet tartalmazza a DAAM-on belül. A másik konstrukció az FH2 mellett az FH1-domént is tartalmazza, amely a profilin kötődéséért felelős régió. Ezt a későbbiekben DAAM FH1FH2-nek nevezzük.

Munkánk során a következő kérdésekre kerestük a választ:

1. Képes-e kötődni a DAAM FH2 domén az aktinhoz, és ha igen, befolyásolja-e annak nukleációs és elongációs sebességét?
2. Van-e különbség az FH2, illetve FH1FH2 doménok jelenlétében megfigyelt aktin polimerizációban, vagyis befolyásolja-e az FH1 domén az aktinnal kialakított kölcsönhatást?
3. A DAAM FH2, illetve FH1FH2 konstrukciók befolyásolják-e az aktin filamentum depolimerizációját?
4. Van-e hatásuk a DAAM FH2 illetve FH1FH2 konstrukcióknak az aktin kritikus koncentrációjára?
5. Milyen disszociációs állandóval kötődik a DAAM FH2, illetve FH1FH2 az aktinhoz?



6. Van-e hatása az általunk vizsgált DAAM konstrukcióknak az aktin filamentumok szupramolekuláris kölcsönhatására? Befolyásolják-e az aktin filamentumok hosszeloszlását, kötegelik-e az aktint, megváltoztatják-e a filamentumok vég-vég kapcsolódását?

7. Milyen hatása van a profilinnek a DAAM FH2, illetve FH1FH2 által kötött aktin filamentumok dinamikájára? Megfigyelhető-e a szakirodalomban már néhány formin esetén leírt kooperáció a profilin és az FH1 domén között?

### III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

---

---

#### III.1. A KÍSÉRLETEKHEZ HASZNÁLT FEHÉRJÉK ELŐÁLLÍTÁSA

---

##### III.1.1. AZ AKTIN PREPARÁLÁSA

---

Kísérleteinkben nyúl (*Oryctolagus cuniculus*) vázizom aktint preparáltunk Spudich és Watt módszere alapján [93] (szerkezet PDB kódja: 3HBT (G aktin); 3G37 (F aktin)). Ehhez nyúl vázizomból kiindulva először egy izom kivonatot, ún. „aceton forgácsot” készítettünk. Ezt követően kioldópuffert (4 mM Tris-HCl, 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,2 mM ATP, 0,5 mM MEA, 0,005% NaN<sub>3</sub>, pH 8,0) adtunk hozzá, jégen kevertettük fél órán át, majd steril gézen leszűrtük. Ezt a lépést megismételtük a már leszűrt aceton forgáccsal, összeöntöttük a két szűrletet, és centrifugáltuk (Beckman Optima MAX, MLA-80 rotor; 100000 g, 30 perc, 4 °C). A felülúszóhoz polimerizációs só (50mM KCl és 2 mM MgCl<sub>2</sub>) adtunk, majd két órán át inkubáltuk szobahőmérsékleten. Ezt követően 0,8 M KCl-os sózást alkalmaztunk, a miozin szennyeződés eltávolítása céljából. Miután a folyamatos kevertetést követően az oldat kitisztult, lecentrifugáltuk (Beckman Optima MAX, MLA-80 rotor; 400000 g, 30 perc, 4 °C). A felülúszót leöntöttük, az üledéket két órán át jégen duzzasztottuk, majd homogenizálást követően éjszakán át dializáltuk a következő pufferben: 4 mM Tris-HCl, 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,2 mM ATP, 0,5 mM DTT, 0,005% NaN<sub>3</sub>, pH 7,3 („A puffer”).

Egy újabb tisztító ultracentrifugálási (Beckman Optima MAX, MLA-80 rotor; 400000 g, 30 perc, 4 °C) lépést követően az aktint gélfiltrációs Sephacryl S300-as oszloptölteten tisztítottuk tovább, hogy a maradék fehérje-szennyeződést is eltávolítsuk.

Az aktin koncentrációjának meghatározása Shimadzu UV-2100 spektrofotométer segítségével történt, amely során az aktin extinkciós együtthatójának 0,63 mg<sup>-1</sup> ml cm<sup>-1</sup> értéket vettünk a 290 nm-en mért abszorbancia esetén [94].

A fluoreszcencia spektroszkópos mérésekhez az aktin további jelölése N-(1-pyrene) iodoacetamide-dal (továbbiakban „pirén”) történt. Ez a fluorofór az aktin 374-es számú cisztein aminosavához kötődik kovalens kötéssel [95]. A pirén-jelölt aktin koncentrációjának meghatározásához a pirén extinkciós koefficiensét 344 nm-en  $2,2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ -nek vettük. Mivel a pirén abszorpciójának van járuléka 290 nm-en is, emiatt a jelölési arány meghatározásához korrekciós faktort használtunk.

---

### III.1.2. A FORMIN FRAGMENTUMOK ÉS A PROFILIN ELŐÁLLÍTÁSA

---

A *Drosophila melanogaster* DAAM esetében a függelékben közölt megfelelő fehérje-szekvenciákat Mihály József és munkacsoportja (Szegedi Biológiai Központ, Genetikai Intézet) inszertálta be számunkra egy pGex-4T-3 típusú plazmidba, amely ampicillin rezisztenciát hordoz, és IPTG-vel indukálható róla a célfehérje átírása. A kívánt fehérje szekvenciája és az affinitási tag között egy trombin hasítóhely van.

A fehérje preparálását Shimada és munkatársai munkája alapján végeztük [72]. A módszer lényege, a hogy a GST affinitási taggal rendelkező fehérje konstrukciókat tartalmazó sejtlizátumot lecentrifugáltuk (Sorvall ultracentrifuga, 400000 g, 4 °C, 1 h), majd a felülúszót egy GSH affinitási oszlopon átfolyattuk. Több mosási lépésből álló tisztítást követően az oszlopot éjszakán át trombinnal emésztettük, majd a célfehérjét lemostuk. Végül egy gélfiltrációs tisztítást hajtottunk végre, Sephacryl S 300-as tölteten.

A fehérjék extinkciós együtthatójának meghatározása a „Protparam” program segítségével (<http://us.expasy.org/tools/>) DAAM FH2 esetén  $\epsilon_{280} = 22920 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ -nek, DAAM FH1FH2 esetén  $\epsilon_{280} = 22982,5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ -nek adódott. A fehérjék számolt mólsúlya 47,9 kDa és 54,7 kDa volt. Mindkét DAAM konstrukciót folyékony nitrogénben történt fagyasztás után -80 °C-on tároltuk.

Az élesztő profilin (PDB azonosító: 1YPR) teljes aminosav szekvenciáját Pekka Lappalainen és munkatársai (Institute of Biotechnology, University of Helsinki, Helsinki, Finnország) egy pHAT2 plazmidba inszertálták be. BL21 (DE3) pLysS kompetens sejtekben IPTG-vel indukáltuk róla a fehérje átírását, majd nikkel affinitás

kromatográfiai módszerrel, növekvő imidazol grádienszt használva választottuk el a szennyező fehérjéktől. Ezt követően, ahogy a DAAM konstrukciók esetén is, alkalmaztunk egy gélfiltrációs lépést, a további szennyezések eltávolítása céljából. A profilin extinkciós együtthatójára  $\epsilon_{280} = 19940 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  értéket kaptunk. Molekulasúlya 13,68 kDa. A preparálást követően folyékony nitrogénben lefagyasztottuk és  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ -on tároltuk.

---

## III.2. KÍSÉRLETI MÓDSZEREK

---

---

### III.2.1. AZ AKTIN POLIMERIZÁCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA

---

Az aktin polimerizációja több lépésből álló folyamat, melynek során először az aktin monomerek nukleuszokat képeznek, és ezek szolgálnak kiindulópontul a filamentum kialakulásához. A kísérleteinkben használt pirén-jelölt aktin monomerek markerként viselkednek ennek a folyamatnak a nyomon követése során. Köszönhetően a pirén-aktin azon tulajdonságának, hogy a filamentumba épülése során az emittált jel intenzitása megnő, a filamentumok hosszabbodása az idő függvényében mérhetővé válik.

A polimerizáció vizsgálata során az aktin végkoncentrációját  $3,5 \mu\text{M}$ -nak (5%-ban pirén-jelölt) állítottuk be. A mérés során a küvettában lévő aktinhoz egy ún. kationcserélő oldatot adtunk (végkoncentráció szerint az oldatban:  $200 \mu\text{M}$  EGTA és  $50 \mu\text{M}$   $\text{MgCl}_2$ ), majd inkubáltunk öt percen keresztül, a kationcsere lezajlása érdekében. Ezt követően adtunk hozzá  $\text{MgCl}_2$  és  $\text{KCl}$ -ot  $1 \text{ mM}$  és  $50 \text{ mM}$  végkoncentrációban, valamint DAAM FH2 vagy DAAM FH1FH2-t a jelzett koncentrációban.

A polimerizáció nyomon követésére két műszert használtunk. Alacsonyabb DAAM koncentrációk esetében a fluoreszcencia-intenzitás változását Perkin-Elmer LS50B típusú spektrofluoriméterrel detektáltuk az idő függvényében,  $365 \text{ nm}$  gerjesztési, és  $407 \text{ nm}$  emissziós hullámhosszakat beállítva.

A kapott polimerizációs görbéket normáltuk: első lépésként levontuk a kationcsere folyamán mért fluoreszcencia intenzitást a teljes görbe intenzitásából (így egy közös pontból indítva minden egyes mérést), majd a filamentumok maximális hosszának elérésekor kapott fluoreszcencia intenzitás értékkel elosztottuk a görbe minden adatpontjának intenzitását, melynek köszönhetően minden görbe plató fázisa ugyanoda került. Végezetül egyenest illesztettünk a polimerizáció felénél a görbékre, és meghatároztuk ezeknek az egyeneseknek a meredekségét. A meredekségeket  $\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$  egységre átszámolva megkaptuk a polimerizáció sebességét a formin koncentrációjának függvényében.

Magasabb ( $1\mu\text{M}$ -t elérő illetve meghaladó) formin koncentrációk esetén a polimerizáció nyomon követése már nehézkessé válik, mivel a polimerizációhoz szükséges összetevők összepipettázása alatt a polimerizáció jelentős része megtörténik. Ilyen esetekben praktikus a megállított áramlású reaktor („stopped-flow” rendszer) használata (Applied Photophysics, SX.18MV-R Stopped Flow Reaction Analyser). Ezekben a kísérletekben a polimerizáció sebességét magasabb formin koncentráció esetén is meglehetősen kis (0,5-1 milliszekundumos) holtidővel, és nagy biztonsággal tudtuk nyomon követni. A mérés során egy  $7\mu\text{M}$ -os, 5%-ban pirénnel jelölt aktin oldatot injektáltunk össze a polimerizációs sókkal és a forminnal olyan módon, hogy a mérőcellában álljon be a vizsgálni kívánt, az előzőekben leírt fehérje- és sókoncentráció.

---

### III.2.2. AZ AKTIN DEPOLIMERIZÁCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA

---

Annak megállapítására, hogy a formin fragmentumok milyen módon befolyásolják az aktin monomerek filamentumról történő disszociációjának sebességét, depolimerizációs tesztek végeztünk.

Ehhez különböző formin koncentrációk jelenlétében (vagy formin nélkül)  $5\mu\text{M}$ -os polimerizált, 70 %-ban pirénnel jelölt aktin filamentumokat hígítottunk ki a kritikus koncentráció alatti értékre ( $0,1\mu\text{M}$ -ra). A kísérletekben alkalmazott, a polimerizációs tesztekhez képest magasabb jelölési arányt az alacsony aktin koncentráció és az ebből adódó kisebb intenzitás indokolta.

A pirén fluoreszcencia-intenzitása csökkenésének mérésével detektáltuk a monomerek disszociációját. A forminoknak a depolimerizáció sebességére kifejtett hatását úgy határoztuk meg, hogy a fluoreszcencia intenzitás-változás görbéjének első ötven másodperces szakaszára egyenest illesztettünk, és meghatároztuk annak meredekségét. Ezt követően elosztottuk ezeket a meredekség-értékeket a csak aktint és puffereket tartalmazó minta hasonlóképpen kapott meredekségének értékével, eképpen normálva a formin-mentes rendszerre. A továbbiakban ezeket a meredekség-arányokat ábráztuk a formin koncentrációjának függvényében.

---

### III.2.3. KRITIKUS KONCENTRÁCIÓ MÉRÉSE

---

Az aktin kritikus koncentrációjának meghatározásához 5%-ban pirénnel jelölt aktint használtunk, és két módszert alkalmaztunk. Az első esetben a formin koncentrációt 100 nM-ra állítottuk be, és az aktin koncentrációját változtattuk. Éjszakán át polimerizáltuk a mintákat, majd felvettük a fluoreszcencia-spektrumukat. A pirén fluoreszcencia emissziójának jellemző maximuma (407 nm) körüli tartományban (397-417 nm) a fluoreszcencia-intenzitás értékeket átlagoltuk, és az átlagokat ábrázoltuk az aktin koncentrációjának függvényében.

A kapott görbére a következő egyenletet illesztettük:

$$I = I_0 + ((SL + SR) ([A] - cc) / 2) - ((SL - SR) \text{abs}([A] - cc) / 2) \quad (1)$$

ahol  $I$  a pirén fluoreszcencia intenzitása a különböző aktin-koncentrációk esetén,  $[A]$  az aktin koncentrációja a különböző mintákban,  $cc$  a kritikus aktin koncentráció,  $I_0$  a függvény által felvett érték a kritikus koncentrációnak megfelelő aktin koncentráció esetén,  $SL$  és  $SR$  pedig a függvénynek a töréspontot megelőző és azt követő meredekség értéke.

A másik esetben az aktin koncentrációját 1  $\mu\text{M}$ -ra állítottuk be, és a formin fragmentumok koncentrációját változtattuk. Éjszakán át történő inkubálást követően az adatpontok felvétele és a spektrumok kiértékelése az előzőekhez hasonló módon történt, azzal a különbséggel, hogy ebben az esetben a filamentumok koncentrációját ábrázoltuk a DAAM koncentráció függvényében.

---

### III.2.4. A FORMIN FRAGMENTUMOK AKTINHOZ VALÓ KÖTŐDÉSÉNEK VIZSGÁLATA

---

Kísérleteinkben meghatározó jelentőséggel bírt a DAAM fragmentumoknak aktinhoz való affinitása. Ennek meghatározásához ún. koszedimentációs módszert használtunk.

Ehhez aktin filamentumokat polimerizáltunk 1,5  $\mu\text{M}$  koncentrációban, szobahőmérsékleten különböző mennyiségű DAAM FH2 illetve FH1FH2 mellett. Ezt követően a mintákat centrifugáltuk Beckman Optima MAX típusú ultracentrifugával (TLA-100 rotor, 20  $^{\circ}\text{C}$ , 30 perc, 400000 g). Az üledéket és a felülúszót különválasztottuk, és redukáló, 12 %-os SDS poliakrilamid gélen megfuttattuk. Coomassie kék festést követően a géleket lefotóztuk és Syngene Bio-imaging program segítségével értékeltük ki az eredményeket. Az egyes fehérjéknek megfelelő sávokat elosztottuk az adott fehérje mólsúlyával, így kaptuk meg az aktinra, illetve forminra vonatkozó intenzitás-értékeket. A pelletben megfigyelhető formin / aktin intenzitás arányokat ábrázoltuk a formin koncentráció függvényében. Az affinitás meghatározásához a következő egyenletet használtuk [96]:

$$[A]_0 D^2 ([A]_0 + [D]_0 + K_D) D + [D]_0 = 0 \quad (2)$$

ahol  $[A]_0$  és  $[D]_0$  a teljes aktin illetve formin koncentrációk,  $K_D$  a disszociációs egyensúlyi állandó, és  $D$  pedig az aktinhoz kötött formin koncentrációja.



---

### III.2.5. MIKROSKÓPOS MEGFIGYELÉSEK

---

#### A) Az aktin filamentumok kötegelődésének és hosszeloszlásának vizsgálata

A DAAM fragmentumoknak az aktin filamentumok kötegelődését okozó hatását a következő módon vizsgáltuk: aktint polimerizáltunk 1  $\mu\text{M}$ -os koncentrációban, 500 nM DAAM FH2 vagy FH1FH2 jelenlétében vagy hiányában két órán keresztül a következő pufferben: 4 mM Tris-HCl, 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,2 mM ATP, 0,5 mM DTT, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 50 mM KCl és 1 mM EGTA, pH 7,0. Ezt követően a filamentumokat rodamin-falloidinnel jelöltük 1:1 moláris arányban egy órán keresztül, majd kihígítottuk 5 nM-os koncentrációra az alábbi mikroszkópos pufferben: 4 mM Tris-HCl, 1 mM EGTA, 50 mM KCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 M DTT, 15 mM glükóz, 20  $\mu\text{g/ml}$  kataláz, 100  $\mu\text{g/ml}$  glükóz-oxidáz, 0.5 % (w/v) metilcellulóz, pH 7,0. Az egyes mintákban meghatároztuk az átlagos egyedi aktin filamentum szélességét, és ezzel az értékkel elosztottuk az egyes filamentumszélességeket. Végül a megfigyelt százalékos gyakoriságot ábrázoltuk a filamentumszélesség függvényében.

A DAAM fragmentumoknak az aktin filamentumok hosszeloszlására való hatását az előzőekhez hasonlóan vizsgáltuk, azzal a különbséggel, hogy a mérés során a filamentumok koncentrációját 2 nM-ra állítottuk be, a pontosabb hossz mérés érdekében.

#### B) A filamentumok vég-vég kapcsolódásának vizsgálata

Az aktin filamentumok vég-vég kapcsolódásának vizsgálatához éjszakán át (az alkalmazott fehérjék jelenlétében vagy hiányában) polimerizált aktin filamentumokat használtunk. Ezeket a mintákat is egy órán át jelöltük Alexa 488 konjugált falloidinnel, majd 26G méretű inzulinos fecskendőn átnyomva mechanikailag összetörtük a filamentumokat. Ezt követően a jelzett időintervallumok elteltével a korábban leírt mikroszkópos pufferben 2,5 nM-ra hígítottuk őket (a vég-vég kapcsolódás folyamatának leállítására), és a kapott képeket ImageJ program segítségével kiértékeltek. Megközelítőleg 100-300 filamentum hosszát mértünk le egy adott minta esetén, és az átlagos hosszat ábrázoltuk az idő függvényében. Végül, a vég-vég

kapcsolódás sebességének meghatározása céljából a következő egyenletet illesztettük a kapott adatokra:

$$l = ((l_{\max} - l_{\min}) / (1 + K/m)) + l_{\min} \quad (3)$$

ahol  $l$ ,  $l_{\min}$  és  $l_{\max}$ : a filamentum hosszak az idő függvényében,  $m$ : az eltelt idő perc egységben megadva,  $K$  pedig a folyamatra jellemző sebességi állandó.

A mintákat Olympus IX81 inverz fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk, 100x objektívet (NA 1.4) és egy CCD kamerát (Orca ERG Hamamatsu) használva. A képeket ImageJ programmal (<http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>) analizáltuk.

## IV. EREDMÉNYEK

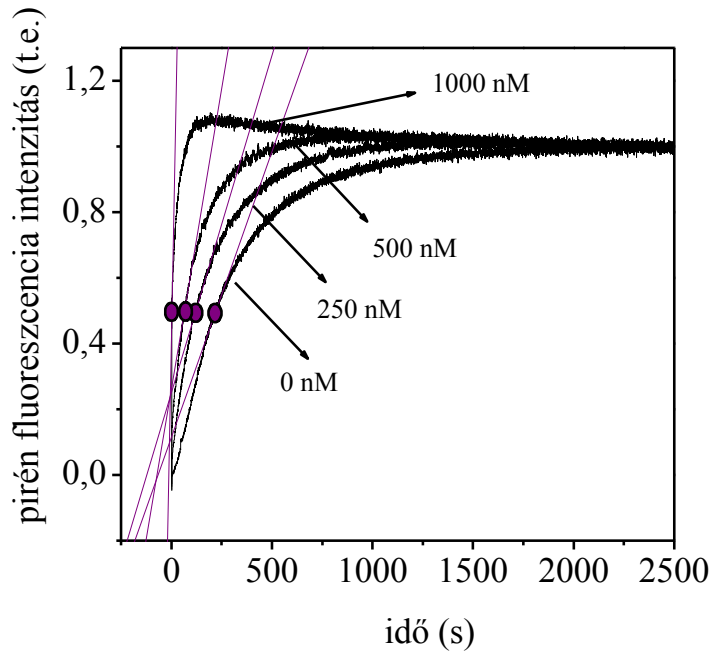
---

### IV.1. A DAAM FH2 DOMÉNJE HATÁSSAL VAN AZ AKTIN POLIMERIZÁCIÓJÁRA

---

Kísérleteinkben a *Drosophila melanogaster* DAAM FH2 hatását vizsgáltuk aktin polimerizációs teszt (ún. pirén-esszé) segítségével. Ezekben a mérésekben a pirén fluorofór fluoreszcencia intenzitásának változását mértük az idő függvényében, ami az oldatban kialakuló filamentumok számával, illetve hosszával arányosan nő. A módszer előnye, hogy egyszerűen és meglehetősen pontosan követhető vele a filamentumok polimerizációja, hátránya viszont, hogy segítségével nem különböztethető meg a nukleációra és az elongációra kifejtett hatás, és nem mérhető a filamentumok hosszeloszlása.

Ezekben a mérésekben aktin monomerekhez (3,5  $\mu\text{M}$ , 5 %-ban pirén-jelölt) a kationcserét követően polimerizációs sókat és különböző koncentrációban DAAM FH2-t adtunk, majd a plató fázis eléréséig detektáltuk a fluoreszcens jelet. Ahogy az a *10. ábrán* is látható, a DAAM FH2 fragmentum koncentrációjának emelésével egyre meredekebben felfutó görbét kaptunk. Ez arra utal, hogy a DAAM FH2 fragmentumok koncentrációjának emelésével egyre gyorsabb az aktin polimerizációja.



10. ábra. A DAAM FH2 hatása az aktin polimerizációjára. A feltüntetett számok az alkalmazott formin koncentráció-értékeket jelentik (t.e.: tetszőleges egységek). A körök azokat a szakaszokat jelölik, ahová az egyeneseket illesztettük.

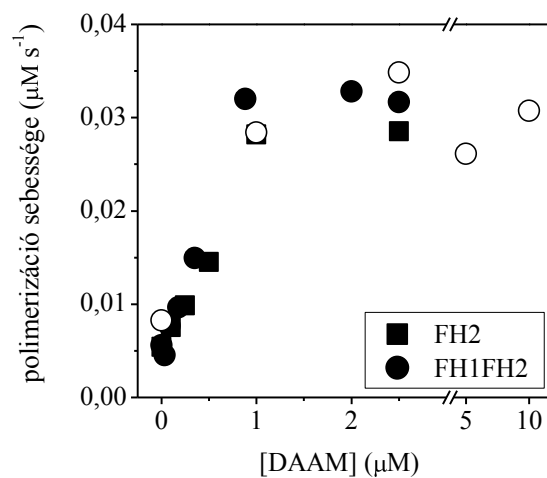
1  $\mu\text{M}$  koncentrációt elérve már egy úgynevezett „overshooting” (túllövés) is mérhető. Irodalmi adatok szerint ez a jelenség általában akkor figyelhető meg, ha a polimerizáció gyors, és az ATP-t kötő aktin monomerek filamentumba való beépülése gyorsan bekövetkezik (a túllövés felszálló része). Az ATP-nek ADP-re való hidrolízise miatt azonban a filamentum plusz vége is ADP-t köt, és mivel az ADP-kötött aktin kritikus koncentrációja magasabb, mint az ATP-kötött aktiné, a filamentum depolimerizációja következik be, monomerek disszociálnak le róla (leszálló rész) [97, 98].

Az egyes görbék felszálló szakaszára az *Anyagok és módszerek* résznél leírt módon egyenest illesztettünk, majd ebből határoztuk meg a polimerizáció sebességét. Ezek értékeit ábrázoltuk a 11. ábrán a DAAM FH2, illetve FH1FH2 koncentrációjának függvényében.

## IV.2. AZ FH1 DOMÉN JELENLÉTE ÖNMAGÁBAN NEM BEFOLYÁSOLJA A DAAM FH2 ÁLTAL A POLIMERIZÁCIÓRA KIFEJTETT HATÁST

Az előzőekben leírt kísérletet megismételtük DAAM FH1FH2-vel is, annak eldöntésére, hogy a DAAM-on belüli prolinban gazdag fehérje-szakasz befolyásolja-e az aktin polimerizációjára kifejtett hatást. A polimerizációs görbékből meghatároztuk a polimerizáció sebességét, és a DAAM koncentráció függvényében ábrázoltuk ezek értékeit.

Ahogy az a *11. ábrán* látható eredményeink mutatják, az FH2 és FH1FH2 fragmentumok gyakorlatilag azonos hatással vannak az aktin polimerizációjára. Ebből arra következtettünk, hogy az FH1 domén jelenléte nem befolyásolja az FH2 fragmentum polimerizációra kifejtett hatását.



*11. ábra. A DAAM FH2 és DAAM FH1FH2 konstrukciók hatása az aktin (3,5 μM, 5 %-ban pirén-jelölt) polimerizációjának sebességére (1mM MgCl<sub>2</sub> és 50mM KCl sókoncentrációk mellett). Az üres körök a stopped flow-val kapott eredményeket jelölik.*

Magasabb formin koncentrációknál, a nagy polimerizációs sebesség miatt szükségessé vált a rövid holtidővel rendelkező megállított áramlású reaktor („stopped flow”) használata. Ennek segítségével teszteltük, hogy az aktin polimerizációjának sebessége a formin koncentrációjának függvényében telítődést mutat-e, és ha igen, milyen formin : aktin aránynál. Mivel a korábbi mérések során a kétféle fragmentum hatása azonosnak bizonyult, mérés technikai okokból ezekben a kísérletekben csak a DAAM FH1FH2 fragmentumot használtuk. Eredményeink azt mutatták, hogy a formin koncentrációját már hiába emeljük  $1 \mu\text{M}$  fölé, a polimerizáció gyorsítására kifejtett hatása tovább nem fokozható, telítést mutat. Mindez plató fázisként látható a *11. ábrán*.

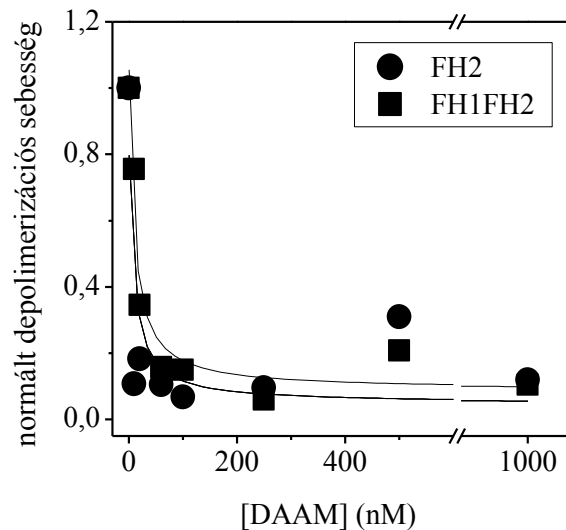
---

### IV.3. A DAAM FH2 ÉS FH1FH2 KONSTRUKCIÓK GÁTOLJÁK AZ AKTIN DEPOLIMERIZÁCIÓJÁT

---

Az aktin depolimerizációjának nyomon követéséhez előzőleg polimerizált, 70 %-ban pirén-jelölt aktint használtunk. Ezekben a kísérletekben a polimerizációs tesztek „fordítottját” végeztük el. A polimerizációhoz szükséges puffert, polimerizációs só, illetve DAAM fragmentumot különböző koncentrációkban összemértünk, és ehhez pipettáztuk hozzá az éjszakán át polimerizálódott aktint. Az aktin mennyiségét úgy választottuk meg, hogy annak végkoncentrációja az elegyben a (körülményeknek megfelelő) kritikus koncentráció alatt (100 nM) legyen. A polimerizációs teszthez hasonlóan itt is a pirén fluoreszcencia-intenzitását detektáltuk az idő függvényében, de ez esetben csökkenő intenzitást kaptunk, hiszen a filamentumokról a monomerek disszociációja zajlott le.

A depolimerizációs görbe első 50 másodperces részére egyenest illesztettünk, és az egyes DAAM fragmentumokat is tartalmazó minták esetén kapott görbék meredekség-értékeit elosztottuk a formin-mentes mérés során kapott görbe meredekségével. A 12. ábrán látható módon a kapott hányadosokat ábrázoltuk a formin fragmentumok koncentrációjának függvényében.



12. ábra. A DAAM fragmentumok hatása az aktin depolimerizációjára (100nM aktin, 1 mM MgCl<sub>2</sub> és 50 mM KCl jelenlétében).

Amint az látható, mindkét DAAM fragmentum lecsökkenti a monomerek disszociációját, tehát erősen gátolják a depolimerizációt. Ezek az eredmények jó egyezést mutatnak az irodalomban korábban a DRF család esetében megfigyeltekkel [63, 76]. Ennek a formin-családnak a tagjai ugyanis általában erősen gátolják a monomerek disszociációját a plusz végről. Lehetséges magyarázat erre az lehet, hogy a DAAM fragmentumok sapkafehérjeként működnek a filamentum plusz végéhez kötve. Emiatt a depolimerizáció csak a szabadon maradt mínusz végek felől lehetséges, ahol pedig annak sebessége jóval kisebb, mint a plusz végen.



---

#### IV.4. AZ ALKALMAZOTT DAAM KONSTRUKCIÓKNAK NINCSEN JELENTŐS HATÁSUK AZ AKTIN KRITIKUS KONCENTRÁCIÓJÁRA

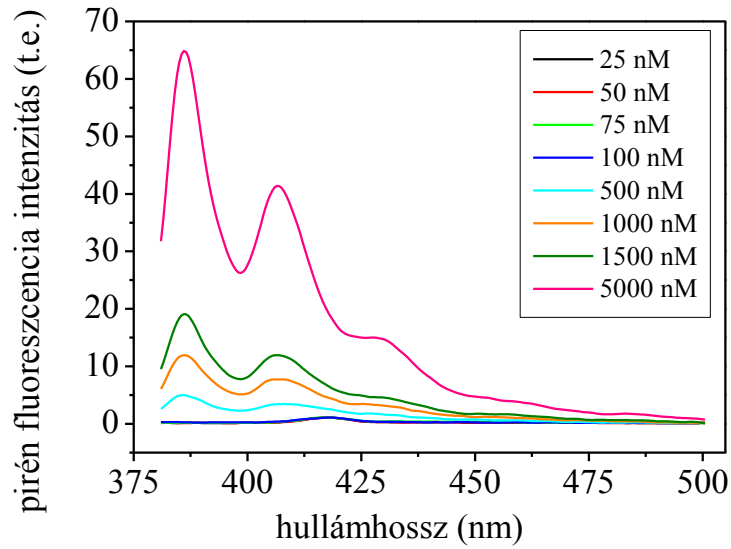
---

Irodalmi adatok szerint számos fehérjének, ezen belül forminnak van hatása az aktin kritikus koncentrációjára [23, 58, 62, 73, 74, 76]. Az alkalmazott mérési körülményeknek megfelelő kritikus koncentráció meghatározásához pirén-jelölt aktint használtunk. Mivel a filamentumban a pirén jele megnő a monomerhez képest, ezzel a módszerrel vizsgálni tudtuk a monomer-filamentum átmenetet.

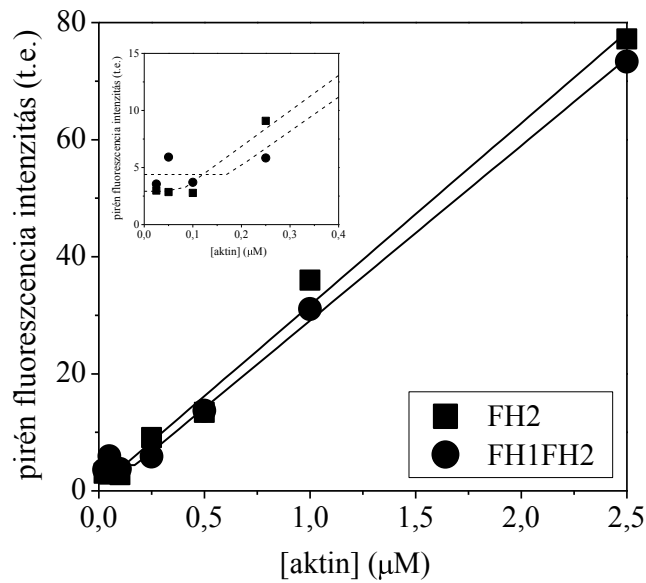
A módszert kétféle elrendezésben is használtuk. Elsőként meghatározott formin koncentráció jelenlétében inkubáltunk aktint különböző koncentrációban. A vizsgálati elv szerint ebben az esetben a pirén fluoreszcencia emissziós spektrumát felvéve (gerjesztési hullámhossz: 365 nm; rések: 5 nm) különböző intenzitású görbéket kaptunk. A kapott intenzitások egyrészt az oldatban jelen lévő jelölt monomerek mennyiségét tükrözik (a kritikus aktin koncentrációnál kisebb mennyiséget tartalmazó minták esetén), másrészt ugrásszerűen megnőhetnek, amint megjelennek a filamentumok az oldatban (nagyobb koncentrációk esetén). Ennek a mérésnek egy jellemző példáját mutatja a *13. ábra*.

A kiértékelés során a pirén emissziós maximuma (407 nm) körüli 20 nm-es hullámhossztartományban mért fluoreszcencia-intenzitás értékeket használtuk fel. A 365 nm-es gerjesztési hullámhossznak megfelelő Raman sáv ugyan jelentkezik 416 nm-en, főleg alacsony aktin koncentrációk esetében, de ez a kísérlet során kapott adatokat nem befolyásolja számottevő mértékben.

Ennek megfelelően a 397 és 417 nm között kapott intenzitás-értékeket átlagoltuk, és ezeket ábráztuk az aktin koncentráció függvényében. Ez látható a *14. ábrán*. Az adatokra az *(1) számú egyenletet* illesztettük (ld. *Anyagok és módszerek* c. fejezet). Az egyenletben szereplő két egyenes meredekségének metszéspontja adja meg az adott mintának megfelelő kritikus aktin koncentrációt. A metszéspont jobb láthatósága érdekében a kritikus koncentráció körüli tartomány kinagyítva látható a betétábrán.



13. ábra. Aktin kritikus koncentrációjának meghatározása során kapott pirén emissziós spektrumok. A színekben látható számok az adott görbéhez tartozó aktin koncentrációt jelölik (t.e.: tetszőleges egységek).



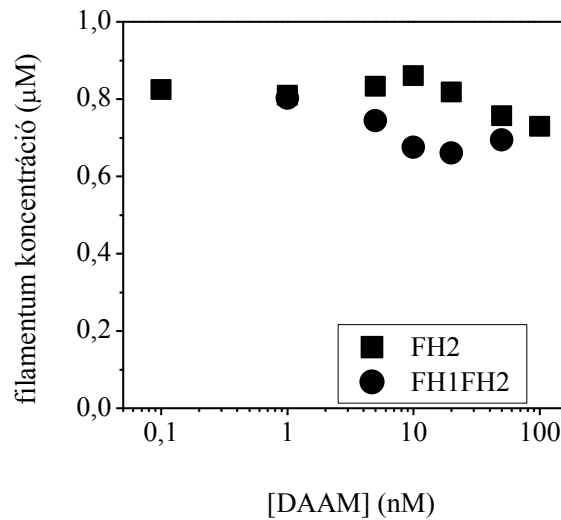
14. ábra. A kritikus koncentráció meghatározása (t.e.: tetszőleges egységek).

Az (1)-es egyenlet illesztésével kapott kritikus koncentráció értékek a 3. táblázatban vannak feltüntetve. A fenti adatok alapján megállapítottuk, hogy 100 nM DAAM-FH2 illetve FH1FH2 alkalmazása esetén az aktin kritikus koncentrációja csak igen kis mértékben változik meg, csak enyhe mértékű emelkedést mutat.

3. táblázat. A különböző formin fragmentumok esetében mért kritikus aktin koncentrációk.

<i>Minta</i>	<i>Az aktin kritikus koncentrációja</i>
<i>Formin nélkül</i>	$0,17 \pm 0,04 \mu\text{M}$
<i>100 nM DAAM FH2 jelenlétében</i>	$0,21 \pm 0,09 \mu\text{M}$
<i>100 nM DAAM FH1FH2 jelenlétében</i>	$0,25 \pm 0,07 \mu\text{M}$

Az így kapott eredmények alátámasztására elvégeztünk egy hasonló, alternatív mérésorozatot is. Ebben az esetben a formin fragmentumok koncentrációját változtattuk állandó aktin koncentráció mellett. Ezekben a mérésekben is a pirén fluoreszcencia intenzitását mértük, de ebben az esetben F-aktin koncentrációjának változását ábrázoltuk a formin koncentráció függvényében, ahogyan az a 15. ábrán látható.



15. ábra. Az F aktin koncentrációjának formin-függése.

Az ábrán látható, hogy alacsony formin koncentrációk esetében az F aktin mennyisége mintegy 0,8 - 0,9  $\mu\text{M}$ , ami 1  $\mu\text{M}$  összaktint figyelembe véve, hozzávetőlegesen 100 - 200 nM kritikus aktin koncentráció értéket jelent. A formin mennyiségének növelésével mindkét formin fragmentum esetén megfigyelhető a filamentumok koncentrációjának további, megközelítőleg 100 nM-os csökkenése, ami a kritikus koncentráció ilyen mértékű emelkedésével magyarázható. Ezen eredményekből megállapítható továbbá, hogy az alkalmazott formin fragmentumok 20-40 nM-os koncentrációban már hatást fejtenek ki az aktin filamentumokra. Érdekes a különbség az alkalmazott két konstrukció között: ahogy az a 15. ábrán látszik, az FH1FH2 konstrukció alacsonyabb koncentrációtartományban fejt ki hatást az aktin kritikus koncentrációjára, mint az FH2 domén önmagában. Ez arra utalhat, hogy az FH1FH2 fragmentum nagyobb affinitással kötődik az aktinhoz, mint az FH2 domén, és emiatt fejt ki már alacsonyabb koncentrációtartományban hatást. A következő fejezetben leírt módszerrel ez bizonyítást is nyert.

Összességében elmondható, hogy a kritikus koncentrációra kifejtett hatással kapcsolatos eredményeink jól illeszkednek az irodalomban más forminok esetében tett megfigyelésekhez. Az élesztő Bni1p forminjának FH1FH2 fragmentumának például nincsen hatása az aktin kritikus koncentrációjára [62], míg a Cdc12 formin esetében ez a fragmentum erősen eltolja ezt a mínusz vég kritikus koncentrációjának irányába [63].

Mindez, a depolimerizációs kísérletek tükrében arra mutat, hogy a DAAM a forminokon belül egy olyan csoportot képvisel, amely ugyan sapkafehérjeként kötődik a filamentum plusz végéhez, de nem zárja le túl szorosan („leaky capper”). Ezzel magyarázható, hogy gátolja a monomerek disszociációját, de nem változtatja meg olyan mértékben a kritikus koncentrációt, ahogyan a Cdc12 formin teszi.

---

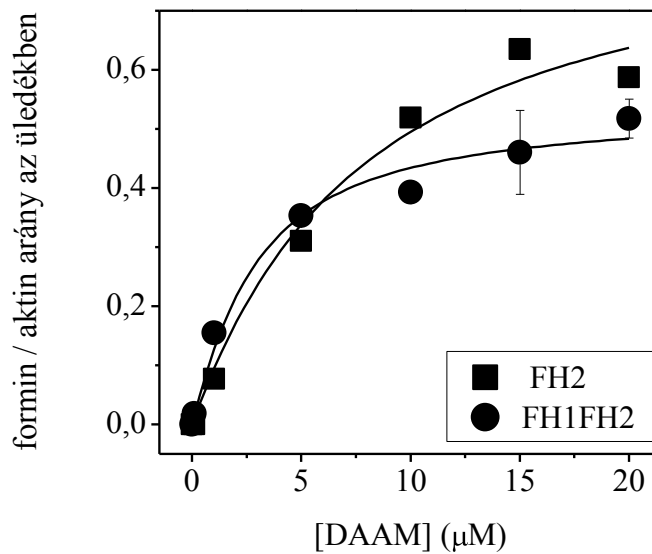
#### IV.5. A DAAM FRAGMENTUMOK AKTIN FILAMENTUMHOZ VALÓ AFFINITÁSA MIKROMOLÁRIS NAGYSÁGRENDŰ

---

Amint az a fentiekben felsorolt mérésekből kitűnik, az általunk alkalmazott DAAM konstrukciók jelentős mértékben hatnak az aktin filamentum polimerizációs tulajdonságaira. Ennek megfelelően felmerült a kérdés, hogy milyen kötési állandóval jellemezhető a formin fragmentumoknak a filamentális aktinhoz való kötődése.

Ennek megállapítására koszedimentációs vizsgálatokat végeztünk. A módszer lényegét az *Anyagok és módszerek* rész tartalmazza.

Vizsgálataink azt mutatták, hogy centrifugálás után a formin pelletben található frakciójának aktinhoz viszonyított aránya telítési görbét mutat a formin koncentrációjának függvényében. Ez látható a *16. ábrán*. Az *Anyagok és módszerek c.* részben leírt (2) *egyenlet* segítségével ebből a forminnak aktinhoz való affinitása számítható. Ez alapján a DAAM FH2 fragmentumnak aktinhoz való disszociációs egyensúlyi állandója  $7 \pm 2,5 \mu\text{M}$ -nak, a DAAM FH1FH2 affinitása pedig  $2,1 \pm 0,5 \mu\text{M}$ -nak adódott. A két konstrukció aktin filamentumhoz való affinitásában tehát némi különbség található. Ez a megfigyelés jól összevethető a korábban a kritikus aktin koncentráció meghatározása során kapott eredményekkel, miszerint az FH2 domén azonos kísérleti elrendezésben kisebb hatást képes kifejteni az aktin filamentumra, mint az FH1FH2 fragmentum. Mindenképpen érdemes azonban a formin fragmentumoknak ezt a viselkedését külön választani az aktin monomerek nukleációjára kifejtett hatásától, hiszen az aktin polimerizációját a pirén teszt során azonos mértékben gyorsították.



16. ábra. A koszedimentációs esszét követően a pelletben található formin és aktin koncentrációarányát ábrázoljuk az alkalmazott formin koncentrációjának függvényében.

Érdekes megfigyelés emellett, hogy a pelletben megjelenő, tehát aktin filamentumhoz kötött formin koncentrációja igen magas. Ha figyelembe vesszük, hogy egy aktin filamentumban átlagosan 2000 aktin monomer van, kiszámítható, hogy a kísérletekben alkalmazott  $1,5 \mu\text{M}$  aktin filamentum végeinek koncentrációja nanomólos nagyságrendbe esik. Ehhez képest a pelletben lévő DAAM fragmentumok koncentrációja mintegy három nagyságrenddel meghaladja az aktin filamentum-végek koncentrációját, amiből arra következtetünk, hogy a formin fragmentumok valószínűleg az aktin filamentumok oldalához is kötnek. Az oldalkötésnek szerepe lehet például abban, hogy a DAAM keresztkötéseket hozhasson létre aktin filamentumok között, mintegy kötegelve azokat. Ezt a jelenséget más forminok esetében már kimutatták [99, 100], emiatt a következőkben leírt módon mi is végeztünk erre vonatkozó vizsgálatokat.

---

## IV.6. A DAAM FH2 ÉS FH1FH2 FRAGMENTUMOK HATÁSA AZ AKTIN FILAMENTUMOK KÖTEGELŐDÉSÉRE ÉS HOSSZELOSZLÁSÁRA

---

---

### IV.6.1. A DAAM FH2 ÉS FH1FH2 FRAGMENTUMOK AKTIN KÖTEGEKET KÉPEZNEK

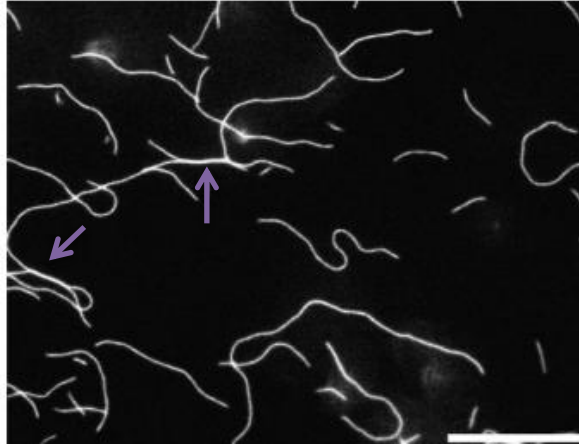
---

Korábban leírt megfigyelések szerint bizonyos forminok képesek az aktin filamentumokat kötegelni („bundling”) [101, 102]. A DAAM-al kapcsolatban korábban leírták, hogy a központ idegrendszerben szerepe van az aktin nukleációjában és elongációjában [103], de az aktin szálak kötegelésben játszott szerepe még nem volt ismert. Az előzőekben leírt koszedimentációs mérések a formin fragmentumoknak az aktin filamentumok oldalához való kötődését látszottak kimutatni, ami utalhat arra, hogy kötegelni képes az aktint. Emiatt célul tűztük ki a DAAM FH2, illetve FH1FH2 konstrukciók aktin filamentumokra kifejtett hatásának vizsgálatát fluoreszcencia mikroszkópiai módszerekkel.

Megfigyeléseinket 0,5  $\mu\text{M}$  DAAM FH2, illetve FH1FH2 mellett, 1  $\mu\text{M}$ -os aktin koncentráció mellett végeztük, annak érdekében, hogy a filamentum oldalaihoz megfelelő mennyiségben kötődhessen a DAAM. Megfigyeléseink jellemző képei a *17-19. ábrán* szerepelnek.

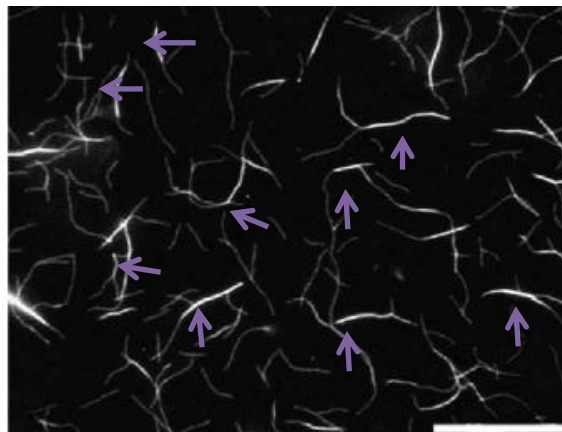
DAAM fragmentumokat nem tartalmazó minta esetén az aktin filamentumok csak igen kis számban képeznek kötegeket. Ezeket a *17. ábrán* nyilak jelölik. A megjelenő filamentumok túlnyomó többsége egyedi aktin filamentum.



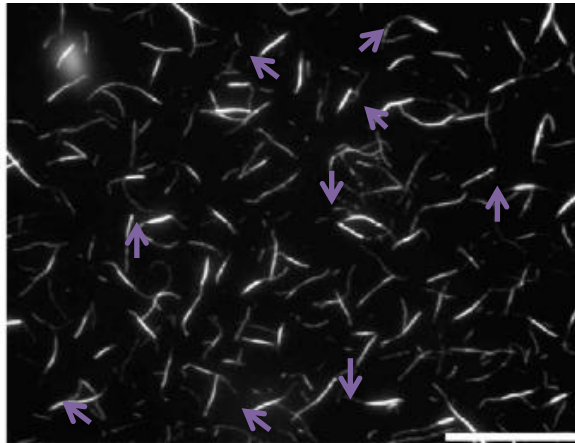


*17. ábra. DAAM fragmentumot nem tartalmazó mintában kevés aktin-köteg figyelhető meg.*

500 nM DAAM FH2 fragmentum jelenlétében polimerizálva az aktin filamentumokat jóval több aktin köteg megjelenése figyelhető meg. Az egyedi aktin filamentumokhoz képest vastagabb és nagyobb intenzitású filamentumok vagy filamentum részek láthatóak ezek esetében. Ezt láthatjuk a *18. ábrán*. Szembeötlő különbség, hogy az egyedi aktin filamentumok ebben az esetben rövidebbnek tűnnek, mint a kontrollként használt, formin-mentes mintában.



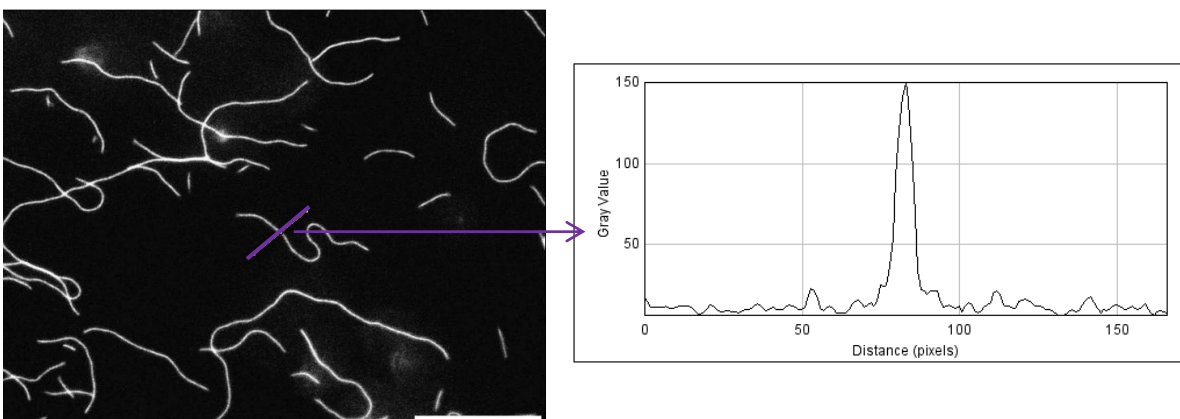
*18. ábra. DAAM FH2 által kötegelt aktin filamentumok.*



19. ábra. A DAAM FH1FH2 fragmentum szintén kötegeket képez, és az egyedi aktin filamentumok is rövidebbek.

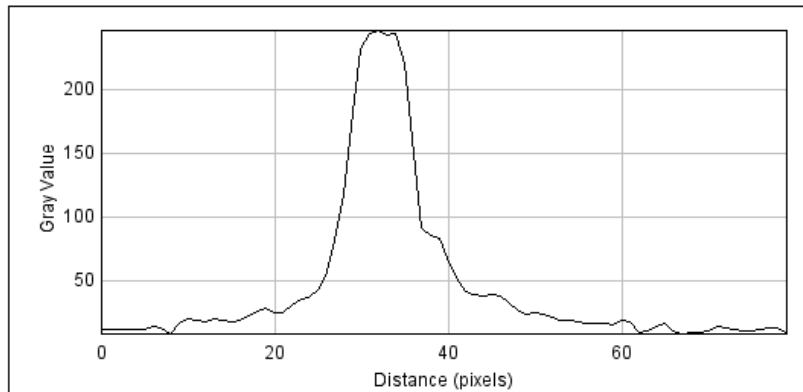
500 nM DAAM FH1FH2 alkalmazása esetén az FH2-t tartalmazó mintához hasonló megfigyeléseket tettünk, azzal a különbséggel, hogy ebben az esetben a filamentum hosszak még kisebbek voltak. Ezen megfigyelések tisztázására a későbbiekben további méréseket végeztünk.

A köteggépzéssel kapcsolatos megfigyeléseket ImageJ program segítségével értékeltük ki. Az egyes mintákban meghatároztuk az átlagos egyedi aktin filamentum szélességét, ahogy az a 20. ábrán látszik.



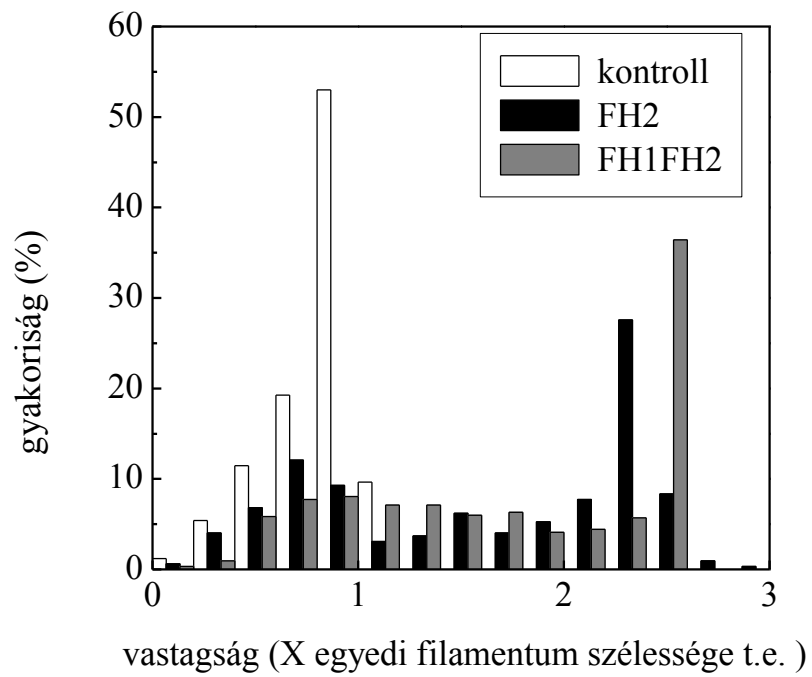
20. ábra. Filamentumok szélességének mérése ImageJ program segítségével.

Ahogy azt vártuk, DAAM fragmentumot tartalmazó minták esetében a filamentumok egy része jóval szélesebb volt, mint ami az egyedi aktin filamentumra jellemző. Erre láthatunk példát az FH2 fragmentum esetében a 21. ábrán.



21. ábra. A DAAM FH2 fragmentum által polimerizált mintában megnő a keresztkötött aktin filamentumok aránya.

Ezt követően az egyedi filamentumhoz tartozó értékre normáltuk a mért filamentumszélességeket, majd a 22. ábrán látható módon ábrázoltuk a filamentumok gyakoriságát a szélesség függvényében. Tehát a filamentum vastagságát az egyedi aktin filamentum szélesség sokszorosaként adtuk meg. Három egymástól független mérést végeztünk, minden minta esetében megközelítőleg száz filamentum szélességét határoztuk meg. Ahogy az a 22. ábrán látszik, a DAAM fragmentumok jelenlétében a filamentumok jelentős populációja, mintegy 30-40 %-a keresztkötést mutat másik aktin filamentummal.



22. ábra. A DAAM fragmentumok kereszt kötik az aktin filamentumokat.

---

#### IV.6.2. A DAAM FRAGMENTUMOK RÖVID AKTIN FILAMENTUMOKAT KÉPEZNEK

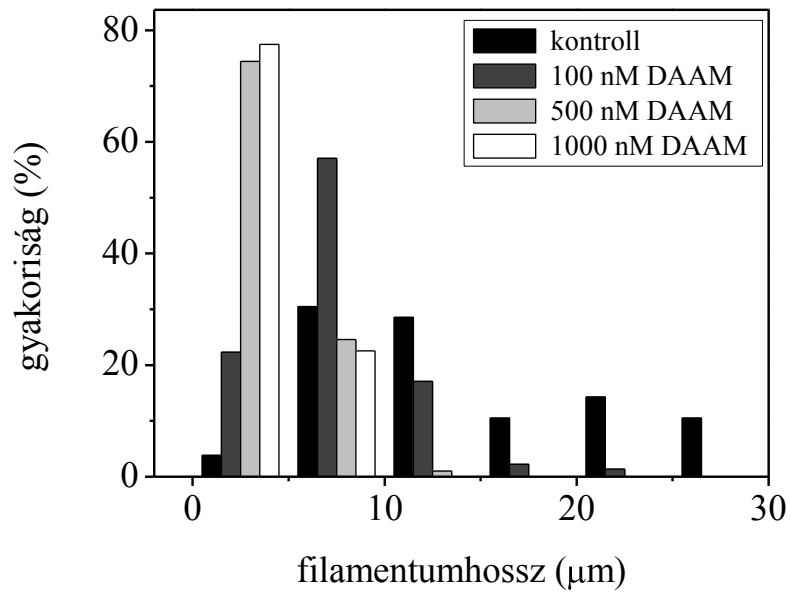
---

Az előzőekben részletezett kötegelődés vizsgálatokor szembeötlően rövidebb filamentumhosszakat figyeltünk meg, ha az aktint DAAM nukleációs faktor jelenlétében polimerizáltuk. Ennek a megfigyelésnek pontosabb alátámasztására az aktint különböző koncentrációjú FH1FH2 fragmentumok jelenlétében polimerizáltunk. Annak érdekében, hogy a kötegeképződés mérést zavaró hatását kiküszöböljük, a mintát nagyobb mértékben hígítottuk ki a mikroszkópos felvételek készítése előtt.

Az ImageJ program segítségével lemértük az egyedi aktin filamentumok hosszát, több DAAM FH1FH2 koncentráció mellett. Az egyes minták elemszáma száz és háromszáz között változott.

A *23. ábrán* az egyes filamentumhossz-értékekhez tartozó gyakoriságokat ábrázoltuk, a *4. táblázatban* pedig az egyes formin koncentrációkhoz tartozó átlagos filamentumhosszak láthatóak.

Amint azt a fenti megfigyelések alapján vártuk, a filamentumok hossza nagyban függ a formin koncentrációjától: növekvő formin koncentrációk esetén egyre rövidebb filamentumokat figyelhetünk meg.



23. ábra. Az aktin filamentumok átlagos hossza fordított arányban áll az alkalmazott DAAM koncentrációval.

4. táblázat. Az átlagos filamentumhossz forminkoncentráció függése.

<i>DAAM koncentrációja</i>	<i>Átlagos filamentum hossz (µm)</i>	<i>Szórás (SD) (µm)</i>
<i>0 M</i>	14,36	7,57
<i>100 nM</i>	7,69	3,60
<i>500 nM</i>	3,86	2,01
<i>1000 nM</i>	3,73	1,80

Ezekből az adatokból arra következtethetünk (figyelembe véve a korábbi, polimerizációs tesztek során kapott eredményeket), hogy a DAAM által nukleált filamentumok jóval rövidebbek, mint a formin-mentes rendszerben polimerizáltak.

Erre a DAAM fragmentumok sapkafehérje-funkciója szolgálhat magyarázatként. Ugyanis a nukleációt követően a forminok kötve maradnak a filamentum pozitív végén, és befolyásolják a monomerek további beépülését. Ennek következménye lehet a „steady state” mérésekben kialakuló rövidebb filamentumhossz.

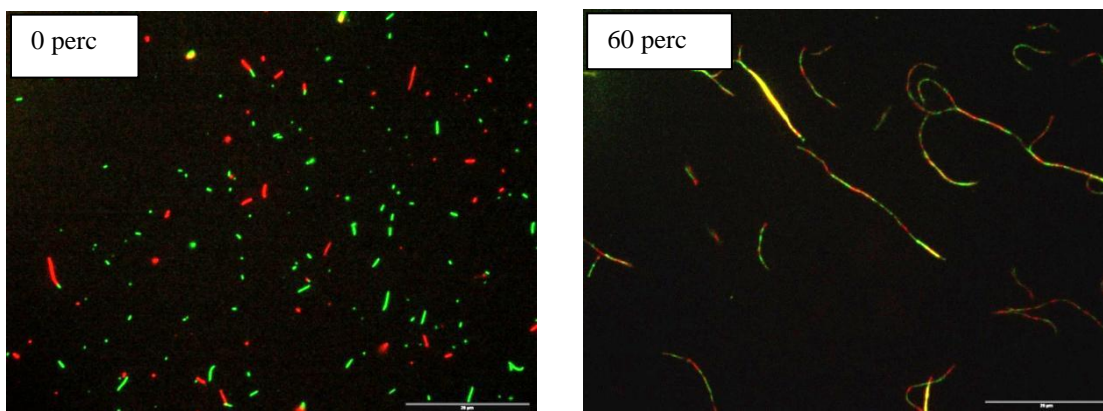
---

#### IV.6.3. AZ DAAM FH1FH2 KONSTRUKCIÓ HATÁSSAL VAN AZ AKTIN FILAMENTUMOK VÉG-VÉG KAPCSOLÓDÁSÁRA

---

Korábbi, a szakirodalomban megjelent, illetve kollaborációs partnereink által leírt megfigyelések alapján célunk volt megvizsgálni, hogy a *Drosophila* DAAM FH1FH2 fragmentumnak van-e hatása az aktin filamentumok vég-vég kapcsolódására.

Vizsgálataink során először teszteltük, hogy az alkalmazott kísérleti összeállításban megtörténik-e az aktin filamentumok vég-vég kapcsolódása („annealing”). Ehhez a filamentumok egyik felét zöld (Alexa 488 konjugált), a másikat piros (Alexa 568 konjugált) falloidinnel jelöltük, majd összekevertük. A korábban leírt módon inzulinos fecskendő segítségével fragmentáltuk a filamentumokat. Ezt követően idővel megfigyelhetővé váltak az egyedi aktin filamentumok, melyek váltakozó piros és zöld részekből álltak, igazolván az annealing megtörténtét. Ennek egy jellemző képét mutatja a 24. ábra.

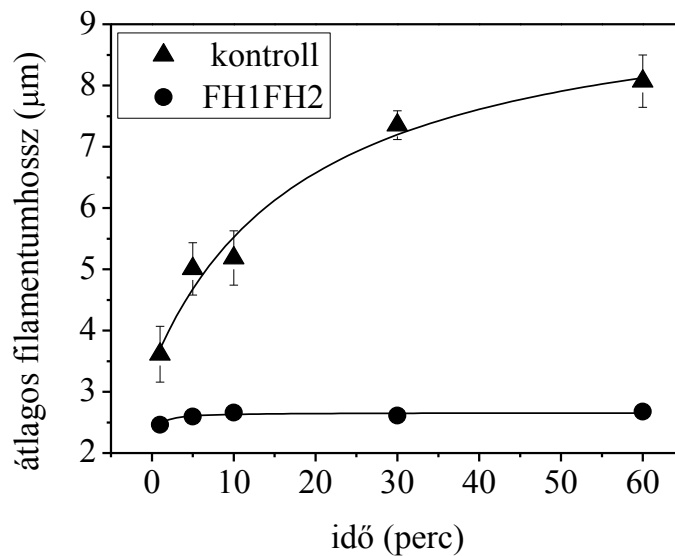


24. ábra. Két színnel jelölt aktin filamentumok közvetlenül az összetörés után és egy órával később.

A két fluorofór eltérő fotostabilitása, és a mikroszkóp hullámhosszfüggő felbontóképessége miatt a további méréseket egyszínű (Alexa 488 konjugált) falloidinnel végeztük. Vizsgálataink során az aktin filamentumok hosszeloszlását vizsgáltuk az idő függvényében, csak aktint tartalmazó, valamint 1  $\mu$ M DAAM FH1FH2 jelenlétében polimerizált filamentumok esetén. Minden minta esetén száz és háromszáz közötti elemszámmal dolgoztunk.



A 25. ábrán látható eredményeink azt mutatják, hogy - összhangban a korábbi, a forminnak az aktin filamentumok hosszára vonatkozó vizsgálatok eredményeivel - a formin jelenlétében időegység alatt elért átlagos filamentumhossz jóval rövidebb, mint a spontán polimerizált aktin esetén.



25. ábra. A DAAM jelenlétében lezajló vég-vég kapcsolódás jóval rövidebb filamentumokat eredményez.

Az *Anyagok és módszerek* c. részben leírt (3) egyenlet illesztésével megállapítottuk az annealingre jellemző sebességi állandót, a kontroll és a DAAM FH1FH2 fragmentumot tartalmazó minták esetén. Eredményeinket az 5. táblázatban foglaltuk össze.

5. táblázat. A DAAM megváltoztatja az annealing sebességét.

<i>Paraméter</i>	<i>DAAM FH1FH2 nélkül</i>	<i>DAAM FH1FH2 jelenlétében</i>
$l_{min} (\mu m)$	$3,41 \pm 0,44$	$1,99 \pm 1,96$
$l_{max} (\mu m)$	$9,66 \pm 1,02$	$2,66 \pm 0,03$
$K (perc)$	$19,42 \pm 10,24$	$0,43 \pm 1,82$

---

## IV.7: A DAAM FH1FH2 KONSTRUKCIÓ PROFILINNEL VALÓ KÖLCSÖNHATÁSÁÉRT AZ FH1 DOMÉN FELELŐS

---

---

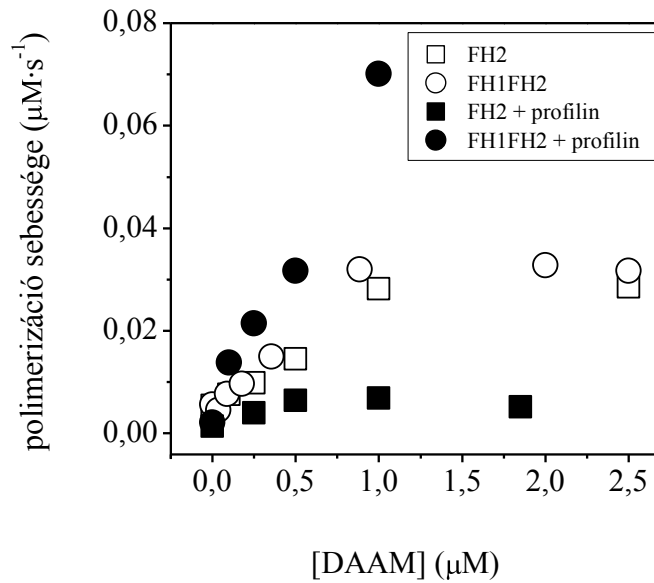
---

### IV.7.1: A PROFILIN A DAAM FH1 DOMÉNJÉVEL KÖLCSÖNHATVA KÉPES A POLIMERIZÁCIÓ GYORSÍTÁSÁRA

---

Más forminok esetében már kimutatták, hogy a filamentum plusz végéhez kötődő formin képes az FH1-profilin kölcsönhatás révén a profilinhez kötött aktin monomerek filamentumba való beépítésére, még hozzá nagyobb sebességgel, mint a profilint nem kötő aktin esetén [39, 47, 104]. További kísérleteink során emiatt felmerült a kérdés, vajon a DAAM FH2, illetve FH1FH2 esetén létezik-e hasonló kölcsönhatás.

Vizsgálataink során a korábban leírt pirén fluoreszcencia intenzitást követő módszerrel végeztünk polimerizációs teszteket, azzal a különbséggel, hogy közvetlenül a polimerizációs só és formin hozzáadása után 5  $\mu$ M profilint adtunk a mintához. Megfigyeltük, hogy DAAM FH2 esetén a 26. ábrán látható módon a polimerizáció nagymértékben lelassul, viszont DAAM FH1FH2-t használva a polimerizációs sebesség jelentős gyorsulása figyelhető meg.



26. ábra. A DAAM FH1FH2 kölcsönhat a profilinnal a polimerizáció gyorsításában

Minderre magyarázatként a DAAM FH1 doménjének profilinnal való kölcsönhatása szolgálhat. A profilin ugyanis önmagában kissé lassítja a polimerizációt, mivel a monomerek filamentumba való beépülését kis mértékben gátolja [75]. A DAAM FH2 doménje nem képes kapcsolódni a profilinhez, és az alkalmazott koncentrációkban a profilin gátló hatása felülkerekedik az FH2 domén nukleációt elősegítő tulajdonságán.

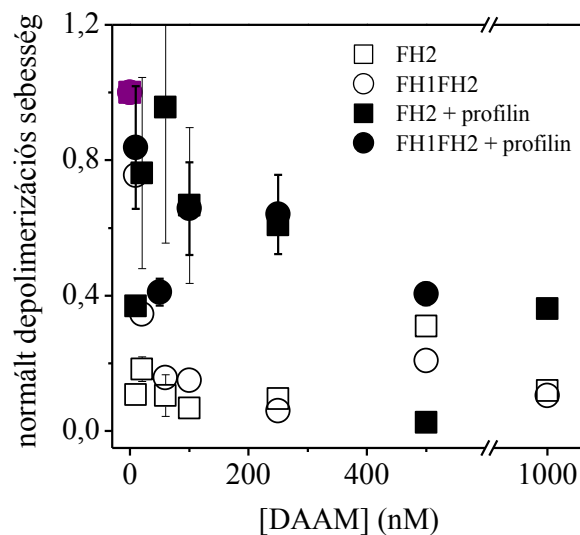
Az FH1FH2 fragmentumot tartalmazó minta esetében azonban a profilinnek teljesen más hatását figyelhetjük meg: a DAAM FH1 doménjét képes kötni, és ezen kapcsolat által a profilinhez kötött aktin monomer beépülését képes elősegíteni a filamentum plusz végén. Ezáltal lehetővé válik, hogy a monomerek beépülése még gyorsabban történjen meg, mint a csak DAAM fragmentumot tartalmazó minta esetében. Ennek megfelelően a korábban más forminok esetében leírt FH1-profilin kölcsönhatás [63, 66, 67] a DAAM esetében is igaznak bizonyul.

---

 IV.7.2: A DAAM FRAGMENTUMOK LECSÖKKENTIK A MONOMEREK DISSZOCIÁCIÓJÁT A FILAMENTUMRÓL PROFILIN JELENLÉTÉBEN IS
 

---

A szakirodalomban leírt megfigyelések szerint a profilin meggyorsíthatja az aktin monomerek disszociációját a filamentum végéről [105, 106]. Kísérleteinkben azt vizsgáltuk meg, hogy a DAAM fragmentumok modulálják-e ezt a hatást. Ennek megállapítására depolimerizációs tesztekét végeztünk formin által polimerizált filamentumokon, 5  $\mu\text{M}$  profilin jelenlétében. Eredményeink azt mutatják, hogy a profilin depolimerizációt elősegítő hatása érvényesül ugyan, de mindkét formin konstrukció képes csökkenteni az aktin monomerek disszociációját a filamentum végéről. Az általunk alkalmazott kísérleti elrendezésben a két DAAM fragmentum között nem volt mérhető különbség, még profilin jelenlétében sem. Ez arra utalhat, hogy a depolimerizáció során a korábban leírt FH1 domén-profilin kölcsönhatásnak nincsen szerepe.



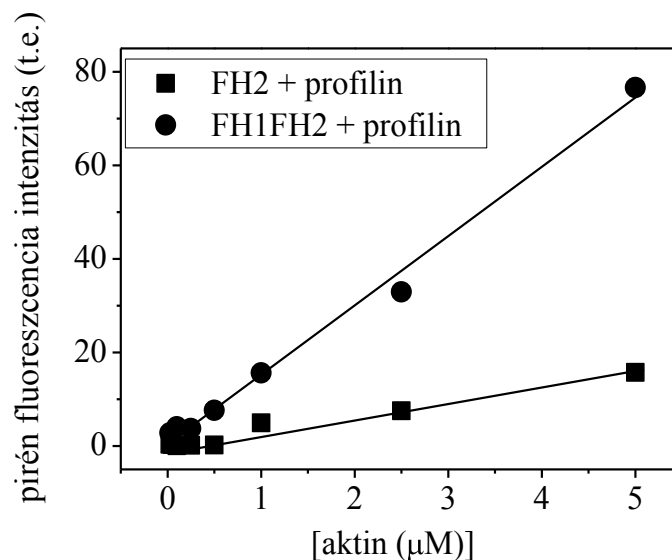
27. ábra. A DAAM fragmentumok képesek lecsökkenteni a monomerek profilin által kiváltott disszociációjának sebességét. A lila szimbólum a DAAM-mentes mintát jelöli.

---

### IV.7.3: A DAAM FH1 DOMÉNJE KÖLCSÖNHAT PROFILINNEL A KRITIKUS AKTIN KONCENTRÁCIÓ FENNTARTÁSÁBAN

---

A korábbi, az aktin kritikus koncentrációjával kapcsolatos méréseinket megismételtük profilin jelenlétében is. Ennek eredményét mutatja a 28. ábra. Megfigyeléseink szerint a DAAM FH2 profilin jelenlétében kevesebb filamentumot volt képes létrehozni, ami azzal magyarázható, hogy az FH1 domén hiányában nem jön létre kölcsönhatás a formin és a profilin között. Ez esetben tehát a profilinnek az a tulajdonsága kerül előtérbe, ami a sejtben is a feladata, mégpedig az aktinnak a monomer formában való tartása. A DAAM FH1 doménje modulálni képes ezt a tulajdonságot: rábírja a profilint arra, hogy a kötött aktin monomerről ledisszociálva annak aktin filamentumba való épülése megtörténhessen.



28. ábra. A DAAM FH1FH2 profilin jelenlétében is fenntartja a kritikus aktin koncentrációt (t.e.: tetszőleges egységek).

## V. EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

---

Vizsgálataink során a *Drosophila melanogaster* DAAM hatását vizsgáltuk vázizom aktin tulajdonságaira két konstrukció felhasználásával. Az egyik az aktin kötéséért felelős részt (FH2), a másik ennek a profilin kötésére képes résszel kiegészített darabját (FH1FH2) foglalta magában.

➤ Méréseink során a DAAM polimerizációt gyorsító hatását figyeltük meg, mind FH2, mind FH1FH2 fragmentumok esetében. Eredményeink szerint az aktin polimerizációjának sebessége függ a jelenlévő formin koncentrációjától, azonban meghatározott értéket elérve tovább már nem fokozható, telítést mutat.

➤ Kísérleteink során megbizonyosodtunk arról, hogy az FH1 doménnek a csak aktint tartalmazó rendszerben (profilin nélkül) nincsen hatása az aktin polimerizációjára.

➤ Élesztő profilin jelenlétében a polimerizáció sebességének drasztikus növekedését figyelhettük meg a DAAM FH1FH2 konstrukció esetén, míg a DAAM FH2 domén esetében csak a profilin lassító hatását láttuk. Korábbi megfigyelések alapján ez a formin FH1 doménje és a profilin közötti kölcsönhatás kialakulásával magyarázható.

➤ Depolimerizációs vizsgálatokkal kimutattuk, hogy a DAAM konstrukciók gátolják a monomerek disszociációját az aktin filamentumról, és magasabb ( $1 \mu\text{M} \leq$ ) formin koncentráció esetén a profilin depolimerizációt elősegítő hatását is képesek megszüntetni.

➤ Megfigyeléseink alapján elmondhatjuk, hogy az alkalmazott formin fragmentumoknak nincsen jelentős hatásuk az aktin kritikus koncentrációjára.

➤ Kimutattuk továbbá, hogy a DAAM FH1FH2 konstrukció a profilin által előidézett kritikus koncentráció növekedést megszüntette, ami –összevetve a csak FH2

fragmentumot tartalmazó mérések eredményeivel- a profilin-FH1 kölcsönhatásnak tulajdonítható.

➤ A két formin fragmentumnak az aktin filamentumhoz való affinitása DAAM FH2 esetében  $7 \pm 2,5 \mu\text{M}$ -nak, a DAAM FH1FH2-re pedig  $2,1 \pm 0,5 \mu\text{M}$ -nak adódott. Ezek az adatok jól illeszkednek a szakirodalomban fellelhető, más forminok esetében kapott affinitás-értékekkel.

➤ A koszedimentációs vizsgálatok eredményei, valamint a mikroszkópos megfigyelések megmutatták, hogy mindkét DAAM konstrukció képes az aktin filamentumok kötegelésére.

➤ Egyedi aktin filamentumokon végzett hosszeloszlás mérések révén megállapítottuk, hogy a DAAM formin mind a polimerizáció, mind a filamentumok vég-a-véghez való kapcsolódásának szabályozása révén az átlagosnál jóval rövidebb filamentumokat hoz létre.

## VI. TOVÁBBVEZETŐ GONDOLATOK

---

Az elvégzett kísérletek kiértékelését követően sok kérdés merült fel, amelyek túlmutatnak e munka keretein.

A már leírt, élesztő profilinnal végzett polimerizációs tesztek folyamányaként felmerül más profilin izoformák vizsgálatának lehetősége. A szakirodalomban fellelhető megfigyelések alapján ugyanis az eltérő profilin izoformák a különböző típusú (illetve más-más élőlényekből származó) forminokkal különböző mértékben gyorsítják az aktin polimerizációját [39, 63, 66, 68, 104, 107, 108]. Érdekesség például, hogy az egyazon organizmusból származó formin-profilin párok nagyobb mértékben képesek az aktin polimerizációjának fokozására, mint a „vegyes” összeállításban szereplők [104]. Ennek a fehérjék szerkezetével, konformációs dinamikájával való összefüggése, illetve a jelenség magyarázata még távolról sem ismert. Hasonlóképpen, (ahogy a mi méréseinkből is kitűnik) még nem került leírásra a formin-profilin kölcsönhatás által indukált, az aktin polimerizációja során elérhető maximális sebesség, illetve annak meghatározása, hogy mi lehet a sebesség meghatározó lépés ebben a folyamatban. Ezeknek a kérdéseknek esetleges tisztázása például stopped flow technikával lehetséges.

Ugyanehhez a gondolatsorhoz kapcsolódik a formin-FH1 kölcsönhatás részleteinek további felderítése. Mivel a forminok FH1 doménjének izolálása elviekben önmagában is megoldható [104], lehetőség lenne fluoreszcencia spektroszkópiai, illetve EPR technikákkal a direkt profilin-FH1 kölcsönhatás további vizsgálatára. Ezen túlmutatóan pedig (kereszt kötött, vagy más okból kifolyólag polimerizációs képességét veszített aktin felhasználásával) direkt módon a filamentum pozitív végéhez kötődő formin és az aktin monomert kötő profilin kölcsönhatásának leírására.

Forminok esetében (az aktin és a profilin mellett) igen nagyszámú egyéb aktin-kötő fehérje is felmerül kölcsönható partnerként. Ezeknek a kölcsönhatásoknak egy része az aktin citoskeleton szervezésében játszik szerepet, más interakciók esetében szerepük még nem tisztázott. Forminok esetében leírtak már például más nukleációs faktorokkal



[109-111], tropomiozinnal [112], valamint a mikrotubuláris rendszerrel való kölcsönhatást, direkt kötődést is [113].

Számunkra egy igen érdekes, aktinnal is kapcsolatos formin-kötő „jelölt” a miozinok családja. Nemrégiben jelent meg olyan publikáció, mely alapján a miozin és a DAAM közötti kölcsönhatásra következtethetünk [114]. Ugyanakkor direkt formin-miozin kapcsolatot eddig még nem írtak le. A DAAM vonatkozásában lehetséges „jelöltként” szóba kerül a II-es és a (még kis mértékben ismert) XVIII-as típusú miozin. Előbbi azért, mert már megfigyelték a nem-izom miozin IIB és a DAAM bizonyos konstrukcióinak kolokalizációját [114]. Utóbbi pedig egy sajátos, PDZ domén típusú szerkezeti eleme miatt [115], amely lehetséges kötő régióként jön szóba, ugyanis a DAAM fehérje a Wnt jelátvitelben upstream regulátorához (Dsh/Dvl) éppen ilyen típusú doménon keresztül kapcsolódik [87]. Egyrészt a miozinokkal kapcsolatos megfigyelések, másrészt korábbi, Mihály és munkatársai által leírt eredmények arra engednek következtetni, hogy a DAAM-nak az izom szarkomerben is lehet kiemelkedően fontos szerepe. Egyes megfigyelések szerint a vázizom fejlődése során kezdeti lépésként nem-izom miozinok építik fel a szarkomerek kezdeményeit, és később ezek lecserélődése során alakul ki a funkcióképes, kifejlett egyedre jellemző, strukturált szarkomer [116-119]. Leírták, hogy a DAAM mennyisége is változik az izom fejlődése során (<http://flybase.org/reports/FBgn0025641.html>). Mindazonáltal eddig nem született olyan munka, amely a miozinok és a forminok közötti, az egyedfejlődés során jelentőséggel bíró esetleges összefüggéseket vizsgálná.

Az izommal kapcsolatosan meglehetősen kevés ismeret áll rendelkezésre az aktin filamentumok nukleációjára vonatkozóan (szívizom FHOD3[120], váz-és szívizom leiomodinok [21]). Mivel a DAAM a szarkomerben (a bizonyítottan izom-specifikus aktin nukleátorokhoz hasonlóan) a H-zóna, tehát a filamentumok mínusz vége felé lokalizálódik, az izom fejlődésében és szabályozásában játszott esetleges szerepe felmerülhet. Ezzel kapcsolatos érdekes vizsgálati módszer, ha a vizsgálati állatban a célfehérjét (jelen esetben a DAAM-ot) például GFP-konjugált konstrukcióban termeltetjük meg. Ebben az esetben és az izom fejlődése során a vizsgálni kívánt fehérjénk lokalizációját vizsgálhatjuk, közvetlenül az izomban, egy, a bőr helyére beültetett, átlátszó lapkán, mint „ablakon” keresztül [121-125]. Egyéb folyamatok

vizsgálatára ez már egy széles körben elterjedt technikának számít, gyakorlati megvalósítása nyilván további kérdéseket vet fel.

## VII. IRODALOMJEGYZÉK

---

1. Sheterline, P., J. Clayton, and J. Sparrow, *Actin*. Protein Profile, 1995. **2**(1): p. 1-103.
2. Sheterline, P. and J.C. Sparrow, *Actin*. Protein Profile, 1994. **1**(1): p. 1-121.
3. Grzanka, A., D. Grzanka, and M. Orlikowska, *Fluorescence and ultrastructural localization of actin distribution patterns in the nucleus of HL-60 and K-562 cell lines treated with cytostatic drugs*. *Oncol Rep*, 2004. **11**(4): p. 765-70.
4. Dingova, H., et al., *Ultrastructural localization of actin and actin-binding proteins in the nucleus*. *Histochem Cell Biol*, 2009. **131**(3): p. 425-34.
5. Castano, E., et al., *Actin complexes in the cell nucleus: new stones in an old field*. *Histochem Cell Biol*. **133**(6): p. 607-26.
6. Vandekerckhove, J., G. Bugaisky, and M. Buckingham, *Simultaneous expression of skeletal muscle and heart actin proteins in various striated muscle tissues and cells. A quantitative determination of the two actin isoforms*. *J Biol Chem*, 1986. **261**(4): p. 1838-43.
7. Wang, H., R.C. Robinson, and L.D. Burtnick, *The structure of native G-actin*. *Cytoskeleton (Hoboken)*. **67**(7): p. 456-65.
8. Murakami, K., et al., *Structural basis for actin assembly, activation of ATP hydrolysis, and delayed phosphate release*. *Cell*. **143**(2): p. 275-87.
9. Higashi, S. and F. Oosawa, *Conformational changes associated with polymerization and nucleotide binding in actin molecules*. *J Mol Biol*, 1965. **12**(3): p. 843-65.
10. Kinoshian, H.J., et al., *Thermodynamics of actin polymerization; influence of the tightly bound divalent cation and nucleotide*. *Biochim Biophys Acta*, 1991. **1077**(2): p. 151-8.
11. Gaszner, B., et al., *Replacement of ATP with ADP affects the dynamic and conformational properties of actin monomer*. *Biochemistry*, 1999. **38**(39): p. 12885-92.
12. Hartvig, N., et al., *Effect of nucleotides and their analogues on essential light chains in myosin head*. *J Biochem Biophys Methods*, 2002. **53**(1-3): p. 67-74.
13. D. Lőrinczy, B.G., F. Könczöl, J. Belágyi, *Effect of nucleotides on thermal transitions of myosin*. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 1999. **56**: p. 1203-1209.
14. Chesarone, M.A. and B.L. Goode, *Actin nucleation and elongation factors: mechanisms and interplay*. *Curr Opin Cell Biol*, 2009. **21**(1): p. 28-37.

15. Mullins, R.D., J.A. Heuser, and T.D. Pollard, *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 U S A, 1998. **95**(11): p. 6181-6.
16. Blanchoin, L., et al., *Direct observation of dendritic actin filament networks nucleated by Arp2/3 complex and WASP/Scar proteins*. Nature, 2000. **404**(6781): p. 1007-11.
17. Campellone, K.G. and M.D. Welch, *A nucleator arms race: cellular control of actin assembly*. Nat Rev Mol Cell Biol. **11**(4): p. 237-51.
18. Qualmann, B. and M.M. Kessels, *New players in actin polymerization--WH2-domain-containing actin nucleators*. Trends Cell Biol, 2009. **19**(6): p. 276-85.
19. Baum, B. and P. Kunda, *Actin nucleation: spire - actin nucleator in a class of its own*. Curr Biol, 2005. **15**(8): p. R305-8.
20. Winckler, B. and D.A. Schafer, *Cordon-bleu: a new taste in actin nucleation*. Cell, 2007. **131**(2): p. 236-8.
21. Chereau, D., et al., *Leiomodin is an actin filament nucleator in muscle cells*. Science, 2008. **320**(5873): p. 239-43.
22. Jewett, T.J., et al., *Chlamydial TARP is a bacterial nucleator of actin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(42): p. 15599-604.
23. Pruyne, D., et al., *Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association*. Science, 2002. **297**(5581): p. 612-5.
24. Sagot, I., S.K. Klee, and D. Pellman, *Yeast formins regulate cell polarity by controlling the assembly of actin cables*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(1): p. 42-50.
25. Sagot, I., et al., *An actin nucleation mechanism mediated by Bni1 and profilin*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(8): p. 626-31.
26. Carlsson, L., et al., *Crystallization of a non-muscle actin*. J Mol Biol, 1976. **105**(3): p. 353-66.
27. Tilney, L.G., *The polymerization of actin. III. Aggregates of nonfilamentous actin and its associated proteins: a storage form of actin*. J Cell Biol, 1976. **69**(1): p. 73-89.
28. Blasco, R., N.B. Cole, and B. Moss, *Sequence analysis, expression, and deletion of a vaccinia virus gene encoding a homolog of profilin, a eukaryotic actin-binding protein*. J Virol, 1991. **65**(9): p. 4598-608.
29. Machesky, L.M. and T.D. Poland, *Profilin as a potential mediator of membrane-cytoskeleton communication*. Trends Cell Biol, 1993. **3**(11): p. 381-5.

30. Fedorov, A.A., T.D. Pollard, and S.C. Almo, *Purification, characterization and crystallization of human platelet profilin expressed in Escherichia coli*. J Mol Biol, 1994. **241**(3): p. 480-2.
31. Thorn, K.S., et al., *The crystal structure of a major allergen from plants*. Structure, 1997. **5**(1): p. 19-32.
32. Lu, J. and T.D. Pollard, *Profilin binding to poly-L-proline and actin monomers along with ability to catalyze actin nucleotide exchange is required for viability of fission yeast*. Mol Biol Cell, 2001. **12**(4): p. 1161-75.
33. Machesky, L.M., P.J. Goldschmidt-Clermont, and T.D. Pollard, *The affinities of human platelet and Acanthamoeba profilin isoforms for polyphosphoinositides account for their relative abilities to inhibit phospholipase C*. Cell Regul, 1990. **1**(12): p. 937-50.
34. Lambrechts, A., et al., *The mammalian profilin isoforms display complementary affinities for PIP2 and proline-rich sequences*. Embo J, 1997. **16**(3): p. 484-94.
35. Mockrin, S.C. and E.D. Korn, *Acanthamoeba profilin interacts with G-actin to increase the rate of exchange of actin-bound adenosine 5'-triphosphate*. Biochemistry, 1980. **19**(23): p. 5359-62.
36. Perelroizen, I., et al., *Role of nucleotide exchange and hydrolysis in the function of profilin in actin assembly*. J Biol Chem, 1996. **271**(21): p. 12302-9.
37. Pring, M., A. Weber, and M.R. Bubb, *Profilin-actin complexes directly elongate actin filaments at the barbed end*. Biochemistry, 1992. **31**(6): p. 1827-36.
38. Nodelman, I.M., et al., *X-ray structure determination of human profilin II: A comparative structural analysis of human profilins*. J Mol Biol, 1999. **294**(5): p. 1271-85.
39. Paul, A.S. and T.D. Pollard, *The role of the FHI domain and profilin in formin-mediated actin-filament elongation and nucleation*. Curr Biol, 2008. **18**(1): p. 9-19.
40. Woychik, R.P., et al., *An inherited limb deformity created by insertional mutagenesis in a transgenic mouse*. Nature, 1985. **318**(6041): p. 36-40.
41. Woychik, R.P., et al., *'Formins': proteins deduced from the alternative transcripts of the limb deformity gene*. Nature, 1990. **346**(6287): p. 850-3.
42. Chalkia, D., et al., *Origins and evolution of the formin multigene family that is involved in the formation of actin filaments*. Mol Biol Evol, 2008. **25**(12): p. 2717-33.
43. Paul, A.S. and T.D. Pollard, *Review of the mechanism of processive actin filament elongation by formins*. Cell Motil Cytoskeleton, 2009. **66**(8): p. 606-17.

44. Liu, R., et al., *Formins in development: orchestrating body plan origami*. Biochim Biophys Acta. **1803**(2): p. 207-25.
45. Rivero, F., et al., *A comparative sequence analysis reveals a common GBD/FH3-FH1-FH2-DAD architecture in formins from Dictyostelium, fungi and metazoa*. BMC Genomics, 2005. **6**: p. 28.
46. Higgs, H.N., *Formin proteins: a domain-based approach*. Trends Biochem Sci, 2005. **30**(6): p. 342-53.
47. Goode, B.L. and M.J. Eck, *Mechanism and function of formins in the control of actin assembly*. Annu Rev Biochem, 2007. **76**: p. 593-627.
48. Wallar, B.J. and A.S. Alberts, *The formins: active scaffolds that remodel the cytoskeleton*. Trends Cell Biol, 2003. **13**(8): p. 435-46.
49. Petersen, J., et al., *FH3, a domain found in formins, targets the fission yeast formin Fus1 to the projection tip during conjugation*. J Cell Biol, 1998. **141**(5): p. 1217-28.
50. Madrid, R., et al., *Oligomerization of the diaphanous-related formin FHOD1 requires a coiled-coil motif critical for its cytoskeletal and transcriptional activities*. FEBS Lett, 2005. **579**(2): p. 441-8.
51. Watanabe, N., et al., *Cooperation between mDial and ROCK in Rho-induced actin reorganization*. Nat Cell Biol, 1999. **1**(3): p. 136-43.
52. Nakano, K., et al., *Distinct actions and cooperative roles of ROCK and mDia in Rho small G protein-induced reorganization of the actin cytoskeleton in Madin-Darby canine kidney cells*. Mol Biol Cell, 1999. **10**(8): p. 2481-91.
53. Umikawa, M., et al., *Interaction of Rho1p target Bni1p with F-actin-binding elongation factor 1alpha: implication in Rho1p-regulated reorganization of the actin cytoskeleton in Saccharomyces cerevisiae*. Oncogene, 1998. **16**(15): p. 2011-6.
54. Evangelista, M., et al., *Bni1p, a yeast formin linking cdc42p and the actin cytoskeleton during polarized morphogenesis*. Science, 1997. **276**(5309): p. 118-22.
55. Imamura, H., et al., *Bni1p and Bnr1p: downstream targets of the Rho family small G-proteins which interact with profilin and regulate actin cytoskeleton in Saccharomyces cerevisiae*. Embo J, 1997. **16**(10): p. 2745-55.
56. Kohno, H., et al., *Bni1p implicated in cytoskeletal control is a putative target of Rho1p small GTP binding protein in Saccharomyces cerevisiae*. Embo J, 1996. **15**(22): p. 6060-8.
57. Castrillon, D.H. and S.A. Wasserman, *Diaphanous is required for cytokinesis in Drosophila and shares domains of similarity with the products of the limb deformity gene*. Development, 1994. **120**(12): p. 3367-77.

58. Li, F. and H.N. Higgs, *The mouse Formin mDial is a potent actin nucleation factor regulated by autoinhibition*. *Curr Biol*, 2003. **13**(15): p. 1335-40.
59. Satoh, S. and T. Tominaga, *mDia-interacting protein acts downstream of Rho-mDia and modifies Src activation and stress fiber formation*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(42): p. 39290-4.
60. Ramirez-Espain, X., et al., *Structural characterization of a new binding motif and a novel binding mode in group 2 WW domains*. *J Mol Biol*, 2007. **373**(5): p. 1255-68.
61. Tanaka, M. and H. Shibata, *Poly(L-proline)-binding proteins from chick embryos are a profilin and a profilactin*. *Eur J Biochem*, 1985. **151**(2): p. 291-7.
62. Pring, M., et al., *Mechanism of formin-induced nucleation of actin filaments*. *Biochemistry*, 2003. **42**(2): p. 486-96.
63. Kovar, D.R., et al., *The fission yeast cytokinesis formin Cdc12p is a barbed end actin filament capping protein gated by profilin*. *J Cell Biol*, 2003. **161**(5): p. 875-87.
64. Kursula, P., et al., *High-resolution structural analysis of mammalian profilin 2a complex formation with two physiological ligands: the formin homology 1 domain of mDial and the proline-rich domain of VASP*. *J Mol Biol*, 2008. **375**(1): p. 270-90.
65. Michelot, A., et al., *The formin homology 1 domain modulates the actin nucleation and bundling activity of Arabidopsis FORMIN1*. *Plant Cell*, 2005. **17**(8): p. 2296-313.
66. Kovar, D.R. and T.D. Pollard, *Insertional assembly of actin filament barbed ends in association with formins produces piconewton forces*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(41): p. 14725-30.
67. Pollard, T.D., *Formins coming into focus*. *Dev Cell*, 2004. **6**(3): p. 312-4.
68. Kovar, D.R., *Molecular details of formin-mediated actin assembly*. *Curr Opin Cell Biol*, 2006. **18**(1): p. 11-7.
69. Yamashita, M., et al., *Crystal structure of human DAAM1 formin homology 2 domain*. *Genes Cells*, 2007. **12**(11): p. 1255-65.
70. Xu, Y., et al., *Crystal structures of a Formin Homology-2 domain reveal a tethered dimer architecture*. *Cell*, 2004. **116**(5): p. 711-23.
71. Otomo, T., et al., *Structural basis of actin filament nucleation and processive capping by a formin homology 2 domain*. *Nature*, 2005. **433**(7025): p. 488-94.
72. Shimada, A., et al., *The core FH2 domain of diaphanous-related formins is an elongated actin binding protein that inhibits polymerization*. *Mol Cell*, 2004. **13**(4): p. 511-22.

73. Harris, E.S., F. Li, and H.N. Higgs, *The mouse formin, FRLalpha, slows actin filament barbed end elongation, competes with capping protein, accelerates polymerization from monomers, and severs filaments*. J Biol Chem, 2004. **279**(19): p. 20076-87.
74. Zigmond, S.H., et al., *Formin leaky cap allows elongation in the presence of tight capping proteins*. Curr Biol, 2003. **13**(20): p. 1820-3.
75. Goldschmidt-Clermont, P.J., et al., *Mechanism of the interaction of human platelet profilin with actin*. J Cell Biol, 1991. **113**(5): p. 1081-9.
76. Romero, S., et al., *Formin is a processive motor that requires profilin to accelerate actin assembly and associated ATP hydrolysis*. Cell, 2004. **119**(3): p. 419-29.
77. Moseley, J.B., et al., *A conserved mechanism for Bni1- and mDia1-induced actin assembly and dual regulation of Bni1 by Bud6 and profilin*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(2): p. 896-907.
78. Chhabra, E.S. and H.N. Higgs, *INF2 Is a WASP homology 2 motif-containing formin that severs actin filaments and accelerates both polymerization and depolymerization*. J Biol Chem, 2006. **281**(36): p. 26754-67.
79. Schafer, D.A., P.B. Jennings, and J.A. Cooper, *Dynamics of capping protein and actin assembly in vitro: uncapping barbed ends by polyphosphoinositides*. J Cell Biol, 1996. **135**(1): p. 169-79.
80. Barkalow, K., et al., *Coordinated regulation of platelet actin filament barbed ends by gelsolin and capping protein*. J Cell Biol, 1996. **134**(2): p. 389-99.
81. Kovar, D.R., J.Q. Wu, and T.D. Pollard, *Profilin-mediated competition between capping protein and formin Cdc12p during cytokinesis in fission yeast*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(5): p. 2313-24.
82. Kawamura, M. and K. Maruyama, *Electron microscopic particle length of F-actin polymerized in vitro*. J Biochem, 1970. **67**(3): p. 437-57.
83. Insall, R.H. and O.D. Weiner, *PIP3, PIP2, and cell movement--similar messages, different meanings?* Dev Cell, 2001. **1**(6): p. 743-7.
84. Miyoshi, T., et al., *Actin turnover-dependent fast dissociation of capping protein in the dendritic nucleation actin network: evidence of frequent filament severing*. J Cell Biol, 2006. **175**(6): p. 947-55.
85. Andrianantoandro, E., et al., *Kinetic mechanism of end-to-end annealing of actin filaments*. J Mol Biol, 2001. **312**(4): p. 721-30.
86. Skau, C.T., E.M. Neidt, and D.R. Kovar, *Role of tropomyosin in formin-mediated contractile ring assembly in fission yeast*. Mol Biol Cell, 2009. **20**(8): p. 2160-73.



87. Habas, R., Y. Kato, and X. He, *Wnt/Frizzled activation of Rho regulates vertebrate gastrulation and requires a novel Formin homology protein Daam1*. Cell, 2001. **107**(7): p. 843-54.
88. Marlow, F., et al., *Zebrafish Rho kinase 2 acts downstream of Wnt11 to mediate cell polarity and effective convergence and extension movements*. Curr Biol, 2002. **12**(11): p. 876-84.
89. Matussek, T., et al., *The Drosophila formin DAAM regulates the tracheal cuticle pattern through organizing the actin cytoskeleton*. Development, 2006. **133**(5): p. 957-66.
90. Salomon, S.N., et al., *Localization of the Diaphanous-related formin Daam1 to neuronal dendrites*. Neurosci Lett, 2008. **447**(1): p. 62-7.
91. Matussek, T., et al., *Formin proteins of the DAAM subfamily play a role during axon growth*. J Neurosci, 2008. **28**(49): p. 13310-9.
92. Kida, Y., T. Shiraishi, and T. Ogura, *Identification of chick and mouse Daam1 and Daam2 genes and their expression patterns in the central nervous system*. Brain Res Dev Brain Res, 2004. **153**(1): p. 143-50.
93. Spudich, J.A. and S. Watt, *The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin*. J Biol Chem, 1971. **246**(15): p. 4866-71.
94. Houk, T.W., Jr. and K. Ue, *The measurement of actin concentration in solution: a comparison of methods*. Anal Biochem, 1974. **62**(1): p. 66-74.
95. Criddle, A.H., M.A. Geeves, and T. Jeffries, *The use of actin labelled with N-(1-pyrenyl)iodoacetamide to study the interaction of actin with myosin subfragments and troponin/tropomyosin*. Biochem J, 1985. **232**(2): p. 343-9.
96. Kurzawa, S.E. and M.A. Geeves, *A novel stopped-flow method for measuring the affinity of actin for myosin head fragments using microgram quantities of protein*. J Muscle Res Cell Motil, 1996. **17**(6): p. 669-76.
97. Brooks, F.J. and A.E. Carlsson, *Actin polymerization overshoots induced by plus-end capping*. Phys Biol. **7**(1): p. 16008.
98. Brooks, F.J. and A.E. Carlsson, *Actin polymerization overshoots and ATP hydrolysis as assayed by pyrene fluorescence*. Biophys J, 2008. **95**(3): p. 1050-62.
99. Harris, E.S., et al., *Mechanistic differences in actin bundling activity of two mammalian formins, FRL1 and mDia2*. J Biol Chem, 2006. **281**(20): p. 14383-92.

100. Vaillant, D.C., et al., *Interaction of the N- and C-terminal autoregulatory domains of FRL2 does not inhibit FRL2 activity*. J Biol Chem, 2008. **283**(48): p. 33750-62.
101. Esue, O., et al., *The filamentous actin cross-linking/bundling activity of mammalian formins*. J Mol Biol, 2008. **384**(2): p. 324-34.
102. Machaidze, G., et al., *Actin filament bundling and different nucleating effects of mouse Diaphanous-related formin FH2 domains on actin/ADF and actin/cofilin complexes*. J Mol Biol. **403**(4): p. 529-45.
103. Sanchez-Soriano, N., et al., *Drosophila as a genetic and cellular model for studies on axonal growth*. Neural Dev, 2007. **2**: p. 9.
104. Neidt, E.M., B.J. Scott, and D.R. Kovar, *Formin differentially utilizes profilin isoforms to rapidly assemble actin filaments*. J Biol Chem, 2009. **284**(1): p. 673-84.
105. Bubb, M.R., et al., *Depolymerization of actin filaments by profilin. Effects of profilin on capping protein function*. J Biol Chem, 2003. **278**(27): p. 24629-35.
106. Romero, S., et al., *How ATP hydrolysis controls filament assembly from profilin-actin: implication for formin processivity*. J Biol Chem, 2007. **282**(11): p. 8435-45.
107. Ezezika, O.C., et al., *Incompatibility with formin Cdc12p prevents human profilin from substituting for fission yeast profilin: insights from crystal structures of fission yeast profilin*. J Biol Chem, 2009. **284**(4): p. 2088-97.
108. Neidt, E.M., C.T. Skau, and D.R. Kovar, *The cytokinesis formins from the nematode worm and fission yeast differentially mediate actin filament assembly*. J Biol Chem, 2008. **283**(35): p. 23872-83.
109. Pechlivanis, M., A. Samol, and E. Kerkhoff, *Identification of a short Spir interaction sequence at the C-terminal end of formin subgroup proteins*. J Biol Chem, 2009. **284**(37): p. 25324-33.
110. Sun, H., et al., *Rho activation of mDia formins is modulated by an interaction with inverted formin 2 (INF2)*. Proc Natl Acad Sci U S A. **108**(7): p. 2933-8.
111. Quinlan, M.E., et al., *Regulatory interactions between two actin nucleators, Spire and Cappuccino*. J Cell Biol, 2007. **179**(1): p. 117-28.
112. Wawro, B., et al., *Tropomyosin regulates elongation by formin at the fast-growing end of the actin filament*. Biochemistry, 2007. **46**(27): p. 8146-55.
113. Bartolini, F., et al., *The formin mDia2 stabilizes microtubules independently of its actin nucleation activity*. J Cell Biol, 2008. **181**(3): p. 523-36.
114. Ang, S.F., et al., *DAAMI is a formin required for centrosome re-orientation during cell migration*. PLoS One. **5**(9).

115. Guzik-Lendrum, S., et al., *Drosophila melanogaster Myosin-18 Represents a Highly Divergent Motor with Actin Tethering Properties*. J Biol Chem. **286**(24): p. 21755-66.
116. Holtzer, H., et al., *Independent assembly of 1.6 microns long bipolar MHC filaments and I-Z-I bodies*. Cell Struct Funct, 1997. **22**(1): p. 83-93.
117. Rhee, D., J.M. Sanger, and J.W. Sanger, *The premyofibril: evidence for its role in myofibrillogenesis*. Cell Motil Cytoskeleton, 1994. **28**(1): p. 1-24.
118. Ehler, E., et al., *Myofibrillogenesis in the developing chicken heart: assembly of Z-disk, M-line and the thick filaments*. J Cell Sci, 1999. **112** ( Pt 10): p. 1529-39.
119. Sanger, J.W., et al., *How to build a myofibril*. J Muscle Res Cell Motil, 2005. **26**(6-8): p. 343-54.
120. Taniguchi, K., et al., *Mammalian formin fhod3 regulates actin assembly and sarcomere organization in striated muscles*. J Biol Chem, 2009. **284**(43): p. 29873-81.
121. Lehr, H.A., et al., *Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice*. Am J Pathol, 1993. **143**(4): p. 1055-62.
122. Laschke, M.W., et al., *In vivo analysis of angiogenesis in endometriosis-like lesions by intravital fluorescence microscopy*. Fertil Steril, 2005. **84 Suppl 2**: p. 1199-209.
123. Lehr, H.A., et al., *Intravital fluorescence microscopy for the study of leukocyte interaction with platelets and endothelial cells*. Methods Enzymol, 1999. **300**: p. 462-81.
124. Menger, M.D. and H.A. Lehr, *Scope and perspectives of intravital microscopy--bridge over from in vitro to in vivo*. Immunol Today, 1993. **14**(11): p. 519-22.
125. Schramm, R., et al., *The subepicardial microcirculation in heterotopically transplanted mouse hearts: an intravital multifluorescence microscopy study*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2007. **134**(1): p. 210-7, 217 e1.

## VIII. ÁBRÁK ÉS TÁBLÁZATOK JEGYZÉKE

---

### VIII.1. ÁBRÁK JEGYZÉKE

---

1. ábra. A monomer aktin szerkezete. A római számok az alegységeket jelentik. (PDB kód:3HBT; Jmol programmal szerkesztve: <a href="http://jmol.sourceforge.net/">http://jmol.sourceforge.net/</a> ) .....	7
2. ábra. Az aktin nukleációjában szerepet játszó fehérje családok [14]. .....	9
3. ábra. A filamentális aktin szerkezete, a polaritás feltüntetésével. A különböző színekből álló részek az egyes monomereket jelölik. (PDB kód:3G37).....	10
4. ábra. A forminok és az Ena/Vasp fehérjecsalád befolyásolja az aktin filamentumok elongációját [11]. .....	10
5. ábra. Az egyes formin családok doménszerkezete [46].....	13
6. ábra. A DRF-ek autoregulációja [57]. .....	15
7. ábra. A DRF család dimerizációjának lehetséges mechanizmusa, az mDia1 formin példáján bemutatva [57].....	16
8. ábra. A forminok FH2 doménje elősegíti a de novo aktin nukleációt [73]. .....	18
9. ábra. A DAAM formin aktivációja a Wnt jelátvitel során [89]. .....	22
10. ábra. A DAAM FH2 hatása az aktin polimerizációjára. A feltüntetett számok az alkalmazott formin koncentráció-értékeket jelentik (t.e.: tetszőleges egységek). A körök azokat a szakaszokat jelölik, ahová az egyeneseket illesztettük.....	36
11. ábra. A DAAM FH2 és DAAM FH1FH2 konstrukciók hatása az aktin (3,5 $\mu$ M, 5 %-ban pirén-jelölt) polimerizációjának sebességére (1mM $MgCl_2$ és 50mM KCl sókoncentrációk mellett). Az üres körök a stopped flow-val kapott eredményeket jelölik. ....	37
12. ábra. A DAAM fragmentumok hatása az aktin depolimerizációjára (100nM aktin, 1 mM $MgCl_2$ és 50 mM KCl jelenlétében).....	40

13. ábra. Aktin kritikus koncentrációjának meghatározása során kapott pirén emissziós spektrumok. A színkódolásban látható szám adatok az adott görbéhez tartozó aktin koncentrációt jelölik (t.e.: tetszőleges egységek). .....	42
14. ábra. A kritikus koncentráció meghatározása (t.e.: tetszőleges egységek). .....	42
15. ábra. Az F aktin koncentrációjának formin-függése .....	44
16. ábra. A koszedimentációs esszét követően a pelletben található formin és aktin koncentrációarányát ábrázoljuk az alkalmazott formin koncentrációjának függvényében. ....	47
17. ábra. DAAM fragmentumot nem tartalmazó mintában kevés aktin-köteg figyelhető meg.....	49
18. ábra. DAAM FH2 által kötegelte aktin filamentumok. ....	49
19. ábra. A DAAM FH1FH2 fragmentum szintén kötegeket képez, és az egyedi aktin filamentumok is rövidebbek. ....	50
20. ábra. Filamentumok szélességének mérése ImageJ program segítségével.....	50
21. ábra. A DAAM FH2 fragmentum által polimerizált mintában megnő a keresztkött aktin filamentumok aránya. ....	51
22. ábra. A DAAM fragmentumok kereszt kötik az aktin filamentumokat. ....	52
23. ábra. Az aktin filamentumok átlagos hossza fordított arányban áll az alkalmazott DAAM koncentrációval.....	54
24. ábra. Két színnel jelölt aktin filamentumok közvetlenül az összetörés után és egy órával később. ....	56
25. ábra. A DAAM jelenlétében lezajló vég-vég kapcsolódás jóval rövidebb filamentumokat eredményez.....	57
26. ábra. A DAAM FH1FH2 kölcsönhat a profilinnal a polimerizáció gyorsításában ..	59

27. ábra. A DAAM fragmentumok képesek lecsökkenteni a monomerek profilin által kiváltott diszociációjának sebességét. A lila szimbólum a DAAM-mentes mintát jelöli. .....	60
28. ábra. A DAAM FH1FH2 profilin jelenlétében is fenntartja a kritikus aktin koncentrációt (t.e.: tetszőleges egységek).....	61

## VIII.2. TÁBLÁZATOK JEGYZÉKE

---

1. táblázat. A forminok családjának jellemző doménjei. ....	14
2. táblázat. A formin-profilin kölcsönhatás szerepe a filamentum plusz végének dinamikájában [68]. ....	19
3. táblázat. A különböző formin fragmentumok esetében mért kritikus aktin koncentrációk. ....	43
4. táblázat. Az átlagos filamentumhossz forminkoncentráció függése. ....	54
5. táblázat. A DAAM megváltoztatja az annealing sebességét. ....	57

## IX. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

---

- ADF: aktin depolimerizációs faktor  
ADP: adenzin difoszfát  
ATP: adenzin trifoszfát  
CaCl<sub>2</sub>: kalcium klorid  
CC: Coiled-coil segment  
DAD: Diaphanous Autoregulatory Domain  
DD: Dimerization Domain  
DID: Diaphanous Inhibitory Domain  
DTT: DL-Dithiothreitol  
EGTA: etilén-glikol-bisz (β-aminoetil-éter)-N,N,N',N'-tetraecetsav  
FH1: Formin Homology Domain 1  
FH2: Formin Homology Domain 2  
FH3: Formin Homology Domain 1  
g: nehézségi gyorsulás  
GBD: GTPase Binding Domain  
GSH: glutathione  
GST: glutathione S-transferase  
IPTG: Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside  
KCl: kálium klorid  
kDa: kilodalton, atomi tömegyegység  
MEA: β-merkaptóetanol  
MgCl<sub>2</sub>: magnézium klorid  
NaN<sub>3</sub>: nátrium azid  
PDB: Protein Data Bank (Fehérje adatbázis): <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>  
P<sub>i</sub>: szervetlen foszfát  
pirén: N-(1-pirén)-jodoacetamid, fluorofór jelölő  
pirén-aktin: pirén fluorofórral jelölt aktin  
SDS: nátrium-dodecilszulfát  
SH3: Src homológia 3  
WH2: Wiskott-Aldrich szindróma fehérje homológia 2  
WW: Megközelítőleg 40 aminosavból álló fehérje modul.

## X.FÜGGELÉK

A KÍSÉRLETEK SORÁN ALKALMAZOTT FORMIN-KONSTRUKCIÓK  
SZEKVENCIÁJA*Drosophila melanogaster* DAAM FH2

DLPKKNVPQPTNPLKSFNWSKLPDAKLQGTWVSELDKLYNNMELESIDKLF  
 SAYQKNGVSATDGSYEDLRVTGKAAKQKVLVIDGRRAQNCTILLSKMKMSD  
 MEISKAILSMDNEQLQLDMVEQLLKFTPSAEERALLDEHSEDIESLARADRFLY  
 EISKIPHYEQRLKSLHYKKRFMLTINDLVPRITSVMEASREVARSRRLRKLELV  
 LALGNYMNRGARGNASGFRLASLNRLADTKSSAAKGTTLLHYLVQVIERKFK  
 DLLKLEDDIPHVREASKVSLGEMDKDIQMLRTGLADVAREIEFHRSSGPAQQG  
 DRFLPVMREFHAQASVRFAELEDKFQDMKTRFDRAVRLFGEDGSVLQPDEFFG  
 IFDSFLAAFAEARHDNESFRRRQEEEEKRAKQEAELKKRTIERK

*Drosophila melanogaster* DAAM FH1FH2

IPDDQKVAGLTGCNGAVSPPPAPPMLKAIPPPPPMAPSMMPPPPPPCPGAPPPPP  
 SMAQTMAPPKVDLPKKNVPQPTNPLKSFNWSKLPDAKLQGTWVSELDK  
 LYNNMELESIDKLFSA YQKNGVSATDGSYEDLRVTGKAAKQKVLVIDGRRAQ  
 NCTILLSKMKMSDMEISKAILSMDNEQLQLDMVEQLLKFTPSAEERALLDEHS  
 EDIESLARADRFLYEISKIPHYEQRLKSLHYKKRFMLTINDLVPRITSVMEASRE  
 VARSRRLRKLELV LALGNYMNRGARGNASGFRLASLNRLADTKSSAAKGTT  
 LLHYLVQVIERKFKDLLKLEDDIPHVREASKVSLGEMDKDIQMLRTGLADVAR  
 EIEFHRSSGPAQQGDRFLPVMREFHAQASVRFAELEDKFQDMKTRFDRAARLF  
 GEDGSVLQPDEFFGIFDSFLAAFAEARHDNESFRRRQEEEEKRAKQEAELKKRTI  
 ERK



## XI. PUBLIKÁCIÓK LISTÁJA

---

---

### I. Az értekezés alapjául szolgáló közlemény

**Barkó, Sz.,** Bugyi, B., Carlier, M-F., Gombos, R., Matussek, T., Mihály, J. and Nyitrai, M. (2010).

**Characterization of the Biochemical Properties and Biological Function of the Formin Homology Domains of Drosophila DAAM.**

*Journal of Biological Chemistry*, **285 (17)**, 13154–13169.

(Impakt faktor: 5,328)

### II. Egyéb közlemények

1. Orbán, J., Halasi Sz., Papp, G., **Barkó, Sz.** and Bugyi, B. (2005).

**Thermodynamic characterization of different actin isoforms.**

*Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, **82**, 287-290.

(Impakt faktor 1,425)

2. Halasi, Sz., Papp, G., Bugyi, B., **Barkó, Sz.**, Orbán, J., Ujfalusi, Z. and Visegrády, B. (2006).

**The effect of pyrene labelling on the thermal stability of actin filaments.**

*Thermochimica Acta*, **445**, 185-189.

(Impakt faktor 1,417)

3. Papp, G., Bugyi, B., Ujfalusi, Z., **Barkó, Sz.**, Hild, G., Somogyi, B. and Nyitrai, M. (2006).

**Conformational changes in actin filaments induced by formin binding to the barbed end.**

*Biophysical Journal*, **91** (7), 2564–2572.

(Impakt faktor 4,757)

4. Orbán, J., Pozsonyi, K., Szarka, K., **Barkó, Sz.**, Bódis, E. and Lőrinczy D. (2006).

**Thermal characterisation of actin filaments prepared from ADP-actin monomers.**

*Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, **84**, 619–623.

(Impakt faktor 1,438)

5. Ujfalusi, Z., **Barkó, Sz.**, Hild, G. and Nyitrai, M. (2010).

**The effects of formins on the conformation of subdomain 1 in actin filaments.**

*Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **98** (1), 7-11.

(Impakt faktor: 2.116)

Összesített IF:16,481