

# PhD értekezés tézisei

## **A DAAM formin hatása az aktin dinamikájára**

**Barkó Szilvia**

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



Pécsi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Biofizikai Intézet

2012



# I. BEVEZETÉS

---

## I.1. AZ AKTIN ÉS AZ AKTIN NUKLEÁCIÓS FAKTOROK

Az aktin az eukarióta sejtek egyik fő sejtvázas alkotó fehérjéje [1, 2]. A sejtben két megjelenési típusa ismert: az egyik a monomer forma, globuláris, más néven G-aktin, [3] a másik a polimer, filamentális forma, amit F-aktinnak neveznek [4]. 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.

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 [5, 6].

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 [7-12]. Az ezek által nukleált aktin filamentumokon nem figyelhető meg elágazódás.

## Bevezetés

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 [13, 14].

A polimerizáció nukleációt követő 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 növő plusz vég („barbed end”), a másik egy lassabban növő, mínusz vég („pointed end”).

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. Az elongáció gyorsításában mindkét típus esetén szerepet játszik a profilin fehérjecsald [14].

## I.2. A PROFILINEK

Az aktin a sejtben szinte kizárólagosan valamilyen kötőfehérjéhez kapcsolódva található meg, igen nagy részben profilinok tartják monomer formában.

A profilin minden eukarióta szervezetben megtalálható. Csaknem minden profilin megegyezik abban, hogy képesek globuláris aktint, foszfoinozitolokat, és prolinban gazdag szekvenciákat kötni [15-17]. Általános tulajdonságuk még, hogy az aktinon a nukleotid kicserélődést elősegítik [18], és az aktin monomereket szekvesztrálhatják [19]. A profilin-aktin komplexből az aktin beépülése a filamentum plusz végén lehetséges [20]. A különböző profilin izoformák prolinban gazdag fehérjékhez más-más affinitással kötődnek. A forminok legtöbb típusa rendelkezik prolinban gazdag részt tartalmazó doménnal, úgynevezett FH1-gyel. A prolinok száma meghatározó fontossággal bír a kötés erőssége szempontjából [21].

### I.3. A FORMINOK

A forminokkal kapcsolatos első leírás egy egerekben felfedezett *ld* („limb deformity”) mutációhoz kapcsolódik. Az első két allélt még a hatvanas években leírták, de a megfelelő gént Woychik és munkatársai csak 1985-ben azonosították először egerekben [22]. Megfigyeléseik szerint transzgenikus egerek inszerciós mutagenézise során az *fmn* (formin) génben történő mutáció okozza a végtag-deformitást [22]. Később ugyanez a munkacsoport jellemezte a gént molekuláris szinten, és a „formin” nevet is ők adták a génről átíródó fehérjéknek [23].

Csaknem minden eukarióta formin fehérje tartalmaz egy FH1 (formin-homológia 1) domént [24], 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 aktinhoz való kötésért felel [25]. A forminok szerkezetében ez utóbbi domén a leginkább konzervatív, és a különböző formin-családokban legszélesebb körben vizsgált és karakterizált rész.

Az FH1 domén *in vitro* vizsgálatokban nélkülözhető a polimerizációhoz, ugyanakkor modulálja az FH2 domén hatását [26, 27]. Általánosságban elmondható, hogy a forminok önmagukban csökkentik az elongáció sebességét, viszont felgyorsítják azt profilin jelenlétében [28-30].

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.*
- 2.) *Megváltoztatják a filamentum elongációs és depolimerizációs sebességét.*
- 3.) *Gátolják a sapkafehérjék kötődését az aktinhoz.*
- 4.) *Hatásuk lehet az aktin vég-vég kapcsolódására.*

Az FH2 domén homológiája alapján az emlős forminokat hét csoportba sorolhatjuk (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)

Bevezetés

**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)

### *A DAAM formin család*

A DAAM fehérjét 2001-ben fedezték fel, egy, a PCP („*Planar Cell Polarity*”, szövetek síkbeli polaritása) jelátvitelben szerepet játszó kötőpartnerére révén. A kötőfehérjét Dishevelled-nek nevezik, innen kapta a nevét a DAAM („*Dishevelled-associated activator of morphogenesis*”) [31]. Szerepet játszik a  $\beta$ -catenin független Wnt-jelátvitelben. Ezen belül a citoszkeleton átszervezésében van alapvető jelentősége [32]. A DAAM gén szekvenciának vizsgálata során derült fény arra, hogy formin homológia doméneket tartalmaz. A DAAM forminok funkciója igen sokrétű. Egyes megfigyelések szerint a PCP jelátvitelben játszott szerepük nem elsődleges [33]. Matussek és munkatársai leírták, hogy a *Drosophila melanogaster* trachea rendszerében az aktin citoszkeleton normális szerveződéséhez elengedhetetlenek [33]. Ugyanez a munkacsoport bizonyította be, hogy a DAAM (meglehetősen konzervatív módon) a fejlődő idegrendszer axonjaiban a filopódiumok szervezésében játszik szerepet. Ezt követően írták le, hogy az axonok növekedésében, morfológiájának kialakításában is alapvető jelentősége van [34], valamint, hogy a központi idegrendszer neuronális sejt differenciálódásában is szerepet játszik [35]. 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 aktinhez, és ha igen, befolyásolja-e annak nukleációs és elongációs sebességét?
2. 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 aktinhez?
6. Befolyásolják-e a vizsgált DAAM konstrukciók 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 [36]. 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. [36]. Az izolálást követően a következő pufferben tároltuk: 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”). 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 [37].

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 [38]. A pirén-jelölt aktin koncentrációjának meghatározásához a pirén extinkciós koefficiensét 344 nm-en 2,2·10<sup>4</sup> M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>-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 előállítás*

A *Drosophila melanogaster* DAAM esetében a 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 [39]. A fehérjék extinkciós együtthatójának meghatározása a „Protparam” program segítségével (<http://us.expasy.org/tools/>) DAAM



FH2 esetén  $\varepsilon_{280} = 22920 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ -nek, DAAM FH1FH2 esetén  $\varepsilon_{280} = 22982,5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ -nek adódott. A fehérjék számolt molsúlya 47,9 kDa és 54,7 kDa volt. Mindkét DAAM konstrukciót folyékony nitrogénben történt fagyasztás után  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ -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 fehérjétől. Ezt követően, ahogy a DAAM konstrukciók esetén is, alkalmaztunk egy gélfiltrációs lépést, a további szennyeződések eltávolítása céljából. A profilin extinkciós együtthatójára  $\varepsilon_{280} = 19940 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  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. A pirén-aktin filamentumba épülése során az emittált jel intenzitása megnő, ezért 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 küvetében 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 nm gerjesztési, és 407 nm emissziós hullámhosszakot beállítva. A kapott polimerizációs görbéket normáltuk. A görbék meredekségét  $\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$  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). 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 tesztekkel 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 ábrázoltuk 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, az üledéket és a felülúszót különválasztottuk, és redukáló, 12 %-os SDS poliakrilamid gélen megfuttattuk. 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 [40]:

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

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. Mikroszkópos 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. 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 kiértékeljük. Végül, a vég-vég kapcsolódás sebességének meghatározása céljából a következő egyenletet illesztettük a kapott adatokra:

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

ahol  $l$ ,  $I_{min}$  és  $I_{max}$ : 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 ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

---

### IV.1. A DAAM KONSTRUKCIÓK HATÁSSAL VANNAK AZ AKTIN POLIMERIZÁCIÓJÁRA

Kísérleteinkben a *Drosophila melanogaster* DAAM FH2 illetve FH1FH2 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. 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 illetve FH1FH2 adtunk, majd a plató fázis eléréséig detektáltuk a fluoreszcens jelet. Megfigyeltük, hogy a DAAM fragmentumok koncentrációjának emelésével egyre meredekebben felfutó görbét kaptunk. Ez arra utal, hogy a DAAM fragmentumok koncentrációjának emelésével egyre gyorsabb az aktin polimerizációja. Megfigyeltük továbbá, hogy 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. 1  $\mu\text{M}$  koncentrációt elérve már 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. 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.

### IV.2. 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 sót, 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. Eredményeink azt mutatták, hogy 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 [30, 41]. 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.3. 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 [13, 27, 41-44]. 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 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). A kiértékelés során a pirén emissziós maximuma (407 nm) körüli 20 nm-es hullámhossztartományban mért fluoreszcencia-intenzitás értékeket használtuk fel. Ennek megfelelően a 397 és 417 nm között kapott

intenzitás-értékeket átlagoltuk, és ezeket ábrázoltuk az aktin koncentráció függvényében. 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. Az adatok alapján megállapítottuk, hogy 100 nM DAAM-FH2 illetve FH1FH2 alkalmazása esetén az aktin kritikus koncentrációja csak igen kis mértékben változik meg, enyhe mértékű emelkedést mutat. 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 az F-aktin koncentrációjának változását ábrázoltuk a formin koncentráció függvényében. 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. Összességében elmondható, hogy a kritikus koncentrációra kifejtett hatással kapcsolatos eredményeink jól illeszkednek az irodalomban más forminok esetében tett megfigyelésekhez. 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”).

#### IV.4. A DAAM FRAGMENTUMOK AKTIN FILAMENTUMHOZ VALÓ AFFINITÁSA MIKROMOLÁRIS NAGYSÁGRENDŰ

A korábbiakban részletezett polimerizációs tesztek fényében 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. 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. 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 keresztköteket hozhasson létre aktin filamentumok között, mintegy kötegelve azokat. Ezt a jelenséget más forminok esetében már kimutatták [45, 46], emiatt a következőkben leírt módon mi is végeztünk erre vonatkozó vizsgálatokat.

### IV.5. A DAAM FH2 ÉS FH1FH2 FRAGMENTUMOK HATÁSA AZ AKTIN FILAMENTUMOK KÖTEGELŐDÉSÉRE ÉS HOSSZELOSZLÁSÁRA

#### *IV.5.1. A DAAM FH2 és FH1FH2 fragmentumok aktin kötegeket képeznek*

Korábban leírt megfigyelések szerint bizonyos forminok képesek az aktin filamentumokat kötegelni („bundling”) [47, 48]. A DAAM-al kapcsolatban korábban leírták, hogy a központi idegrendszerben szerepe van az aktin nukleációjában és elongációjában [49], de az aktin szálak kötegelésben játszott szerepe még nem volt ismert. 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. Megfigyeltük, hogy a DAAM fragmentumokat nem tartalmazó minta esetén az aktin filamentumok csak igen kis számban képeznek kötegeket, tehát a megjelenő filamentumok túlnyomó többsége egyedi aktin filamentum.  $500 \text{ nM}$  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. Szembeötlő különbség, hogy az egyedi aktin filamentumok ebben az esetben rövidebbnek tűnnek, mint a kontrollként használt, formin-mentes mintában. A köteggépzéssel kapcsolatos megfigyeléseket ImageJ program segítségével értékeltük ki. Eredményeink azt mutatták, hogy a DAAM fragmentumok jelenlétében a filamentumok jelentős populációja, mintegy 30-40 %-a keresztkötést mutat másik aktin filamentummal. 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.

### *IV.5.2. A DAAM fragmentumok rövid aktin filamentumokat képeznek*

Az előzőekben részletezett köteggépzés vizsgálatakor 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 köteggépződés 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. Amint azt a fenti megfigyelések alapján vártuk, a filamentumok hossza nagyban függ a formin koncentrációjától: növekvő formin koncentrációk esetén egyre rövidülő filamentumokat figyelhetünk meg. 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.5.3. 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 az aktin filamentumok hosszeloszlását vizsgáltuk az idő

függvényében, csak aktint tartalmazó, valamint 1  $\mu\text{M}$  DAAM FH1FH2 jelenlétében polimerizált filamentumok esetén. 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. 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. Megfigyeléseink szerint DAAM jelenlétében a jóval rövidebb filamentumhosszak gyorsabban épülnek össze.

#### IV.6: A DAAM FH1FH2 KONSTRUKCIÓ PROFILINNEL VALÓ KÖLCSÖNHATÁSÁÉRT AZ FH1 DOMÉN FELELŐS

*IV.6.1: 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, méghozzá nagyobb sebességgel, mint a profilint nem kötő aktin esetén [21, 50, 51]. 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 tesztek, azzal a különbséggel, hogy közvetlenül a polimerizációs só és formin hozzáadása után 5  $\mu\text{M}$  profilint adtunk a mintához. Megfigyeltük, hogy DAAM FH2 esetén a polimerizáció nagymértékben lelassul, viszont DAAM FH1FH2-t használva a polimerizációs sebesség jelentős gyorsulása figyelhető meg. 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 [52]. 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 [28-30] a DAAM esetében is igaznak bizonyul.

### *IV.6.2: 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 [53, 54]. Kísérleteinkben azt vizsgáltuk meg, hogy a DAAM fragmentumok modulálják-e ezt a hatást. Ennek megállapítására depolimerizációs tesztek 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.

### *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. 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 profilinnak 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.

## V. EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

---

Munkánk során megállapítottuk, hogy

- A DAAM FH2 illetve FH1FH2 fragmentumok gyorsítják az aktin polimerizációját. Ennek sebessége függ a jelenlévő formin koncentrációjától, azonban meghatározott értéket elérve tovább már nem fokozható, telítést mutat.
- Az FH1 doménnek a csak aktint tartalmazó rendszerben (profilin nélkül) nincsen hatása az aktin polimerizációjára.
- Élesztő profilin jelenlétében a polimerizáció sebessége drasztikus mértékben megnő 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.
- 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.
- Az alkalmazott formin fragmentumoknak nincsen jelentős hatásuk az aktin kritikus koncentrációjára.
- A DAAM FH1FH2 konstrukció a profilin által előidézett kritikus koncentráció növekedést megszünteti, ami –összevetve a csak FH2 fragmentumot tartalmazó mérések eredményeivel- a profilin-FH1 kölcsönhatásnak tulajdonítható.
- A DAAM FH2 aktin filamentumhoz való affinitása mintegy  $7 \pm 2,5 \mu\text{M}$ , a DAAM FH1FH2 fragmentumé pedig  $2,1 \pm 0,5 \mu\text{M}$ .
- Mindkét DAAM konstrukció képes az aktin filamentumok kötegelésére.
- A DAAM formin mind a polimerizáció, mind a filamentumok vég-a-véghez való kapcsolódásának szabályozása révén az átlagosnál jóval rövidebb filamentumokat hoz létre.

## VI. 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. Wang, H., R.C. Robinson, and L.D. Burtnick, *The structure of native G-actin*. Cytoskeleton (Hoboken). **67**(7): p. 456-65.
4. Murakami, K., et al., *Structural basis for actin assembly, activation of ATP hydrolysis, and delayed phosphate release*. Cell. **143**(2): p. 275-87.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. Baum, B. and P. Kunda, *Actin nucleation: spire - actin nucleator in a class of its own*. Curr Biol, 2005. **15**(8): p. R305-8.
10. Winckler, B. and D.A. Schafer, *Cordon-bleu: a new taste in actin nucleation*. Cell, 2007. **131**(2): p. 236-8.
11. Chereau, D., et al., *Leiomodin is an actin filament nucleator in muscle cells*. Science, 2008. **320**(5873): p. 239-43.
12. 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.
13. Pruyne, D., et al., *Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association*. Science, 2002. **297**(5581): p. 612-5.
14. Sagot, I., et al., *An actin nucleation mechanism mediated by Bni1 and profilin*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(8): p. 626-31.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. 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.

21. 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.
22. Woychik, R.P., et al., *An inherited limb deformity created by insertional mutagenesis in a transgenic mouse*. *Nature*, 1985. **318**(6041): p. 36-40.
23. Woychik, R.P., et al., *'Formins': proteins deduced from the alternative transcripts of the limb deformity gene*. *Nature*, 1990. **346**(6287): p. 850-3.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. Pring, M., et al., *Mechanism of formin-induced nucleation of actin filaments*. *Biochemistry*, 2003. **42**(2): p. 486-96.
28. 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.
29. Pollard, T.D., *Formins coming into focus*. *Dev Cell*, 2004. **6**(3): p. 312-4.
30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. 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.
34. Matussek, T., et al., *Formin proteins of the DAAM subfamily play a role during axon growth*. *J Neurosci*, 2008. **28**(49): p. 13310-9.
35. 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.
36. 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.
37. 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.
38. 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.
39. 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.

40. 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.
41. 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.
42. Li, F. and H.N. Higgs, *The mouse Formin mDia1 is a potent actin nucleation factor regulated by autoinhibition.* Curr Biol, 2003. **13**(15): p. 1335-40.
43. 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.
44. 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.
45. 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.
46. 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.
47. Esue, O., et al., *The filamentous actin cross-linking/bundling activity of mammalian formins.* J Mol Biol, 2008. **384**(2): p. 324-34.
48. 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.
49. Sanchez-Soriano, N., et al., *Drosophila as a genetic and cellular model for studies on axonal growth.* Neural Dev, 2007. **2**: p. 9.
50. 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.
51. 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.
52. 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.
53. 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.
54. 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.



## VII. PUBLIKÁCIÓK LISTÁJA

---

### **I. Az értekezés alapjául szolgáló közlemény**

Barkó, Sz., Bugyi, B., Carlier, M-F., Gombos, R., Matusek, 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)

## Publikációk listája

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**

### III. Az értekezéshez kapcsolódó előadások:

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

A FEBS/EMBO lecture course in conjunction with European Cytoskeletal Forum and SACR: The Cytoskeleton in Development and Pathology

Stockholm, Svédország, 2010. június 19 – 24.

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

EBSA Satellite Meeting

Pécs, 2011. augusztus 20-22.