

PhD értekezés tézisei

A DISHEVELLED-ASSOCIATED ACTIVATOR OF MORPHOGENESIS FORMIN SZEREPE AZ AKTIN ÉS MIKROTUBULUS SEJTVÁZ DINAMIKAI SZABÁLYOZÁSÁBAN

Vig Andrea

Témavezető: Dr. Bugyi Beáta

Doktori iskola: Interdiszciplináris Orvostudományok (D93)

Doktori iskola vezetője: Prof. Dr. Sümegi Balázs

Program: Funkcionális fehérjedynamika vizsgálata biofizikai módszerekkel (B-130)

Doktori program vezetője: Prof. Dr. Nyitrai Miklós



Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Biofizikai Intézet
2018

BEVEZETÉS

Az eukarióta sejtek sejtváznak nélkülözhetetlen alkotói a fehérje alegységekből felépülő polimerhálózatok; ezek a mikrofilamentumok (vagy aktin filamentumok, AF), intermedier filamentumok (IF) és a mikrotubulusok (MT). Ezek a polimerhálózatok szinte minden sejtfunkcióban fontos szerepet játszanak, köztük (ide értve, de nem kizárólagosan) a sejtosztódást, a sejtmozgást, adhéziók formálását, jelátviteli folyamatokat, valamint intra-, és extracelluláris transzportfolyamatokat. Sejtjeink megfelelő működése; és ezáltal egészségünk, ezen hálózatok morfológiai és dinamikai sajátosságainak pontos időbeli és térbeli szabályozásán alapszik, melyet számos, a polimerhálózatokhoz asszociált fehérje végez. Éppen ezért ezen szabályzó fehérjéknek a sejtvázműködésében betöltött szerepének megértése elengedhetetlen az orvostudomány és az élettudomány számára.

A forminok a sejtvázhhoz asszociált szabályzó fehérjék, amelyeket az evolúciósan konzervált formin homológ domének alapján azonosíthatunk (FH1 és FH2). Az FH2 domén az aktinnal, míg az FH1 egy kis aktin-kötő fehérjével, a profilinnal képes kölcsönhatni. A tandem FH1-FH2 modul legfőbb szerepe az aktin monomerek gyors filamentummá épülésében mutatkozik meg; katalizálja az aktin filamentumok nukleációját és azok processzív növekedését profilin-aktin jelenlétében. Az általam vizsgált Dishevelled-associated activator of morphogenesis (DAAM) formin a Diaphanous-related formin (DRF) családba tartozik. A családra jellemző, hogy az FH doménekén kívül rendelkezik speciális N-(DID), és C terminális (DAD-CT) doménekkel is, amelyek az FH1-FH2 és az aktin kölcsönhatásának idő-, és térbeli szabályozását végzik (autoreguláció).

A DAAM szerepe az eddig fellelhető irodalom alapján igen sokrétű, fontos szerepet játszik az aktin sejtvázhhoz kapcsolódó morfogenetikai folyamatokban. Ilyen például *Drosophila melanogaster* modell rendszerben az aktin kábelek irányítása, mellyel elősegíti a trachea megfelelő apikális elrendeződését (Matusek, Djiane et al. 2006). A növekedési kúp felületén található filopodiális kitüremkedések kialakítása révén részt vesz az axonok növekedésében is (Matusek, Gombos et al. 2008), valamint az izmok kialakulása során a szarkomerogenezisben is (Bao, Zhang et al. 2012; Molnar, Migh et al. 2014; Vogler, Liu et al. 2014). Kutatócsoportunk korábbi munkája során már leírta a *Drosophila* DAAM FH1-FH2 az aktinnal kialakított kölcsönhatásainak alapvető fizikokémiai sajátosságait, mely szerint a DAAM FH1-FH2 egy profilin-szabályozott aktin filamentum összeszerelő faktor (Barko, Bugyi et al. 2010; Molnar, Migh et al. 2014).

A forminok C-terminális szakaszainak újszerű szerepe és funkciója

Az utóbbi évek kutatásai rávilágítottak arra, hogy különböző forminok (egér Dia1, FMNL3, INF2, *Drosophila* Capuccino, humán Daam, élesztő Bni1 és Bnr1) C-terminális szakaszai befolyásolhatják az FH1-FH2 aktin-szabályzó funkcióit a már ismert autoregulációs aktivitásuk mellett (Chhabra and Higgs 2006; Gould, Maiti et al.

2011; Heimsath and Higgs 2012; Vizcarra, Bor et al. 2014). Az eddigi biokémiai vizsgálatok arra utalnak, hogy a forminok izolált C-terminális régiói az FH2 domén jelenléte nélkül is képesek az aktinhoz kötődni, azonban ennek a kölcsönhatásnak a funkcionális kimenetele eltérő lehet. Ilyen vizsgálat alanya volt például az INF2 formin, melynek WH2/DAD C-terminális szakvesztrálja az aktin monomereket, valamint hasítja a filamentumokat (Chhabra and Higgs 2006). Az FMNL3 formin dimer formájú WH2-DAD-CT régiója elősegíti az aktin filamentumok nukleációját, ugyanakkor lassítja azok növekedését (Heimsath and Higgs 2012). Hasonlóan, a Dia1 formin izolált C-terminális DAD doménje dimer formában katalizálja az aktin nukleációját (Gould, Maiti et al. 2011). Ezzel szemben a Capuccino formin farki része még dimer formában sem fejt ki hatást az aktin filamentumok összeszerelésére (Vizcarra, Bor et al. 2014). Mindezen megfigyelések alapján elmondható, hogy a C-terminális régiók eltérő módon befolyásolhatják az aktin filamentumképződés egyes szakaszait. Így felmerül a kérdés, hogy a C-terminális szakaszok különböző szerepei közül, mely aktivitások és miként járulnak hozzá a különböző forminok biológiai funkcióihoz az FH1-FH2 domén jelenlétében.

A forminok új szerepe a mikrotubulus sejtvázas szabályzásában

A klasszikus elgondolás szerint a forminok az aktin sejtvázas meghatározó szabályzói. Azonban nemrégiben megjelent tanulmányokból arra következtethetünk, hogy egyes forminok - egér Dia1/2, INF1/2 és *Drosophila* Capuccino - kölcsönhatnak a mikrotubulusokkal és szerepet játszhatnak azok dinamikai szabályzásában is, például a sejtváándorlás, sejtosztódás, illetve vírusfertőzés során (Palazzo, Cook et al. 2001; Zhou, Leder et al. 2006; Bartolini, Moseley et al. 2008; Young, Thurston et al. 2008; Bartolini and Gundersen 2010; Gaillard, Ramabhadran et al. 2011; Roth-Johnson, Vizcarra et al. 2014). *In vitro* munkák szerint az egér Dia1/2, INF2 and *Drosophila* Capuccino forminok az FH2 doménjükön keresztül kötődnek a mikrotubulusokhoz, csakúgy, mint az aktinhoz. Ezzel szemben, az INF1 formin izolált FH2 doménje nem képes a mikrotubulusokkal kölcsönhatni, a kötésben egy újonnan azonosított C-terminális mikrotubulus kötő domén vesz részt (Young, Thurston et al. 2008). A forminokat és mikrotubulus hálózatot EGFP-Dia2 FH1-FH2 segítségével vizualizálták, mely intracelluláris lokalizációs eredmények megerősítették a formin és a mikrotubulusok asszociációját (Bartolini, Moseley et al. 2008). A formin-MT kölcsönhatás funkcionális hatásainak első vizsgálatai megkezdődtek; hideg-, és hígítás-indukált depolimerizációs vizsgálatokban kimutatták, hogy az egér Dia1/2 formin stabilizálja a mikrotubulusokat, feltételezhetően az alegységek disszociációjának gátlása által a polimer végeken (Bartolini, Moseley et al. 2008). Mindezek mellett az egér Dia2, az INF2 és *Drosophila* Capuccino forminok képesek kötegelni is a mikrotubulusokat (Bartolini, Moseley et al. 2008; Gaillard, Ramabhadran et al. 2011; Roth-Johnson, Vizcarra et al. 2014). Érdekes felfedezés, hogy az INF2 formin képes egy időben az aktin filamentumokhoz és a mikrotubulusokhoz is kötődni (Gaillard, Ramabhadran et al. 2011).

A fent megfogalmazottaknak megfelelően a forminok C-terminális régiója különböző aktivitásokkal rendelkezhet az FH1-FH2 által katalizált aktin összeszerelésben. Emellett a formin fehérjék fontos szerepet tölthetnek be a mikrotubulus sejtvázas szabályozásában, valamint az aktin-mikrotubulus hálózat funkcionális koordinálásában is.

CÉLOK és KÉRDÉSEK

Munkám során célul tűztem ki a *Drosophila* DAAM (dDAAM) formin C-terminális szakaszainak az aktin dinamikai szabályozásában betöltött szerepének vizsgálatát, illetve az FH és a C-terminális domének kölcsönhatásainak és aktivitásainak leírását a mikrotubulus és az aktin-mikrotubulus hálózatok szerveződésében.

Az alábbi kérdésekre kerestem a választ:

1. Részt vesznek-e a dDAAM N-, és a C- terminális doménjei az FH1-FH2 aktinnal kialakított kölcsönhatásainak szabályozásában, hasonlóan a DRF család más tagjaihoz?
2. Befolyásolják-e a dDAAM C-terminális szakaszai az FH1-FH2 által katalizált aktin filamentum összeszerelődést? Ha igen, mely régiók felelősek ezért?
3. Kölcsön hat-e a dDAAM izolált C-terminálisa az aktinnal?
4. Képes-e a dDAAM kölcsönhatni a mikrotubulusokkal? Ha igen, mely régiók felelősek ezért és mik ezen kölcsönhatás funkcionális következményei?
5. Képes-e a dDAAM egyidejűleg az aktin filamentumokhoz és a mikrotubulusokhoz is kötődni? Ha igen, mely régiók meghatározóak ebben kölcsönhatásban?

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Fehérjék előállítása, fluoreszcens jelölés

A *Drosophila melanogaster* DAAM szakaszainak natív, mutációt tartalmazó, valamint trunkált változatait (DID: 115-356 aa cDAAM: 568-1153 aa, FH1-FH2: 568-1054 aa, cDAAM Δ CT: 568-1116, DAD-CT: 1083-1153 aa, DAD: 1083-1119 aa, FH1-FH2^{I732A}, cDAAM^{I732A}, cDAAM^{R-A}, DAD-CT^{R-A}) együttműködő partnerünk (Mihály József, MTA SZBK, Szeged) bocsátotta rendelkezésünkre. A fehérjéket Gluthation S-Transferase (GST) fúziós fehérjeként *E. coli* BL21(DE3)pLysS sejtvonalt alkalmazásával termeltettük és tisztítottuk (Novagen). Az aktint nyúl vázizomból nyert acetoneforgácsból tisztítottuk (Feuer, Molnar et al. 1948). Az aktin fluoreszcens jelölőkkel való módosítását standard eljárások szerint végeztük (Bugyi, Papp et al. 2006; Barko, Bugyi et al. 2010; Bugyi, Didry et al. 2010; Toth, Majoros et al. 2016). Jelöletlen és Hylite FluorTM 488-jelölt liofilizált tubulint (Cytoskeleton) BRB pufferben (80 mM PIPES pH6.9, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 2 mM GTP, 1 mM DTT) oldottunk a gyártó leírása szerint. A profilin 1 (egér) tisztítása és jelölése Alexa Fluor[®] C₅ 568 maleimide-el (Alexa568C, Invitrogen) korábban kidolgozott eljárások szerint történt (Perelroizen, Marchand et al. 1994). A sapkafehérje (egér, heterodimer α 1 β 2, CP) a már korábban leírt módszerek szerint került tisztításra (Bugyi, Didry et al. 2010).

Steady-state fluoreszcencia spektroszkópai vizsgálatok

Az aktin monomerek (0.2 μ M, AlexaFluor[®] 488NHS-jelölt) és az egyes dDAAM fehérjék kölcsönhatását profilin (0.8 μ M) jelenlétében és hiányában steady-state anizotrópia mérésekben vizsgáltuk. A méréseket Horiba Jobin Yvon spektrofluoriméteren végeztük. Az anizotrópia értékeket a dDAAM koncentrációjának függvényében ábrázoltuk, melyre görbék illesztésével a dDAAM:G-aktin kölcsönhatást jellemző disszociációs egyensúlyi állandót határoztuk meg. A dDAAM DAD-CT profilin:G-aktinnal kialakított kölcsönhatását Alexa Fluor[®] 568C₅ maleimiddel jelölt profilin anizotrópiájának mérésével is leírtuk.

A dDAAMnak az aktin (2 μ M) filamentumok összeszerelődési kinetikájára gyakorolt hatásait profilin (6 μ M) jelenlétében és hiányában pirén jelölt (N-(1-pirén)jóacetamid) aktin alapú polimerizációs kísérletekben vizsgáltuk (Cooper, Walker et al. 1983; Pollard and Cooper 1984). A polimerizációt 1 mM MgCl₂ és 50 mM KCl hozzáadásával indítottuk el. A méréseket Safas Xenius FLX spektrofluoriméteren végeztük. A mennyiségi elemzés során a polimerizációs sebességet a pirén tranziens fél-maximumnál meghatározott meredekségből számoltuk. A dDAAM és a sapkafehérje aktin filamentumok összeszerelődésére gyakorolt együttes hatását a korábbiakban kidolgozott módszertan alapján végeztük (Bombardier, Eskin et al. 2015).

Teljes visszaverődésen alapuló fluoreszcencia mikroszkópai (TIRFM) kísérletek

A dDAAM aktivitásait az egyedi filamentumok szintjén TIRF mikroszkópiával vizsgáltuk. Meghatároztuk a dDAAM hatásait az aktin (0.5 μ M, 10 % Alexa488NHS-G-

aktin) filamentumok nukleációjára és elongációjára profilin jelenlétében (2 μM) és hiányában is. A vizsgálatokhoz N-etilmaleimid (NEM) jelölt vázizom miozin S1-el funkcionált fedőlemezt alkalmaztunk, biztosítva az aktin filamentumok evanszcens mezőben való jelenlétét. A méréseket Olympus IX81 mikroszkóppal (491 nm és 568 nm lézer alapú TIRF modul, APON TIRF 60x NA1.45 immerziós objektív, Hamamatsu Orca-ER-1394 CCD kamera) végeztük. A képelemzéshez a Fiji szoftvert használtunk. A mennyiségi elemzés során az aktin filamentumok számát és növekedési sebességét határoztuk meg.

A dDAAM aktin filamentum és mikrotubulus keresztkötegelő képességét falloidin stabilizált aktin filamentumok (0.4 μM 10 % Alexa568NHS-G-aktin) és taxol stabilizált mikrotubulusok (0.4 μM 10 % Hylite Fluor™ 488-tubulin) együttes jelenlétében vizsgáltuk TIRFM kísérletekben. A méréseket Olympus IX81 mikroszkóppal (491 nm és 568 nm lézer alapú TIRF modul, APON TIRF 60x NA1.45 immerziós objektív, Hamamatsu Orca-ER-1394 CCD kamera) végeztük. A képelemzéshez a Fiji szoftvert használtuk. A mennyiségi elemzés során az aktin filamentumok és mikrotubulusok kolokalizációját határoztuk meg (Elie, Prezel et al. 2015).

Szedimentációs kísérletek

A dDAAM-nak aktin filamentumok (2 μM) oldalához való kötődésének vizsgálatához magas fordulatszámú ultracentrifugálási kísérleteket végeztünk (100.000 g, 20 min, 20°C). A felülúszók és pelletek fehérjetartalmát SDS-PAGE analízissel határoztuk meg. A dDAAM:F-aktin kölcsönhatást jellemző disszociációs egyensúlyi állandót a korábbiak szerint származtattuk (Shimada, Nyitrai et al. 2004).

A dDAAM-nak az aktin filamentumok, vagy mikrotubulusok kötegelésére kifejtett hatását alacsony fordulatszámú centrifugálási kísérletekben vizsgáltuk (14.000g, 5 min, 20°C). A felülúszók és pelletek fehérjetartalmát SDS-PAGE analízissel határoztuk meg. A mennyiségi elemzés érdekében a felülúszók relatív F-aktin/mikrotubulus tartalmát határoztuk meg.

Az dDAAM-nak az aktin filamentumokból és mikrotubulusokból (2 μM) álló kopolimerek kialakulására kifejtett hatásainak vizsgálatához egy 30%-os cukorgrádiensen keresztül történő alacsony fordulatszámú centrifugálási (4000 g, 10 min, 20°C) módszert dolgoztunk ki (Elie, Prezel et al. 2015). Kontroll kísérletek alapján ilyen körülmények között az egyedi polimerek csakúgy, mint az aktin filamentum kötegek nem szedimentálódnak, csak a nagyobb filamentum komplexek (mikrotubulus kötegek, F-aktin:mikrotubulus kopolimerek) jelennek meg a pelletben. A felülúszók és pelletek fehérjetartalmát SDS-PAGE analízissel határoztuk meg.

Statisztikai módszerek

Az adatok legalább két független kísérletből származnak. Az értékek átlag \pm standard deviációként vannak megadva. A TIRFM kísérletekből származó adatokat két-mintás T-, illetve Z-próbával elemeztük, figyelembe véve a minta nagyságát és varianciáját (Excel, Microsoft). Jelölések: $p \geq 0.05$ statisztikailag nem szignifikáns, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK

A dDAAM FH1-FH2 domén aktinnal kialakított kölcsönhatását az N-terminális DID és a C-terminális DAD domének közötti autoregulációs kölcsönhatás szabályozza

Pirén polimerizációs kísérleteink eredményei alapján elmondható, hogy a dDAAM DID doménje nem befolyásolja szignifikánsan sem a spontán aktin polimerizáció, sem az FH1-FH2 által katalizált aktin összeszerelődés kinetikáját. Ezzel ellentétben, a cDAAM által katalizált aktin polimerizáció koncentrációfüggő módon gátolt DID jelenlétében. Mivel az egyetlen különbség a dDAAM FH1-FH2 és a cDAAM között a C-terminális DAD-CT régió jelenléte, ez arra enged következtetni, hogy a DID ezen C-terminálison elhelyezkedő doménekén keresztül fejt ki negatív hatást a dDAAM aktivitására. A mennyiségi elemzés alapján a DID:C-terminális kölcsönhatást jellemző disszociációs egyensúlyi állandó ~ 30 nM-ra tehető, mely erős kölcsönhatásra utal. *In vitro* eredményeink alapján a dDAAM egy *bona fide* DRF formin, mivel az FH1-FH2-aktin kölcsönhatás az N-terminális DID és a C-terminális DAD domén között kialakuló autóinhibíció által szabályozott. Az irodalmi adatok és megfigyeléseink alapján ez az autoregulációs mechanizmus konzervált a rovarok és az emberek között (Liu, Sato et al. 2008).

A cDAAM hatékonyabban katalizálja az aktin filamentumok összeszerelődését, mint az FH1-FH2, ami a hatásosabb nukleációt elősegítő képességén alapszik

A dDAAM DAD-CT esetleges aktin aktivitásainak vizsgálata érdekében a konstitutívan aktív FH1-FH2 és cDAAM régiók polimerizációt elősegítő hatásait tanulmányoztuk pirén aktin alapú polimerizációs esszéekben. Eredményeink alapján a cDAAM ~ 36 -szor hatékonyabb a polimerizáció elősegítésében, mint az FH1-FH2. Ez a különbség nem az eltérő aktin monomer affinitásaira vezethető vissza, ahogy azt steady-state fluoreszcencia anizotrópia vizsgálataink is alátámasztják. Egyedi filamentumok összeszerelődésének TIRF mikroszkópiai elemzése alapján a filamentumok száma a cDAAM jelenlétében szignifikánsan nagyobb volt, mint a DAD-CT-t nem tartalmazó FH1-FH2 jelenlétében. A filamentumok növekedési sebességét mindkét konstrukt ugyanolyan mértékben befolyásolta. Összességében megfigyeléseink egyértelműen bizonyítják, hogy a cDAAM fokozottabb polimerizációt elősegítő hatása, az FH1-FH2-höz képest, a hatékonyabb nukleációs aktivitásának köszönhető. Eredményeink tehát arra utalnak, hogy a dDAAM DAD-CT doménje képes befolyásolni az aktív FH1-FH2 domének aktin polimerizációra kifejtett hatását is.

A dDAAM megfelelő nukleációs aktivitásához mind az FH2 mind pedig a C-terminális régiók jelenléte szükséges

Steady-state anizotrópia méréseink szerint a dDAAM izolált DAD-CT régiója, kis affinitással ugyan, de képes kötődni az aktin monomerekhez, függetlenül az FH1-FH2 domén jelenlététől. A kölcsönhatást jellemző affinitás az ionerősség növelésével csökkent. A CT szakasz nélküli (DAD) és a mutációval rendelkező CT (DAD-CT^{R-A})

konstrukcióink esetében nem találtunk szignifikáns kötődést. Pirén aktin alapú polimerizációs és TIRFM méréseink eredményei szerint egyik C-terminális konstrukció sem befolyásolta szignifikánsan az aktin filamentumok összeszerelődésének kinetikáját. Mindezek arra utalnak, hogy a dDAAM DAD-CT az FH2 domén jelenlététől független módon képes kölcsön hatni az aktin monomerekkel, azonban az FH2 doméntől függő aktivitást mutat az aktin dinamika szabályozásában. Az FH2 és a C-terminális domének hozzájárulását a dDAAM aktin polimerizációra kifejtett hatásaihoz a továbbiakban mutációt hordozó, illetve trunkált konstrukciók vizsgálatával folytattuk (FH1-FH2^{I732A}, cDAAM^{I732A}, cDAAM Δ CT, cDAAM^{R-A}). Kinetikai vizsgálataink alapján mind a DAD, mind pedig a CT régió jelenléte szükséges a dDAAM FH1-FH2 doménjének polimerizációra kifejtett hatásának elősegítéséhez. Eredményeink arra is fényt derítettek, hogy a monomer kötés mellett, a DAD-CT régió a filamentum végekkel kialakított kölcsönhatásban is szerepet játszhat.

A dDAAM a sapkafehérje antagonistája

Irodalmi adatok alapján bizonyos forminok a klasszikus sapkafehérjék (CP) antagonistájaként funkcionálnak a szöges vég dinamikájának szabályozásában (Romero, Le Clainche et al. 2004; Bombardier, Eskin et al. 2015). Pirén aktin alapú polimerizációs kísérletekben arra kerestük a választ, hogy a DAD-CT hozzájárul-e a dDAAM sapkafehérjével szemben mutatott antagonistikus hatásához. A mennyiségi elemzés alapján a cDAAM erősebb versenytárs a sapkafehérjével szemben, mint az FH1-FH2 ($IC_{50}(FH1-FH2) = 47.7 \pm 16.97$ nM, $IC_{50}(cDAAM) = 345.9 \pm 27.60$ nM). A natív cDAAM fehérjéhez képest a DAD-CT régió mutációja/trunkációja részleges funkcióvesztést okozott ($IC_{50}(cDAAM^{R-A}) = 108.6 \pm 19.35$ nM, $IC_{50}(cDAAM\Delta CT) = 93.7 \pm 19.06$ nM). Sem az I732A mutációt hordozó FH2 domént tartalmazó konstrukciók, sem az izolált C-terminális régió nem képes befolyásolni a sapkafehérje polimerizációra kifejtett gátló hatását. Ezen eredményeink alapján dDAAM antagonistikus működéséhez a vad-típusú FH2 domén nélkülözhetetlen, míg a DAD-CT elősegíti ezt az aktivitást. Vizsgálataink így a DAD-CT egy új funkcióját azonosították, mint a dDAAM a sapkafehérje ellenében betöltött antagonistikus szerepének szabályozó alegysége.

A DAD-CT:aktin kölcsönhatás szerkezeti háttere

Steady-state anizotrópia és kinetikai vizsgálataink alapján a dDAAM DAD-CT aktin monomer kötését és aktin aktivitását a profilin nem befolyásolja. Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy a profilin és a DAD-CT egyidejűleg kötődik az aktinhoz, egy háromtagú komplexet kialakítva. A komplex csak akkor tud kialakulni, ha a DAD-CT és a profilin kötőhelyei nagymértékben különböznek. Korábbiakban leírták, hogy a profilin kötőhelye az aktin hidrofób zsebébenél, az 1-es és a 3-as alegység között található (Schutt, Myslik et al. 1993). A WH2 domének aktinhoz való kötődési helye is ismert, így egy WH2 doménnel rendelkező fehérje segítségével kompetíciós mérésekből kötőhely elhelyezkedésre következtethetünk. Anizotrópia eredményeink alapján a SALS (Sarcomere Length Short) WH2 doménjei gátolják a DAD-CT aktin

monomerhez való kötődését. Ezek alapján feltételezhetjük, hogy a WH2 és a DAD-CT kötőhelye szignifikánsan átfed. Ezt megerősítendő, szerkezeti elemzést végeztünk. A WH2 domének N-terminálisa egy amfipatikus alpha-hélixbe tekeredve az aktin hidrofób hasadékában található, mely kölcsönhatást a WH2 domén konzervált hidrofób LxxI aminosavai stabilizálják. Ezt a kötést tovább erősíti a WH2 domén C-terminálisa felé elhelyezkedő LKKT/V motívum. Így a WH2 domén C-terminálisa az aktin hegyes vége irányában helyezkedik el, a kötődése elsősorban elektrosztatikus kölcsönhatásokon alapul. Bioinformatikai elemzésünk arra utal, hogy a DAAM DAD-CT rendelkezik egy konzervált LxxI motívummal, habár az LKKT/V szakasz, mely az aktin WH2 domén kölcsönhatás stabilitásában fontos szerepet játszik, hiányzik. Összességében adataink alátámasztják, hogy a gyenge aktin-DAD kölcsönhatás egy, a hidrofób hasadékban található WH2-szerű aminosav tripletnek köszönhető, amelyet a CT szakasz erősíthet az aktin monomer negatív régióival kialakított kölcsönhatásával.

dDAAM képes az aktin filamentumok oldalához kötődni és rendelkezik filamentum kötegelő aktivitással is

A DAD-CT ($K_d = 38.9 \pm 3.2 \mu\text{M}$) képes kötődni az aktin filamentumok oldalához, bár kisebb affinitással, mint az FH1-FH2 ($K_d = 2.1 \pm 0.5 \mu\text{M}$) (Barko, Bugyi et al. 2010)). A C-terminális trunkációja/mutációja a filamentum kötő képességet jelentősen csökkenti ($K_d > 100 \mu\text{M}$). Mind az FH1-FH2, mind a cDAAM képes az aktin filamentumokat kötegelni. Az izolált DAD-CT az oldalkötés által képes az aktin filamentumokat magasabb rendű szerkezeti egységekbe, kötegekbe rendezni, míg a C terminálison trunkált/mutált DAD-CT konstrukciók kötegelő hatása elenyésző. Eredményeink alapján a dDAAM fő filamentum oldalkötő/kötegelő eleme az FH2 domén, míg a DAD-CT csak hozzájárul ehhez funkcióhoz.

A dDAAM kölcsönhat a mikrotubulusokkal és kötegekbe, illetve keresztkötött struktúrákba rendezi azokat

A cDAAM képes köteg/keresztkötött mikrotubulus struktúrákat indukálni (alacsony fordulatszámú szedimentációs kísérletek). Érdekes módon a C-terminális nem tartalmazó FH1-FH2 nem képes erre, csakúgy, mint az izolált DAD-CT sem. Mindezek az eredmények azt jelzik, hogy az izolált FH1-FH2 és a DAD-CT egyedül nem elégségesek a kötegelésre/keresztkötésre. A megfelelő kötegelő/keresztkötő aktivitáshoz ezen régiók mikrotubulusokkal való egyidejű interakciója szükséges.

A dDAAM képes egyidejűleg kötődni az aktin filamentumokhoz és a mikrotubulusokhoz és képes azokat keresztkötegelni

A dDAAM kölcsönhat mind az F-aktinnal, mind a mikrotubulusokkal. Így felmerül annak a lehetősége, hogy a dDAAM esetleg képes a két filamentum típusal egy időben kölcsön hatni, fizikailag összekapcsolni azokat. Ezen lehetőség vizsgálatára létrehoztunk/kifejlesztettünk egy alacsony fordulatszámú szedimentációs protokollt, mely biztosítja az F-aktin-MT komplex más komplexektől való elszeparálását (pl.

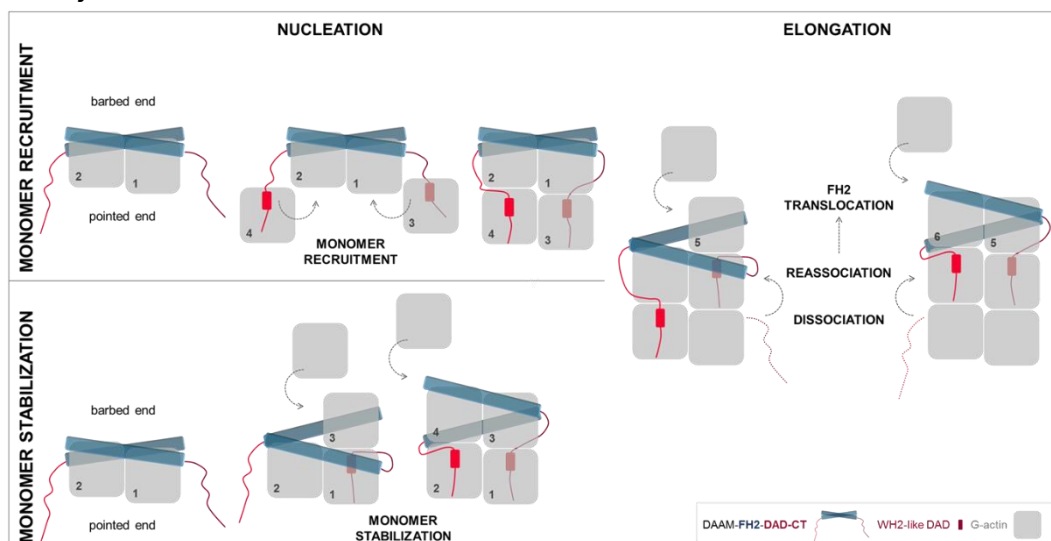
egyéni filamentumok, kötegek). A szeparáció eléréséhez a centrifugálás egy 30 %-os szukróz párnán keresztül nagyon alacsony, 4000 g fordulatszámon történik. Ilyen feltételek mellett az egyéni vagy kötegelt aktin filamentumok (például FH1-FH2, cDAAM által) a felülúszóban maradnak, míg a nagyobb fehérjék (cDAAM által kötegelt/kereszt-kötött mikrotubulusok) szelektíven szedimentálhatóak lesznek és a pelletbe mennek. Mindez magába foglalja, hogy az aktin filamentumok csak akkor jelennek meg a pelletben, ha fizikailag a mikrotubulusokhoz vannak kötve. Eredményeink szerint cDAAM jelenlétében jelentős mennyiségű F-aktin jelent meg a pelletben a mikrotubulusokkal együtt, mutatva a cDAAM és a két polimer típus egyidejű interakcióját. Ezzel ellentétben FH1-FH2, DAD-CT, DAD or DAD-CT^{R-A} jelenlétében az aktin filamentumok nem szedimentálódtak a pelletbe. Ezen eredményeinket teljes mértékben alátámasztják a TIRFM alapú kolokalizációs kísérleteink is. Összefoglalva, mindkét régió, az FH2 és az CT is szükséges az aktin filamentumok és a mikrotubulusok keresztkötegeléshez, bár egyik sem elégséges önmagában, mely kooperatív természetű aktivitásra utal.

KÖVETKEZTETÉSEK és HIPOTÉZISEK

A forminok C-terminálisának szerepe az FH2 által mediált aktin összeszerelődésben

A munkám legfőbb eredményei szerint a dDAAM DAD-CT befolyása az FH1-FH2 régióra, mely így egy hatásosabb nukleátor és az FH1-FH2 filamentum-vég kölcsönhatások megerősítéséhez való hozzájárulás. Hogyan kapcsolhatók össze a DAD-CT szerkezeti és működési sajátosságai? Az FMNL3 formin FH1 doménje a vizsgálatok alapján stabilizálhatja az FH2-dimer szerkezetét, mely így egy erősebb elongátorként működik (Gould, Maiti et al. 2011; Thompson, Heimsath et al. 2013). Az, hogy a DAD-CT egy hasonló hatásmechanizmust adaptál és stabilizálja az FH2 dimereket, ezáltal egy erősebb nukleátort teremtve, az egyik lehetséges magyarázata eredményeinkre. Így a DAD-CT hozzájárulása az FH2 eredeti aktivitásához indirekt és független a saját aktin kötő képességétől. Figyelembe véve, hogy az izolált dDAAM DAD-CT képes az FH2-től függetlenül aktin monomereket kötni egy alternatív magyarázatot is kilátásba helyezhetünk. Azt gondoljuk, hogy a DAD-CT hozzájárulása az FH2 nukleációs aktivitásához a DAD-CT és az aktin monomer direkt kötésének az eredménye. A lehetséges aktin-DAD-CT kötési módok megtalálása érdekében - az FH1-FH2-DAD-CT dimeren belül - ismert aktin, WH2-domén és formin szerkezeteket hasonlítottunk össze. A szerkezeti adatok alapján az FH1-FH2-DAD-CT dimeren belül, a DAD-CT régiók képesek egy-egy aktin monomerrel kapcsolatot kialakítani, a már FH2 által kötött monomereken felül. Mindezek alapján az FH1-FH2-DAD-CT komplexben levő DAD-CT képes közvetlenül kapcsolódni az aktinhoz, mely így a nukleációs intermedierek stabilizációja révén, hatékonyabb nukleációt eredményez. Így a formin C-terminális szakaszainak hozzájárulását az FH2-mediált nukleációhoz a 'monomer stabilizációs modell' alapján értelmezhetjük. A modellben az FH1-FH2

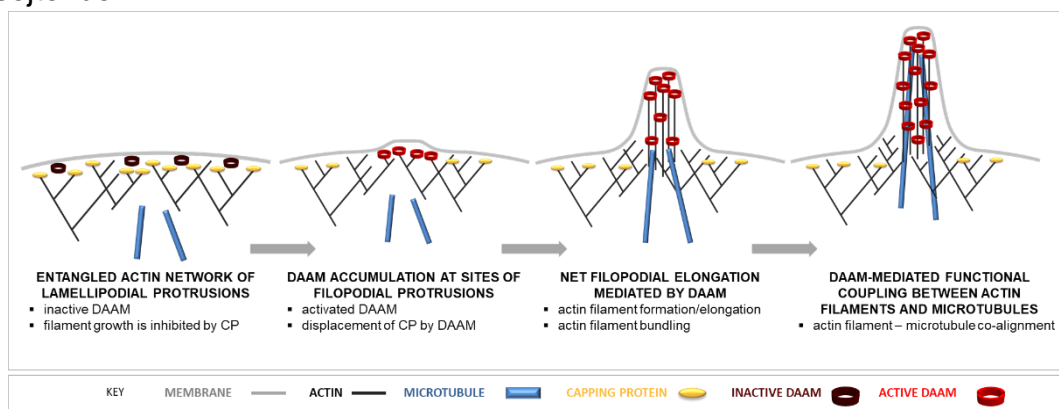
dimer által kötött aktin monomerekhez közvetlenül kapcsolódik a DAD-CT által kötött monomer, stabilizálva a dDAAM aktin komplexet. Ebben az elrendezésben a dDAAM FH1-FH2-DAD-CT dimer négy aktin monomert stabilizál. A közelmúltban egy másik modellt, a formin FH1-FH2-C-terminális, mint háromtagú szerkezeti egységet vezették be, amely szerint a C-terminális egy monomer toborzó motívumként működik (Gould, Maiti et al. 2011). A 'monomer toborzó' modell feltételezi, hogy a DAD-CT által kötött monomer a hegyes végen épül be, melyet azonban profilin jelenléte megakadályozna. Erre azonban méréseink nem utalnak, mivel a profilin nem akadályozza meg a DAD-CT működését. Mindezek mellett figyelembe kell venni, hogy az aktin dDAAM-hoz való affinitása viszonylag gyenge az FH2 domén hiányában, ráadásul megfelelő monomer toborzás megfelelő aktin kötőerősséget is feltételez. Így a 'toborzó modell' feltételezi, hogy a forminok FH1-FH2-C-terminusban levő C-terminus affinitása jelentősen nagyobb, mint izolált formájukban. Az affinitás erősségét feltételezhetően vagy az FH2-által indukált C-terminus szerkezeti változásai, vagy az FH2 által a DAD-CT-hez közvetlen közelségbe hozott monomerek növelhetik meg. Ebben az elrendezésben a forminok alacsony aktin affinitású C-terminális régiói az FH2 dimer által kötött monomerek stabilitását növelhetik, míg a magas affinitású domének a további monomerek asszociációját segíthetik elő. A DAD-CT nemcsak a nukleációban játszik szerepet, de segíti az FH2 filamentumvégekkel kialakított kölcsönhatását és a sapkafehérje elleni kompetíciót is. Ezen funkciók a filamentumvég közvetlen közelében elhelyezkedő alegységekkel történő kölcsönhatásokon keresztül mutatkoznak meg, mely elképzelés az általunk javasolt szerkezeti modellnek is megfelel. A C-terminális jelenlétében a forminok processzivitása megköveteli mind az FH2, mind a DAD-CT disszociációját és re-asszociációját, mely befolyásolja a processzív filamentumvég kötődést, ahogy azt eredményeink és mások munkája is alátámasztja.



Az FH2 és a C-terminális alegységek összehangolt monomer beépítésnek alternatív modelljei
A „monomer toborzó” (Gould, Maiti et al. 2011) és a „monomer stabilizáló” modellek sematikus ábrája.

A dDAAM aktin és mikrotubulus sejtíváz koordinációjában betöltött szerepe

Munkánk során a dDAAM új kölcsönhatásait - az aktinnal való kölcsönhatás mellett, aktivitásait azonosítottuk: képes mikrotubulusokat kötegelni/keresztkötni, és szimultán képes kölcsön hatni az aktin filamentumokkal és a mikrotubulusokkal, keresztkötegelve a két polimertípust. Megállapítottuk, hogy az FH2, mint fő aktin kölcsönható partner jelenléte nem elégséges a mikrotubulus kötegelő/keresztköti és aktin-MT összefűző aktivitáshoz. Ehhez szükséges a C-terminus jelenléte is. Éppen ezért adataink új kölcsönhatásokat, információt szolgáltatnak a dDAAM DAD-CT régiójáról. Kollaborációs partnerünk *Drosophila* primér idegsejtes munkája megerősítette, hogy ezen új aktivitások biológiai jelentőséggel is bírnak (Szikora, Foldi et al. 2017). A dDAAM kolokalizálódik, mind az aktin, mind a mikrotubulus hálózattal az idegsejtek növekedési kúpjaiban és jelentős mennyiségű hányaduk (~ 20 %) keresztköti a két polimerhálót. Elmondható, hogy a dDAAM kölcsönhatásai alapvető szerepet játszanak a megfelelő filopodium képződésben és dinamikában a növekedési kúpban. Az idegrendszer aktin-mikrotubulus hálózat működésének és szabályozásának részleteiben való megértéséhez további kutatásokat kell végezni. *In vitro* adataink alapján, a dDAAM filopodium képződésben játszott szerepéről a növekedési kúpban a következő munkahipotézist állítjuk fel. (Ábra 34). Az aktin gazdag periférián, a lamellipodium aktin filamentum kötegekkel stabilizált kitérkedéseit, az Arp2/3 komplex és a sapkafehérje koordinált együttműködése tartja fenn, mely meghatározza az erő kifejtés irányát és mechanikai stabilitást is ad (Blanchoin, Boujemaa-Paterski et al. 2014). Az elongáció előrehaladtát a filamentumvégekhez kapcsolódó sapkafehérjék akadályozzák meg. A filopodium képződés során a dDAAM aktiválódik: a megfelelő RhoGTPáz kötődik a DID doménhez. A DID-DAD kötés felbomlik és az FH1-FH2 domén aktin kötőhelye már nem lesz szerkezeti gátolt. A dDAAM versenyezve a sapkafehérjével, fenntartja az irányított és folyamatos profilin:aktin beépülést a filamentumvégeken, mely filamentum és ezáltal filopodium hossznövekedéshez vezet. Kötegelő aktivitása által a dDAAM a képződő filopodiális aktin filamentumokat kötegeli, növelve a filopodium mechanikai integritását. A dDAAM a mikrotubulusok filopodiumba való beáramlásában is segíthet. Egyidejűleg kötődve az aktin filamentumokhoz és mikrotubulusokhoz keresztköti a két polimer rendszert, mely kötegek így együtt tudják a filopodiumot kialakítani az idegsejtekben.



A dDAAM működési modellje filopodium képződés során az idegsejtekben.

A TÉMÁBAN ELÉRT ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

Munkám során a *Drosophila* Dishevelled-associated activator of morphogenesis (dDAAM) forminnak a sejtvezérlés dinamikai szabályzásban betöltött szerepét kutattam. A DAAM különböző biológiai funkciók elengedhetetlen szereplője és kulcsfontosságú az aktin és a mikrotubulus hálózat szabályzásban az idegrendszer folyamatos átalakulása során. Korábbiakban kutatócsoportunk a DAAM FH1-FH2 domén szerepét már leírta, de friss tanulmányok szerint a forminok C-terminálisa is képes befolyásolni az aktin dinamikáját. Az eddigi kutatások úgy tekintettek a forminokra, mint aktin kötő fehérjére. Azonban *in vivo* vizsgálatok megmutatták, hogy dDAAM képes az idegi mikrotubulus hálózattal is kölcsönhatni.

A dDAAM a biológiai funkcióinak, idegrendszerben betöltött szerepének molekuláris működési alapjainak megértéséhez, a dDAAM különböző régióinak kölcsönhatásait vizsgáltam az aktinnal és a mikrotubulusokkal.

Eredményeim összefoglalása:

- A dDAAM egy *bona fide* DRF, vagyis az FH2 domén aktin kötése a N-terminális DID és a C-terminális DAD domének által szabályozott.
- A DAD-CT szakaszt tartalmazó cDAAM hatékonyabban katalizálja az aktin filamentumok összeszerelődését, mint az FH1-FH2, ami az erősebb nukleációt elősegítő hatásán alapszik.
- A DAD-CT tartalmazó cDAAM hatásosabban képes a sapkafehérje jelenlétében a filamentumvég dinamikáját fenntartani, mint az FH1-FH2, mely a DAD-CT új szerepét vetíti elő, mint az elongációt elősegítő gépezet egysége.
- Az izolált dDAAM DAD-CT FH2-től független módon képes kötődni az aktin monomerekhez és filamentumokhoz, mely kötődés elektrosztatikus kölcsönhatásokon alapszik.
- A dDAAM DAD-CT aktin monomer kölcsönhatást a profilin nem befolyásolja jelentősen, ellentétben a WH2 domén fehérjékkel.
- A dDAAM DAD-CT aktin kötő képessége ellenére, az FH2 hiányában nem befolyásolja az aktin dinamikát, vagyis FH2-függő funkciókkal rendelkezik.
- A dDAAM képes kötegekbe rendezni az aktin filamentumokat, amihez az FH1-FH2 domén jelenléte szükséges és elégséges.
- A dDAAM képes magasabb rendű kötegekbe rendezni a mikrotubulusokat, amelyhez az FH1-FH2 és DAD-CT együttes jelenléte szükséges. Ez a képesség feltételezhetően kooperatív tulajdonsággal bír.
- A dDAAM képes egy időben kötődni az aktin filamentumokhoz és a mikrotubulusokhoz és keresztkötegelni a két polimertípust, mely aktivitás mind az FH1-FH2 mind a DAD-CT domén jelenlétét feltételezi.

Összességében eredményeim új perspektívába helyezik a dDAAM nemcsak az aktin, de az aktin-mikrotubulus hálózatban nyújtott szabályzó szerepét, és szélesítik az egyes formin domének a polimerhálózatok szabályzásban betöltött funkcióinak megértését is.

REFERENCIÁK

- Bao, B., L. Zhang, et al. (2012). "Deletion of a single-copy DAAM1 gene in congenital heart defect: a case report." BMC Med Genet **13**: 63.
- Barko, S., B. Bugyi, et al. (2010). "Characterization of the biochemical properties and biological function of the formin homology domains of Drosophila DAAM." J Biol Chem **285**(17): 13154-13169.
- Bartolini, F. and G. G. Gundersen (2010). "Formins and microtubules." Biochim Biophys Acta **1803**(2): 164-173.
- Bartolini, F., J. B. Moseley, et al. (2008). "The formin mDia2 stabilizes microtubules independently of its actin nucleation activity." J Cell Biol **181**(3): 523-536.
- Blanchoin, L., R. Boujemaa-Paterski, et al. (2014). "Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility." Physiol Rev **94**(1): 235-263.
- Bombardier, J. P., J. A. Eskin, et al. (2015). "Single-molecule visualization of a formin-capping protein 'decision complex' at the actin filament barbed end." Nat Commun **6**: 8707.
- Bosch, M., K. H. Le, et al. (2007). "Analysis of the function of Spire in actin assembly and its synergy with formin and profilin." Mol Cell **28**(4): 555-568.
- Bugyi, B., D. Didry, et al. (2010). "How tropomyosin regulates lamellipodial actin-based motility: a combined biochemical and reconstituted motility approach." Embo J **29**(1): 14-26.
- Bugyi, B., G. Papp, et al. (2006). "Formins regulate actin filament flexibility through long range allosteric interactions." J Biol Chem **281**(16): 10727-10736.
- Chhabra, E. S. and H. N. Higgs (2006). "INF2 Is a WASP homology 2 motif-containing formin that severs actin filaments and accelerates both polymerization and depolymerization." J Biol Chem **281**(36): 26754-26767.
- Cooper, J. A., S. B. Walker, et al. (1983). "Pyrene actin: documentation of the validity of a sensitive assay for actin polymerization." J Muscle Res Cell Motil **4**(2): 253-262.
- Coue, M., S. L. Brenner, et al. (1987). "Inhibition of actin polymerization by latrunculin A." FEBS Lett **213**(2): 316-318.
- Elie, A., E. Prezel, et al. (2015). "Tau co-organizes dynamic microtubule and actin networks." Sci Rep **5**: 9964.
- Feuer, G., F. Molnar, et al. (1948). "Studies on the composition and polymerization of actin." Hung Acta Physiol **1**(4-5): 150-163.
- Gaillard, J., V. Ramabhadran, et al. (2011). "Differential interactions of the formins INF2, mDia1, and mDia2 with microtubules." Mol Biol Cell **22**(23): 4575-4587.
- Gould, C. J., S. Maiti, et al. (2011). "The formin DAD domain plays dual roles in autoinhibition and actin nucleation." Curr Biol **21**(5): 384-390.
- Heimsath, E. G., Jr. and H. N. Higgs (2012). "The C terminus of formin FMNL3 accelerates actin polymerization and contains a WH2 domain-like sequence that binds both monomers and filament barbed ends." J Biol Chem **287**(5): 3087-3098.
- Liu, W., A. Sato, et al. (2008). "Mechanism of activation of the Formin protein Daam1." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(1): 210-215.
- Matusek, T., A. Djiane, et al. (2006). "The Drosophila formin DAAM regulates the tracheal cuticle pattern through organizing the actin cytoskeleton." Development **133**(5): 957-966.
- Matusek, T., R. Gombos, et al. (2008). "Formin proteins of the DAAM subfamily play a role during axon growth." J Neurosci **28**(49): 13310-13319.

- Molnar, I., E. Migh, et al. (2014). "DAAM is required for thin filament formation and Sarcomerogenesis during muscle development in *Drosophila*." *PLoS Genet* **10**(2): e1004166.
- Palazzo, A. F., T. A. Cook, et al. (2001). "mDia mediates Rho-regulated formation and orientation of stable microtubules." *Nat Cell Biol* **3**(8): 723-729.
- Perelroizen, I., J. B. Marchand, et al. (1994). "Interaction of profilin with G-actin and poly(L-proline)." *Biochemistry* **33**(28): 8472-8478.
- Pollard, T. D. and J. A. Cooper (1984). "Quantitative analysis of the effect of *Acanthamoeba* profilin on actin filament nucleation and elongation." *Biochemistry* **23**(26): 6631-6641.
- Romero, S., C. Le Clainche, et al. (2004). "Formin is a processive motor that requires profilin to accelerate actin assembly and associated ATP hydrolysis." *Cell* **119**(3): 419-429.
- Roth-Johnson, E. A., C. L. Vizcarra, et al. (2014). "Interaction between microtubules and the *Drosophila* formin Cappuccino and its effect on actin assembly." *J Biol Chem* **289**(7): 4395-4404.
- Schutt, C. E., J. C. Myslik, et al. (1993). "The structure of crystalline profilin-beta-actin." *Nature* **365**(6449): 810-816.
- Shimada, A., M. Nyitrai, et al. (2004). "The core FH2 domain of diaphanous-related formins is an elongated actin binding protein that inhibits polymerization." *Mol Cell* **13**(4): 511-522.
- Szikora, S., I. Foldi, et al. (2017). "The formin DAAM is required for coordination of the actin and microtubule cytoskeleton in axonal growth cones." *J Cell Sci*.
- Thompson, M. E., E. G. Heimsath, et al. (2013). "FMNL3 FH2-actin structure gives insight into formin-mediated actin nucleation and elongation." *Nat Struct Mol Biol* **20**(1): 111-118.
- Toth, M. A., A. K. Majoros, et al. (2016). "Biochemical Activities of the Wiskott-Aldrich Syndrome Homology Region 2 Domains of Sarcomere Length Short (SALS) Protein." *J Biol Chem* **291**(2): 667-680.
- Vizcarra, C. L., B. Bor, et al. (2014). "The role of formin tails in actin nucleation, processive elongation, and filament bundling." *J Biol Chem* **289**(44): 30602-30613.
- Vogler, G., J. Liu, et al. (2014). "Cdc42 and formin activity control non-muscle myosin dynamics during *Drosophila* heart morphogenesis." *J Cell Biol* **206**(7): 909-922.
- Young, K. G., S. F. Thurston, et al. (2008). "INF1 is a novel microtubule-associated formin." *Mol Biol Cell* **19**(12): 5168-5180.
- Zhou, F., P. Leder, et al. (2006). "Formin-1 protein associates with microtubules through a peptide domain encoded by exon-2." *Exp Cell Res* **312**(7): 1119-1126.

PhD munkámhoz kapcsolódó publikációk

1. **Andrea Teréz Vig**, István Földi, Szilárd Szikora, Ede Migh, Rita Gombos, Mónika Ágnes Tóth, Tamás Huber, Réka Pintér, Gábor Csaba Talián, József Mihály, Beáta Bugyi (2017) The activities of the C-terminal regions of the formin protein dishevelled-associated activator of morphogenesis (DAAM) in actin dynamics. *Journal of Biological Chemistry*, 2017 Aug 18;292(33):13566-13583. doi: 10.1074/jbc.M117.799247. Epub 2017 Jun 22.
IF: 4.258, Q1/D1
2. Szilárd Szikora, István Földi, Krisztina Tóth, Ede Migh E, **Andrea Teréz Vig**, Beáta Bugyi, József Maléth, Péter Hegyi, Péter Kaltenecker P., Natalia Sanchez-Soriano, József Mihály J (2017) The formin DAAM is required for coordination of the actin and microtubule cytoskeleton in axonal growth cones. *Journal of Cell Science*, 2017 Aug 1;130(15):2506-2519. doi: 10.1242/jcs.203455. Epub 2017 Jun 12.
IF: 4.431, Q1/D1, Independent citation: 1

PhD munkámhoz kapcsolódó konferencia előadások

1. **Andrea Vig**, Péter Gaszler, Mónika Ágnes Tóth, Beáta Bugyi: The CT region of DAAM has a supporting role in FH2-mediated actin dynamics regulation, 2016.05.27-29. 5th Interdisciplinary Doctoral Conference, Pécs
2. **Andrea Vig**, Andrea Majoros, Tamás Huber, Ede Migh, József Mihály, Miklós Nyitrai and Beáta Bugyi: DAAM formin's C-terminal end in the actin-formin interaction, Membrán Transzport Konferencia 2015.05.19-22. Sümeg

PhD munkámhoz kapcsolódó posztereim

1. Pintér Réka, Fórizs Judit Viktória, Huber Tamás, **Vig Andrea Teréz**, Bugyi Beáta (2017): *A Disheveled-Associated Activator of Morphogenesis (DAAM) formin szerepe az aktin dinamikájában.* (2017. 08. 22–25. A Magyar Biofizikai társaság XXVI. Kongresszusa, Szeged)
2. Fórizs Judit Viktória, Pintér Réka, **Vig Andrea Teréz**, Huber Tamás, Bugyi Beáta (2017): *A DAAM (Disheveled-Associated Activator of Morphogenesis) formin szerepe az aktin-mikrotubulus dinamika koordinációjában.* (2017. 08. 22–25. A Magyar Biofizikai társaság XXVI. Kongresszusa, Szeged)
3. Szilárd Szikora, István Földi, Krisztina Tóth, **Andrea Vig**, Ede Migh, Beáta Bugyi, József Mihály (2017): *The formin DAAM coordinates the actin and the microtubule cytoskeleton during axonal development.* (2017. 03. 31–04. 02. Hungarian Molecular Life Sciences, Eger)
4. István Földi, Szilárd Szikora, Krisztina Tóth, **Andrea Vig**, Beáta Bugyi, József Mihály (2017): *Characterization of the interaction between a Drosophila formin DAAM and microtubules.* (2017. 03. 31–04. 02. Hungarian Molecular Life Sciences, Eger)
5. Péter Gaszler, Judit Viktória Fórizs, Tamás Huber, **Andrea Teréz Vig**, Beáta Bugyi (2017): *Coordination of actin-microtubule dynamics by Disheveled-*

- Associated Activator of Morphogenesis (DAAM) formin.* (2017. 03. 31–04. 02. Hungarian Molecular Life Sciences, Eger)
6. Péter Gaszler, Judit Viktória Fórizs, **Andrea Teréz Vig**, Beáta Bugyi (2016): *Coordination of actin-microtubule dynamics by DAAM formin.* (2016. 08. 28–31. Annual Conference of the Hungarian Biochemical Society, Szeged)
 7. Péter Gaszler, **Andrea Vig**, Judit Viktória Fórizs, Mónika Ágnes Tóth, István Földi, József Mihály, Beáta Bugyi (2016): *The CT region of DAAM has a supporting role in FH2-mediated actin dynamics regulation.* (2016. 08. 28–31. Annual Conference of the Hungarian Biochemical Society, Szeged)
 8. **Andrea Vig**, Péter Gaszler, Mónika Ágnes Tóth, István Földi, József Mihály, Beáta Bugyi (2016): *The CT region of DAAM has a supporting role in FH2-mediated actin dynamics regulation.* (2016. 06. 20–23. European Cytoskeletal Forum, Cambridge)
 9. **Vig Andrea**, Majoros Andrea, Huber Tamás, Migh Ede, Mihály József, Nyitrai Miklós és Bugyi Beáta (2015): *A DAAM formin C-terminális régióinak szerepe az aktin-formin kölcsönhatás integritásában,* (2015. 05.19-22. Membrán Transzport Konferencia, Sümeg)