

# PhD ÉRTEKEZÉS

## A forminok hatása az aktin filamentumok polimerizációs tulajdonságaira és dinamikai jellemzőire

BUGYI BEÁTA



Pécsi Tudományegyetem  
Általános Orvostudományi Kar  
Biofizikai Intézet  
2006.

Program: Biokémia és molekuláris biológia

Programvezető: Dr. Sümegi Balázs

Alprogram: B-130: Funkcionális fehérjedynamika vizsgálata biofizikai módszerekkel

Alprogramvezető: Dr. Somogyi Béla

Témavezetők: Dr. Nyitrai Miklós

Dr. Somogyi Béla

„Vannak, akik a Napot sárga foltta alakítják át. És vannak mások, akik Nappá alakítanak egy sárga foltot.”

*Pablo Picasso*

## **Köszönetnyilvánítás**

*Köszönetet mondok témavezetőmnek, Dr. Nyitrai Miklósnak a szakmai tanácsaiért és irányításáért, a munkám során nyújtott támogatásért. Köszönöm továbbá az értékes beszélgetéseket, amelyekből a legtöbbet tanulhattam mind a tudományról, mind pedig az életszemléletről.*

*Köszönettel tartozom Dr. Somogyi Béla egyetemi tanárnak, hogy intézetében lehetőséget adott a Ph.D. munkám elvégzéséhez valamint azért, hogy megismerhettem egyedülálló gondolkodásmódját, és részese lehettem annak a korszaknak, amit személye képviselt a Biofizikai Intézetben.*

*Köszönöm Dr. Lőrinczy Dénes egyetemi docensnek a kalorimetriai mérések kivitelezése és értelmezése során nyújtott nélkülözhetetlen segítségét.*

*Köszönöm Dr. Belágyi József emeritus professzornak, Ifj. Dr. Kellermayer Miklós egyetemi docensnek és Dr. Hild Gábor egyetemi docensnek hogy hasznos tanácsaikkal és észrevételeikkel segítették az értekezésem elkészítését.*

*Köszönöm továbbá a Biofizikai Intézet minden dolgozójának a mindennapi munka során nyújtott értékes segítségüket és hasznos tanácsaikat.*

*Köszönöm Édesanyámnak, Édesapámnak és Testvéremnek, hogy bíztak bennem, szeretetükkel kitartást és erőt adtak munkámhoz és a mindennapokhoz.*

*Köszönöm Torjai Lászlónak, hogy vigyáz rám és gondoskodásával nyugodt hátteret biztosít a munkám végzéséhez.*

# Tartalomjegyzék

Köszönetnyilvánítás	4
Tartalomjegyzék	5
<b>I. Irodalmi áttekintés</b>	7
I. 1. Az aktin	7
I. 2. Az aktin nukleációs faktorok	11
I. 2. 1. A forminok	12
I. 2. 1. 1. A formin fehérjék szerkezete	13
I. 2. 1. 2. A forminok funkciója	17
<b>II. Célkitűzések</b>	21
<b>III. Anyagok és módszerek</b>	22
III. 1. Fehérjék	22
III. 1. 1. Az aktin preparálása és izolálása	22
III. 1. 2. Az mDia fehérjék expressziója és tisztítása	22
III. 2. Ioncsere, polimerizálás	23
III. 3. Az aktin fluoreszcens jelölése	24
III. 4. A fehérje-koncentrációk és a jelölési arányok meghatározása	25
III. 5. „Steady-state” fluoreszcencia spektroszkópia	26
III. 6. Fluoreszcencia rezonancia energia transzfer	28
III. 7. Koszedimentációs módszer	31
III. 8. Az ionerősség meghatározása	33
III. 9. A foszfát disszociáció sebességének meghatározása	34
III. 10. Differenciális pásztázó kalorimetriai kísérletek	35
<b>IV. Eredmények és következtetések</b>	37
IV. 1. A forminok hatása az aktin filamentumok polimerizációjának kinetikájára	37
IV. 1. 1. Az mDia fehérjék központi FH2 doménjének hatása az aktin polimerizációjának és depolimerizációjának sebességére	37
IV. 1. 2. Az mDia fehérjék központi FH2 doménjének hatása az aktin kritikus koncentrációjára	41
IV. 1. 3. Az mDia-FH2 <sup>monomér</sup> fragmentumok aktinhoz való kötődésének a vizsgálata	44
IV. 1. 4. Az mDia1-FH2 <sup>monomér</sup> fragmentumban létrehozott pontmutációk hatásának vizsgálata	47
IV. 1. 5. A polimerizációt gyorsító mDia fragmentumok vizsgálata	52
IV. 1. 5. 1. Az mDia-FH2 <sup>dimér</sup> fragmentumok hatása az aktin polimerizációjára	52
IV. 1. 5. 2. A polimerizációt gyorsító hatás hátterében álló szerkezeti sajátosságok	55
IV. 2. A forminok hatása az aktin filamentumok dinamikai tulajdonságaira	57
IV. 2. 1. A FRET alkalmazhatóságának vizsgálata a formin–aktin kölcsönhatás leírására	58
IV. 2. 1. 1. A hőmérséklet és a fluoreszcens próbák hatása az mDia1–FH2 <sup>dimér</sup> aktivitására	58
IV. 2. 1. 2. A hőmérséklet, a fluoreszcens próbák és az mDia1–FH2 <sup>dimér</sup> hatása az aktin kritikus koncentrációjára	62
IV. 2. 2. A FRET kísérletek	66
IV. 2. 2. 1. Az mDia1-FH2 <sup>dimér</sup> hatása az aktin filamentumok flexibilitására	66

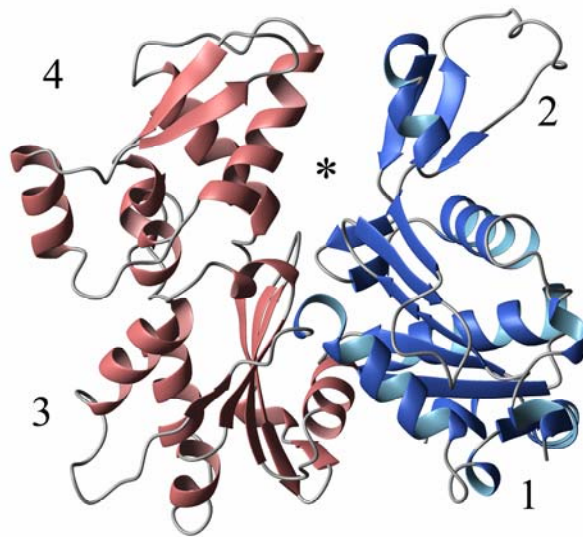
IV. 2. 3. Az mDia1-FH2 <sup>dimér</sup> aktin filamentumokhoz való kötésének vizsgálata	69
IV. 2. 4. Az mDia1-FH2 <sup>dimér</sup> fragmentum és az aktin kölcsönhatását leíró modell	70
IV. 2. 5. Az mDia1-FH2 <sup>monomér</sup> hatása az aktin filamentumok flexibilitására	73
IV. 2. 6. A formin aktin kölcsönhatás természete	74
IV. 2. 7. Az mDia1-FH2 <sup>dimér</sup> fragmentum hatása az aktin filamentumok termikus stabilitására	78
IV. 2. 8. Az mDia1-FH2 <sup>dimér</sup> fragmentum hatása a foszfát csoport disszociációjának sebességére	79
IV. 2. 9. Az mDia1-FH2 <sup>dimér</sup> fragmentum hatása az aktin és a kofilin kölcsönhatására	82
IV. 3. Eredményeink biológiai jelentősége: egy lehetséges új mechanizmus az aktin citoszkeleton szabályozásában	84
<b>V. Összefoglalás</b>	<b>86</b>
<b>VI. Rövidítések jegyzéke</b>	<b>87</b>
<b>Az értekezés alapjául szolgáló közlemények</b>	<b>88</b>
<b>Az értekezéshez kapcsolódó előadások</b>	<b>88</b>
<b>Az értekezéshez kapcsolódó poszterek</b>	<b>88</b>
<b>Az értekezésben nem szereplő közlemények</b>	<b>89</b>
<b>Irodalomjegyzék</b>	<b>90</b>

# I. Irodalmi áttekintés

## I. 1. Az aktin

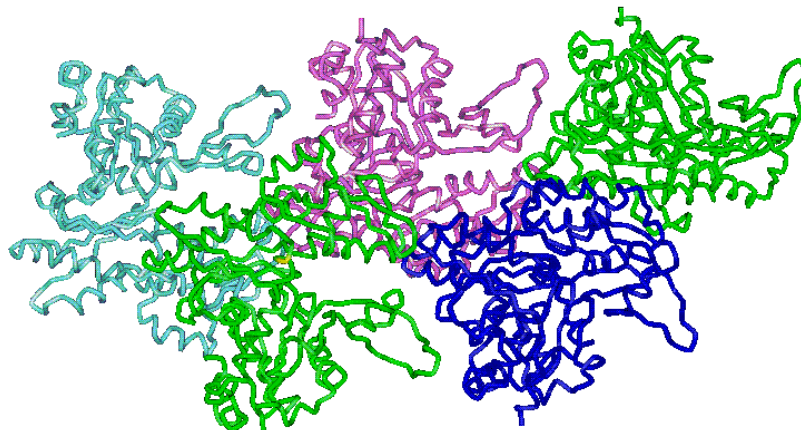
Az aktin citoszkeleton (a mikrofilamentum rendszer) az eukarióta sejtek citoplazmájában található fehérjehálózat felépítésében résztvevő, nagymértékben konzervált, filamentális szerkezetű sejtvázkomponens. A sejt alakjának, mechanikai ellenálló képességének biztosítása mellett a sejt dinamikus tulajdonságainak meghatározásában is alapvető szerepet játszik. A strukturálisan differenciált szerveződést mutató aktin filamentum hálózatok eltérő mechanikai tulajdonságokkal rendelkeznek, ez ad lehetőséget különböző intra- és extracelluláris funkciók betöltésére. A változatos morfológiájú aktin struktúrák kialakításának hátterében az asszociált fehérjék diverzitása, azok térben és időben összehangolt működése, illetve a mikrofilamentumok polimerizációjával kapcsolatos molekuláris mechanizmusok állnak.

A mikrofilamentum rendszer fő alkotóeleme az aktin, amely egy 375 aminosavból felépülő, 43 kDa relatív molekulatömegű fehérje. A sejtben, két formában, monomér vagy más néven globuláris (G - aktin), illetve a monomérekkel nem kovalens kötéssel létrejövő polimer, vagy más néven filamentális (F - aktin) formában fordul elő. Az aktin monomér DNáz 1-el alkotott komplexének a röntgen-krisztallográfián alapuló háromdimenziós atomi modellje 1990-ben vált ismertté [1]. A monomér szerkezete két doménre osztható, amelyek közül a kisebb domént a szubdomén 1 és 2, míg a nagyobb domént a szubdomén 3 és 4 alkotja (*1. ábra*). A két domén közötti hasadékban találhatóak az elsődleges kation-, és a nukleotidkötő helyek. A kötött kétértékű kation fiziológiásan a  $Mg^{2+}$ , *in vitro* körülmények között az aktin preparálás oldatai és a kationokhoz való affinitások miatt a  $Ca^{2+}$ . A nukleotidkötő hely ATP-t, ADP.P<sub>i</sub>-t vagy ADP-t tart kötve. Az ATP molekula a fehérjével és a zsebben elhelyezkedő kationnal egyaránt kötést létesít biztosítva a monomér szerkezeti stabilitását. Teljesen nukleotidmentes környezetben az aktin gyorsan denaturálódik.



1. *ábra*: Az aktin monomér szalagmodellje. Az I. domént késsel, a II. domént rózsaszínnel jelöltük. Az 1-4 számok az egyes szubdoménokat jelölik. A csillag az I. és II. domén között elhelyezkedő nukleotid-, és kationkötő helyet jelöli (Protein Data Bank kód: 1ATN [2]).

Az aktin polimerizációja során, a monomerek összekapcsolódása révén jön létre az aktin filamentum (2. *ábra*), amely geometriailag egy egyszálú, alacsony menetemelkedésű (5.9 nm) balmenetes hélixként (úgynevezett „genetikus hélix”) valamint két, egymásra tekeredő százból álló nagy emelkedésű (72 nm) jobbmenetes hélixként írható le.



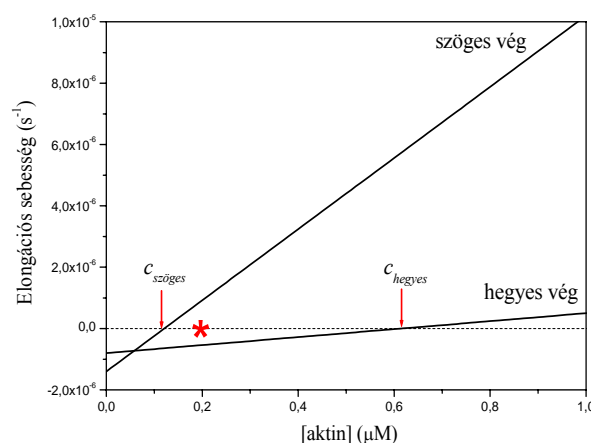
2. *ábra*: Az aktin monomerek polimerizációja során felépülő filamentum modellje. Az egyes protomereket a különböző színek jelölik.



Az aktin filamentumban a monomérek orientációja rendezett, ami a filamentumok szerkezeti polaritását eredményezi. A miozin fejekkel dekorált aktin filamentumok negatív festéssel készített elektronmikroszkópos képe alapján a filamentumok egyik végét szöges végnek (vagy „barbed end”), a másikat hegyes végnek (vagy „pointed end”) nevezzük [3].

Az aktin filamentumok polimerizációja három fő szakaszból áll. A monomérek aktivációját követően az első fázisban, a nukleáció szakaszában két aktin monomér összekapcsolódása során jönnek létre az aktin dimérek. Ezekhez egy újabb monomér hozzákapcsolódása révén alakulnak ki az aktin trimérek, vagy nukleuszok. A dimérek, illetve a trimérek instabilitása miatt a nukleáció folyamata lassú (e komplexek képződésére jellemző egyensúlyi állandók rendre:  $K_d^{\text{dimér}} = 10^5 \mu M$  és  $K_d^{\text{trimér}} = 10 - 100 \mu M$  [4]). A polimerizáció következő szakasza az aktin monomérek filamentumba épülése, a diffúziókontrollált elongáció. Az utolsó fázisban egy dinamikus egyensúly, úgynevezett taposómalom (vagy „treadmilling”) áll be. Ebben az állapotban a monomérek a kialakult filamentumokba épülnek (asszociáció), illetve azokról leválnak (disszociáció), így a filamentumok hossza nem változik, bennük mégis folyamatos dinamikus belső mozgás figyelhető meg. A filamentumnak mind a két végén végbemegy mind a monomérek asszociációja, mind a disszociációjuk. Az ezen folyamatokat az egyes végeken jellemző kinetika miatt azonban a filamentum szöges végén a monomérek asszociációja, a hegyes végen pedig a disszociációjuk a domináns folyamat. A rövidülő vég monomérjei elsősorban ADP-t, míg a növekvő véghez kapcsolódó monomérek ATP-t kötnek. Mivel az ATP hidrolízise általában – a tipikus aktin koncentrációk mellett - lassabb, mint a monomér asszociáció sebessége, a filamentumok szöges végén ún. ATP-monomér sapka alakul ki. A filamentumok „korát” egy belső óraként az ATP hidrolízise és a foszfát csoport disszociációja méri. Mind a két folyamat elsőrendű. Az előbbi folyamat gyorsabb, a monomérek filamentumba épülése után másodperceken belül bekövetkezik ( $0.3 \text{ s}^{-1}$  [5]), míg az utóbbi sokkal lassabban megy végbe ( $0.002 \text{ s}^{-1}$  [6]). A foszfát csoport disszociációját egy konformációs változás kíséri, amelynek következtében a filamentumok destabilizálódnak.

Mint azt az előző szakaszban tárgyaltuk, a környezetével egyensúlyban lévő aktin filamentumok mindkét végén épülnek be monomerek a filamentumba, illetve válnak le onnan. E folyamatokra jellemző asszociációs ( $k_+$ ) és disszociációs ( $k_-$ ) állandók hányadosaként mindkét vég esetén megadhatunk egy, az adott vég egyensúlyára jellemző, disszociációs egyensúlyi állandót. Ez az ún. kritikus koncentráció ( $c_{kritikus} = \frac{k_-}{k_+}$ ). A kritikus koncentráció értéke  $Mg^{2+}$ -ot és ATP-t kötő aktin monomerek esetén  $c_{szöges} = 100 \text{ nM}$  a szöges végre, illetve  $c_{hegyes} = 700 \text{ nM}$  a hegyes végre [6]. Ha az aktin monomerek koncentrációja nagyobb, mint a kritikus koncentráció, akkor a végeken végbemenő asszociációs és disszociációs folyamatok a filamentumok növekedéséhez vezetnek. Ellenkező esetben a depolimerizáció folyamata valósul meg. Mind az asszociáció, mind a disszociáció folyamata gyorsabb a filamentumok szöges végén, mint a hegyes végeken. Ennek megfelelően egyensúlyban a szöges végek kinetikai paraméterei a meghatározóak. Az, hogy a taposómalom mechanizmus következtében az egyensúlyban lévő filamentumok hossza nem változik, úgy lehetséges, ha a szöges végeken az időegység alatt kapcsolódó és onnan leváló monomerek száma megegyezik. Ennek megfelelően a filamentumok egyensúlyi állapotára jellemző kritikus koncentráció a szöges és a hegyes vég dinamikáját jellemző kritikus koncentráció értékek közötti monomér koncentrációval lesz egyenlő, de úgy, hogy értéke számottevően közelebb van a szöges vég kritikus koncentrációjához (3. ábra).



3. ábra: A filamentumok növekedésének sebessége a szöges, illetve a hegyes végen. Piros nyilakkal jelöltük a szöges és a hegyes végre jellemző kritikus koncentráció értékeket. Piros csillaggal jelöltük a taposómalom egyensúlyi állapotban jellemző kritikus koncentráció értékét. (Az ábra készítése során felhasznált asszociációs és disszociációs állandók a [7] referenciából származnak.)

## I. 2. Az aktin nukleációs faktorok

A monomérek polimerizációja során felépülő aktin filamentumok szerepet játszanak többek között a sejt alakváltozásában, a sejtmozgásban, a kontraktilis struktúrák felépítésében, és a sejtek közötti kapcsolatok kialakításában. A sejtekben lejátszódó folyamatok során a különböző extracelluláris stimulusok hatására a citoskeletális filamentum-hálózatok átszerveződése következik be. Az aktin citoskeleton dinamikus átrendeződésének hátterében a mikrofilamentum rendszer szabályozásában résztvevő fehérjék összehangolt működése áll, ennek leírására napjainkban a dendritikus nukleációs hipotézis elfogadott [8].

A spontán polimerizáció folyamatában a leglassabb szakasz a nukleáció folyamata, ezért ennek sebessége meghatározza az egész polimerizációs folyamat kinetikáját. Ennek áthidalására és a polimerizáció felgyorsítására a sejteken belül különböző mechanizmusok léteznek, amelyek eredményeképpen a szabad szöges végek kialakulása felgyorsul, vagy a kialakuló végek száma megnő. A gelsolin és ADF/kofilin a már kialakult filamentumokat darabolja szét („severing”). A szöges végekhez kötődő sapkafehérjék leválása („uncapping”) is további szöges végeket eredményez. Az úgynevezett nukleációs faktorok pedig új aktin filamentumok létrehozását segítik a *de novo* nukleáció révén.

Jelenleg a nukleációs faktoroknak három családja ismert, amelyek különböző mechanizmusok révén eltérő szerkezetű és mechanikai tulajdonságú aktin filamentum-hálózatok létrejöttét katalizálják.

Az Arp2/3 fehérje hét alegységből álló komplex, amelyek közül kettő, az Arp2 és az Arp3 az aktin monomérhez hasonló szerkezetet mutatnak, azaz az aktinnal rokon fehérjék (Arp: „Actin-related protein”) [9]. Az Arp2/3 aktivációját a nukleáció-promociós faktorok, illetve másodlagos aktivátorként az aktin filamentum idézik elő. Az aktív komplex a már létező anya-filamentumok oldalához kötődve segíti elő újabb filamentumok, úgynevezett leány-filamentumok nukleációját, amelyek a szöges végükön növekedhetnek. Az Arp2/3 jelenlétében rövid, elágazásokban gazdag filamentum-hálózatok alakul ki, amelyek a membrán közeli területeken lokalizálódó aktin struktúrák felépítésében vesznek részt [10].

Újonnan felfedezett, kevésbé ismert nukleációs faktor a *Drosophila melanogaster*-ből származó spire fehérje [11]. Az eddigi megfigyelések alapján ez a fehérje feltételezhetően az N-terminálisán található négy, egymás utáni aktin monomér kötő WH2 régiója segítségével kapcsol össze négy aktin monomért egy szállá, ami a további polimerizáció alapját képezi [12].

A nukleációt gyorsító faktorok harmadik nagy családját alkotják a forminok, amelyeket munkánk során tanulmányoztunk.

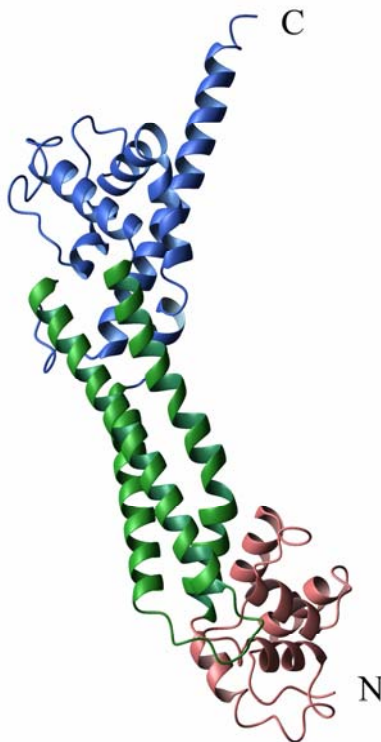
### *I. 2. 1. A forminok*

A forminok az eukarióta sejtekben található, az aktin citoskeleton szabályozásában résztvevő fehérjecsalád. A formin elnevezés az angol *form* (alakít, formál) szóból ered, ugyanis az első ismert formint kódoló gén *ld* („limb deformity”) mutációt tartalmazó alléljei az egérben befolyásolták a neuronális funkciókat, valamint gátolták a végtagok és a vese kifejlődését („formálását”) [13-15]. Castrillon és Wasserman azonosították először a gének közötti szekvenciabeli homológia felismerésével a forminok Diaphanous alcsaládját. Az általuk bevezetett elnevezés a *Dia* allélre utal, amelynek defekciója rovarok lárváiban végtaghiányhoz vezetett [16]. Egyes természetben előforduló formin mutációk kimutathatók voltak humán betegségek, mint pl. sükettség esetében is [17].

A forminok jelenlétében elágazásoktól mentes aktin filamentumok jönnek létre. Az ezekből a filamentumokból felépülő aktin kötegek részt vesznek a sejtosztódás során a kontraktilis gyűrű kialakításában [18-21], a filopodiumok létrejöttében [22], a sejt polarizációjának meghatározásában [23, 24], a vezikulák szállításában, az epiteliális sejtek közötti kapcsolatok kialakításában [25-27] és a sejtmozgásban [28] is. A formin fehérjék szerepet játszanak továbbá egyes jelátviteli folyamatokban, a gének átírásában és az embrionális fejlődés folyamatában [14, 15, 29, 30].

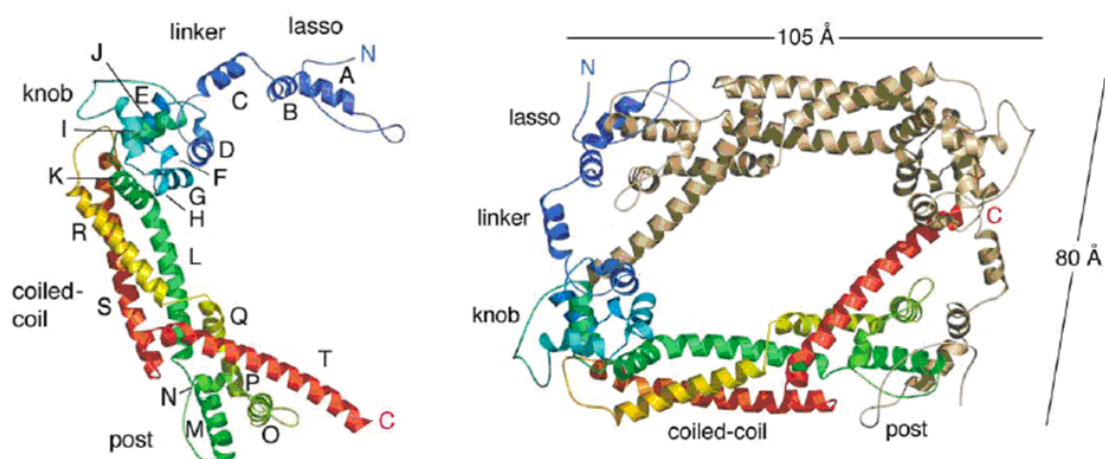
### I. 2. 1. 1. A formin fehérjék szerkezete

A forminok viszonylag nagy (> 1000 aminosav), multidomén szerkezetű fehérjék. Szerkezeti sajátosságuk, hogy az evolúció során nagymértékben konzervált régiókat úgynevezett formin homológia doméneket (FH) tartalmaznak. A röntgenkristallográfia módszerén alapuló kísérletek eredményeképpen jelenleg három forminnal kapcsolatos atomi felbontású szerkezet ismert. Az első ismert szerkezet, az egérből származó mDia1 formin központi FH2 régiójának szerkezete volt (4. ábra), amit a dortmundi Max Plank Intézetben működő kutatócsoporttal való együttműködés keretében határoztunk meg [31]. Nem sokkal később a sarjadzó élesztőben (*Saccharomyces cerevisiae*) található Bni1p FH2 doménje [32], valamint annak a tetrametil-rodaminnal jelölt aktinnal alkotott komplexének a szerkezete is ismertté vált [33]. Az mDia1 N-terminálisán található GBD („GTPase binding domain”) doménjének az RhoA-val alkotott komplexének a szerkezetét pedig 2005-ben sikerült meghatározni [34].



4. ábra: Az mDia1 formin központi FH2 doménjének szalagmodellje. Az N és C betűk a domén amino-, illetve karboxil terminálisát jelölik. (Protein Data Bank kód: 1V9D)

A forminok legnagyobb mértékben konzervált régiója a körülbelül 400 aminosavból álló FH2 domén, amely alapvető szerepet játszik az aktinnal való kölcsönhatás kialakításában. A többnyire alfa-hélixekből felépülő, ellipszoid alakú FH2 domén öt egységre osztható, nevezetesen az N-terminálisán található úgynevezett „lasso”, az azt követő flexibilis „linker”, egy kompakt, globuláris szerkezetű „knob” szegmens, egy „coiled-coil” régió, valamint a C-terminálisán található „post” alegység (5. ábra).



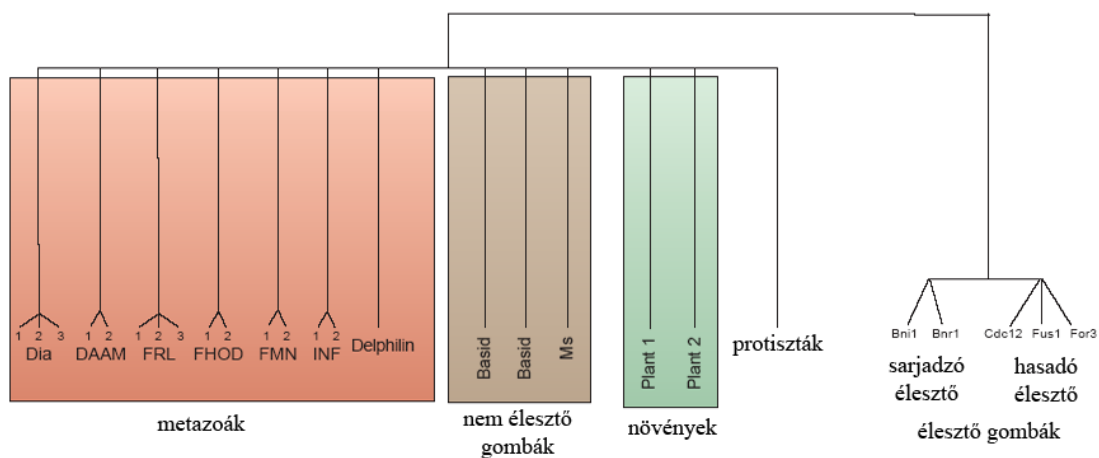
5. ábra: A Bni1p formin FH2 doménjének (bal oldali ábra) és a két FH2 domén összekapcsolódása során létrejövő dimér (jobb oldali ábra) szalagmodellje. A kék N és piros C betű a domén amino-, illetve karboxil terminálisát, a latin betűk az egyes alfa-héliceket jelölik [32].

A Bni1p formin FH2 doménjének atomi felbontású szerkezetének meghatározása révén számos, a forminok mechanizmusának háttérében álló szerkezeti sajátásra derült fény. Bebizonyosodott, hogy dimerizáció során két FH2 domén antiparalell módon képes összekapcsolódni, gyűrű alakú diméreket alkotva. A dimérek stabilitását az egyik alegység „post” és a másik alegység „lasso” régiója közötti hidrogénkötések, illetve hidrofób kölcsönhatások biztosítják. Ezen kapcsolódási felületen található továbbá az FH2 régió leginkább konzervált glicin, aszparagin, tirozin / fenilalanin, metionin, aszparagin (GNY / FMN) szekvenciárészlete. Az FH2 dimér flexibilitását a „linker” régió biztosítja. A flexibilis dimér az FH2 domén funkcionális formája, amely kulcsfontosságú szerepet tölt be az aktin nukleációs fázisára kifejtett gyorsító hatásában, illetve a szöges végekkel való kölcsönhatásának kialakításában.

Az FH2 domén N-terminálisán található a kevésbé konzervált formin homológia 1 domén (FH1), amely prolinban gazdag szekvenciákat tartalmaz. Az FH1 domén kölcsönhat az SH3, illetve a WW doménnal rendelkező faktorokkal [35], az Src családba tartozó kinázokkal [29, 30, 36, 37], valamint kötőhelyeket biztosít (ezek száma a formin fajtájától függően 0 - 16 lehet) az aktin monomér-kötő fehérjének, a profilinnak [38-42]. Az FH1 régió a változatos hossza, a kevésbé konzervált aminosav-szekvenciája, valamint a prolintartalma miatt valószínűleg nem rendelkezik harmadlagos szerkezettel.

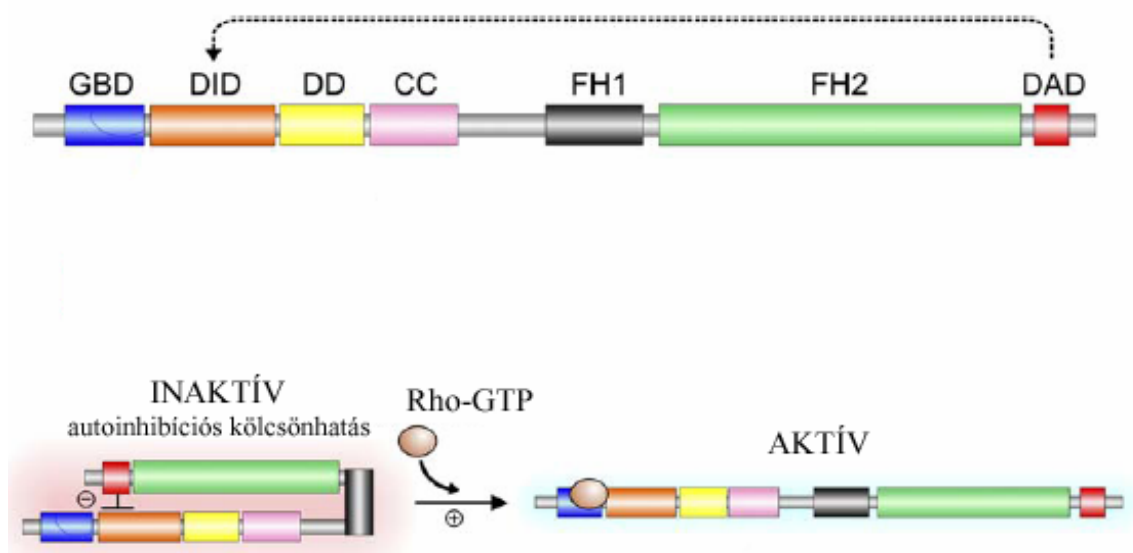
Az eddig ismert összes forminban megtalálható FH1 és FH2 domének mellett bizonyos forminok rendelkeznek még a fehérje amino-terminálisához közeli régióban található FH3 doménnel. Az FH3 a legkevésbé konzervált szerkezetű formin homológia domén, funkciója még kevésbé ismert. Az eddigi ismeretek szerint, feltételezhetően szerepe lehet a hasadó élesztőben (*Schizosaccharomyces pombe*) a sarjak, valamint a mitotikus orsó kialakításában részt vevő Fus1 formin lokalizációjában [43]. Számos formin rendelkezik még „coiled-coil” régióval az FH1 domén N-terminálisán [44]. Az azonban, hogy ezek a fehérjerégiók milyen szerepet töltenek be ez idáig tisztázatlan.

A forminok törzsfelődésének vizsgálata során kiderült, hogy az FH2 domént kódoló génekkel számos faj rendelkezik (6. ábra). Az emlősökben található forminok 7 alcsaládra oszthatóak, ezek a Dia (mammalian mDia1, 2, 3), DAAM (DAAM1, 2), FRL (FRL1, 2, 3) FHOD (FHOD1, 2), Delphilin, FNM (FNM1, 2) és INF (INF1, 2) alcsaládok.



6. ábra: Az FH2 domén sematikus filogenetikus fája [44].

A „Diaphanous-related” forminok (Dia, vagy Drfs) a fent említett doméneken kívül tartalmaznak még további doméneket. Ezek a fehérje amino-terminálisán található GBD domén („GTPase binding domain”), amely a Ras-szerű kis GTPázok alcsaládjába tartozó Rho-fehérjék megkötésére képes, valamint a Diaphanous inhibíciós domén (DID) és a dimerizációs domén (DD), amelyek a C-terminálison található Diaphanous autoregulációs doménnel (DAD) együtt a fehérje aktivitásának szabályozásában vesznek részt. A DID és a DAD domének közötti autoinhibíciós kölcsönhatás következtében a fehérje funkcionálisan inaktív állapotban van. Az aktiváció során az intracelluláris szabályozás eredményeképpen a GBD doménhez egy Ras-homológ fehérje kötődik, aminek következtében a DID és a DAD domének közötti intramolekuláris kölcsönhatás megszűnik, majd a DAD leválik a fehérje N-terminálisáról, szabaddá téve az FH1FH2 régiót (7. ábra).



7. ábra: Az mDia fehérjék domén szerkezete, a DID és DAD domének közötti autoinhibíciós kölcsönhatás és az aktiváció sematikus ábrázolásával [46].



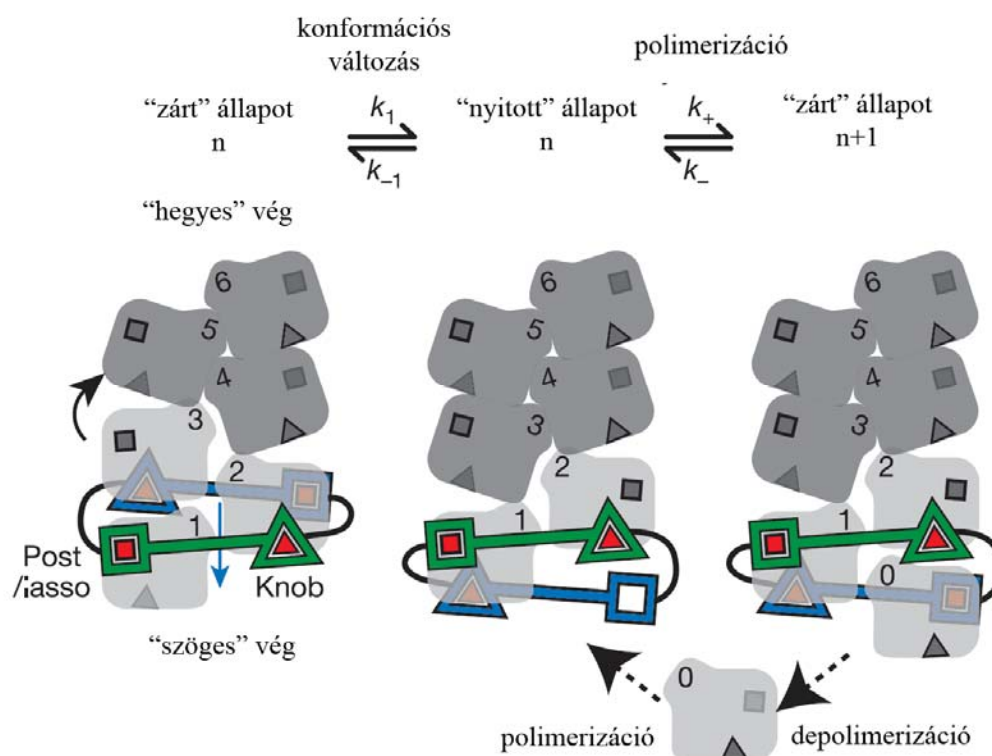
### *I. 2. 1. 2. A forminok funkciója*

A forminok közös tulajdonsága, hogy módosítják az aktin filamentumok polimerizációjának a dinamikáját. Az Arp2/3 komplextől független módon képesek gyorsítani az aktin filamentumok nukleációját [47], továbbá befolyásolják az elongáció sebességét, valamint képesek a polimerizáció előrehaladtával, processziv módon az aktin filamentumok szöges végein maradni, így a sapkafehérjék odakötődését megakadályozni [47, 48].

A forminok funkciójában és az aktin filamentumokkal való kölcsönhatás kialakításában meghatározó szerepe van az FH2 doménnek. Az FH2 domén tulajdonsága, hogy elősegíti az aktin nukleáció folyamatát. A citoplazmában található viszonylag alacsony szabad aktin monomér koncentráció ( $0.5 \mu\text{M}$ ), valamint az aktin dimérek nagyfokú instabilitása miatt a spontán módon keletkező aktin dimérek koncentrációja is igen alacsony. Egy lehetséges mechanizmus szerint a két FH2 által létrehozott dimér aktin monomerekhez való kötése révén stabilizálhatja az aktin diméreket, kedvezőbb feltételeket biztosítva a polimerizáció számára [32, 49-51].

A különböző fajokból származó FH2 doméneknek az elongáció szakaszára kifejtett hatásában jelentős eltérések figyelhetők meg. A Cdc12p formin FH2 doménje klasszikus sapkafehérjeként gátolja a filamentumok elongációját, míg az egérből származó emlős mDia1 formin FH2 doménjének jelenlétében az elongációs sebesség nem változik. Részlegesen gátolják a polimerizáció e szakaszát az FRL1 (~ 80 %-ban), az mDia2 (~ 70 %-ban) és a Bni1p (~ 25 - 50 %-ban) forminok FH2 doménjei is [52].

A jelenlegi modell szerint az FH2 dimér a filamentumok szöges végével egy „nyitott-zárt” egyensúlyi állapotban van, amelynek során három aktin protomérrel van kölcsönhatásban (8. ábra).



8. ábra: Az FH2 dimér processzivitását leíró modell sematikus ábrázolása. A formin dimért alkotó egyes FH2 doméneket zöld és kék szín jelöli. Háromszög jelöli az FH2 domén „knob”, négyzet pedig a „post”/”lasso” régióját. Világosszürke szín jelöli a formin dimér által kötött aktin protoméret, sötétszürke szín pedig a filamentumban lévő többi protomért mutatja [33]. Az ábra részletes magyarázata a szövegben található.

A dimért alkotó FH2 domének mindegyike két aktin monomérrel létesít kötést. A „zárt” állapotot a dimér által kötött három protomér feszített konformációs állapota jellemzi. A „nyitott” állapotban a filamentum szöges végén található aktin protomér és az egyik FH2 domén „post” régiója közötti kapcsolat megszűnik, lehetővé téve egy újabb monomér filamentumba épülését. Eközben a filamentum végétől legtávolabb elhelyezkedő, FH2 dimér által kötött aktin protomér a filamentumba épül, amit valószínűleg egy konformációs változás is kísér. Ennek során ez a protomér felveszi a filamentumban lévő protomérek konformációjára jellemző állapotot. A „nyitott” és a „zárt” állapot közötti átmenetet jellemző egyensúlyi állandó nagymértékben változik a különböző forminok esetén, amely magyarázhatja az elongációs szakaszra kifejtett hatásuk különbözőségét [53]. A fentiekben ismertetett modell alapján értelmezhető az FH2 dimér processziv tulajdonsága is.

Ez azt jelenti, hogy az FH2 dimér nem válik le a filamentumok szöges végéről, majd kapcsolódik újra minden egyes monomér beépülésekor vagy leválásakor, hanem a polimerizáció előrehaladtával képes hosszú ideig a szöges végen maradni [54]. Az FH2 dimér processzív tulajdonsága szerepet játszhat abban, hogy képes meggátolni a polimerizációt akadályozó sapkafehérjék szöges végre kötődését is, így biztosítva a növekedni képes filamentumokat.

A forminok hatása módosulhat egy aktin monomér-kötő fehérje, a profilin jelenlétben. A sejtben viszonylag nagy koncentrációban (sejttípustól függően néhány  $\mu\text{M}$  és  $100 \mu\text{M}$  közötti koncentrációban) jelen lévő profilin az aktin monomérhez való kötése révén befolyásolja a polimerizáció folyamatát [6]. Egyrészt a profilin-aktin komplex nem képes nukleuszokat alkotni, másrészt a profilin-aktin komplex csak a szöges végen épül be a filamentumba, a profilint nem kötő (szabad) monomérével megközelítő sebességgel. Az eddigi eredmények szerint a profilin gátolja az FH2 domén nukleációt elősegítő hatását. Feltételezhetően azért, mert a profilin és az FH2 domén versengenek az aktin monomérékért, így az FH2 domén rendelkezésére álló aktin monomérek száma lecsökken. Ezzel szemben az FH1 doménhez kötött profilin az FH1FH2 által katalizált nukleációt még inkább elősegíti. A forminok elongációra gyakorolt hatása is módosul profilin jelenlétében. Profilin hiányában a forminok különböző mértékben redukálják az elongáció sebességét. Az FH1FH2 és a profilin együttes jelenlétében azonban az elongáció sebessége nagyobb, mint a szabad szöges végek elongációs sebessége. Ennek egy lehetséges magyarázata az, hogy a profilin az FH1 doménhez és az aktin monomérhez egyaránt kötve megnöveli a szöges vég környezetében a lokális monomér koncentrációt, kedvezőbb feltételeket biztosítva így a polimerizáció számára. Valószínűleg ez lehet a magyarázata annak is, hogy a profilin hatékonyabbá teszi az FH1FH2 domén nukleációra kifejtett hatását.

Mint fentebb tárgyaltuk, a különböző fajokból származó forminokkal *in vivo* és *in vitro* körülmények között végzett tanulmányokból kiderült, hogy az FH2 domén fontos szerepet tölt be az aktinnal való kölcsönhatás kialakításában. A különböző hosszúságú, az FH2 domént is tartalmazó formin fragmentumok képesek hatékonyan nukleálni az aktin filamentumokat, valamint a filamentumok szöges végének polimerizációs kinetikáját befolyásolni. Az *in vitro* kísérletek eredményei megmutatták azt is, hogy a különböző fajokból származó forminok hatásukban jelentősen eltérhetnek.

Bár több modell is született a forminok molekuláris kölcsönhatásainak és működési mechanizmusának leírására a forminok hatásának háttérében álló pontos mechanizmus részletei még ma sem ismertek. A korábbi vizsgálatok nem szolgáltak információval arra vonatkozóan, hogy melyik a fehérjének az a legkisebb egysége, amely nélkülözhetetlen az aktin polimerizációs folyamatára kifejtett hatásának előidézéséhez. Azzal kapcsolatban sem voltak pontos ismeretek, hogy a forminok előidéznek-e szerkezeti változásokat az aktin filamentumokban. Túlnyomórészt ismeretlen volt az is, hogy képesek-e a forminok befolyásolni az aktin filamentumoknak más fehérjékkel kialakított kölcsönhatását. Nem volt ismert továbbá a formin fehérjék háromdimenziós atomi szerkezete sem.

## II. Célkitűzések

Munkánk középpontjában a forminok funkciója és szerkezeti sajátosságai közötti kapcsolatok pontosabb megismerése állt. Kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogy miként befolyásolják a forminok az aktin filamentumok polimerizációjának folyamatát, illetve az aktin filamentumok dinamikai tulajdonságait.

- Kísérleteink első fázisában arra kerestük a választ, hogy hogyan módosulnak az aktin polimerizációját, depolimerizációját és kritikus koncentrációját jellemző paraméterek a különböző, egérből származó mDia fehérjék (mDia1, mDia2 és mDia3) központi FH2 doménjei, illetve az mDia1 fehérje központi FH2 doménjét, és annak az N-terminálisán található 72 aminosavból álló „linker” régiót is tartalmazó fragmentuma jelenlétében.
- Vizsgálni kívántuk továbbá azt is, hogy az FH2 domén mely régiói szükségesek a fehérje funkciójának a betöltéséhez.
- A munkánk második felében arra kerestük a választ, hogy módosulnak-e az aktin filamentumok konformációs tulajdonságai az mDia1 fehérje központi FH2 doménjének, illetve ugyanezen fehérjének a „linker” régiót is tartalmazó fragmentumának jelenlétében.
- Tanulmányoztuk azt is, hogy milyen hatása van a forminok által az aktin filamentumban előidézett konformációs állapotbeli változásnak az filamentumok funkcionális tulajdonságaira és a más fehérjékkel kialakított kölcsönhatásukra.

### III. Anyagok és módszerek

#### III. 1. Fehérjék

##### III. 1. 1. Az aktin preparálása és izolálása

Az aktin preparálás első lépésében nyúl vázizomból aceton-extrahált izomforgácsot készítettünk [55]. Ebből az aktin izolálása Spudich és Watt [56] módszere alapján történt. Az izolálás után az aktin puffer A-ban (4 mM TRIS - HCl (pH7.3), 0.2 mM ATP, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mM DTT) volt feloldva.

##### III. 1. 2. Az mDia fehérjék expressziója és tisztítása

Az emlős (egér) mDia fragmentumokat rekombináns GST-fúziós fehérje-expressziós rendszerben termeltettük meg, prokarióta sejtekben. A preparálás során első lépésben a kollaborációs partnerünktől (Prof. Alfred Wittinghoffer, Dr. Atsushi Shimada, Max Planck Institute Für Molekulare Physiologie, Dortmund, Németország) származó, az mDia fragmentumokat kódoló génszakaszt tartalmazó pGEX-4-T3 típusú plazmidot *E. coli* TOP10-es sejtvonalon szaporítottuk fel és miniprep kittel (V-Gene) nyertük ki. A plazmidot *E. coli* BL21 (DE3)pLysS kompetens sejtekbe transzformáltuk. A transzformáció során a plazmidot elegyítettük a kompetens sejtekkel, majd 30 percig jégen inkubáltuk. Ezt követően 42 °C-on hősokkot alkalmaztunk 45 másodpercig, majd 2 perc jégen történő inkubálás után, az LB tápoldat hozzáadását követően az oldatot 37 °C-on inkubáltuk, 2 órán át 120 rpm-en rázatva. Ampicillin tartalmú (100 µg/ml) táptalajra szélesztve csak az integrálódott plazmiddal rendelkező, a rezisztencia markert tartalmazó sejtek nőttek ki. A rekombináns fehérje preparálás során a megfelelő mennyiségű sejt előállításához 5 x 1 liter, 100 µg/ml ampicillin tartalmú LB tápoldatot oltottunk be 20 ml, éjszakán át 37 °C-on növesztett előkultúrával. A sejtuszuspenzió OD<sub>600</sub> = 0.75 értékénél IPTG oldat (300 mM) hozzáadásával indukáltuk a vektor T7 promoterét. Ezt követően az expressziót 120 rpm-en rázatva, éjszakán át, 20 °C-on folytattuk.

Másnap centrifugálással összegyűjtöttük a sejteket (Janetzki K26, 4000 rpm, 4 °C, 20 perc), meghatároztuk a nedves sejttömeget és felhasználásig –20 °C-on tároltuk.

A fehérje preparálás során felolvasztottuk a sejteket, majd puffer (50 mM TRIS - HCl (pH7.6), 5 mM DTE, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 % glicerin), a nedves sejttömegeggyel arányos mennyiségű proteáz inhibitor koktél és 1 mM fenil-metil-szulfonil-fluorid hozzáadását követően a sejtszuszpenziót mechanikusan, majd szonikátorral feltártuk. Preparatív ultracentrifugálás után (Sorvall, 4 °C, 30000 rpm, 1 óra) a DNáz-I enzim hozzáadását követően a feltárt sejtszuszpenzióból az mDia fehérjét affinitás kromatográfiás módszerrel választottuk el (Pharmacia FPLC), melynek során az GSH-agaróz oszlopról (Amersham) a GST-mDia fehérjét trombinos hasítást követően eluáltuk. A nemkívánatos egyéb fehérjék eltávolításához gélfiltrációs elválasztást alkalmaztunk (Sephacryl S300). Az mDia fehérjéket tartalmazó eluátumot Amicon ULTRA 10 MWCO centrifugacsövekben koncentráltuk (4000 rpm, 4 °C, 5 óra). Folyékony nitrogénben lefagyasztottuk és felhasználásig –80 °C-on tároltuk. A tárolópuffer 50 mM TRIS - HCl-t (pH7.3), 50 mM NaCl-t, 5 mM DTT-t és 5 % glicerint tartalmazott. A fehérjetisztítási folyamat hatékonyságát SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel ellenőriztük.

### *III. 2. Ioncsere, polimerizálás*

Az izolálás után az aktin monomér formában (G - aktin),  $\text{Ca}^{2+}$ -mal telítve van. A kötött  $\text{Ca}^{2+}$ -nak  $\text{Mg}^{2+}$ -ra való kicserélése során az aktin monoméreket tartalmazó oldathoz 200  $\mu\text{M}$  EGTA-t és 50  $\mu\text{M}$   $\text{MgCl}_2$ -ot adtunk, aminek hatására a kationok kicserélődése 5 - 10 percen belül végbement [57]. A kationcserét követően az aktin monomérek polimerizációját 10 mM KCl és 0.5 mM  $\text{MgCl}_2$  hozzáadásával indítottuk el.

Abban az esetben, ha a minta formin fragmentumot is tartalmazott, azt közvetlen a polimerizációt megelőzően adtuk az oldathoz. A formin fehérjék tárolópuffere 50 mM TRIS - HCl-t (pH7.3) és 50 mM NaCl-ot tartalmazott. Annak érdekében, hogy ennek hatását kizárjuk, állandó (5 %) értéken tartottuk a tárolópuffer térfogatát mind a formin fragmentumot tartalmazó, mind pedig a formin nélküli mintákban.

### III. 3. Az aktin fluoreszcens jelölése

A fluoreszcencia spektroszkópai vizsgálatok érdekében az aktint megfelelő fluorofórokkal jelöltük. A jelölés minden esetben fénytől védve, DTT-mentes puffer A-ban történt.

IAEDANS - jelölés: G - aktint (2 mg/ml) 100 mM KCl és 2 mM MgCl<sub>2</sub> hozzáadásával 2 órán keresztül polimerizáltunk szobahőmérsékleten. Az így előállított F - aktin oldatot 10-szeres moláris túlsúlyban lévő IAEDANS-szel inkubáltuk 1 órán keresztül, ugyancsak szobahőmérsékleten. A jelölőt, a jelölést megelőzően néhány  $\mu$ l DMF-ben oldottuk fel, majd  $\sim$  50-szeresére hígítottuk DTT-mentes puffer A-val. Az aktin oldathoz adott DMF térfogata nem haladta meg az össztérfogat 0.6 %-át ( $V_{\text{DMF}} / V_{\text{aktin}} < 0.006$ ). A reakciót 2 mM MEA hozzáadásával állítottuk le, majd a mintát 400,000 g-n, 4 °C-on, 50 percen keresztül centrifugáltuk.

IAF - jelölés: G - aktint (2 mg/ml) inkubáltunk 15-szörös moláris feleslegben lévő IAF-fel 24 órán keresztül, 4 °C-on. Az IAF-et 0.1 M-os NaOH-ban oldottuk fel. A jelölés során az aktin oldat pH-ját megfelelő mennyiségű 0.1 M-os HCl hozzáadásával tartottuk állandó értéken. A jelölést követően a mintát 100 mM KCl és 2 mM MgCl<sub>2</sub> hozzáadásával polimerizáltuk 2 órán keresztül, szobahőmérsékleten, majd 400,000 g-n, 4 °C-on, 50 percen keresztül centrifugáltuk.

Pirén - jódatamid (pirén) jelölés: G - aktint (2 mg/ml) 100 mM KCl és 2 mM MgCl<sub>2</sub> hozzáadásával 2 órán keresztül polimerizáltunk szobahőmérsékleten, majd az F - aktin oldatot (1 mg/ml) 1.1 tömegszázalékban ( $m_{\text{pirén}} / m_{\text{aktin}}$ ) hozzáadott pirénnel, 18 órán keresztül, szobahőmérsékleten inkubáltuk. A jelölőt DMF-ben oldottuk fel, az oldat koncentrációja 5 mg/ml volt. A jelölést követően a mintát 400,000 g-n, 4 °C-on, 50 percen keresztül centrifugáltuk.

A centrifugálást követően az üledékeket mindhárom jelölés esetében duzzasztottuk, a mintákat homogenizáltuk, majd éjszakán át dializáltuk puffer A-val szemben. A kísérlet előtt a minták tisztítása érdekében a jelölt és jelöletlen aktin monomér oldatokat 400,000 g-n, 4 °C-on, 30 percen keresztül centrifugáltuk.



### III. 4. A fehérje-koncentrációk és a jelölési arányok meghatározása

A vizsgált fehérjék, illetve az alkalmazott fluoreszcens jelölők koncentrációját Shimadzu UV-2100 típusú fotométerrel mértük. A koncentráció-meghatározás során használt extinkciós koefficiens értékeket az 1. táblázatban foglaltuk össze. A jelölt minták esetén a fluorofór járulékat korrekcióba vettük (1. táblázat).

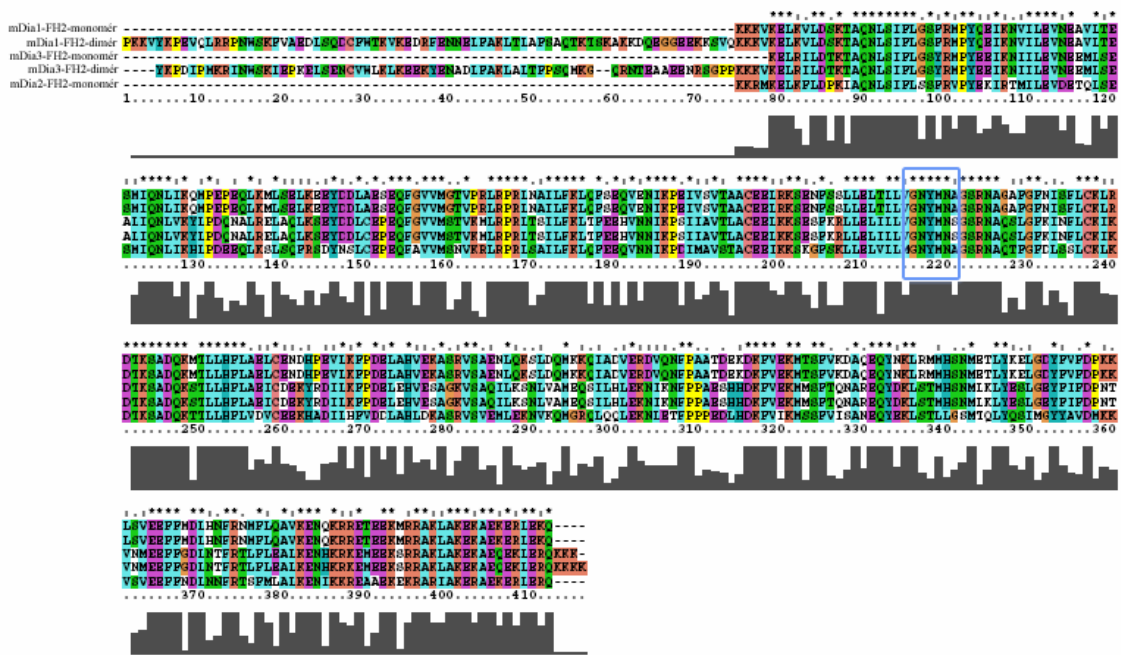
	<i>extinkciós koefficiens</i>	<i>korrekciós faktor</i>	<i>referencia</i>
G – aktin	$\epsilon_{290\text{ nm}} = 0.63 \text{ ml mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	-	[58]
IAEDANS	$\epsilon_{336\text{ nm}} = 6100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	$A_{290\text{ nm}} = 0.21 \times A_{336\text{ nm}}$	[59]
IAF	$\epsilon_{495\text{ nm}} = 60000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , pH7.3	$A_{290\text{ nm}} = 0.23 \times A_{495\text{ nm}}$	[60]
pirén	$\epsilon_{344\text{ nm}} = 22000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	$A_{290\text{ nm}} = 0.127 \times A_{344\text{ nm}}$	[61].

1. táblázat: A koncentráció és jelölési arány meghatározása során használt állandók.

A jelölési arányt a fehérje és a fluoreszcens jelölő moláris koncentrációjának hányadosaként számoltuk. A mérések során a jelölési arányok IAEDANS-re 0.9 - 1.0, IAF-re 0.6 - 0.7, pirénre: 0.8 - 0.9 között voltak. Az aktin molekulatömegét a számolások során 42.3 kDa-nak vettük [62]. Az mDia fragmentumok koncentrációját 6 M-os GuHCl oldatban, 280 nm-en mért abszorpció értékei alapján számoltuk [63]. Az extinkciós koefficienseket ( $\epsilon_{280\text{ nm}}$ ) (2. táblázat) a szekvenciák alapján (9. ábra) a ProtParam segítségével határoztuk meg (<http://us.expasy.org/tools/>).

<i>mDia fragmentum</i>	$\epsilon_{280\text{ nm}}$ ( $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )	<i>aminosav</i>	<i>molekulatömeg</i> ( <i>kDa</i> )
mDia1-FH2 <sup>monomér</sup>	7680	826 – 1163	40
mDia1-FH2 <sup>dimér</sup>	20580	752 – 1163	51
mDia2-FH2 <sup>monomér</sup>	10680	685 – 1022	40
mDia3-FH2 <sup>monomér</sup>	13660	701 - 1037	40
mDia3-FH2 <sup>dimér</sup>	27640	629 - 1038	51

2. táblázat: A vizsgált mDia fragmentumok 280 nm-es hullámhosszra számolt extinkciós koefficiensei a fragmentumok első és utolsó aminosavjainak sorszáma és molekulatömegei.



9. ábra: A vizsgált mDia fragmentumok aminosavsorrendje. A kék téglalap a leginkább konzervált GNYMN régiót jelöli. Az ábrát a Clustal X programmal készítettük.

A minták abszorpciós spektrumainak felvétele során referenciaként minden esetben a mérendő anyagot (fehérjét vagy fluorofórt) nem tartalmazó puffert használtuk.

### III. 5. „Steady-state” fluoreszcencia spektroszkópia

A „steady-state” fluoreszcencia vizsgálatokat Perkin-Elmer LS50B típusú spektrofluorométerrel végeztük. A hullámhosszakat monokromátorral állítottuk a megfelelő értékre. A réseket mind az emissziós, mind pedig a gerjesztési oldalon 5 nm-re állítottuk. A hőmérsékletet termosztáttal állítottuk be a kívánt értékre (6 – 30 °C között, a mintatartóban).

Perén jelölt aktin alkalmazásával vizsgáltuk az mDia fragmentumoknak az aktin polimerizációs tulajdonságaira (polimerizáció, depolimerizáció sebessége, kritikus koncentráció) kifejtett hatását. A mérések során a gerjesztési hullámhossz 365 nm volt, az emissziót pedig 407 nm-en figyeltük.

A formin fragmentumoknak az aktin polimerizációjára kifejtett hatásának vizsgálatakor aktin monomér oldatot (3.5  $\mu\text{M}$  vagy 5  $\mu\text{M}$ , amelynek 5 %-a volt pirén jelölt aktin) polimerizáltunk formin fehérjék jelenlétében és nélkülük, majd a pirén emisszió időbeli változását követtük nyomon. Az elongáció sebességét a normált pirén-intenzitásgörbéhez féltelítésben illesztett egyenes meredekségéből határoztuk meg.

A formin fragmentumoknak az aktin filamentumok depolimerizációjára kifejtett hatását vizsgáló kísérletekben aktint (5  $\mu\text{M}$ , amelynek 68 %-a volt pirén jelölt aktin) polimerizáltunk legalább 4 órán keresztül, majd 0.1  $\mu\text{M}$ -ra hígítottuk ki mDia fehérjéket tartalmazó, illetve nem tartalmazó puffer A-val, amelyet 10 mM KCl-dal és 0.5 mM  $\text{MgCl}_2$ -dal egészítettünk ki. A depolimerizáció sebességét a pirén-intenzitásgörbe első 50 s-hoz illesztett egyenes meredekségéből határoztuk meg.

Az aktin kritikus koncentrációjának meghatározása során különböző koncentrációjú aktin monomér oldatokat (amelyek 5 % pirén jelölt aktint tartalmaztak) polimerizáltunk 24 órán keresztül, 4 °C-on különböző koncentrációjú mDia fragmentumok jelenlétében, illetve nélkülük, majd a pirén emissziós spektrumait rögzítettük a 380 – 500 nm-es tartományon. A kiértékeléshez a  $407 \pm 5$  nm hullámhosszakon mért intenzitások átlagát határoztuk meg. A fluoreszcencia intenzitás átlagértékeit az aktin koncentrációjának függvényében ábrázolva a kritikus koncentráció az alábbi egyenlet illesztési paramétereiből származtatható:

$$y = yt + ((EL + ER) \cdot \frac{(x - cc)}{2}) - ((EL - ER) \cdot \left| \frac{(x - cc)}{2} \right|) \quad (1)$$

ahol  $EL$  és  $ER$  a bal, illetve a jobb oldali egyenes meredeksége,  $cc$  a kritikus koncentráció,  $yt$  pedig a kritikus koncentrációhoz tartozó függvényérték.

### III. 6. Fluoreszcencia rezonancia energia transzfer

A Förster-típusú rezonancia energia transzfer alkalmas fluorofór párok (donor és akceptor molekula) között jöhet létre, amennyiben

1. a donor molekula emissziós és az akceptor molekula abszorpciós spektrumai között átfedés van,
2. a donor kvantumhatásfoka megfelelően nagy,
3. a donor molekula emissziós és az akceptor molekula abszorpciós vektora kedvező szöget zár be egymással,
4. a donor és akceptor molekulák közötti távolság az 1 - 10 nm-es tartományba esik.

A rezonancia energia transzfer feltételeinek teljesülése esetén a donor molekulát megfelelő hullámhosszúságú fényel gerjesztve emissziójának egy része sugárzás nélküli („non-radiative”) dipól-dipól kölcsönhatás révén transzferálódik az akceptor molekulához.

A fluoreszcens donor-akceptor pár között létrejövő energia transzfer (FRET) egyik jellemző paramétere a transzferhatásfok ( $E$ ), amely kísérletesen meghatározható a donor molekula fluoreszcencia intenzitását mérve akceptor nélküli ( $F_D$ ) és akceptort tartalmazó ( $F_{DA}$ ) rendszerben a következő egyenlet segítségével:

$$E = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D} \quad (2)$$

A transzferhatásfok ismeretében a donor és akceptor molekula közötti távolság ( $R$ ) az alábbi összefüggéssel számolható:

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6} \quad (3)$$

ahol  $R_0$ , a Förster-féle kritikus távolság, amely azt a donor-akceptor távolságot jelenti, amelynél a transzfer hatásfoka 0.5 (50 %-os).

$R_0$  értéke meghatározható a következő egyenlet alapján:

$$R_0^6 = (8.79 \cdot 10^{11}) n^4 \kappa^2 \Phi_D J(\lambda) \quad (4)$$

ahol  $n$  a donor és akceptor molekula közötti közeg törésmutatója,  $\kappa^2$  a két fluorofór relatív helyzetét jellemző orientációs faktor,  $\Phi_D$  a donor kvantumhatásfoka,  $J$  pedig az akceptor abszorpciós spektrumának ( $\varepsilon_A(\lambda)$ ) és a donor emissziós spektrumának ( $F_D(\lambda)$ ) átfedési integrálja [64].

A FRET fluoreszcencia spektroszkópai alkalmazásával lehetőségünk nyílik a fehérjemátrixon belüli szerkezeti és dinamikai változások vizsgálatára. A fenti paramétereiből származtatható ugyanis egy újabb FRET paraméter, az ún.  $f$  (vagy az  $f'$ ) paraméter [65, 66], amelyet az energia transzfer hatásfokának és a donor molekula akceptor jelenlétében mért kvantumhatásfokának ( $\phi_{DA}$ ) (vagy intenzitásának:  $F_{DA}$ ) hányadosaként adhatunk meg:

$$f = \frac{E}{\phi_{DA}}, \text{ illetve } f' = \frac{E}{F_{DA}} \quad (5)$$

Mind az  $f$ , mind pedig az  $f'$  paraméter érzékenyen reagál a jelölők közötti fehérjemátrixban bekövetkező fluktuációk megváltozására. Ha a rendszerbe energiát táplálunk (pl.: növeljük a rendszer hőmérsékletét), akkor a molekuláris fluktuációk amplitúdói megnőnek. A fluktuációkban bekövetkező módosulások mértéke az adott fehérje régió flexibilitásától függ. Amennyiben a két vizsgált pont közötti fehérjemátrix flexibilisebb, a fluktuációk amplitúdója nagyobb lesz, míg a merevebb fehérje régió korlátozza az ilyen mozgásokat. Az  $f$  paraméter, illetve a vele egyenesen arányos  $f'$  paraméter a donor és akceptor közötti távolságeloszlás félértékszélességével van kapcsolatban, így a hőmérsékletfüggésének nyomon követésével lehetőség nyílik a fehérje eltérő flexibilitású és / vagy konformációs állapotú formái közötti különbség kimutatására. Normálva a legalacsonyabb hőmérséklethez tartozó értékkel a kapott relatív  $f'$  függvény alakjából információt kaphatunk a molekulán belül a két jelölt pont közötti fehérjeszegmens flexibilitásáról.

Ha a fehérje szerkezetében jelentős konformációváltozás nem következik be, flexibilisebb fehérjerész esetén a hőmérséklet profil meredekebb a merevebb formával összehasonlítva.

Munkánk során az aktin filamentumok monomérek közötti, ún. intermonomér flexibilitását formin fragmentumok jelenlétében és nélkülük hőmérsékletfüggő fluoreszcencia rezonancia energia transzfer alkalmazásával vizsgáltuk (10. ábra).



10. ábra: Az intermonomér FRET mérések során alkalmazott donor (D) – akceptoros (A) minták sematikus ábrája. A körök az aktin filamentum egyes protomérjeit jelölik.

Ennek érdekében az aktin monoméreket alkalmas donor (IAEDANS) és akceptor (IAF) molekulákkal jelöltük. A csak donort tartalmazó aktin filamentumokat 1 : 9 arányban összekevert IAEDANS-jelölt, illetve jelöletlen aktin, míg a donort és akceptort is tartalmazó aktin filamentumokat 1 : 9 arányban összekevert IAEDANS-jelölt, illetve IAF-jelölt aktin polimerizációjával hoztuk létre. Így a két mintában a donor koncentrációja megegyezett. A mintákat 24 órán keresztül, 4 °C-on inkubáltuk. A „steady-state” fluoreszcencia mérések során mind a csak donorral, mind a donorral és akceptorral egyaránt jelölt aktin filamentumok esetében a donor fluoreszcencia intenzitását mértük. A gerjesztési hullámhossz 350 nm volt, az emissziós spektrumokat a 370 - 550 nm hullámhosszak között követtük nyomon. Az emissziós spektrumokat minden esetben korrigáltuk a minta ön-abszorpciójából származó „inner filter” effektusra.

Figyelembe véve a küvetta és fénynyaláb geometriai elrendezését, 1 x 1 cm-es fényúttal rendelkező küvetta esetében a következő összefüggést alkalmaztuk:

$$F_{korrigált} = F_{mért} \operatorname{antilog} \left[ \frac{OD_{ex} + OD_{em}}{2} \right] \quad (6)$$

ahol  $F_{korrigált}$  és  $F_{mért}$  a korrigált és mért intenzitásokat,  $OD_{ex}$  a gerjesztés hullámhosszán, 1 cm-es fényúton mért abszorpció értékét,  $OD_{em}$  pedig a beállított emissziós hullámhossz-tartományon mért abszorpció spektrumot jelenti. A donor akceptor nélkül és akceptor jelenlétében felvett korrigált emissziós spektrumainak a 440 – 460 nm hullámhossz-tartományon vett görbe alatti integráljait határoztuk meg, és az integrálokat tekintettük donor intenzitásoknak ( $F_D$  vagy  $F_{DA}$ ). A donor intenzitás értékekből a 2. *egyenlet* alkalmazásával számoltuk a FRET hatásfokot, és az 5. *egyenlettel* az aktin intermonomér flexibilitására jellemző  $f'$  paramétert.

### III. 7. Koszedimentációs módszer

A különböző mDia fragmentumoknak az aktin filamentumokhoz való kötődését ultracentrifugáláson alapuló koszedimentációs módszer alkalmazásával vizsgáltuk. A módszer alapját az képezi, hogy ha aktint és aktin-kötő fehérjét tartalmazó oldatokat nagy fordulatszámon centrifugálunk az aktin filamentumok az üledékbe kerülnek az aktinhoz kötődő fehérjékkel együtt, míg az aktinhoz nem kapcsolódó aktin-kötő fehérjék az oldatban maradnak.

A mintakészítés során aktin monoméreket (3  $\mu$ M, illetve 5  $\mu$ M, 200  $\mu$ l) tartalmazó oldatot polimerizáltunk éjszakán át, 4 °C-on, különböző koncentrációban jelen lévő formin fragmentumokkal. A mintákat 400,000 g-n, 30 percig, 20 °C-on centrifugáltuk Beckman Optimax asztali ultracentrifugával (rotor: TLA-100), majd az üledékeket és a felülúszókat szétválasztottuk. Az üledékeket 200  $\mu$ l puffer A-ban duzzasztottuk. Mind a üledékekhez, mind a felülúszókhöz további 100  $\mu$ l Laemmli oldatot adtunk. A minták fehérjetartalmát denaturáló SDS-poliakrilamid gél (12.5 %) analízis alkalmazásával vizsgáltuk.

A géleket „coomassie blue”-val festettük, az egyes fehérjekomponensek sávjainak intenzitását a Syngene Bio-Imaging System gél dokumentációs és kiértékelő műszer segítségével határoztuk meg. Az intenzitásokat az adott fehérjék molekulatömegeivel korigáltuk.

Ha az üledékek analíziséből meghatározott kötött formin mennyiségét ábrázoljuk az összes formin mennyiségének függvényében az alábbi egyenlet illesztésével megkapjuk az mDia fragmentumoknak az aktin filamentumok oldalához való kötődését jellemző affinitást ( $K_d$ ) [67, 68]:

$$[A]_0 S^2 - ([A]_0 + [mDia]_0 + K_d)S + [mDia]_0 = 0 \quad (7)$$

ahol  $[A]_0$  és  $[mDia]_0$  jelöli a mintában lévő teljes aktin, illetve formin koncentrációt,  $S$  pedig a kötött formin arányát, amit az üledékben található formin sáv ( $B_{\text{formin}}^P$ ) és az aktin sáv ( $B_{\text{aktin}}^P$ ) intenzitásának hányadosaként kaptunk:

$$S = \frac{B_{\text{formin}}^P}{B_{\text{aktin}}^P} \quad (8)$$

A kofilinnel végzett kísérleteinkben 5  $\mu\text{M}$  aktint polimerizáltunk 0.5  $\mu\text{M}$  mDia1-FH2<sup>dimér</sup> jelenlétében, illetve nélküle. Ezt követően az aktin filamentumokat tartalmazó oldatokat éjszakán át inkubáltuk különböző koncentrációban jelen lévő kofilinnel (0 - 5  $\mu\text{M}$ ). A mintákat 400,000 g-n, 30 percig, 20 °C-on centrifugáltuk. Az üledékek és a felülúszók aktin tartalmát denaturáló SDS-poliakrilamid gél (12.5 %) analízis alkalmazásával vizsgáltuk. A „coomassie blue”-val festett aktin sávok intenzitását a Syngene Bio-Imaging System segítségével határoztuk meg, majd azokat az aktin molekulatömegével korigáltuk.



A felülúszókban található aktin koncentrációját ( $c_{aktin}^{SN}$ ) az alábbi egyenlet alapján számoltuk:

$$c_{aktin}^{SN} = \frac{B^{SN}}{B^{SN} + B^P} \cdot c_{aktin} \quad (9)$$

ahol  $B^{SN}$  és  $B^P$  a felülúszóban, illetve az üledékben található aktin sávok korrigált intenzitásai,  $c_{aktin}$  pedig a mintában található aktin koncentrációja.

### III. 8. Az ionerősség meghatározása

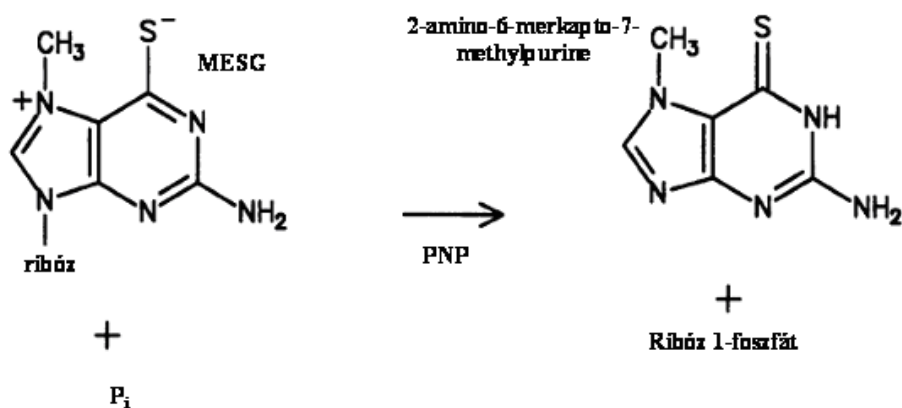
A sejten belül az aktin filamentumok spontán polimerizációját a viszonylag magas koncentrációban jelen lévő ionok, illetve a pH alkalmas értéke segíti elő. Fiziológias körülmények között a pH jellemző értéke 7.0 - 7.1 a szabad ionkoncentrációé pedig 50 – 100 mM KCl és 1 mM MgCl<sub>2</sub> [69]. A vizsgálataink során alkalmazott ionerősség kisebb volt az *in vivo* viszonyokra jellemző értékeknél (lásd: III. 2. fejezet). Munkánk során (polimerizációs és FRET kísérletek) megvizsgáltuk azt is, hogy miként változik a forminok hatása akkor, ha az aktin polimerizációját a fiziológias körülményeknek megfelelő koncentrációjú ionok hozzáadásával indítjuk el. Kísérleteinkben a már említett 10 mM KCl és 0.5 mM MgCl<sub>2</sub> koncentráció („alacsony” ionerősség) mellett a polimerizáció indukálásához 50 mM KCl-ot és 1 mM MgCl<sub>2</sub>-ot („közepes” ionerősség), illetve 100 mM KCl-ot és 2 mM MgCl<sub>2</sub>-ot („magas” ionerősség) adtunk az aktin monoméreket tartalmazó oldathoz. Az ionok közötti elektrosztatikus kölcsönhatás erősségét jellemző ionerősséget az ionok koncentrációjának és töltésének ismeretében számoltuk az alábbi összefüggés alapján:

$$[ionerősség] = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n c_i z_i^2 \quad (10)$$

ahol  $c_i$  és  $z_i$  az  $i$ . ion moláris koncentrációját és töltését jelöli.

### III. 9. A foszfát disszociáció sebességének meghatározása

Az ATP enzimatis hasítása során képződő szerves foszfát ( $P_i$ ) mennyiségének, illetve az aktin filamentumokról való disszociáció kinetikájának vizsgálatára a Webb által kidolgozott módszert alkalmaztuk [70]. A módszer alapját egy enzimatis reakció képezi. Ennek során a reakcióban szereplő szubsztrát, a 2-amino-6-merkaptó-7-metilpurin ribozid (MESG) foszfát jelenlétében a purin nukleozid foszforiláz (PNP) által katalizált reakcióban ribóz 1-foszfáttá és 2-amino-6-merkaptó-7-metil-purinná alakul át (11. ábra).

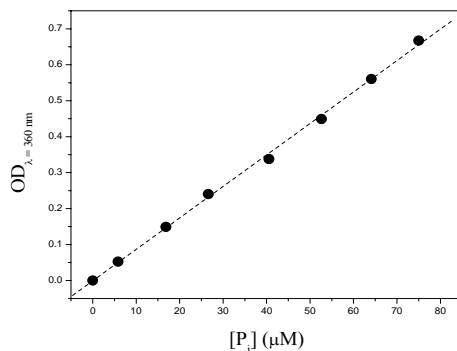


11. ábra: Az ATP enzimatis hasítása során képződő szerves foszfát ( $P_i$ ) mennyiségi meghatározásának alapjául szolgáló reakció sémája [70].

A szubsztrát és a termék abszorpciós maximumát jellemző hullámhosszak különbsége (335 nm és 360 nm) révén spektrofotometriás méréssel a reakció nyomon követhető.

Méréseink során a Molecular Probes által forgalmazott EnzCheck nevű terméket használtuk, amely tartalmazta a reakcióhoz szükséges anyagokat. Kísérleteinket a Carlier és munkacsoportja által már korábban alkalmazott stratégia szerint végeztük [71]. A kationcserét követően 100  $\mu$ M-os aktin monomér oldatot 10 mM KCl és 0.5 mM  $MgCl_2$  hozzáadásával polimerizáltunk formin nélkül, illetve annak jelenlétében. Ezt követően az aktin filamentumokat tartalmazó oldatot 10  $\mu$ M-ra hígítottuk a gyártó által forgalmazott reakció pufferrel (100 mM Tris - HCl, (pH7.5), 2 mM  $MgCl_2$ , és 0.2 mM nátrium azid, kiegészítve 10 mM KCl-dal). A minta abszorpciójának időbeli változását 360 nm-es hullámhosszon követtük nyomon. Méréseinket Shimadzu UV-2100 típusú fotométerrel végeztük.

A  $P_i$  koncentrációjának meghatározásához szükséges kalibrációs egyenest a készletben található standard  $KH_2PO_4$  oldat segítségével, az általunk alkalmazott pufferkörülmények között vettük fel (12. ábra).



12. ábra: A szervesen foszfát mennyiségének meghatározásához felvett kalibrációs egyenes.

### III. 10. Differenciális pásztázó kalorimetriai kísérletek

A termodinamika vizsgálati módszereinek segítségével fontos információkat nyerhetünk a biológiai rendszerek, így a fehérjék energiaállapotáról, belső rendezettségéről és termikus stabilitásáról. A differenciális pásztázó kalorimetriai módszer (DSC: „*differential scanning calorimetry*”) előnye az, hogy érzékeny, azaz alkalmazásával a rendszer folyamatos melegítése, illetve lehűtése során bekövetkező kis hőeffektusok is mérhetőek.

Munkánk során a DSC kísérleteket egy SETARAM Micro DSC II kaloriméteren végeztük. A műszer a hőáram mérés elvén működik. A mérő és a referencia cella egy program szerint fűthető / hűthető hőelnyelő blokkban található. A mérő cella a mintát, a referencia cella a minta pufferoldatát tartalmazza, amelyek bemérése úgy történik, hogy a két cella hőkapacitása közel azonos legyen. Így a programozott fűtés során a két cella hőmérséklete azonos módon változik, hőmérsékletkülönbségük mindaddig nulla, amíg valamilyen folyamat (endo, vagy exoterm) nem történik a mintát tartalmazó cellában. A cellák közötti termikus egyensúly fenntartása érdekében a hőmérsékletkülönbség előjelétől és nagyságától függően vagy a mintát, vagy a referencia oldatot tartalmazó cellába kell energiát táplálnunk. A műszer ezt az energiát méri az idő, vagy a hőmérséklet függvényében (hőáram). A folyamatról közvetlenül nyerhető információ a kimenő jel integrálja, az ún. kalorimetrikus entalpiaváltozás:

$$\frac{dH}{dt} = C_p \frac{dT}{dt} \quad (11)$$

Ebből a minta állandó nyomásra vonatkoztatott hőkapacitása ( $C_p$ ) (a rendszer ugyanis inhomogén) az alábbi módon származtatható:

$$\frac{dH/dt}{dT/dt} = C_p \quad (12)$$

ahol  $dH$  a kalorimetrikus entalpiaváltozás,  $t$  az idő,  $m$  a tömeg, valamint  $C_p$  a hőkapacitás,  $dT/dt$  pedig a fűtési / hűtési sebesség.

Kísérleteink során az aktin filamentumok hődenaturációját 0 és 100 °C között 0.3 °C/perc fűtési, illetve hűtési sebesség mellett Hastelloy cellákban követtük nyomon. A vizsgált minták tömege átlagosan 850 mg volt. A méréshez referenciaként a mért minta pufferoldata szolgált. A rendszer alapvonalának stabilitása az alkalmazott fűtési sebesség mellett, izoterm üzemmódban  $\pm 0.2 \mu\text{W}$  hibahatáron belül volt. Az aktin koncentrációja minden esetben 60  $\mu\text{M}$  volt. A formint is tartalmazó mintákban az mDia1-FH2<sup>dimér</sup> koncentrációja 3  $\mu\text{M}$  volt. Az endoterm denaturáció kalorimetrikus entalpiaváltozását ( $\Delta H$ ) a hőáram-hőmérséklet görbe integráljából határoztuk meg. A mérés során kapott hődenaturációs görbék egyes denaturációihoz tartozó entalpiaváltozás értékeket ( $\Delta H$ ) a denaturációs csúcsokra ( $T_m$ ) illesztett Gauss-görbék területeinek arányaiból számítottuk ki. A denaturáció entrópiaváltozását ( $\Delta S$ ) a denaturáció hőmérsékletére ( $T_m$ ) számítva az alábbi képlettel kaptuk:

$$\Delta S = \frac{\Delta H}{T_m} \quad (13)$$

A Gibbs-féle szabadentalpia-változást a következő képlettel számítottuk ki  $T = 22 \text{ °C}$ -ra:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (14)$$

## IV. Eredmények és következtetések

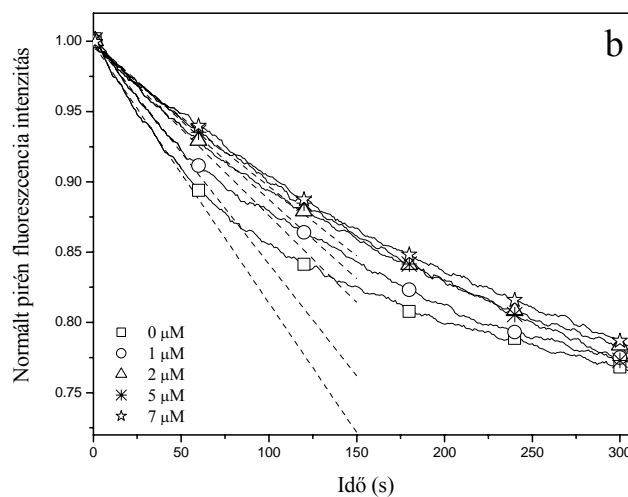
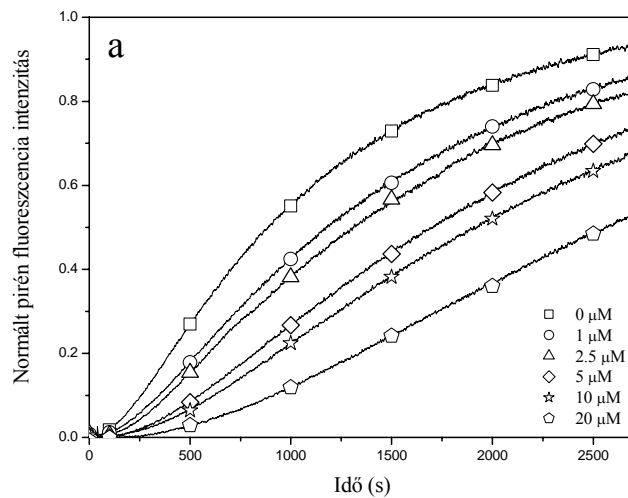
### *IV. 1. A forminok hatása az aktin filamentumok polimerizációjának kinetikájára*

Az egérben található mDia1 formin központi FH2 doménjének háromdimenziós atomi szerkezetének (4. ábra) röntgen-kristallográfiai módszerrel történő meghatározása, 2.6 Å-os felbontásban kollaborációs partnerünkkel (Prof. Alfred Wittinghoffer, Dr. Atsushi Shimada, Max Planck Institute Für Molekulare Physiologie, Dortmund, Németország) való együttműködés keretében történt. Ez volt az első ismert formin szerkezet. Kísérleteink első szakaszában ennek, és az ugyancsak az emlős Dia forminok családjába tartozó mDia2 és mDia3 forminok központi FH2 doménjeinek (a későbbiekben mDia-FH2<sup>monomér</sup>) az aktin polimerizációs tulajdonságaira kifejtett hatását vizsgáltuk.

#### *IV. 1. 1. Az mDia fehérjék központi FH2 doménjének hatása az aktin polimerizációjának és depolimerizációjának sebességére*

Az mDia-FH2<sup>monomér</sup> fragmentumoknak az aktin polimerizációs tulajdonságaira (polimerizáció, depolimerizáció sebessége, kritikus koncentráció) kifejtett hatását pirén-jelölt aktin alkalmazásával vizsgáltuk. Ezen fluorofór sajátja, hogy a fluoreszcencia intenzitása a polimerizáció során az aktin filamentum mennyiségével arányosan növekszik. A pirénnel jelölt aktin monomerek filamentumba épülése hasonló kinetikával jellemezhető, mint a fluorofórral nem jelölteké [61]. Ezek alapján a pirén emisszió időbeli változásának nyomonkövetése lehetőséget ad az aktin polimerizációs folyamatának leírására.

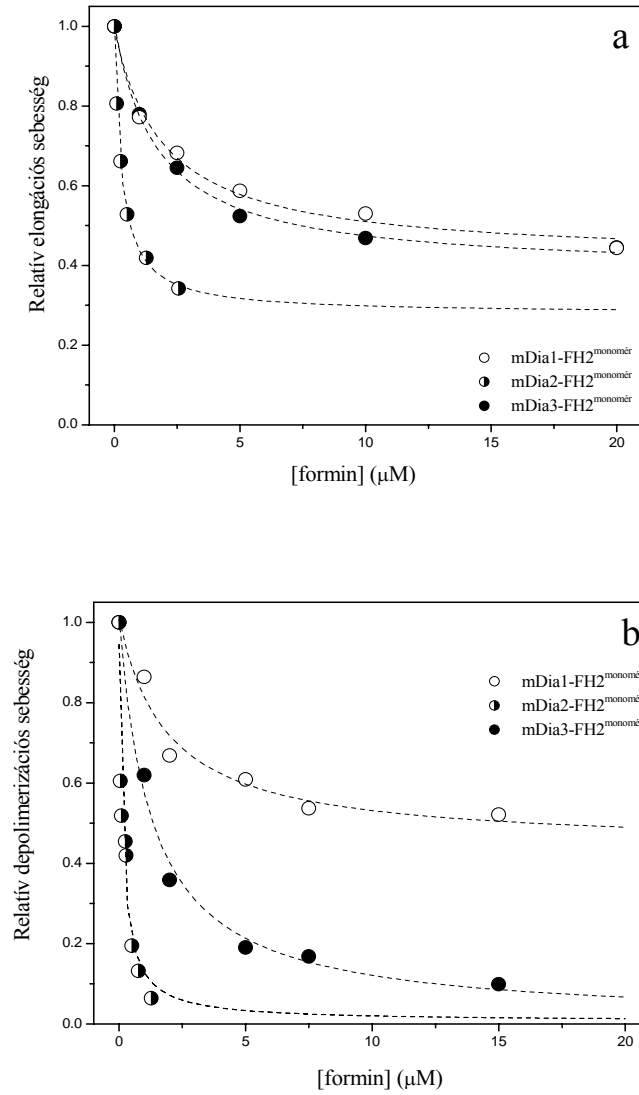
A pirén alkalmazásával kapott eredményeink szerint mindhárom mDia-FH2<sup>monomér</sup> fragmentum már mikromolós koncentráció-tartományban lassította mind a spontán polimerizációt (13. a ábra), mind pedig a spontán depolimerizáció folyamatát (13. b ábra).



13. ábra: Az mDia1-FH2<sup>monomér</sup> fragmentum hatása az aktin polimerizációs (a ábra) és depolimerizációs (b ábra) folyamatára. Az ábrák a normált pirén fluoreszcencia intenzitás időbeli változását mutatják különböző koncentrációban jelen lévő mDia1-FH2<sup>monomér</sup> esetén (lásd: jelmagyarázat). A b ábrán a szaggatott vonalak a normált pirén-intenzitásgörbék első 50 s-os szakaszához illesztett egyeneseket jelölik.

A polimerizációra gyakorolt hatás mértéke azonban a három központi FH2 domén esetében különbözőnek bizonyult. A normált pirén tranziensekből meghatározott relatív elongációs, illetve depolimerizációs sebességeket a formin koncentráció függvényében ábráztuk (14. a, b ábra). A féltelítési koncentrációt ( $K_d$ ) a mérési eredményekre illesztett hiperbola (15. egyenlet) paramétereiből határoztuk meg.

$$y = \frac{y_{\max}}{1 + \frac{x}{K_d}} + y_{\min} \quad (15)$$



14. ábra: A relatív elongációs (a ábra) és depolimerizációs (b ábra) sebesség függése a különböző mDia-FH2<sup>monomér</sup> fragmentumok koncentrációjától (lásd: jelmagyarázat). A szaggatott vonalak az eredményekre illesztett hiperbolákat mutatják.

A mennyiségi analízis eredményei szerint az mDia2–FH2<sup>monomér</sup> fragmentum gátolta legnagyobb mértékben a monomerek asszociációját, illetve disszociációját, telítésben az elongációs sebesség 27 %-ra, a depolimerizáció sebessége pedig 0.6 %-ra csökkent a spontán aktin polimerizációt jellemző sebességekhez viszonyítva. Valamivel kisebb hatást tapasztaltunk az mDia3–FH2<sup>monomér</sup> esetén, amely telítési koncentrációban az elongációs sebességet 38 %-ra, a depolimerizáció sebességét pedig 0.5 %-ra csökkentette. A legkisebb hatást az mDia1–FH2<sup>monomér</sup> jelenlétében figyeltük meg (3. táblázat).

<i>mDia fragmentum</i>	<i>Illesztési paraméter</i>	<i>Polimerizáció</i>	<i>Depolimerizáció</i>
<i>mDia1-FH2<sup>monomér</sup></i>	<i>K<sub>d</sub></i>	1.96 ± 0.42 μM	1.89 ± 0.76 μM
	<i>y<sub>min</sub></i>	41.55 ± 2.92 %	44.09 ± 5.68 %
<i>mDia2-FH2<sup>monomér</sup></i>	<i>K<sub>d</sub></i>	0.28 ± 0.01 μM	0.14 ± 0.06 μM
	<i>y<sub>min</sub></i>	27.91 ± 1.23 %	0.62 ± 10.04 %
<i>mDia3-FH2<sup>monomér</sup></i>	<i>K<sub>d</sub></i>	1.71 ± 0.19 μM	1.30 ± 0.25 μM
	<i>y<sub>min</sub></i>	38.36 ± 1.59 %	0.53 ± 4.36 %

3. táblázat: Az mDia forminok központi FH2 fragmentumainak az aktin polimerizációs és depolimerizációs folyamatára kifejtett hatását jellemző paraméterek. (*K<sub>d</sub>*: feltelítési koncentráció, *y<sub>min</sub>*: telítési koncentrációban az elongáció, illetve a depolimerizáció sebessége %-ban megadva, a formin nélküli minta elongációs és depolimerizációs sebességéhez - 100%-nak felel meg – viszonyítva. A táblázatban a standard hibákat adtuk meg.)

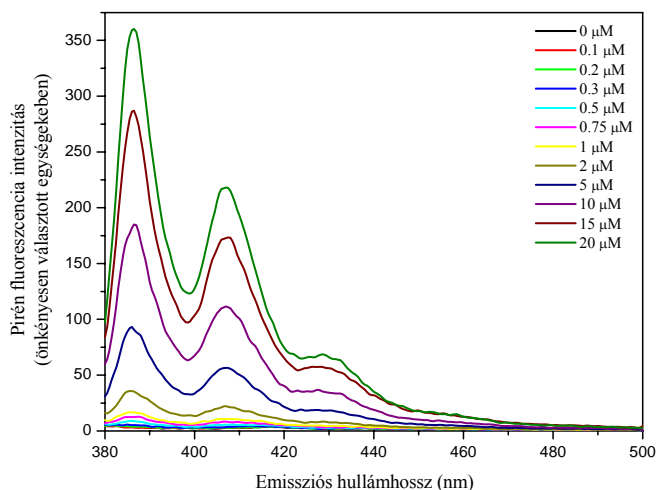
Megfigyeléseink szerint mindhárom mDia formin központi FH2 doménje gátolta az aktin filamentumok polimerizációjának és depolimerizációjának folyamatát. Az általunk alkalmazott módszer hátránya, hogy a filamentumok egy populációjának viselkedését írja le, így egyedi filamentumokról nem szolgáltat információt. Továbbá nem ad lehetőséget arra, hogy elkülönítsük a nukleáció, illetve az elongáció fázisának a teljes polimerizációs folyamathoz való hozzájárulását. A polimerizáció sebességének csökkenését eredményezheti az, hogy az mDia-FH2<sup>monomér</sup> fragmentumok jelenlétében az aktin nukleuszok kialakulása lassabban megy végbe, illetve az, hogy ezen fragmentumok megakadályozzák a monomerek filamentumba épülését az elongáció folyamata során.



A forminok jelenlétében tapasztalt lassabb depolimerizáció pedig annak lehet a következménye, hogy a vizsgált fragmentumok gátolják a monomerek filamentumról való leválását.

#### *IV. 1. 2. Az mDia fehérjék központi FH2 doménjének hatása az aktin kritikus koncentrációjára*

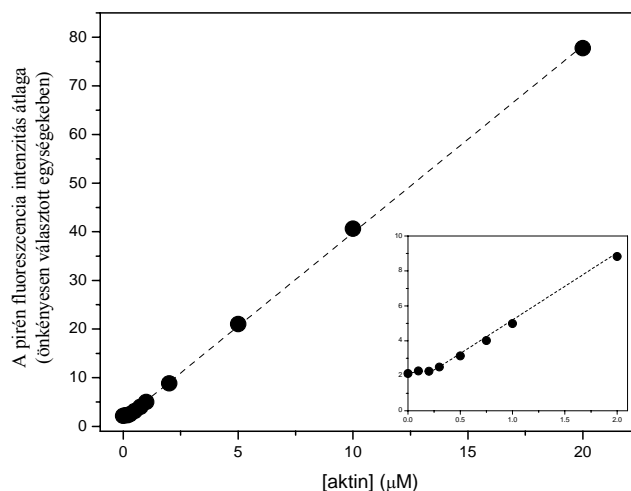
A pirén jelölő azon tulajdonsága, hogy fluoreszcencia intenzitása arányos az aktin filamentum mennyiségével lehetőséget adott az aktin kritikus koncentrációjának fluoreszcencia spektroszkópai módszereken alapuló meghatározására is. Kísérleteink során különböző koncentrációjú aktin monomér oldatokat polimerizáltunk mDia–FH2<sup>monomér</sup> fragmentumok jelenlétében és nélkülük, majd a pirén emissziós spektrumait rögzítettük. A kritikus koncentrációnál kevesebb aktint tartalmazó mintákban a polimerizáció még a KCl és MgCl<sub>2</sub> hozzáadása után sem indult meg, így filamentumok nem keletkeztek, a pirén intenzitása alacsony maradt. A kritikus koncentrációnál több aktint tartalmazó mintákban nőtt a kialakult filamentumok mennyisége, így a pirén fluoreszcencia intenzitása is (15. ábra).



15. ábra: A pirén emissziós spektrumai a különböző koncentrációjú aktin minták esetén (lásd: színek).

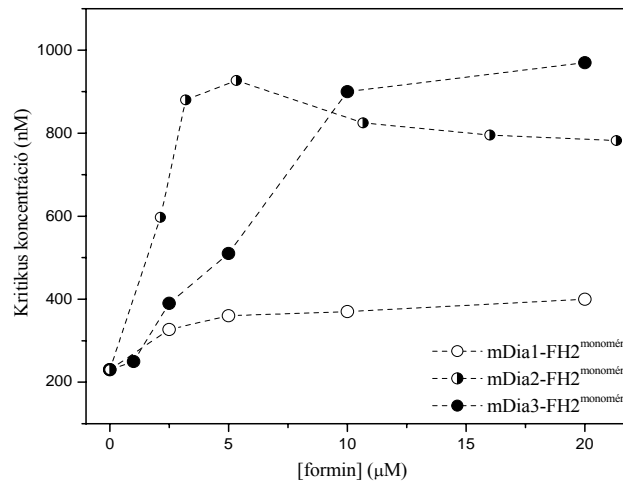
A pirén jelölt aktin koncentrációja minden esetben a teljes aktin koncentráció 5 %-a volt.

A spektrumok alapján meghatározott pirén-intenzitás értékeit az aktin koncentráció függvényében ábrázoltuk, majd a kapott eredményekre az *1. egyenletet* illesztettük (*16. ábra*).



*16. ábra:* A pirén emissziós spektrumai alapján meghatározott intenzitás értékeinek függése a mintában lévő aktin koncentrációjától az mDia-FH2<sup>monomér</sup> fragmentumot nem tartalmazó minta esetén. A szaggatott vonal az *1. egyenlet* illesztésével kapott görbét jelöli. A betét ábra a görbe kezdeti szakaszát mutatja:  $[aktin] = 0 - 2.5 \mu\text{M}$ .

A méréseket forminok nélkül, és több formin koncentráció mellett is elvégeztük. A kiértékelés alapján az aktin kritikus koncentrációja forminok nélkül  $225.44 \pm 0.07 \text{ nM}$ -nak adódott. Az mDia-FH2<sup>monomér</sup> doménekkal végzett méréseink szerint különböző mértékben, de mindhárom fragmentum jelenlétében megnövekedett az aktin kritikus koncentrációja. Eredményeink alapján a kritikus koncentráció értéke az mDia1-FH2<sup>monomér</sup> hatására  $\sim 350 \text{ nM}$ -ra, az mDia2-FH2<sup>monomér</sup> hatására  $\sim 800 \text{ nM}$ -ra, az mDia3-FH2<sup>monomér</sup> hatására pedig  $\sim 1000 \text{ nM}$ -ra tolódot (*17. ábra*).



17. ábra: Az aktin kritikus koncentrációjának függése az mDia-FH2<sup>monomér</sup> fragmentumok koncentrációjától (lásd: jelmagyarázat).

Az általunk alkalmazott módszerrel meghatározott kritikus koncentráció értékek az aktin filamentumok dinamikus egyensúlyi állapotát (taposómalom) jellemzik, azaz a szöges és a hegyes vég együttes dinamikáját (lásd: *I. 1. fejezet*). Kísérleteinkben a szöges, illetve a hegyes végre jellemző asszociációs és disszociációs állandókat, valamint az egyes végekre jellemző kritikus koncentrációk pontos értékét nem tudtuk meghatározni. Vizsgálataink alapján azonban következtethetünk arra, hogy a forminok jelenlétében a filamentumok melyik végén módosult a polimerizáció folyamata.

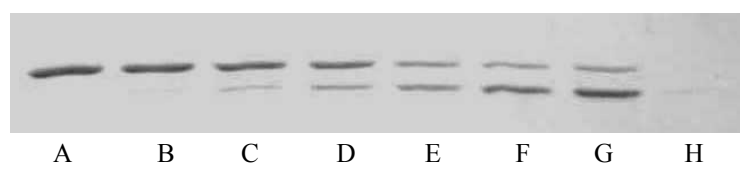
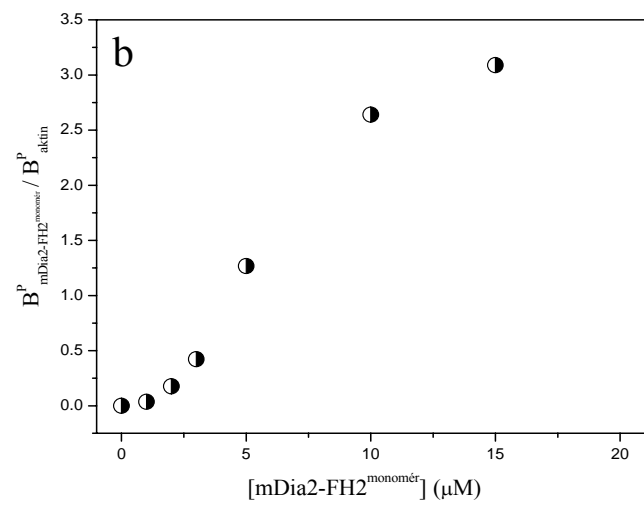
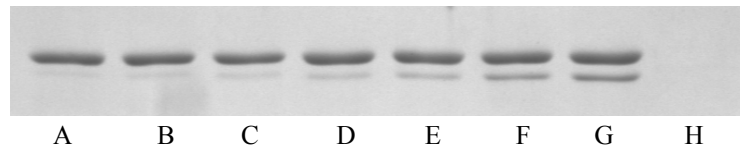
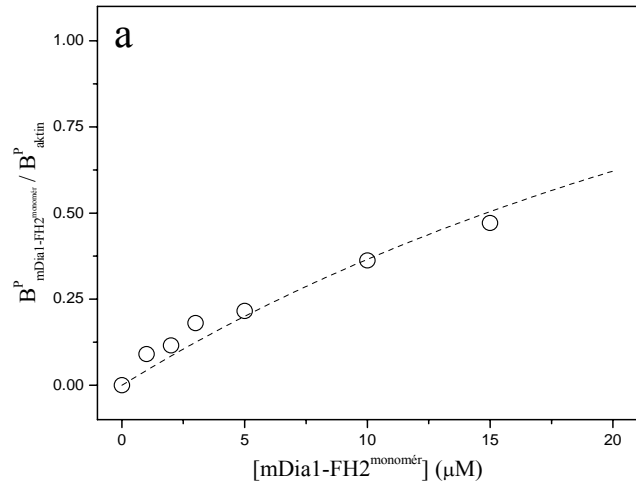
Ismert, hogy a két alegységből felépülő heterodimér sapkafehérjék nagy affinitással kötődnek a filamentumok szöges végeihez, gátolva mind a monomerek beépülését, mind pedig leválását az adott végen. A szöges végek lezárása így a kritikus koncentráció eltolódását eredményezi a hegyes végre jellemző értékek felé [72]. Kísérleteink eredményei alapján, valamint a sapkafehérjék és a vizsgált formin fragmentumok hatásaiban megfigyelhető hasonlóságok alapján feltételezhetjük, hogy ezen mDia-FH2<sup>monomér</sup> fragmentumok a szöges vég polimerizációs dinamikájára fejtik ki hatásukat. A megfigyelt hatást eredményezheti az, hogy a szöges végen a monomerek asszociációja lassabb ( $k_+$  értéke kisebb), és / vagy a disszociációjuk gyorsabb ( $k_-$  értéke nagyobb) a vizsgált FH2 fragmentumok jelenlétében, aminek következtében a filamentum egyensúlyát jellemző kritikus koncentráció értéke nagyobb lesz.

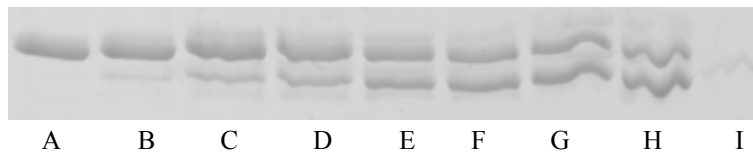
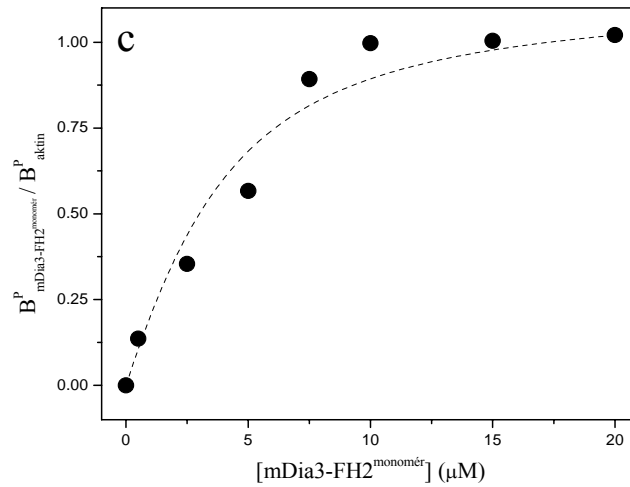
Az mDia fehérjék központi FH2 doménjeinek az aktin polimerizációs folyamatára kifejtett hatását is figyelembe véve feltételezhetjük, hogy a vizsgált fragmentumok a filamentumok szöges végével kialakított kölcsönhatásuk következtében különböző mértékben módosítják ezen a végen mind a monomerek asszociációját, mind pedig azok disszociációját.

#### *IV. 1. 3. Az mDia-FH2<sup>monomér</sup> fragmentumok aktinhoz való kötődésének a vizsgálata*

Ultracentrifugáláson alapuló koszedimentációs módszer alkalmazásával vizsgáltuk azt, hogy az mDia-FH2<sup>monomér</sup> fragmentumok kötődnek-e az aktin filamentumokhoz. Ha egy fehérje az aktin filamentumokhoz kötődik, akkor az ultracentrifugálás során a filamentumokkal együtt az üledékbe kerül, a szabadon maradt (nem kötött) fehérje pedig a felülúszóban marad. A üledékekben, illetve a felülúszókban található fehérjék mennyiségének vizsgálata így lehetőséget nyújt a kötést jellemző affinitás meghatározására.

Vizsgálataink során a poliakrilamid gélek analízise alapján kapott eredmények szerint aktin filamentumok távollétében egyik mDia-FH2<sup>monomér</sup> fragmentum sem került az üledékbe, aktin jelenlétében viszont megtalálhatóak voltak az üledékekben is. Ez arra utal, hogy mindhárom vizsgált formin kötött az aktin filamentumok oldalához (18. a, b, c). Az üledékek és felülúszók poliakrilamid géljein az azonos mennyiségű aktinnak, illetve az egyes mDia-FH2<sup>monomér</sup> fragmentumoknak megfelelő sávok molekulatömeggel korrigált intenzitásai alapján a két fehérjét a „coomassie blue” egyenlő mértékben festette meg (az adatok nincsenek feltüntetve), lehetőséget adva a mennyiségi analízisre. Az üledékben talált formin, illetve aktin sávok intenzitásainak hányadosaként meghatározott (8. egyenlet) kötött formin mennyiségét a teljes formin koncentráció függvényében ábráztuk. Az adatok az üledékben található formin mennyiségének a növekedését mutatták a teljes formin koncentráció növekedésével. Az eredményeink alapján (18. a, c ábra) az mDia1 és mDia3 fehérjék esetén megállapíthattuk, hogy 1 : 1 FH2 : aktin protomér arányban kötöttek az aktin filamentumok oldalához. A kötésüket jellemző affinitásokat így a 7. egyenlet alapján határoztuk meg.





18. ábra: A kötött formin mennyiségének függése a teljes mDia-FH2<sup>monomér</sup> koncentrációtól: *a* ábra az mDia1-FH2<sup>monomér</sup>, *b* ábra az mDia2-FH2<sup>monomér</sup>, *c* ábra mDia3-FH2<sup>monomér</sup> fragmentummal végzett koszedimentációs kísérletek eredményeit mutatja. Az ábrák alatt az üledékek poliakrilamid géljeit tüntettük fel. A gélen a felső sávok az aktinnak, az alsó sávok az mDia-FH2<sup>monomér</sup>-nek felelnek meg. A betűk az egyes mintákat jelölik, amelyekben az mDia-FH2<sup>monomér</sup> fragmentum koncentrációját (*mDia*) és az aktin koncentrációját (*aktin*) az alábbi táblázatban foglaltuk össze:

	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>D</i>	<i>E</i>	<i>F</i>	<i>G</i>	<i>H</i>	<i>I</i>
[ <i>mDia1</i> ]	0	1	2	3	5	10	15	5	-
[ <i>aktin</i> ]	3	3	3	3	3	3	3	0	
[ <i>mDia2</i> ]	0	1	2	3	5	10	15	5	-
[ <i>aktin</i> ]	3	3	3	3	3	3	3	0	
[ <i>mDia3</i> ]	0	0.5	2.5	5	7.5	10	15	20	5
[ <i>aktin</i> ]	3	3	3	3	3	3	3	3	0

4. táblázat: A koszedimentációs kísérletek során alkalmazott formin és aktin koncentrációk. A koncentrációkat μM-ban adtuk meg.

A hiperbola illesztési paramétereinek alapján az affinitás értéke az általunk alkalmazott körülmények között az mDia1–FH2<sup>monomér</sup> fragmentum esetén  $14.47 \pm 0.86 \mu\text{M}$ , míg az mDia3–FH2<sup>monomér</sup>  $2.20 \pm 0.36 \mu\text{M}$  volt. Az mDia2–FH2<sup>monomér</sup> esetén a kötött formin mennyiségének a teljes formin mennyiségtől való függésének ábrázolása egy szigmoid jellegű telítési görbét eredményezett (18. b ábra), így nem volt leírható a fentiekben használt modellel. Ennek alapján feltételezhető, hogy az mDia2–FH2<sup>monomér</sup>-nek az aktin filamentumok oldalához való kötése komplexebb mechanizmus révén valósul meg, amelynek pontos magyarázatához további vizsgálatokra van szükség.

#### *IV. 1. 4. Az mDia1-FH2<sup>monomér</sup> fragmentumban létrehozott pontmutációk hatásának vizsgálata*

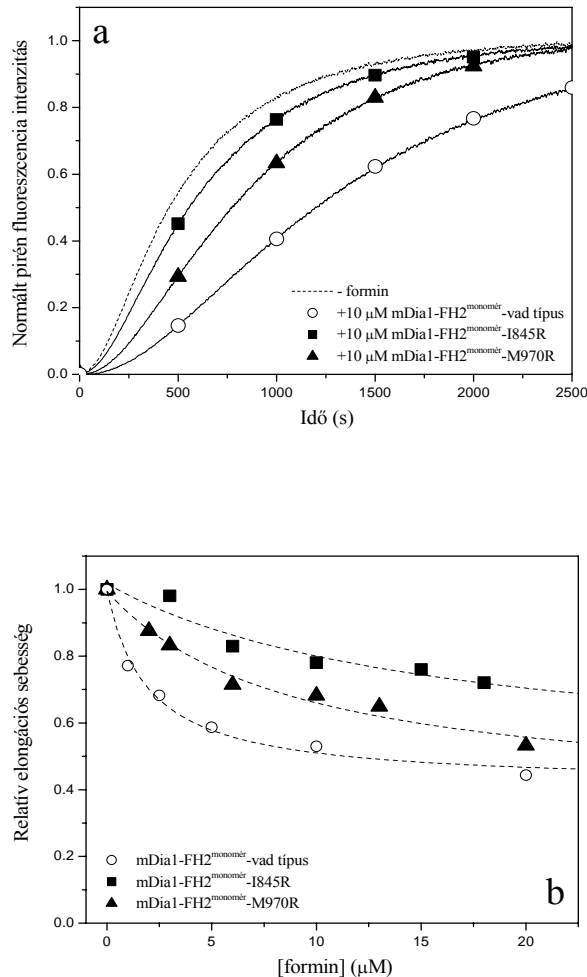
Annak érdekében, hogy megállapítsuk az FH2 domén mely régióinak van szerepe a funkció betöltésében megvizsgáltuk az mDia1 pontmutációt tartalmazó fragmentumainak az aktin polimerizációjára kifejtett hatását is. Az mDia1-FH2<sup>monomér</sup> fragmentum mutációinak tervezéséhez 6 különböző formin; az mDia1 (*egér*), az mDia2 (*egér*), az mDia3 (*egér*), a Diaphanous (*D. melanogaster*), a Bni1p (*S. cerevisiae*), a Cdc12 (*S. pombe*) és a FHOD1 (*humán*) FH2 doménjének szekvenciáit vetettük össze. Az analízis alapján azonosítottuk az ellipszoid alakú domén legnagyobb mértékben konzervált aminosav-tartományait. Ezen szekvencia-tartományokból két hidrofób aminosavat, a metionin<sup>970</sup>-et (M970R), és az izoleucin<sup>845</sup>-öt (I845R) helyettesítettünk az inkább hidrofil sajátságokat mutató argininnal (19. a, b ábra). A mutációt hordozó mDia1 fragmentumok klónozását, expresszióját és tisztítását kollaborációs partnerünk végezte (Prof. Alfred Wittinghoffer, Dr. Atsushi Shimada, Max Planck Institute Für Molekulare Physiologie, Dortmund, Németország).



19. ábra: a ábra: Az mDia1 központi FH2 doménjének felszíni modellje a leginkább konzervált aminosav-tartományokkal. b ábra: A vizsgált FH2 doménok aminosavsorrendje. Piros színnel jelöltük az mDia1 központi FH2 doménjében létrehozott két pontmutáció (izoleucin<sup>845</sup> és methionin<sup>970</sup>) helyét. Az ábrát a Clustal X szoftverrel készítettük. A narancssárgával jelölt régiók mind a hét, a sárgával jelölt régiók pedig 6 általunk vizsgált FH2 domén szekvenciájában is megtalálhatóak voltak.



A továbbiakban a vad típusú domének vizsgálata során alkalmazott módszerekkel tanulmányoztuk e két mutációt hordozó fragmentumnak az aktin polimerizációjára kifejtett hatását. A kísérleteink eredményei szerint mindkét mDia1-FH2<sup>monomér</sup> mutáció hatása kisebb volt, mint a vad típusú fragmentumé (20. a ábra).



20. ábra: Az mDia1 központi FH2 doménjében létrehozott mutációkat tartalmazó fragmentumok hatása az aktin polimerizációs folyamatára.

*a ábra:* A normált pirén-intenzitásgörbék az mDia1-FH2<sup>M970R</sup> (teli háromszögek), az mDia1-FH2<sup>I845R</sup> (teli négyzetek) és a vad típusú fragmentum (üres körök) jelenlétében. A mintákban a formin koncentrációja 10 μM volt. A szaggatott vonallal jelölt görbe az mDia1 fragmentumot nem tartalmazó minta polimerizációs folyamatát mutatja.

*b ábra:* A relatív elongációs sebesség függése a formin koncentrációtól (mDia1-FH2<sup>M970R</sup>: teli háromszögek, mDia1-FH2<sup>I845R</sup>: teli négyzetek, vad típusú fragmentum: üres körök, a szaggatott vonalak az eredményekre illesztett hiperbolákat mutatják).

Az illesztés során meghatározott paraméterek szerint telítésben mindkét mutáció hasonló mértékben gátolta a spontán aktin polimerizációt, mint a vad típusú mDia1–FH2<sup>monomér</sup>, azonban a féltelítési koncentráció az mDia1–FH2<sup>M970R</sup> esetén körülbelül négyszerese, az mDia1–FH2<sup>I845R</sup> fragmentum esetén pedig mintegy nyolcszorosa volt a vad típusú fragmentuménak (20. b ábra 5. táblázat).

<i>mDia1 fragmentum</i>	<i>Illesztési paraméter</i>	<i>Polimerizáció</i>
<i>mDia1–FH2 vad típusú</i>	$K_d$	1.96 ± 0.42 μM
	$y_{min}$	41.55 ± 2.92 %
<i>mDia1–FH2<sup>M970R</sup></i>	$K_d$	8.91 ± 3.05 μM
	$y_{min}$	36.26 ± 8.43 %
<i>mDia1–FH2<sup>I845R</sup></i>	$K_d$	15.96 ± 16.47 μM
	$y_{min}$	45.48 ± 29.38 %

5. táblázat: Az mDia1 központi FH2 doménjében létrehozott mutációknak az aktin polimerizációs folyamatára kifejtett hatását jellemző paraméterek. ( $K_d$ : féltelítési koncentráció,  $y_{min}$ : telítési koncentrációban az elongáció, illetve a depolimerizáció sebessége %-ban megadva, a formin nélküli minta elongációs és depolimerizációs sebességéhez - 100%-nak felel meg – viszonyítva. A táblázatban a standard hibákat adtuk meg.)

A koszedimentációs kísérleteink eredményei alapján mindkét pontmutációval létrehozott mDia1–FH2<sup>monomér</sup> fragmentum megtalálható volt az üledékekben (az adatok nincsenek feltüntetve), ami arra enged következtetni, hogy kötöttek az aktin filamentumok oldalához. Az üledékek vizsgálata során az affinitás pontos értékét nem tudtuk meghatározni, a kötött formin mennyiségének a teljes formin koncentrációjától való függése azonban azt mutatta, hogy a telítési koncentráció mindkét mutáció esetén nagyobb volt, mint 15 μM.

A pontmutációkat tartalmazó formin fragmentumokon végzett vizsgálataink eredményei szerint a központi FH2 domén mindkét vége szükséges az mDia1 fragmentumok által az aktin polimerizációs folyamatára kifejtett hatáshoz.

Az mDia forminok központi FH2 doménjeivel végzett vizsgálataink alapján feltételezhetjük, hogy mindhárom vizsgált formin fragmentum a sapkafehérjéhez hasonló mechanizmus révén, a filamentumok szöges végével kialakított kölcsönhatás következtében, lassítja e vég polimerizációs dinamikáját. Eredményeink jól összeegyeztethetőek a hasonló fragmentumokkal, *in vivo* körülmények között végzett kísérletek eredményeivel [30]. Megfigyeléseink szerint az mDia-FH2<sup>monomér</sup> fragmentumok lassítják mind a monomerek filamentumba épülését, mind pedig azok filamentumról való disszociációját. A monomerek beépülésére kifejtett hatást eredményezheti az, hogy e fehérjék a filamentum szöges végéhez, vagy ahhoz közeli tartományokhoz kötődve térben gátolják egy újabb monomér beépülését, de az is elképzelhető, hogy a filamentumvégen elhelyezkedő protomerek konformációját befolyásolják, úgy hogy az a polimerizáció számára kedvezőtlen. Az aktin monomerek disszociációjára kifejtett hatás feltételezhetően annak következménye, hogy a forminok jelenlétében a szöges végeken lévő protomerek közötti kötések száma és / vagy erőssége megnövekszik. A nagyobb kötési energia pedig a terminális és az azt követő protomerek közötti kapcsolat erősödését okozhatja [72].

Összehasonlítva az általunk kapott eredményeket más munkacsoportok eredményeivel, az mondhatjuk, hogy a vizsgált fragmentumok közül az mDia2-FH2<sup>monomér</sup> és az mDia3-FH2<sup>monomér</sup> hatása inkább a hasadó élesztőben található Cdc12p formin FH2 doménje (882 – 1375 aa.) által kifejtett hatáshoz áll közelebb. A Cdc12p-FH2 klasszikus sapkafehérjeként a szöges véghez kötve gátolja a filamentumok elongációját, lassítja a depolimerizációt (~ 34 %-ra) és megnöveli a kritikus koncentrációt [73]. Az mDia1-FH2<sup>monomér</sup> fragmentum hatása közelebb áll a sarjadzó élesztő Bni1p forminjának FH2 (1348 - 1824 aa.) doménje által kiváltott hatáshoz. A Bni1p a szöges végek részleges sapkázásával lassítja mind az elongáció sebességét (~ 50 %-ra), mind pedig a depolimerizáció sebességét (~ 60 %-ra), míg jelenlétében a kritikus koncentráció csak kis mértékben tolódik el [49]. A vizsgált mDia fehérjék központi FH2 doménjeinek hatásában megfigyelhető különbségek háttérben feltételezhetően szekvenciabeli különbségek, illetőleg a sejten belül kifejtett hatásukban megfigyelhető eltérések állhatnak. A kérdés pontos tisztázására azonban további kísérletekre van szükség.

A mutációk esetében tapasztalt funkcióvesztés arra enged következtetni, hogy az általunk vizsgált központi FH2 domén mindkét vége szerepet játszik az aktin filamentumokkal való kölcsönhatás kialakításában.

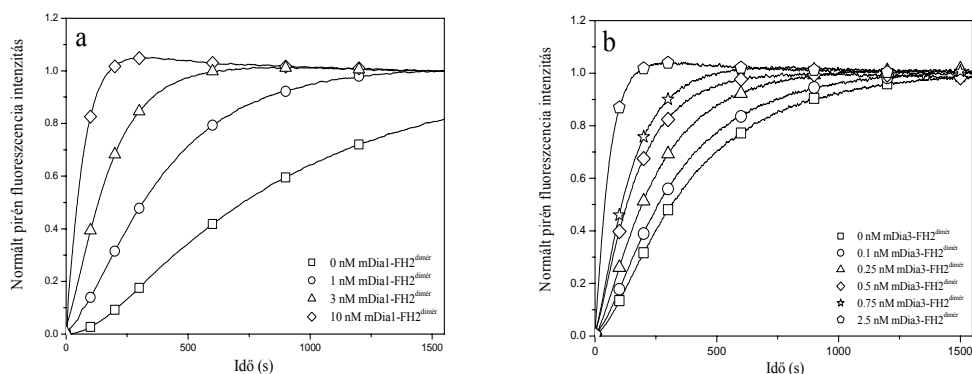
#### *IV. 1. 5. A polimerizációt gyorsító mDia fragmentumok vizsgálata*

Az általunk vizsgált mDia forminok központi FH2 doménjei gátolták a spontán aktin polimerizációt. A más munkacsoportok által vizsgált, hosszabb mDia1 fehérje azonban gyorsította az aktin polimerizációs folyamatát [48]. A következőkben az volt a célunk, hogy az mDia fehérjék legkisebb, a polimerizációt már gyorsító, a központi FH2 domént is tartalmazó fragmentumának határait definiáljuk.

A kollaborációs partnerünkkel való együttműködés keretében sikerült az mDia1 és az mDia3 fehérjék központi FH2 doménjét és az azt az FH1 doménnel összekötő, 72 aminosavból álló ún. „linker” régiót is tartalmazó fragmentumokat (a továbbiakban mDia–FH2<sup>dimér</sup>) *E. coli* rekombináns fehérjeként expresszálni. Munkánk második szakaszában azt vizsgáltuk milyen hatása van az aktin polimerizációját jellemző paraméterekre ezen mDia fehérjéknek.

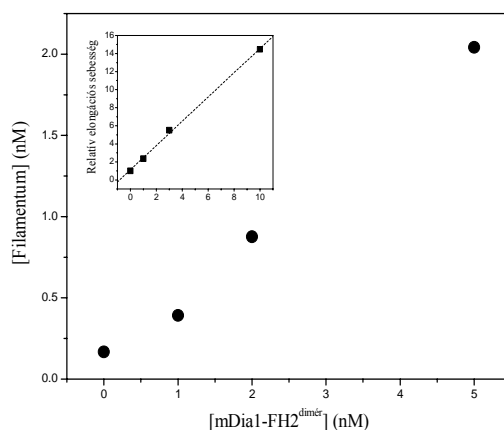
##### *IV. 1. 5. 1. Az mDia-FH2<sup>dimér</sup> fragmentumok hatása az aktin polimerizációjára*

Megvizsgáltuk az mDia1 és az mDia3 formin „linker” régiót is tartalmazó FH2 fragmentumának az aktin polimerizációs folyamatára kifejtett hatását. Eredményeink szerint az mDia3–FH2<sup>dimér</sup> már pikomólos, az mDia1–FH2<sup>dimér</sup> pedig nanomólos koncentráció-tartományban képes volt gyorsítani a polimerizáció folyamatát (21. a, b ábra). A magasabb formin koncentráció-tartományon végzett méréseink kiértékelését nehezítette, hogy a teljes polimerizáció már a forminokat tartalmazó oldat hozzáadása során végbement, így az ahhoz tartozó fluoreszcencia intenzitás változását nem tudtuk mérni.

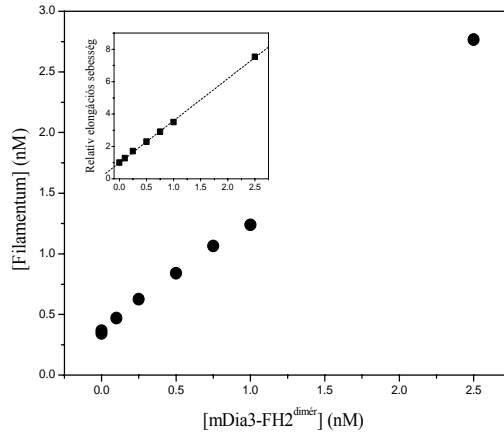


21. ábra: Az mDia-FH2<sup>dimér</sup> fragmentumok hatása az aktin polimerizációs folyamatára. Az ábrák a normált pirén fluoreszcencia intenzitás időbeli változását mutatják különböző koncentrációban (lásd: jelmagyarázat) jelen lévő mDia1-FH2<sup>dimér</sup> (a ábra) és mDia3-FH2<sup>dimér</sup> (b ábra) esetén.

A vizsgált koncentráció-tartományban a pirén-intenzitásgörbék alapján meghatározott relatív elongációs sebességet a formin koncentráció függvényében ábrázolva egyenest kaptunk (22, 23. ábra, betét ábra).



22. ábra: Az aktin filamentumok koncentrációjának függése az mDia1-FH2<sup>dimér</sup> koncentrációjától 50%-os polimerizációnál. A betét ábra a relatív elongációs sebességet mutatja az mDia1-FH2<sup>dimér</sup> koncentrációjának függvényében.



23. ábra: Az aktin filamentumok koncentrációjának függése az mDia3-FH2<sup>dimér</sup> koncentrációjától 50 %-os polimerizációnál. A betét ábra a relatív elongációs sebességet mutatja az mDia3-FH2<sup>dimér</sup> koncentrációjának függvényében.

Az elongációs sebesség ismeretében meghatározható az aktin filamentumok koncentrációja ( $[filamentum]$ ) is az alábbi egyenlet segítségével:

$$[filamentum] = \frac{S^*}{k_+ \cdot M_{0.5}} \quad (16)$$

Az összefüggésben szereplő  $S^*$  a  $\mu\text{M/s}$ -ban megadott elongációs sebesség, amely a pirén-intenzitásgörbék meredekségéből ( $S$ ) és a mintában lévő teljes aktin monomér koncentrációból ( $M_t$ ) következő módon számolható:

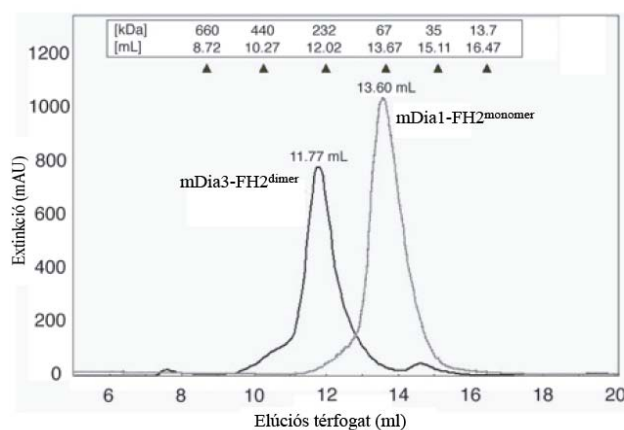
$$S^* = \frac{S \cdot M_t}{f_{\max} - f_{\min}} \quad (17)$$

ahol  $M_{0.5}$  az aktin monomér koncentráció 50 %-os polimerizációnál, amely  $M_t = 3.5 \mu\text{M}$  monomér koncentráció esetén, a szöges vég kritikus koncentrációjának  $0.1 \mu\text{M}$ -t feltételezve [6]  $1.7 \mu\text{M}$ -nak adódik. Az  $f_{\max}$  és  $f_{\min}$  a teljes mértékben polimerizált, illetve a teljes mértékben monomér formában jelen lévő aktin minták fluoreszcencia intenzitását jelöli. A szöges végen a monomérek asszociációját jellemző állandót a számolások során  $k_+ = 11.6 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ -nak vettük [74].

Eredményeink szerint, az alkalmazott kísérleti körülmények között, formin jelenléte nélkül az aktin filamentumok koncentrációja néhány tized nM. Az mDia-FH2<sup>dimér</sup> fragmentumok jelenlétében a filamentumok koncentrációja a vizsgált koncentráció-tartományon lineárisan nőtt a növekvő formin koncentrációval. A legtöbb formint tartalmazó minták esetén (5 nM az mDia1-FH2<sup>dimér</sup>, 2.5 nM az mDia3-FH2<sup>dimér</sup> esetén) a filamentumok koncentrációja 2 - 3 nM között volt (22., 23. ábra). Ezek alapján feltételezhetjük, hogy a vizsgált fragmentumok a nukleációs fázisban az aktin nukleuszok képződését gyorsítják, amelynek eredményeképpen forminok jelenlétében több aktin nukleusz keletkezik. A filamentumok növekedésének alapját biztosító nukleuszok megnövekedett száma egyben azt is jelenti, hogy a filamentumok / szöges végek koncentrációja megnő, amely révén az elongáció folyamata is gyorsabb lesz.

#### IV. 1. 5. 2. A polimerizációt gyorsító hatás hátterében álló szerkezeti sajátosságok

Az mDia fehérjék oldatainak fehérjeösszetételét megvizsgáltuk analitikai kromatográfias módszerek alkalmazásával is. E technika segítségével a fehérje oldat egyes komponensei molekulatömegük és alakjuk alapján választhatók el. Az eluátum abszorpcióját ábrázoltuk az egyes eluátum frakciók térfogatának ismeretében kiszámított elúciós térfogat függvényében (24. ábra). A görbe maximumaihoz tartozó elúciós térfogatokból meghatározhatjuk az egyes komponensek molekulatömegeit ismert molekulatömegű anyagok segítségével felvett kalibrációs görbe alapján.



24. ábra: Az mDia1-FH2<sup>monomér</sup> és az mDia3-FH2<sup>dimér</sup> fragmentumok elúciós profiljai. Az ismert molekulatömegű (kDa-ban megadva) fehérjékre meghatározott elúciós térfogatok értékei (ml-ben megadva) az ábra felső részén található táblázatban vannak feltüntetve.

Az mDia1 központi FH2 doménjének elúciós térfogata 13.60 ml volt (24. ábra). Az mDia3 fehérjének a központi FH2 domént és a „linker” régiót is tartalmazó fragmentuma kisebb elúciós térfogatban mosódott le, mint a vizsgált mDia1-FH2 fragmentum (11.77 ml, 24. ábra). A kisebb elúciós térfogat valószínűleg annak volt a következménye, hogy a fehérje nagyobb egységeket alkotott és így hamarabb mosódott le az oszlopról. Ez feltételezéseink szerint azt jelenti, hogy több mDia3 fragmentum összekapcsolódása révén oligomérek keletkeztek. Az elúciós térfogatok alapján az mDia3-FH2 „linker” régiót is tartalmazó fragmentuma esetében formin dimérek alakultak ki. Ezen megfigyelésünket kollaborációs partnerünk – a svájci Baselben kutató Ueli Aebi professzor (M.E. Müller Institute Biozentrum, University of Basel) - analitikai ultracentrifugáláson alapuló kísérletei később alátámasztották (személyes megbeszélés). A más munkacsoportok által végzett kutatások ugyancsak hasonló eredményekre vezettek. A gélkromatográfiai módszereken, illetve a sztatikus fényszórás vizsgálatának módszerén alapuló kísérletek szerint az mDia1 fehérje FH1FH2 fragmentuma oligoméereket hoz létre [48], a Bni1p formin FH2 doménjét tartalmazó nukleációt gyorsító fragmentum és az FH1FH2 doménje tetraméreket alkot [75].

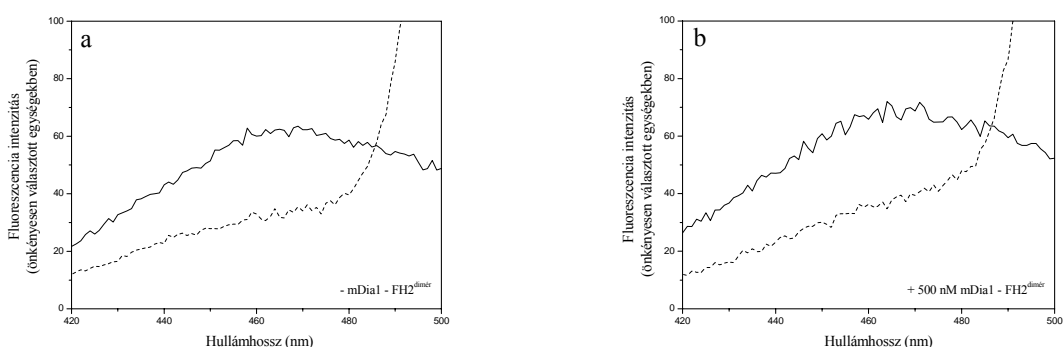
A fentiekben és a korábbi szakaszokban ismertetett kísérleteink eredményei alapján feltételezzük, hogy a „linker” régió révén az mDia fehérjék képesek diméreket alkotni és a dimerizáció alapvetően szükséges az aktin polimerizációjának nukleációs fázisára kifejtett gyorsító hatásához. Feltételezéseinket igazolták Xu és munkacsoportjának a röntgen-krisztallográfia módszerével kapott eredményei. Ezen kutatók meghatározták a Bni1p formin FH2 doménjének háromdimenziós atomi szerkezetét. Munkájukban arról számoltak be, hogy két Bni1p-FH2 domén képes antiparallel módon összekapcsolódni, amelynek eredményeképpen stabil és flexibilis dimérek jönnek létre [32]. Az FH2 doménben létrehozott pontmutációkkal végzett kísérleteikben megmutatták továbbá azt is, hogy bár a dimért alkotó monomerek mindegyike képes kölcsönhatásba lépni a filamentumok szöges végével, azonban a nukleáció elősegítése, és a processzív tulajdonság a dimér sajátja.



#### IV. 2. A forminok hatása az aktin filamentumok dinamikai tulajdonságaira

Munkánk során hőmérsékletfüggő fluoreszcencia rezonancia energia transzfer alkalmazásával vizsgáltuk miként módosulnak az aktin filamentumok dinamikai tulajdonságai az mDia1–FH2<sup>dimér</sup> fragmentum jelenlétében. A FRET a korábbi vizsgálatok során megfelelő módszernek bizonyult a különböző tényezők (pH, kationok, peptidekkel és fehérjékkel kialakított kölcsönhatások...) által kiváltott konformációs módosulások leírására az aktin filamentumban [60, 76-81]. Kísérleteinkben az aktin monomér Cys-374-es aminosavához kovalensen kapcsolódó fluorofórokat, az IAEDANS-t és az IAF-et alkalmaztuk, mint donor-akceptor párt. Méréseink során a különböző aktin protomérek elhelyezkedő fluoreszcens próbák közötti Förster-típusú energia transzfer hatásfokának hőmérsékletfüggését mértük. A mért adatok segítségével számoltunk egy további FRET paramétert, az  $f'$ -t (5. egyenlet), amely a fenti stratégiát alkalmazva a filamentumok intermonomér flexibilitásának jellemzésére adott lehetőséget.

Az első kísérleteink igazolták, hogy mind a formin nélküli, mind pedig az mDia1–FH2<sup>dimér</sup> fragmentumot tartalmazó mintákban lecsökken a donor fluoreszcencia intenzitása az akceptor molekula jelenlétében, ami az energia transzfer létrejöttére utal (25. a, b ábra).



25. ábra: A donor akceptor nélkül (folytonos vonal) és akceptor jelenlétében (szaggatott vonal) 22 °C-on mért emissziós spektrumai az mDia1-FH2<sup>dimér</sup>-t nem tartalmazó minta esetén (a ábra) és 500 nM mDia1-FH2<sup>dimér</sup> jelenlétében (b ábra).

#### *IV. 2. 1. A FRET alkalmazhatóságának vizsgálata a formin–aktin kölcsönhatás leírására*

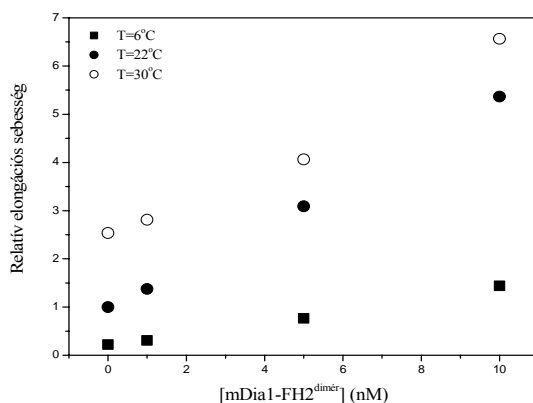
Az  $f'$  értékében bekövetkező változások a donor és akceptor molekula közötti fehérjemátrix dinamikai paramétereiről szolgáltatnak információt. Az  $f'$  paraméter értékeinek alakulásában két effektus játszik meghatározó szerepet. Az egyik a fehérjemátrix flexibilitásában bekövetkező változás, amely a helyi fluktuációk módosulását vonja maga után. Ez a módosulás lehet mind a fluktuáció amplitúdójának, mind pedig a frekvenciájának a megváltozása. Az ilyen módosulások esetében a donor-akceptor távolságot leíró eloszlás várható értéke ugyanaz marad, míg az eloszlás félértékszélessége megváltozik. Amennyiben az  $f'$  értéke e folyamat eredményeképpen változik meg, úgy az  $f'$ -ben mért változás a fehérje dinamikai paramétereinek a megváltozását tükrözi. Ugyanakkor olyan konformációs változások is befolyásolhatják az  $f'$  paraméter értékét, amelyek során a donor és az akceptor molekula közötti távolságeloszlás várható értéke megváltozik. Amennyiben a fehérje dinamikai állapotát akarjuk jellemezni az ilyen szerkezeti változások hatását is figyelembe kell venni. Bizonyos esetekben előfordulhat az is, hogy a fluoreszcens jelölő alkalmazása módosítja a vizsgált rendszert, így a fehérjék viselkedését és a közöttük kialakuló kölcsönhatásokat.

A fentiekben leírtak alapján tehát szükséges volt annak tisztázása, hogy a FRET módszere alkalmazható-e a forminok által kiváltott hatás leírására.

#### *IV. 2. 1. 1. A hőmérséklet és a fluoreszcens próbák hatása az mDia1–FH2<sup>dimér</sup> aktivitására*

Megvizsgáltuk hogy módosul-e a formin-aktin kölcsönhatás a hőmérsékletváltozás, illetve az alkalmazott fluoreszcens próbák hatására. A korábbi kísérleteink igazolták, hogy az mDia1–FH2<sup>dimér</sup> fragmentum karakterisztikus tulajdonsága, hogy gyorsítja az aktin polimerizációját (lásd: *IV. 1. 5. 1. fejezet*). Ezen megfigyelés alapján a formin aktivitását az aktin polimerizációs kinetikájára kifejtett hatásán keresztül mértük.

A 6, 22, és 30 °C-on elvégzett polimerizációs kísérletek során meghatározott elongációs sebességeket a 22 °C-on, formin jelenléte nélkül mért elongációs sebességgel normáltuk, majd az így kapott értékeket az mDia1–FH2<sup>dimér</sup> koncentrációjának függvényében ábrázoltuk (26. ábra).



26. ábra: A relatív elongációs sebesség függése az mDia1-FH2<sup>dimér</sup> koncentrációjától 6 °C (teli négyzetek), 22 °C (teli körök), 30 °C (üres körök) hőmérsékleten.

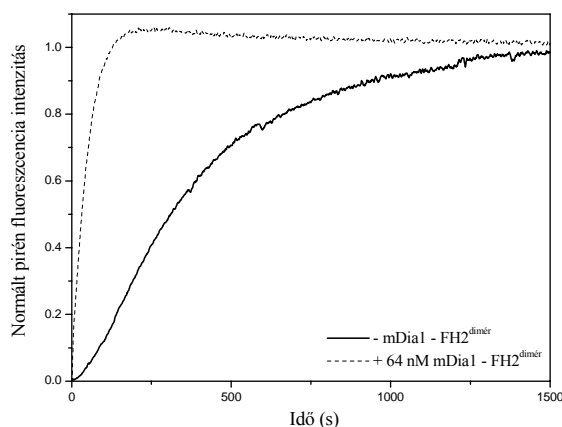
A formin nélküli rendszerben a hőmérséklet növekedésével nőtt az aktin polimerizációjának sebessége, ami az aktin monomereknek a hőmérsékletfüggő diffúziós folyamatok által meghatározott filamentumba épülésével magyarázható. Az mDia1–FH2<sup>dimér</sup> fragmentum koncentrációjának növelésével a vizsgált hőmérsékleti értékeken nőtt a spontán aktin polimerizáció sebessége. Eredményeinket a 6. táblázatban foglaltuk össze.

[mDia1-FH2 <sup>dimér</sup> ] (nM)	T = 6 °C		T = 22 °C		T = 30 °C	
	Elongációs sebesség (·10 <sup>-3</sup> s <sup>-1</sup> )	Relatív elongációs sebesség	Elongációs sebesség (·10 <sup>-3</sup> s <sup>-1</sup> )	Relatív elongációs sebesség	Elongációs sebesség (·10 <sup>-3</sup> s <sup>-1</sup> )	Relatív elongációs sebesség
0	0.42 (± 0.02)	1	1.91 (± 0.01)	1	4.84 (± 0.05)	1
1	0.59 (± 0.00)	1.39	2.63 (± 0.03)	1.37	5.37 (± 0.08)	1.10
5	1.46 (± 0.01)	3.45	5.9 (± 0.05)	3.08	7.76 (± 0.11)	1.60
10	2.75 (± 0.03)	6.50	10.25 (± 0.12)	5.36	12.54 (± 0.08)	2.59

6. táblázat: Az aktin polimerizációs folyamatát jellemző paraméterek hőmérséklet-, és formin koncentrációfüggése. (A táblázatban a standard hibákat adtuk meg.)

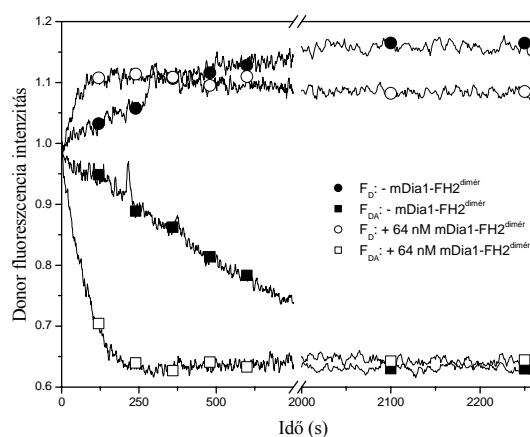
A vizsgált hőmérsékleti értékeken az mDia1–FH2<sup>dimér</sup>-nek az aktin polimerizációjának sebességére gyakorolt hatása nem változott számottevő mértékben, így az mDia1–FH2<sup>dimér</sup> fragmentum és az aktin filamentumok közötti kölcsönhatás létrejön a FRET mérések során alkalmazott hőmérsékleti tartományon.

Megvizsgáltuk továbbá azt is, befolyásolják-e az általunk alkalmazott fluorofórok a mDia1–FH2<sup>dimér</sup> fragmentumnak az aktin polimerizációjára kifejtett hatását. Ennek érdekében a polimerizáció folyamatát a donor fluoreszcencia intenzitásának időbeli változásán keresztül követtük nyomon akceptor nélküli és akceptort tartalmazó rendszerben. Az IAEDANS-szel jelölt aktin minták esetén a polimerizáció folyamatának vizsgálatára az adott lehetőséget, hogy ezen fluorofór fluoreszcencia intenzitása az aktin monomerek filamentumba épülése során ~ 10 %-kal megnövekszik. A donort és akceptort egyaránt tartalmazó minták polimerizációs kinetikájának leírására a FRET módszert használtuk. E szerint a donor fluoreszcencia emissziója megfelelő körülmények között (lásd: *Módszerek fejezet*) lecsökken az akceptor jelenlétében. Így, ha a polimerizáció során mind a donor, mind az akceptor molekula a filamentumba épül, akkor közöttük energia transzfer jön létre, amit a donor fluoreszcencia intenzitásának csökkenése jelez. A mérések során referenciaként a pirén alkalmazásával kapott eredmények szolgáltak, amelyek szerint 64 nM mDia1–FH2<sup>dimér</sup> ~ 8-szorosára gyorsította a spontán aktin polimerizációt (27. ábra).



27. ábra: A pirén fluoreszcencia emissziójának időfüggése az aktin polimerizációs folyamata során a formint nem tartalmazó minta esetén (folytonos vonal) és 64 nM mDia1–FH2<sup>dimér</sup> jelenlétében (szaggatott vonal), 22 °C-on.

A csak donort tartalmazó formin nélküli minták esetén az elongáció sebessége közel azonos volt a pirén alkalmazása során kapott eredménnyel, ami azt mutatja, hogy az IAEDANS jelölő nem befolyásolta az aktin monomerek polimerizációs képességét (28. ábra). A 64 nM mDia1–FH2<sup>dimér</sup> jelenlétében elvégzett mérés eredménye szerint az elongációs sebesség 7.7-szeresére növekedett, ami jól egyezik a pirén jelölő alkalmazásával végzett mérés eredményével.



28. ábra: A donor fluoreszcencia emisszójának időfüggése az aktin polimerizációs folyamata során akceptor jelenléte nélkül (körök) és akceptor jelenlétében (négyzetek) a formin nem tartalmazó minta esetén (teli szimbólumok) és 64 nM mDia1–FH2<sup>dimér</sup> jelenlétében (üres szimbólumok). A méréseket 22 °C-on végeztük.

Ha a donor jelölt aktint az akceptor jelölt aktin jelenlétében polimerizáltuk a donor fluoreszcencia intenzitása lecsökkent, ami a FRET jelenlétére utal (28. ábra). Az eredmények szerint az elongációs sebesség körülbelül fele akkora volt, mint amit a pirén jelölt aktinnal végzett kísérletek eredményei alapján számoltunk. Ez feltételezhetően annak a következménye, hogy az IAF-fel jelölt monomerek lassabban épülnek a filamentumba, mint a jelöletlenek. 64 nM mDia1–FH2<sup>dimér</sup> jelenlétében az elongáció sebessége 10.81-szerese volt a formin nélküli mérés során meghatározott értéknek. Ezen eredményeink azt mutatják, hogy mDia1–FH2<sup>dimér</sup> képes gyorsítani mind az IAEDANS-szel, mind pedig a IAF-fel jelölt monomerek polimerizációját. Eredményeinket a 7. táblázatban foglaltuk össze. A különböző formin koncentrációk alkalmazása mellett kapott eredményeink is alátámasztják ezt a megfigyelést (az adatok nincsenek feltüntetve).

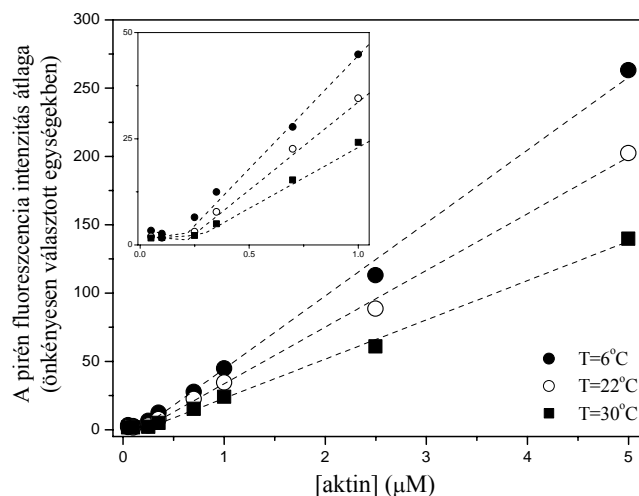
$[mDial-FH2^{dimér}]$ (nM)		Donor	Donor-akceptor	Pirén (5 % pirén jelölt aktin)
0	Elongációs sebesség ( $\cdot 10^{-3} s^{-1}$ )	0.99 ( $\pm 0.108$ )	0.64 ( $\pm 0.043$ )	1.40 ( $\pm 0.008$ )
	Relatív elongációs sebesség	1	1	1
64	Elongációs sebesség ( $\cdot 10^{-3} s^{-1}$ )	7.63 ( $\pm 2.710$ )	6.92 ( $\pm 0.522$ )	11.72 ( $\pm 0.166$ )
	Relatív elongációs sebesség	7.70	10.81	8.37

7. táblázat: A különböző jelölők (donor: IAEDANS, akceptor: IAF és pirén) fluoreszcencia emissziójának mérése alapján meghatározott, az mDial–FH2<sup>dimér</sup> fragmentumnak az aktin polimerizációjára kifejtett hatását leíró paraméterek értékei.

Mindezek alapján arra következtethetünk, hogy sem az általunk használt jelölők, sem pedig a hőmérséklet változása nem módosította számottevő mértékben a vizsgált formin fragmentumnak az aktinnal kialakított kölcsönhatását.

#### IV. 2. 1. 2. A hőmérséklet, a fluoreszcens próbák és az mDial–FH2<sup>dimér</sup> hatása az aktin kritikus koncentrációjára

Az aktin monomérek kritikus koncentrációnak megfelelő hányada minden körülmények között monomér formában marad, így közöttük energia transzfer a kedvezőtlen térbeli orientációjuk miatt nem alakul ki (lásd: *Módszerek fejezet*). Ezért fontos volt vizsgálni azt, hogy változik-e az mDial–FH2<sup>dimér</sup> fragmentum jelenlétében az aktin kritikus koncentrációja a vizsgált hőmérsékleti tartományon, illetve az alkalmazott jelölők hatására. A pirén jelölő alkalmazásával kapott eredményeink szerint az aktin kritikus koncentrációja a 195 – 230 nM között volt, és hőmérsékletfüggetlennek bizonyult. A 250 nM mDial–FH2<sup>dimér</sup> jelenlétében megismételt mérések során a kritikus koncentráció értéke nem változott számottevő mértékben (8. táblázat, 29. ábra).



29. ábra: A pirén emissziós spektrumai alapján meghatározott átlagintenzitások függése a mintában lévő aktin koncentrációjától 250 nM mDia1–FH2<sup>dimér</sup> jelenlétében 6 °C (teli körök), 22 °C (üres körök), és 30 °C (teli négyzetek) hőmérsékleten. A szaggatott vonalak az 1. egyenlet illesztésével kapott görbét jelölik. A betét ábra a görbék kezdeti szakaszát mutatja: [aktin] = 0 - 1 μM.

[mDia1-FH2 <sup>dimér</sup> ] (nM)	$T = 6\text{ }^{\circ}\text{C}$	$T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$	$T = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$
	Kritikus koncentráció (nM)	Kritikus koncentráció (nM)	Kritikus koncentráció (nM)
0	195 ± 36	212 ± 6	230 ± 4
250	162 ± 47	198 ± 41	318 ± 57

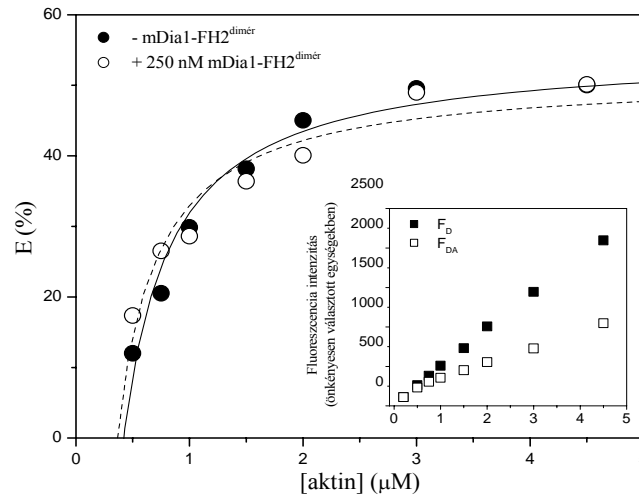
8. táblázat: Az aktin kritikus koncentrációja 6 °C, 22 °C, 30 °C hőmérsékleten, formin nélkül és 250 nM mDia1-FH2<sup>dimér</sup> jelenlétében. (A táblázatban a standard hibákat adtuk meg.)

A fluoreszcens jelölőknek az aktin kritikus koncentrációjára kifejtett hatását a FRET módszerének segítségével vizsgáltuk. A donorral és akceptorral jelölt aktin monomerek között energia transzfer nem alakul ki. Amennyiben a jelölt monomerek a polimerizáció során a filamentumba épülnek, az energia transzfer határfoka megnövekszik. Ennek alapján a FRET határfoka alkalmas paraméter az aktin filamentum mennyiségének a mérésére. Kísérleteinkben a különböző koncentrációjú aktin mintákat IAEDANS-jelölt, illetve IAF-jelölt aktin monomerek megfelelő arányú (a FRET mérések során is alkalmazott 1 : 9 IAEDANS : IAF moláris arány) összekeverésével hoztuk létre.

A polimerizációhoz szükséges körülmények biztosítása érdekében az oldatokhoz 10 mM KCl-ot és 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>-ot adtunk, majd azokat éjszakán át inkubáltuk. A mért transzferhatásfok értékeit az aktin koncentrációjának függvényében ábrázoltuk (30. ábra). Az eredményeket az alábbi egyenlettel illesztettük:

$$E = E_{\max} (([aktin] - cc) / [aktin]) \quad (18)$$

ahol  $E_{\max}$  az a transzferhatásfok jelenti, amikor a teljes aktin mennyisége filamentális formában van jelen,  $cc$  pedig a kritikus koncentráció.



30. ábra: A FRET hatásfokának aktin koncentrációfüggése 22 °C-on a formin nélkül (teli körök) és 250 nM mDia1–FH2<sup>dimér</sup> (üres körök) jelenlétében. A folytonos (formin nélkül) és a szaggatott (250 nM mDia1–FH2<sup>dimér</sup> jelenlétében) vonal 18. egyenlet illesztésével kapott görbékét jelöli. A betét ábra a donor fluoreszcencia intenzitását mutatja akceptor nélkül (teli négyzetek) és akceptor (üres négyzetek) jelenlétében a formint nem tartalmazó mintában.

$[mDia1-FH2^{dimér}]$ (nM)	$T = 6\text{ }^{\circ}\text{C}$	$T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$	$T = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$
	Kritikus koncentráció (nM)	Kritikus koncentráció (nM)	Kritikus koncentráció (nM)
0	$397 \pm 73$	$331 \pm 33$	$420 \pm 48$
250	$457 \pm 60$	$345 \pm 27$	$420 \pm 25$

9. táblázat: A 18. egyenlet illesztésével kapott kritikus koncentráció értékek. (A táblázatban a standard hibákat adtuk meg.)



Az illesztés során kapott eredmények szerint az mDia1–FH2<sup>dimér</sup>-t nem tartalmazó donorral és akceptorral jelölt aktin minták kritikus koncentrációja 397 – 420 nM volt a vizsgált hőmérsékleti tartományon (9. táblázat). Ezek az értékek magasabbak, mint a pirén jelölő alkalmazása során kapott eredmények, ami valószínűleg azzal magyarázható, hogy az IAEDANS-szel és IAF-fel jelölt aktin monomérek filamentumba épülése lassabb a pirénnel jelöltekénél. A 250 nM mDia1–FH2<sup>dimér</sup> jelenlétében megismételt mérés eredményei alapján a kritikus koncentráció nem változott számottevő mértékben (9. táblázat).

Eredményeink szerint a monomér-filamentum egyensúly sem a hőmérsékletváltozás, sem pedig az mDia1–FH2<sup>dimér</sup> hatására nem tolódott el számottevően. A kontroll kísérletek eredményei alapján tehát a FRET alkalmas módszer a forminok jelenlétében az aktin filamentumok dinamikájában bekövetkező változások leírására.

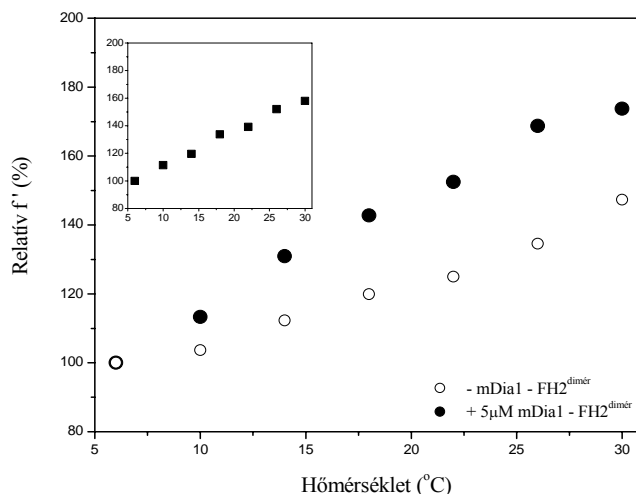
#### IV. 2. 2. A FRET kísérletek

##### IV. 2. 2. 1. Az mDia1-FH2<sup>dimér</sup> hatása az aktin filamentumok flexibilitására

Az mDia1-FH2<sup>dimér</sup> fragmentum által kiváltott konformációs változások leírására a donor akceptor nélküli és akceptor jelenlétében mért fluoreszcencia intenzitásából számolt  $f'$  paraméter hőmérsékletfüggését vizsgáltuk. Mivel e paraméter hőmérsékletfüggésének meredeksége fontos a fehérje flexibilitásának jellemzése szempontjából, a normált, vagy relatív  $f'$  értékeket is meghatároztuk. A normálást a legalacsonyabb hőmérsékleten (6°C-on) mért  $f'$  értékekkel végeztük.

Forminok hiányában, 5  $\mu$ M aktin esetén a relatív  $f'$  értékek a 6–30 °C-os hőmérsékleti tartományon monoton növekedő tendenciát mutattak, a maximális változás 30 °C-nál ~ 150 % volt. Ez az eredmény jól egyezik a korábbi munkákban közölt értékekkel [76]. A relatív  $f'$  paraméter hőmérsékletfüggését leíró görbe meredeksége nagyobb volt (30 °C-nál ~ 175 %) equimoláris koncentrációban jelen lévő mDia1-FH2<sup>dimér</sup> fragmentum esetén (31. ábra).

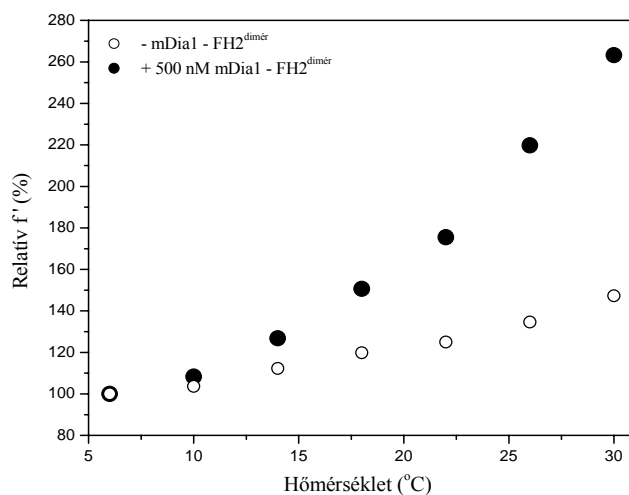
Ez arra utal, hogy a vizsgált fehérje jelenlétében módosult az aktin filamentum konformációja, ami a filamentumok flexibilitásának növekedésében nyilvánult meg.



31. ábra: A relatív  $f'$  paraméter hőmérsékletfüggése 5  $\mu$ M mDia1-FH2<sup>dimér</sup> jelenlétében (teli körök) és nélküle (üres körök). Az aktin koncentrációja 5  $\mu$ M volt. A betét ábra a 10  $\mu$ M aktinnal és 10  $\mu$ M mDia1-FH2<sup>dimér</sup>-rel elvégzett mérés eredményeit mutatja (teli négyzetek).

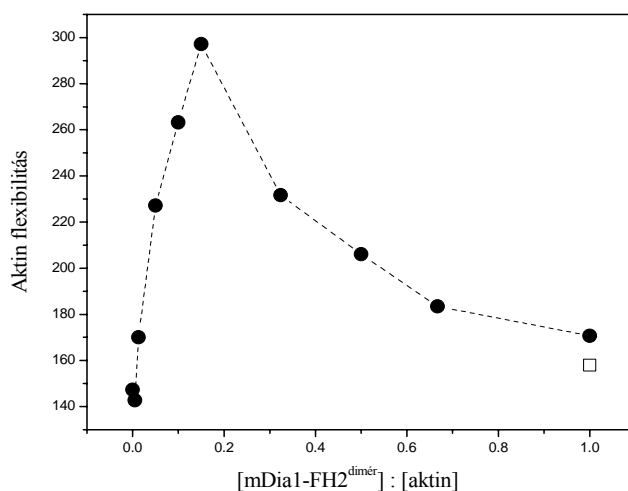
Alapjában véve a fentiekkel megegyező következtetésekre jutottunk abban az esetben is, ha mindkét fehérje koncentrációját  $10\ \mu\text{M}$ -ra növeltük (31. ábra, betét ábra). A formin hatásnak az alkalmazott aktin koncentrációtól való függetlensége alátámasztja azt a következtetésünket, hogy a megfigyelt változás nem tulajdonítható monomér-filamentum egyensúlyban bekövetkező eltolódásnak.

A következőkben azt vizsgáltuk, hogy milyen módon függ a hatás a formin koncentrációjától. Ennek érdekében olyan méréseket végeztünk, amelyek során a mintákban az aktin koncentrációját állandó értéken tartottuk ( $5\ \mu\text{M}$ ) és változtattuk a mDia1–FH2<sup>dimér</sup> fragmentum koncentrációját  $5\ \text{nM}$  és  $5\ \mu\text{M}$  között. Az 32. ábra az  $500\ \text{nM}$  formin jelenlétében kapott eredményeket mutatja, e körülmények között a relatív  $f'$  paraméter hőmérsékletfüggését leíró görbe meredekebb növekedést mutatott ( $30\ ^\circ\text{C}$ -nál  $270\ \%$ ), mint amit az equimoláris koncentrációban jelen lévő mDia1–FH2<sup>dimér</sup> esetén tapasztaltunk. A relatív  $f'$  értékében bekövetkezett változás tehát formin koncentrációfüggőnek bizonyult. Ezt alátámasztják a különböző formin koncentrációkon elvégzett méréseink eredményei is (az adatok nincsenek feltüntetve).



32. ábra: A relatív  $f'$  paraméter hőmérsékletfüggése  $500\ \text{nM}$  mDia1–FH2<sup>dimér</sup> jelenlétében (teli körök) és nélküle (üres körök). Az aktin koncentrációja  $5\ \mu\text{M}$  volt.

A hatás pontosabb jellemzése érdekében a relatív  $f'$  paraméter 30 °C-on mért értékét választottuk, mint az aktin filamentumok flexibilitását jellemző kvantitatív mennyiséget. A flexibilitás növekedését ezen paraméter monoton növekedése tükrözi, azonban nem lineárisan arányos vele [65, 66].



33. ábra: Az aktin filamentumok flexibilitásának (a relatív  $f'$  paraméter értékében 30 °C-on bekövetkezett változás) függése a formin : aktin moláris protomér aránytól. Az üres négyzet a 10  $\mu$ M mDia1-FH2<sup>dimér</sup> és 10  $\mu$ M aktin jelenlétében végzett mérés eredményét mutatja.

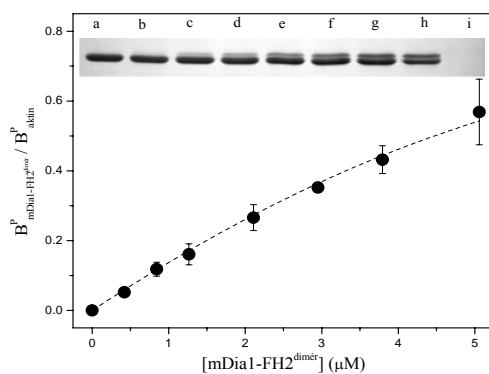
A 33. ábra mutatja a *flexibilitás*nak a formin : aktin moláris protomér koncentráció aránytól való függését. Forminok jelenlétében minden esetben az aktin filamentumok flexibilitásának növekedését tapasztaltuk. Alacsony koncentrációban jelen lévő mDia1–FH2<sup>dimér</sup> fragmentum esetén a flexibilitás a formin koncentrációval együtt növekedett körülbelül 0.15 : 1 formin : aktin koncentráció arányig, ami 750 nM mDia1–FH2<sup>dimér</sup>-nek felelt meg. A 750 nM feletti koncentráció értékek esetén a koncentráció növekedésével egyre kisebb hatást tapasztaltunk.

Összegezve elmondhatjuk, hogy az mDia1–FH2<sup>dimér</sup> fragmentum jelenlétében az aktin filamentumok a konformációs állapotukban bekövetkező változások révén flexibilisebbé váltak. A formin indukálta hatás formin : aktin moláris protomér koncentráció aránytól való függése arra enged következtetni, hogy a hatás kiváltásában legalább két mechanizmus játszhat szerepet. A további kísérleteink célja az volt, hogy a fenti megfigyelésünk háttérében álló molekuláris mechanizmust leírjuk.

#### IV. 2. 3. Az mDia1-FH2<sup>dimér</sup> aktin filamentumokhoz való kötésének vizsgálata

A forminokkal kapcsolatos kutatások eredményei szerint e fehérjék képesek mind az aktin filamentumokhoz szöges végéhez, mind pedig azok oldalához kötni. Az előbbi egy 20 - 50 nM-os affinitású, erős kötést jelent [82, 83], míg az oldalkötés gyengébb, affinitása a  $\mu\text{M}$ -os tartományba esik [82].

Ultracentrifugáláson alapuló koszedimentációs módszer alkalmazásával tanulmányoztuk, hogy a vizsgált mDia1-FH2<sup>dimér</sup> fragmentum az alkalmazott körülmények között képes-e a filamentumok oldalához kötni. Hasonló kötődést az mDia monomerek esetében már megfigyeltünk (lásd: IV. 1. 3. fejezet). A poliakrilamid gélek analízise alapján az mDia1-FH2<sup>dimér</sup> fragmentum önmagában nem került az üledékbe, aktin jelenlétében azonban megtalálható volt az üledékekben is, ami arra utal, hogy a fehérje az aktin filamentumok oldalához kötött (34. ábra, betét ábra). Az üledékek formin, illetve aktin sávjainak intenzitásai alapján meghatározott kötött formin arányt a teljes formin koncentráció függvényében ábrázoltuk (34. ábra). Az adatok az üledékben található formin mennyiségének a növekedését mutatták a teljes formin koncentráció növekedésével. Feltételezve, hogy a vizsgált fragmentum 1 : 1 mDia1-FH2<sup>dimér</sup> : aktin protomér arányban köt az aktin filamentumok oldalához a 7. egyenlet alapján meghatározható volt a kötést jellemző affinitás.



34. ábra: Az üledékben található kötött formin mennyiségének függése a mintában lévő teljes formin koncentrációtól. A szaggatott vonal az eredményekre illesztett hiperbolát mutatja. A betét ábra az üledékek „comassie blue”-val festett poliakrilamid géljét mutatja. A gélen felső sávok az mDia1-FH2<sup>dimér</sup>-nek (a: 0  $\mu\text{M}$ , b: 0.4  $\mu\text{M}$ , c: 0.8  $\mu\text{M}$ , d: 1.2  $\mu\text{M}$ , e: 2.1  $\mu\text{M}$ , f: 2.9  $\mu\text{M}$ , g: 3.7  $\mu\text{M}$ , h: 5  $\mu\text{M}$ , i: 3  $\mu\text{M}$ ), az alsó sávok az aktinnak (a – h-ig: 5  $\mu\text{M}$ , i: 0  $\mu\text{M}$ ) felelnek meg. (Az ábrán a standard hibákat tüntettük fel.)

Az eredményekre illesztett hiperbola illesztési paramétereit alapján az affinitás értéke  $2.0 \pm 0.2 \mu\text{M}$ -nak adódott. Az így meghatározott affinitás erősebb kötésre utal, mint a más munkacsoportok által meghatározott  $3 \mu\text{M}$  affinitás [48]. Az eltérést magyarázhatja a kísérleti körülmények különbözősége. Az általunk alkalmazott ionerősség ( $10 \text{ mM KCl}$  és  $0.5 \text{ mM MgCl}_2$ ) alacsonyabb volt, mint az említett munkában alkalmazott  $50 \text{ mM KCl}$  és  $1 \text{ mM MgCl}_2$ . A két eredmény közötti különbség alapján arra következtethetünk, hogy az  $\text{mDia1-FH2}^{\text{dimér}}$ -nek az aktin filamentumok oldalához való kötését jellemző affinitás ionerősségtől függ.

#### *IV. 2. 4. Az $\text{mDia1-FH2}^{\text{dimér}}$ fragmentum és az aktin kölcsönhatását leíró modell*

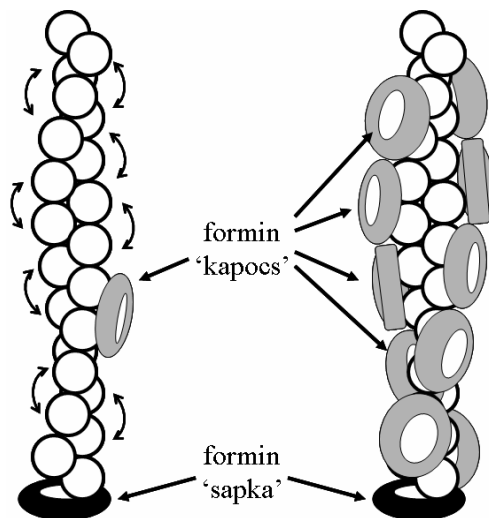
A FRET kísérleteink eredményei szerint az általunk vizsgált formin fragmentumok jelenlétében megváltozik az aktin filamentumok konformációs állapota. Az alkalmazott  $\text{mDia1-FH2}^{\text{dimér}}$  koncentrációtól függően két különböző hatás volt megfigyelhető. Az  $\text{mDia1-FH2}^{\text{dimér}}$  által kiváltott szerkezeti módosulást a szöges véghez, illetve a filamentumok oldalához való kötődés figyelembevételével a következő módon értelmezhetjük. Alacsony formin koncentráció esetén ( $< 750 \text{ nM}$ ) a szöges véghez való kötés a meghatározó. Ez valószínű, egyrészt azért, mert ez a kötés körülbelül egy nagyságrenddel erősebb, mint a filamentumok oldalához való kötés, másrészt pedig azért, mert ebben a formin koncentráció-tartományban az oldalkötő helyeknek csak alacsony hányada lehet telítve. A koncentráció növelésével  $750 \text{ nM}$ -ig a szöges végeken lévő kötőhelyek fokozatosan telítődnek. Az ezen a tartományon mért növekvő *flexibilitás* értékek alapján arra következtethetünk, hogy a filamentumok szöges végéhez kapcsolódó  $\text{mDia1-FH2}^{\text{dimér}}$  domének a filamentumok szerkezetét fellazítják, azok flexibilisebbé válnak.

A vizsgált formin fragmentumok funkcionális egysége a két FH2 domént tartalmazó dimér. Így a maximális flexibilitás változást okozó  $1 : \sim 6$  formin : aktin protomér arány esetén egy formin dimér legkevesebb 12 aktin protomérrel kerül kölcsönhatásba. Az eredmények alapján az  $\text{mDia1-FH2}^{\text{dimér}}$  által kiváltott hatás hatótávolságát (azaz azt, hogy a forminok szöges véghez való kötésének következtében hány aktin protomér konformációja módosul) nem tudtuk pontosan meghatározni.

Figyelembe véve azonban azt, hogy a filamentumok több száz aktin monomér összekapcsolódása során jönnek létre, egy formin dimér szöges véghez való kötődése szükségszerűen számos aktin protomér konformációs állapotát változtatja meg. Így a megfigyelt jelentős flexibilitás növekedés feltételezhetően az mDia1–FH2<sup>dimér</sup> által kiváltott, a protomérek között kialakuló hosszú hatótávolságú, alloszterikus kölcsönhatások következtében jön létre. Ez azt jelenti, hogy a forminok nem csak azon protomérek konformációját képesek megváltoztatni, amelyekhez közvetlenül kötnek, hanem kötésük révén a filamentumok végeitől távolabbi protomérek közötti kapcsolatokat is módosítják. Orlova és munkatársai feltételezték azt, hogy az aktin filamentumok sajátosága a belső kooperativitás [84]. Ennek eredményeképpen a ligandumok és az aktin-kötő fehérjék hatása hosszú hatótávolságú kölcsönhatásokon keresztül kiterjedhet az egész filamentumra. Elektronmikroszkópiával végzett kísérleteik során megmutatták azt is, hogy a szöges véghez kötődő gelsolin fehérje jelenlétében kialakult filamentumokra egy megváltozott konformációs állapot volt jellemző, összehasonlítva a gelsolin hiányában kialakult filamentumok konformációjával. Így az egyetlen gelsolin molekula kötődése következtében létrejött konformációs változás nagyfokú kooperatív kölcsönhatás következtében a kötőhelytől távoli filamentum régiókra is kiterjedt. Mindezek alapján feltételezhetjük, hogy az aktin filamentumok képesek a szöges végen kialakult lokális konformációs módosulásokat a protomér-protomér kapcsolatokon keresztül a szöges végtől távolabbi filamentum részekhez is közvetíteni.

A formin koncentráció további növelésével (> 750 nM) az aktin filamentumok oldalán lévő kötőhelyek is telítetté válnak. A filamentumok oldalához kötődő formin domének méréseink alapján a filamentumok flexibilitásának kisebb növekedését váltják ki, mint a szöges véghez kötődő dimérek. Bár a forminoknak az aktin filamentumok oldalával létrehozott kölcsönhatás részleteiről kevés információ áll a rendelkezésünkre, feltételezéseink szerint a filamentumok oldalához kötődő mDia1–FH2<sup>dimér</sup> fragmentumok a protomérek közötti kölcsönhatást módosítják, ami a filamentumok stabilizációját eredményezi.

A fentiekben leírtak alapján megalkotott modellünk szerint a szöges véghez kapcsolódó formin sapka az aktin filamentumok szerkezetét fellazítja. A filamentumok oldalához kötődő formin kapcsok a szomszédos protomérek közötti molekuláris kölcsönhatások erősítése révén a filamentumokat stabilizálják (35. ábra).



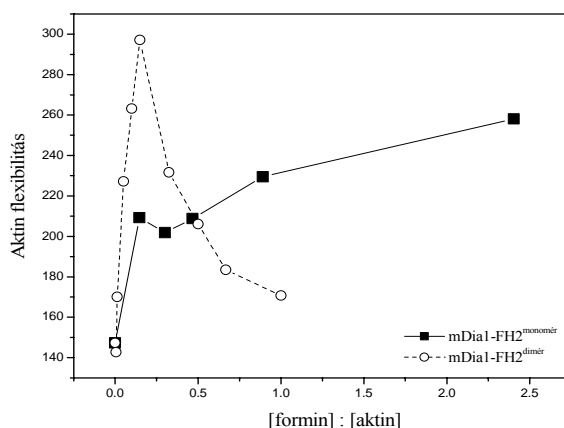
35. ábra: Az mDia1–FH2<sup>dimér</sup> fragmentum és az aktin filamentumok kölcsönhatását leíró modell sematikus ábrázolása. Az üres körök az aktin filamentumot alkotó protoméreket jelölik, a fekete, illetve a szürke ellipszisek a filamentumok szöges végére, illetve azok oldalához kötődő formin diméreket jelölik. Az ábra bal oldali része az alacsony formin : aktin arány, a jobb oldali ábra pedig a magas formin : aktin arány esetén jellemző állapotot mutatja.

A FRET kísérletekben alkalmazott stratégia révén az aktin filamentumok protomérek közötti dinamikájáról nyertünk információt. A vizsgálataink során számolt relatív  $f'$  paraméter érzékenyen reagál minden olyan folyamatra, amely a donor és akceptor molekulák közötti távolságot befolyásolja. A munkánk során használt *flexibilitás* paraméter a két jelölt pont közötti fehérjemátrix rugalmasságáról ad információt, közvetlenül nem a filamentumok hajlékonyságát jellemző paraméterekkel (csavarási, hajlítási rugalmasság / flexibilitás) van kapcsolatban. Azt, hogy ezen módusok milyen mértékben járulnak hozzá a relatív  $f'$  paraméter értékében bekövetkező változáshoz az általunk alkalmazott módszerrel nem tudtuk megállapítani. Így a forminok által az aktin filamentumban létrehozott konformációs módosulások pontos természetét nem tudtuk leírni. Nem zárható ki az, hogy az intramolekuláris szintű szerkezeti változások mellett a forminok kötésük révén az aktin filamentumok szupramolekuláris szerkezetét is befolyásolják.



#### IV. 2. 5. Az mDia1-FH2<sup>monomér</sup> hatása az aktin filamentumok flexibilitására

Az mDia1 fehérje sejten belüli funkciójának betöltésében alapvető szerepet játszik a fehérje azon képessége, hogy két FH2 doménje antiparallel módon összekapcsolódva diméreket alkosson. Az mDia1 dimér FH2 fragmentumával végzett kísérleteink során megfigyelt hatás háttérében álló mechanizmus pontosabb megismerése érdekében vizsgáltuk az mDia1 monomér központi FH2 doménjének az aktin filamentumok konformációs tulajdonságaira kifejtett hatását. Ennek érdekében a fentiekben ismertetett stratégiát követve FRET méréseket végeztünk különböző koncentrációban jelen lévő mDia1-FH2<sup>monomér</sup>-rel. Eredményeink alapján a monomér FH2 fragmentum is előidézte az aktin filamentumok flexibilitásának növekedését. A filamentumok szerkezetében bekövetkezett fellazulás azonban kisebb mértékű volt, mint az mDia1-FH2<sup>dimér</sup> esetén és az mDia1-FH2<sup>dimér</sup> jelenlétében megfigyelt koncentrációfüggést sem tapasztaltuk (36. ábra).



36. ábra: Az aktin filamentumok flexibilitásának (a relatív  $f'$  paraméter értékében 30 °C-on bekövetkezett változás) függése a formin : aktin moláris protomér aránytól. A teli négyzetek az mDia1-FH2 monomér, az üres körök pedig a dimér fragmentumának jelenlétében kapott eredményeket mutatják.

A munkánk első szakaszában végzett kísérleteink szerint az mDia1-FH2<sup>monomér</sup> fragmentum kötődik mind a filamentumok szöges végéhez ( $K_d \sim 2 \mu\text{M}$ ), mind pedig azok oldalához ( $K_d \sim 15 \mu\text{M}$ ). A monomér fragmentum kötését jellemző affinitásokat is figyelembe véve eredményeink alátámasztják az mDia1-FH2<sup>dimér</sup> hatását leíró modellünket.

#### IV. 2. 6. A formin aktin kölcsönhatás természete

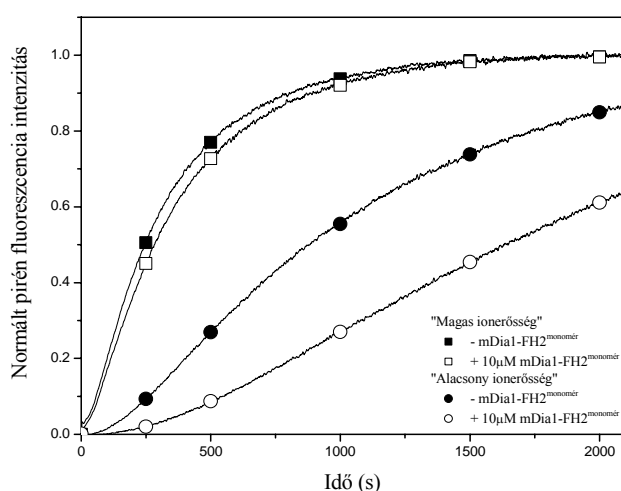
Az aktin monomerek filamentummá szerveződésének folyamatában fontos szerepe van az ionerősségnek. Az aktin monomerekben található egy nagy affinitású kationkötő hely, amely kétértékű kationok ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) megkötésére képes nM-os affinitással. Ezen kívül az aktin monomerek számos, közepes (0.1 – 10 mM) és kis affinitású (10 – 100 mM), mind egyértékű, mind pedig kétértékű kationok megkötésére képes kötőhellyel rendelkeznek [69]. Korábbi vizsgálatokból ismert, hogy ezeknek a kötőhelyeknek, illetve kationoknak fontos szerepe van az aktin polimerizációjában is [85]. Az ionok anyagi minőségének és koncentrációjának megváltozása során a kationt kötő helyek telítődhetnek. Ez az aktin monomerek aktivációját eredményezi, melynek során a monomerek egy konformációs állapotbeli változáson mennek keresztül [86, 87]. A szerkezeti változás eredményeképpen a monomerek egy, a filamentumot felépítő protomerek konformációjához hasonló állapotot vesznek fel.

A sejten belül az aktin monomerek spontán polimerizációját a magas koncentrációban jelen lévő szabad ionok biztosítják [69]. A fentebb tárgyalt munkánk során a polimerizáció indukálásához az *in vivo* körülmények között jellemző viszonyoknál kisebb ionkoncentrációt alkalmaztunk. Ugyanakkor megvizsgáltuk azt, is hogy módosul-e a forminoknak az aktin polimerizációs kinetikájára, illetve a filamentumok dinamikai tulajdonságaira kifejtett hatása abban az esetben, ha a fiziológiás körülményekhez közeli ionerősség biztosításával indítjuk el a polimerizáció folyamatát. A kísérleteinkben alkalmazott körülményre vonatkozó ionerősség értékeket a 10. egyenlet alapján számoltuk és a 10. táblázatban foglaltuk össze.

	<i>A polimerizáció folyamatát biztosító körülmények</i>	<i>[ionerősség] (mM)</i>
„alacsony”	10 mM KCl és 0.5 mM $\text{MgCl}_2$	20.8
„közepes”	50 mM KCl és 1 mM $\text{MgCl}_2$	62.1
„magas”	100 mM KCl és 2 mM $\text{MgCl}_2$	110.0

10. táblázat: A kísérletek során alkalmazott ionok koncentrációja és az annak megfelelő ionerősség.

A következő szakaszokban a „magas” ionerősség az az ionerősség, amely 100 mM KCl és 2 mM MgCl<sub>2</sub> jelenlétében alakul ki, míg az „alacsony” ionerősség 10 mM KCl és 0.5 mM MgCl<sub>2</sub> mellett áll be. Az alacsony, illetve a magas ionerősség (10. táblázat) mellett végzett polimerizációs kísérleteink eredményei szerint az aktin spontán polimerizációjának sebessége nagyobb volt magasabb ionerősség esetén (37. ábra), ami összhangban van a korábbi munkákban közölt eredményekkel [88]. Tobacman és munkatársai megmutatták, hogy mind a nukleáció, mind pedig az elongáció sebessége függ az ionerősségtől. MgCl<sub>2</sub> illetve KCl jelenlétében e folyamatok sebessége megnövekszik, együttes jelenlétükben pedig hatásuk additív módon érvényesül. Így, végeredményben a MgCl<sub>2</sub> és KCl koncentrációját növelve a polimerizáció folyamata is gyorsabb lesz.



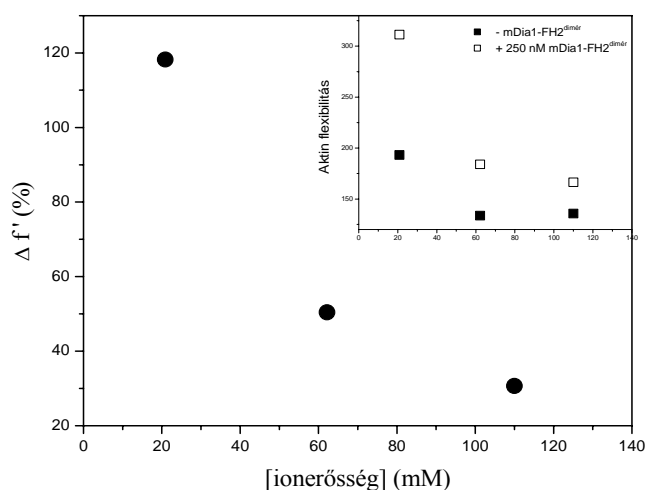
37. ábra: Az mDia1-FH2<sup>monomér</sup> fragmentumnak az aktin polimerizációjára kifejtett hatása különböző ionerősségek esetén (lásd: jelmagyarázat). A formint tartalmazó mintákban az mDia1-FH2<sup>monomér</sup> koncentrációja 10 μM volt.

A magas ionerősség mellett 10 μM mDia1-FH2<sup>monomér</sup> a polimerizáció folyamatát ~ 7 %-kal lassította. Nagyobb hatást tapasztaltunk alacsony ionerősség esetén, ahol 10 μM mDia1-FH2<sup>monomér</sup> jelenlétében a polimerizáció sebessége 35 %-kal volt lassabb a spontán aktin polimerizációs sebességnél (11. táblázat).

[ionerősség] (mM)	20.8	110.0	20.8	110.0
[mDia1-FH2 <sup>monomér</sup> ] ( $\mu$ M)	Elongációs sebesség ( $10^{-3} \cdot s^{-1}$ )		Relatív elongációs sebesség	
0	0.48 ( $\pm 0.003$ )	1.58 ( $\pm 0.01$ )	1	1
10	0.32 ( $\pm 0.01$ )	1.47 ( $\pm 0.01$ )	0.66	0.93

11. táblázat: Az mDia1-FH2<sup>monomér</sup> fragmentum hatásának függése az alkalmazott ionerősségtől. (A táblázatban a standard hibákat tüntettük fel.)

Annak érdekében, hogy a forminoknak az aktin filamentumok konformációjára kifejtett hatásának ionerősségfüggését leírjuk FRET kísérleteket végeztünk különböző ionerősségeket alkalmazva. Mind a formin nélküli, mind pedig a 250 nM mDia1-FH2<sup>dimér</sup> jelenlétében elvégzett méréseink eredményei azt mutatták, hogy az aktin filamentumok flexibilitásában bekövetkező változás ionerősségfüggő. A filamentumok flexibilitása (a 30 °C-on meghatározott relatív  $f'$  paraméter értéke) alacsony ionerősség esetén nagyobb volt, mint magasabb ionkoncentrációt alkalmazva (38. betét ábra, 12. táblázat).



38. ábra: A forminok hatására az aktin flexibilitásában bekövetkező változás függése az ionerősségtől. A  $\Delta f'$  a 250 nM mDia1-FH2<sup>dimér</sup> jelenlétében és formin nélkül 30 °C-on mért relatív  $f'$  paraméterek különbségét jelöli. A betét ábra a relatív  $f'$  paraméter értékének ionerősségfüggését mutatja 30 °C-on. Az aktin koncentrációja minden esetben 5  $\mu$ M volt.

<i>[ionerősség] (mM)</i>	20.8	62.1	110.0
<i>[mDia1-FH2<sup>dimér</sup>] (nM)</i>	<i>Aktin flexibilitás (relatív f ' 30 °C-on)</i>		
0	1.93	1.33	1.35
250	3.11	1.84	1.66

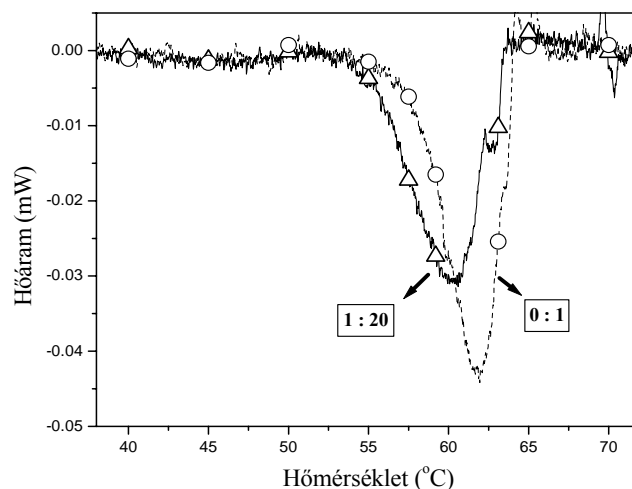
12. táblázat: Az aktin filamentumok flexibilitásának ionerősségfüggése mDia1-FH2<sup>dimér</sup> jelenlétében és nélküle.

Az mDia1-FH2<sup>dimér</sup> kötődésének hatására az aktin filamentumok flexibilitásában bekövetkező változás is ionerősségfüggést mutatott (38. ábra). A polimerizációs kísérletek eredményeihez hasonlóan alacsony ionerősség esetén nagyobb hatást figyeltünk meg, mint magas ionerősségen.

Összegezve elmondhatjuk, hogy a forminoknak mind az aktin filamentumok polimerizációjára, mind pedig azok konformációs tulajdonságaira kifejtett hatása kisebb volt magasabb ionerősség esetén. Ezek alapján a formin fragmentumok hatása fiziológias körülmények között valószínűleg kisebb, mint az általunk alkalmazott alacsony ionerősségű modell rendszerben. A IV. 2. 3. fejezetben leírtuk, hogy a forminoknak az aktin filamentumok oldalához való kötését jellemző affinitás magasabb ionerősségen gyengébb volt. Elképzeléseink szerint a magasabb ionerősségen megfigyelt kisebb hatást a forminok és az aktin között kialakuló kötés gyengülése eredményezi. Eredményeink alapján feltételezzük, hogy a formin-aktin kölcsönhatás kialakításában fontos szerepük lehet a két fehérje között kialakuló elektrosztatikus kölcsönhatásoknak is, és gyengébb kötés azért alakul ki magasabb ionerősségek mellett, mert az oldat hatása leárnyékolja a fehérje csoportok elektrosztatikus kölcsönhatásait. Ugyanakkor azoknak az ionerősségfüggő molekuláris mechanizmusoknak a megértéséhez, amelyek a forminoknak az aktin filamentumokra gyakorolt hatásában részt vesznek, további vizsgálatokra lesz szükség.

#### IV. 2. 7. Az mDia1-FH2<sup>dimér</sup> fragmentum hatása az aktin filamentumok termikus stabilitására

A spektroszkópai vizsgálatok mellett kalorimetriai módszerek alkalmazása is értékes információval szolgálhat az aktin filamentum és aktin-kötő fehérjék vagy peptidek kölcsönhatásait illetően. A korábbi munkák során bebizonyosodott, hogy az aktin filamentumok dinamikai tulajdonságai és termikus stabilitása között korreláció áll fenn [89, 90]. A kalorimetria módszerével vizsgáltuk azt, hogy a formin által kiváltott konformációs állapotbeli módosulások kapcsolatba hozhatóak-e az aktin filamentumok termikus jellemzőinek a megváltozásával. Kísérleteinket a 0 – 100 °C-os hőmérsékleti tartományban végeztük formin jelenléte nélkül, illetve az mDia1–FH2<sup>dimér</sup> fragmentum jelenlétében polimerizált aktin filamentumokon. A mérés során a visszahűtött minta ismételt felfűtésével igazoltuk, hogy a tapasztalt denaturációk irreverzibilisek voltak (az adatok nincsenek feltüntetve).



39. ábra: Az aktin filamentumok (60  $\mu\text{M}$ ) hődenaturációját leíró görbék formin jelenléte nélkül (üres körök) és 3  $\mu\text{M}$  mDia1–FH2<sup>dimér</sup> jelenlétében (üres háromszögek). A formin koncentrációja 1 : 20 formin : aktin moláris protomér aránynak felel meg.

A formint nem tartalmazó minták esetén az aktin filamentumok hődenaturációjához tartozó „melting” hőmérséklet ( $T_m$ ) 61.9 °C volt (39. ábra). Ez az eredmény jól egyezik az irodalomban fellelhető adatokkal [89, 91, 92]. A denaturációs csúcs maximumértéke mDia1–FH2<sup>dimér</sup> jelenlétében az alacsonyabb hőmérsékleti értékek felé ( $T_m = 60.4$  °C) tolódot el. A több mintán, azonos körülmények között elvégzett méréseink (n = 3) szerint ezek az értékek jól reprodukálhatóak voltak. Az denaturációs hőmérséklet csökkenése az mDia1–FH2<sup>dimér</sup> jelenlétében polimerizált aktin filamentumok kisebb hőstabilitását mutatja. A mérések során számított kalorimetrikus entalpia, entrópia, és Gibbs-féle szabadentalpia-változás is alacsonyabbnak bizonyult forminok jelenlétében (13. táblázat), utalva arra, hogy a kevésbé stabil filamentum szerkezet denaturációjához kisebb energia szükséges.

$[mDia1-FH2^{dimér}]$ ( $\mu M$ )	$T_m$ (°C)	$\Delta H$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S$ (kJ K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> )	$\Delta G$ (kJ K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> )
0	61.9	608	1.8	76
3	60.4	568	1.7	69

13. táblázat: Az aktin filamentumok hődenaturációját jellemző paraméterek az mDia1–FH2<sup>dimér</sup> fragmentum jelenlétében és nélküle.

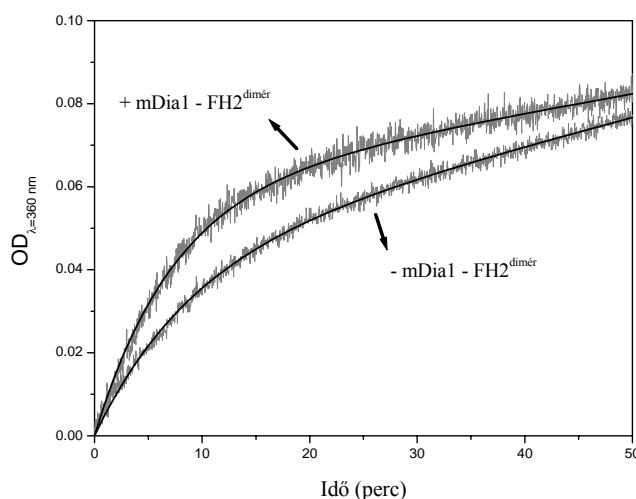
A DSC mérések - megerősítve ezzel a FRET mérések eredményeit - igazolták, hogy forminok hatására az aktin filamentumok termodinamikai stabilitása lecsökken.

#### IV. 2. 8. Az mDia1-FH2<sup>dimér</sup> fragmentum hatása a foszfát csoport disszociációjának sebességére

Az aktin filamentumok dinamikai tulajdonságai korrelálhatnak a protomérek által kötött ATP hidrolízisének folyamatával. Az aktin filamentumok szerkezetét stabilizáló phalloidinnal végzett kutatások eredményei szerint a phalloidin gátolja az aktin ATPáz enzim hatására képződő foszfát (P<sub>i</sub>) disszociációját [93].

Munkánk során a Webb által kidolgozott módszer segítségével vizsgáltuk, hogy forminok jelenlétében módosul-e a foszfát csoport aktin filamentumról való leválásának a sebessége [70].

Annak érdekében, hogy a mérés kezdete előtt ne menjen végbe az ATP hidrolízisét követően a foszfát csoport disszociációja, az aktin filamentumokat viszonylag nagy koncentrációban (100  $\mu\text{M}$ ), gyorsan polimerizáltuk. Ilyen körülmények között a formin nélküli minta esetén az aktin körülbelül 90 %-a a polimerizáció elindítását követő 2 percen belül, míg a formint is tartalmazó minták esetén 1 percen belül filamentális formában volt jelen (a pirénnel végzett kontroll kísérleteink eredményei alapján, az adatok nincsenek feltüntetve). Az abszorpció időbeli változása mind a forminmentes, mind pedig az mDia1–FH2<sup>dimér</sup> fragmentumot is tartalmazó minták esetén két fázisra volt osztható (40. ábra).

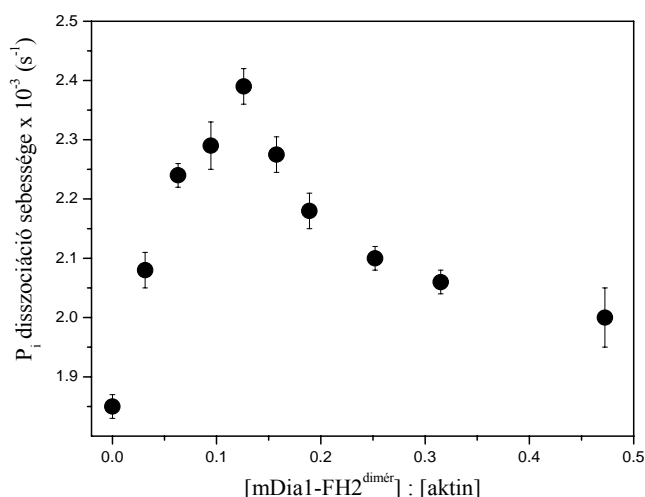


40. ábra: A 360 nm mért abszorpció időbeli változása a foszfát csoport aktin filamentumokról való disszociációja során, formin jelenlétében (1.55  $\mu\text{M}$ ) és nélküle. A folytonos vonalak az eredményekre illesztett görbék mutatják egy exponenciális és egy lineáris komponenst feltételezve.

A méréseink során alkalmazott stratégia eredményeképpen a keletkezett filamentumok több  $\text{P}_i$ -t kötöttek, mint ami a dinamikus egyensúlyban lévő filamentumokra jellemző. A görbék első szakaszában (az első 10 - 20 perc során) az abszorpció növekedésének kinetikája ennek a nagy mennyiségű szervesetlen foszfátnak a gyors leválását mutatta, míg a második szakasz a dinamikus egyensúlyra volt jellemző. Az abszorpciós görbék így egy, az első szakaszt leíró, exponenciális függvény és egy, a második fázisra jellemző, lineáris függvény összegével illesztettük.



Eredményeink szerint a lineáris szakasz meredeksége az mDia1–FH2<sup>dimér</sup> jelenlétében körülbelül fele akkora volt annak, amit a formin nélküli minta kiértékelése során kaptunk (az adatok nincsenek feltüntetve). Ez arra utal, hogy a dinamikus egyensúly állapotában a monomerek filamentumba épülése illetve a filamentumokról való leválása, azaz a „treadmilling” a forminok jelenlétében lassabban megy végbe, ami összhangban van azzal a megfigyeléssel, mely szerint az mDia1–FH2<sup>dimér</sup> a szöges végek sapkázásával lassítja e vég polimerizációs dinamikáját. Az exponenciális komponens amplitúdója a 0.05 – 0.07 nagyságrendbe esett, ami a kalibrációs görbe (lásd: *Anyagok és módszerek fejezet*) alapján 6 – 8  $\mu\text{M}$  inorganikus foszfátnak felel meg. Az exponenciális komponens illesztési paraméterei alapján a foszfát csoport disszociációját jellemző elsőrendű sebességi állandó aktin esetén  $1.85 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ -nak adódott. Ez az érték összhangban van a korábbi munkákban közölt eredményekkel ( $1.98 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  [94]). Az mDia1–FH2<sup>dimér</sup> jelenlétében a méréseink során meghatározott sebességi állandó értéke nagyobbak bizonyult, ami arra utal, hogy a forminok jelenlétében a foszfát csoport gyorsabban válik le az aktin filamentumokról, mint azok hiányában. A sebességi állandó a FRET mérések során meghatározott *flexibilitás* paraméteréhez hasonló formin koncentrációfüggést mutatott (41. ábra), amelyből arra következtethetünk, hogy szoros korreláció van az aktin filamentumok flexibilitása és a protomerek által kötött foszfát csoport leválásának sebessége között.

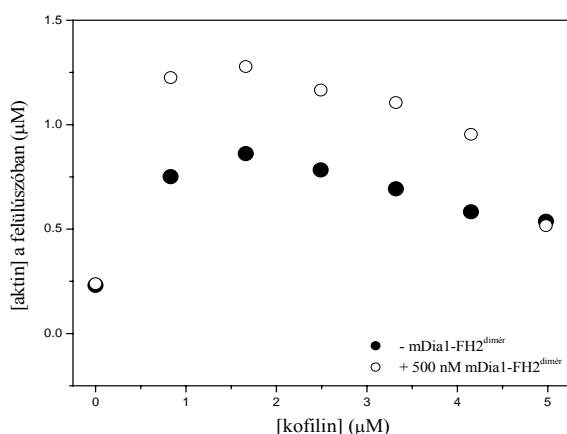


41. ábra: A foszfát csoport disszociációjának sebessége különböző formin : aktin moláris protomér arányok esetén. (Az ábrán a standard hibákat tüntettük fel.)

#### IV. 2. 9. Az mDia1-FH2<sup>dimér</sup> fragmentum hatása az aktin és a kofilin kölcsönhatására

Munkánk során vizsgáltuk azt is, hogy a forminok által az aktin filamentumok szerkezetében előidézett konformációs módosulások befolyásolják-e a más aktin-kötő fehérjékkel kialakított kölcsönhatásokat. A sejten belül az aktin filamentumok dinamikájának szabályozásában alapvető szerepet játszik az aktint depolimerizáló faktorok családjába tartozó kofilin fehérje. A kofilin egy kis molekulatömegű (15 – 18 kDa) fehérje, amely nagy affinitással ( $K_d < 1\mu\text{M}$ ) köt mind a monomér, mind pedig a filamentális formában jelen lévő aktinhoz [95]. A kofilin az aktin filamentumok depolimerizációját segíti elő, a filamentumok hegyes végének polimerizációs dinamikájára kifejtett hatásán keresztül.

Vizsgálataink során tanulmányoztuk, hogy megváltozik-e a kofilinnek az aktin filamentumok depolimerizációjára kifejtett hatása forminok jelenlétében. Abban az esetben, ha az mDia1-FH2<sup>dimér</sup> jelenlétében a kofilin által előidézett depolimerizáció mértéke nagyobb, a mintákban a monomér-filamentum egyensúly eltolódik úgy, hogy a monomérek koncentrációja megnő a formint nem tartalmazó mintákéhoz képest. Ezek alapján a kofilin hatásának vizsgálatára a koszedimentációs módszer adott lehetőséget. A poliakrilamid gélek analízise során a felülúszókban található aktin koncentrációját a 9. *egyenlet* alapján számoltuk, majd az eredményeket az alkalmazott kofilin koncentrációjának a függvényében ábrázoltuk (42. *ábra*).



42. *ábra*: A felülúszók aktintartalmának függése a kofilin koncentrációjától 500 nM mDia1-FH2<sup>dimér</sup> jelenlétében (üres körök) és nélküle (teli körök).

Az adatok azt mutatták, hogy a felülúszókban az aktin koncentrációja nagyobb volt az mDia1–FH2<sup>dimér</sup> fragmentum és a kofilin együttes jelenlétében, mint az mDia1–FH2<sup>dimér</sup>-t nem tartalmazó minták esetén. Ennek alapján megállapíthatjuk, hogy a kofilin hatékonyabban depolimerizálja a forminok által fellazított aktin filamentumokat.

Orlova és munkatársai korábbi munkájuk során feltételezték, hogy a polimerizációs folyamat egyes szakaszainak szabályozásában részt vevő aktin-kötő fehérjék hatása kapcsolatban lehet a protomérek változatos konformációs állapotaival, illetve a közöttük lévő kölcsönhatások módosulásával [96]. Elektronmikroszkópiai módszerekkel végzett kísérleteikben megmutatták, hogy az aktin filamentumok a polimerizáció kezdeti fázisában nem egységes konformációs állapotban vannak. A filamentumok konformációs heterogenitása csak a polimerizáció előrehaladtával szűnik meg. Munkájukban azt feltételezték, hogy az aktin depolimerizáló faktorok, így az ADF/kofilin hatásmechanizmusának része a filamentumok szerkezetében indukált változás, amelynek következtében azok egy kevésbé stabil konformációs állapotba kerülnek. Ez a szerkezetbeli módosulás azonban nem teljesen újszerű filamentumszerkezetet jelent, hanem egyet a polimerizáció korai szakaszában létező konformációs állapotok közül [96].

Eredményeink alapján, feltételezhetjük, hogy a kofilin a forminok jelenlétében keletkezett flexibilisebb és termodinamikailag kevésbé stabil filamentumokat nagyobb mértékben képes depolimerizálni. Ennek oka lehet az, hogy az aktivációs energia, ami a kofilin által meghatározott filamentumszerkezet kialakításához szükséges kisebb a forminok jelenlétében, mint nélkülük.

#### *IV. 3. Eredményeink biológiai jelentősége: egy lehetséges új mechanizmus az aktin citoskeleton szabályozásában*

Az élő sejtekben előforduló aktin struktúrákat morfológiájuk és a sejten belüli elhelyezkedésük alapján csoportosíthatjuk. Megkülönböztetünk aktin kötegeket, aktin foltokat, illetve kontraktilis gyűrűt. Az eltérő aktin képletek a sejt különböző életfunkcióiban játszanak szerepet. Bár ezen aktin struktúrák biológiai funkciója nem teljesen tisztázott, számos megfigyelés utal arra, hogy az egyes képleteket alkotó aktin filamentumok más és más fehérjékkel vannak kapcsolatban. Az élesztő sejtekkel végzett kísérletek során megállapították, hogy a forminok az aktin kötegek [97-100] és a kontraktilis gyűrű [37, 100] felépítésében részt vevő aktin filamentumok kialakításában vesznek részt. A forminokhoz hasonlóan lokalizálódik a tropomiozin is [101-104]. Ugyanakkor sem a forminok, sem a tropomiozin nem fordul elő az aktin foltokban. Ezzel szemben az aktin foltokban lokalizálódik a másik nukleációs faktor, az Arp2/3 komplex [105, 106], valamint a kofilin [107-109]. Sem az Arp2/3 komplex, sem a kofilin nem fordul elő az aktin kötegekben vagy a kontraktilis gyűrűben. Az, hogy milyen mechanizmusok állnak ennek az intracelluláris lokalizációnak a háttérében, még nem ismert.

Elképzeléseink szerint a különböző aktin képletek kialakításában részt vevő aktin filamentumok eltérő affinitást mutatnak az egyes aktin-kötő fehérjékhez való kötődésre. Az affinitások szabályozásában az aktin filamentumok konformációs tulajdonságai játszanak meghatározó szerepet. A munkánk eredményei alapján felállított hipotézis szerint a forminok kötődésük révén képesek megváltoztatni az aktin filamentumok konformációs állapotát. A forminok kötődésének hatására módosult konformációs állapotba került aktin filamentumoknak az egyes aktin-kötő fehérjékhez való affinitásuk megnő, más fehérjék kötésére mutatott affinitásuk lecsökken a módosítatlan filamentumok affinitásához képest. Ezen tulajdonságuk révén a forminok meghatározó szerepet játszhatnak az aktin és az aktin-kötő fehérjék között kialakuló szupramolekuláris kölcsönhatások szabályozásában.

A jelen munkánk során megalkotott hipotézis általános érvényű is lehet a citoskeletális fehérjekomplexek szabályozásában. A nukleációs faktorok sajátja, hogy az aktin-kötő fehérjék közül elsőként kerülnek kapcsolatba a keletkező filamentumokkal. A forminokkal végzett kísérleteink során tett megállapításainkat általánosítva elképzelhető, hogy a fehérje komplexek térbeli és időbeli kialakulásának szabályozásában meghatározó a nukleációs faktorok azon tulajdonsága, mely szerint az aktin filamentumokhoz való kötésük révén képesek módosítani azok konformációját. A szerkezeti módosulás háttérében a kötésük következtében létrejövő alloszterikus kölcsönhatások állhatnak. Így, bár egy nukleációs faktor az aktin filamentumok egy meghatározott pontjához köt (a filamentumok végéhez, illetve oldalához) mégis képes az egész filamentum konformációs állapotát megváltoztatni. Ennek révén az aktin filamentumok nem pusztán passzív szálak, hanem aktív résztvevőként - információ továbbítására alkalmas szabályozó csatornaként - vesznek részt a sejtek működése során végbemenő folyamatokban.

## V. Összefoglalás

Munkánk során megállapítottuk, hogy:

- Az mDia fehérjék monomér formájú központi FH2 doménje, az aktin filamentumok szöges végéhez kötődve lassítja a filamentumok polimerizációját.
- Az mDia1 központi FH2 doménjében létrehozott mutációk vizsgálata során tapasztalt funkcióvesztés alapján az általunk vizsgált központi FH2 domén mindkét vége szerepet játszik az aktin filamentumokkal való kölcsönhatás kialakításában.
- Az FH2 domén amino-terminálisán található flexibilis „linker” régiót is tartalmazó mDia fragmentumok az aktin polimerizációs folyamatát gyorsítják a nukleációs fázis elősegítése révén.
- A hatásbeli különbségek hátterében a fehérjék szerkezetében megfigyelhető eltérések állnak. A flexibilis „linker” régiót tartalmazó domének ugyanis képesek összekapcsolódásuk során diméreket alkotni. A dimerizáció, illetve a dimerizáció létrejöttében alapvető szerepet játszó „linker” régió szükséges a fehérje *in vivo* funkciójának a betöltéséhez.
- A dimér mDia1-FH2 fragmentum jelenlétében módosulnak az aktin filamentumok dinamikai tulajdonságai. A filamentumok szöges végéhez kapcsolódó dimérek alloszterikus kölcsönhatások révén azok szerkezetét fellazítják, míg a filamentumok oldalához kapcsolódó dimérek stabilizáló hatást fejtenek ki.
- A dimér fragmentum hatására flexibilisebb konformációs állapotba került aktin filamentumok funkcionális sajátságai is megváltoztak:
  - csökkent a filamentumok termodinamikai stabilitása,
  - megnőtt az aktin ATPáz enzimátikus hasítása során képződő foszfát filamentumokról való leválásának a sebessége,
  - valamint módosult a filamentumok kofilinnel való kölcsönhatása is.

## VI. Rövidítések jegyzéke

ATP: adenzin trifoszfát

ADP: adenzin difoszfát

P<sub>i</sub>: szervetlen foszfát

ADF: aktin depolimerizációs faktor

WH2: Wiskott-Aldrich szindróma fehérje homológia 2

SH3: : Src homológia 3

WW: A WW domén körülbelül 40 aminosavból álló, a természetben előforduló legkisebb fehérje modul. A WW a doménben található két triptofán aminosavra utal [45].

DTT: DL-Dithiothreitol

LB: Luria-Bertani tápoldat (10 g/l tripton, 5 g/l élesztőkivonat, 10 g/l NaCl)

IPTG: Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside

rpm: „revolution per minute”, a centrifuga percenkénti fordulatszáma

DTE: 1,4-Dithioerythritol

EDTA: Ethylenedinitrilotetraacetic acid

GST: glutathione S-transferase

GSH: glutathione

SDS: sodium dodecyl sulfát

IAEDANS: N-[[[(iodoacetyl)amino]ethyl]-5-naphthylamine-1-sulfonate

DMF: dimethylformamid

MEA: mercaptoethanol

IAF: 5-(iodoacetamido)fluorescein

FRET: fluoreszcencia rezonancia energia transzfer

g: nehézségi gyorsulás

aa.: „amino acid”, a fehérjerégió első és utolsó aminosavjának sorszáma mellett az aminosav elnevezésre utal

## **Az értekezés alapjául szolgáló közlemények**

Bugyi B., G. Papp, G. Hild, D. Lőrinczy, EM. Nevalainen, P. Lappalainen, B. Somogyi, M. Nyitrai: Formins regulate actin filament flexibility through long-range allosteric interactions. *Journal of Biological Chemistry*, **281.**, 10727-10736, 2006. IF: 6.355

Shimada A., M. Nyitrai , IR. Vetter, D. Kuhlmann, B. Bugyi, S. Narumiya, MA. Geeves, A. Wittinghofer: The core FH2 domain of diaphanous-related formins is an elongated actin binding protein that inhibits polymerization. *Molecular Cell*, **4.**, 511 – 522, 2004. IF: 16.811

## **Az értekezéshez kapcsolódó előadások**

Bugyi B., G. Papp, G. Hild, D. Lőrinczy, Z. Ujfalusi, Sz. Barkó, B. Somogyi and M. Nyitrai. Formins regulate actin filament flexibility through long-range allosteric interactions. 2006. június 15-17., EMBO/HHMI Central European Scientists Meeting, Dubrovnik, Horvátország.

Bugyi B., G. Papp, Z. Ujfalusi, Sz. Barkó, M. Nyitrai and B. Somogyi. Formin caps and cramps on actin filaments: A possible mechanism to regulate the formation of cytoskeletal protein complexes. 2005. szeptember 25-28., 8th International Symposium on Instrumental Analysis, Graz, Ausztria.

## **Az értekezéshez kapcsolódó poszterek**

Bugyi B., G. Papp, Z. Ujfalusi, G. Hild, M. Nyitrai: The FH2 domain of Diaphanous Related formin mDia1 affects the dynamic properties of actin filaments. Meeting of International Research Scholars. 2005. június 22-25., Mérida, Mexikó.

Bugyi B., Papp G., Barkó Sz., Ujfalusi Z., Nyitrai M.: A formin homológ 2 domén hatása az aktin filamentumok dinamikájára. Magyar Biofizikai Társaság XXII. Kongresszusa, 2005. június 26-29., Debrecen.



Bugyi B., Kelemen F., Barna I., Nyitrai M.: A formin homológ 2 domén hatása az aktin polimerizációjára. XXXIV. Membrán-Transzport Konferencia, 2004. június 1-4., Sümeg.

### **Az értekezésben nem szereplő közlemények**

Papp G.\*, Bugyi B.\*, Z. Ujfalusi, Sz. Barkó, G. Hild, B. Somogyi, M. Nyitrai: Conformational changes in actin filaments induced by formin binding to the barbed end. *Biophysical Journal*, 2006., *in press*. IF: 4.584

Bugyi B., G. Papp, Sz. Halasi, B. Visegrády: The effect of toxins on the thermal stability of actin filaments by differential scanning calorimetry. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, **Vol. 82.**, 275 – 279, 2005. IF: 1.478

Orbán J., Sz. Halasi, G. Papp, Sz. Barkó, B. Bugyi: Thermodynamic Characterisation of Different Actin Isoforms. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, **Vol. 82.**, 287 – 290, 2005. IF: 1.478

Papp G., B. Bugyi, Z. Ujfalusi., Sz. Halasi, J. Orbán: The Effect of pH on the Thermal Stability of Alpha-Actin Isoforms. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, **Vol. 82.**, 281 – 285, 2005. IF: 1.478

Halasi, Sz., G. Papp, B. Bugyi, Sz. Barkó, J. Orbán, Z. Ujfalusi and B. Visegrády. The Effect of Pyrene Labelling on the Thermal Stability of Actin Filaments. *Thermochim. Acta*, 2005, *in press*. IF: 1.161

**A cikkek összesített impakt faktora: 33.345**

\*: közös első szerzők

## Irodalomjegyzék

1. Kabsch, W., et al., *Atomic structure of the actin:DNase I complex*. Nature, 1990. **347**(6288): p. 37-44.
2. Graceffa, P. and R. Dominguez, *Crystal structure of monomeric actin in the ATP state. Structural basis of nucleotide-dependent actin dynamics*. J Biol Chem, 2003. **278**(36): p. 34172-80.
3. Moore, P.B., H.E. Huxley, and D.J. DeRosier, *Three-dimensional reconstruction of F-actin, thin filaments and decorated thin filaments*. Journal of Molecular Biology, 1970. **50**(2): p. 279-288.
4. Pollard, T.D. and J.A. Cooper, *Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions*. Annu Rev Biochem, 1986. **55**: p. 987-1035.
5. Blanchoin, L. and T.D. Pollard, *Hydrolysis of ATP by polymerized actin depends on the bound divalent cation but not profilin*. Biochemistry, 2002. **41**(2): p. 597-602.
6. Pollard, T.D., L. Blanchoin, and R.D. Mullins, *Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 2000. **29**: p. 545-76.
7. Pollard, T.D. and A.G. Weeds, *The rate constant for ATP hydrolysis by polymerized actin*. FEBS Lett, 1984. **170**(1): p. 94-8.
8. Pollard, T.D. and G.G. Borisy, *Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments*. Cell, 2003. **112**(4): p. 453-65.
9. Machesky, L.M., et al., *Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from Acanthamoeba by affinity chromatography on profilin-agarose*. J Cell Biol, 1994. **127**(1): p. 107-15.
10. Higgs, H.N. and T.D. Pollard, *Regulation of actin filament network formation through ARP2/3 complex: activation by a diverse array of proteins*. Annu Rev Biochem, 2001. **70**: p. 649-76.
11. Baum, B. and P. Kunda, *Actin nucleation: spire - actin nucleator in a class of its own*. Curr Biol, 2005. **15**(8): p. R305-8.
12. Quinlan, M.E., et al., *Drosophila Spire is an actin nucleation factor*. Nature, 2005. **433**(7024): p. 382-8.
13. Woychik, R.P., et al., *'Formins': proteins deduced from the alternative transcripts of the limb deformity gene*. Nature, 1990. **346**(6287): p. 850-3.
14. Woychik, R.P., et al., *An inherited limb deformity created by insertional mutagenesis in a transgenic mouse*. Nature, 1985. **318**(6041): p. 36-40.
15. Mass, R.L., et al., *Disruption of formin-encoding transcripts in two mutant limb deformity alleles*. Nature, 1990. **346**(6287): p. 853-5.
16. Castrillon, D.H. and S.A. Wasserman, *Diaphanous is required for cytokinesis in Drosophila and shares domains of similarity with the products of the limb deformity gene*. Development, 1994. **120**(12): p. 3367-77.
17. Lynch, E.D., et al., *Nonsyndromic deafness DFNA1 associated with mutation of a human homolog of the Drosophila gene diaphanous*. Science, 1997. **278**(5341): p. 1315-8.
18. Afshar, K., B. Stuart, and S.A. Wasserman, *Functional analysis of the Drosophila diaphanous FH protein in early embryonic development*. Development, 2000. **127**(9): p. 1887-97.

19. Feierbach, B. and F. Chang, *Roles of the fission yeast formin for3p in cell polarity, actin cable formation and symmetric cell division*. *Curr Biol*, 2001. **11**(21): p. 1656-65.
20. Ingouff, M., et al., *Plant formin AtFH5 is an evolutionarily conserved actin nucleator involved in cytokinesis*. *Nat Cell Biol*, 2005.
21. Kato, T., et al., *Localization of a mammalian homolog of diaphanous, mDia1, to the mitotic spindle in HeLa cells*. *J Cell Sci*, 2001. **114**(Pt 4): p. 775-84.
22. Schirenbeck, A., et al., *The Diaphanous-related formin dDia2 is required for the formation and maintenance of filopodia*. *Nat Cell Biol*, 2005. **7**(6): p. 619-25.
23. Sagot, I., S.K. Klee, and D. Pellman, *Yeast formins regulate cell polarity by controlling the assembly of actin cables*. *Nat Cell Biol*, 2002. **4**(1): p. 42-50.
24. Wedlich-Soldner, R. and R. Li, *Closing the loops: new insights into the role and regulation of actin during cell polarization*. *Exp Cell Res*, 2004. **301**(1): p. 8-15.
25. Zigmond, S., *Formin' adherens junctions*. *Nat Cell Biol*, 2004. **6**(1): p. 12-4.
26. Bershadsky, A., *Magic touch: how does cell-cell adhesion trigger actin assembly?* *Trends Cell Biol*, 2004. **14**(11): p. 589-93.
27. Kobiela, A., H.A. Pasolli, and E. Fuchs, *Mammalian formin-1 participates in adherens junctions and polymerization of linear actin cables*. *Nat Cell Biol*, 2004. **6**(1): p. 21-30.
28. Koka, S., et al., *The formin-homology-domain-containing protein FHOD1 enhances cell migration*. *J Cell Sci*, 2003. **116**(Pt 9): p. 1745-55.
29. Gasman, S., Y. Kalaidzidis, and M. Zerial, *RhoD regulates endosome dynamics through Diaphanous-related Formin and Src tyrosine kinase*. *Nat Cell Biol*, 2003. **5**(3): p. 195-204.
30. Copeland, J.W. and R. Treisman, *The diaphanous-related formin mDia1 controls serum response factor activity through its effects on actin polymerization*. *Mol Biol Cell*, 2002. **13**(11): p. 4088-99.
31. 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.
32. Xu, Y., et al., *Crystal structures of a Formin Homology-2 domain reveal a tethered dimer architecture*. *Cell*, 2004. **116**(5): p. 711-23.
33. Otomo, T., et al., *Structural basis of actin filament nucleation and processive capping by a formin homology 2 domain*. *Nature*, 2005. **433**(7025): p. 488-94.
34. Rose, R., et al., *Structural and mechanistic insights into the interaction between Rho and mammalian Dia*. *Nature*, 2005. **435**(7041): p. 513-8.
35. Bedford, M.T., D.C. Chan, and P. Leder, *FBP WW domains and the Abl SH3 domain bind to a specific class of proline-rich ligands*. *Embo J*, 1997. **16**(9): p. 2376-83.
36. Fujiwara, T., et al., *Rho small G-protein-dependent binding of mDia to an Src homology 3 domain-containing IRSp53/BAIAP2*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. **271**(3): p. 626-9.
37. Kamei, T., et al., *Interaction of Bnr1p with a novel Src homology 3 domain-containing Hof1p. Implication in cytokinesis in Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(43): p. 28341-5.
38. Tominaga, T., et al., *Diaphanous-related formins bridge Rho GTPase and Src tyrosine kinase signaling*. *Mol. Cell*, 2000. **5**(1): p. 13-25.

39. Evangelista, M., et al., *Bni1p, a yeast formin linking cdc42p and the actin cytoskeleton during polarized morphogenesis*. *Science*, 1997. **276**(5309): p. 118-22.
40. Chang, F., D. Drubin, and P. Nurse, *cdc12p, a protein required for cytokinesis in fission yeast, is a component of the cell division ring and interacts with profilin*. *J. Cell Biol.*, 1997. **137**(1): p. 169-82.
41. Watanabe, N., et al., *p140mDia, a mammalian homolog of Drosophila diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin*. *EMBO J.*, 1997. **16**(11): p. 3044-56.
42. Satoh, S. and T. Tominaga, *mDia-interacting protein acts downstream of Rho-mDia and modifies Src activation and stress fiber formation*. *J. Biol. Chem.*, 2001. **276**(42): p. 39290-4.
43. Petersen, J., et al., *FH3, a domain found in formins, targets the fission yeast formin Fus1 to the projection tip during conjugation*. *J Cell Biol*, 1998. **141**(5): p. 1217-28.
44. Higgs, H.N. and K.J. Peterson, *Phylogenetic analysis of the formin homology 2 domain*. *Mol Biol Cell*, 2005. **16**(1): p. 1-13.
45. Macias, M.J., S. Wiesner, and M. Sudol, *WW and SH3 domains, two different scaffolds to recognize proline-rich ligands*. *FEBS Lett*, 2002. **513**(1): p. 30-7.
46. Faix, J. and R. Grosse, *Staying in Shape with Formins*. *Developmental Cell*, 2006. **10**(6): p. 693.
47. Evangelista, M., et al., *Formins direct Arp2/3-independent actin filament assembly to polarize cell growth in yeast*. *Nat Cell Biol*, 2002. **4**(1): p. 32-41.
48. 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.
49. Pring, M., et al., *Mechanism of formin-induced nucleation of actin filaments*. *Biochemistry*, 2003. **42**(2): p. 486-96.
50. Moseley, J.B., et al., *A conserved mechanism for Bni1- and mDia1-induced actin assembly and dual regulation of Bni1 by Bud6 and profilin*. *Mol Biol Cell*, 2004. **15**(2): p. 896-907.
51. Pruyne, D., et al., *Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association*. *Science*, 2002. **297**(5581): p. 612-5.
52. Higgs, H.N., *Formin proteins: a domain-based approach*. *Trends Biochem Sci*, 2005. **30**(6): p. 342-53.
53. Kovar, D.R., et al., *Control of the assembly of ATP- and ADP-actin by formins and profilin*. *Cell*, 2006. **124**(2): p. 423-35.
54. Higashida, C., et al., *Actin polymerization-driven molecular movement of mDia1 in living cells*. *Science*, 2004. **303**(5666): p. 2007-10.
55. Feuer, G., et al., *Studies on the composition and polymerisation of actin*. *Hung. Acta Physiol.*, 1948. **1**: p. 150-163.
56. 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.
57. Strzelecka-Golaszewska, H., Moraczewska, J., Khaitline, S. Y., Mossakowska, M., *Localization of the tightly bound divalent-cation-dependent and nucleotide-dependent conformation changes in G-actin using limited proteolytic digestion*. *Eur J Biochem*, 1993. **211**: p. 731-742.

58. Houk, T.W. and K. Ue, *The measurement of actin concentration in solution: a comparison of methods*. Anal. Biochem., 1974. **62**(1): p. 66-74.
59. Hudson, E.N., Weber, G., *Synthesis and characterization of two fluorescent sulfhydryl reagents*. Biochemistry., 1973. **12**(21): p. 4154-61.
60. Hild, G., M. Nyitrai, and B. Somogyi, *Intermonomer flexibility of Ca- and Mg-actin filaments at different pH values*. Eur J Biochem, 2002. **269**(3): p. 842-9.
61. Cooper, J.A., S.B. Walker, and T.D. Pollard, *Pyrene actin: documentation of the validity of a sensitive assay for actin polymerization*. J Muscle Res Cell Motil, 1983. **4**(2): p. 253-62.
62. Elzinga, M., et al., *Complete amino-acid sequence of actin of rabbit skeletal muscle*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1973. **70**(9): p. 2687-91.
63. Pace, C.N., et al., *How To Measure And Predict The Molar Absorption-Coefficient Of A Protein*. Protein Science, 1995. **4**(11): p. 2411-2423.
64. Lakowicz, J.R., *Principles of fluorescence spectroscopy*. 1983, New York: Plenum Press.
65. Somogyi, B., et al., *Förster-type energy transfer as a probe for changes in local fluctuations of the protein matrix*. Biochemistry, 1984. **23**: p. 3403-3411.
66. Somogyi, B., et al., *Protein flexibility as revealed by fluorescence resonance energy transfer: an extension of the method for systems with multiple labels*. J. Photochem. Photobiol. B, 2000. **59**(1-3): p. 26-32.
67. Nyitrai, M., A.G. Szent-Gyorgyi, and M.A. Geeves, *Interactions of the two heads of scallop (*Argopecten irradians*) heavy meromyosin with actin: influence of calcium and nucleotides*. Biochem J, 2003. **370**(Pt 3): p. 839-48.
68. 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.
69. Sheterline, P., J. Clayton, and J. Sparrow, *Actin*. Protein Profile, 1995. **2**(1): p. 1-103.
70. Webb, M.R., *A continuous spectrophotometric assay for inorganic phosphate and for measuring phosphate release kinetics in biological systems*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(11): p. 4884-7.
71. Carrier, M.F., *Measurement of Pi dissociation from actin filaments following ATP hydrolysis using a linked enzyme assay*. Biochem Biophys Res Commun, 1987. **143**(3): p. 1069-75.
72. Wear, M.A., et al., *How capping protein binds the barbed end of the actin filament*. Curr Biol, 2003. **13**(17): p. 1531-7.
73. 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.
74. Pollard, T.D., *Rate constants for the reactions of ATP- and ADP-actin with the ends of actin filaments*. J Cell Biol, 1986. **103**(6 Pt 2): p. 2747-54.
75. 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.
76. Nyitrai, M., et al., *The flexibility of actin filaments as revealed by fluorescence resonance energy transfer. The influence of divalent cations*. J Biol Chem, 1999. **274**(19): p. 12996-3001.

77. Nyitrai, M., et al., *Conformational and dynamic differences between actin filaments polymerized from ATP- or ADP-actin monomers*. J Biol Chem, 2000. **275**(52): p. 41143-9.
78. Nyitrai, M., et al., *Effect of Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup> exchange on the flexibility and/or conformation of the small domain in monomeric actin*. Biophys J, 1998. **74**(5): p. 2474-81.
79. Nyitrai, M., et al., *Conformational distributions and proximity relationships in the rigor complex of actin and myosin subfragment-1*. J Biol Chem, 2000. **275**(4): p. 2404-9.
80. Nyitrai, M., et al., *Flexibility of myosin-subfragment-1 in its complex with actin as revealed by fluorescence resonance energy transfer*. Eur J Biochem, 2000. **267**(14): p. 4334-8.
81. Bodis, E., et al., *Dynamic reorganization of the motor domain of myosin subfragment 1 in different nucleotide states*. Eur J Biochem, 2003. **270**(24): p. 4835-45.
82. Li, F. and H.N. Higgs, *The mouse Formin mDial is a potent actin nucleation factor regulated by autoinhibition*. Curr. Biol., 2003. **13**(15): p. 1335-40.
83. 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.
84. Orlova, A., E. Prochniewicz, and E.H. Egelman, *Structural dynamics of F-actin: II. Cooperativity in structural transitions*. J Mol Biol, 1995. **245**(5): p. 598-607.
85. Selden, L.A., J.E. Estes, and L.C. Gershman, *High affinity divalent cation binding to actin. Effect of low affinity salt binding*. J Biol Chem, 1989. **264**(16): p. 9271-7.
86. Cooper, J.A., et al., *Kinetic evidence for a monomer activation step in actin polymerization*. Biochemistry, 1983. **22**(9): p. 2193-202.
87. Carlier, M.F., *Actin: protein structure and filament dynamics*. J Biol Chem, 1991. **266**(1): p. 1-4.
88. Tobacman, L.S. and E.D. Korn, *The kinetics of actin nucleation and polymerization*. J Biol Chem, 1983. **258**(5): p. 3207-14.
89. Visegrady, B., et al., *The effect of phalloidin and jasplakinolide on the flexibility and thermal stability of actin filaments*. FEBS Lett, 2004. **565**(1-3): p. 163-6.
90. Visegrady, B., et al., *A simple model for the cooperative stabilisation of actin filaments by phalloidin and jasplakinolide*. FEBS Lett, 2005. **579**(1): p. 6-10.
91. Bombardier, H., P. Wong, and C. Gicquaud, *Effects of nucleotides on the denaturation of F actin: a differential scanning calorimetry and FTIR spectroscopy study*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **236**(3): p. 798-803.
92. Le Bihan, T. and C. Gicquaud, *Stabilization of actin by phalloidin: a differential scanning calorimetric study*. Biochem Biophys Res Commun, 1991. **181**(2): p. 542-7.
93. Dancker, P. and L. Hess, *Phalloidin reduces the release of inorganic phosphate during actin polymerization*. Biochim Biophys Acta, 1990. **1035**(2): p. 197-200.
94. Melki, R., S. Fievez, and M.F. Carlier, *Continuous monitoring of Pi release following nucleotide hydrolysis in actin or tubulin assembly using 2-amino-6-mercapto-7-methylpurine ribonucleoside and purine-nucleoside phosphorylase as an enzyme-linked assay*. Biochemistry, 1996. **35**(37): p. 12038-45.

95. Carlier, M.F., et al., *Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility*. J Cell Biol, 1997. **136**(6): p. 1307-22.
96. Orlova, A., et al., *Actin-destabilizing factors disrupt filaments by means of a time reversal of polymerization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(51): p. 17664-8.
97. Zahner, J.E., H.A. Harkins, and J.R. Pringle, *Genetic analysis of the bipolar pattern of bud site selection in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(4): p. 1857-70.
98. Jansen, R.P., et al., *Mother cell-specific HO expression in budding yeast depends on the unconventional myosin myo4p and other cytoplasmic proteins*. Cell, 1996. **84**(5): p. 687-97.
99. Evangelista, M., et al., *Bni1p, a yeast formin linking cdc42p and the actin cytoskeleton during polarized morphogenesis*. Science, 1997. **276**(5309): p. 118-22.
100. Imamura, H., et al., *Bni1p and Bnr1p: downstream targets of the Rho family small G-proteins which interact with profilin and regulate actin cytoskeleton in Saccharomyces cerevisiae*. Embo J, 1997. **16**(10): p. 2745-55.
101. Drees, B., et al., *Tropomyosin is essential in yeast, yet the TPM1 and TPM2 products perform distinct functions*. J Cell Biol, 1995. **128**(3): p. 383-92.
102. Pruyne, D.W., D.H. Schott, and A. Bretscher, *Tropomyosin-containing actin cables direct the Myo2p-dependent polarized delivery of secretory vesicles in budding yeast*. J Cell Biol, 1998. **143**(7): p. 1931-45.
103. Liu, H.P. and A. Bretscher, *Disruption of the single tropomyosin gene in yeast results in the disappearance of actin cables from the cytoskeleton*. Cell, 1989. **57**(2): p. 233-42.
104. Lippincott, J. and R. Li, *Sequential assembly of myosin II, an IQGAP-like protein, and filamentous actin to a ring structure involved in budding yeast cytokinesis*. J Cell Biol, 1998. **140**(2): p. 355-66.
105. Winter, D., T. Lechler, and R. Li, *Activation of the yeast Arp2/3 complex by Bee1p, a WASP-family protein*. Curr Biol, 1999. **9**(9): p. 501-4.
106. Moreau, V., et al., *The Saccharomyces cerevisiae actin-related protein Arp2 is involved in the actin cytoskeleton*. J Cell Biol, 1996. **134**(1): p. 117-32.
107. Moon, A.L., et al., *Cofilin is an essential component of the yeast cortical cytoskeleton*. J Cell Biol, 1993. **120**(2): p. 421-35.
108. Lappalainen, P. and D.G. Drubin, *Cofilin promotes rapid actin filament turnover in vivo*. Nature, 1997. **388**(6637): p. 78-82.
109. Iida, K. and I. Yahara, *Cooperation of two actin-binding proteins, cofilin and Aip1, in Saccharomyces cerevisiae*. Genes Cells, 1999. **4**(1): p. 21-32.