Ph.D. ÉRTEKEZÉS

# A SZARKOMERIKUS FILAMENTUM-RENDSZEREK ÖSSZESZERVEZŐDÉSÉÉRT FELELŐS MECHANIZMUSOK VIZSGÁLATA

Huber Tamás



Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Biofizikai Intézet 2015 Program: Interdiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola Iskolavezető: Prof. Dr. Sümegi Balázs Alprogram (B-130): Funkcionális fehérjedinamika vizsgálata biofizikai módszerekkel Programvezető: Prof. Dr. Nyitrai Miklós Témavezetők: Prof. Dr. Kellermayer Miklós S. Z. és Dr. Grama László

# TARTALOMJEGYZÉK

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	3
ELŐSZÓ	4
RÖVIDÍTÉSEK ÉS SZIMBÓLUMOK JEGYZÉKE	5
1. BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS	7
1.1. A titin és a formin fehérjék kutatásának történeti háttere	7
1.2. A titin és a forminok szarkomerikus elhelyezkedése	9
1.3. A titin és a DAAM formin szerkezete	
1.4. A titin gén szövetspecifikus kifejeződése	17
1.5. A titin és a DAAM formin C-terminálisának funkciója	18
1.6. A titinmolekula rugalmassága	
2. CÉLKITŰZÉSEK	
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	25
3.1. A kísérletekhez használt peptidek és fehérjék előállítása	
3.1.1. PEVK peptidek	
3.1.2. Humán vázizom PPAK fragmentumok előállítása	
3.1.3. DAAM konstrukciók megtermeltetése és tisztítása	
3.1.4. Az aktin preparálása	
3.2. Abszorpciós fotometria	29
3.3. Az aktin fluoreszcens jelölése	
3.4. Fluoreszcencia spektroszkópiai vizsgálatok	29
3.4.1. Az aktin polimerizációjának követése és sebességének meghatároza	ása 29
3.4.2. PEVK peptidek steady-state fluoreszcencia spektroszkópiai mérése	i 31
3.4.3. PEVK peptidek időfüggő fluoreszcencia spektroszkópiai mérései	
3.4.4. DAAM formin fragmentumok steady-state fluoreszcencia ani	zotrópia
vizsgálatai	

3.5. Mikroszkópos vizsgálatok
3.5.1. Teljes belső visszaverődésen alapuló fluoreszcencia mikroszkópia34
3.5.2. A PPAK fragmentum atomerő-mikroszkópos megnyújtása
3.6. Polimer-modell számítások
3.7. Molekuláris dinamikai szimulációk
4. EREDMÉNYEK
4.1. PEVK peptidek spektrális tulajdonságai
4.2. PEVK peptidek látszólagos perzisztenciahossza41
4.3. Kémiai denaturáció hatása PEVK peptidekre41
4.4. PEVK peptideken végzett fluoreszcencia élettartam mérések
4.5. Ionerő hatása a PEVK peptidek konformációjára45
4.6. Hőmérséklet hatása a PEVK peptidek konformációs dinamikájára 47
4.7. PEVK peptidek molekuláris dinamikai szimulációja49
4.8. A PPAK fragmentum molekuláris mechanikája51
4.9. A CDAAM az FH1-FH2 konstrukcióval összehasonlítva nagyobb mértékben
gyorsítja az aktin polimerizációját52
4.10. A CDAAM és FH1-FH2 konstrukciók hatásainak vizsgálata az aktin
polimerizációjának egyes szakaszaira54
4.11. A DAD, illetve DAD+C konstrukciók kötnek az aktin monomerhez56
5. MEGBESZÉLÉS
6. ÖSSZEFOGLALÁS
HIVATKOZOTT IRODALOM
ÁBRÁK ÉS TÁRI ÁZATOK JEGVZÉKE 82
ADRAK ES TADLAZATOK JEUTZERE
PUBLIKÁCIÓK LISTÁJA
Az értekezés alapjául szolgáló közlemény
Az értekezéshez nem kapcsolódó közlemények
Az értekezéshez kapcsolódó konferencia poszterek és előadások

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőimnek, Professzor Dr. Kellermayer Miklósnak és Dr. Grama Lászlónak Ph.D. munkám során nyújtott kiváló szakmai irányításukért, türelmükért és baráti támogatásukért.

Köszönettel tartozom Professzor Dr. Nyitrai Miklósnak, hogy doktori programvezetőként intézetében lehetőséget adott kutatómunkám elvégzéséhez.

Külön köszönöm Dr. Bugyi Beátának, hogy befogadott munkacsoportjába és irányításával elkészíthettem értekezésem forminokról szóló részét, továbbá hogy mindenben támogat közös munkánk során.

Köszönöm Dr. Lukács Andrásnak, hogy értékes tanácsaival segített a spektroszkópiai méréseknél.

Köszönöm a Biofizikai Intézet minden munkatársának segítségét és hasznos észrevételét.

Végezetül szeretném hálásan megköszönni feleségemnek és szüleimnek, hogy mindvégig türelmesen támogattak és bátorítottak doktori kutatásaim során.

A kutatás a TÁMOP-4.2.4.A/2-11/1-2012-0001 azonosító számú Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése konvergencia program című kiemelt projekt keretében zajlott. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.

## ELŐSZÓ

# Szarkomerikus fehérjék vizsgálata a Pécsi Tudományegyetem Biofizikai Intézetében

A doktori iskolában végzett tanulmányaim során a Biofizikai Intézet két munkacsoportjában is volt alkalmam dolgozni. Kutatásaim mindkét fázisában szarkomerikus fehérjéket vizsgáltam. A két kutatócsoport sok ponton azonos, máshol viszont teljesen különböző metodikai eszköztárat alkalmaz a megismerni kívánt biológiai rendszerek vizsgálatára. Értekezésemben célul tűztem ki a vizsgált fehérjék bemutatását, a munkafolyamatok hátterének leírását, illetve kutatásom elért eredményeinek összefoglalását.

Prof. Dr. Kellermayer Miklós és Dr. Grama László témavezetésével végzett munkám során a titin fehérje PEVK régiójának szerkezetét és rugalmasságát vizsgáltuk fluoreszcencia spektroszkópiai, nanomechanikai és molekuláris dinamikai szimulációs módszerekkel.

Dr. Bugyi Beáta irányításával a Jedlik Ányos Doktorjelölti Ösztöndíj a Konvergencia Régiókban pályázat keretében a DAAM formin fehérje karboxiterminális régiójának aktin kötésben betöltött szerepét vizsgáltuk fluoreszcencia spektroszkópiai és mikroszkópiai módszerekkel.

# RÖVIDÍTÉSEK ÉS SZIMBÓLUMOK JEGYZÉKE

AFM	atomerő-mikroszkóp ("Atomic Force Microscope"),
ATP	adenozin-5'-trifoszfát,
cDNS	komplementer (RNS-ről másolt) dezoxiribonukleinsav,
DAAM	forminfehérje, ("Dishevelled Associated Activator of Morphogenesis"),
DTT	ditiothreitol,
E. coli	Escherichia coli,
EGTA	etilénglikol-bisz-(β-aminoetil-éter)-N,N,N',N'-tetraacetát,
FNIII	fibronektin III típusú titin domén,
FRET	fluoreszcencia rezonancia energia transzfer,
GSH	glutation (γ-glutamil-ciszteinil-glicin), redukált forma,
GST	glutation-S-transzferáz,
GuHCl	guanidin-hidroklorid,
HPLC	nagynyomású folyadékkromatográfia ("high pressure liquid chromatography"),
I732A	a DAAM FH2 doménjében létrehozott pontmutáció (a 732-ik aminosavként szereplő izoleucin cseréje alaninra),
IAEDANS	5-((((-2-iodoacetil)amino)etil)naftilamin)-1-szulfonát,
Ig	immunglobulin típusú titin domén,
IPTG	izopropil β-D-1-tiogalakto-piranozid,
mRNS	hírvivő ("messenger") ribonukleinsav,
NCBI	National Center for Biotechnology Information,
pCa	a Ca <sup>2+</sup> - koncentráció tízes alapú negatív logaritmusa,
PEVK	a titin prolinban (P), glutaminsavban (E), valinban (V) és lizinben (K) gazdag doménje,
PDB	Protein Data Bank,
PPAK	a PEVK domén prolin (P), alanin (A) és lizin (K) motívumismétlődése,
SD	szórás (standard deviáció),
SPC	explicit víz modell ("Single Point Charge"),
TCSPC	időkorrelált egy-foton számlálás ("Time-Correlated Single Photon Counting"),
t.e.	tetszőleges egység,
TIRFM	teljes belső visszaverődésen alapuló fluoreszcencia mikroszkópia ("Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy"),
WLC	"féregszerű lánc" modell ("Wormlike Chain model"),

$lpha_i$	a triptofán egyes élettartam komponenseinek amplitúdója,
Ε	FRET hatásfok,
$\mathcal{E}_{\lambda}$	adott hullámhosszhoz tartozó extinkciós koefficiens,
сс	kritikus koncentráció,
F	megnyújtási erő,
f'	a donor és akceptor közötti fehérjemátrix rugalmasságát jellemző paraméter,
$F_D$	a donor fluoreszcencia intenzitása akceptor nélkül,
$F_{DA}$	a donor fluoreszcencia intenzitása az akceptor jelenlétében,
$F_{korr}$	korrigált fluoreszcencia intenzitás,
$F_{m\acute{e}rt}$	mért fluoreszcencia intenzitás,
Κ	disszociációs egyensúlyi állandó,
К	rugóállandó,
$k_+$	asszociációs sebességi állandó,
k <sub>B</sub>	Boltzmann-állandó (k = $1,38 \times 10^{-23}$ J/K),
λ	hullámhossz,
Laa	egy aminosav átlagos hossza,
$L_c$	kontúrhossz: a teljesen kinyújtott polimer hossza,
LIAEDANS	az akceptor molekula mérete,
$L_p$	perzisztenciahossz: egy polimer hajlítómerevségét jellemző hosszúság,
N <sub>aa</sub>	aminosavak száma,
OD	optikai denzitás,
r	steady-state fluoreszcencia anizotrópia,
$I_{VV}$	a vertikálisan polarizált fénnyel gerjesztett fluorofór emissziójának vertikálisan polarizált intenzitása,
$I_{VH}$	a vertikálisan polarizált fénnyel gerjesztett fluorofór emissziójának horizontálisan polarizált intenzitása,
R	a polimerlánc vég-vég távolsága,
$R_0$	Förster-féle kritikus távolság,
$R^2$	a polimerlánc átlagos négyzetes vég-vég távolsága,
τ	fluoreszcencia átlagélettartam,
v	az aktin filamentum növekedési sebessége.

## 1. BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A harántcsíkolt izom szerkezeti és működési egysége a szarkomer. A szarkomer egy rendkívül szabályos, félkristályos szerkezetű fehérjekomplex, melyben az aktin és miozin filamentumok közötti ATP-függő kölcsönhatás vezet az izomösszehúzódáshoz. Bár a szarkomer aktív összehúzódásának molekuláris mechanizmusairól sokat tudunk, máig nem pontosan ismert, hogy ez a lenyűgözően rendezett struktúrájú komplex hogyan alakul ki, és milyen mechanizmusok határozzák meg illetve szabályozzák az őt felépítő filamentumok szerkezeti tulajdonságait és kölcsönhatásait. Jelen tudásunk szerint az általam vizsgált mindkét fehérje, a titin és a formin is fontos szerepet játszik az izomszarkomer szerkezetének szabályozásában. A titin óriás izomfehérje amellett, hogy determináns szerepet játszik az izom passzív mechanikai tulajdonságainak, vagyis rugalmasságának kialakításában, egyúttal templátként is funkcionál, vagyis a szarkomerikus filamentumrendszerek globális szerkezeti elrendezésének kialakításához is hozzájárul. A formin, aktin-kötő tulajdonságai miatt feltehetően aktív szerepet játszik a szarkomerikus vékony filamentum szerkezeti dinamikájának szabályozásában. Az alábbiakban bemutatom mindkét fehérje szerkezeti és működési tulajdonságait.

#### 1.1. A titin és a formin fehérjék kutatásának történeti háttere

Az izomösszehúzódás csúszó filamentum elméletének megalkotói már az 1950-es évek elején feltételezték, hogy a miofibrillumokban létezik egy harmadik, hosszanti elhelyezkedésű filamentumrendszer (**1. ábra**). Feltevésüket arra a megfigyelésre alapozták, hogy a szarkomerek szerkezete az aktin és miozin kivonása után sem bomlott fel [1]. Nem sokkal később elektronmikroszkópos felvételekkel sikerült vékony, rugalmas filamentumokat kimutatni túlnyújtott szarkomerekben a vékony és vastag filamentumok közötti résben ("gap filaments") [2-4].



 ábra. Elektronmikroszkópos felvétel nyúl szívizom szarkomerekről az aktin és a miozin filamentumok szelektív eltávolítása után. A Z-csík (Z) és az M-vonal (M) közötti térrészben megfigyelhetők a rugalmas filamentumok [5].

Az elasztikus filamentumok felfedezésében magyar kutatók is fontos szerepet játszottak. Trombitás és Tigyi-Sebes rovarok repülőizmából szelektíven eltávolították a vékony filamentumokat, majd a szarkomer nyújtása utáni elektronmikroszkópos felvételekkel kimutatták, hogy a vastag filamentumok a Z-csík mindkét oldalához összekötő filamentumokkal ("connecting filaments") kapcsolódnak [6, 7]. Guba és munkatársai nevéhez fűződik az izomrostok fibrillin fehérjéjének felfedezése [8, 9], melyről utólag feltételezhető, hogy azonos a connectin molekulával.

A connectint 1977-ben Maruyama és munkatársai írták le [10]. Wang és kutatócsoportja tőlük függetlenül és közel egyidőben felfedeztek egy szarkomerikus fehérjét, melyet óriási mérete miatt titinnek neveztek el [11]. Hamarosan kiderült, hogy a connectin és titin elnevezések ugyanazt a fehérjét takarják [12]. Napjainkra az utóbbi megnevezés használata terjedt el az irodalomban.

Az 1980-as évek második felétől kezdve felgyorsult a titin kutatás. A fehérje kedvező antigén sajátságait felhasználva immun-elektronmikroszkópos tanulmányokkal feltárult pontos szarkomerbeli lokalizációja [5, 13, 14]. 1995-ben ismerté vált a humán titin gén szekvenciája [15], amelyről az átíródó mRNS alternatív érési folyamatával jönnek létre a különböző titin izoformák [16]. A titin szerepét az izom passzív rugalmasságában kezdetben élettani kutatások igazolták [15, 17-20]. Később a modern egyedi molekula manipulációs technikák (lézercsipesz és atomerő-mikroszkóp) megjelenésével lehetőség nyílott a rugalmasság mélyebb, molekuláris szinten történő vizsgálatára [21-23].

A szarkomerikus vékony filamentumok képződése során az aktin polimerizációja révén filamentumok épülnek össze. A polimerizáció folyamatában a forminoknak alapvető jelentőségük van. A formin fehérjéket az *ld* ("*limb deformity*") allél molekuláris karakterizálása során írták le [24]. Elsőként azt figyelték meg, hogy az

ebben okozott mutáció végtag deformitásokat okoz, de már ekkor feltételezhető volt, hogy ezen fehérjék hibája más szerveket is súlyosan érinthet [25]. Későbbiekben beigazolódott, hogy a formin fehérjék mutációjával valóban összefüggésbe hozható több szervrendszert érintő betegség is [26, 27].

Molekuláris szintű, *in vitro* vizsgálatok során derült fény arra, hogy a forminok is az aktint szabályozó, úgynevezett nukleációs faktorok közé tartoznak [28-30], hasonlóan a korábban leírt Arp2/3 [31, 32], illetve a WH2-domént tartalmazó fehérjékhez [33-38]. Érdekes tulajdonságuk emellett, hogy nem csak a kialakuló aktin nukleuszok stabilizálásában van szerepük, hanem az aktin elongációjának fázisát is sokrétűen szabályozzák [39, 40].

#### 1.2. A titin és a forminok szarkomerikus elhelyezkedése

Mennyisége alapján a titin a miozin és aktin után a harmadik leggyakoribb fehérje a gerincesek vázizmában. A harántcsíkolt izomban a vékony és vastag filamentumok között párhuzamosan fut és áthidalja a szarkomer hosszának felét [13]. N-terminális része a Z-csíkban található, C-terminálisa az M-vonalhoz rögzül (**2. ábra**).



2. ábra. A titin elhelyezkedése a szarkomerben.

A titin N-terminálisának 80 kDa tömegű (vagy izoformától függően kisebb) része a teljes Z-csíkon végighúzódik. A szomszédos szarkomerek titin filamentumai a Z-csíkon belül átfednek, így hosszanti irányú molekulaláncolatot képeznek [41]. Az N-terminális rögzítéséért a telethonin ("T-cap", vagy titin-sapka) fehérje felelős, míg a filamentumok Z-csíkon belüli keresztbe kapcsolását az alfa-aktinin biztosítja [42, 43].

Az I-szakaszban, az adott izoformától függően, a titin legrugalmasabb, 0,8-1,5 MDa nagyságú része található, melynek felépítése három szegmensre osztható. A Zcsík közepétől számított mintegy 100 nm hosszúságú szakaszon a titin a vékony filamentumokhoz kapcsolódik [44, 45]. A vastag filamentumok végétől számítva megközelítőleg 100 nm hosszúságban hat titin molekula kötegszerűen összekapcsolódva önálló filamentumot képez ("end-filament") [46, 47]. A két fenti, kipányvázott molekularészek között a titinmolekulák önállóan, stabil kölcsönhatásoktól mentesen húzódnak az I-szakasz mentén [5].

A szarkomer A-szakaszában található a titin legnagyobb méretű, körülbelül 2 MDa nagyságú része, melyet a miozinhoz és C-fehérjéhez történő erős kapcsolódása miatt élettani körülmények között nyújthatatlannak tekintenek [13, 48-50].

A titin C-terminálisának körülbelül 200 kDa-os része az M-vonalban lokalizálódik. Az N-terminális szakaszhoz hasonlóan a szomszédos fél szarkomerekből benyúló titin filamentumok C-terminálisai itt is átfednek és stabilan összekapcsolódnak [51]. A Z- és M-csíkokban anti-parallel módon öszekapcsolódó titinmolekulák tandem filamentumrendszere tehát egy kontinuus hálózatot hoz létre a miofibrillum mentén.

Ahogyan arra már korábban utaltunk, a forminokkal összefüggésbe hozhatóak bizonyos, izommal kapcsolatos betegségek [27]. Elsőként a Fhod3 forminról igazolódott be, hogy a szívizomban elősegíti az aktin filamentumok polimerizációját, és mennyiségének csökkenése a miofibrillumok integritásának felbomlásához vezet [52]. Ezt az izoformát a későbbiekben már "miokardiális forminnak" is elnevezték [53] és kimutatták, hogy a szív fejlődésének kezdeti szakaszában esszenciális [54], valamint hogy a fejlődő és kifejlett szívizomban máshova is lokalizálódik, tehát szerepe az egyed életében végig meghatározó [55].

Ezen fehérje közeli rokona, a Fhod1, az aorta simaizomzatában található meg nagy mennyiségben, és a simaizom fenotípusának kialakításáért teszik felelőssé [56]. Ugyanezen fehérje *C. elegansban* megtalálható homológja, egy másik formin családba tartozó fehérjével, a CYK1-gyel együtt a féreg testfal izomzatának felépítésében vesz részt. Megállapították, hogy a szarkomer Z csíkjának közelében lokalizálódnak, és hiányukban a szarkomerikus mintázat felbomlik [57].

Az általunk vizsgált formin fehérje a DAAM (Dishevelled Associated Activator of Morphogenesis) fehérjecsalád tagja, amely egy újabban felfedezett és emiatt még csak részlegesen leírt formin család [58]. Rosado és munkatársai megfigyelték, hogy a forminok igen széles körének, többek között a DAAM-nak is igen jelentős szerepe van a szívizom miofibrillogenezise során [59].

Mihály József és munkatársai megfigyelték, hogy a *Drosophila* DAAM a szarkomer Z-, illetve M csíkja közelében lokalizálódik, és szerepet játszik a miofibrillogenezis során mind a lárva szomatikus izmainak, mind pedig a kifejlett egyed repülőizmainak, valamint szívének kialakításában is [60]. Ilyen vonatkozásban tehát nagymértékű hasonlóságot mutat az előzőekben említett Fhod3 fehérjével, abból a szempontból, hogy az izom fejlődése, majd a későbbiekben annak integritása fenntartása szempontjából alapvető jelentőséggel bír.

#### 1.3. A titin és a DAAM formin szerkezete

A titin a természetben előforduló legnagyobb méretű fehérje. *In situ* átlagos hossza több mint 1 µm és molekulatömege izoformától függően 3-3,7 MDa [61, 62]. Szekvencia analízise alapján kifejezetten moduláris felépítésű molekula. Tömegének 90%-át két különböző típusú, a fibronektin III (FNIII) és az immunglobulin (Ig) szupercsaládba tartozó domének ismétlődése teszi ki [63].

Mágneses magrezonancia szerkezetvizsgálatokkal kimutatták, hogy a kétféle, hozzávetőlegesen 100 aminosav hosszúságú FNIII és Ig modul egyaránt hét antiparallel lefutású β-lemezből álló globuláris alegységet alkot [64, 65] (**3. ábra**).



3. ábra. Immunglobulin (kék) és fibronektin III (barna) domének kapcsolódása a titin M-vonalbeli szakaszában (PDB kód: 2NZI, Mrosek és munkatársai alapján [66], módosítva).

A titin filamentumot elképzelhetjük mikroszkópikus méretű, szabálytalan mintázatú gyöngyfüzérként is, mely mintegy 300 gyöngyszemből (166 Ig és 132 FNIII domén) áll. Mindkét doméntípus kötőhelyet biztosít különböző funkciójú fehérjék (izomrost alkotók, membránkomponensek, enzimek és jelátviteli molekulák) számára.

Az Ig és FNIII doménsorozatok között helyezkedik el a titin tömegének 10%-át kitevő 17 egyedi szekvencia. Ezek közül a C-terminális közelében elhelyezkedő titin kináz domén szekvenciája bizonyos fokú homológiát mutat a humán miozin könnyű lánc kináz családdal [67], illetve a gerinctelenekben található twitchin és projectin fehérjék kináz doménjeivel [68, 69]. A többi szekvencia nem hozható rokonságba más fehérjecsaláddal.

Az alábbiakban vizsgáljuk meg részleteiben is e hatalmas molekula szerkezeti felépítését az N-terminálisa felől.

A Z-csíkon belüli titin szekvenciában hét Ig domén és két egyedi szekvencia (Z inszerció, "Z insertion") található, melyek a harmadik Ig domént fogják közre [70]. A második Z inszercióban 45 aminosav hosszúságú ismétlődő egységeket (Z-repeat) írtak le, melyek száma 2-7 között változik izoformától, fajtól és az egyedfejlődési szakasztól függően [71-73].

Komplex felépítésének, rugalmasságának, kölcsönható partnereinek és a jelátviteli folyamatokban betöltött szerepének köszönhetően a titin I-szakaszbeli része áll leginkább a kutatások középpontjában [15, 74-76]. A szarkomer ezen szakaszában tandem elrendezésű Ig doménekből álló régiókat, illetve a közöttük elhelyezkedő, egyedi szekvenciákból és Ig doménekből felépülő unikális régiókat különböztethetünk meg (**4. ábra**). Míg a proximális (Z-csíkhoz közeli, I1-15) és disztális (Z-csíktól távolabb eső, I84-105) tandem Ig sorozat konzervált az egyes izoformákban, addig a differenciálisan kifejeződő középső Ig szegmens (I28-79) és az unikális régiók hossza izomtípusonként eltérő [16, 77].



4. ábra. A: I-szakaszbeli hipotetikus titin szegmens doménszerkezete, mely abban az esetben jönne létre, ha az összes exon kifejeződne. B: Alternatív splicing révén kialakuló titin izoformák különböző izomszövetek I-szakaszában. Az N2BA típus középső Ig régiójának hossza eltérő lehet, ezt szaggatott vonal jelzi [70].

Az unikális régiók három típusa közül az egyik az N2A régió, mely Ig doméneket és egyedi szekvenciákat váltakozva tartalmaz. Az emlősök vázizmában az N2A régió mindegyik titin izoformában megtalálható.

Az unikális régiók második típusát az N2B szekvencia adja, mely csak a szívizomra jellemző. Előfordulhat önmagában (N2B titin izoforma), vagy az N2A változattal együtt kifejeződve (N2BA titin izoforma). Cazorla és munkatársai egyedi izolált szívizomsejteken végzett immunfluoreszcenciás és mechanikai kísérletekkel kimutatták, hogy a rágcsálók bal kamrája főleg a rövidebb N2B titint tartalmazza, míg nagyobb emlősök kamráiban az N2BA/N2B izoforma arány a testmérettel párhuzamosan növekszik [78]. Az emberi bal kamrában ez az arány megközelítőleg 0,6, a pitvarokban pedig főleg N2BA titin található. Kutatásaik fényt derítettek arra, hogy azonos szarkomerhossz mellett a rágcsálók szívizomsejtjei nagyobb passzív erőt képesek kifejteni, mint a humán és a nagy testméretű emlős szívizomsejtek [78].

A harmadik unikális szakasz a PEVK régió, mely az egyik legismertebb és funkcionális szempontból legfontosabbnak tartott egyedi szekvencia. Nevét a prolin (P), glutaminsav (E), valin (V) és lizin (K) aminosavak szokatlanul gyakori előfordulásáról kapta. Hossza izoformától függően 163-2174 aminosav lehet [15]. Szekvenciájában két, változó számban megjelenő motívum típust írtak le: a PPAK (vagy PEVK) és polyE motívumokat. A 26-28 aminosav hosszúságú PPAK motívum az összes titin izoformában megtalálható, nagyszámban tartalmaz bázikus oldalláncú aminosavakat (izoelektromos pontja: 9-10). A vázizom PEVK szegmensben és a szív N2BA izoformában ezen felül kifejeződik a polyE motívum is, mely glutamátban gazdag (izoelektromos pontja: 4,0) [16, 77, 79, 80]. Sokáig úgy gondolták, hogy a PEVK régió szerkezete rendezetlen, egyedüli másodlagos szerkezeti elemként poliprolin II típusú hélixek előfordulását mutatták ki benne [81-83].

A C-terminális irányába továbbhaladva a szarkomer A-szakaszában található a következő titin szegmens, melyre jellemző, hogy szekvenciája erősen konzerválódott a különböző fajok és izomtípusok között. A molekulát itt rendkívül szabályos mintázatú és moduláris felépítésű, Ig és FNIII doméneket tartalmazó szuper-sorozatok (super-repeat) alkotják [50, 84-86]. Kétféle A-szakaszbeli titin szuper-sorozatot különböztethetünk meg (**5. ábra**).



5. ábra. A titin felépítése a szarkomer A-szakaszában és M-vonalában [70].

Az N-terminális felé eső első szuper-sorozat 7 domén mintázatának (Ig-FnIII<sub>2</sub>-Ig-FnIII<sub>3</sub>) hatszori ismétlődéséből áll. A közvetlenül az elsőhöz kapcsolódó második, 11 domén hosszúságú mintázatot (Ig-FnIII<sub>2</sub>-Ig-FnIII<sub>3</sub>-Ig-Fn III<sub>3</sub>) tartalmazó szuper-sorozat 11-szer ismétlődik [50, 87]. Érdekes módon ez utóbbi sorozatban a periódusok hossza 43 nm, melyekhez a C-fehérjén keresztül a miozin nehéz lánca kapcsolódik [88-91]. Így feltételezhető, hogy ez a magasfokú rendezettség molekuláris sablont biztosít a vastag filamentum felépüléséhez.

A titin M-vonalbeli végső szakasza komplex szerkezetű és nem mutat szabályos mintázatot (**5. ábra**). Tartalmazza a titin kináz domént, hét egyedi szekvenciát (M inszerció, "M insertion") és tíz Ig alegységet [42, 50, 92]. Az utolsó kivételével mindegyik inszerció konstitutívan fejeződik ki az egyes izomszövetekben [93, 94].

A formin fehérjék a titinhez hasonlóan szintén domén szerkezetű molekulák, melyek elhelyezkedése és elnevezése az 1. táblázatban, illetve a 6. ábrán látható. A DAAM a forminok úgynevezett "diaphanous-related" formin (DRF) alcsaládjába tartozik. Ezekre jellemző, hogy a molekula két végén található domén a fehérje aktivitását szabályozza. Mai ismereteink szerint a sejten belül a Rho GTP-áz fehérjecsalád tekinthető a fő regulátoruknak. Kölcsönható partner hiányában a DID és DAD domének egymáshoz kötődnek, ezáltal tartva inaktív állapotban a fehérjét. Amint azonban GTP-áz kötődik a molekula N terminális végén található GBD doménhez, az autoinhibíciós konformáció feloldásra kerül, és hozzáférhetővé válnak a formin aktin kötésben szerepet játszó szakaszai [95]. Egyik ezek közül az FH1 domén, mely ugyan direkt módon nem képes aktin kötésére, azonban az aktin monomert kötő profilin kölcsönható partnere. Az FH1-profilin kapcsolat felelős azért, hogy az aktin filamentum plusz végét processzíven kötő formin fehérjék jelenlétében is maximális mértékű legyen az elongáció [96, 97]. Az FH2 domén a leginkább konzervatív szakasz a molekulán belül, és ez az "elsőrendű" aktin-kötő rész [98], hiszen évtizedekig ez volt az egyetlen domén a fehérjében, amelynek az aktin nukleációjára kifejtett hatását vizsgálták. Ennek megfelelően a különböző formin fehérjék esetében ezen szakasz karakterizálása már javarészt megtörtént [28, 95-97, 99-104]. Itt jegyezném meg, hogy Mihály József és munkatársai létrehoztak egy olyan, az FH2 doménben elhelyezkedő pontmutációt, amely eltörölni látszott a formin funkcióját a vizsgálati rendszerükben (I732A) [60]. Munkám során ezt a mutációt hordozó konstrukciót használtam az FH2 hatásának "kiküszöbölésére", hogy in vitro is igazolni tudjam in vivo megfigyeléseiket.

A vizsgálataink középpontjában álló DAD domén egy, az imént említettnél sokkal rövidebb, alig 15-20 aminosavból álló szakasz. Ahogyan már korábban említettük, a forminokkal kapcsolatos "klasszikus" nézőpont szerint ennek a DRF csoportba tartozó forminok esetében azok inaktív állapotban tartásában van jelentősége [99, 105, 106]. Abban az esetben, ha a DID vagy a DAD domén nincsen jelen a molekulán belül, a sejteken abnormális filopódiumképződés figyelhető meg, továbbá túlzott méretű aktin kötegek, úgynevezett stressz-rostok jelennek meg bennük [107-109].

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

1. táblázat. A forminok különböző doménjainak elnevezése.



6. ábra. A DRF fehérjecsalád sematikus szerkezete. Az klasszikus felfogás szerint a DID és DAD domének az autoinhibícióban játszanak szerepet, míg az FH2 domén felelős az aktin kötéséért. Az új megközelítés szerint a DAD domén is képes aktin kötésére, bár ennek részletei még nem tisztázottak (Maiti és munkatársai alapján, módosítva [110]).

#### 1.4. A titin gén szövetspecifikus kifejeződése

A harántcsíkolt izom titinmolekuláját egyetlen gén kódolja (*TTN*, NCBI génazonosító: 7273), mely emberben a második kromoszóma hosszú karján, egy 294 kilobázis (kb) nagyságú szakaszon lokalizálódik [63, 111]. Összesen 363 exont tartalmaz, mely a leghosszabb izoforma esetén 38138 aminosav átírását jelenti [77].

Az első 28 exon kódolja a titin Z-csíkon áthúzódó szegmensét, amelyen belül a Zrepeat-ek (8–14. exonok) száma változó lehet (ld. **1.3. fejezet**).

A titin gén differenciális kifejeződésének folyamata legnagyobb mértékben a szarkomer I-szakaszában (29–251. exonok) figyelhető meg. Az I-szakasz hosszát az N2B (49. exon), az N2A (102–109. exonok), a középső Ig és a PEVK (110–225. exonok) régiók alternatív splicing útvonalai szabják meg. Például, az előző fejezetben említett, kizárólag a szívizomra jellemző N2B izoforma kis méretét az okozza, hogy az mRNS-ben az 50. exon után közvetlenül a 219. következik.

A titin A-szakaszbeli és M-vonalbeli szegmensét kódoló 252–363. exonok kifejeződése a legnagyobb mértékben konstitutív. A titin kináz domént a 358-as exon kódolja, a 362-es pedig az utolsó M inszercióban található calpain-3 (vagy p94) proteázt kötő szakaszt. Gyors izmokban a titinmolekulák 90%-a tartalmazza ezt a kötőhelyet, míg lassú izmokban csak 10%-ban van jelen [93, 94].

Titin izoformák jelen vannak simaizom szövetekben is, melyekben 80-100 exon kódol 1 MDa-os, vagy ennél kisebb méretű titin fehérjéket [112]. E titinek szerepe a simaizom kontrakciójában, továbbá kapcsolatuk egy korábban felfedezett titin-szerű fehérjével (smitin) még nem teljesen tisztázott [113-115].

Humán nem-izom sejtekben (fibroblasztok, vérlemezkék) szintén kimutatták a titin gén termékeit. Ezekre a celluláris titin (c-titin) izoformákra jellemző, hogy stressz szálakkal asszociátumokat képeznek [116].

Érdekes módon a sejtmagban is találtak titint, mely feltételezhetően a kromoszómák rugalmasságának és szerkezeti integritásának biztosításában játszik fontos szerepet [117, 118].

#### 1.5. A titin és a DAAM formin C-terminálisának funkciója

A titin A- és I-szakaszbeli része szerepét tekintve igen eltér egymástól. Míg előbbi egy funkcionálisan rugalmatlan molekulaszakasz, addig utóbbi jelentős mértékben megnyújtható erő hatására.

A titin egyik legfőbb szerepe az izom vékony és vastag filamentumoktól független, passzív rugalmasságának biztosítása. Ennek bizonyítására Horowits és munkatársai a titint ionizáló sugárzással degradálták, majd megfigyelték, hogy az izomrostok passzív feszültsége jelentősen csökkent [19]. A titin egy másik rendeltetése, hogy centrálja a szarkomer A-szakaszát az izom kontrakciójakor. Ez azért igen fontos, mert így a szomszédos szarkomereket egyforma terhelés éri a megnyúlás vagy az összehúzódás során [20]. A következőkben vegyük részletesen is sorra az óriás molekula egyes szakaszainak funkcióit.

A titin a szarkomer Z-csíkjának szerkezetét a nebulinnal, egy vékony filamentumokhoz kapcsolódó fehérjével közösen határozza meg [42, 119]. A Z-csík izom-típusonként változó megjelenésű: gyors izmokban jellemző módon keskeny, lassú izmokban pedig széles, feltehetően a nagyobb szilárdság biztosítása érdekében. Számos tanulmány rávilágított a titin Z-csík régiójának esszenciális szerepére a szarkomer felépülését, stabilizációját és fenntartását illetően [41, 72, 120-122]. Ezek a kísérletek megmutatták, hogy egyes Z-csíkbeli titin szakaszok túltermeltetése nemcsak közvetlenül a Z-csík felépítésében okoz súlyos zavarokat, hanem a vékony filamentumok I-szakaszba, illetve a vastag filamentumok A-szakaszba történő szerveződésében is. Meglepő módon ez fordítva is igaz: a titin C-terminális részében okozott deléció károsítja mind az M-vonal, mind a Z-csík szerkezetét [123]. A fentiek tükrében kijelenthető, hogy a miofibrillum kialakulásakor a titin molekuláris sablonként is működik, azaz meghatározza az egyes fehérjék pontos helyzetét a szarkomerben.

A titin rugalmas viselkedéséért a vékony és vastag filamentumok közötti, Iszakaszban húzódó rész a felelős. A Z-csík közelében a titin a vékony filamentumokhoz kapcsolódik, így csak a fennmaradó szegmense nyújtható [44, 45]. A benne rugóként funkcionáló elemek (tandem Ig-, N2B-, N2A- és PEVK régiók) passzív erő kifejtésével állnak ellen a szarkomer nyújtásának. A különböző titin izoformákban a differenciális kifejeződés miatt e nyújtható szakaszok hossza igen változatos (**4. ábra**) [15, 16, 77]. Az elasztikusabb vázizom titin fehérjék hosszú, míg a feszesebb szívizom izoformák viszonylag rövid I-szakasszal rendelkeznek [124]. Erre vonatkozó érdekes megfigyelés, hogy a grizzly medve (*Ursus arctos horribilis*) szívében hibernáció alatt lecsökken az N2BA/N2B izoformák aránya [125], így a medve szívében lezajló alternatív splicing folyamata segíti a megváltozott élettani igényekhez történő alkalmazkodást. Ezek a különleges megnyújtható szekvenciák mechanikai szerepükön túlmenően igen fontos mechanikai érzékelő funkciókat, és ligandjaik révén különféle jelátviteli feladatokat is ellátnak [74].

A titinmolekula az A-szakaszban fiziológiás körülmények között nyújthatatlan, mivel a vastag filamentumokhoz kapcsolódik [49, 88]. Ezen szakasz korábban már említett 11 domén hosszúságú elemek ismétlődéséből álló második szuper-sorozata mintaként segítheti elő a vastag filamentum szabályos szerkezetének kialakulását (ld. **1.3. fejezet**).

A titin M-vonalában található titin kináz enzim működését intenzíven tanulmányozzák. Ismert, hogy embrionális korban célfehérjéje a Z-csíkban található telethonin (T-cap) [67]. Kísérletek igazolták, hogy nélkülözhetetlen szerepe van a szarkomer kialakulásában és fenntartásában [126]. Izgalmas az a megfigyelés, miszerint a titin kináz is egy mechanoszenzor molekula, mely a terheléstől függően befolyásolni képes az izomfehérjék expresszióját [127]. Kimutatták továbbá, hogy a titin kináz hatással van a szívizom kontraktilitására, a kardiomiociták kalcium felvételének szabályozásán keresztül [128].

Figyelembe véve a titin gén hatalmas méretét, nem meglepő, hogy mutációi érinthetik a fenti funkciókat, így a titinnek a különböző súlyosságú miopátiák kialakulásában is szerepe van [70, 74]. A mutáns titin gén okozta humán vázizom betegségek közé sorolható a végtagövi 2J-típusú izomdisztrófia ("limb-girdle muscular dystrophy type-2J"), a sípcsonti muszkuláris disztrófia ("tibial muscular dystrophy") és az örökletes, légzési elégtelenséggel járó miopátia ("hereditary myopathy with early respiratory failure"). A szívizmot érintő humán titinopátiák csoportjába a dilatatív (tágulásos) kardiomiopátia (,,dilated cardiomyopathy"), a hipertrófiás (megvastagodásos) kardiomiopátia ("hypertrophic cardiomyopathy") és a korai kialakulású miopátia fatális kimenetelű kardiomiopátiás típusa ("early-onset myopathy with fatal cardiomyopathy") tartozik.

Az elmúlt években derült csak fény arra, hogy a C-terminális közeli DAD doménnek a formin molekula inaktív állapotban tartásán kívül esetleg más funkciója is lehet. Gould és munkatársai 2011-ben megjelent közleménye alapján a DAD domén szerepe kettős: az autoinhibíción túl a forminok nukleációs aktivitásában is szerepe lehet [129]. Vizsgálataikat elsősorban egér mDia1 forminnal végezték, de bizonyos kísérleteket más, például humán DAAM1 jelenlétében is megismételtek. Ezek alapján arra a következtetésre jutottak, hogy az összes, általuk vizsgált formin esetében azok nukleációs aktivitása jóval kifejezettebb DAD jelenlétében, mint anélkül. Érdekes módon a DAAM esetében volt a legnagyobb mértékű hatás: az FH1-FH2, illetve FH1-FH2-DAD konstrukciókat összehasonlítva, mintegy harmincszorosára növekedett az aktin filamentumok összeszerelődésének a sebessége.

Ezek a kísérletek világítottak rá arra, hogy érdemes lenne feltérképezni a DAAM formin karboxil-terminálásának viselkedését, hiszen ezek a vizsgálatok talán fényt deríthetnének arra, hogy mennyiben különbözik az eddigiekben karakterizált FH2-aktin kölcsönhatás a (teljes hosszúságú forminhoz sokkal inkább hasonló) FH2-DAD-aktin rendszertől.

#### 1.6. A titinmolekula rugalmassága

A titin egyik legfontosabb tulajdonsága, hogy molekuláris rugóként a Z-csík és M-vonal között kifeszülve rugalmasságot biztosít a szarkomerek számára. Fiziológiás körülmények között a titin molekula csak a szarkomer I-szakaszában nyúlik meg, ahol tandem Ig régiókat és egyedi szekvenciákat tartalmaz (**4. ábra**). Utóbbiak közül a legjelentősebb a nevét alkotó aminosavakban gazdag PEVK régió, melynek hossza az egyes izoformákban igen változatos [15].

1995-ben Labeit és Kolmerer a tandem Ig szegmenseket még merev rudakként írta le [15], mivel alkotóegységeik az Ig domének stabil háromdimenziós szerkezettel rendelkeztek [130]. A PEVK régiót ezzel szemben lazább, rendezetlen szerkezetű rugalmas elemnek tekintették. Trombitás és Granzier megfigyelései szerint a szívizom szarkomerek nyugalmi állapotában a titin molekulák I-szakaszbeli része felgombolyodott állapotban található [131, 132]. Később monoklonális ellenanyagokkal végzett vizsgálatokkal feltárták, hogy a szarkomer megnyújtásának kezdeti szakaszában először nem a PEVK régió, hanem az azt szegélyező tandem Ig szegmensek egyenesednek ki [133, 134].

1997-ben három olyan publikáció is megjelent, melyekben lézercsipesz vagy atomerő-mikroszkóp segítségével egyedi molekulák szintjén vizsgálták a titin rugalmasságát [21-23]. E munkák fő következtetése az volt, hogy a titin rugalmassága (erő-megnyúlás válasza) nemlineáris, mely a molekula entrópikus polimerlánc viselkedésével magyarázható. Az entrópikus polimerlánc végpontjai közötti távolság csökkenhet termikus eredetű hajlító hatások következményeként. A feltekeredett, kompakt forma kialakulását a lánc kis hajlítómerevsége teszi lehetővé. A lánc nyújtásával ugyanakkor csökken a szerkezeti rendezetlensége (entrópiája), azaz kiegyenesítése munkát igényel. Az egyedi molekula kísérletek során regisztrált erő-megnyúlás görbéket az entrópikus rugalmasságot leíró, "féregszerű lánc" modellel ("Wormlike Chain model", WLC) illesztették [21, 135].

A WLC modell értelmében a polimerláncot egy deformálható kontinuumnak képzelhetjük el, melynek alakját hajlítómerevsége, valamint az ezt jellemző perzisztenciahossz határozza meg. A szerkezeti entrópia merev polimerek esetében alacsony, míg ennek ellenkezője érvényes a rugalmas, kis hajlítómerevségű polimerláncokra. Az egyedi molekula manipulációs mérések eredményei alapján bebizonyosodott, hogy a titin I-szakaszában található egy eleve kitekeredett szegmens [15], melyet később a PEVK szegmenssel azonosítottak [21].

Később az entrópikus polimer modell felhasználásával értelmezték újabb immunelektronmikroszkópos kísérletek eredményeit, amelyek során a titin I-szakaszának nyújthatóságát *in situ* vizsgálták humán *soleus* [136] és patkány *psoas* izmokban [137, 138]. Az eredmények szerint a nem kitekeredett Ig domének alkotta lánc is entrópikus rugóként viselkedik, ugyanakkor a PEVK régió megnyúlása dominál nagyobb erők esetén és a szarkomer nagyobb relatív megnyújtásakor. Máig vitatott, hogy az izom fiziológiás nyújtásakor az Ig domének kitekerednek-e vagy sem.

A laza, nem megnyújtott szarkomerben a tandem Ig szegmensek felgombolyodott állapotban vannak jelen (7. B ábra). A szarkomer kismértékű nyújtásának hatására ezen szegmensek kiegyenesednek, mivel az egyes Ig doméneket összekötő szekvenciaszakaszok megnyúlnak (7. C ábra) [139, 140]. A szarkomer nagyobb mértékű megnyújtásakor a PEVK, N2B és/vagy N2A különleges szekvenciák nyúlnak meg (7. D ábra), feltehetően a bennük lévő rendezetlen szerkezetek ("random coil") kiegyenesedésének következtében [140-142]. Végül az izom összehúzódása során, amikor a vastag filamentum a Z-csíkot közelíti, a titin rugalmas szakaszai ellenkező irányban nyúlnak meg, így állítva helyre a szarkomer nyugalmi hosszát (7. A ábra) [143, 144].



7. ábra. A szívizom titin rövidülésének és megnyúlásának mai tudásunk alapján elfogadott mechanizmusai. A nyugalmi hosszhoz képest megrövidült szívizom szarkomer (A). A nyugalmi állapotban lévő szarkomer (B). A szarkomer megnyújtásának kezdeti szakasza (C). A szarkomer további nyújtása (D). PEVK régió (sárga); N2B régió (kék); a titin nyújthatatlan, vékony filamentumokhoz kötött része (halványzöld) [62].

Jóllehet a PEVK régió rugalmassága máig igen aktívan kutatott terület, háttere még nem teljesen ismert. Az eddigi kutatások alapján úgy gondolják, hogy kis és közepes nyújtó erők esetén jól alkalmazható rá az entrópikus elaszticitás modellje, nagyobb mértékű megnyújtáskor azonban entalpikus tényezők szerepe is felmerült [137, 145]. Ilyen entalpikus faktorok közé sorolhatjuk a PEVK szekvenciáján belüli elektrosztatikus és hidrofób kölcsönhatásokat.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

Korábbi munkákban a titin PEVK régióját rendezetlen szerkezetű fehérjeláncnak tekintették. Mindazonáltal, további vizsgálatok másodlagos szerkezeti elemek (pl. poliprolin II típusú hélixek) jelenlétére utalnak. Vizsgálataink során arra kerestük a választ, hogy a *m. soleus* titin izoforma PEVK doménje valóban ideális polimerláncként viselkedik-e, és rugalmasságára alkalmazható-e a féregszerű lánc (wormlike chain, WLC) modell.

Részletes céljaink az alábbiak voltak:

- fluoreszcensen jelölt, szintetikus PEVK peptidek vég-vég távolságának meghatározása fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer vizsgálatok segítségével;
- a peptidek hajlítómerevségének és ezen keresztül konformációjának leírása a látszólagos perzisztenciahossz meghatározásán keresztül;
- kémiai denaturánsok konformációra kifejtett hatásának vizsgálata;
- az ionerő hatásának vizsgálata a peptidek konformációjára;
- a lánc flexibilitásának vizsgálata hőmérséklet-indukált fluktuációk hatásán keresztül;
- másodlagos szerkezeti elemek valószínűsíthető megjelenésének vizsgálata molekuláris dinamikai szimulációk segítségével;
- PPAK fragmentum klónozása, *E. coli*ban történő termeltetése, tisztítása és egyedi PPAK fragmentumok nanomechanikai jellemzése atomerőmikroszkópos megnyújtásuk alapján.

Kutatómunkám másik részében a *Drosophila* DAAM karboxil-terminális régiójának karakterizálását tűztem ki célul. Ezen belül részletes terveim a következők voltak:

A DAAM formin alábbi konstrukcióinak előállítása:

- GST-FH1-FH2-DAD+C terminális vég (későbbiekben: CDAAM)
- GST-DAD (későbbiekben: DAD)
- GST-DAD+C terminális vég (későbbiekben: DAD+C)
- vad típusú és mutáns GST-FH1-FH2 (későbbiekben: FH1-FH2)

Annak meghatározása, hogy

- a CDAAM az FH1-FH2 konstrukcióval összehasonlítva képes-e fokozottabban gyorsítani az aktin polimerizációját,
- az esetleges effektus a polimerizáció mely szakaszára kifejtett hatásnak tulajdonítható,
- befolyásolja-e a DAD/DAD+C konstrukció az aktin polimerizációjának kinetikáját,
- a DAAM formin DAD/DAD+C doménje képes-e az aktin monomer kötésére,
- szerepe van-e a molekula C-terminális részén lévő aminosavaknak a kötésben,
- az I732A mutáció eltörli-e az FH2 nukleációs aktivitását (ahogyan erre az előzetesen megfigyelt *in vivo* kísérletek utalnak).

## 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### 3.1. A kísérletekhez használt peptidek és fehérjék előállítása

#### 3.1.1. PEVK peptidek

A 11- illetve 21 aminosav hosszúságú PEVK peptideket (PEVK11 és PEVK21, 8. ábra) szilárd fázisú szintézis segítségével kollaborációs partnereink, Fülöp Lívia és munkatársai állították elő [146]. A peptidek szekvenciája megfeleltethető a X90569 GenBank hivatkozási számú humán titin mRNS 17413-17442 (PEVK11) és 17413-17472 (PEVK21) szakaszainak [15]. A szintézis folyamata során a peptidek Cterminálisára egy-egy cisztein aminosavat illesztettek. A peptidek egy részét ezt követően cisztein szulfhidril (SH) csoportján keresztül а 5-((((-2iodoacetil)amino)etil)naftilamin)-1-szulfonát fluoreszcens festékkel (IAEDANS, Molecular Probes) jelölték meg, így megvalósult az 1:1 peptid-IAEDANS jelölési mólarány. A liofilizált szintetikus peptidek tisztasági fokát analitikai nagynyomású folyadékkromatográfiával (HPLC) ellenőrizték, ez 98.4% felettinek bizonyult.

```
PEVK11 peptid:
1 WEEAYQEREVC 11
PEVK21 peptid:
1 WEEAYQEREVIQVQKEVYEEC 21
PPAK fragmentum:
1 MGSSHHHHHH SSGLVPRGSH MASWEEAYQE REVIQVQCEV YEESHERKVP AKVPEKKAPP 60
61 PPKVIKKPVI EKIEKTSRM EEEKVQVTKV PEVSKKIVPQ KPSRTPVQEE VIEVKVPAVH 120
121 TKKMVISEEK MFFASHTEEE VSVTVPEVQK EIVTEEKIHV AVSKRVEPPP KVPELPEKPA 180
181 PEEVAPVPIP KKVEPPAPKV PEVPKKPVPE EKKPVPVPKK EPAA 224
```

 ábra. A vizsgált PEVK peptid és PPAK fragmentum szekvenciák. Az expressziós vektorból származó aminosavakat kék szín jelöli.

A liofilizált mintákból 1 mg/ml-es koncentrációjú törzsoldatot készítettünk foszfát pufferbe oldva (25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7,4), 200 mM KCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 1 mM DTT és 3 mM NaN<sub>3</sub>). Méréseink során a peptidek végkoncentrációját 0,25 mg/ml-re állítottuk be.

#### 3.1.2. Humán vázizom PPAK fragmentumok előállítása

A humán vázizom cDNS könyvtárat Dr. Siegfried Labeit-tól kaptuk. Az általunk expresszálni kívánt PPAK fragmentum a *m. soleus* titin PEVK doménjének első harmadában található. A fragmentumban egyetlen cisztein aminosavat cseréltünk PCR-pontmutagenezis segítségével. Minderre a szintetikus peptidek szekvenciájával való teljes egyezés és a később elvégzendő fluoreszcencia spektroszkópiai vizsgálatok érdekében volt szükség. A fragmentumot kódoló 603 nukleotid hosszúságú régiót (17413-18015, GenBank hivatkozási szám: X90569 [15]) NheI és XhoI restrikciós endonukleázzal (Promega) végzett hasítás után pET-28a (Novagen) vektorba ligáltuk. A konstrukciót BL21(DE3)pLysS *E. coli* kompetens sejtekbe (Promega) transzformáltuk és 1 mM IPTG-vel (izopropil β-D-1-tiogalakto-piranozid) történő indukcióval 37 °C-on, 3 órán át termeltettük a fehérjét Luria-Bertani (LB, Scharlau) tápoldatban.

Az expresszált fehérjét tartalmazó sejtlizátumot lecentrifugáltuk (Sorvall Ultra Pro 80 ultracentrifuga, T-1250 rotor, 100000 g, 4 °C, 1h), a felülúszót Ni-NTA agaróz oszlopon (Qiagen) átfolyattuk és Ni<sup>2+</sup>-affinitás kromatográfiával tisztítottuk, végül az imidazollal eluált fehérjét egy éjszakán át dializáltuk foszfát puffer ellenében. A fehérje szekvenciája a PEVK szekvencián felül az N-terminálison további 23, a pET-28a plazmidból származó aminosavat tartalmaz (a teljes hossz: 224 aminosav), mivel a Histag-et nem hasítottuk le (**8. ábra**).

A PPAK fragmentum moláris extinkciós együtthatóját a szekvencia ismeretében a "ProtParam" program (*http://www.expasy.ch/tools/protparam.html*) segítségével határoztuk meg, mely  $\varepsilon_{280} = 8480 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ -nek adódott. A fragmentumot folyékony nitrogénben fagyasztottuk és atomerő-mikroszkópos vizsgálatáig -80 °C-on tároltuk.

#### 3.1.3. DAAM konstrukciók megtermeltetése és tisztítása

A különböző *Drosophila melanogaster* DAAM szekvenciákat kódoló pGEX-2T plazmidokat Mihály József és munkacsoportja (Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Genetikai Intézet) bocsátotta rendelkezésünkre. A transzformált BL21(DE3)pLysS *E. coli* kompetens sejteket (Promega) ampicillinnel (100 μg/ml) kiegészített LB tápoldatban 37 °C-on 0,6-0,8-as OD-érték eléréséig rázattuk, majd a célfehérje átírását 0,5 mM IPTG hozzáadásával egész éjszakán át rázatva 20 °C-on indukáltuk.

A fehérjék preparálását korábban ismertetett eljárások alapján végeztük [102]. A GST (glutation-S-transzferáz) affinitási taggal rendelkező fehérje konstrukciókat tartalmazó sejtlizátum centrifugálása után (Sorvall ultracentrifuga, 100000 g, 4 °C, 1h) a felülúszót egy GSH (glutation (γ-glutamil-ciszteinil-glicin)) affinitási oszlopon átfolyattuk. Több mosási lépésből álló tisztítást követően 50 mM glutationnal szorítottuk le az oszlopról fehérjéinket. A preparálást egy Sephadex G75-ös (Sigma) oszloppal történő gélszűrés zárta (a gélfiltrációs puffer összetétele: 50 mM TRIS-HCl (pH 7,3), 50 mM NaCl, 1% szukróz, 5% glicerol, 5 mM DTT). A megtisztított fehérjék szekvenciái a **9. ábrán** láthatóak.

A DAAM fragmentumok moláris extinkciós együtthatóját és molekulatömegét a szekvencia ismeretében a "ProtParam" program (*http://www.expasy.ch/tools/protparam.html*) segítségével határoztuk meg, mely alapján az alábbi értékeket használtuk:  $\varepsilon_{280} = 42860 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ DAD} (31 \text{ kDa})$  és DAD+C (34,8 kDa) esetén;  $\varepsilon_{280} = 65780 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ FH1-FH2}$  és pontmutánsa (81,4 kDa), továbbá CDAAM (92,4 kDa) esetén. A fragmentumokat folyékony nitrogénben fagyasztottuk és további felhasználásukig -80 °C-on tároltuk. Kontrol kísérleteink szerint a fagyasztásfelolvasztás nem befolyásolta a fragmentumok aktivitását (adatok nincsenek feltűntetve).

GST-DAAM-DAD:							
1	MSPILGYWKI	KGLVQPTRLL	LEYLEEKYEE	HLYERDEGDK	WRNKKFELGL	EFPNLPYYID	60
61	GDVKLTQSMA	IIRYIADKHN	MLGGCPKERA	EISMLEGAVL	DIRYGVSRIA	YSKDFETLKV	120
121	DFLSKLPEML	KMFEDRLCHK	TYLNGDHVTH	PDFMLYDALD	VVLYMDPMCL	DAFPKLVCFK	180
181	KRIEAIPQID	KYLKSSKYIA	WPLQGWQATF	GGGDHPPKSD	LVPRGSPGIH	RDGGDNKGEF	240
241	DDLISALRTG	DVFGEDMAKF	KRSRKARV				268
GST	-DAAM-DAD+(	C-term•					
1	MSPILGYWKI	KGLVOPTRLL	LEYLEEKYEE	HLYERDEGDK	WRNKKFELGL	EFPNLPYYID	60
61	GDVKLTOSMA	TTRYTADKHN	MLGGCPKERA	EISMLEGAVL	DIRYGVSRIA	YSKDFETLKV	120
121	DFLSKLPEML	KMFEDRLCHK	TYLNGDHVTH	PDFMLYDALD	VVLYMDPMCL	DAFPKLVCFK	180
181	KRIEATPOID	KYLKSSKYTA	WPLOGWOATE	GGGDHPPKSD	LVPRGSPGTH	RDGGDNKGEF	240
241	DDLISALRTG	DVFGEDMAKF	KRSRKARVLN	GGGSSTGHTS	PPRHGSLORE	ESGRERERTV	300
301	RRO	2.1.02211111					303
	ĩ						
GST	-DAAM-FH1FH	12:					
1	MSPILGYWKI	KGLVQPTRLL	LEYLEEKYEE	HLYERDEGDK	WRNKKFELGL	EFPNLPYYID	60
61	GDVKLTQSMA	IIRYIADKHN	MLGGCPKERA	EISMLEGAVL	DIRYGVSRIA	YSKDFETLKV	120
121	DFLSKLPEML	KMFEDRLCHK	TYLNGDHVTH	PDFMLYDALD	VVLYMDPMCL	DAFPKLVCFK	180
181	KRIEAIPQID	KYLKSSKYIA	WPLQGWQATF	GGGDHPPKSD	LVPRGSPGIH	IPDDQKVAGL	240
241	TGCNGAVSPP	PAPPMLKAIP	PPPPPMAPSM	MPPPPPPCPG	APPPPPSMAQ	TMAPAPPKVD	300
301	LPKKNVPQPT		LPDAKLQGTV	WSELDESKLY	NNMELESIDK	LFSAYQKNGV	360
361		RVTGKAAKQK	VLSVIDGRRA	QNCT <b>I</b> LLSKL	KMSDMEISKA	ILSMDSNEQL	420
421	QLDMVEQLLK	FTPSAEERAL	LDEHSEDIES	LARADRFLYE	ISKIPHYEQR	LKSLHYKKRF	480
481	MLTINDLVPR	ITSVMEASRE		LELVLALGNY			540
541		TTLLHYLVQV	IERKFKDLLK	LEDDIPHVRE		KDIQMLRTGL	600
601		RSSGPAQQGD		AQASVRFAEL	EDKFQDMKTR		660
661	DGSVLQPDEF	FGIFDSFLAA		FRRRQEEEEK	RAKQEAELKK	RTIERK	716
GST	-DAAM-FH1FH	I2-DAD+C-tern	n:				
1	MSPILGYWKI	KGLVQPTRLL	LEYLEEKYEE	HLYERDEGDK	WRNKKFELGL	EFPNLPYYID	60
61	GDVKLTQSMA	IIRYIADKHN	MLGGCPKERA	EISMLEGAVL	DIRYGVSRIA	YSKDFETLKV	120
121	DFLSKLPEML	KMFEDRLCHK	TYLNGDHVTH	PDFMLYDALD	VVLYMDPMCL	DAFPKLVCFK	180
181	KRIEAIPQID	KYLKSSKYIA	WPLQGWQATF	GGGDHPPKSD	LVPRGSPGIH	IPDDQKVAGL	240
241	TGCNGAVSPP	PAPPMLKAIP	PPPPPMAPSM	MPPPPPPCPG	APPPPPSMAQ	TMAPAPPKVD	300
301	LPKKNVPQPT	NPLKSFNWSK	LPDAKLQGTV	WSELDESKLY	NNMELESIDK	LFSAYQKNGV	360
361	SATDGSYEDL	RVTGKAAKQK	VLSVIDGRRA	QNCTALLSKL	KMSDMEISKA	ILSMDSNEQL	420
421	QLDMVEQLLK	FTPSAEERAL	LDEHSEDIES	LARADRFLYE	ISKIPHYEQR	LKSLHYKKRF	480
481	MLTINDLVPR	ITSVMEASRE	VARSRRLRKL	LELVLALGNY	MNRGARGNAS	GFRLASLNRL	540
541	ADTKSSAAKG	TTLLHYLVQV	IERKFKDLLK	LEDDIPHVRE	ASKVSLGEMD	KDIQMLRTGL	600
601	ADVAREIEFH	RSSGPAQQGD	RFLPVMREFH	AQASVRFAEL	EDKFQDMKTR	FDRAVRLFGE	660
661	DGSVLQPDEF	FGIFDSFLAA	FAEARHDNES	FRRRQEEEEK	RAKQEAELKK	RTIERK <b>NKTG</b>	720
721	LMTSVARNLG	LKSGSSNGDP	<b>DSPAK</b> GGDNK	GEFDDLISAL	RTGDVFGEDM	AKFKRSRKAR	780
781	VLNGGGSSTG	HTSPPRHGSL	QREESGRERE	RTVRRQNSS			819

**9. ábra.** A vizsgált DAAM formin fehérje szekvenciák. A GST affinitási tagot fekete betűk jelzik, a pontmutánsokban a kékkel jelölt izoleucin aminosavak alaninra lettek cserélve.

#### 3.1.4. Az aktin preparálása

Méréseinkhez nyúl (*Oryctolagus cuniculus*) vázizomból először aceton-extrahált izomforgácsot preparáltunk [147], majd ebből Spudich és Watt módszere alapján [148] izoláltuk az aktint (a tároló puffer ("A puffer") összetétele: 4 mM TRIS-HCl (pH 7,3), 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,2 mM ATP, 0,5 mM DTT, 0,005% NaN<sub>3</sub>).

Az aktin koncentrációjának meghatározását Shimadzu UV-2100 spektrofotométerrel végeztük, mely során az aktin relatív molekulatömegét 42,3 kDanak vettük [149], míg extinkciós együtthatóként a 0,63 mg<sup>-1</sup> ml cm<sup>-1</sup> értéket használtuk 290 nm-es hullámhosszon [150].

#### 3.2. Abszorpciós fotometria

Az abszorpciós spektrumokat termosztálható mintatartóval ellátott Shimadzu UV-2100 típusú spektrofotométerrel vettük fel. Referenciaként a spektrumok felvételekor a vizsgált anyagot (peptidet, fehérjét, fluorofórt) nem tartalmazó puffert használtuk.

#### 3.3. Az aktin fluoreszcens jelölése

Az aktin polimerizációjának nyomon követéséhez az aktin 374-es pozícióban lévő cisztein aminosavát pirén-jódacetamiddal (pirén, Molecular Probes) jelöltük meg [151]. A pirén-jelölt aktin koncentrációjának meghatározásakor a pirén extinkciós koefficiensét 344 nm-en 22000 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>-nek vettük. A jelölési arány meghatározásánál korrekciós faktort alkalmazva figyelembe vettük a pirén abszorpciójának 290 nm-en jelenlévő járulékát.

A steady-state fluoreszcencia anizotrópia és a teljes belső visszaverődésen alapuló fluoreszcencia mikroszkópiai vizsgálatokhoz az aktint Alexa Fluor 488-szukcinimidilészter fluoreszcens festékkel (Alexa 488, Molecular Probes) korábban ismertetett módszer alapján konjugáltuk [152]. Az Alexa Fluor 488-jelölt aktin koncentrációjának számolását a fluorofór  $\varepsilon_{495} = 71000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  extinkciós együttható értékének felhasználásával végeztük, melyet korrigáltunk a festék 290 nm-en mért abszorpciós járulékával.

#### 3.4. Fluoreszcencia spektroszkópiai vizsgálatok

#### 3.4.1. Az aktin polimerizációjának követése és sebességének meghatározása

Ahogyan arra már az előző fejezetben utaltunk, a DAAM konstrukciók aktin polimerizációjára kifejtett hatását pirén fluorofórral jelölt aktin segítségével végeztük.

Tettük ezt azért, mert a pirén-jódacetamid aktin monomert kötő állapotában alacsonyabb fluoreszcencia emissziót mutat, mint a filamentumban lévő aktin kötése közben. Ebből következik tehát, hogy az aktin monomerek filamentumba épülésének folyamata, a polimerizáció ilyen módon követhetővé válik. Meg kell azonban jegyezni, hogy sok előnye mellett a módszernek van egy hátránya is, miszerint a polimerizáció két lépése, a nukleáció és az elongáció nem választható el, arra más, fluoreszcencia mikroszkópos vizsgálati módszerek adnak lehetőséget.

A polimerizációs kísérleteket 2,5 μM, 5%-ban pirénnel jelölt aktin jelenlétében 20 °C-on végeztük, Horiba Jobin Yvon Fluorolog-3 fluoriméter segítségével. 5 nm-es optikai rések mellett 365nm-es gerjesztési, és 407 nm-es emissziós hullámhosszat beállítva vettük fel a csak aktint és GST-t, illetve a különböző koncentrációban jelen lévő DAAM konstrukciót tartalmazó minták esetében a polimerizációs görbéket. A mérés során a monomer aktinhoz elsőként kationcserélő oldatot adtunk (200 μM EGTA és 50 μM MgCl<sub>2</sub> végkoncentrációban), miáltal a monomerhez kötött kalcium magnéziumra cserélődött le. Öt perces inkubáció után adtuk hozzá a különböző konstrukciókat (illetve azok megfelelő térfogatarányú pufferét), valamint a polimerizációhoz szükséges sókat (1mM MgCl<sub>2</sub> és 50 mM KCl, végkoncentrációban). Ezt követően a polimerizáció folyamatát egészen addig követtük, amíg az el nem érte az egyensúlyi állapotot (steady-state), vagyis ahol a monomerek filamentumba épülése és arról leválása egyenlő mértékű.

Az így kapott polimerizációs görbék kiértékelésekor elsőként a kationcsere idején mért fluoreszcencia intenzitást átlagoltuk, majd ezt az értéket kivontuk a polimerizáció folyamata során az egyes időpillanatokban mért fluoreszcencia emisszió értékeiből. Így minden görbénk nullából indult. Az egyensúlyi állapothoz tartozó plató fázist használtuk fel a maximális intenzitás kiszámításához: az annak átlagolásából kapott intenzitás-értékkel elosztottuk a polimerizációs görbe adatait. Az így normált adatsor már tehát nullától egyig, vagy másképpen nullától száz százalékig futott, a fluoreszcencia intenzitás értékektől függetlenül. A normált görbék felszálló ágának közepére, az 50%-os telítési szakaszra (45% - 55%-ig) egyenest illesztettünk [102], végül az ebből kapott meredekség-értékeket ábrázoltuk az adott konstrukció koncentrációjának függvényében. Megjegyezzük, hogy a fent részletezett normálást csak abban az esetben alkalmazhatjuk, ha a vizsgált fehérje nem befolyásolja az egyensúlyi aktin monomer-filamentum arányt, azaz a steady-state állapothoz tartozó intenzitás megegyezik. Ez a feltétel korábbi vizsgálataink szerint teljesül [153].

30

#### 3.4.2. PEVK peptidek steady-state fluoreszcencia spektroszkópiai mérései

A PEVK peptidek fluoreszcencia spektroszkópiai vizsgálatát termosztálható mintatartóval felszerelt Jobin Yvon Fluorolog-3 spektrofluoriméterrel végeztük. Kísérleteinkben a peptidek N-terminális triptofánja mint donor és az IAEDANS mint akceptor között lejátszódó fluoreszcencia rezonancia energiatranszfert (FRET) fluoreszcencia spektroszkópia segítségével követtük nyomon. Az emissziós spektrumokfelvétele során a triptofánt 295 nm-en gerjesztettük és az emittált fényt 305-700 nm hullámhossztartományban detektáltuk. A gerjesztéshez és emisszióhoz egyaránt 5 nm-es optikai rést használtunk.

A fluoreszcencia emissziós spektrumokat minden esetben korrigáltuk a peptidek abszorpciós spektrumainak segítségével a belső szűrő hatás (inner filter effect) figyelembe vételével [154]:

$$F_{korr} = F_{m\acute{e}rt} \, 10^{OD_{ex} + OD_{em}} \,, \tag{1}$$

ahol az  $F_{korr}$  és  $F_{m\acute{e}rt}$  a korrigált és mért fluoreszcencia intenzitásokat jelentik, az  $OD_{ex}$  és  $OD_{em}$  pedig a gerjesztési és emissziós hullámhosszakon felvett abszorbancia értékek.

A FRET jelensége során a gerjesztett állapotban lévő donor molekula (triptofán), dipól-dipól kölcsönhatás révén sugárzás nélkül átadja energiáját az akceptor molekulának (IAEDANS).

Energiatranszfer az alábbi feltételek teljesülése esetén következhet be:

- I. a donor emissziós és az akceptor gerjesztési spektrumai egymással kellő mértékben átfednek.
- II. a donor kvantumhatásfoka megfelelően nagy.
- III. a donor és akceptor molekulák közötti távolság: 1-10 nm.
- IV. a donor és akceptor dipólmomentumai egymáshoz képest megfelelő orientációjúak.

A FRET hatásfokát (E) a következő egyenlet segítségével határoztuk meg:

$$E = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D} \tag{2}$$

ahol  $F_{DA}$  a donor fluoreszcencia intenzitása az akceptor jelenlétében,  $F_D$  pedig akceptor nélkül.

Az energiatranszfer hatásfokának ismeretében kiszámolható a donor és az akceptor molekulák közötti távolság (*R*) az alábbi összefüggés alkalmazásával:

$$R = \sqrt[6]{\frac{R_0^6}{E} - R_0^6},$$
(3)

ahol  $R_0$  a Förster-féle kritikus távolság, amelynél a transzfer hatásfoka 50%-os (triptofán-IAEDANS pár esetén 2,2 nm [155]).

A FRET hatásfok ismeretében kiszámolható az ún. f' paraméter, melynek segítségével információt nyerhetünk a donor és akceptor közötti fehérjemátrix rugalmasságáról [156]:

$$f' = \frac{E}{F_{DA}} \tag{4}$$

Az f' paraméter függ a molekulán belüli fluktuációk amplitúdójától, mely a hőmérséklet emelésével növelhető. Flexibilis fehérjemátrixban a fluktuációk amplitúdója nagyobb, mint egy merevebb konformációval rendelkező peptidlánc esetében. Vizsgálataink során az f' paraméter relatív értékének változását követtük nyomon a hőmérséklet függvényében. A relatív f' értékét az f' aktuális értékének a legalacsonyabb hőmérséklethez tartozó f' értékkel történő normálásával kaptuk meg. Amennyiben nincsenek jelentős szerkezeti változások a molekulában, a relatív f'paraméter hőmérsékletprofilja flexibilis fehérjerész esetén meredekebb egy rigidebb szerkezetű fehérjeszakasszal összehasonlítva.

#### 3.4.3. PEVK peptidek időfüggő fluoreszcencia spektroszkópiai mérései

A minták egy részén a steady-state fluoreszcencia spektroszkópia mellett időkorrelált egy-foton számlálásos ("Time-Correlated Single Photon Counting", TCSPC) rendszerrel is elvégeztük a FRET vizsgálatokat. A méréseket egy ISS Chronos-BH spektrofluoriméterrel (Champain, IL, USA) 22 °C-on végeztük. A triptofán 295 nm-en történő gerjesztése méréseink során nem okozott detektálható fotokioltást. A triptofán fluoreszcencia átlagélettartamát ( $\tau$ ) diszkrét élettartam eloszlás feltételezésével a következő egyenlettel határoztuk meg:

$$\bar{\tau} = \frac{\sum \alpha_i \tau_i^2}{\sum \alpha_i \tau_i},\tag{5}$$

ahol  $\alpha_i$  és  $\tau_i$  a triptofán egyes élettartam komponenseinek amplitúdóját és értékét jelölik [157].

A FRET hatásfokát e mérések során a triptofán fluoreszcencia élettartamának csökkenéséből számoltuk:

$$E = 1 - \frac{\overline{\tau_{DA}}}{\overline{\tau_D}}, \qquad (6)$$

ahol  $\tau_D$  és  $\tau_{DA}$  a donor (triptofán) átlagos fluoreszcencia élettartama akceptor (IAEDANS) nélkül és annak jelenlétében.

#### 3.4.4. DAAM formin fragmentumok steady-state fluoreszcencia anizotrópia vizsgálatai

A méréseket Horiba Jobin Yvon Fluorolog-3 fluoriméter segítségével 20 °C-on végeztük. A kísérletekben 0,5  $\mu$ M Alexa Fluor 488-szukcinimidil-észterrel 50%-osan jelölt G-aktinhoz különböző koncentrációkban adtunk DAD illetve DAD+C konstrukciókat. A fluoreszcensen jelölt aktin monomereket 488 nm-en polarizált fénnyel gerjesztettük és az emissziót 516 nm-en vizsgáltuk 5 nm-es optikai rések alkalmazásával. A steady-state fluoreszcencia anizotrópia (*r*) számolása a következő módon történt [158]:

$$\mathbf{r} = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}},\tag{7}$$

ahol  $I_{VV}$  és  $I_{VH}$  a vertikálisan polarizált fénnyel gerjesztett fluorofór emissziójának vertikálisan és horizontálisan polarizált komponense (intenzitása), *G* pedig a geometriai faktor, amely a műszer vertikálisan és horizontálisan polarizált fényre vonatkoztatott eltérő érzékenységét jellemzi:

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}},\tag{8}$$

ahol  $I_{HV}$  és  $I_{HH}$  a horizontálisan polarizált fénnyel gerjesztett fluorofór emissziójának vertikális és horizontális komponense.

A steady-state anizotrópia értékeit (*r*) a vizsgált fehérjék koncentrációjának függvényében ábrázoltuk. A steady-state anizotrópia additivitása szerint az adatsorra az alábbi egyenletet illesztettük:

$$\frac{r - r_A}{r_{AD} - r_A} = \frac{A_0 + D_0 + K - \sqrt{A_0 + D_0 + K^2 - 4A_0D_0}}{2},$$
(9)

ahol  $r_A$  és  $r_{AD}$  a vizsgált fehérjék hiányában, illetve azok telítési koncentrációjában mért anizotrópia értéke,  $A_0$  és  $D_0$  pedig az aktin, illetve a vizsgált DAAM konstruktok teljes koncentrációja, *K* pedig a kölcsönhatást jellemző disszociációs egyensúlyi állandó.

#### 3.5. Mikroszkópos vizsgálatok

#### 3.5.1. Teljes belső visszaverődésen alapuló fluoreszcencia mikroszkópia

Amint a fentiekben említettük az aktin polimerizáció nukleációs és elongációs szakasza nem különíthető el a pirén-aktin alkalmazásán alapuló fluoreszcencia spektroszkópiai mérések során. Az aktin polimerizációjának részletes vizsgálatára teljes belső visszaverődésen alapuló fluoreszcencia mikroszkópiai (total internal reflection fluorescence microscopy; TIRFM) kísérleteket végeztünk. A módszer lényege röviden abban áll, hogy a teljes belső visszaverődés során létrejövő evaneszcens elektromágneses mező sajátságai miatt a mintának csak egy vékony (néhány 100 nm), az üvegfelszín közelében lévő rétegében található fluorofórokat gerjesztjük. Így emissziót ebből rétegből fluoreszcencia is csupán а detektálhatunk. А háttérfluoreszcencia kiküszöbölése révén a módszer lehetővé teszi az üvegfelszínhez kötött egyedi aktin filamentumok megfigyelését, illetve a polimerizációs folyamat egyes szakaszainak elkülönítését (10. ábra).



10. ábra Alexa Fluor 488-cal jelölt aktin filamentumokat tartalmazó oldat széleslátóterű (bal oldali kép)
 és TIRF (jobb oldali kép) megvilágításban. (ImageJ, Lookup Table: Fire)

A mérésekhez fedőlemezekből áramlási cellákat készítettünk, majd többszöri mosási lépés után a polimerizáció nyomon követésére belepipettáztunk 100 µl
mikroszkópos mérőoldatot. A mérőoldat 0,5 µM koncentrációban Alexa Fluor 488szukcinimidil-észterrel 20%-osan jelölt, előzetesen kationcserélt G-aktint, különböző DAAM konstrukciókat (illetve azok megfelelő térfogatarányú pufferét), a polimerizációhoz szükséges sókat, valamint a fotokioltás ellen szükséges összetevőket (100 mM DTT, 10 mM DABCO) tartalmazott (50 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub> végkoncetrációban). Az aktin filamentumokat N-etil-maleimid konjugált miozinnal kötöttük a fedőlemezhez.

A méréseket egy Olympus IX81 epifluoreszcens mikroszkópra szerelt TIRF megvilágító egység segítségével szobahőmérsékleten végeztük, amelyet egy Olympus APON 60X NA 1.45 TIRF olaj immerziós objektív, egy CCD kamera (Hamamatsu ORCA-ER), illetve egy 491 nm hullámhosszúságú lézer (Olympus cell\*) egészített ki. A rendszert az Olympus xcellence rt szoftver irányította, a képeket TIFF formátumba mentettük és további analízisre az ImageJ programot (National Institutes of Health, USA) használtuk. A polimerizáció időbeliségének követésére a képeket 10 másodpercenként vettük fel. Az egyedi aktin filamentumok növekedési sebességét kimográf analízissel (**11. ábra**) határoztuk meg, melyhez az ImageJ szoftver MultipleKymograph plugin csomagját alkalmaztuk. A kiértékelést mintánként 20 egyedi filamentum figyelembe vételével végeztük.



11. ábra Reprezentatív felvétel egyedi aktin filamentumok növekedéséről (felső ábrasor) és a kimográf elemzéséről (alsó ábra). Idő = perc : másodperc, lépték = 5 μm.

A növekedés sebességét (v) µm/s-ban az alábbi módon számoltuk:

$$v = \frac{\Delta l}{\Delta t} = \tan \alpha , \qquad (10)$$

ahol *tan*  $\alpha$  a filamentum hossz ( $\Delta l$ ) - idő ( $\Delta t$ ) függvény meredeksége. Feltételezve, hogy 1 µm 330 alegységet tartalmaz, az elongációs sebesség ismeretében a következő egyenlet segítségével kiszámolható az aktin monomerek filamentumba épülését jellemző asszociációs sebességi állandó ( $k_+$ ):

$$k_{+} = \frac{v}{F \ G - cc},\tag{11}$$

ahol egy filamentum esetén F = 1, G a teljes G-aktin és cc a kritikus koncentráció, amelyet 0,15 µM-nak vettünk [153].

#### 3.5.2. A PPAK fragmentum atomerő-mikroszkópos megnyújtása

A mechanikai manipulációs kísérleteket Molecular Force Probe-1D típusú (Asylum Research, Santa Barbara, CA, USA) erőmérő atomerő-mikroszkóppal végeztük. A mérések előtt a PPAK fragmentumot foszfát pufferben kellő mértékben kihígítottuk és egy gyárilag tisztított üveg mikroszkóp fedőlemezre cseppentettük. 5- 10 perces inkubálás után a nem kötődött molekulákat foszfát pufferes mosással távolítottuk el. A mérések során a mintát 150-200 µl foszfát puffer fedte (**12. ábra**).



12. ábra. A PPAK fragmentum atomerő-mikroszkópos megnyújtásának kísérleti vázlata.

A lézerdiódából a rugólapkára vetített, és onnan visszaverődő lézernyaláb pozíciójának változása alapján meghatározható a rugólapka elhajlása. Az egyedi PPAK molekulákat megnyújtó erőket a rugólapkák elhajlásából, a rugólapkák rugóállandójának ( $\kappa$ ) ismeretében számoltuk ki ( $F = \kappa \Delta x$ ). A rugólapkák rugóállandóit minden egyes rugólapka esetén külön, termikus kalibráció segítségével határoztuk meg. A rugóállandók termikus kalibráció során meghatározott értéke a 20-60 pN/nm tartományba esett.

A kísérletek kiértékelése során 50 darab erő-megnyúlás görbére az entrópikus rugalmasság "féregszerű lánc" ("Wormlike Chain", WLC) egyenletét illesztettük [21, 135]:

$$\frac{FL_p}{k_B T} = \frac{R}{L_c} + \frac{1}{4 \ 1 - R/L_c}^2 - \frac{1}{4},$$
(12)

ahol  $L_p$  a perzisztenciahossz,  $k_B$  a Boltzmann állandó,  $L_c$  a kontúrhossz, R a vég-vég távolság, T az abszolút hőmérséklet és F a megnyújtási erő.

#### 3.6. Polimer-modell számítások

A PEVK peptidek kontúrhosszát ( $L_c$ ) az aminosavak száma ( $N_{aa}$ ) alapján a következő módon számoltuk:

$$L_c = N_{aa} \cdot L_{aa} + L_{IAEDANS} , \qquad (13)$$

ahol  $L_{aa}$  egy aminosav átlagos hossza (0,38 nm) és  $L_{IAEDANS}$  az akceptor molekula mérete (0,87 nm, [159]). Az ily módon meghatározott kontúrhossz PEVK11 esetén 4,18 nm, PEVK21 esetén pedig 7,98 nm volt.

A PPAK fragmentum kontúrhosszát az aminosav szekvencia alapján számoltuk, ennek értéke 85,12 nm-nek adódott ( $224 \times 0,38$  nm).

A peptidek átlagos vég-vég távolságát (R) a FRET mérések alapján határoztuk meg (**3. egyenlet**), a polimerek hajlítási merevségét jellemző paramétert, a látszólagos perzisztenciahosszat ( $L_p$ ) pedig összhangban a WLC modellel az alábbi összefüggés segítségével [160, 161]:

$$\left\langle R^{2} \right\rangle = 2L_{p}L_{c} \left( 1 - \frac{L_{p}}{L_{c}} \left( 1 - e^{-\frac{L_{c}}{L_{p}}} \right) \right),$$
 (14)

ahol  $R^2$  az átlagos négyzetes vég-vég távolság.

#### 3.7. Molekuláris dinamikai szimulációk

A molekuláris dinamikai szimulációkat Dr. Hetényi Csaba együttműködő partnerünk végezte. A jelöletlen peptidek lehetséges másodlagos szerkezetének becslése a GOR4 [162], a NetSurfP [163], a Jpred3 [164] és a PSIPRED [165] másodlagos szerkezet predikciós szerverek alkalmazásával történt. Mindkét peptid a TINKER és a PCModel segítségével épült fel, α-hélix kiindulási szerkezetet feltételezve. A GROMACS [166] molekuladinamikai programcsomaggal történő számításokhoz a GROMOS 96 erőtere ("force-field") [167] került alkalmazásra. Az IAEDANS-jelölt ciszteinek erőtér paramétereinek meghatározása hasonló módon történt. A nyers komplexek rendszerei, a semlegesítő ellenionok és a vízmolekulák (az explicit víz ("Single Point Charge", SPC) modelljét használva) derékszögű szimulációs dobozokba kerültek, melyekben a peptid és a doboz fala közötti távolság 9 Å. A rendszerek molekuláris mechanikai energiaminimalizálása gradiens ("steepest descent") és BFGS módszerek segítségével történt. A finomított rendszereken ezután 100 ns időtartamú molekuláris dinamikai szimulációk készültek, 2 fs lépésközzel, 300 K állandó hőmérsékleten és a kötéshosszak nagyságát állandó értéken tartó LINCS kényszermegoldó algoritmus alkalmazásával. A hőmérséklet csatolása a Berendsen módszer szerint valósult meg. A nagy hatótávolságú elektrosztatikus kölcsönhatások szimulációi a particle-mesh Ewald módszerrel, míg a van der Waals-kölcsönhatások számítása 9 Å határtávolság alkalmazásával zajlott. A szomszédsági listák 10 fs-os időközönként frissültek. A létrejövő útvonal fájlok elemzése a GROMACS programcsomaggal és a DSSP programmal [168] történt. A szerkezeti ábrák Dr. Warren L. DeLano PyMol programjának segítségével készültek.

## 4. EREDMÉNYEK

#### 4.1. PEVK peptidek spektrális tulajdonságai

A pontos koncentráció meghatározásához és az IAEDANS-jelölés ellenőrzéséhez felvettük a PEVK peptidek abszorpciós spektrumait (**13. ábra**).



**13. ábra.** A PEVK peptidek abszorpciós spektrumai akceptor (IAEDANS) jelenlétében (folytonos vonal) illetve hiányában (szaggatott vonal). A spektrumokat 0,2 M ionerő mellett 20 °C-on rögzítettük.

Az IAEDANS-jelölt peptidek elnyelési görbéjén a 336 nm-es hullámhossznál jelentkező csúcs megfelel az akceptor abszorpciós maximumának. A 300 nm alatti régióban a fehérjék abszorpciójára jellemző 280 nm körüli csúcs egy része látható.

Ezt követően rögzítettük a csak donort illetve a donort és akceptort is tartalmazó peptidek fluoreszcencia emissziós spektrumait (**14. ábra**).



14. ábra. A PEVK peptidek fluoreszcencia emissziós spektrumai donor és akceptor (folytonos vonal) illetve csak donor (szaggatott vonal) jelenlétében. A spektrumokat 0,2 M ionerő mellett 20 °C-on rögzítettük.

A fenti ábrán jól látszik, hogy a triptofán donor 355 nm-es csúcsnál jelentkező fluoreszcencia intenzitása akceptor jelenlétében lecsökken ( $F_{DA}$ ), tehát lejátszódik a FRET jelensége. A 497 nm-nél jelentkező csúcs az IAEDANS fluorofór emissziós maximuma. A FRET erős távolságfüggését jól szemlélteti a rövidebb peptid esetében tapasztalható sokkal nagyobb  $F_{DA}$  csökkenés. A PEVK peptidek két vége között végbemenő energiatranszfer folyamatának vázlatát a **15. ábra** illusztrálja.



15. ábra. A PEVK peptidek láncvégei között fellépő FRET sematikus ábrázolása.

#### 4.2. PEVK peptidek látszólagos perzisztenciahossza

A peptidek hajlítómerevségének jellemzése érdekében kiszámoltuk azok látszólagos perzisztenciahosszát. Ennek érdekében előbb a FRET mérések segítségével meghatározott transzferhatásfok és a vég-vég távolságok közötti összefüggés (**3.** egyenlet) segítségével meghatároztuk a peptidek átlagos vég-vég távolságait. Ezek értékei, az alkalmazott, fiziológiáshoz közeli körülmények között (0,2 M ionerő és 20 °C) a PEVK11 illetve PEVK21 peptidek esetén 2,12 (±0,01) és 2,69 (±0,05) nm voltak. Ezen értékek és a **13. egyenlet** figyelembevételével kapott kontúrhosszak ismeretében a látszólagos perzisztenciahosszak a **14. egyenlet** alapján 0,63 (PEVK11) és 0,48 (PEVK21) nm-nek adódtak.

#### 4.3. Kémiai denaturáció hatása PEVK peptidekre

További kísérletekkel megvizsgáltuk, hogy létezhetnek-e a peptideken belül olyan kölcsönhatások, amelyek kémiai denaturánsok által felbonthatók. Ennek érdekében méréseinkben először guanidin-hidrokloridot (GuHCl) alkalmaztunk. A denaturánst 0-6 M közötti végkoncentrációban adtuk a foszfát pufferbe oldott peptidekhez. A PEVK11 transzferhatásfok értékei növekvő denaturáns koncentráció mellett fokozatosan, kis lépésekben csökkentek 0,56 ( $\pm$ 0,01)-ról 0,41 ( $\pm$ 0,02)-re (**16. ábra**). A PEVK21 esetében

a transzferhatásfok 0,23 ( $\pm$ 0,02)-ról 0,16 ( $\pm$ 0,003)-ra csökkent, azonban a 2-4 M GuHCl koncentráció tartományban a hatásfok meredekebb esését tapasztaltuk. Az energiatranszferben bekövetkező csökkenés megfelel a peptidlánc vég-vég távolság (*R*) növekedésének.



16. ábra. Guanidin-hidroklorid (GuHCl) hatása PEVK peptidek transzfer hatásfokára, a hibahatárok a négy független mérési pont alapján számolt szórást (SD) jelzik. A betétábrákon kinagyítva láthatóak az akceptor nélküli peptidek triptofán emissziós spektrumai.

A triptofán-IAEDANS fluorofór pár Förster-féle kritikus távolságának ( $R_0$ =2,2 nm, [155]) ismeretében ez esetben is kiszámítottuk a transzferhatásfok értékeknek megfelelő vég-vég távolságokat (**3. egyenlet**). Számításaink alapján a rövidebb peptid *R* értéke 2,12 (±0,01) nm-ről 2,34 (±0,03) nm-re, míg a hosszabbik peptidé 2,69 (±0,05) nm-ről 2,91 (±0,01) nm-re nőtt. A vég-vég távolságok alapján számolt perzisztenciahossz értékek, a natív körülmények és a 6 M GuHCl koncentráció közötti különbséget tekintve 0,18 nm-rel növekedtek a PEVK11 és 0,09 nm-rel a PEVK21 esetében.

A **16. ábra** betétábráin kontrollkísérletek eredményei láthatóak, amelyeken az akceptor nélküli peptidek triptofán fluoreszcencia emisszióját ábrázoltuk a GuHCl koncentráció függvényében. A fluoreszcencia intenzitás a denaturáns alkalmazásával mintegy 25-30%-al csökkent és 2 nm-es kékeltolódást mutatott. Érdekes módon 4 és 6 M GuHCl koncentráció között a peptidek visszanyerték emissziós intenzitásuk egy részét.

A továbbiakban méréseinket egy másik ismert denaturálószerrel, ureával is megismételtük és a fentiekhez hasonló eredményt kaptunk. A vég-vég távolságok növekedésének hátterében feltehetőleg az állhat, hogy a peptid oldalláncok közötti hidrofób kölcsönhatásokat a kémiai denaturánsok képesek fokozatosan gyengíteni és végül megszüntetni.

#### 4.4. PEVK peptideken végzett fluoreszcencia élettartam mérések

A fenti steady-state fluoreszcencia spektroszkópiai eredmények igazolása érdekében időfüggő fluoreszcencia méréseket is végeztünk időkorrelált egy-foton számlálás módszerrel különböző denaturáns koncentrációk mellett. A **17. ábrán** két jellemző triptofán fluoreszcencia lecsengési görbe látható. A görbék dupla exponenciális függvénnyel való illesztése adta a legjobb eredményt, mely arra utal, hogy kétféle élettartam populáció állhat a fluoreszcens viselkedés hátterében. GuHCl alkalmazása jelentős mértékben csak a hosszabb élettartam-komponens értékét csökkentette.



17. ábra. IAEDANS-jelölt PEVK11 és PEVK21 peptidek fluoreszcencia lecsengési görbéi. Eredeti adatok (kék illetve vörös színnel jelölve), illesztés (világosszürke görbék) és a készülék válaszfüggvénye (fekete görbék).

A steady-state illetve az élettartam-mérésekből számolt FRET hatásfok értékek összehasonlítását a **2. táblázat** mutatja.

		FRET HATÁSFOK (%)	
peptid	[GuHCl] (M)	steady-state mérés	időkorrelált egy-foton számlálásos mérés
PEVK11	0	55,7	59,8
	3	45,1	49,2
	6	40,8	45,0
PEVK21	0	23,0	23,3
	3	18,1	17,9
	6	15,6	16,2

2. táblázat. Különböző módszerekkel számolt FRET hatásfok értékek összehasonlítása.

Eredményeink alapján kijelenthető, hogy a két különböző módszerrel mért transzfer hatásfok értékek közelítőleg azonosak (a legnagyobb eltérés 4,2%-on belülinek adódott). Mindez igazolja a steady-state módszerrel kapott eredmények érvényességét.

#### 4.5. Ionerő hatása a PEVK peptidek konformációjára

Az ionerősség peptidekre kifejtett hatását növekvő koncentrációjú KCl jelenlétében felvett fluoreszcencia emissziós spektrumokkal vizsgáltuk. A görbékből számolt FRET hatásfokokat a sókoncentráció függvényében ábrázoltuk (**18. ábra**).



**18. ábra.** KCl hatása a PEVK peptidek transzfer hatásfokára. A hibahatárok a szórást (SD) jelzik. A betétábrákon kinagyítva láthatóak az akceptor nélküli peptidek triptofán emissziós spektrumai.

A közeg ionerősségének növelése mindkét peptid esetén egyre nagyobb transzfer hatásfokot eredményezett (6%-os teljes növekmény a PEVK11, illetve 10,3%-os a PEVK21 esetén). Érdekes módon a hosszabb peptid esetében az *E* értéke a 0,2-1,0 M közötti tartományban meredekebben növekedett, mint a rövidebbnél, melynél többé-kevésbé monoton változást tapasztaltunk.

A **18. ábra** betétábráin kontrollkísérletek eredménye látható, ahol növekvő sókoncentráció mellett akceptor nélküli peptideken követtük nyomon a triptofán fluoreszcenciát. Megfigyelhető, hogy a fluoreszcencia emisszió intenzitása mintegy 15%-al csökken 3 M KCl alkalmazásával és ezzel egyidejűleg körülbelül 2 nm-es kékeltolódás is észlelhető.

További mérésekben arra kerestük a választ, hogy befolyásolja-e a peptidek transzfer hatásfokát a kalcium koncentráció változása. Ennek érdekében pCa 9 és pCa 2 között (pCa: a Ca<sup>2+</sup>- koncentráció tízes alapú negatív logaritmusa) fokozatosan emeltük a kalcium koncentrációját. A peptidek FRET hatásfok értékei azonban nem nőttek számottevően, a legnagyobb mértékű növekedés is 2%-on belüli volt (adatok nincsenek feltüntetve).

#### 4.6. Hőmérséklet hatása a PEVK peptidek konformációs dinamikájára

Munkánk során hőmérsékletfüggő fluoreszcencia rezonancia energia transzfer alkalmazásával vizsgáltuk a peptidek szerkezeti dinamikáját és fluktuációit. A hőmérsékletet fokozatosan 10-ről 50 °C-ra emelve, a PEVK21 transzfer hatásfoka 20,7%-ról 24,2%-ra nőtt, míg a PEVK11-nél csak kismértékű változás jelentkezett. Figyelembe véve, hogy a termikus fluktuációk perturbálják a molekula szerkezetét, megvizsgáltuk a peptidek szerkezeti dinamikáját jellemző relatív f' paramétert a 10-50 °C tartományban. A relatív f' (a normált transzfer hatásfok relatív értéke, **4. egyenlet**) hőmérsékletfüggése jellemzi a donor és akceptor közötti fehérjemátrix flexibilitását, oly módon, hogy merevebb szerkezet esetén az f' változása az adott hőmérsékleti tartományon kisebb. A hőmérséklet 40 °C-os emelkedésének hatására a PEVK11 peptid relatív f' értéke mintegy 30%-al, míg a PEVK21 peptidé körülbelül 70%-al nőtt (**19. ábra**).



**19. ábra.** Hőmérséklet hatása a PEVK peptidek relatív f' értékére, a hibahatárok a szórást (SD) jelzik.

A fenti ábra alapján kijelenthető, hogy hőmérséklet függvényében a peptidek relatív f' paraméterében bekövetkező változások nyomvonala eltérő. A rövid peptid esetében a növekedés a hőmérséklet növelésével egyre kisebb mértékű, míg a hosszabb peptid adatsora sokkal meredekebb, a növekedés üteme csak 40 °C felett csillapodik.

#### 4.7. PEVK peptidek molekuláris dinamikai szimulációja

Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk létezhetnek-e tartósan magasabbrendű szerkezeti elemek a peptideken belül, 100 ns időtartamú molekuláris dinamikai szimulációkat alkalmaztunk. A szimulációkat Dr. Hetényi Csaba együttműködő partnerünk végezte. A PEVK21 peptid belső aminosavai esetében az alkalmazott másodlagos szerkezet predikciós szerverek mindegyike α-hélix szerkezetet valószínűsített, míg a PEVK11 peptid esetén a különböző szerverek helikális, rendezetlen lánc vagy ezek kombinációjának lehetőségét jelezték. Így molekuláris mechanikai а energiaminimalizáláshoz és az azt követő egyensúlyi állapothoz vezető folyamat szimulációjához kiindulásként mindkét peptid esetében α-hélix másodlagos szerkezetet használtunk. A szimulációk első 10 ns-os időtartama során a kezdeti α-hélix struktúra részlegesen (PEVK21) vagy teljesen (PEVK11) eltűnt, miközben laza  $\pi$ -hélixek, hajlott és kanyar motívumok jelentek meg (20. ábra).



20. ábra. PEVK11 (A) és PEVK21 (B) peptid 100 ns időtartamú molekuláris dinamikai szimulációja. A színes sávok a másodlagos szerkezet aminosav szintű változásait mutatják. A szerkezeti modelleken a peptidek konformációjában bekövetkező jelentősebb változásokat tüntettük fel.

Az energiaminimalizálást követően az N-terminális triptofán és a C-terminális ciszteinhez konjugált IAEDANS aromás oldallánca közötti távolság 2,2 nm-nek adódott a rövid, illetve 2,9 nm-nek a hosszabb peptid esetében. A PEVK11 végződéseinek aromás oldalláncai igen gyorsan, mintegy 2 ns alatt kevesebb mint 1 nm-re megközelítették egymást (**21. ábra**). A helikális szerkezet ebben az időtartományban még stabil volt, majd felbomlását követően körülbelül 40 ns-ig egy hajlott konformáció tartotta fenn az aromás kontaktust. A PEVK21 esetében a szimuláció első 20 ns-os időtartamában a peptidlánc végeinek kezdeti távolsága szintén kevesebb, mint 1 nm-re csökkent és így is maradt közel 35 ns-ig (**21. ábra**). Ez a hosszú időtartam mutatja, hogy a peptidvégek aromás oldalláncainak kapcsolata viszonylag stabil lehet. Megfigyelhető továbbá, hogy ezen időszak alatt fennmaradt a központi aminosavak helikális (és kanyar) konformációja. Érdekes módon a peptidláncok ötödik pozíciójában levő tirozin oldalláncok is képesek voltak megközelíteni az IAEDANS-jelölt ciszteineket, miközben a terminális gyűrűk távolsága körülbelül 2 nm volt (**20. ábra**).



21. ábra. A PEVK peptidek terminális aromás gyűrűi közötti távolság változása.

#### 4.8. A PPAK fragmentum molekuláris mechanikája

A PPAK fragmentum rugalmasságát egy egyedi molekula mechanikai módszer segítségével, molekuláris erőmérő atomerő-mikroszkóppal vizsgáltuk. A méréseket natív körülmények között 20 °C-on és 0,2 M só koncentráció mellett végeztük.

Az erőmérő atomerő-mikroszkópos kísérletek során a vizsgált molekulát egy rugalmas lapocska végén levő tűvel mechanikailag nyújtottuk (**12. ábra**). Nyújtás hatására az üvegfelszín és a tű között kifeszülő molekulában rugalmas erő lép fel, melyet a vele egyensúlyban levő rugólapka meghajlásának méréséből kapunk meg. Ismételt húzási és visszaengedési ciklusokban erő-megnyúlás görbéket gyűjtöttünk. A nem-lineáris rugalmas erőgörbékre a "féregszerű lánc" (WLC) modell egyenletét illesztettük (**22.** A **ábra**).



22. ábra. A PPAK fragmentum erő-megnyúlás görbéje (A). A húzás folyamatát fekete, a visszaengedési szakaszt piros, a WLC egyenlet illesztését pedig kék görbe jelzi. A hisztogramok a WLC egyenlet alapján számolt kontúrhossz- (B) és perzisztenciahossz (C) értékeket mutatják.

A húzási szakaszon igen ritkán fűrészfog alakú átmenetek is megjelentek, melyek belső szerkezeti átmenettel, vagy több megfogott molekula esetén egy-egy molekula leszakadásával hozhatók összefüggésbe. A visszaengedés során minden esetben egyensúlyi, azaz átmenetektől mentes nem-lineáris görbeszakasz volt megfigyelhető.

A PPAK fragmentum WLC-illesztéssel kapott kontúrhossza  $81 (\pm 13,3)$  nm, perzisztenciahossza 0,68 ( $\pm 0,27$ ) nm (**22. B** és **C ábra**). Az általunk kapott kontúrhossz aránylag jó egyezést mutat a számított kontúrhosszal, ami arra utal, hogy molekuláris mechanikai kísérleteinkben többnyire a végükön fogtuk meg a molekulákat.

## 4.9. A CDAAM az FH1-FH2 konstrukcióval összehasonlítva nagyobb mértékben

#### gyorsítja az aktin polimerizációját

Vizsgálataink során elsőként annak megállapítását tűztük ki célul, hogy a korábban Gould és munkatársai által egér mDia1-en, illetve humán DAAM1-en végzett megfigyelések érvényesek-e az általunk vizsgált *Drosophila* DAAM esetében is. Konkrét kérdésünk tehát az volt, hogy az eredendően autoinhibíciós doménként karakterizált DAD jelenléte képes-e befolyásolni a fehérje aktinnal kialakított kölcsönhatását.

Ehhez a vizsgálathoz elsőként kétféle DAAM konstrukciót használtunk: a korábbi kutatásainkból már ismert FH1-FH2-t, illetve a CDAAM-ot. Az aktin polimerizációjának kinetikáját pirén fluorofórral jelölt aktin segítségével vizsgáltuk kihasználva annak azt a korábban említett tulajdonságát, hogy monomer aktinhoz kötve fluoreszcencia emissziója alacsonyabb, mint filamentális aktinhoz kötése esetén. Ez tehát azt jelenti, hogy a pirén fluoreszcencia emisszió mérésével a polimerizáció folyamata időfüggésben nyomon követhető.



**23. ábra.** A pirén-jelölt aktin fluoreszcencia emissziójának időbeli változása az aktin filamentumok összeszerelődése során különböző DAAM konstrukciók jelenlétében, reprezentatív mérési eredmények.

A 23. ábrán látható, hogy a polimerizáló só, illetve a konstrukciók hozzáadásának hatására a fluoreszcencia intenzitás minden esetben elkezd növekedni, ám különböző sebességgel. Annak érdekében, hogy a növekedés ütemét a különböző minták esetében átláthatóbbá, illetve számszerűsíthetővé tegyük, a 3.4.1. fejezetben leírt módon egyenest illesztettünk a görbék felszálló ágának lineáris, 45-55%-os telítési szakaszára [102]. Ezt követően az illesztésből kapott meredekség-értékeket ábrázoltuk a vizsgált konstrukció koncentrációjának függvényében (24. ábra).



24. ábra. Az aktin polimerizáció sebessége a DAAM koncentráció függvényében.

A 24. ábrán jól látszik, hogy a CDAAM konstrukció képes volt tovább erősíteni az FH1-FH2 aktin polimerizációt fokozó hatását. Érdekes módon azonban önmagában sem a DAD+C, sem pedig a DAD nem befolyásolta az aktin filamentumok összeszerelődését, az általunk vizsgált koncentrációtartományban (24. ábra). További eredményeink szerint a mutáns FH1-FH2-nek nem volt érdemi hatása az aktin polimerizációjára.

# 4.10. A CDAAM és FH1-FH2 konstrukciók hatásainak vizsgálata az aktin polimerizációjának egyes szakaszaira.

A DAAM konstruktok aktin polimerizációjára kifejtett hatásának részletesebb vizsgálata érdekében teljes belső visszaverődésen alapuló fluoreszcencia mikroszkópiai (TIRFM) vizsgálatokat végeztünk. A korábban ismertetettek szerint, ez a módszer a teljes belső visszaverődés során kialakuló evaneszcens gerjesztő mező sajátságai révén lehetővé teszi a minta fedőlemez közeli régióinak szelektív gerjesztését, így

fluoreszcens jelölővel ellátott egyedi aktin filamentumok megfigyelését. Reprezentatív mikroszkópos felvételeken látható (**25. ábra**), hogy mind az FH1-FH2, mind pedig a CDAAM fragmentum jelenléte jelentősen megnöveli az aktin filamentumok számát a formint nem tartalmazó kontrollhoz képest.



25. ábra. Reprezentatív összehasonlító TIRF mikroszkópos felvételek. A felső ábrasor: az aktin spontán polimerizációja. Középső és alsó ábrasor: az aktin polimerizációja DAAM FH1-FH2 és CDAAM jelenlétében.

Mindez arra utal, hogy mindkét konstrukt képes a filamentumok nukleációját katalizálni. A filamentumok növekedési sebességét az aktin filamentumok hosszának időbeli változásából határoztuk meg a 3.5.1. fejezetben leírtak szerint. Az aktin filamentumok spontán növekedési sebessége 2,99 ( $\pm 0,12$ ) alegység/s-nak adódott (26. ábra), összhangban korábban publikált irodalmi adatokkal [153]. Az FH1-FH2 és CDAAM jelenlétében mért elongációs sebességek  $0,30 (\pm 0,08)$ és 0,87 (±0,59) alegység/s-nak adódtak, azaz mindkét konstrukt gátolja az aktin monomerek asszociációját a szöges végen, azonban a CDAAM gátló hatása kevésbé kifejezett. Összhangban a pirén-aktin alkalmazásán alapuló fluoreszcencia spektroszkópiai mérésekkel, sem a DAD+C, sem a DAD, illetve a mutációt hordozó

FH1-FH2 konstrukció sem befolyásolta jelentősen a filamentumok elongációját (26. ábra).



26. ábra. Az aktin monomerek spontán beépülési rátája (első oszlop), illetve 0,5 μM koncentrációban hozzáadott GST vagy formin fehérjékkel.

#### 4.11. A DAD, illetve DAD+C konstrukciók kötnek az aktin monomerhez

Ahogyan azt az előző részben említettük, a DAD domén szerepe az aktin kötésében a polimerizációs görbék esetében megkérdőjelezhető, annak ellenére, hogy a CDAAM konstrukció hatása az aktin polimerizációjára egyértelműen sokkal kifejezettebb, mint az FH1-FH2 konstrukcióé.

Annak megállapítására, hogy a DAD képes-e az aktin monomer kötésére, steadystate fluoreszcencia vizsgálatokat végeztünk Alexa 488-jelölt aktin segítségével. A módszer lényege, hogy a fluorofór anizotrópia-értéke megnő abban az esetben, ha a jelölt molekulához másik fehérje kapcsolódik. Esetünkben tehát célunk volt annak a megállapítása, hogy megváltozik-e a jelölt aktin anizotrópia-értéke valamelyik DAD konstrukció jelenlétében, ami egyértelműen a kötést igazolná a számunkra, és ha igen, milyen DAD koncentráció esetében, tehát mennyire "erős" a kötés. Noha a polimerizációs tesztekben a DAD-nak nem volt hatása az aktin polimerizációjára, szerettük volna kiküszöbölni azt, hogy polimerizáció miatt kapjunk megnövekedett anizotrópia-értéket. Ennek elkerülésére mintáinkhoz hatszoros moláris feleslegben latrunculin A-t adtunk, amely meggátolja az aktin polimerizációját [169], így tehát bármely változás kizárólag a monomer-kötést volt hivatott jelezni számunkra.

Ahogyan az a **27. ábrán** látszik, a jelölt monomer aktinhoz mindkét konstrukció képes kötődni, noha teljesen különböző mértékben. A **9. egyenletet** felhasználva meghatároztuk a két konstrukció aktinhoz való affinitását, amely 0,76 ( $\pm$  0,09)  $\mu$ M-nak adódott DAD+C esetében, míg a C-terminálist nem tartalmazó konstrukció esetében egy ennél lényegesen gyengébb, 43,44 ( $\pm$  1,01)  $\mu$ M affinitás volt mérhető.



27. ábra. A DAAM C-terminálisának szerepe az aktin monomer kötésében.

### 5. MEGBESZÉLÉS

A titin PEVK doménjéről korábbi munkák alapján azt gondolták, hogy nem rendelkezik magasabbrendű szerkezettel és rendezetlen, folyamatosan kitekeredett polipeptidláncként viselkedik [15, 17, 137]. A PEVK mechanikai erőválaszát a WLC modellel írták le [135], amely feltételezi, hogy a lánc különböző szegmensei nem hatnak kölcsön egymással és a perzisztenciahossz (a lánc hajlítómerevségének mértéke) a polimer mentén állandó. További tanulmányok ugyanakkor arra utaltak, hogy másodlagos szerkezeti elemek is jelen lehetnek a PEVK-n belül [82, 83], valamint hogy e régió rugalmassága nem magyarázható kizárólag entrópikus mechanizmusokkal [137].

Hogy megvizsgáljuk, valóban alkalmazható-e az ideális polimerlánc modellje rövid PEVK szakaszokra, a PEVK N-terminális harmadából (*m. soleus* izoforma) egy 11 és egy 21 aminosav hosszúságú peptidet állítottunk elő szilárdfázisú szintézis segítségével. A peptidek N-terminálisukon egy, a natív PEVK szekvenciában is jelenlévő triptofán aminosavat mint donort, C-terminálisukon pedig egy IAEDANS fluorofórt tartalmaztak, mint akceptort. A PEVK11 peptid szekvencia alapján számolt kontúrhossza 4,18 nm, a PEVK21 kontúrhossza pedig 7,98 nm, így – mivel a FRET technika 2-10 nm-es donorakceptor távolságtartományban használható – mindkét peptid vizsgálható fluoreszcencia energia transzfer segítségével. A kísérletek során a triptofán és az IAEDANS között lejátszódó energiatranszfer hatásfokát mértük steady-state fluoreszcencia spektroszkópia segítségével. A transzfer hatásfokot a steady-state FRET méréseket követően időkorrelált egy-foton számlálásos (TCSPC) fluorimetria segítségével is meghatároztuk. A két eltérő mérési módszerrel kapott hatásfok értékek megközelítőleg azonosak voltak (**2. táblázat**), ami megerősítette a steady-state mérések érvényességét.

A mért FRET hatásfok értékek alapján meghatároztuk a peptidek vég-vég távolságát. Ennek birtokában és a 14. egyenlet felhasználásával kiszámítottuk a peptidek látszólagos perzisztenciahosszát, feltételezve, hogy a WLC modellnek megfelelően ideális polimerláncként viselkednek. A natív körülmények között számolt látszólagos perzisztenciahossz érték 0,63 (±0,01) nm volt a PEVK11. és 0,48 (±0,02) nm a PEVK21 esetében. Fontos azonban megjegyezni, hogy ezeket a perzisztenciahossz  $(L_p)$  értékeket a WLC modellre alapozva kaptuk, amely feltételezi, hogy a peptidek rendezetlen szerkezettel bírnak. Nagyobb méretű PEVK szegmensekről korábbi nanomechanikai értekezésekben beszámoltak írt arról. hogy а perzisztenciahossz értéke igen széles tartományban változhat. A konstitutívan kifejeződő PEVK régiók esetében 0,4 és 2,5 nm közötti [81], valamint 0,1 és 2,5 nm közé eső perzisztenciahosszakat mértek [141]. Az értékek széles tartományát az első esetben a láncon belüli prolin aminosavak különböző fokú izomerizációs állapotának, míg az utóbbi esetben a manipulált molekulák változó számának tulajdonítják (az egyedi molekulákra vonatkozó  $L_p$  átlagértéke: 1,4 nm).

Más munkákban a PEVK régiót rekombináns DNS technikákkal felosztották és az egyes szakaszok elasztikus tulajdonságait külön vizsgálták. Sarkar és munkatársai arra a következtetésre jutottak, hogy a különböző PEVK exonokból kifejezett szegmensek hasonló átlagos perzisztenciahosszal rendelkeznek [170]. Ezzel ellentétben, a humán *m. soleus* izoforma PEVK doménjének első, második és harmadik harmadának perzisztenciahossza különböző volt, és 0,7 és 1,4 nm között változott. Munkacsoportunk egy korábbi tanulmánya szerint ez utóbbi variabilitás állhat a PEVK régió hierarchikus, teleszkópszerű viselkedésének hátterében [171]. A PEVK peptidek általunk mért perzisztenciahosszai a fenti értékek tartományának alsó régiójában találhatóak, és hasonlóak a teljesen kitekeredett polipeptidláncok esetén mért értékekhez ( $L_p = 0,4$ -0,44 nm [23, 172, 173]). A PEVK21 peptid alacsonyabb  $L_p$  értéke arra utal, hogy létezhetnek olyan tényezők, melyek hangolják a peptid rugalmasságát és ezáltal a látszólagos perzisztenciahossz csökkenését eredményezik. A két peptid jelentősen eltérő L<sub>p</sub> értéke azt jelzi, hogy nem tekinthetők ideális polimerláncnak, így valószínűleg a WLC modell feltételei sem érvényesek esetükben. Mindez arra utal, hogy az általunk vizsgált PEVK peptidekben a konformációs variabilitások (eltérő perzisztenciahosszak) és/vagy peptidláncon belüli kölcsönhatások is jelen lehetnek.

A kémiai denaturáció során fokozatosan, de némileg eltérő útvonal mentén csökkent a peptidek FRET hatásfoka (**16. ábra**). A PEVK21 esetében a FRET hatásfok esése a 2-4 M denaturáns koncentrációtartományban vált meredekké. A hatásfokok fokozatos csökkenését a lánc vég-vég távolságának növekedése okozza, melyet feltehetően a láncrövidítő, molekulán belüli kölcsönhatások felbomlása indukál. E folyamat hátterében a lánc hidrofób kölcsönhatásainak gyengülése állhat [174]. Mivel mindkét peptid megközelítőleg 40%-ban tartalmaz hidrofób oldalláncú aminosavakat, így valóban lehetséges, hogy belső hidrofób kölcsönhatások stabilizálják a szerkezetet, a lánc rövidülését eredményezve. Kémiai denaturáció hatására ezek a hidrofób kölcsönhatások meggyengülnek és a peptidek vég-vég távolsága megnő.

A fentiek alapján a PEVK21 peptid 2-4 M GuHCl koncentrációtartományban megfigyelhető lépcsőszerű FRET hatásfok változását egy stabilabb térszerkezeti állapot felbomlása okozhatja. Natív körülmények között a triptofánt tartalmazó fehérjék emissziós maximumának értéke 308 és 355 nm között változhat [175]. Érdekes módon GuHCl hozzáadásával a triptofán emissziós spektrumában kismértékű kék-eltolódást észleltünk, amely arra utal, hogy az aminosav lokális környezete apolárisabbá vált. Így elképzelhető, hogy a triptofán oldallánc árnyékolni képes a GuHCl hatására szabaddá váló belső hidrofób aminosav oldalláncokat.

Az eddigiekhez hasonló méréseket növekvő koncentrációjú KCl oldat alkalmazásával is elvégeztük. Eredményeink alapján a növekvő ionerősség hatására a FRET hatásfok megnőtt (**18. ábra**), ami megfelel a peptidek vég-vég távolság csökkenésének. A PEVK11 esetében a hatásfok változása többé-kevésbé monoton, a PEVK21-nél viszont kétfázisú és hangsúlyozottabb: a 0,2-1 M KCl koncentrációtartományban egy meredek növekedés figyelhető meg, majd az ionerőt tovább növelve kisebb lépésekben és fokozatosan történnek a változások.

A jelenség értelmezésében valószínűleg az elektrosztatikus árnyékolás és a hidrofobicitás szerepe emelhető ki. Mindkét peptid szekvenciájában a glutaminsavak adják a töltött aminosavak többségét. Így az elektrosztatikus árnyékolás gyengítheti az intramolekuláris taszítás hatását, és a peptidlánc rövidülését eredményezheti. Zangi és munkatársai beszámoltak arról, hogy az ionerősség növelésével felerősödnek a hidrofób kölcsönhatások [176], amelyek szintén a lánc kontrakcióját okozzák. A PEVK21 peptid esetében látható kétfázisú FRET hatásfok növekedés arra utal, hogy ezen peptid szerkezete stabilabb, mint a PEVK11 peptidé. Megfigyeléseink összhangban vannak korábbi mérési eredményekkel, melyekben az ionerősség csökkentése növelte az izomrostok titin-alapú merevségét [137], illetve a humán fetális titin PEVK domén perzisztenciahosszát [177]. Ily módon, az ionerősség változása finomhangolhatja az izom viszkoelasztikus viselkedését, mivel hatással van a PEVK domén intramolekuláris kölcsönhatásaira.

További kísérleteinkben megvizsgáltuk, hogy a kalcium szint változása hatással van-e a peptidek konformációjára. A FRET hatásfokból számolt vég-vég távolság értékek azonban nem változtak szignifikánsan (0,03 nm-nél kisebb növekedést tapasztaltunk), amikor a kalcium koncentrációját a pCa9-2 közötti tartományban fokozatosan emeltük (adatok nincsenek feltüntetve). Meglepő módon eredményeink arra utalnak, hogy a kalcium szerepe elhanyagolható a vizsgált PEVK peptidek

konformációjának meghatározásában. Labeit és munkatársai ezzel ellentétben a PEVK régió polyE motívumdarabjairól írt munkájukban beszámoltak arról, hogy a kalcium hatására bekövetkező szerkezeti módosulások csökkentik a polyE fragmentumok hajlítómerevségét [178]. Fontos azonban megjegyezni, hogy az általuk vizsgált legrövidebb fragmentum hossza is meghaladta a 100 nm-t, azaz több mint egy nagyságrenddel nagyobb a jelen dolgozatban szereplő PEVK peptidek hosszánál. Az általunk vizsgált peptidek esetén a kalcium hatása feltételezhetően azért elhanyagolható, mert a PEVK szerkezetére gyakorolt kalciumfüggő hatások csak hosszabb láncok esetén nyilvánulnak meg.

Hőmérsékletfüggő méréseinkben a hőmérséklet növelésével a normált FRET hatásfok értéke (relatív f') mindkét peptid esetében nőtt, jóllehet az adatsorok eltérő lefutásúak voltak (**19. ábra**). A PEVK11 esetén a változások kismértékűek és az adatsor alakja ellaposodó. Ezzel szemben a PEVK21 adatsora kétfázisú: a 10-40 °C tartományban a relatív f' értéke egyre meredekebben nőtt, végül a hőmérséklet további emelésére a növekedés üteme csökkent. Korábbi elméleti [156] és kísérletes vizsgálatokban [179] beszámoltak arról, hogy a relatív f' paraméter érzékeny a fehérje lokális konformációjában és a fehérjemátrix rugalmasságában bekövetkező változásokra. A hőmérséklet növelésével konformációs fluktuációk válthatók ki, melyekkel perturbálni lehet a fehérjék szerkezetét. A hőmérséklet függvényében monoton növekvő relatív f' paraméter a fehérjemátrix flexibilitását jellemzi: minél nagyobb a meredekség, annál rugalmasabb a mátrix [156, 179].

A hosszabb peptid relatív f' paraméterének hőmérséklet függvényében kapott nagyobb általános meredeksége jelzi, hogy a PEVK21 általános peptidmátrix rugalmassága nagyobb, mint a PEVK11 esetében. Megfigyelésünk összhangban van a peptidek natív körülmények esetén számolt látszólagos perzisztenciahosszával. A PEVK21 0,48 (±0,02) nm-es perzisztenciahossz értékéből flexibilisebb (kisebb hajlítómerevségű) peptidláncra következtethetünk, mint a PEVK11 esetében, melynek látszólagos perzisztenciahossza 0,63 (±0,01) nm-nek adódott. Az általános lefutáson felül a peptidek relatív f' görbéin különböző meredekség figyelhető meg az egyes szakaszok, hőmérséklettartományok esetén. Az adatsorok meredekségének határozott változását leggyakrabban a konformációs állapot megváltozásával magyarázzák [179]. Mivel a PEVK peptidek esetén ezek nem egy adott hőmérsékletnél megfigyelhető határozott változásokat jelentenek, a hatás kézenfekvő magyarázata az lehet, hogy a peptidek több, egymástól alacsony energiagátakkal elválasztott konformációs állapoton haladnak át a hőmérséklet emelése során. A hőmérséklet hatása kifejezettebb a PEVK21 peptid esetében, ahol a relatív f' paraméter hőmérsékletfüggése meredekebb és kétfázisú. Hőmérsékletfüggő vizsgálataink eredménye alapján tehát úgy tűnik, hogy a PEVK21 szerkezete stabilabb a rövid peptidéhez hasonlítva.

A PEVK peptideken végrehajtott molekuláris dinamikai szimulációk azt mutatták, hogy a PEVK21 peptidláncának magja laza helikális szerkezetű, míg a PEVK11 jól meghatározható másodlagos szerkezetek között fluktuál (**20. ábra.**). Eredményeinkkel összhangban, Duan és munkatársai szintén magas  $\alpha$ -helikális tartalmat valószínűsítettek PEVK peptidekre (az általuk vizsgált E115-ös peptid C-terminálisa az utolsó aminosav kivételével megegyezik a PEVK21-el), jóllehet ezeket a predikciókat nem támasztották alá cirkuláris dikroizmuson alapuló méréseik [180]. Szimulációink a PEVK21 esetében egy megközelítőleg két fordulat hosszúságú  $\alpha$ -helikális szegmenst mutattak ki, amelynek jelenléte hatással lehet a peptid kontúrhosszára is. Ha a hét aminosav hosszúságú rendezetlen szerkezetű (kitekeredett) szakasz kontúrhosszát (7 × 0,38 nm = 2,66 nm), egy két fordulatos hélix tengelymenti hosszával (2 × 0,54 nm = 1,08 nm) helyettesítjük, a PEVK21 szekvencia alapján számolt kontúrhossza 7,98 nm-ről 6,4 nmre csökken, látszólagos perzisztenciahossza pedig 0,48 nm-ről 0,62 nm-re nő. A peptidláncok rövidülésében a terminális aromás oldalláncoknak is szerepe lehet, mivel kapcsolatuk viszonylag hosszan fennmaradt.

Erőmérő atomerő-mikroszkópos méréseink során egy 224 aminosav hosszúságú PEVK szakaszt, a PPAK fragmentumot vizsgáltuk. A fragmentum erő-megnyúlás görbéire a "féregszerű lánc" (WLC) modell egyenletét illesztettük. Bár a 11 illetve 21 aminosav hosszúságú peptidek esetén a FRET módszerrel kapott eredmények arra utaltak, hogy azok viselkedése eltér a WLC modell alapján várttól, az AFM segítségével kapott erő-megnyúlás görbéken nem voltak megfigyelhetők szerkezeti átmenetekre utaló jelek, és a görbe sem tért el lényegesen a WLC egyenlettel illeszthető alaktól. Ennek oka az lehet, hogy az atomerő-mikroszkóp, a rugólapka viszonylag nagy rugóállandója miatt valószínűleg nem érzékeny a finom, több kisebb lépésben lezajló szerkezeti átmenetekre. A natív körülmények között elvégzett kísérleteink alapján a fragmentum perzisztenciahossza 0,68 (±0,27) nm-nek adódott (**22. c ábra**). Ez az érték összemérhető a PEVK11 peptid hasonló körülmények között kivitelezett FRET mérései

során kapott 0,63 (±0,01) nm-es látszólagos perzisztenciahosszával, viszont meghaladja a PEVK21 0,48 (±0,02) nm-es értékét.

Elképzelhető, hogy a PEVK rendezetlen szerkezetű, illetve szerkezet nélküli egysége mintegy 10 aminosav hosszúságú, mindazonáltal, átmeneti kölcsönhatások, például elektrosztatikus vagy hidrofób kölcsönhatások megjelenhetnek hosszabb szakaszokban. Ilyen gyenge kölcsönhatások a PEVK rugalmasságához entalpikus komponensek formájában járulhatnak hozzá, amelyet Linke és munkatársai korábban felvetettek [137]. Figyelembe véve, hogy ezen kölcsönhatások mértékét külső, például az oldószer által meghatározott tényezők befolyásolják, ez lehetőséget teremt a titin látszólagos rugalmasságának dinamikus módosítására, akár gyors környezeti változások hatására. A két általunk használt peptid a polyE szekvenciamotívumok csoportjához tartozik, amelyek a PEVK szekvenciájának csak kisebb hányadát alkotják. Mindazonáltal, mivel nincs lényeges különbség az általunk vizsgált peptidek és a PEVK általános aminosav összetétele között, lévén hogy mindkettő tartalmaz aminosavakat, amelyek részt vehetnek elektrosztatikus vagy hidrofób kölcsönhatásokban, lehetségesnek tartjuk, hogy eredményeink extrapolálhatóak más PEVK fragmentumokra vagy akár a teljes PEVK szakaszra is.

A DAAM formin konstrukciókkal végzett aktin polimerizációs tesztek során egyenest illesztettünk a görbék felszálló ágának lineáris, 45-55%-os telítési szakaszára. Az illesztés meredekségéből a következő következtetéseket vonhatjuk le a filamentumok összeszerelődésére vonatkozóan. Megfigyeltük egyrészt, hogy a DAAM C-terminális szakaszai önmagukban nem képesek az aktin filamentumok összeszerelődését elősegíteni, azonban az FH2 aktinnal kialakított kölcsönhatását befolyásolják olyan módon, hogy az FH2 domén aktivitását fokozzák (24. ábra). A CDAAM konstrukcióval végzett polimerizációs tesztjeink ugyanis azt mutatták, hogy ha megjelenik az aktin monomert kötő (ám önmagában nem nukleáló) DAD szakasz a molekulán belül, a fehérje aktin polimerizációját fokozó hatása jelentősen megnő. Mivel a két konstrukt között csupán a C-terminális DAD+C régió jelenlétének köszönhető az eltérés, eredményeink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy ez a szakasz befolyásolja az FH2 domén aktinnal kialakított kölcsönhatását, összhangban korábbi irodalmi adatokkal [129]. Megállapítható, hogy a Drosophila DAAM esetében is, mint más forminok vonatkozó régióiról korábban lejegyzett, polimerizációt elősegítő "extra" hatás igazolást nyert. A DAD+C régió ezen szerepének in vivo fiziológiai relevanciája,

valamint pontos molekuláris alapjai még nem ismertek, ezek felderítése kutatócsoportunk jelenlegi vizsgálatainak az alapját képezi.

Xu és munkatársai az élesztő Bni1 forminjáról írt korábbi munkájukban beszámoltak egy nukleációt gátló mutációról az FH2 doménben [101]. Hasonló hatásról számoltak be együttműködő partnereink az ecetmuslica DAAM FH2 doménjében létrehozott analóg pontmutáció alkalmazásával [60]. Polimerizációs tesztjeink során megfigyeltük, hogy ennek a mutáns FH1-FH2 konstruktnak nincs hatása az aktin polimerizációjára (**24. ábra**). Így a korábban *in vivo* megfigyelt, az FH2 domén nukleáló hatását eltörlő mutáció szerepe *in vitro* is beigazolódott. Tehát ez a konstrukció kiválóan alkalmas arra, hogy jövőbeli munkánk során az FH2-n kívüli régiókat az FH2 domén "zavaró" hatása nélkül tanulmányozhassuk.

Mint azt már korábban említettük, fluoreszcencia spektroszkópiai eredményeink arra utalnak, hogy a DAAM formin C-terminális régiója fontos szerepet játszik az aktinformin kölcsönhatás kialakításában, viszont a pirén jelölt aktin polimerizációjának sebessége nem változott a DAD konstrukt jelenlétében. Mindamellett a DAD-ot és FH2-t is tartalmazó konstrukció jelentős mértékben gyorsította a polimerizációt. Mivel a fluorimetriás módszerek alkalmazásával nehézkes az egyedi molekulák kinetikájának vizsgálata, TIRF mikroszkópos mérési módszert alkalmaztunk annak eldöntésére, hogy a polimerizáció mely (nukleációs illetve elongációs) szakaszára milyen mértékben hatnak a fent említett fehérjék.

Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a DAAM DAD+C/DAD doménjeinek önmagukban nincsen hatásuk az elongációra, tehát az aktin monomert kötő tulajdonságuk nem befolyásolja a polimerizáció ezen szakaszát. A korábban az irodalomban már leírt megfigyelés, miszerint az FH2 domén sapkafehérjeként működik [101], igazolást nyert (**25. ábra**). Az elongációs sebességek ismeretében viszont azt is megállapíthatjuk, hogy a DAD-ot és FH2-t is tartalmazó CDAAM konstrukció kisebb mértékben gátolja a hossznövekedést, mint az FH2-t tartalmazó (**26. ábra**). Ezzel igazolást nyerhet az a feltételezés, hogy a DAD domén fiziológiás funkciójának betöltéséhez elengedhetetlen az FH2 domén jelenléte, az azzal való akár direkt, akár indirekt kölcsönhatás miatt. Igaz lehet mindez annak fényében is, hogy a DAD doménaktin monomer kötődés az FH2 domén nélkül is létrejöhet.

A DAAM formin konstrukciókkal elvégzett steady-state fluoreszcencia anizotrópia mérések alapján arra következtethetünk, hogy a *Drosophila* DAAM autoinhibíciós doménje képes az aktin monomert megkötni, ám a kötés erőssége szempontjából

meghatározó az a pár aminosav, amely a kifejezetten DAD doménnek nevezett szakasztól C-terminális irányban helyezkedik el (**27. ábra**). Ezen pár aminosav jelenléte mintegy ötvenszeresére növelheti a DAD domén aktin monomerez való affinitását. Ez annak fényében különösen érdekes, hogy az elsőként ebben a témában publikált eredmények (egy ugyancsak Diaphanous típusú formin esetében) arra utaltak, hogy a DAD doménen kívüli, egészen pontosan az attól C-terminálisan elhelyezkedő aminosavaknak nincsen hatásuk a DAD aktin-kötésére [129]. Ez arra enged következtetni, hogy az egyes formin családok tagjai között a domének szintjén is fennállhat funkcionális különbség.

Kísérleteink így a forminok C-terminális szakaszának egy eddig nem ismert tulajdonságára derítettek fényt. Ha emellé hozzátesszük, hogy az idézett munkában a DAD domén hatással volt az aktin polimerizációjára, felmerül a kérdés, hogy a két formin család aktin nukleációjára, illetve polimerizációjára kifejtett hatása, illetve ezen belül a DAD szerepe eltérő-e?

Ez, a formin családok aktinra kifejtett hatása közötti apró különbség, illetve működésbeli különbözőség szolgálhat talán magyarázatul arra, hogy miért létezik olyan sokféle formin fehérje, és mi lehet az indoka azok szövetspecifikus lokalizációjának és funkciójának.

## 6. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk első részében a *m. soleus* titin izoforma PEVK doménjének konformációját vizsgáltuk 11- illetve 21 aminosav hosszúságú szintetikus PEVK peptidek és egy 224 aminosav hosszúságú PPAK fragmentum felhasználásával.

- A peptideken végzett fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer mérések segítségével meghatároztuk azok vég-vég távolságát (*R*). Fiziológiáshoz közeli körülmények között a PEVK11 illetve PEVK21 peptidek *R* értékei 2,12 (±0,01) illetve 2,69 (±0,05) nm voltak.
- A "féregszerű lánc" (WLC) modellre alapozva kiszámoltuk a peptidlánc hajlítómerevségét jellemző látszólagos perzisztenciahosszakat (L<sub>p</sub>), melyek natív körülmények között 0,63 (PEVK11) és 0,48 (PEVK21) nm-nek adódtak. A két peptid jelentősen eltérő L<sub>p</sub> értéke a perzisztenciahossz lánc menti változásaival és/vagy a peptidláncon belüli kölcsönhatások jelenlétével magyarázható, és azt jelzi, hogy nem tekinthetők ideális polimerláncnak, így a WLC modell valószínűleg nem érvényes az esetükben.
- Kémiai denaturáció során a peptidek vég-vég távolsága megnőtt, ami a peptidláncon belüli hidrofób kölcsönhatások létére illetve meggyengülésére utal.
- Az ionerősség növelésével a vég-vég távolságok csökkenését tapasztaltuk. Ennek lehetséges magyarázata, hogy az elektrosztatikus árnyékolás gyengítheti a peptideken belüli, láncmerevítő hatású intramolekuláris taszítás hatását.
- A kalciumnak a PEVK szerkezetére gyakorolt hatása elhanyagolható volt.
- Hőmérsékletfüggő méréseink alapján a relatív f' paraméterének hőmérséklet függvényében kapott nagyobb általános meredeksége azt jelzi, hogy a PEVK21 esetében a peptidmátrix rugalmassága nagyobb, mint a PEVK11 esetében.
- A peptideken végrehajtott molekuláris dinamikai szimulációk a PEVK21 szerkezetében egy megközelítőleg két fordulat hosszúságú α-helikális szegmenst valószínűsítettek, míg a PEVK11 jól meghatározható másodlagos szerkezetek között fluktuált.
- Az erőmérő atomerő-mikroszkópos méréseink során a PPAK fragmentum perzisztenciahossza 0,68 (±0,27) nm-nek adódott, amely összemérhető a FRET mérési módszerek segítségével kapott perzisztenciahossz értékekkel.

Kutatómunkám másik részében a Drosophila DAAM fehérje C-terminális régiójának az aktin filamentális rendszer szervezésében betöltött szerepét vizsgáltam.

- A polimerizációs tesztek során a CDAAM konstrukt az FH1-FH2-vel összehasonlítva fokozottabban gyorsította az aktin polimerizációját.
- Az FH2 domén nukleációs aktivitását megszüntette az I732A mutáció, igazolva a korábbi *in vivo* megfigyeléseket.
- A teljes belső visszaverődésen alapuló fluoreszcencia mikroszkópos kísérletek alapján a DAAM DAD doménje önmagában nem volt hatással az elongációra, viszont az is megállapítható, hogy a CDAAM kisebb mértékben gátolja a hossznövekedést, mint az FH1-FH2 konstrukció.
- A DAD/DAD+C konstrukciók a polimerizációs kinetikára nem voltak hatással, azonban anizotrópia értékeik megnövekedése arra utal, hogy képesek az aktin monomerek kötésére.
- A DAD+C konstrukció esetében a C-terminális irányban elhelyezkedő aminosavaknak jelentős szerepe van az aktin monomerek kötésében.

#### HIVATKOZOTT IRODALOM

- Huxley, H. And J. Hanson, Changes In The Cross-Striations Of Muscle During Contraction And Stretch And Their Structural Interpretation. Nature, 1954. 173(4412): P. 973-6.
- Carlsen, F., G.G. Knappeis, And F. Buchthal, Ultrastructure Of The Resting And Contracted Striated Muscle Fiber At Different Degrees Of Stretch. J Biophys Biochem Cytol, 1961. 11: P. 95-117.
- 3. Huxley, A.F. And L.D. Peachey, The Maximum Length For Contraction In Vertebrate Straiated Muscle. J Physiol, 1961. 156: P. 150-65.
- 4. Sjostrand, F.S., The Connections Between A- And I-Band Filaments In Striated Frog Muscle. J Ultrastruct Res, 1962. 7: P. 225-46.
- Funatsu, T., Et Al., Elastic Filaments In Situ In Cardiac Muscle: Deep-Etch Replica Analysis In Combination With Selective Removal Of Actin And Myosin Filaments. J Cell Biol, 1993. 120(3): P. 711-24.
- Trombitas, K. And A. Tigyi-Sebes, Direct Evidence For Connecting C Filaments In Flight Muscle Of Honey Bee. Acta Biochim Biophys Acad Sci Hung, 1974. 9(3): P. 243-53.
- Garamvolgyi, N., The Structural Basis Of The Elastic Properties In The Flight Muscle Of The Bee. J Ultrastruct Res, 1969. 27(5): P. 462-71.
- Guba, F., G. Harsanyi, And P. Kovacs, [Physico-Chemical Study Of Fibrillin In An Alkaline Urea Solution]. Kiserl Orvostud, 1964. 16: P. 35-9.
- Guba, F. And G. Harsanyi, [Isolation And Chemical Analysis Of Fibrillin, A New Myofibrillar Albumin]. Kiserl Orvostud, 1964. 16: P. 28-34.
- Maruyama, K., Et Al., Connectin, An Elastic Protein Of Muscle. Characterization And Function. J Biochem, 1977. 82(2): P. 317-37.
- Wang, K., J. Mcclure, And A. Tu, Titin: Major Myofibrillar Components Of Striated Muscle. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. 76(8): P. 3698-702.
- Maruyama, K., Et Al., Connectin, An Elastic Protein Of Muscle. Identification Of "Titin" With Connectin. J Biochem, 1981. 89(3): P. 701-9.

- Furst, D.O., Et Al., The Organization Of Titin Filaments In The Half-Sarcomere Revealed By Monoclonal Antibodies In Immunoelectron Microscopy: A Map Of Ten Nonrepetitive Epitopes Starting At The Z Line Extends Close To The M Line. J Cell Biol, 1988. 106(5): P. 1563-72.
- Trinick, J., P. Knight, And A. Whiting, Purification And Properties Of Native Titin. J Mol Biol, 1984. 180(2): P. 331-56.
- Labeit, S. And B. Kolmerer, Titins: Giant Proteins In Charge Of Muscle Ultrastructure And Elasticity. Science, 1995. 270(5234): P. 293-6.
- Freiburg, A., Et Al., Series Of Exon-Skipping Events In The Elastic Spring Region Of Titin As The Structural Basis For Myofibrillar Elastic Diversity. Circ Res, 2000. 86(11): P. 1114-21.
- Labeit, S., B. Kolmerer, And W.A. Linke, The Giant Protein Titin. Emerging Roles In Physiology And Pathophysiology. Circ Res, 1997. 80(2): P. 290-4.
- Horowits, R., The Physiological Role Of Titin In Striated Muscle. Rev Physiol Biochem Pharmacol, 1999. 138: P. 57-96.
- Horowits, R., Et Al., A Physiological Role For Titin And Nebulin In Skeletal Muscle. Nature, 1986. 323(6084): P. 160-4.
- Horowits, R. And R.J. Podolsky, The Positional Stability Of Thick Filaments In Activated Skeletal Muscle Depends On Sarcomere Length: Evidence For The Role Of Titin Filaments. J Cell Biol, 1987. 105(5): P. 2217-23.
- Kellermayer, M.S., Et Al., Folding-Unfolding Transitions In Single Titin Molecules Characterized With Laser Tweezers. Science, 1997. 276(5315): P. 1112-6.
- 22. Tskhovrebova, L., Et Al., Elasticity And Unfolding Of Single Molecules Of The Giant Muscle Protein Titin. Nature, 1997. 387(6630): P. 308-12.
- Rief, M., Et Al., Reversible Unfolding Of Individual Titin Immunoglobulin Domains By Afm. Science, 1997. 276(5315): P. 1109-12.
- Woychik, R.P., Et Al., An Inherited Limb Deformity Created By Insertional Mutagenesis In A Transgenic Mouse. Nature, 1985. 318(6041): P. 36-40.
- 25. Woychik, R.P., Et Al., 'Formins': Proteins Deduced From The Alternative Transcripts Of The Limb Deformity Gene. Nature, 1990. 346(6287): P. 850-3.

- Brown, E.J., Et Al., Mutations In The Formin Gene Inf2 Cause Focal Segmental Glomerulosclerosis. Nat Genet, 2010. 42(1): P. 72-6.
- Wooten, E.C., Et Al., Formin Homology 2 Domain Containing 3 Variants Associated With Hypertrophic Cardiomyopathy. Circ Cardiovasc Genet, 2013. 6(1): P. 10-8.
- Pruyne, D., Et Al., Role Of Formins In Actin Assembly: Nucleation And Barbed-End Association. Science, 2002. 297(5581): P. 612-5.
- 29. 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.
- Sagot, I., Et Al., An Actin Nucleation Mechanism Mediated By Bni1 And Profilin. Nat Cell Biol, 2002. 4(8): P. 626-31.
- Mullins, R.D., J.A. Heuser, And T.D. Pollard, The Interaction Of Arp2/3 Complex With Actin: Nucleation, High Affinity Pointed End Capping, And Formation Of Branching Networks Of Filaments. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(11): P. 6181-6.
- Blanchoin, L., Et Al., Direct Observation Of Dendritic Actin Filament Networks Nucleated By Arp2/3 Complex And Wasp/Scar Proteins. Nature, 2000. 404(6781): P. 1007-11.
- Campellone, K.G. And M.D. Welch, A Nucleator Arms Race: Cellular Control Of Actin Assembly. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. 11(4): P. 237-51.
- Qualmann, B. And M.M. Kessels, New Players In Actin Polymerization--Wh2-Domain-Containing Actin Nucleators. Trends Cell Biol, 2009. 19(6): P. 276-85.
- Baum, B. And P. Kunda, Actin Nucleation: Spire Actin Nucleator In A Class Of Its Own. Curr Biol, 2005. 15(8): P. R305-8.
- Winckler, B. And D.A. Schafer, Cordon-Bleu: A New Taste In Actin Nucleation. Cell, 2007. 131(2): P. 236-8.
- Chereau, D., Et Al., Leiomodin Is An Actin Filament Nucleator In Muscle Cells. Science, 2008. 320(5873): P. 239-43.
- Jewett, T.J., Et Al., Chlamydial Tarp Is A Bacterial Nucleator Of Actin. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(42): P. 15599-604.
- Paul, A.S. And T.D. Pollard, The Role Of The Fh1 Domain And Profilin In Formin-Mediated Actin-Filament Elongation And Nucleation. Curr Biol, 2008. 18(1): P. 9-19.
- 40. Paul, A.S. And T.D. Pollard, Review Of The Mechanism Of Processive Actin Filament Elongation By Formins. Cell Motil Cytoskeleton, 2009. 66(8): P. 606-17.
- Gregorio, C.C., Et Al., The Nh2 Terminus Of Titin Spans The Z-Disc: Its Interaction With A Novel 19-Kd Ligand (T-Cap) Is Required For Sarcomeric Integrity. J Cell Biol, 1998. 143(4): P. 1013-27.
- Gregorio, C.C., Et Al., Muscle Assembly: A Titanic Achievement? Curr Opin Cell Biol, 1999. 11(1): P. 18-25.
- Ohtsuka, H., Et Al., Binding Of The N-Terminal 63 Kda Portion Of Connectin/Titin To Alpha-Actinin As Revealed By The Yeast Two-Hybrid System. Febs Lett, 1997. 401(1): P. 65-7.
- Trombitas, K. And H. Granzier, Actin Removal From Cardiac Myocytes Shows That Near Z Line Titin Attaches To Actin While Under Tension. Am J Physiol, 1997. 273(2 Pt 1): P. C662-70.
- 45. Linke, W.A., Et Al., Actin-Titin Interaction In Cardiac Myofibrils: Probing A Physiological Role. Biophys J, 1997. 73(2): P. 905-19.
- Trinick, J.A., End-Filaments: A New Structural Element Of Vertebrate Skeletal Muscle Thick Filaments. J Mol Biol, 1981. 151(2): P. 309-14.
- Liversage, A.D., Et Al., Titin And The Sarcomere Symmetry Paradox. J Mol Biol, 2001. 305(3): P. 401-9.
- Trombitas, K., Et Al., Nature And Origin Of Gap Filaments In Striated Muscle. J Cell Sci, 1991. 100 (Pt 4): P. 809-14.
- Houmeida, A., Et Al., Studies Of The Interaction Between Titin And Myosin. J Cell Biol, 1995. 131(6 Pt 1): P. 1471-81.
- Labeit, S., Et Al., Towards A Molecular Understanding Of Titin. Embo J, 1992. 11(5): P. 1711-6.
- 51. Obermann, W.M., Et Al., Molecular Structure Of The Sarcomeric M Band: Mapping Of Titin And Myosin Binding Domains In Myomesin And The Identification Of A Potential Regulatory Phosphorylation Site In Myomesin. Embo J, 1997. 16(2): P. 211-20.

- Iskratsch, T., Et Al., Formin Follows Function: A Muscle-Specific Isoform Of Fhod3 Is Regulated By Ck2 Phosphorylation And Promotes Myofibril Maintenance. J Cell Biol, 2010. 191(6): P. 1159-72.
- Taniguchi, K., Et Al., Mammalian Formin Fhod3 Regulates Actin Assembly And Sarcomere Organization In Striated Muscles. J Biol Chem, 2009. 284(43): P. 29873-81.
- Kan, O.M., Et Al., Mammalian Formin Fhod3 Plays An Essential Role In Cardiogenesis By Organizing Myofibrillogenesis. Biol Open, 2012. 1(9): P. 889-96.
- Kan-O, M., Et Al., Expression And Subcellular Localization Of Mammalian Formin Fhod3 In The Embryonic And Adult Heart. Plos One, 2012. 7(4): P. E34765.
- Staus, D.P., Et Al., Formin Homology Domain-Containing Protein 1 Regulates Smooth Muscle Cell Phenotype. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011. 31(2): P. 360-7.
- Mi-Mi, L., Et Al., Z-Line Formins Promote Contractile Lattice Growth And Maintenance In Striated Muscles Of C. Elegans. J Cell Biol, 2012. 198(1): P. 87-102.
- Habas, R., Y. Kato, And X. He, Wnt/Frizzled Activation Of Rho Regulates Vertebrate Gastrulation And Requires A Novel Formin Homology Protein Daam1. Cell, 2001. 107(7): P. 843-54.
- Rosado, M., Et Al., Critical Roles For Multiple Formins During Cardiac Myofibril Development And Repair. Mol Biol Cell, 2014. 25(6): P. 811-27.
- Molnar, I., Et Al., Daam Is Required For Thin Filament Formation And Sarcomerogenesis During Muscle Development In Drosophila. Plos Genet, 2014. 10(2): P. E1004166.
- Tskhovrebova, L. And J. Trinick, Titin: Properties And Family Relationships. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. 4(9): P. 679-89.
- 62. Granzier, H.L. And S. Labeit, The Giant Protein Titin: A Major Player In Myocardial Mechanics, Signaling, And Disease. Circ Res, 2004. 94(3): P. 284-95.
- Labeit, S., Et Al., A Regular Pattern Of Two Types Of 100-Residue Motif In The Sequence Of Titin. Nature, 1990. 345(6272): P. 273-6.

- 64. Improta, S., Et Al., The Assembly Of Immunoglobulin-Like Modules In Titin: Implications For Muscle Elasticity. J Mol Biol, 1998. 284(3): P. 761-77.
- Goll, C.M., A. Pastore, And M. Nilges, The Three-Dimensional Structure Of A Type I Module From Titin: A Prototype Of Intracellular Fibronectin Type Iii Domains. Structure, 1998. 6(10): P. 1291-302.
- 66. Mrosek, M., Et Al., Molecular Determinants For The Recruitment Of The Ubiquitin-Ligase Murf-1 Onto M-Line Titin. Faseb J, 2007. 21(7): P. 1383-92.
- 67. Mayans, O., Et Al., Structural Basis For Activation Of The Titin Kinase Domain During Myofibrillogenesis. Nature, 1998. 395(6705): P. 863-9.
- Benian, G.M., Et Al., Sequence Of An Unusually Large Protein Implicated In Regulation Of Myosin Activity In C. Elegans. Nature, 1989. 342(6245): P. 45-50.
- Benian, G.M., A. Ayme-Southgate, And T.L. Tinley, The Genetics And Molecular Biology Of The Titin/Connectin-Like Proteins Of Invertebrates. Rev Physiol Biochem Pharmacol, 1999. 138: P. 235-68.
- Kontrogianni-Konstantopoulos, A., Et Al., Muscle Giants: Molecular Scaffolds In Sarcomerogenesis. Physiol Rev, 2009. 89(4): P. 1217-67.
- Gautel, M., Et Al., The Central Z-Disk Region Of Titin Is Assembled From A Novel Repeat In Variable Copy Numbers. J Cell Sci, 1996. 109 (Pt 11): P. 2747-54.
- Peckham, M., P. Young, And M. Gautel, Constitutive And Variable Regions Of Z-Disk Titin/Connectin In Myofibril Formation: A Dominant-Negative Screen. Cell Struct Funct, 1997. 22(1): P. 95-101.
- Sorimachi, H., Et Al., Tissue-Specific Expression And Alpha-Actinin Binding Properties Of The Z-Disc Titin: Implications For The Nature Of Vertebrate Z-Discs. J Mol Biol, 1997. 270(5): P. 688-95.
- Linke, W.A., Sense And Stretchability: The Role Of Titin And Titin-Associated Proteins In Myocardial Stress-Sensing And Mechanical Dysfunction. Cardiovasc Res, 2008. 77(4): P. 637-48.
- 75. Greaser, M.L., Et Al., Developmental Changes In Rat Cardiac Titin/Connectin: Transitions In Normal Animals And In Mutants With A Delayed Pattern Of Isoform Transition. J Muscle Res Cell Motil, 2005. 26(6-8): P. 325-32.

- Wang, K., Et Al., Regulation Of Skeletal Muscle Stiffness And Elasticity By Titin Isoforms: A Test Of The Segmental Extension Model Of Resting Tension. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. 88(16): P. 7101-5.
- 77. Bang, M.L., Et Al., The Complete Gene Sequence Of Titin, Expression Of An Unusual Approximately 700-Kda Titin Isoform, And Its Interaction With Obscurin Identify A Novel Z-Line To I-Band Linking System. Circ Res, 2001. 89(11): P. 1065-72.
- Cazorla, O., Et Al., Differential Expression Of Cardiac Titin Isoforms And Modulation Of Cellular Stiffness. Circ Res, 2000. 86(1): P. 59-67.
- Greaser, M., Identification Of New Repeating Motifs In Titin. Proteins, 2001.
  43(2): P. 145-9.
- Greaser, M.L., Et Al., Species Variations In Cdna Sequence And Exon Splicing Patterns In The Extensible I-Band Region Of Cardiac Titin: Relation To Passive Tension. J Muscle Res Cell Motil, 2002. 23(5-6): P. 473-82.
- Li, H., Et Al., Multiple Conformations Of Pevk Proteins Detected By Single-Molecule Techniques. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(19): P. 10682-6.
- Ma, K., L. Kan, And K. Wang, Polyproline Ii Helix Is A Key Structural Motif Of The Elastic Pevk Segment Of Titin. Biochemistry, 2001. 40(12): P. 3427-38.
- Ma, K. And K. Wang, Malleable Conformation Of The Elastic Pevk Segment Of Titin: Non-Co-Operative Interconversion Of Polyproline Ii Helix, Beta-Turn And Unordered Structures. Biochem J, 2003. 374(Pt 3): P. 687-95.
- Furst, D.O. And M. Gautel, The Anatomy Of A Molecular Giant: How The Sarcomere Cytoskeleton Is Assembled From Immunoglobulin Superfamily Molecules. J Mol Cell Cardiol, 1995. 27(4): P. 951-9.
- Muhle-Goll, C., Et Al., Structural And Functional Studies Of Titin's Fn3 Modules Reveal Conserved Surface Patterns And Binding To Myosin S1--A Possible Role In The Frank-Starling Mechanism Of The Heart. J Mol Biol, 2001. 313(2): P. 431-47.
- Tskhovrebova, L. And J. Trinick, Properties Of Titin Immunoglobulin And Fibronectin-3 Domains. J Biol Chem, 2004. 279(45): P. 46351-4.
- Gautel, M., The Super-Repeats Of Titin/Connectin And Their Interactions: Glimpses At Sarcomeric Assembly. Adv Biophys, 1996. 33: P. 27-37.

- Bennett, P.M. And M. Gautel, Titin Domain Patterns Correlate With The Axial Disposition Of Myosin At The End Of The Thick Filament. J Mol Biol, 1996. 259(5): P. 896-903.
- Freiburg, A. And M. Gautel, A Molecular Map Of The Interactions Between Titin And Myosin-Binding Protein C. Implications For Sarcomeric Assembly In Familial Hypertrophic Cardiomyopathy. Eur J Biochem, 1996. 235(1-2): P. 317-23.
- Head, J.G., Et Al., Stability And Folding Rates Of Domains Spanning The Large A-Band Super-Repeat Of Titin. Biophys J, 2001. 81(3): P. 1570-9.
- 91. Furst, D.O., U. Vinkemeier, And K. Weber, Mammalian Skeletal Muscle C-Protein: Purification From Bovine Muscle, Binding To Titin And The Characterization Of A Full-Length Human Cdna. J Cell Sci, 1992. 102 (Pt 4): P. 769-78.
- Centner, T., Et Al., Identification Of Muscle Specific Ring Finger Proteins As Potential Regulators Of The Titin Kinase Domain. J Mol Biol, 2001. 306(4): P. 717-26.
- Kolmerer, B., Et Al., Genomic Organization Of M Line Titin And Its Tissue-Specific Expression In Two Distinct Isoforms. J Mol Biol, 1996. 256(3): P. 556-63.
- 94. Kolmerer, B., Et Al., The Titin Cdna Sequence And Partial Genomic Sequences: Insights Into The Molecular Genetics, Cell Biology And Physiology Of The Titin Filament System. Rev Physiol Biochem Pharmacol, 1999. 138: P. 19-55.
- 95. 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.
- 96. 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.
- Kovar, D.R., Molecular Details Of Formin-Mediated Actin Assembly. Curr Opin Cell Biol, 2006. 18(1): P. 11-7.
- Zigmond, S.H., Formin-Induced Nucleation Of Actin Filaments. Curr Opin Cell Biol, 2004. 16(1): P. 99-105.
- 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.

- 100. Kovar, D.R. And T.D. Pollard, Insertional Assembly Of Actin Filament Barbed Ends In Association With Formins Produces Piconewton Forces. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(41): P. 14725-30.
- 101. Xu, Y., Et Al., Crystal Structures Of A Formin Homology-2 Domain Reveal A Tethered Dimer Architecture. Cell, 2004. 116(5): P. 711-23.
- 102. 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.
- 103. Harris, E.S., F. Li, And H.N. Higgs, The Mouse Formin, Frlalpha, Slows Actin Filament Barbed End Elongation, Competes With Capping Protein, Accelerates Polymerization From Monomers, And Severs Filaments. J Biol Chem, 2004. 279(19): P. 20076-87.
- 104. 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.
- Alberts, A.S., Identification Of A Carboxyl-Terminal Diaphanous-Related Formin Homology Protein Autoregulatory Domain. J Biol Chem, 2001. 276(4): P. 2824-30.
- 106. Li, F. And H.N. Higgs, Dissecting Requirements For Auto-Inhibition Of Actin Nucleation By The Formin, Mdia1. J Biol Chem, 2005. 280(8): P. 6986-92.
- 107. Evangelista, M., Et Al., Bni1p, A Yeast Formin Linking Cdc42p And The Actin Cytoskeleton During Polarized Morphogenesis. Science, 1997. 276(5309): P. 118-22.
- 108. Tominaga, T., Et Al., Diaphanous-Related Formins Bridge Rho Gtpase And Src Tyrosine Kinase Signaling. Mol Cell, 2000. 5(1): P. 13-25.
- 109. Watanabe, N., Et Al., Cooperation Between Mdia1 And Rock In Rho-Induced Actin Reorganization. Nat Cell Biol, 1999. 1(3): P. 136-43.
- 110. Maiti, S., Et Al., Structure And Activity Of Full-Length Formin Mdia1. Cytoskeleton (Hoboken), 2012. 69(6): P. 393-405.
- 111. Pelin, K., Et Al., Refined Localisation Of The Genes For Nebulin And Titin On Chromosome 2q Allows The Assignment Of Nebulin As A Candidate Gene For Autosomal Recessive Nemaline Myopathy. Eur J Hum Genet, 1997. 5(4): P. 229-34.

- 112. Labeit, S., Et Al., Expression Of Distinct Classes Of Titin Isoforms In Striated And Smooth Muscles By Alternative Splicing, And Their Conserved Interaction With Filamins. J Mol Biol, 2006. 362(4): P. 664-81.
- 113. Keller, T.C., 3rd, Et Al., Role Of Titin In Nonmuscle And Smooth Muscle Cells. Adv Exp Med Biol, 2000. 481: P. 265-77; Discussion 278-81.
- 114. Kim, K. And T.C. Keller, 3rd, Smitin, A Novel Smooth Muscle Titin-Like Protein, Interacts With Myosin Filaments In Vivo And In Vitro. J Cell Biol, 2002. 156(1): P. 101-11.
- 115. Chi, R.J., Et Al., Smooth Muscle Alpha-Actinin Interaction With Smitin. Int J Biochem Cell Biol, 2005. 37(7): P. 1470-82.
- 116. Cavnar, P.J., S.G. Olenych, And T.C. Keller, 3rd, Molecular Identification And Localization Of Cellular Titin, A Novel Titin Isoform In The Fibroblast Stress Fiber. Cell Motil Cytoskeleton, 2007. 64(6): P. 418-33.
- 117. Machado, C. And D.J. Andrew, Titin As A Chromosomal Protein. Adv Exp Med Biol, 2000. 481: P. 221-32; Discussion 232-6.
- 118. Zastrow, M.S., Et Al., Nuclear Titin Interacts With A- And B-Type Lamins In Vitro And In Vivo. J Cell Sci, 2006. 119(Pt 2): P. 239-49.
- 119. Witt, C.C., Et Al., Nebulin Regulates Thin Filament Length, Contractility, And Z-Disk Structure In Vivo. Embo J, 2006. 25(16): P. 3843-55.
- 120. Turnacioglu, K.K., Et Al., Zeugmatin Is Part Of The Z-Band Targeting Region Of Titin. Cell Struct Funct, 1997. 22(1): P. 73-82.
- 121. Ayoob, J.C., Et Al., Targeting Of Cardiac Muscle Titin Fragments To The Z-Bands And Dense Bodies Of Living Muscle And Non-Muscle Cells. Cell Motil Cytoskeleton, 2000. 45(1): P. 67-82.
- Gregorio, C.C. And P.B. Antin, To The Heart Of Myofibril Assembly. Trends Cell Biol, 2000. 10(9): P. 355-62.
- 123. Miller, G., Et Al., A Targeted Deletion Of The C-Terminal End Of Titin, Including The Titin Kinase Domain, Impairs Myofibrillogenesis. J Cell Sci, 2003. 116(Pt 23): P. 4811-9.
- 124. Granzier, H. And S. Labeit, Cardiac Titin: An Adjustable Multi-Functional Spring. J Physiol, 2002. 541(Pt 2): P. 335-42.

- 125. Nelson, O.L., Et Al., Titin Isoform Switching Is A Major Cardiac Adaptive Response In Hibernating Grizzly Bears. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. 295(1): P. H366-71.
- 126. Weinert, S., Et Al., M Line-Deficient Titin Causes Cardiac Lethality Through Impaired Maturation Of The Sarcomere. J Cell Biol, 2006. 173(4): P. 559-70.
- 127. Lange, S., Et Al., The Kinase Domain Of Titin Controls Muscle Gene Expression And Protein Turnover. Science, 2005. 308(5728): P. 1599-603.
- 128. Peng, J., Et Al., Cardiac Hypertrophy And Reduced Contractility In Hearts Deficient In The Titin Kinase Region. Circulation, 2007. 115(6): P. 743-51.
- 129. Gould, C.J., Et Al., The Formin Dad Domain Plays Dual Roles In Autoinhibition And Actin Nucleation. Curr Biol, 2011. 21(5): P. 384-90.
- 130. Politou, A.S., D.J. Thomas, And A. Pastore, The Folding And Stability Of Titin Immunoglobulin-Like Modules, With Implications For The Mechanism Of Elasticity. Biophys J, 1995. 69(6): P. 2601-10.
- 131. Trombitas, K., J.P. Jin, And H. Granzier, The Mechanically Active Domain Of Titin In Cardiac Muscle. Circ Res, 1995. 77(4): P. 856-61.
- 132. Granzier, H., M. Helmes, And K. Trombitas, Nonuniform Elasticity Of Titin In Cardiac Myocytes: A Study Using Immunoelectron Microscopy And Cellular Mechanics. Biophys J, 1996. 70(1): P. 430-42.
- 133. Gautel, M. And D. Goulding, A Molecular Map Of Titin/Connectin Elasticity Reveals Two Different Mechanisms Acting In Series. Febs Lett, 1996. 385(1-2): P. 11-4.
- 134. Linke, W.A., Et Al., Towards A Molecular Understanding Of The Elasticity Of Titin. J Mol Biol, 1996. 261(1): P. 62-71.
- 135. Bustamante, C., Et Al., Entropic Elasticity Of Lambda-Phage Dna. Science, 1994.265(5178): P. 1599-600.
- 136. Trombitas, K., Et Al., Titin Extensibility In Situ: Entropic Elasticity Of Permanently Folded And Permanently Unfolded Molecular Segments. J Cell Biol, 1998. 140(4): P. 853-9.
- 137. Linke, W.A., Et Al., Nature Of Pevk-Titin Elasticity In Skeletal Muscle. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(14): P. 8052-7.

- 138. Linke, W.A., Et Al., Characterizing Titin's I-Band Ig Domain Region As An Entropic Spring. J Cell Sci, 1998. 111 (Pt 11): P. 1567-74.
- Linke, W.A. And H. Granzier, A Spring Tale: New Facts On Titin Elasticity. Biophys J, 1998. 75(6): P. 2613-4.
- 140. Trombitas, K., Et Al., Molecular Dissection Of N2b Cardiac Titin's Extensibility. Biophys J, 1999. 77(6): P. 3189-96.
- 141. Watanabe, K., Et Al., Molecular Mechanics Of Cardiac Titin's Pevk And N2b Spring Elements. J Biol Chem, 2002. 277(13): P. 11549-58.
- 142. Li, H., Et Al., Reverse Engineering Of The Giant Muscle Protein Titin. Nature, 2002. 418(6901): P. 998-1002.
- 143. Helmes, M., K. Trombitas, And H. Granzier, Titin Develops Restoring Force In Rat Cardiac Myocytes. Circ Res, 1996. 79(3): P. 619-26.
- 144. Granzier, H., Et Al., Mechanical Properties Of Titin Isoforms. Adv Exp Med Biol, 2000. 481: P. 283-300; Discussion 300-4.
- 145. Linke, W.A., Et Al., Pevk Domain Of Titin: An Entropic Spring With Actin-Binding Properties. J Struct Biol, 2002. 137(1-2): P. 194-205.
- 146. Zarandi, M., Et Al., Synthesis Of Abeta[1-42] And Its Derivatives With Improved Efficiency. J Pept Sci, 2007. 13(2): P. 94-9.
- 147. Feuer, G., F. Molnar, And Et Al., Studies On The Composition And Polymerization Of Actin. Hung Acta Physiol, 1948. 1(4-5): P. 150-63.
- 148. 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.
- 149. 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.
- 150. Houk, T.W., Jr. And K. Ue, The Measurement Of Actin Concentration In Solution: A Comparison Of Methods. Anal Biochem, 1974. 62(1): P. 66-74.
- 151. Criddle, A.H., M.A. Geeves, And T. Jeffries, The Use Of Actin Labelled With N-(1-Pyrenyl)Iodoacetamide To Study The Interaction Of Actin With Myosin Subfragments And Troponin/Tropomyosin. Biochem J, 1985. 232(2): P. 343-9.

- 152. Isambert, H., Et Al., Flexibility Of Actin Filaments Derived From Thermal Fluctuations. Effect Of Bound Nucleotide, Phalloidin, And Muscle Regulatory Proteins. J Biol Chem, 1995. 270(19): P. 11437-44.
- 153. Barko, S., Et Al., Characterization Of The Biochemical Properties And Biological Function Of The Formin Homology Domains Of Drosophila Daam. J Biol Chem, 2010. 285(17): P. 13154-69.
- 154. Lakowicz, J., Instrumentation For Fluorescence Spectroscopy, In Principles Of Fluorescence Spectroscopy. 2006, Springer Science+Business Media, Llc: New York, Ny 10013, Usa. p. 55-57.
- 155. Fairclough, R.H. And C.R. Cantor, The Use Of Singlet-Singlet Energy Transfer To Study Macromolecular Assemblies. Methods Enzymol, 1978. 48: P. 347-79.
- 156. Somogyi, B., Et Al., Forster-Type Energy Transfer As A Probe For Changes In Local Fluctuations Of The Protein Matrix. Biochemistry, 1984. 23(15): P. 3403-11.
- 157. Lakowicz, J., Time-Domain Lifetime Measurements, In Principles Of Fluorescence Spectroscopy. 2006, Springer Science+Business Media, Llc: New York, Ny 10013, Usa. P. 141-143.
- 158. Lakowicz, J., Fluorescence Anisotropy, In Principles Of Fluorescence Spectroscopy. 2006, Springer Science+Business Media, Llc: New York, Ny 10013, Usa. P. 361-363.
- 159. Hammarstrom, P., Et Al., High-Resolution Probing Of Local Conformational Changes In Proteins By The Use Of Multiple Labeling: Unfolding And Self-Assembly Of Human Carbonic Anhydrase Ii Monitored By Spin, Fluorescent, And Chemical Reactivity Probes. Biophys J, 2001. 80(6): P. 2867-85.
- 160. Flory, P.J., Statistical Mechanics Of Chain Molecules. 1989, Munich, Vienna, New York: Hanser Publishers.
- 161. Rivetti, C., M. Guthold, And C. Bustamante, Scanning Force Microscopy Of Dna Deposited Onto Mica: Equilibration Versus Kinetic Trapping Studied By Statistical Polymer Chain Analysis. J Mol Biol, 1996. 264(5): P. 919-32.
- 162. Garnier, J., J.F. Gibrat, And B. Robson, Gor Method For Predicting Protein Secondary Structure From Amino Acid Sequence. Methods Enzymol, 1996. 266: P. 540-53.

- 163. Petersen, B., Et Al., A Generic Method For Assignment Of Reliability Scores Applied To Solvent Accessibility Predictions. Bmc Struct Biol, 2009. 9: P. 51.
- 164. Cole, C., J.D. Barber, And G.J. Barton, The Jpred 3 Secondary Structure Prediction Server. Nucleic Acids Res, 2008. 36(Web Server Issue): P. W197-201.
- 165. Bryson, K., Et Al., Protein Structure Prediction Servers At University College London. Nucleic Acids Res, 2005. 33(Web Server Issue): P. W36-8.
- 166. Van Der Spoel, D., Et Al., Gromacs: Fast, Flexible, And Free. J Comput Chem, 2005. 26(16): P. 1701-18.
- 167. Oostenbrink, C., Et Al., A Biomolecular Force Field Based On The Free Enthalpy Of Hydration And Solvation: The Gromos Force-Field Parameter Sets 53a5 And 53a6. J Comput Chem, 2004. 25(13): P. 1656-76.
- 168. Kabsch, W. And C. Sander, Dictionary Of Protein Secondary Structure: Pattern Recognition Of Hydrogen-Bonded And Geometrical Features. Biopolymers, 1983. 22(12): P. 2577-637.
- Coue, M., Et Al., Inhibition Of Actin Polymerization By Latrunculin A. Febs Lett, 1987. 213(2): P. 316-8.
- 170. Sarkar, A., S. Caamano, And J.M. Fernandez, The Elasticity Of Individual Titin Pevk Exons Measured By Single Molecule Atomic Force Microscopy. J Biol Chem, 2005. 280(8): P. 6261-4.
- 171. Nagy, A., Et Al., Hierarchical Extensibility In The Pevk Domain Of Skeletal-Muscle Titin. Biophys J, 2005. 89(1): P. 329-36.
- 172. Buscaglia, M., Et Al., Effects Of Denaturants On The Dynamics Of Loop Formation In Polypeptides. Biophys J, 2006. 91(1): P. 276-88.
- 173. Oberhauser, A.F., Et Al., The Molecular Elasticity Of The Extracellular Matrix Protein Tenascin. Nature, 1998. 393(6681): P. 181-5.
- 174. Zangi, R., R. Zhou, And B.J. Berne, Urea's Action On Hydrophobic Interactions. J Am Chem Soc, 2009. 131(4): P. 1535-41.
- 175. Vivian, J.T. And P.R. Callis, Mechanisms Of Tryptophan Fluorescence Shifts In Proteins. Biophys J, 2001. 80(5): P. 2093-109.
- 176. Zangi, R., M. Hagen, And B.J. Berne, Effect Of Ions On The Hydrophobic Interaction Between Two Plates. J Am Chem Soc, 2007. 129(15): P. 4678-86.

- 177. Forbes, J.G., Et Al., Titin Pevk Segment: Charge-Driven Elasticity Of The Open And Flexible Polyampholyte. J Muscle Res Cell Motil, 2005. 26(6-8): P. 291-301.
- 178. Labeit, D., Et Al., Calcium-Dependent Molecular Spring Elements In The Giant Protein Titin. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(23): P. 13716-21.
- 179. Nyitrai, M., Et Al., Effect Of Ca2+-Mg2+ Exchange On The Flexibility And/Or Conformation Of The Small Domain In Monomeric Actin. Biophys J, 1998. 74(5): P. 2474-81.
- 180. Duan, Y., Et Al., Studies On Titin Pevk Peptides And Their Interaction. Arch Biochem Biophys, 2006. 454(1): P. 16-25.

Ábrák és táblázatok jegyzéke

### Ábrák jegyzéke

1. ábra	Nyúl szívizom szarkomer elektronmikroszkópos felvétele	8
2. ábra	A titin elhelyezkedése a szarkomerben	9
3. ábra	Immunglobulin és fibronektin III domének szerkezete.	. 11
4. ábra	I-szakaszbeli hipotetikus titin szegmens doménszerkezete (A). Alternatív splicing révén kialakuló titin izoformák (B)	. 13
5. ábra	A titin felépítése a szarkomer A-szakaszában és M-vonalában	. 14
6. ábra	A DRF fehérjecsalád sematikus szerkezete	. 16
7. ábra	A szívizom titin rövidülésének és megnyúlásának mechanizmusai	. 22
8. ábra	A vizsgált PEVK peptid és PPAK fragmentum szekvenciák	. 25
9. ábra	A vizsgált DAAM formin fehérje szekvenciák.	. 28
10. ábra	Alexa Fluor 488-cal jelölt aktin filamentumokat tartalmazó oldat széleslátóterű és TIRF megvilágításban	. 34
11. ábra	Reprezentatív felvétel egyedi aktin filamentumok növekedéséről	. 35
12. ábra	A PPAK fragmentum atomerő-mikroszkópos megnyújtásának kísérleti vázlata.	. 36
13. ábra	A PEVK peptidek abszorpciós spektrumai	. 39

14. ábra	A PEVK peptidek fluoreszcencia emissziós spektrumai
15. ábra	A PEVK peptidek láncvégei között fellépő FRET sematikus ábrázolása 41
16. ábra	Guanidin-hidroklorid hatása PEVK peptidek transzfer hatásfokára
17. ábra	IAEDANS-jelölt PEVK11 és PEVK21 peptidek fluoreszcencia lecsengési görbéi
18. ábra	KCl hatása a PEVK peptidek transzfer hatásfokára 46
19. ábra	Hőmérséklet hatása a PEVK peptidek relatív $f'$ értékére
20. ábra	A PEVK peptidek 100 ns időtartamú molekuláris dinamikai szimulációja. 49
21. ábra	A PEVK peptidek terminális aromás gyűrűi közötti távolság változása 50
22. ábra	A PPAK fragmentum erő-megnyúlás görbéje (A). Kontúrhossz- (B) és perzisztenciahossz (C) hisztogramok
23. ábra	A pirén-jelölt aktin fluoreszcencia emissziójának időbeli változása az aktin filamentumok összeszerelődése során
24. ábra	Az aktin polimerizáció sebessége a DAAM koncentráció függvényében 54
25. ábra	Reprezentatív összehasonlító TIRF mikroszkópos felvételek 55
26. ábra	Az aktin monomerek beépülési rátája 56
27. ábra	A DAAM C-terminálisának szerepe az aktin monomer kötésében 57

# Táblázatok jegyzéke

1. táblázat	A forminok különböző doménjainak elnevezése.	16
2. táblázat	Különböző módszerekkel számolt FRET hatásfok értékek	
	összehasonlítása	45

## PUBLIKÁCIÓK LISTÁJA

#### Az értekezés alapjául szolgáló közlemény

**Huber, T.**, Grama, L., Hetényi, C., Schay, G., Fülöp, L., Penke, B., Kellermayer, M.S.Z. (2012). Conformational dynamics of titin PEVK explored with FRET spectroscopy. Biophysical Journal, 103 (7), pp. 1480-1489. IF: 3,668.

#### Az értekezéshez nem kapcsolódó közlemények

- Grama, L., Nagy, A., Scholl, C., Huber, T., Kellermayer, M.S.Z. (2005). Local variability in the mechanics of titin's tandem Ig segments. Croat. Chem. Acta 78, 405-411. IF: 0,936.
- Nagy, A., Grama, L., Huber, T., Bianco, P., Trombitás, K., Granzier, H.L., Kellermayer, M.S.Z. (2005). *Hierarchical extensibility in the PEVK domain of skeletal-muscle titin*. Biophys. J. 89(1), 329-336. IF: 4,507.
- Bianco, P., Nagy, A., Kengyel, A., Szatmari, D., Martonfalvi, Z., Huber, T., Kellermayer, M.S.Z. (2007). *Interaction forces between F-actin and titin PEVK motifs measured with optical tweezers*. Biophys J. 93, 2102-2109. IF: 4,627.
- Kellermayer, M.S.Z., Karsai, Á., Kengyel, A., Nagy, A, Bianco, P., Huber, T., Kulcsár, Á., Niedetzky, Cs., Proksch, R., Grama, L. (2006). Spatially and temporally synchronized atomic force and total internal reflection fluorescence microscopy for imaging and manipulating cells and biomolecules. Biophys. J. 91, 2665-2667. IF: 4,757.
- Sun, M., Northup, N., Marga, F., Huber, T., Byfield, F.J., Levitan, I., Forgacs, G. (2007). *The effect of cellular cholesterol on membrane-cytoskeleton adhesion*. J. Cell Sci. 120(Pt 13):2223-31. IF: 6,383.
- 6. **Huber, T.** *Egy kis "forminológia" forminfehérjék vizsgálata a Biofizikai Intézetben.* PTE Orvoskari Hírmondó, 23. oldal, 2014. július 8.

A cikkek összegzett impakt faktora: 24,878

#### Az értekezéshez kapcsolódó konferencia poszterek és előadások

- 1. **Huber, T.**, Szatmári, D., Mártonfalvi, Zs., Kellermayer, M.S.Z. *A titin PEVK domén szekvenciamotívumainak szerkezete és mechanikája.* 37. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2007. május 22-25.
- Huber, T., Szatmári, D., Mártonfalvi, Zs., Kellermayer, M.S.Z. *The structure and mechanics of the titin's PEVK domain sequence motifs*. IV. International Conference on Molecular Recognition, August 15-18. 2007. Pécs, Hungary.
- Szatmári, D., Huber, T., Németh, V., Kollár, V., Grama, L., Kellermayer, M.S.Z. *A titin mechanoszenzor tulajdonságainak vizsgálata*. 38. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2008. május 20-23.
- Huber, T., Fülöp, L., Grama, L., Penke, B., Kellermayer, M.S.Z. Conformational dynamics of titin PEVK explored with FRET spectroscopy. Regional Biophysics Conference, Linz, February 10-14. 2009.
- 5. **Huber, T.**, Fülöp, L., Grama, L., Penke, B., Kellermayer, M.S.Z. *Conformational dynamics of titin PEVK explored with FRET spectroscopy*. Biophysical Society 53rd Annual Meeting, Boston (MA), February 28- March 4. 2009.
- Huber, T., Fülöp, L., Grama, L., Penke, B., Kellermayer, M.S.Z. A titin PEVK domén konformációs dinamikája. 39. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2009. május 19-22.
- Tóth, M.Á., Kokas, Á., Türmer, K., Vig, A., Huber, T., Hild, G., Nyitrai, M., Bugyi, B. *Tropomiozin izoformák hatása a nukleációs faktorokra*, 41. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2011. május 17-20.
- Vig, A., Huber, T., Bugyi, B. *Tropomyosin isoform specific regulation of nucleation factors*. Intracellular Fluorescence Spectroscopy (8th European Biophysics Congress Satellite Conference), Pécs, August 20-22. 2011.
- Huber, T., Fülöp, L., Grama, L., Hetényi, C., Penke, B., Kellermayer, M.S.Z. *Structure of titin PEVK explored with FRET spectroscopy*. Biophysical Society 56th Annual Meeting, San Diego (CA), February 25-29. 2012.
- 10. **Huber, T.,** Vig, A., Nyitrai, M., Bugyi, B. *Functional properties of actin isoforms*. The 28th European Cytoskeletal Forum Meeting, Fribourg, September 1-5. 2013.
- 11. **Huber, T.** *Interactions of Drosophila DAAM with actin.* Present and future of fluorescence microscopy and spectroscopy course, Kiev, January 13. 2014.
- 12. **Huber, T.,** Majoros, A., Mihály, J., Migh, E., Nyitrai, M., Bugyi, B. *A DAAM formin autoregulációs doménjének aktin kötésben betöltött szerepe*. 44. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2014. május 20-23.
- 13. **Huber, T.** *Interactions of DAAM with actin.* SNF Meeting, Pécs, November 10. 2014.