

Ph.D. ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**A SZARKOMERIKUS FILAMENTUM-RENDSZEREK
ÖSSZESZERVEZŐDÉSÉÉRT FELELŐS
MECHANIZMUSOK VIZSGÁLATA**

Huber Tamás



Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Biofizikai Intézet

2015

Ph.D. ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

A SZARKOMERIKUS FILAMENTUM-RENDSZEREK ÖSSZESZERVEZŐDÉSÉÉRT FELELŐS MECHANIZMUSOK VIZSGÁLATA

Huber Tamás

Program: Interdiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola

Iskolavezető: Prof. Dr. Sümegi Balázs

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

Programvezető: Prof. Dr. Nyitrai Miklós

Témavezetők: Prof. Dr. Kellermayer Miklós S. Z. és Dr. Grama László



Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Biofizikai Intézet

2015

BEVEZETÉS

A harántcsíkolt izom szerkezeti és működési egysége a szarkomer. 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 öt 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 a természetben előforduló legnagyobb méretű fehérje. Egyik legfőbb szerepe az izom vékony és vastag filamentumoktól független, passzív rugalmasságának biztosítása. *In situ* átlagos hossza több mint 1 μm és molekulatömege izoformától függően 3-3,7 MDa [1, 2]. 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 futó egyedi titinmolekulák áthidalják a szarkomer hosszának felét [3]. N-terminális része a Z-csíkban található, C-terminálisa az M-vonalhoz rögzül. 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 [4]. Az Ig és FNIII doménsorozatok között 17 egyedi szekvencia helyezkedik el.

Az egyik legismertebb és funkcionális szempontból legfontosabbnak tartott egyedi szekvencia a PEVK régió. Nevét a prolin (P), glutaminsav (E), valin (V) és lizin (K) aminosavak szokatlanul gyakori előfordulásáról kapta. Hossza izoformától függően 163-2174 aminosav lehet [5]. Szekvenciájában két, változó számban megjelenő motívum típust írtak le: a sok bázikus oldalláncú aminosavat tartalmazó PPAK (vagy PEVK) és a glutamátban gazdag polyE motívumokat.

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 entalpiikus tényezők szerepe is felmerült [6, 7]. Ilyen entalpiikus faktorok közé sorolhatjuk a PEVK szekvenciáján belüli elektrosztatikus és hidrofób kölcsönhatásokat.

A szarkomerikus vékony filamentumok képződése során az aktin polimerizációja révén filamentumok épülnek össze. A polimerizáció folyamatában a forminoknak alapvető jelentőségük van. A formin fehérjék a titinhez hasonlóan szintén domén szerkezetű molekulák. Molekuláris szintű, *in vitro* vizsgálatok során derült fény arra, hogy a forminok is az aktint szabályozó, úgynevezett nukleációs faktorok közé tartoznak [8-10]. Érdekes tulajdonságuk emellett, hogy nem csak a kialakuló aktin nukleuszok stabilizálásában van szerepük, hanem az aktin elongációját is sokrétűen szabályozzák [11, 12].

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 [13]. Tagjaira 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 (Diaphanous Inhibitory Domain) és DAD (Diaphanous Autoregulatory Domain) domének egymáshoz kötődnek, ezáltal tartva inaktív állapotban a fehérjét. Amint azonban GTP-áz kötődik a molekula N terminális végén található GTP-áz kötő doménhez, az autoinhibíciós konformáció feloldásra kerül, és hozzáférhetővé válnak a formin aktin kötésben szerepet játszó szakaszai [14]. Egyik ezek közül az FH1 (Formin Homology 1) domén, mely ugyan direkt módon nem képes aktin kötésére, azonban az aktin monomert kötő profilin kölcsönható partnere. Az FH2 (Formin Homology 2) domén a leginkább konzervatív szakasz a molekulán belül, és ez az „elsőrendű” aktin-kötő rész [15].

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 [16].

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 kapcsolattól.

CÉLKITŰZÉSEK

Korábbi munkákban a titin PEVK régióját rendezetlen szerkezetű fehérjeláncnak tekintették. Mindazonáltal, egyes 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 atomerő-mikroszkópos 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 előállítását:

- 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 megszünteti-e az FH2 nukleációs aktivitását (ahogyan erre az előzetesen megfigyelt *in vivo* kísérletek utalnak).

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A kísérletekhez használt peptidek és fehérjék előállítása

PEVK peptidek

A 11- illetve 21 aminosav hosszúságú PEVK peptideket (PEVK11 és PEVK21) szilárd fázisú szintézis segítségével kollaborációs partnereink, Dr. Fülöp Livia és munkatársai állították elő [17]. A peptidek szekvenciája megfeleltethető a X90569 GenBank hivatkozási számú humán titin mRNS 17413-17442 (PEVK11) és 17413-17472 (PEVK21) szakaszainak [5].

Humán vázizom PPAK fragmentumok előállítása

A humán vázizom cDNS könyvtárat Dr. Siegfried Labeit-től kaptuk. Az általunk expresszálni kívánt PPAK fragmentum a *m. soleus* titin PEVK doménjének első harmadában található. A fragmentumot kódoló 603 nukleotid hosszúságú régiót (17413-18015, GenBank hivatkozási szám: X90569 [5]) *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, Sigma) történő indukcióval 37 °C-on, 3 órán át termeltettük a fehérjét Luria-Bertani (Scharlau) tápoldatban.

Az expresszált fehérjét tartalmazó sejtlyúzatumot lecentrifugáltuk (Sorvall Ultra Pro 80 ultracentrifuga, T-1250 rotor, 100000 g, 4 °C, 1h), a felülúszót Ni-NTA agaróz oszlopon (Qiagen) átfolyattuk és Ni²⁺-affinitás kromatográfiával tisztítottuk. Végül az imidazollal eluált fehérjét egy éjszakán át dializáltuk foszfát puffer ellenében és további felhasználásig -80 °C-on tároltuk.

DAAM konstrukciók megtermeltetése és tisztítása

A különböző *Drosophila melanogaster* DAAM szekvenciákat kódoló pGEX-2T plazmidokat Dr. Mihály József és munkacsoportja (Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Genetikai Intézet) bocsátotta rendelkezésünkre. A fehérjék preparálását korábban ismertetett eljárások alapján végeztük [18].

Az aktin preparálása és fluoreszcens jelölése

Méréseinkhez nyúl (*Oryctolagus cuniculus*) vázizomból először aceton-extrahált izomforgácsot preparáltunk [19], majd ebből Spudich és Watt módszere alapján [20] izoláltuk az aktint.

Az aktin polimerizációjának nyomon követéséhez az aktin 374-es pozícióban lévő cisztein aminosavát pirén-jódacetamiddal (pirén, Molecular Probes) jelöltük meg [21].

A steady-state fluoreszcencia anizotrópia és a teljes belső visszaverődésen alapuló fluoreszcencia mikroszkópiai (TIRFM) vizsgálatokhoz az aktint Alexa Fluor 488-szukcinimidil-észter fluoreszcens festékkel (Alexa 488, Molecular Probes) korábban ismertetett módszer alapján konjugáltuk [22].

Fluoreszcencia spektroszkópiai vizsgálatok

Az aktin polimerizációjának követése és sebességének meghatározása

A DAAM konstrukciók aktin polimerizációjára kifejtett hatását pirén fluorofórral jelölt aktin segítségével vizsgáltuk. 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 polimerizációs görbéket, melyekből a polimerizáció sebességét meghatároztuk.

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 energiáttranszfert (FRET) fluoreszcencia spektroszkópia segítségével követtük nyomon. Az emissziós spektrumok felvétele során a triptofánt 295 nm-en gerjesztettük és az emittált fényt 305-700 nm hullámhossztartományban detektáltuk 5 nm-es optikai rések mellett.

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

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

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:

$$R = \sqrt[6]{\frac{R_0^6}{E} - R_0^6}, \quad (2)$$

ahol R_0 a Förster-féle kritikus távolság, amelynél a transzfer hatásfoka 50%-os (triptofán-IAEDANS pár esetén 2,2 nm [23]).

A FRET hatásfok ismeretében kiszámolható az ún. f' paraméter, melynek segítségével információt nyerhetünk a donor és akceptor közötti fehérjemátrix rugalmasságáról [24]:

$$f' = \frac{E}{F_{DA}}. \quad (3)$$

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 (Champaign, IL, USA) 22 °C-on végeztük. A triptofán fluoreszcencia átlagélettartamát (τ) diszkrét élettartam eloszlás feltételezésével a következő egyenlettel határoztuk meg:

$$\bar{\tau} = \frac{\sum \alpha_i \tau_i^2}{\sum \alpha_i \tau_i}, \quad (4)$$

ahol α_i és τ_i a triptofán egyes élettartam komponenseinek amplitúdóját és értékét jelölik [25].

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

$$E = 1 - \frac{\overline{\tau_{DA}}}{\tau_D}, \quad (5)$$

ahol τ_D és τ_{DA} a donor (triptofán) átlagos fluoreszcencia élettartama akceptor (IAEDANS) nélkül és annak jelenlétében.

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 μM 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 fényrel 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 [26]:

$$r = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}}, \quad (6)$$

ahol I_{VV} és I_{VH} a vertikálisan polarizált fényrel 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.

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

$$\frac{r - r_A}{r_{AD} - r_A} = \frac{A_0 + D_0 + K - \sqrt{A_0 + D_0 + K^2 - 4A_0D_0}}{2}, \quad (7)$$

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.

Mikroszkópos vizsgálatok

Teljes belső visszaverődésen alapuló fluoreszcencia mikroszkópia

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 méréseket egy Olympus IX81 epifluoreszcens mikroszkópra szerelt TIRF megvilágító egység segítségével szobahőmérsékleten végeztük.

A növekedés sebességét (v) $\mu\text{m/s}$ -ban az alábbi módon számoltuk:

$$v = \frac{\Delta l}{\Delta t} = \tan \alpha, \quad (8)$$

ahol $\tan \alpha$ a filamentum hossz (Δl) - idő (Δt) 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_+):

$$k_+ = \frac{v}{F G - cc}, \quad (9)$$

ahol egy filamentum esetén $F = 1$, G a teljes G-aktin és cc a kritikus koncentráció, amelyet 0,15 μM -nak vettünk [27].

Atomerő-mikroszkópia

A mechanikai manipulációs kísérleteket Molecular Force Probe-1D típusú (Asylum Research, Santa Barbara, CA, USA) erőmérő atomerő-mikroszkóppal végeztük.

A kísérletek kiértékelése során az erő-megnyúlás görbékre az entrópiikus rugalmasság „féregszerű lánc” („Wormlike Chain”, WLC) egyenletét illesztettük [28, 29]:

$$\frac{FL_p}{k_B T} = \frac{R}{L_c} + \frac{1}{4} \frac{1}{1 - R/L_c} - \frac{1}{4}, \quad (10)$$

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.

Polimer-modell számítások

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

$$L_c = N_{aa} \cdot L_{aa} + L_{IAEDANS} , \quad (11)$$

ahol L_{aa} egy aminosav átlagos hossza (0,38 nm) és $L_{IAEDANS}$ az akceptor molekula mérete (0,87 nm, [30]). 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 (**2. egyenlet**), a polimerek hajlítási merevségét jellemző paramétert, a látszólagos perzisztenciahosszat (L_p) pedig összhangban a WLC modellel az alábbi összefüggés segítségével [31, 32]:

$$\langle R^2 \rangle = 2L_p L_c \left(1 - \frac{L_p}{L_c} \left(1 - e^{-\frac{L_c}{L_p}} \right) \right), \quad (12)$$

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

Molekuláris dinamikai szimulációk

A molekuláris dinamikai szimulációkat Dr. Hetényi Csaba együttműködő partnerünk végezte. A jelöletlen peptidek lehetséges másodlagos szerkezetének becslése a GOR4 [33], a NetSurfP [34], a Jpred3 [35] és a PSIPRED [36] másodlagos szerkezet predikációs szerverek alkalmazásával történt.

EREDMÉNYEK

A PEVK peptidek spektrális tulajdonságai

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

Ezt követően rögzítettük a csak donort illetve a donort és akceptort is tartalmazó peptidek fluoreszcencia emissziós spektrumait. A triptofán donor 355 nm-es csúcsnál jelentkező fluoreszcencia intenzitása akceptor jelenlétében lecsökkent (F_{DA}), tehát lejátszódott a FRET jelensége. A FRET erős távolságfüggését jól mutatta a rövidebb peptid esetében megfigyelt sokkal nagyobb F_{DA} csökkenés.

A 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 (**2. egyenlet**) segítségével meghatároztuk a peptidek átlagos vég-vég távolságait. Ezek értékei, az alkalmazott, fiziológiához közeli körülmények között (0,2 M ionerő és 20 °C) a PEVK11 illetve PEVK21 peptidek esetén 2,12 ($\pm 0,01$) és 2,69 ($\pm 0,05$) nm voltak. Ezen értékek és a **11. egyenlet** figyelembevételével kapott kontúr hosszak ismeretében a látszólagos perzisztenciahosszak a **12. egyenlet** alapján 0,63 (PEVK11) és 0,48 (PEVK21) nm-nek adódtak.

Kémiai denaturáció hatása a PEVK peptidekre

További kísérletekkel megvizsgáltuk, hogy létezhetnek-e a peptideken belül olyan kölcsönhatások, amelyek kémiai denaturánsok által felbonthatók. Méréseinkben először guanidin-hidrokloridot (GuHCl) alkalmaztunk, de hasonló eredményeket kaptunk urea használatával is. A PEVK11 transzferhatásfok értékei növekvő denaturáns koncentráció mellett fokozatosan, kis lépésekben csökkentek 0,56 ($\pm 0,01$)-ről 0,41 ($\pm 0,02$)-re. A PEVK21 esetében a transzferhatásfok 0,23 ($\pm 0,02$)-ről 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.

A triptofán-IAEDANS fluorofór-pár Förster-féle kritikus távolságának ($R_0=2,2$ nm, [23]) ismeretében ez esetben is kiszámítottuk a transzferhatásfok értékeknek megfelelő vég-vég távolságokat (**2. egyenlet**). Számításaink alapján a rövidebb peptid R értéke 2,12 ($\pm 0,01$) nm-ről 2,34 ($\pm 0,03$) nm-re, míg a hosszabbik peptidé 2,69 ($\pm 0,05$) nm-ről 2,91 ($\pm 0,01$) 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.

PEVK peptideken végzett fluoreszcencia élettartam mérések

A fenti steady-state fluoreszcencia spektroszkópai eredmények igazolása érdekében ugyanazokon a mintákon időfüggő fluoreszcencia méréseket is végeztünk időkorrelált egy-foton számlálás módszerrel, különböző denaturáns koncentrációk mellett. A triptofán fluoreszcencia lecsengési 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.

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

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 ábráztuk. 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).

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^{2+} -koncentráció tízes alapú negatív logaritmus) fokozatosan emeltük a kalcium koncentrációját. A peptidek FRET hatásfok értékei azonban nem nőttek számottevően, a legnagyobb mértékű növekedés is 2%-on belüli volt.

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 határfoka 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 normált transzfer határfok relatív értéke, **3. egyenlet**) a 10-50 °C tartományban. A hőmérséklet 40 °C-os emelkedésének hatására a PEVK11 peptid relatív f' értéke mintegy 30%-al, míg a PEVK21 peptidé körülbelül 70%-al nőtt.

Eredményeink 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.

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. A szimulációk első 10 ns-os időtartama során a kezdeti α -hélix struktúra részlegesen (PEVK21) vagy teljesen (PEVK11) eltűnt, miközben laza π -hélixek, hajlott és kanyar motívumok jelentek meg.

Az energiainimalizálást 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 PPAK fragmentum molekuláris mechanikája

A fragmentumok rugalmasságát egyedi-molekula erőspektroszkópiával vizsgáltuk. Ismételt húzási és visszaengedési ciklusokban erő-megnyúlás görbéket gyűjtöttünk. A nem-lineáris rugalmas erőgörbékre a „féregszerű lánc” (WLC, **10. egyenlet**) modell egyenletét illesztettük.

A PPAK fragmentum WLC-illesztéssel kapott kontúrhossza $81 (\pm 13,3)$ nm, perzisztenciahossza $0,68 (\pm 0,27)$ nm. Az általunk kapott kontúrhossz aránylag jó egyezést mutat a szekvencia alapján számított kontúrhosszal (85 nm, **11. egyenlet**). Mindez arra utal, hogy molekuláris mechanikai kísérleteinkben többnyire a végükön fogtuk meg a molekulákat.

A CDAAM az FH1-FH2 konstrukcióval összehasonlítva nagyobb mértékben gyorsítja az aktin polimerizációját

Vizsgálataink során kérdésünk 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.

A kiértékelés során azt kaptuk, 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. További eredményeink szerint a mutáns FH1-FH2-nek nem volt érdemi hatása az aktin polimerizációjára.

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 mikroszkópos felvételeken mind az FH1-FH2, mind pedig a CDAAM fragmentum jelenléte jelentősen megnöveli az aktin filamentumok számát a formint nem tartalmazó kontrollhoz képest.

Mindez arra utal, hogy mindkét konstruktképes a filamentumok nukleációját katalizálni. A filamentumok növekedési sebességét az aktin filamentumok hosszának időbeli változásából határoztuk meg. Az aktin filamentumok spontán növekedési sebessége $2,99 (\pm 0,12)$ alegység/s-nak adódott (**9. egyenlet**), összhangban korábban publikált irodalmi adatokkal [27]. Az FH1-FH2 és CDAAM jelenlétében mért elongációs sebességek $0,30 (\pm 0,08)$ és $0,87 (\pm 0,59)$ alegység/s-nak adódtak, azaz mindkét konstruktképes 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.

A DAD, illetve DAD+C konstrukciók kötnek az aktin monomerhez

Annak megállapítására, hogy a DAD képes-e az aktin monomer kötésére, steady-state fluoreszcencia anizotrópia vizsgálatokat végeztünk Alexa 488-jelölt aktin segítségével.

A jelölt monomer aktinhoz mindkét konstrukció képes kötődni, noha teljesen különböző mértékben. A **7. egyenletet** felhasználva meghatároztuk a két konstrukció aktinhoz való affinitását. A C-terminálist nem tartalmazó konstrukció esetében lényegesen gyengébb affinitás volt mérhető ($K=43,4 \pm 1,0 \mu\text{M}$) mint a DAD+C esetében ($K=0,76 \pm 0,09 \mu\text{M}$).

ÖSSZEFOGLALÁS, KÖVETKEZTETÉSEK

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). Fiziológiához közeli körülmények között a PEVK11 illetve PEVK21 peptidek R értékei $2,12 (\pm 0,01)$ illetve $2,69 (\pm 0,05)$ nm voltak.
- A „féregszerű lánc” (WLC) modellre alapozva kiszámoltuk a peptidlánc hajlítómerevségét jellemző látszólagos perzisztenciahosszakokat (L_p), melyek natív körülmények között $0,63$ (PEVK11) és $0,48$ (PEVK21) nm-nek adódtak. A két peptid jelentősen eltérő L_p 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 létrejöttére 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 $0,68 (\pm 0,27)$ 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.

MEGBESZÉLÉS

Eredményeink alapján 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 entalpiikus komponensek formájában járulhatnak hozzá, amelyet Linke és munkatársai korábban felvetettek [6]. 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.

Fluoreszcencia spektroszkópai eredményeink arra utalnak, hogy a DAAM formin C-terminális régiója fontos szerepet játszik az aktin-formin kölcsönhatás kialakításában, viszont a pirén jelölt aktin polimerizációjának sebessége nem változott a DAD konstrukció jelenlétében. Mindamellét a DAD-ot és FH2-t is tartalmazó konstrukció jelentős mértékben gyorsította a polimerizációt. Polimerizációs tesztjeink során megfigyeltük, hogy a mutáns FH1-FH2 konstrukciónak nincs hatása az aktin polimerizációjára. Így a korábban *in vivo* megfigyelt, az FH2 domén nukleáló hatását eltörlő mutáció szerepe *in vitro* is beigazolódott.

TIRF mikroszkópia segítségével megállapítottuk, hogy a DAD-ot és FH2-t is tartalmazó CDAAM konstrukció kisebb mértékben gátolja a hossznövekedést, mint az FH2-t tartalmazó. További eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a DAAM DAD+C/DAD doménjeinek önmagukban nincs hatásuk az elongációra, tehát az aktin monomert kötő tulajdonságuk nem befolyásolja a polimerizáció ezen szakaszát.

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.

Kísérleteink így a forminok C-terminális szakaszának egy eddig nem ismert tulajdonságára derítettek fényt. A formin családok aktinra kifejtett hatása közötti apró különbségek, illetve működésbeli különbségek szolgálhatnak talán magyarázatul arra, hogy miért létezik olyan sokféle formin fehérje, és mi lehet az indoka azok szövetspecifikus lokalizációjának és funkciójának.

HIVATKOZOTT IRODALOM

1. Tskhovrebova, L. and J. Trinick, *Titin: properties and family relationships*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. 4(9): p. 679-89.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. Labeit, S. and B. Kolmerer, *Titins: giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity*. Science, 1995. 270(5234): p. 293-6.
6. 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.
7. 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.
8. Pruyne, D., et al., *Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association*. Science, 2002. 297(5581): p. 612-5.
9. 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.
10. Sagot, I., et al., *An actin nucleation mechanism mediated by Bni1 and profilin*. Nat Cell Biol, 2002. 4(8): p. 626-31.

11. Paul, A.S. and T.D. Pollard, *The role of the FHI domain and profilin in formin-mediated actin-filament elongation and nucleation*. *Curr Biol*, 2008. 18(1): p. 9-19.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. Zigmond, S.H., *Formin-induced nucleation of actin filaments*. *Curr Opin Cell Biol*, 2004. 16(1): p. 99-105.
16. 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.
17. Zarandi, M., et al., *Synthesis of Abeta[1-42] and its derivatives with improved efficiency*. *J Pept Sci*, 2007. 13(2): p. 94-9.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. 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.

26. Lakowicz, J., *Fluorescence Anisotropy*, in *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 2006, Springer Science+Business Media, LLC: New York, NY 10013, USA. p. 361-363.
27. 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.
28. Bustamante, C., et al., *Entropic elasticity of lambda-phage DNA*. *Science*, 1994. 265(5178): p. 1599-600.
29. Kellermayer, M.S., et al., *Folding-unfolding transitions in single titin molecules characterized with laser tweezers*. *Science*, 1997. 276(5315): p. 1112-6.
30. 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.
31. Flory, P.J., *Statistical mechanics of chain molecules*. 1989, Munich, Vienna, New York: Hanser Publishers.
32. 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.
33. 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.
34. Petersen, B., et al., *A generic method for assignment of reliability scores applied to solvent accessibility predictions*. *BMC Struct Biol*, 2009. 9: p. 51.
35. 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.
36. Bryson, K., et al., *Protein structure prediction servers at University College London*. *Nucleic Acids Res*, 2005. 33(Web Server issue): p. W36-8.

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

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
2. **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.
3. 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.
4. **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.
6. **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.
7. 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.
8. 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.
9. **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.