

**Izomfehérjék vizsgálata lumineszcencia
spektroszkópia alkalmazásával**

Ph.D. értekezés

Bódis Emőke

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar,
Biofizikai Intézet

2004

Program: Biokémia és molekuláris biológia

Programvezető: Dr. Sümegi Balázs

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

Alprogramvezető: Dr. Somogyi Béla

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőmnek, Somogyi Bélának, a PTE Biofizikai Intézet intézetvezető egyetemi tanárának a lehetőséget, hogy ebben az intézetben folytathattam Ph.D. tanulmányaimat és a bizalmat, amellyel mindvégig támogatott.

Köszönöm Nyitrai Miklósnak és Szarka Krisztinának, két legközelebbi munkatársamnak az évek során nyújtott rengeteg segítséget, az emlékezetes és jóhangulatú közös munkákat, baráti beszélgetéseket.

Köszönöm Czimbalek Líviának, Grama Lászlónak, Hild Gábornak, Lukács Andrásnak, Visegrády Balázsnak és a Biofizikai Intézet minden munkatársának a mindennapi hasznos és kedves segítségnyújtásukat.

Köszönöm szüleimnek és leginkább férjemnek, Tarrósy Istvánnak, a folyamatos támogatást és rengeteg türelmet, amelyek nagymértékben hozzájárultak a mindennapi munkám eredményességéhez.

Tartalomjegyzék

Bevezetés	6
A miozin	8
A harántcsíkolt izom szerkezete	8
A miozin szubfragmentum 1 szerkezete	11
A miozin szubfragmentum 1 könnyű láncai	12
Nukleotid-kötő zseb	12
Az aktin-miozin kölcsönhatás szerkezeti modellje	14
A miozin működésének kinetikai sémája	16
A miozin szubfragmentum 1 ATPáz aktivitás nyomonkövetésének különböző alkalmazásai	17
Aktin-kötő régiók a szubfragmentum 1-en	18
Az aktin	20
Az aktin-miozin kölcsönhatás	24
A harántcsíkolt vázizom szabályozása	25
Célkitűzések	28
Anyagok és módszerek	30
Spektrofotometria	30
„Steady-state” fluoreszcencia spektroszkópia	30
Távolságmérés donor-akceptor pár között	32
Flexibilitás mérés Fluoreszcencia Rezonancia Energia Transzferrel	33
„Steady-state” anizotrópia mérések	35
Időfüggő fluoreszcencia mérések	36
Fluoreszcencia kioltás	37
Foszforeszcencia spektroszkópia	39
Szubfragmentum 1 preparálás, jelölés és karakterizálás	44
ATP és ADP.P _i nukleotid állapotok mimikálása	45
SDS-poliakrilamid gél elektroforézis	46
Preparálás a kioltási kísérletekhez	47
Preparálás a foszforeszcencia mérésekhez	48
Eredmények	50

A miozin szubfragmentum 1 irányfüggő, intramolekuláris flexibilitásának vizsgálata.	50
A szubfragmentum 1 aktin-kötő régiójának szerkezeti vizsgálata fluoreszcencia kioltási kísérletekkel.	62
Az aktin szerkezeti vizsgálata triptofán foszforeszcencia alkalmazásával.	65
Következtetések.	75
Irodalomjegyzék.	77
Publikációs lista.	85

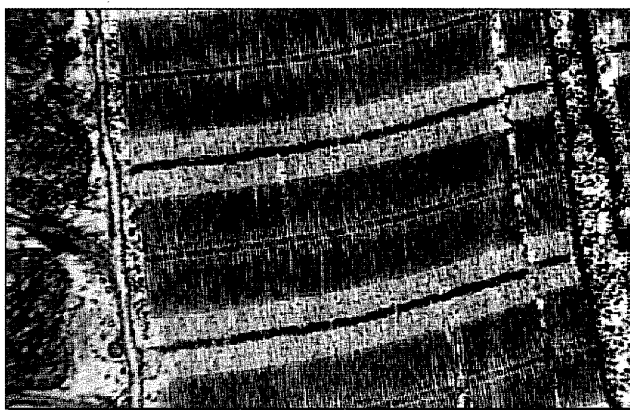
Bevezetés

„Minden élet oka a mozgás.”

Leonardo da Vinci

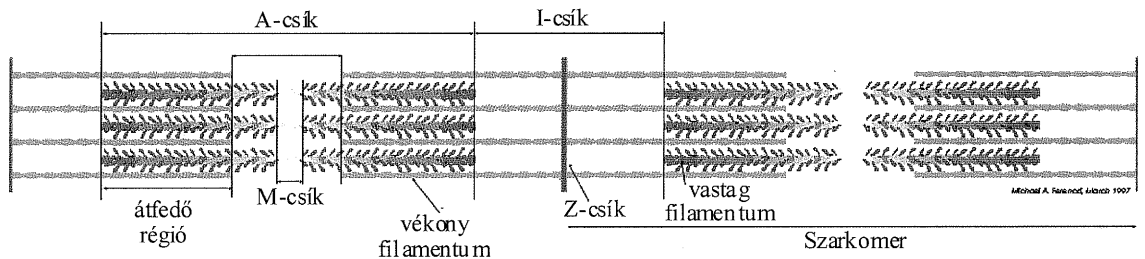
A mozgás megvalósításáért magasabb rendű szerveződésekben az izomszövet felelős. A különféle életfunkciók különböző típusú terheléseket rónak egy szervezetre, így ennek megfelelően három izomtípust különböztetünk meg: harántcsíkolt izom, szívizom és simaizom.

A harántcsíkolt izomsejt a szervezet egyik legnagyobb méretű sejtje, mioblasztok asszociációjából alakul ki, így számos sejtmagot tartalmaz. Az izomsejtek térfogatának jelentős részét a kétféle filamentális rendszerből, a főként aktint tartalmazó ún. vékony és a miozint tartalmazó ún. vastag miofilamentumokból felépülő miofibrillumok foglalják el. E filamentális rendszerek szabályos, egymással párhuzamos elrendeződéssel hozzák létre az izomkontrakció elemi egységét, a szarkomert (1. ábra). Megkülönböztetünk gyors (vörös színű szövet, sok mioglobin) és lassú (fehér színű szövet, kevesebb mioglobin) harántcsíkolt izomsejteket függően a terhelés típusához adaptálódott erő kifejtés nagyságától és időtartamától.



1. ábra: Harántcsíkolt izom fénymikroszkópos felvétele, ahol a szarkomerek élesen elkülönülnek egymástól (forrás: www.willamette.edu/~stas/physiology/labs/lab1/).

Fénymikroszkópos felvételeken jól látszik, hogy a szarkomer szabályosan szervezett harántcsíkolatokból áll, amelyek a vékony és vastag filamentumhoz tartozó különböző törésmutatók következményeképpen jönnek létre. Az egyszeresen törő szakasz (izotróp, I csík) csak vékony filamentumot, míg a kétszeresen törő szakasz (anizotróp, A csík) a vékony és vastag filamentumok átfedését tartalmazza (2. ábra).



2. ábra: A sematikus ábrán két egymás mellett lévő szarkomer látható az I, A, Z és M csíkok jelölésével; a vékony filamentum zöld, a vastag filamentum narancsszínű.

(forrás: www.ebsa.org/npbsn41/maf_home.html)

H csíknak nevezzük a szarkomer azon részét, ahol csak vastag filamentum van jelen. A Z csík a szarkomerek határát jelöli ki, míg az M csík a vastag filamentum miozin fejeket nem tartalmazó része (2. ábra).

A mai napig alapjaiban elfogadott izommodell 1954-ben született, amikor csaknem egyidőben két független kutatócsoport Hugh Huxley és Jean Hanson az MIT-ről (USA), illetve Sir Andrew Huxley és Rolf Niedergerke a Cambridge Egyetemről (Nagy-Britannia) ismertette „sliding filaments” elnevezésű kontrakciós elméletét. A „sliding filaments” modell szerint (Hanson and Huxley, 1953) izomösszehúzódkor az aktin és miozin tartalmú filamentumok egymás mentén elmozdulnak, amely a szarkomer megrövidülését, az izomsejt, illetve az izomsejtekből felépülő izomrost kontrakcióját okozzák. A kontrakcióhoz szükséges energiát a miozin által kötött ATP hidrolíziséből felszabaduló energia biztosítja.

A miozin

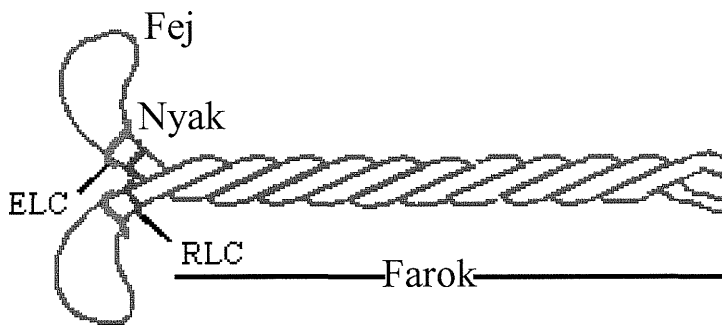
A miozin szupercsalád azokat a típusú motorfehérjéket foglalja magában, amelyekre jellemző, hogy az ATP-bontásból származó kémiai energiát egy szupramolekuláris fehérjekomplex részeként mechanikai munkává képesek alakítani, amely szupramolekuláris rendszer másik tagja az aktin. A szupercsalád rendkívül sokoldalú, ma mintegy 18 különböző családjára ismeretes és nem valószínű, hogy ez a szám végleges. Miozin előfordul minden eukarióta sejtben, részt vesz a sejt polaritás kialakításában, citokinezisben, vezikulum transzportban, sejtszerkezet kialakításában és fenntartásában, sejtmozgásban, kemotaxisban, jelátvitelben, magasabb rendű élőlények esetén az izomszövet felépítésében (Mermall et al., 1998; Baker and Titus, 1998). Legrégebben és legalaposabban tanulmányozott osztály a miozin II, amely nevét az őt felépítő két darab nehézláncról kapta. Ezt a miozin típusot konvencionális miozinnek is nevezik. A nem konvencionális miozin típusokat kezdetben a miozin I családba sorolták, de később az újabb típusok felfedezése egy idő után átláthatatlanná tette a családot, ezért a nevezéktant módosítani kellett. Így ma a miozin I családba a klasszikus egyfejtű, nem konvencionális miozinok tartoznak (a mai ismeretek szerint 26 taggal), míg a többiek külön családokba kaptak besorolást, a számozás pedig a felfedezés időrendiségét követi (Cope et al., 1996).

A miozin II (továbbiakban: miozin) megtalálható minden állati eukarióta sejtben, míg növényekben egyáltalán nem fordul elő. Habár az e családba tartozó miozinok közös tulajdonsága, hogy (i) két nehézlácból épülnek fel, (ii) Mg^{2+} -ATP-t hidrolizálnak, (iii) aktinhez asszociálnak, (iv) az aktin mentén a – végtől a + vég felé mozdulnak; mégis figyelemreméltó szerkezeti és szabályozásbeli különbségek figyelhetők meg a család tagjai között. A motor domén szerkezeti felépítése és szabályozásuk alapján négy nagy csoportra oszthatjuk a család tagjait: 1) harántcsíkolt izom/szívmusculus miozin; 2) simaizom/nem-izom miozin; 3) *Dictyostelium/Acanthamoeba* miozin; 4) élesztő miozin.

A harántcsíkolt izom miozin szerkezete

A miozin két, kb. 220 kDa súlyú nehéz láncból és két pár kb. 20 kDa súlyú könnyű láncból álló hexamerikus polipeptid. A polipeptid N-terminálisa, mintegy 850 aminosav, globuláris szerkezetet felvéve kialakítja a miozin fej („head”) régiót,

amely kifelé áll a vastag filamentum felszínéről és ún. kereszthidakat („cross-bridge”) hoz létre a miozin és aktin filamentumok között, biztosítva a két filamentális rendszer kapcsolatát. A fennmaradó aminosavakból a fehérje C-terminális része helikális szerkezetbe rendeződik, amelynek hossza eléri az 1500 Å-öt. Ez a fark („tail”) domén. A globuláris szakasz tartalmazza a fehérje enzimátikus (ATP hidrolízis) és az aktin-kötő funkciójáért felelős, ún. motor domén régiót, illetve az esszenciális („Essential Light Chain”, ELC) és regulációs („Regulatory Light Chain”, RLC) könnyű láncokat kötő nyak („neck” vagy könnyű-lánc kötő) domént (3. ábra).



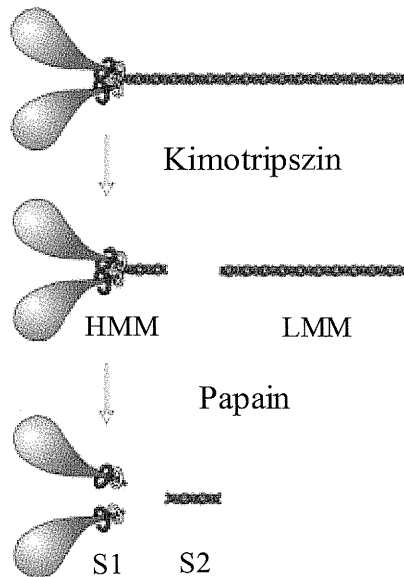
3. ábra: A miozin feji („head”), nyaki („neck”) és farki („tail”) doménje látható a sematikus ábrán. A könnyű láncok (ELC, RLC) is jelölve vannak.

(forrás: www.bms.ed.ac.uk/research/others/smaciver/Myosin%20II.htm)

A fark domén a vastag filamentum szerkezetének kialakításáért felelős, rendkívül változatos mind hosszúságában, mind aminosav szekvenciájában, jellemzi az adott miozin családot hasonlóan a motor doménhez, bár ez utóbbinak a szerkezete sokkal konzervatívabb. A fark domén aminosav sorrendjében megfigyelhető egyfajta periodicitás, a két nehéz lánc egymás felé forduló szakaszai hidrofób aminosavakat tartalmaznak, hidrofób kölcsönhatást kialakítva egymás között. A dimer miozin molekulák filamentummá való formálódásuk során egy helikális, ún. „coiled coil” szerkezetet alakítanak ki, ugyanis az egymás felé forduló régiói főleg töltött aminosavakat tartalmaznak, így a vastag filamentumot elsősorban elektrosztatikus kölcsönhatás tartja össze a miozin molekulák fark doménjein keresztül.

Történetileg a miozin volt az egyik első molekula, amelyről kiderült, hogy megfelelő proteolitikus emésztéssel olyan, a fejet is tartalmazó fragmentumra

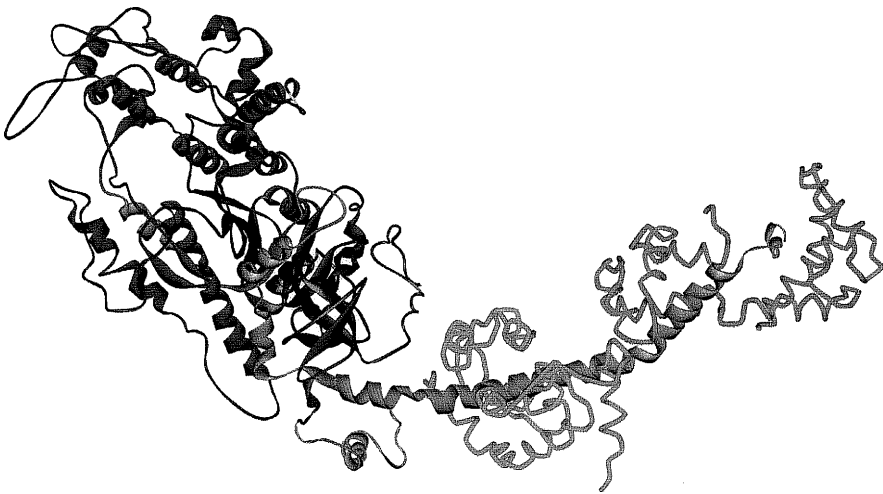
bontható, amely nem veszíti el az aktinhoz való kötődés és az ATPáz aktivitás képességét. (Csapó and Gergely, 1950; Perry, 1950) Így került izolálásra Szent-Györgyi Albert és csoportja által a miozinból emésztett kétfejű, kb. 130 kDa súlyú nehéz meromiozin (HMM, „Heavy Meromyosin”) és a miozin további részét tartalmazó könnyű meromiozin (LMM, „Light Meromyosin”) (4. ábra).



4. ábra: A miozin HMM-re illetve S1-re történő proteolitikus degradációja.
(forrás: www.ebsa.org/npbsn41/maf_home.html)

A HMM az ép miozinnal és LMM-mel ellentétben alacsony ionkoncentráción is vízdékony. 1960-ban Perry és munkatársai (Müller and Perry, 1960) kimutatták, hogy a HMM további papainnal vagy kimotripszinnel történő emésztéssel olyan kisebb fragmentumra bontható (szubfragmentum 1, S1), amely még mindig őrzi az aktin-kötés és ATP hidrolizálás képességét. Spudich és munkatársai *in vitro* motilitási kísérlettel később kimutatták, hogy az S1 elegendő fragmentuma a miozinnak, hogy az aktin filamentumot mozgatni tudja (Spudich and Watt, 1971). A legkisebb aktív egység megtalálása érdekében a *Dyctiostelium* által expresszált S1-et tovább hasították motor doménre és nyak (regulációs) doménre. Eredményeik alapján ugyan a motor domén az ATPáz aktivitását megőrzi, de *in vitro* motilitási kísérletek alapján az aktint nem képes mozgatni (Itakura et al., 1993).

A csirke vázizomból származó egyfejű S1 (5. ábra) háromdimenziós szerkezete 1993 óta ismert (Rayment et al., 1993b). Hosszúsága 190 Å, szélessége 50 Å a legkiterjedtebb részén. C-terminális végéhez kapcsolódnak a könnyű láncok. A kb. 95 kDa súlyú S1 tartalmaz két proteolitikusan érzékeny, az elektron denzitás vizsgálatokban nem látható, struktúrával nem rendelkező régiót („disordered regions”). Csirke harántcsíkolt izom S1-ben ezek a Glu²⁰⁴-Gly²¹⁶ (loop1), illetve Gly⁶²⁷-Phe⁶⁴⁶ (loop2) aminosavak közötti glicinben és lizinben gazdag szakaszok, amelyek hossza és szekvenciája eltérő a különböző miozin családokra nézve. Feltételezhető, hogy a hurkok aminosav-összetétele és helyzete fontos szerepet játszik a funkció meghatározásában a különböző típusú miozinok között. Az S1 ezen hurkainál történő tripszines proteolízis során egy 25 kDa-os NH₂-terminális, egy centrális 50 kDa-os és egy 20 kDa-os C-terminális fragmentum keletkezik (5. ábra).



5. ábra: A miozin szubfragmentum 1 röntgen-krisztallográfiai technikán alapuló szalagmodellje (Protein Data Bank kód: 2MYS). Pirossal a nehéz lánc 20 kDa-os, kézzel az 50 kDa-os, zölddel a 25 kDa-os emésztési fragmentumai láthatók. A két könnyű lánc világoskék és világoszöld.

Az S1 aminosav sorrendjének analízise kimutatta, hogy a miozin fejen belül 131 nagymértékben konzervatív aminosav található, ezek nagy része eltemetett, hidrofób környezetben helyezkedik el, néhány felszíni konzervatív aminosav

kivételével. Előfordulásuk elsősorban a kötött nukleotid koordinálását végző régióban figyelemre méltó, kevésbé jellemző az aktin-kötő felszíni aminosavakra.

Az S1 könnyű láncai

Aminosav szekvencia vizsgálatok kimutatták, hogy a könnyű lánc nagyfokú hasonlóságot mutat mind a kalmódulinnal, mind a troponin C-vel, amelyek tipikus kétértékű kation-kötő fehérjék. A jellegzetes kétértékű kation-kötő motívum („EF-hand”) megtalálható mind az ELC-ben, mind az RLC-ben, de az evolúció során a kötőhelyeket összekötő hosszú α -hélix megváltozott a fentiekhez képest (Rayment et al., 1993b). A miozin α -kimotripsinnel való emésztésekor a regulációs könnyű lánc degradálódik, míg papainnal való emésztéskor mindkét lánc kötve marad a könnyű lánc-kötő doménen. Az RLC nevét a simaizomban betöltött szabályozó funkciójáról kapta, míg az esszenciális könnyűlánc nevét a funkció szempontjából esszenciálisnak gondolt jelenléte miatt kapta. Ma már tudjuk, hogy ha nem denaturáló körülmények között választjuk el az ELC-t a nehéz láncától, akkor sem az ATPáz aktivitás, sem az aktin-kötés nem sérül, tehát az ELC jelenléte mégsem esszenciális (Sivaramakrishnan and Burke, 1982; Wagner and Giniger, 1981).

Nukleotid-kötő zseb

Az S1 központi magjának, a nukleotid-kötő régiónak szerkezeti kialakításában mindhárom emésztési fragmentum részt vesz. A globuláris fej 48%-ban α -hélix struktúrát tartalmaz (Rayment et al., 1993b), amely körbeveszi a hét, nagyjából párhuzamos, a nukleotid-kötő zseb kialakításában résztvevő β -lemezt.

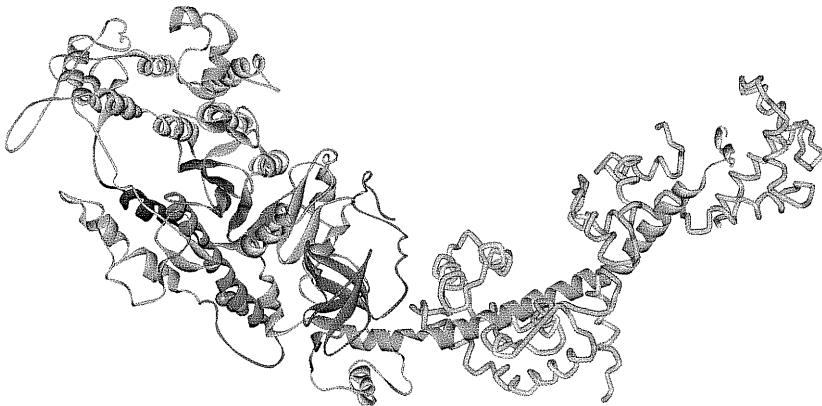
A nukleotid-kötő zseb, mint egy hasadék, az 50 kDa-os emésztési fragmentumot szeli ketté, alsó és felső 50 kDa-os doménre bontva azt. Az ATP-kötő zseb szerkezetét két, nagymértékben konzervatív aminosavakat (Gly¹⁷⁹-Thr¹⁸⁷ és Asn²³³-Lys²⁴¹) tartalmazó szakasz alakítja ki. A zseb kialakításában résztvevő aminosavak leginkább az ATP γ -foszfátjának és az ATP-hez kapcsolódó Mg²⁺-nak a koordinálását végzik, míg a ribóz és az adenin kötése kevésbé specifikus, számszerűleg is kevesebb másodlagos kötés alakul ki közöttük és az őket koordináló aminosavak között (Cope et al., 1996). Ez feltehetően annak érdekében lehet fontos,

hogy a miozin képes legyen különböző típusú nukleotidok kötésére (White et al., 1993). Mindamellet a kinetikai eredmények alapján a γ -foszfát kötőhelynek kell leginkább érzékenynek lennie egészen apró konformációs változásokra, hiszen az itt történő kémiai átalakulás okozza számos további konformációs lépésen keresztül az S1 C-terminálisának mintegy 10 nm-nyi elmozdulását, az izomkontrakció vagyis a mozgás létrejöttét (Finer et al., 1994; Molloy et al., 1995; Holmes and Geeves, 2000; Holmes, 1997; Geeves and Holmes, 1999). Szerkezeti elemzések és modellezések (Rayment et al., 1993b) arra engednek következtetni, hogy a miozin ún. „back-door” típusú enzim, azaz hidrolízis után az inorganikus foszfát az ATP-belépéssel ellentétes oldalon, míg az ADP a belépés helyén távozik (Yount et al., 1995).

A nukleotid-kötő zseb γ -foszfátot kötő régiója függően az ott tartózkodó nukleotid minőségétől (ATP, ADP.P_i, ADP) nyitott („open”) vagy zárt („closed”) állapotban fordulhat elő. Röntgen-krisztallográfián alapuló eredmények szerint a zseb nyitott pozíciót nukleotidmentes és ADP állapotokban, míg zárt pozíciót ATP- illetve ADP.P_i állapotokban vesz fel, így az ATP hidrolízis egy ciklusa alatt a zseb nyitott→zárt→nyitott állapotokon halad át. Spektroszkópián alapuló technikákkal az ATP és ADP.P_i állapotok nem vagy nehezen vizsgálhatók rövid élettartamuk miatt, ezért praktikus ezen állapotok mimikálására olyan nukleotid analógokat alkalmazni, amelyek a ciklust ezekben a lépésekben „befagyasztják”, azaz a miozin egyes releváns konformációját hozzák létre. Így szerkezeténél fogva az ATP állapot vizsgálatára például az ADP.BeF_x, (Fisher et al., 1995) ADP.P_i állapot vizsgálatára ADP.AIF₄⁻, ADP.V_i (Smith and Rayment, 1996) alkalmazása ad lehetőséget. A nukleotidmentes rigor és az ADP állapot stabil, hosszú élettartamú, így spektroszkópiai vizsgálata nem okoz gondot. A *Dyctiostelium* által expresszált motor domén jól kristályosítható, így röntgen krisztallográfián alapuló technikával a fent említett nukleotid analógokkal létrehozott különböző nukleotid állapotokhoz tartozó fehérje konformáció pontosan ismert (Fisher et al., 1995; Bauer et al., 2000; Smith and Rayment, 1996). Így a különböző technikák alkalmazása során kapott szerkezeti és dinamikai információk egymást kiegészítve segítenek közelebb kerülni a fehérje jellemzőinek és működésének pontosabb megismeréséhez.

Az aktin-miozin kölcsönhatás szerkezeti modellje

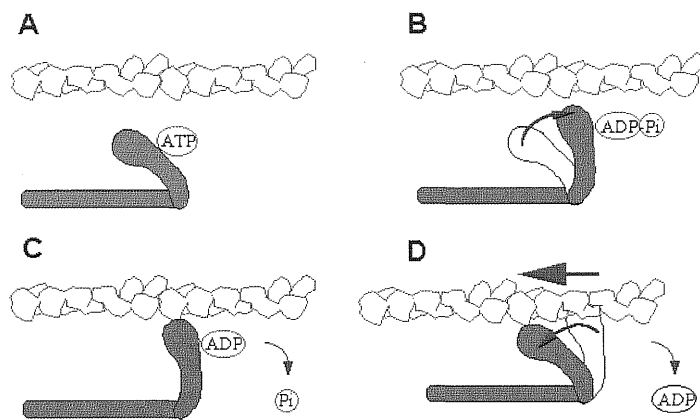
Az aktin és S1 kölcsönhatásának lépéseit ma leginkább az ún. lengő emelőkar („swinging lever arm”) modell írja le (Holmes, 1997; Dominguez et al., 1998). A modell szerint az aktinhoz kapcsolódó S1-ek orientációja változik a kötött nukleotidtól függően. Nukleotidmentes állapotban a kereszthidak 45°-os szöget zárnak be a vékony filamentummal miközben erősen kötött állapot (rigor állapot) alakul ki közöttük. Ekkor a nukleotid-kötő zseb nyitott („open”). ATP kötésekor hidrogénhidak alakulnak ki a nukleotid és az azt koordináló aminosavak között, amely hatására a *switch II* hélix (Phe⁴⁷⁵-Glu⁵⁰⁹) és a hozzá tartozó hurok (Trp⁵¹⁰-Leu⁵¹⁹) kb. 24°-kal elfordul kezdeti pozíciójához képest a Val⁴⁹⁷ körül (6. ábra).



6. ábra: Az ábrán szürkével jelöltük az S1-et, benne a *switch II* hélix és hurok (Phe⁴⁷⁵ - Leu⁵¹⁹) zöld színnel látható, narancs a Val⁴⁹⁷, kék a csuklópontnak nevezett Thr⁶⁴⁸-Ser⁶⁶⁶ közötti aminosav szakasz és lila a konverter domén.

Ennek következtében a γ -foszfát-kötő zseb rácsukódik az ATP terminális foszfátjára, létrehozva a zárt („closed”) állapotot (7. ábra). A miozin fejek aktinhoz való affinitása nagymértékben nukleotid-függő, ATP állapotban a nukleotidmentes állapothoz képest drasztikusan lecsökken, így ATP bekötődésekor a miozin fejek disszociálnak az aktin filamentumról (7. ábra, A). A hidrolízist követően a nukleotid ADP és inorganikus foszfát (P_i) formában van jelen a nukleotid-kötő zsebben. Az 50

kDa-os alsó és felső domén Thr⁶⁴⁸-Ser⁶⁶⁶ aminosavak közötti helix -e szakaszt csuklópontnak is hívjuk - körüli elfordulása tönkreteszi a γ -foszfátot koordináló hidrogénkötéseket és indukálja a foszfát-kötő zseb kinyílását, a nyitott („open”) állapot kialakulását. Az elfordulás következtében a fejek pozíciója ekkor kb. 90°-s az aktin filamentumhoz képest. Eközben a miozin fej még a két végterméket kötésben tartva gyengén visszaköt a kezdeti aktin monomerhez képest szomszédos monomerhez (7. ábra, B). A nyitott állapot elősegíti a foszfát disszociációját, így az inorganikus foszfát távozik a „hátsó ajtón” (7. ábra, C). Ezzel párhuzamosan a miozin fejek és aktin filamentum között erősödik a kölcsönhatás, mivel az ADP állapotú miozinok aktinhoz való affinitása nagyobb, mint akár az ATP, akár az ADP.P_i állapotú miozinoké.



7. ábra: Az ábrán az erőgenerálás egy ciklusa látható lépésekre bontva. Az aktin filamentum monomerei piros, a miozin fej kék színű.

(forrás: www.bms.ed.ac.uk/research/others/smaciver.htm)

Az ADP elengedésével párhuzamosan a konverter domén kb. 70°-kal elfordul, ami a C-terminális megközelítőleg 10 nm-es elmozdulásához vezet. Ez maga a húzás lépése. Így a fejek ismét visszatérnek eredeti 45°-os pozíciójukba elhúzva az aktin filamentumot a miozin filamentumhoz képest (7. ábra, D), és a szarkomer megrövidül.

minőségének változását követi nyomon és a *switch II* hélix és a konverter domén között, az ún. „relay loop” végén elhelyezkedő Trp⁵¹⁰-ból származik (Málnási-Csizmadia et al., 2001a; Yengo et al., 2000; Wakelin et al., 2002). A fluoreszcencia növekedés csak valamilyen konformáció változás eredménye lehet (pl. egy aminosav a fehérje felszínéről a molekula belseje felé fordul), ezért szükségszerűen a hidrolízis lépése (8. ábra, 3. lépés) további két allépésre (3a, 3b lépés) bontható. A lépés első fele (3a lépés) a nukleotid-kötő zseb „open-closed” átmenetét biztosító konformáció-változást foglalja magában, míg a második fele (3b lépés) a γ -foszfát hasítását. A 3a lépés egyensúlyi állandója 0.2, míg a 3b lépésé ≥ 10 , a közös érték ≥ 2 , ami így a foszfát disszociáció irányába tolja el a 3. lépést. A ciklus 3a lépése figyelemreméltó jelentőséggel bír a folyamat során, ugyanis ezen izomerizáció következtében történik a nukleotid-kötő zseb záródása, amely végső soron a „lever arm” nagymértékű elmozdulását eredményezi. Az „open-closed” átmenet egyensúlya nagymértékben függ a nukleotid tartalom minősége mellett a hőmérséklettől is. A hidrolízis lépés reverzibilis ($K_3 = 10$), gyors előrehaladó és gyors visszalépő konstansokkal jellemezhetjük, vagyis maga az ATP állapot instabil, élettideje rövid, gyorsan megszűnik.

A miozin S1 ATPáz aktivitás nyomonkövetésének különböző alkalmazásai

A teljes hosszúságú miozin molekula nem előnyös sem „steady-state”, sem gyors kinetikai ATPáz-aktivitás mérésekre, mert fiziológias vagy annál alacsonyabb ionerősségen, főleg aktin jelenlétében filamentummá formálódik, hosszabb időtartamú mérések esetén a küvetta aljára ülepedik, szórja a fényt, illetve heterogén akto-miozin kölcsönhatást alakít ki. Ezért elsősorban a vízdoldékony S1 vagy HMM alkalmas az ATPáz aktivitás mérésére.

Az S1, illetve HMM Mg^{2+} -ATPáz aktivitásának nyomonkövetésére számos „steady-state” módszer alkalmas. Ezek közül leggyakrabban használatos módszer a „coupled enzyme assay”, ahol a felszabaduló inorganikus foszfát egy piruvát-kináz – laktát-dehidrogenáz enzimkaszkádon keresztül összekapcsolódik a $NADH \rightarrow NAD$ átalakulással. Mivel a NADH abszorpciója adott hullámhosszon (340 nm) külön detektálható a NAD abszorpciójától, az ATP hidrolízis folyamata spektrofotometria alkalmazásával nyomonkövethető (Trentham et al., 1972). Az aktin aktivált vázizom

miozin Mg^{2+} -ATPáz aktivitás 5-10-szer nagyobb aktin jelenlétében, mint annak távollétében. Feltehető, hogy az aktin jelenléte a nukleotid-kötő zseb nyitott állapotát indukálja, gyorsítva ezáltal a foszfát elengedés lépését.

Szokás nem fiziológias körülmények között K^+ /EDTA-, és Ca^{2+} -ATPáz aktivitásokat is mérni. E mérések elsősorban spin vagy külső fluorofór próbák kötődésének, kötőhelyének karakterizálására szolgálnak. Gyakran a miozin preparálás után is mérik ezen aktivitásokat, hiszen a fehérje épségéről szolgáltatnak információt. Jól működő, friss miozin Ca^{2+} -ATPáz aktivitása alacsonyabb, mint a K^+ /EDTA-ATPáz aktivitása. Ehhez gyakran használatos módszer a kolorimetriás assay, amely az inorganikus foszfát ammónium-molibdenát által való megkötésén alapul, amely reagálva malachitzölddel, színreakciót vált ki és fotométeren detektálhat $\lambda=650$ nm-en (Lanzetta et al., 1979; Fiske, 1925).

Aktin-kötő régiók az S1-en

Az S1-gyel dekorált aktin filamentum elektronmikroszkópos képe alacsony felbontású, az aktin és S1 közötti kölcsönhatások nem vizsgálhatók nagy pontossággal. Mivel sem a filamentális aktin, sem az akto-miozin komplex nem kristályosítható, az aktin filamentum (Milligan et al., 1990; Holmes et al., 1990; Lorenz et al., 1993) és az aktin-miozin kölcsönhatás (Rayment et al., 1993a) térbeli felépítése az aktin monomer szerkezetére és az aktin-S1 elektronmikroszkópos eredményeire építve modellezéssel készült. A miozin aktinon lévő kötőhelyének felismerése függ a konformációtól és a kötőfelszín topográfiájától, továbbá a töltésviszonyoktól és hidrofóbicitástól (Cope et al., 1996). Az aktin-kötésben résztvevő aminosavak nagyrésze nem konzervatív. A modell szerint egy miozin fej két szomszédos aktin monomerhez képes kapcsolódni. Ezt igazolják mind az elektronmikroszkópos felvételek, mind a G-aktin filamentummá való polimerizálódása pusztán S1 kötés hatására is (Miller et al., 1988).

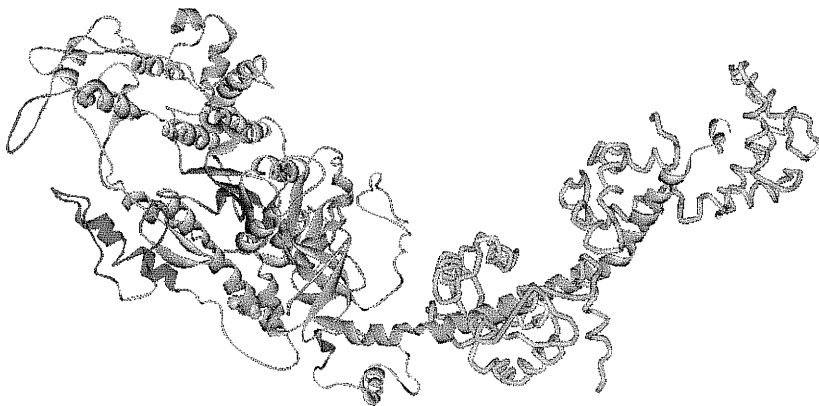
Az aktin kötésben részt vesznek:

(i) loop2 (Gly⁶²⁷-Phe⁶⁴⁶), amelynek az aktin kötésben való részvételét már a térbeli modell ismerete előtt feltételezték, hiszen az S1 aktinhoz való kötése meggátolja a loop2 proteolízisét (Mornet et al., 1981). A feltételezést tovább erősítették aktin és S1 közötti keresztkötési kísérletek (Sutoh, 1982). A loop2 főleg pozitív töltésű aminosavakat tartalmaz, amelyek ionos kölcsönhatást alakítanak ki az

aktin Asp¹-Glu⁴ és Asp²⁴-Asp²⁵ negatív töltésű szakaszával. Ez a miozin dokkolásának első lépése, ekkor a komplex közötti kapcsolat gyenge („weak binding”).

(ii) Arg⁴⁰⁵-Thr⁴¹⁴ loop, amelyet kardiomiopátiás loop-nak is hívnak, hiszen szívizom miozinban az Arg⁴⁰⁵ aminosav mutációja glutaminra hipertrófiás kardiomiopátiát okoz (Sweeney et al., 1994; Geisterfer-Lowrance et al., 1990). Megfigyelhető, hogy ilyen esetben csökken az S1 *in vitro* motilitási képessége és redukálódik az ATPáz aktivitás is. A hurok elér és sztereospecifikus kölcsönhatást alakít ki az aktin Pro³³²-Glu³³⁴ szakaszával.

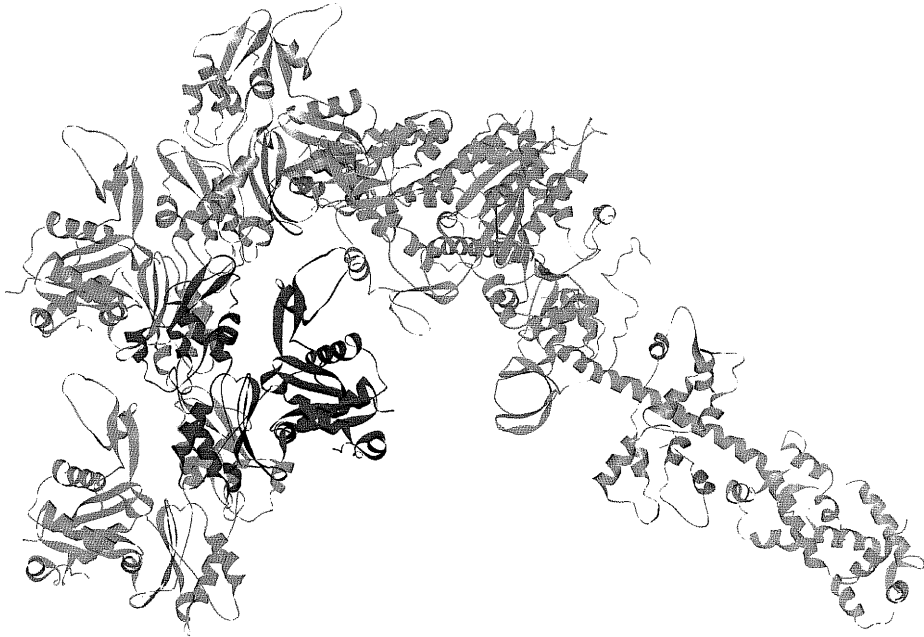
(iii) a Gly⁵²⁰-Pro⁵⁵⁸ szakasz egy helix(Gly⁵²⁰-Phe⁵⁴²)-loop(Pro⁵⁴³-Thr⁵⁴⁶)-helix(Asp⁵⁴⁷-His⁵⁵⁸) mintázat az alsó 50 kDa súlyú fragmentumban, hidrofób kölcsönhatást alakít ki a megfelelő aktin monomer Ile³⁴¹-Gln³⁵⁴ és Ala¹⁴⁴-Thr¹⁴⁸ szakaszaival. A miozin ezen szakaszának 39 aktinhoz kötődő aminosava közül csak négy konzervatív: Leu⁵²⁵, Glu⁵²⁷, Gly⁵³¹ és Leu⁵³⁶.



9. ábra: Zölddel jelölve láthatók az S1 aktin-kötésben résztvevő régiói.

(iv) Lys⁵⁶⁷-His⁵⁷⁸ szakasz is egy hurkot formál, elektrosztatikus kölcsönhatást alakít ki a szomszédos (n-1) aktin monomerrel. A modellezéssel készült komplexen ez a szakasz nem ér el az aktin felszínéig, mivel azonban maga a hurok flexibilis, képes áthidalni a hiányzó távolságot és az aktin Tyr⁹¹-Glu¹⁰⁰ szakaszához kapcsolódni. A kölcsönhatás nagy valószínűséggel elektrosztatikus, a miozin ezen

régiója pozitív, az aktiné negatív töltésű aminosavakat tartalmaz. Mutálva a Glu⁹⁹-et vagy Glu¹⁰⁰-at hisztidinné, a filamentum motilitása jelentősen redukálódik (Johara et al., 1993).



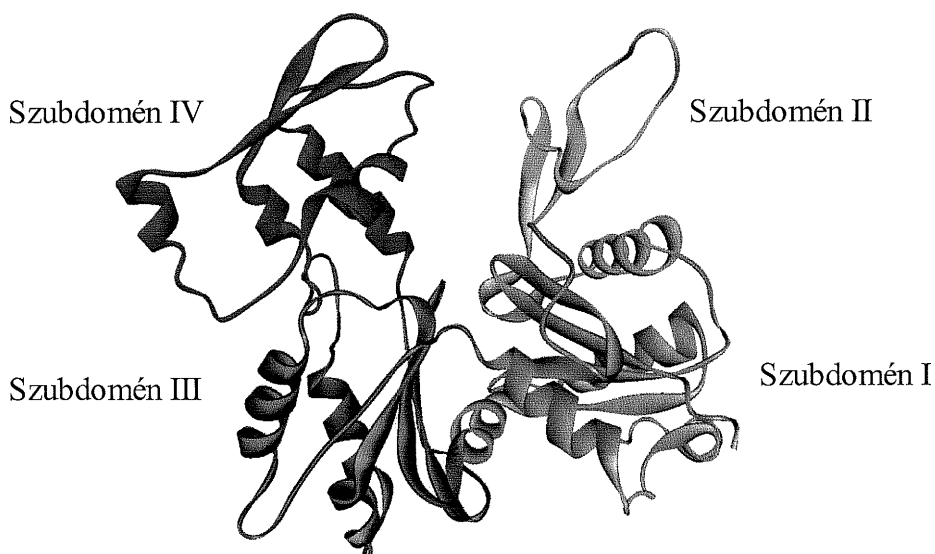
10. ábra: Az aktin-S1 komplex modellezéssel készült szalagmodellje. Az ábrán 4 aktin monomer (zöld, kék, zöld és bordó) és egy S1 (a nehéz lánc világoskék, az ELC és RLC bordó és zöld) látható.

(v) habár az ELC NH₂-terminálisának felbontása kevésbé jó, mint a molekula többi részének (nehéz láncnak), biokémiai, spektroszkópiai és modellezési vizsgálatok (Nyitrai et al., 2000b) kimutatták, hogy az ELC is képes lehet kötődni az aktin filamentumhoz.

Az aktin

Az aktin az eukarióta sejtek egyik leggyakrabban előforduló fehérjéje. Minden eukarióta sejtben megtalálható mint a citoszkeleton egyik típusának (mikrofilamentum) építő egysége. Magasabb rendű élőlényekben az izomszövetben e filamentális forma speciális szerkezetbe rendeződik és a miozin tartalmú vastag filamentummal együtt az izomkontrakció strukturális alapját képezi. Úgy az élő sejtben, mint *in vitro* körülmények között kétféle formában van jelen: monomer

vagy G-aktin (globuláris) (11. ábra), illetve filamentális F-aktin (12. ábra), amely a monomerek polimerré való rendeződésével alakul ki. A monomer aktin röntgenkristallográfián alapuló 3D modellje 1990-ben megszületett (Kabsch et al., 1990; Lorenz et al., 1993), így ma már az ismert aminosav sorrenden túl a harmadlagos szerkezet is elérhető (11. ábra).



11. ábra: Az aktin monomer szalagmodellje látható (Protein Data Bank kód: 1ATN).

Az aktin monomer 43 kDa súlyú globuláris fehérje. A monomer két doménre osztható, amelyek mindegyike még további két szubdoménre bontható. A két domén között egy hasadék található, amely a kation- és nukleotid-kötő helyeket tartalmazza. A kötött kétértékű kation fiziológiásan a Mg^{2+} , *in vitro* körülmények között az aktin preparálás oldatai miatt a Ca^{2+} . A nukleotid-kötőhely ATP-t, ADP.P_i-t vagy ADP-t tart kötve. Teljesen nukleotidmentes környezetben az aktin gyorsan denaturálódik.

A filamentum két protofilamentum helikális feltekeredését jelenti (12. ábra), amelyet felfoghatunk egy balmenetes helixnek, ahol a menetemelkedés 2.75 nm monomerenként, vagy egy jobbmentes helixnek, ahol pedig 13 monomer egy periódus. Az aktin monomerek filamentummá való rendeződése során a szubdomén III és IV található a filamentum tengelye felé, míg a subdomén I és II a tengelytől kifelé rendeződik (Holmes et al., 1990; Miki et al., 1992).



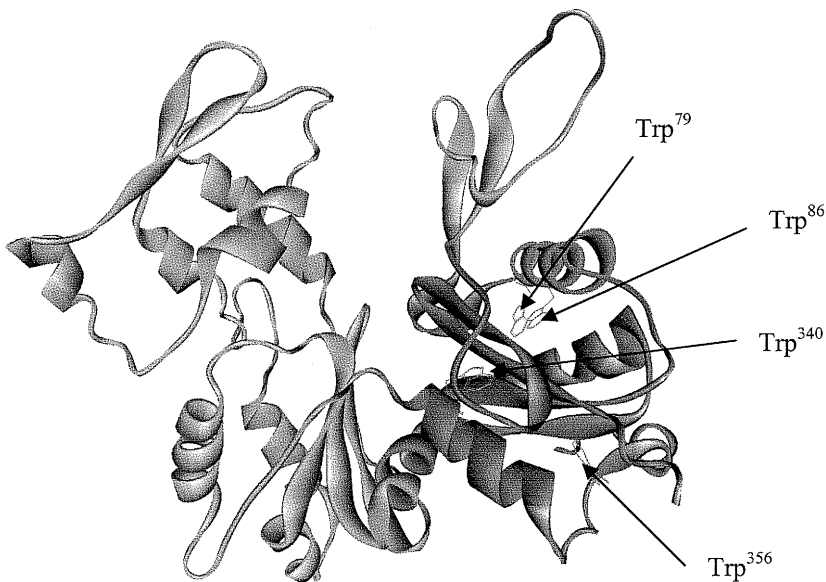
12. ábra: Aktin monomerek polimerizációjából felépülő filamentum modellje.

A filamentum felépülésének folyamatát két szakaszra bonthatjuk: 1. nukleáció, amely során néhány monomer összekapcsolódik, 2. elongáció, amikor a kialakult dimerekhez, trimerekhez további monomerek csatlakoznak és hosszú polimerekké szerveződnek. Az egyensúly kialakulása után a filamentumhoz asszociáló és onnan disszociáló monomerek száma megegyezik, a filamentum hossza nem változik, mégis egy folyamatos dinamikus belső mozgás van jelen (dinamikus egyensúly). Ezt a folyamatot nevezzük „treadmilling”-nek. A filamentum egyik végét („pointed end”) inkább a monomerek disszociációja, másik végét („barbed end”) inkább a monomerek asszociációja jellemzi. A disszociáló vég monomerjei elsősorban ADP-t kötnek, míg az asszociáló vég kapcsolódó monomerjei elsősorban ATP-t. Mivel az ATP hidrolízis lassabb (0.02 s^{-1}), (Pollard and Weeds, 1984) mint a monomer asszociáció sebessége, a filamentumnak ezen a végén ún. ATP-monomer sapka található.

Akár *in vivo* akár *in vitro* figyeljük az aktin filamentumot, mindig találunk mellette egy olyan szubpopulációt, amely monomer formában van jelen. Egyensúlyban a jelenlévő monomerek koncentrációja az ún. kritikus koncentráció, amely érték alatt az aktin nem képes filamentummá formálódni. A kritikus koncentráció értéke nagymértékben függ a környezeti paraméterektől, az aktin

nukleotid- és kation-tartalmától. Ugyanazon filamentum két végén („pointed end”, „barbed end”) különböző a kiritikus koncentráció értéke.

Az aktin tartalmaz négy triptofánt, amelyek mind a szubdomén I-ben találhatóak. Ezeket, mint fluorofórokat (kromofórokat) alkalmazhatjuk lumineszcencián alapuló vizsgálatokban.



13. ábra: Aktin monomer, pirossal jelölve a szubdomén I, amely tartalmazza a molekulában előforduló négy triptofánt.

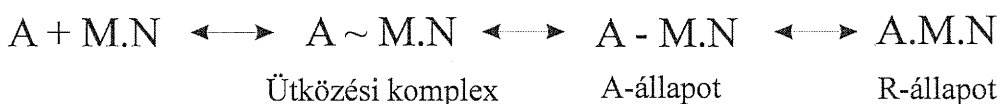
A szerkezeti ábrán látható (13. ábra), hogy a W79 a felszínen található, a W356 is a felszínen helyezkedik el, de indol gyűrűje a molekula belseje felé mutat. A W340 és W86 aminosavak a fehérje belsejében, eltemetetten találhatóak. Reisler és munkatársai kimutatták, hogy az aktin teljes fluoreszcenciája hogyan bontható fel az egyes triptofánok járulékaikra (Doyle et al., 2001). Kiderült, hogy kevesebb járuléka a W79 és W86 triptofánoknak (1% és 16%), jelentősebb járuléka a W340 és W356 triptofánoknak van (33% és 50%). A $\text{Ca}^{2+} \rightarrow \text{Mg}^{2+}$ kation kicserélődés növelte az aktin teljes fluoreszcenciáját, amelyhez elsősorban a W356 megnövekedett fluoreszcenciája járult hozzá, így tehát e triptofán környezete érzékeny a kötött kation minőségére. A polimerizáció azonban csökkentette az összfluoreszcenciát, amely 2 vagy 3 triptofánnak a polimerizáció során bekövetkező részleges kioltásával lehet összefüggésben (Doyle et al., 2001).

G. B. Strambini és S. S. Lehrer 1991-ben végzett az aktinon foszforeszcencia spektroszkópiai vizsgálatokat, amelyek célja az aktin 4 triptofánjának

karakterizálása illetve a monomer és filamentum közötti konformációs és dinamikai különbségek feltérképezése volt. Eredményeik szerint a triptofánok jelentős heterogenitást mutattak, amely arra enged következtetni, hogy a fluorofórok környezetének polaritása és lokális flexibilitása nagymértékben különbözik egymástól (Strambini and Lehrer, 1991). Összehasonlítva a monomer és filamentális formák foszforeszcencia tulajdonságait, arra a megállapításra jutottak, hogy a szubdomén I-ben lévő triptofánok körüli lokális környezet csak kis mértékben változik a polimerizáció során. Az eredmény annyiban talán nem meglepő, hogy a szubdomén I nem vesz részt a filamentum formálásban, nem a filamentum tengelyén található, hanem attól viszonylag távol. Hozzá kell tenni, hogy a kísérletek óta eltelt évtizedben a G. B. Strambini által házilag épített foszforiméter, -amelyen magam is végeztem a kísérleteimet- jelentős fejlesztésen ment keresztül, érzékenysége ma már lefedi a triptofán foszforeszcencia emisszió teljes tartományát, (Strambini and Gonnelli, 1995; Gonnelli and Strambini, 1995), így ez okból is praktikus volt újrazivsgálni az aktin foszforeszcenciáját.

Az aktin-miozin kölcsönhatás

A miozin aktinhoz való kapcsolódása kinetikai mérések alapján három lépésre bontható („Three-Step model”) (Geeves and Conibear, 1995). Az aktin és miozin közötti első lépés egy elektrosztatikus kölcsönhatás létrehozása (14. ábra).



14. ábra: Az aktin (A) és nukleotidot (N) kötő miozin (M) közötti kötés létrehozásának lépései.

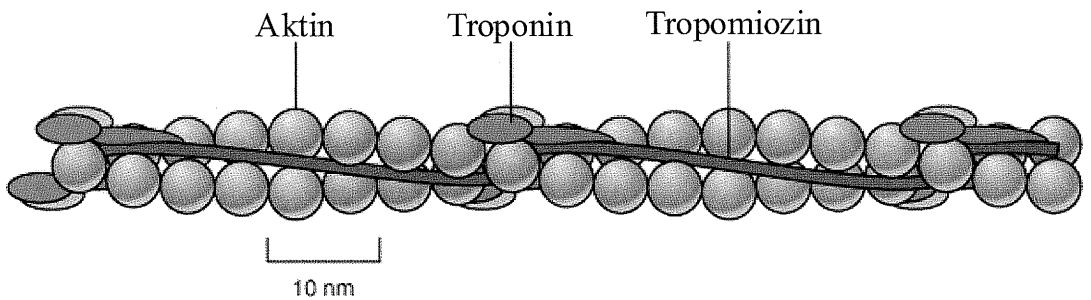
Ütközések révén a miozin pozitívan töltött loop2 régiójának és az aktin 1-4 és 24, 25 aminosavak közötti negatív töltésű régióinak elektrosztatikus vonzása hozza kötésbe a két molekulát. Feltehetően ez a lépés diffúzió-limitált és a kísérletek alapján az adott hőmérsékleti tartományban hőmérséklet-független. A kötés kialakításának

további lépései e két molekula egyre erősebb komplex kialakítására irányuló konformáció változásait tartalmazza.

Hidrofób aminosavak közötti kölcsönhatás, amely egyben a komplex első izomerizációs lépése, alakítja ki a molekulák közötti gyenge kötést („weak binding”, A-állapot), ekkor a miozin 516-558 helix-loop-helix mintázata kapcsolódik az aktinon lévő 341, 354, 144, 147 aminosavakhoz. A lépés sebessége nem függ az ionerősségtől, de függ a hőmérséklettől. Majd a két molekula között tovább erősödik a kapcsolat, újabb hőmérséklet-független konformáció változással kialakul az erős kötés („strong binding”, R-állapot). Azt, hogy itt valóban történik belső konformáció változás, bizonyítja, hogy az aktin Cys³⁷⁴-hez kapcsolt pyrén fluoreszcenciája, illetve az S1-hez kötött fluoreszcens nukleotidok fluoreszcenciája megváltozik. Az A→R átmenet egyensúlyi állandója erősen nukleotid-függő, ellentétben az első (ütközési komplex) és második (A-állapot) lépéssel. Mindez azt jelenti, hogy az S1 minden nukleotid állapotban a fenti séma szerint kötődik az aktinhoz, de egyes állapotokban (ATP, ADP.P_i) a 3. lépés egyensúlyi konstansa nagyon kicsi a nukleotidmentes vagy ADP állapothoz viszonyítva, így nem alakul ki az erős kölcsönhatás (R-állapot). A miozin aktinnal való kölcsönhatásának erősödése párhuzamosan a nukleotid kötő affinitásának csökkenéséhez vezet, az R-állapot kialakulása például 100-ad részére csökkenti a miozin ADP iránti affinitását.

A harántcsíkolt vázizom szabályozása

A szarkomerben az izomműködés szabályozása a vékony filamentumon keresztül történik a hozzá kapcsolódó tropomiozin (Tm) és az ún. troponin komplex (Tn) által. A Tn komplex három alegységből épül fel: (i) TnT, amely az aktin, a Tm és a Tn közötti szerkezeti stabilitásért felelős, (ii) TnI, amely inhibitorként Ca²⁺ távollétében a miozin aktinhoz való kötését gátolja és (iii) TnC, amely a Ca²⁺-ot képes kötni. Az izomsejt felszínén végighaladó akciós potenciál eredményeként Ca²⁺ szabadul fel a szarkoplazmatikus retikulumból, így az intracelluláris térben megnövekedik a Ca²⁺ koncentráció. A szabad Ca²⁺-ot a TnC megköti és így közvetetten, a Tm aktinhoz viszonyított pozícióját megváltoztatva aktiválja az izomösszehúzódást.



Copyright 1999 John Wiley and Sons, Inc. All rights reserved.

15. ábra: A kettős hélix felépítésű aktin filamentum, amelyhez kapcsolódik a tropomiozin és a troponin komplex.

(forrás: fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/neuro/tropomyosin.jpg)

A Tm egy homo- vagy heterodimerből felépülő α -helikális „coiled-coil” (Perry, 2001; Milligan et al., 1990) (15. ábra). A Tm család számos izoformát tartalmaz, amelyek hosszúságukat tekintve különbözőek. A haráncsíktolt izomban előforduló Tm hét aktin monomeren fekszik keresztül, ún. „head-to-tail” elrendezésben polimerizálódik. Az aktinon egy kis szakaszon átfednek egymással a szomszédos Tm molekulák. A Tm aktin filamentumon való pozíciójának meghatározása nem egyszerű, hiszen Ca^{2+} és miozin jelenlétének függvényében változik elhelyezkedése. A ma elfogadott ún. három állapotú dinamikus térbeli modell (McKillop and Geeves, 1993) szerint a Tm három pozíció, „blokkolt”, „zárt” és „nyitott” állapotok között képes elmozdulni (Maytum et al., 1999). „Blokkolt” állapotban, amikor a TnC nem köt Ca^{2+} -ot, a Tm eltakarja az aktin miozin-kötő felszínét, mindössze gyenge elektrosztatikus kölcsönhatást engedve a két molekula között. A TnC Ca^{2+} kötésének hatására a Tm 25° -kal elmozdul az aktin filamentum tengelye mentén létrehozva az ún. „zárt” állapotot, amely a miozin számára további kötőhelyek hozzáférhetőségét biztosítja. A Tm pozíciója ebben az állapotban jelentősen stabilabb, mint blokkolt állapotban (Isambert et al., 1995). A miozin fejek bekötésének hatására a Tm további 10° -kal csúszik el az aktin felszínén, ezáltal gyakorlatilag minden miozin-kötő régió elérhetővé válik a miozin számára. Ezt hívjuk „nyitott” állapotnak. Morfológiai vizsgálatokból kiderült, hogy a Tm „blokkolt” állapotban az aktin szubdomén II és III régiókon fekszik keresztül, a

„zárt” és „nyitott” állapotokban pedig a szubdomén IV felé csúszik tovább (Lehman et al., 1994). *In vitro* vizsgálatokban a Tm komplexet nem tartalmazó vékony filamentumot szabályozatlan filamentumnak hívjuk. Ekkor a Tm aktinon való elhelyezkedése csak a miozin jelenlététől függ. Miozin mellett a Tm „nyitott” pozícióban, míg miozin nélküli kísérletekben „zárt” pozícióban található (Lorenz et al., 1995).

Célkitűzések

Vizsgálataink központjában a miozin intramolekuláris flexibilitásának feltérképezése, illetve az aktin és miozin közötti kapcsolatnak mind a miozin, mind az aktin oldaláról történő karakterizálása áll.

1.) Célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk a miozin S1 intramolekuláris flexibilitását, mint dinamikai paramétert, különböző, az enzimatis tevékenység szempontjából aktív régiók között, úgy mint az aktin-kötő régió, az ATP-kötő zseb és a legnagyobb reaktivitású cisztein (SH1, Cys⁷⁰⁷). Továbbá célunk volt, hogy feltérképezzük, hogy ez a paraméter hogyan változik az ATP hidrolízis egy ciklusán belül, ahol ATP, ADP.P_i, ADP és nukleotidmentes állapotokat különböztetünk meg, és amelyekben a γ -foszfát kötőhely nyitott vagy zárt állásban lehet. A kísérletek elvégzéséhez fluoreszcencia spektroszkópai módszereket alkalmaztunk: fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer (FRET), fluoreszcencia élettartam és „steady-state” anizotrópia méréseket.

2.) A miozin aktin-kötő felszínéhez közel található a Lys⁵⁵³ aminosav, amely szelektíven jelölhető külső fluorofórral. Fluoreszcencia kioltási kísérletekkel kívántuk jellemezni a fluorofór környezetét és az abban bekövetkező változásokat aktin jelenlétében és hiányában, a miozin nukleotidmentes és ADP állapotaiban.

3.) További célul tűztük ki, hogy az aktin-miozin kapcsolatot az aktin oldaláról vizsgáljuk. Ehhez steady-state és időfüggő foszforeszcencia spektroszkópai módszereket alkalmaztunk, amelyekkel jellemezhetjük az aktinban a kromofórok körüli lokális környezetben bekövetkező szerkezeti és dinamikai változásokat a miozinnal való kölcsönhatáskor. Kromofórként az aktin triptofánjait alkalmaztuk. A miozin modellezésére triptofánmentes miozin motor domént (MD/W-) (Malnasi-Csizmadia et al., 2001a) használtunk, amelynek aktivitása és aktin-kötő képessége közel megegyezik a natív S1-ével.

Anyagok és Módszerek

Spektrofotometria

Kísérleteink során az alkalmazott fehérjék és külső fluorofórok koncentrációjának, illetve az S1 ATPáz aktivitásának meghatározásához Shimadzu UV-2100 típusú spektrofotométert használtunk. Az említett koncentrációk meghatározhatók a Lambert-Beer törvényt alkalmazásával:

$$\ln I_0/I = A = \varepsilon \cdot x \cdot c, \quad (1)$$

ahol I_0 az oldathoz érkező fénysugár intenzitása, I az oldatból kilépő fénysugár intenzitása, A az abszorpció, ε az extinkciós koefficiens, x a fénysugár oldatban megtett úthossza (1 cm 1x1 cm-es kvarcküvetta esetén) és c az oldott anyag koncentrációja. A fehérjére, illetve fluorofóra jellemző, adott hullámhosszra megadott ε ismeretében a koncentráció a leolvasott abszorpció érték ismeretében meghatározható. Kolorimetrián alapuló ATPáz aktivitás méréskor (Fiske, 1925; Lanzetta et al., 1979) műanyag 1x1 cm-es küvetával dolgoztunk, mivel az abszorpció értékek leolvasása 660 nm-en történtek, ahol ezek a küveták nem nyelik el ezt a hullámhosszúságú fényt.

„Steady-state” fluoreszcencia spektroszkópia

Méréseinket egy Perkin Elmer LS50B típusú fluoriméteren végeztük. A miozin S1-et a fehérjéhez kapcsolt külső fluorofórok spektrális tulajdonságain keresztül vizsgáltuk, amely riporter molekulák elnyelési maximumát spektrofotométeren állapítottuk meg. A külső fluorofórok jellemzőit az irodalomból ismerjük, így olyan fluorofórokat alkalmaztunk, amelyek megfeleltek elvárásainknak: (i) szelektíven kapcsolódjon egy adott aminosavhoz az S1-en belül, (ii) a fehérje jellemzőit csupán elfogadható hibahatáron belül módosítsa a natív állapotú fehérjéhez képest, (iii) lehetőleg magas legyen a kvantumhatásfoka (FRET mérésekben donorként alkalmazott fluorofóroknál kritikus). Az emissziós spektrumokat adott gerjesztési

hullámhossz beállítása mellett vettük fel és adott, fluorofórtól függő hullámhossz-tartományon detektáltuk.

<i>külső fluorofór</i>	<i>gerjesztési maximum (nm)</i>	<i>emissziós maximum (nm)</i>
ANN	350	475
IAEDANS	350	490
FHS	490	525
IAF	490	515

1. Táblázat: Az általunk alkalmazott fluorofórok gerjesztési és emissziós jellemzői, ahol az ANN, a 9-anthroylnitrile, az FHS a 6-(fluorescein-5-carboxamido) hexanoic acid succinimidyl ester, az IAF a 5-(iodoacetamido)fluorescein és az IAEDANS a N-[[(iodoacetyl)amino]ethyl]-5-naphthylamine-1-sulfonate rövidítése.

Méréskor a gerjesztési és emissziós rések nagyságát (5 nm), a spektrum felvétel sebességét (300-500 nm/min) vagy több spektrum felvételének (3-5) és átlagszámolásának lehetőségét mérés előtt beállítottuk. Hőmérséklet-függő emissziós spektrumok felvételekor a küvetákat az őket körülvevő küvetatartóval együtt a kívánt hőmérsékletre termosztáltuk (2-34 °C). A felvett emissziós spektrumokat korrigáltuk a fényforrás intenzitás függésére a gyártó által biztosított, ismert spektrumú standard lámpával. Hullámhossz-függő korrekciós faktort kapunk, ha a standard lámpa egy adott hullámhossz-tartományon vett intenzitás spektrumát elosztjuk a műszer saját lámpájának ugyanazon hullámhossz-tartományon felvett intenzitásával. Ezzel a paraméterrel elosztva bármely, általunk is alkalmazott fluorofór emissziós spektrumát, egy műszer-független, korrigált emissziós spektrumot kaptunk.

A spektrumokat továbbá korrigálni kellett az „inner filter” effektusra is, amely a minta re-abszorpciójából ered. Figyelembe véve a küvetta és fényaláb geometriai elrendezését, 1x1 cm-es küvetára vonatkozó korrekcióhoz a következő összefüggést alkalmaztuk:

$$F_{\text{kor}} = F_{\text{obs}} \text{antilog} [(OD_{\text{ex}} + OD_{\text{em}})/2] \quad (2)$$

ahol OD_{ex} a gerjesztés hullámhosszán mért abszorpció értéke 1 cm-re vonatkoztatva, OD_{em} pedig a beállított emissziós tartományhoz tartozó abszorpciós spektrum.

Távolságmérés donor-akceptor pár között

A molekulán belül két pont közötti távolság mérésének egyik lehetősége a Förster-típusú Rezonancia Energia Transzfer (FRET) jelenségén alapuló fluoreszcens technika. A jelenség egy spektrálisan jól megválasztott donor-akceptor fluorofór pár között jön létre, ha (i) a donor emissziós spektruma átfed az akceptor abszorpciós spektrumával, (ii) a donor emissziós vektora és az akceptor abszorpciós vektora közel párhuzamos egymással, (iii) a donor és akceptor között lévő távolság 20-100 Å-nyi tartományba esik. A feltételek teljesülésekor a donor molekulát gerjesztve adott frekvenciájú fényel, emissziójának egy része non-radiatív módon dipól-dipól kölcsönhatás révén transzferálódik az akceptor molekulához. A donor akceptor nélküli (teljes emisszió) és akceptor jelenlétében mért emissziójának ismeretében meghatározható a transzferált energia aránya. Az ún. transzferhatásfok (E) kísérletesen meghatározható a donor akceptor jelenlétében (F_{DA}) és nélküle (F_D), adott emissziós tartományon felvett intenzitásaiból:

$$E = (F_D - F_{DA}) / F_D = 1 - (F_{DA} / F_D) \quad (3)$$

Amikor az akceptor jelölési arány 100%-nál alacsonyabb volt, az így számolt transzferhatásfokot korrigáltuk a jelölési aránnyal (β), hiszen ebben az esetben figyelembe kell venni, hogy van olyan donor, amelynek nincs akceptor párja, így az F_{DA} spektrumra szuperponálódik egy szubpopulációs F_D spektrum:

$$E_{corr} = E / \beta \quad (4)$$

A kísérletes eredményekből meghatározott transzferhatásfok (E) ismeretében a donor és akceptor közötti távolság (R) a következő összefüggésből számolható:

$$E = R_0^6 / (R_0^6 + R^6) \quad (5)$$

ahol R_0 az ún. Förster-féle kritikus távolság, amely az 50%-os transzferhatásfokhoz tartozó érték. A donor-akceptor közti távolság (R) számolásához szükség van a Förster-féle kritikus távolság (R_0) ismeretére:

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

ahol n a törésmutató, κ^2 az orientációs faktor, Φ_D a donor kvantumhatásfoka, J pedig az akceptor abszorpciós spektrumának és a donor emissziós spektrumának átfedési integrálja, amely kísérletesen meghatározható a következő összefüggésből:

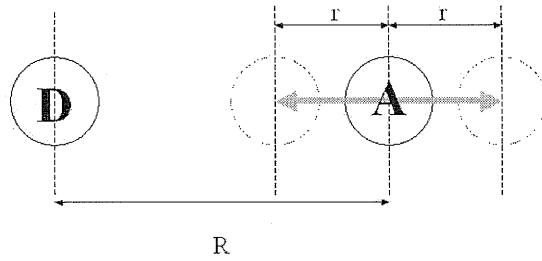
$$J = \int F_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda / \int F_D(\lambda) d\lambda \quad (7)$$

A törésmutató értéke 1.4, a donor kvantumhatásfoka (Φ_D) meghatározható egy ismert kvantumhatásfokú referencia minta, pl. a quinin szulfát emissziós spektrumának ismeretében (ennek kvantumhatásfoka 0.1 N H_2SO_4 -ben oldva 0.53 (Kouyama et al., 1985)). A κ^2 értéke 0-4 közötti értékeket vehet fel attól függően, hogy mennyire rigid a kapcsolat a fluorofór és a fehérjeszegmens között, és hogy milyen a két fluorofór relatív pozíciója. Ideális esetben, amikor a fluorofórok egymáshoz képest gyorsan (ns-os skálán) és szabadon rotálhatnak egy, az adott fluorofór hosszával megegyező sugarú képzeletbeli gömb térfogatában, értéke 2/3-nak vehető. A valóságban általában nem teljesen izotróp ez a mozgás, a fehérje környezet jelenléte korlátozza azt, így a 2/3 érték alkalmazása nem ad ideálisan pontos R_0 -t és az ebből származtatott R értéket.

Flexibilitás-mérés FRET-tel

A fehérjén belüli donor-akceptor közötti távolságot (R) a fehérje fluktuáló mozgásából eredően átlag távolságnak kell tekintenünk, figyelembe véve, hogy ehhez a távolsághoz egy adott félértékszélességű távolságeloszlás tartozik. Ez az eloszlás a rendszerbe juttatott többlet energia (pl. hőmérséklet emelkedése) hatására szélesedik. Ha a fehérje két pontja között történő változást pusztán a

transzferhatásfokból számolt R távolsággal akarjuk jellemezni, meglehetősen pontatlanul tehetjük azt a köztük lévő 6. hatványos függés miatt (5. egyenlet).



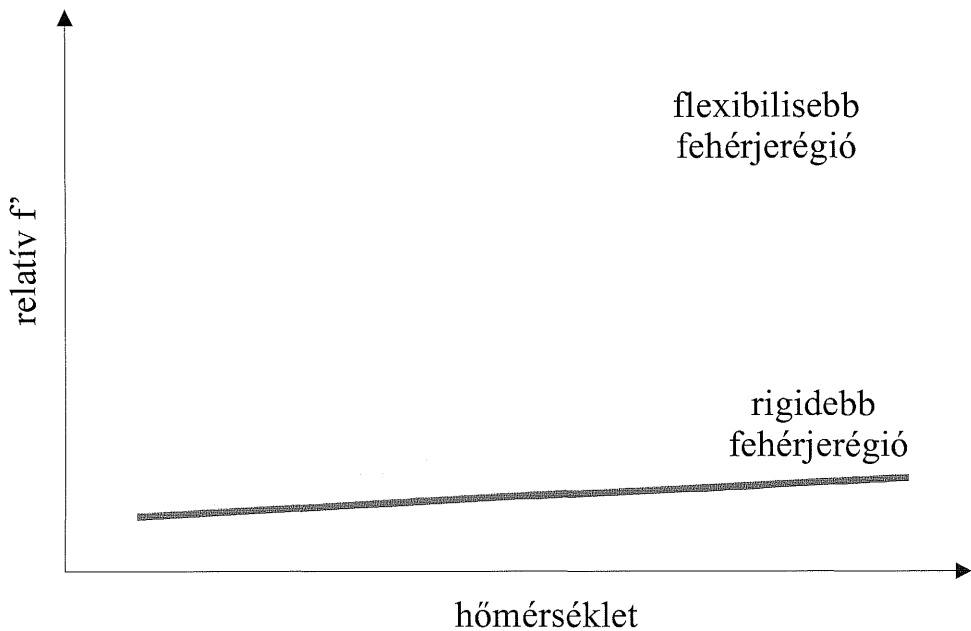
16. ábra: Donor és akceptor közötti relatív mozgás modellezése úgy, hogy a donorhoz rögzített koordináta-rendszerben vizsgáljuk az akceptor mozgását r amplitudós kitéréssel.

A probléma áthidalására bevezettünk egy paramétert, a normált transzferhatásfokot, f' , amely a következőképpen definiálható (Somogyi et al., 1984):

$$f' = E / F_{DA} \cong \langle k_t \rangle / k_f \sim \langle R^{-6} \kappa^2 \rangle \quad (8)$$

ahol k_t és k_f az energiáttranszfer és a donor emisszió sebességi állandói, $\langle \rangle$ jelenti a várható értéket.

A paraméter bevezetésének célja, hogy a donor és akceptor közötti fehérjetérrész flexibilitásáról informáljon. Energia betáplálás során (pl. hőmérséklet emelés) a molekuláris fluktuációk felerősödnek, a felerősödés mértéke függ attól, hogy a fehérje adott régiója mennyire flexibilis vagy éppen rigid. Két pont közötti flexibilis régió nagyobb mértékű fluktuációt enged, mint egy rigidebb régió, amely korlátozza a mozgást. Az f' paraméter a donor és az akceptor közötti távolság eloszlásának kiszélesedésével van összefüggésben, ezért a hőmérséklettől való függéséből közvetlenül vonhatunk le információt a donor és az akceptor közötti fehérje térrész flexibilitásáról. E paraméter nyomonkövetése azért praktikusabb, mint a két pont közötti távolságadatok vizsgálata, mert az f' az E transzferhatásfokkal lineáris kapcsolatban van (17. ábra).



17. ábra: A relatív f' tendenciája a hőmérséklet függvényében attól függően, hogy a donor és akceptor közötti fehérjeterrész mennyire rigid vagy flexibilis.

A módszer jól alkalmazható, ha az átlagos távolság nem változik a donor és akceptor között. Ekkor az f' paraméter hőmérséklet-függésének tendenciája a fehérje két pontja közötti térrész flexibilitásáról ad információt. Minél nagyobb az f' meredeksége, annál flexibilisebb a donor-akceptor közötti fehérjemátrix (17. ábra).

„Steady-state” anizotrópia mérések

Anizotrópia méréseket szintén a Perkin Elmer LS50B fluoriméteren végeztük. A fluorofórokat megfelelő hullámhosszú, vertikálisan polarizált fénnel világítottuk meg és detektáltuk az emisszió vertikális (V) és horizontális (H) komponenseit. Az anizotrópia értéke meghatározható:

$$r = (I_{VV} - G \cdot I_{VH}) / (I_{VV} + 2G \cdot I_{VH}) \quad (9)$$

ahol az emisszió intenzitásának (I) első indexe a gerjesztés irányára, a második indexe a detektálás irányára vonatkozik. A G egy ún. műszerre jellemző korrekciós

faktor, ugyanis a detektor nem egyformán érzékeny a vertikális és horizontális intenzitás komponensekre.

$$G = I_{HV} / I_{HH} \quad (10)$$

A Perrin-egyenlet segítségével meghatározható annak a térrésznek a nagysága (V), amelyben a fluorofór mozog:

$$1 / r = 1 / r_0 (1 + (k T / V \eta) \tau) \quad (11)$$

ahol r a „steady-state” anizotrópia, r_0 a határanizotrópia, k a Boltzman állandó, T az abszolút hőmérséklet, V a gömb alakúnak feltételezett mozgó egység térfogata, η a közeg viszkozitása és τ a fluorofór élettartama. A határanizotrópia értéke 0.4, a látszólagos határanizotrópia (r_0^{app}) meghatározható az $1/r$ vs. T/η ábra y-tengely metszetéből (Lakowicz, 1986), a rotáló V térfogat pedig a függvény meredekségéből. Ha a r_0^{app} értéke közelíti a 0.4 értéket, az azt jelenti, hogy a fluorofór meglehetősen rigidén kapcsolódik a fehérjéhez. Ebben az esetben a $\kappa^2 = 2/3$ alkalmazása nem pontos, így az alkalmazásával számolt távolság adatok egy látszólagos értéket fognak megadni.

Időfüggő fluoreszcencia spektroszkópia: fluoreszcencia élettartam mérés

Fluoreszcencia élettartam méréseket ISS K2 típusú fázisfluoriméteren végeztük, amely az alkalmazott „cross-correlation” módszer segítségével képes az általunk is használt fluorofórok élettartamát meghatározni. A műszer működésének alapja, hogy a szinuszosan modulált gerjesztő és emissziós fény közötti fáziseltolódást és demodulációt méri és illesztéssel határozza meg az élettartam értékeket, amelynek pontosságát egy jósági paraméter (χ^2) adja meg. A méréshez szükséges egy ismert élettartamú referencia oldat, amely a mi méréseink során az erősen fényszóró glikogen volt ($\tau = 0$ ns).

Az élettartam értékeket diszkrét függvények alkalmazásával számoltuk ki. A komponensek száma a jósági paraméter értékétől függ, addig növelhető, amíg a

következő komponens alkalmazása nem adja az illesztés további javulását. A kapott átlag élettartam így kiszámolható a komponensekből:

$$\tau = (\sum \tau_i^2 \alpha_i) / (\sum \tau_i \alpha_i) \quad (12)$$

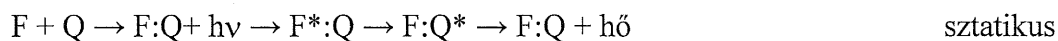
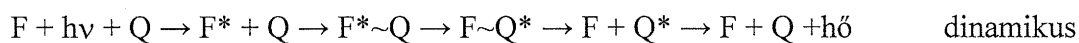
ahol τ_i az élettartam i -edik komponensét, α_i pedig a hozzá tartozó amplitúdót jelöli.

Fluoreszcencia kioltás

Gerjesztett állapotban lévő molekula igyekszik megszabadulni az energiatöbblettől és relaxálódik. A gerjesztési energia kétféleképpen: radiatív vagy non-radiatív lecsengés formájában távozik a rendszerből. A radiatív, vagyis fotonkibocsátással járó folyamatok a fluoreszcencia és foszforeszcencia, a non-radiatív relaxáció esetén a többletenergia hő formájában eloszlik vagy más, az oldatban található, erre alkalmas kémiai anyagok veszik át azt. Ez utóbbi folyamatot nevezzük kioltásnak. Kioltónak nevezzük azokat a típusú molekulákat, amelyek szerkezetüknél fogva képesek átvenni a gerjesztett állapotban lévő fluorofór energiáját. A fluoreszcencia kioltási kísérletek gyakorlati előnye, hogy alkalmazásukkal egy molekula szerkezete és töltésviszonyai a fluorofór körüli fehérjerégióban feltérképezhetők.

A kioltás mechanizmusa történhet dinamikus vagy sztatikus módon. Dinamikus kioltás esetén a kioltó és fluorofór között ütközési komplex alakul ki, amely során a kioltó a gerjesztett állapotú fluorofórtól ütközések sorozatával ($\sim f = 10^4 \text{ s}^{-1}$) veszi át annak energiáját. A sztatikus kioltás esetén ún. sötét komplex alakul ki a kioltó és fluorofór között, amelyben a gerjesztés pillanatában a kioltó átveszi a fluorofór energiáját, annak emissziója teljesen meg is szűnik.

A kioltás két különböző mechanizmusának sémája felítható a következőképpen:



ahol F a fluorofórt, Q a kioltó molekulát, * a gerjesztett állapotot, ~ a dinamikus komplex kialakulását, : pedig a sztatikus komplex kialakulását szimbolizálja.

A kérdésre, hogy a fehérje mélyen eltemetett fluorofórajainak kioltása hogyan történik, három modell próbál választ adni.

(i) A „gating” modell (Somogyi et al., 1986) azt feltételezi, hogy az eltemetett fluorofórok a fehérje szerkezetének termikusan aktivált fluktuációi miatt időről időre a kioltó számára hozzáférhetővé válnak, így történhet a kioltás.

(ii) A „penetration” modell (Gratton et al., 1984) szerint szintén a fehérje szerkezetének fluktuációi miatt ideiglenes csatornák alakulnak ki a fehérje belseje felé, amelyeken keresztül a kioltó megközelítheti a fluorofórt.

(iii) A „long-range transfer” modell azt állítja, hogy a kioltónak nem is szükséges a fehérje belsejébe hatolni, a felszínről képes kioltani az eltemetett fluorofór emisszióját.

A sztatikus és dinamikus kioltás elkülönítésére „steady-state” intenzitás spektrumokat (sztatikus és dinamikus kioltás együtt), illetve élettartam adatokat (csak dinamikus kioltás) szükséges gyűjteni a kioltó molekula különböző koncentrációinak függvényében. A Stern-Volmer egyenlet alkalmazásával kiszámolható a kioltás hatékonysága:

$$F_0/F = (1+K_D[Q]) (1+K_S[Q]) = 1+ K_D[Q]+ K_S[Q]+ K_DK_S[Q]^2 \quad (13)$$

ahol F_0 a kioltó nélküli intenzitás, F pedig a kioltó jelenlétében mért intenzitás, K_D a dinamikus kioltási állandó, K_S a sztatikus kioltási állandó, Q pedig a kioltóvegyület koncentrációja.

Ha a kioltás csak dinamikus módon történik, akkor a Stern-Volmer egyenlet egyszerűsödik:

$$F_0/F = \tau_0/\tau = 1+K_{SV}[Q] \quad (14)$$

ahol F_0 és τ_0 a kioltó nélküli intenzitás és élettartam, F és τ pedig a kioltó jelenlétében mért intenzitás és élettartam, K_D pedig a Stern-Volmer kioltási állandó, amely tovább felírható:

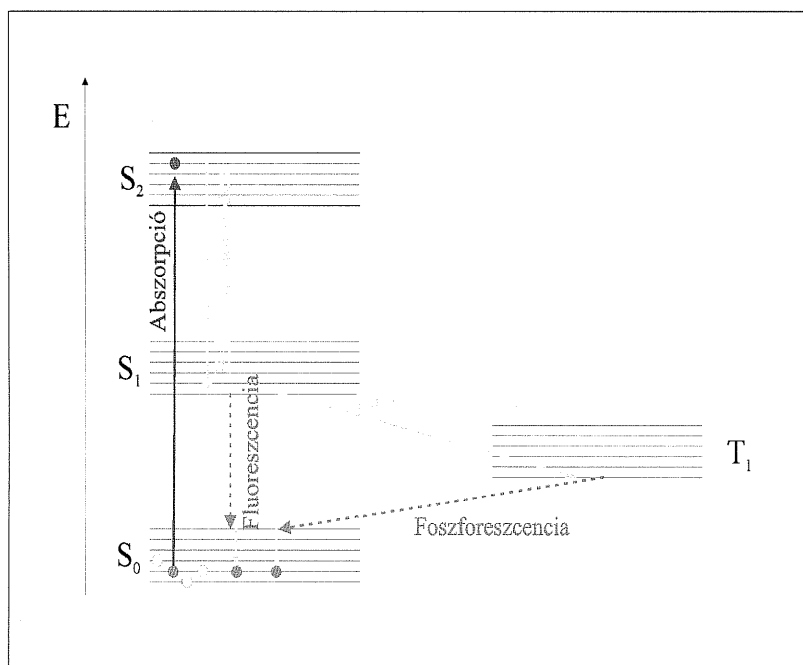
$$K_D = k_+ \tau_0$$

(15)

ahol k_+ a bimolekuláris kioltási állandó, értéke a fluorofór megközelíthetőségéről, töltött kioltók alkalmazása esetén a töltésviszonyok alakulásáról ad információt.

Foszforeszcencia spektroszkópia

Foszforeszcenciának a $T_1 \rightarrow S_0$ fotonkibocsátással járó relaxációt nevezzük (18. ábra). A T_1 gerjesztett állapot feltöltésének különböző lehetséges újtjai vannak. Egyik út, ha az S_0 állapotból közvetlenül kerülnek T_1 -re a gerjesztett elektronok. Mivel azonban az $S_0 \rightarrow T_1$ tiltott átmenethez tartozó extinkciós koefficiens értéke nagyon kicsi (élettartama nagyon hosszú), így ezen átmenet valószínűsége rendkívül kicsi.



18. ábra: A Jablonszky diagram az abszorpció és a relaxáció néhány lehetséges útját mutatja, ahol vibrációs szintekre felhasadt alap (S_0) és gerjesztett (S_1 , T_1 , S_2) elektronállapotok láthatók.

Némely foszforeszcenciára alkalmas molekula termikus energia betáplálás hatására képes átugorni az $S_0 \rightarrow T_1$ átment energiakülönbségét (ez pl. a triptofán

esetén nem lehetséges, itt ugyanis túl nagy az S_0 és T_1 közötti energiakülönbség). A T_1 feltöltődésének másik, gyakoribb útja, hogy az elektron az S_1 állapotból egy spinátfordulással járó, ún. „intersystem crossing” révén esik az S_1 -hez képest alacsonyabb energiaszinten lévő T_1 állapotba.

T_1 állapotból alapállapotba való relaxálódás lehetséges útjai felírhatók a következőképpen:

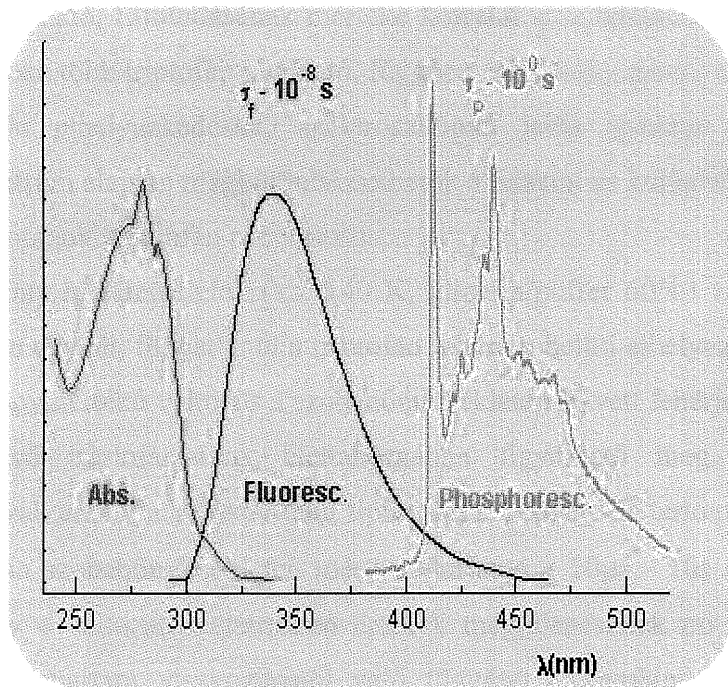
$$d[T_1]/dt = - (k_p + k_{pq} [Q_p] + k_{pnr})[T_1] + k_{isc} [S_1] \quad (16)$$

ahol a k_p a foszforeszcencia sebességi állandója, $k_{pq} [Q_p]$ a foszforeszcencia kioltás sebességi állandója a jelenlévő kioltó koncentrációjának függvényében, k_{pnr} a non-radiatív lecsengési utakat magában foglaló sebességi állandó és $k_{isc} [S_1]$ az ellentétes irányú „intersystem crossing” ($T_1 \rightarrow S_1$) sebességi állandója.

Az „intersystem crossing” élettartama 1-2 nagyságrenddel, a foszforeszcencia élettartama még további 4-8 nagyságrenddel hosszabb, mint az $S_1 \rightarrow S_0$ átmenetek radiatív (fluoreszcencia) és non-radiatív relaxációi, így a foszforeszcencia kvantumhatásfoka 10^{-6} vagy kevesebb.

A foszforeszcencia, mint jelenség régebb óta ismert, mint a fluoreszcencia, azonban ez utóbbi mérésének egyszerűbb kivitelezhetősége és a korábbi technikai elérhetőségek miatt sokkal elterjedtebbé vált a fehérjék és nukleinsavak kutatásában. Kezdetben csak fagyasztott mintán tudtak foszforeszcenciát megfigyelni, amely így nagymértékben behatárolta alkalmazhatóságát. Az első szobahőmérsékleten felvett foszforeszcencia spektrum 1967-ből származik, ez a luciferáz enzim spektruma volt (Hastings and Gibson, 1967). Azóta kiderült, hogy oxigén jelenléte nélkül (az oxigén erős kioltó) gyakorlatilag minden triptofán tartalmú fehérjének van mérhető foszforeszcenciája szobahőmérsékleten.

Ha megvizsgáljuk, hogy a fluoreszcencia és foszforeszcencia spektrumok hogyan viszonyulnak egymáshoz egy hullámhossz skálán (19. ábra), azt tapasztaljuk, hogy mivel a T_1 - S_0 közötti energiakülönbség kisebb, mint az S_1 - S_0 közötti, ezért ugyanazon kromofór foszforeszcencia spektruma a magasabb hullámhosszak felé tolódik el a fluoreszcencia spektrumához képest.



19. ábra: A triptofán abszorpciós, fluoreszcencia és foszforeszcencia spektrumai láthatók a hullámhossz függvényében. (forrás: www.cnr.it)

A fehérjekutatásban a lumineszcencia spektroszkópián alapuló módszerek leggyakrabban alkalmazott kromofórja a triptofán, amelynek előnye, hogy a fehérjék többségében jelen van, így a fehérjék külső jelölő alkalmazása nélkül is vizsgálhatók. A foszforeszcencia tulajdonságainak, környezeti paramétereiktől való függésének kutatásához előnyösek az egy-triptofán tartalmú fehérjéket, mint pl. az RNázT1, a HSA, az apoazurin, a máj alkohol dehidrogenáz stb.

A fluoreszcencia spektrum eltolódása a hullámhossz skálán nagyobb mértékben környezetfüggő, mint a foszforeszcencia, ugyanis a gerjesztett singlett állapot dipól momentuma nagyobb, mint a gerjesztett triplett állapoté. Ennek ellenére a triptofán foszforeszcencia spektruma struktúrált, szemben a fluoreszcencia spektrummal, így alkalmas individuális triptofánok egymástól való szeparálására. A $0,0 (\lambda_{0,0})$ átmenet, amely a T_1 állapot legalsó vibrációs szintje és az S_0 állapot legalsó vibrációs szintje közötti átmenetet jelenti (legnagyobb energiakülönbség), a spektrum kék oldalon elhelyezkedő jellegzetes pontja. Ennek helye a hullámhossz skálán informál a triptofán környezetének polárosságáról (Hershberger et al., 1980). A szabad triptofán $0,0$ átmenete 406.4 nm-en található vizes közegben. A hosszabb hullámhosszak felé való eltolódás azt jelenti, hogy a triptofán a fehérje belsejében,

eltemetetten található. Eltolódásának mértéke korrelál az eltemetettség mértékével. Ha egy fehérjében több triptofán található, függően attól, hogy mennyire heterogén a fehérjében való elhelyezkedésük, spektroszkópiai jelük gyakran szeparálható. Ilyenkor a spektrum alapján megkülönböztethetők a felszíni és különböző mértékben eltemetett triptofánok (triptofán csoportok).

Az alacsony hőmérsékleten (kb. 140 K, glicerin/puffer 60/40 v/v) a fehérjék élettartama nem egyedi, függetlenül a triptofán fehérjén belüli elhelyezkedésétől 5-7 s közé esik. Nagymértékű változás a szobahőmérsékleten felvett fehérjék, különböző pozícióban lévő triptofánjainak élettartamában figyelhető meg. Szemben a fluoreszcenciával, amelynek élettartama tipikusan a 1-20 ns-os tartományba esik, a foszforeszcencia szobahőmérsékleten mért élettartama a 10 μ s - 10s időtartományt ölelik át. Hogy e változatos élettartam értékek megjelenésének mi lehet az oka, vizsgálták az élettartam viszkozitástól való függését (Strambini and Gabellieri, 1987) és kiderült, hogy a környezet viszkozitását 10⁹ és 10⁴ Pa's között változtatva ugyanazon fehérjék élettartama 2 nagyságrenddel különbözött egymástól. Az élettartam értékek azonban nem függtek az oldat polárosságától. Ezen empirikus tényekre támaszkodva megszületett az a hipotézis, hogy egy adott triptofán élettartama összefüggésben áll mikrokörnyezetének rigiditásával. Ez alapján a hosszabb élettartam a triptofán körüli rigidebb régió jelenlétére utal, míg a rövidebb élettartam a kromofór felszín közelségét vagy a fehérjén belül egy laza, flexibilis régióban való előfordulását jelenti. E hipotézist támasztják alá továbbá azok a megfigyelések, ahol a triptofán fluoreszcencia anizotrópia lecsengése és foszforeszcencia élettartama között találtak korrelációt. Bizonyos fehérjékben (egy-triptofán tartalmú modell fehérjéket vizsgálva) a triptofán immobilisnek mutatkozott fluoreszcencia anizotrópia lecsengés kísérletekben, ezzel párhuzamosan hosszú foszforeszcencia élettartammal rendelkezett.

A molekuláris diffúziós folyamatok időskálájához képest viszonylag hosszú foszforeszcencia élettartam lehetőséget ad a kioltó folyamatok élettartamot és „steady-state” intenzitást csökkentő hatásának. A kioltó folyamatokat két csoportba oszthatjuk: (i) környezeti kioltó hatások, amelynek hatása az oldatban található kioltó molekulák típusától és koncentrációjától függenek, (ii) specifikus hatások, amelyeket a molekula bizonyos alkotóelemei okoznak, mint pl. a diszulfid kötések vagy egy másik triptofán közelsége, amellyel homo energia-transzfer alakulhat ki.

Pontos foszforeszcencia élettartam mérések legnagyobb kihívása a környezeti kioltó folyamatok lehető legnagyobb mértékű visszaszorítása és a specifikus kioltó hatások pontos ismerete.

A fluoreszcencia spektroszkópiában alkalmazott kioltási kísérletek foszforeszcencia spektroszkópiában is alkalmazhatók. A módszerből származtatható molekuláris információk hasonlóak, elsősorban egy kromofór csoport megközelíthetősége térképezhető fel.

A Stern-Volmer egyenlet:

$$\tau_0/\tau = 1 + K_{SV} \quad (17)$$

azzal a különbséggel, hogy a kioltás típusától függetlenül a $F_0/F \neq \tau_0/\tau$, ugyanis a kioltó molekulák jelenléte általában növelik az „intersystem crossing” valószínűségét.

Az aktinon történt foszforeszcencia méréseket Professzor G. B. Strambini laboratóriumában (CNR, Pisa, Olaszország) házilig készített és fejlesztett foszforiméteren végeztük. Az aktin vizsgálatához annak saját triptofánjait alkalmaztuk kromofórként. A kísérletek két részből álltak össze (i) alacsony hőmérsékleten felvett „steady-state” spektrumok 0,0 átmeneteinek analizálása, (ii) élettartam meghatározás szobahőmérsékletű foszforeszcencia lecsengésekből. Az aktinkötő fehérjék nélkül mért adatokat összehasonlítottuk az S1, a *Dictyostelium discoideum* miozin triptofánmentes motor domén (MD/W-) és/vagy Tm jelenlétében mért adatokkal.

A „steady-state” spektrumokat 140 K-en vettük fel az oldat 60%-os glicerin tartalama mellett, ahol a közeg üvegszerű állapotban található („glass matrix”). A mintát folyékony nitrogén segítségével hűtöttük le a megfelelő hőmérsékletre.

A foszforeszcencia élettartam lecsengéseket 0.5 és 20 °C-on mértük vizes (puffer) környezetben. A méréseket megelőzően az oldat oxigén tartalmát nitrogénnel cseréltük. A lecsengéseket exponenciális illesztésével értékeltük Global (Global Unlimited, LFD, University of Illinois) illesztőprogram segítségével.

S1 preparálás, jelölés és karakterizálás

Miozint nyúl hátizomból preparáltunk Margossian és Lowey 1982-ben kidolgozott módszere alapján (Margossian and Lowey, 1982). Az S1-et α -kimotripsinnel történő enzimatis emésztéssel készítettük (Weeds and Taylor, 1975), koncentrációját spektrofotométeren határoztuk meg felhasználva az S1-nek 280 nm-re megadott extinkciós koefficiensét, amely $A_{1\text{cm}}^{1\%} = 7.45$ (Wagner, 1977).

Az Ser¹⁸¹ ANN-nel való jelölése (Hiratsuka, 1989) előtt az S1 éjszakán át dializálódott 50 mM TES pH = 7.0, 0.2 mM PMSF ellen, 4 °C-on. A jelölés megkezdése előtt 50 mM KCl-ot, 0.5 mM MgCl₂-ot, 0.5 mM ATP-t adtunk a fehérjeoldathoz. Az ANN-t frissen DMF-ben oldottuk úgy, hogy az oldatba kerülő DMF térfogata ne érje el az oldat térfogatának 1%-át, majd az ANN-t a fehérjéhez képest 20-szoros moláris túlsúlyban a szobahőmérsékletre termosztált fehérje oldathoz adtuk. A reakció ideje 1 óra volt, amelyet 15 mM végkoncentrációjú Tris-HCl oldattal állítottunk le. A jelölt fehérjét dializáltuk rigor puffer ellen, ami egyben a mérőpuffer is volt: 25 mM Tes, pH = 7.0, 80 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 2 mM EGTA, 4 mM MEA.

A Cys⁷⁰⁷ IAEDANS-szel való jelölése előtt az S1-et dializáltuk éjszakán át 50 mM TES pH=7.0, 60 mM KCl, 0.2 mM PMSF ellen, 4 °C-on. A fehérjét jelölés előtt szobahőmérsékletre termosztáltuk, az IAEDANS-t DMF-ben oldottuk frissen (DMF térfogata kevesebb legyen az összetérfogat 1%-ánál). A festéket 10-szeres moláris túlsúlyban tettük a fehérje mellé, a reakció idő 1 óra volt. A reakciót a festék koncentrációjához képest 100-szoros moláris túlsúlyú MEA-val állítottuk le, majd a fehérjét a szabad festéktől oszlopkromatográfiás szűréssel választottuk el, az oszloptöltet Sephadex G25 volt. Ezt követte a mérőpuffer elleni dializálás, amely minden esetben rigor puffer volt (25 mM Tes pH = 7.0, 80 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 2 mM EGTA, 4 mM MEA).

A Cys⁷⁰⁷ IAF-fel való jelölésekor (ANN-S1 további módosítása) a jelölő puffer ugyanaz volt, mint IAEDANS-szel való jelöléskor: 50 mM TES pH = 7.0, 60 mM KCl, 0.2 mM PMSF, 4 °C. Jelölés előtt a fehérjét szobahőmérsékletre termosztáltuk, az IAF-et 10-szeres molaris túlsúlyban adjuk a fehérjéhez. Az IAF-et 0.1 N NaOH-ban oldottuk. A jelölő hozzáadása folyamatos pH ellenőrzés mellett történt, a pH érték eltolódását a lúgosabb értékek felé 0.1 N HCl-dal kompenzáltuk.

A jelölési idő 50 perc, amelyet rögtön követett egy oszlopkromatográfiás szűrés, Sephadex G25-ös töltettel, majd dializálás rigor puffer ellen (25 mM Tes pH = 7.0, 80 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 2 mM EGTA, 4 mM MEA).

A Lys⁵⁵³ FHS-sel való jelölés előtt a fehérjét (a mi esetünkben ANN-S1-et vagy IAEDANS-S1-et) dializáltuk 50 mM Mops, pH=7.0 ellen. Mérés előtt a fehérjeoldatot szobahőmérsékletre termosztáljuk, a festéket DMF-ben oldottuk (DMF térfogata kevesebb legyen az összetérfogat 1%-ánál). Az FHS-t a fehérjekoncentrációhoz képest 2-szeres molaris túlsúlyban adtuk a fehérjéhez. A jelölési idő 15 perc volt, amelyet 10 mM végkoncentrációjú glicin-ethyl-észter hozzáadásával állítottunk le, majd oszlopkromatográfiával elválasztottuk a fehérjét a szabad festéktől. Ezt követte a rigor puffer elleni dializálás: (25 mM Tes pH = 7.0, 80 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 2 mM EGTA, 4 mM MEA).

A fluorofórok koncentrációjának meghatározásához pH=7.0 értéken a téma irodalmából származó extinkciós koefficienseket használtuk fel: ANN esetén 8400 M⁻¹cm⁻¹ 361 nm-en (Hiratsuka, 1989), IAEDANS esetén 6100 M⁻¹cm⁻¹ 336 nm-en (Xing and Cheung, 1995), IAF esetén 55000 M⁻¹cm⁻¹ 496 nm-en (Takashi, 1979) és FHS esetén 68000 M⁻¹cm⁻¹ 495 nm-en (Bertrand et al., 1995). A jelölési arányt a fehérje és a fluorofór koncentrációjának arányából határoztuk meg. A pontos érték meghatározásához figyelembe kellett venni, hogy az alkalmazott fluorofórok mindegyikének van abszorpciója 280 nm-en, ezért ezzel a 280 nm-en megjelenő fluorofór járulékkal minden esetben korrigáltuk a fehérje koncentrációját. ANN esetén ez a járulék 100%-a a 361 nm-en mért abszorpciónak, IAEDANS esetén 21%-a a 336 nm-es abszorpciónak, IAF és FHS esetén 30%-a a 496 nm-en illetve 495 nm-en mért abszorpciónak.

ATP és ADP.P_i nukleotid állapotok mimikálása

Az S1 ATP és ADP.P_i nukleotid állapotainak mimikálására ADP.BeF_x, ADP.AlF₄⁻ és ADP.V_i-ot alkalmaztunk. Az S1.ADP.BeF_x és S1.ADP.AlF₄⁻ komplexek létrehozása során az S1 oldatot inkubáltuk 0.2 mM ADP-vel, 5 mM NaF-dal és 0.2 mM AlCl₃-dal vagy BeSO₄-tal (Peysner et al., 2001). Az S1.ADP.V_i komplex létrehozásakor a fehérjeoldatot 0.2 mM ADP-vel és 0.2 mM VO₄-tal inkubáltuk (Goodno, 1982). A csapdázott nukleotid állapotokat minden esetben a mérés előtt, a jelölt és duplán jelölt mintákon alakítottuk ki. A be nem kötött nukleotidokat és

foszfátanalógokat nem távolítottuk el a minta mellől, hogy a komplex forma a mérés időtartama alatt (kb 4 óra) megmaradjon.

ATPáz-aktivitás mérés

A Mg^{2+} -ATPáz aktivitás méréshez az ún. „coupled enzyme assay”-alkalmaztuk (Trentham et al., 1972; Norby, 1971). A mérés során a natív vagy jelölt S1-et 100 mM KCl, 20 mM Mops pH=7.0, 1 mM $MgCl_2$, 0.5 mM ATP, 1 mM PEP, 0.5 mM EGTA tartalmú pufferben hígítunk 0.5 μ M végkoncentrációra. Az oldathoz adtunk 0.15 mM NADH és 5-10 μ l Piruvát-Kináz-Laktát-Dehidrogenáz oldatot. A NADH időben történő fogyását (átalakulását NAD-dá) fotométer segítségével 340 nm-en detektáltuk. Ismerve a NADH adott hullámhosszra vonatkozó extinkciós koefficiensét ($\epsilon^{340nm} = 6220 M^{-1}cm^{-1}$), a NADH abszorpciójának időfüggéséből kiszámítottuk az ATP bontás „steady-state” sebességi állandóját (jól funkcionáló S1-é 0.05 s^{-1}). Aktin jelenlétében az S1 által produkált ATP hidrolízis felgyorsul, amelyet teszteltünk 17 μ M és 34 μ M aktin hozzáadásával.

Az S1 fluorofórral történő módosítása után az enzim Ca^{2+} -ATPáz illetve K^+ /EDTA-ATPáz aktivitását is ellenőriztük minden esetben (Lanzetta et al., 1979). A mérés 50 mM Tris pH = 8.0, 600 mM KCl pufferben történik, amelyhez 9 mM $CaCl_2$ -ot vagy 10 mM EDTA-t adunk. A fehérje koncentrációját 0.02 mg/ml-re állítottuk. A mérést 2.5 mM ATP hozzáadásával indítottuk, majd 0.5, 2, 4, 6 és 8 perc elteltével a reakciót malachit zöldet és ammónium-molibdenátot tartalmazó oldathoz adva leállítottuk. További 1 perc után nátrium-citrát hozzáadásával a színreakciót fixáltuk. Fotométeren 660 nm-en a keletkezett inorganikus foszfáttal arányos abszorpciót detektáltuk.

SDS-poliakrilamid gélelektroforézis

A fluorofórok kötési helyének ellenőrzésére szolgál, ha a fehérjét további kisebb fragmentumokra hasítjuk és SDS-poliakrilamid gélen szeparáljuk (Laemmli, 1970). S1 esetén a fehérje tripszinnel történő proteolízissel három fragmentumra bontható. Ugyan a fluorofórok pontos kötéshelyének meghatározása még így sem lehetséges, az megállapítható azonban, hogy az adott fluorofór melyik fragmentumhoz

kapcsolódott. Az általunk alkalmazott FRET párok fluorofórijai különböző emésztési fragmentumokhoz tartoztak. A Ser¹⁸¹, amelyhez kapcsolódik az ANN, a 25 kDa-os, a Lys⁵⁵³, amelyhez kapcsolódik az FHS, az 50 kDa-os, a Cys⁷⁰⁷, amelyhez kapcsolódik az IAEDANS és IAF, a 20 kDa-os fragmentum része. A futtatás SDS PAGE 12%-os poliakrilamid gélen történt, hat különböző mintát vizsgáltunk: ANN-S1, FHS-S1, IAEDANS-S1, ANN-FHS-S1, ANN-IAF-S1 és IAEDANS-FHS-S1. Futtatás után a gél olyan hullámhosszúságú fényel világítottuk meg, amelyet csak a külső fluorofórok képesek abszorbeálni, a fehérje saját fluorofórijai nem. Így detektáláskor a fehérje emésztési fragmentumai közül csak azok az emésztési fragmentumok emittálnak, amelyek külső fluorofórokat tartalmaznak.

A jelölt S1-eket 20 mM Tris pH = 8.0, 50 mM NaCl pufferben inkubáltuk 0.02 mg/ml tripszinnel 10 percig, 25 °C-ra termosztálva (Hiratsuka, 1989). A mintához 20 mg/ml DTT-t adtunk, majd 1 percre az oldatot közel forrásban lévő vízbe tettük. A géltre helyezés előtt a mintát 3 percig tisztítottuk asztali centrifugán 3000/perc fordulatszámmal. Futtatás után a gél metanolt (10%) és ecetsavat (5%) tartalmazó oldattal fixáltuk, majd a gél 360 nm-es fényel megvilágítva azt tapasztaltuk, hogy csak az a fragmentum világított, ahova fluorofór kapcsolódott. Fotografálás után a gél 1-1,5 órán át „Coomassie Blue” oldatban tároltuk, hogy a fluorofórokat nem tartalmazó fragmentumok is láthatóvá váljanak, hogy ellenőrizni tudjuk az emésztés minőségét.

Preparálás a kioltási kísérletekhez

A fluoreszcencia kioltási kísérletek elvégzéséhez az S1-et a fentiek szerint preparáltuk (Margossian and Lowey, 1982; Weeds and Taylor, 1975) és jelöltük FHS fluorofórral (Bertrand et al., 1995). Kioltó vegyületet (CoCl₂) 500 mM-os törzsoldatként minden esetben a mérés előtt frissen készítettük. Az S1-hez kapcsolt FHS-t 495 nm-en gerjesztettük, és detektáltuk az emissziót 500 és 650 nm között. Felhasználva a különböző koncentrációjú kioltó vegyület jelenlétében felvett spektrumok görbe alatti területeinek arányát és az átlagélettartam adatokat, a Stern-Volmer egyenletből a K_{SV} -t, abból a k_+ -t meghatároztuk.

Preparálás a foszforeszcencia mérésekhez

Miozint és abból az enzimatis emésztéssel létrehozott S1-et a korábban leírtak alapján készítettük (Margossian and Lowey, 1982; Weeds and Taylor, 1975) aktin forgácsot nyúl hátizmából preparáltuk (Spudich et al, 1971), majd abból mérések előtt extraháltuk az aktint. A nagyobb tisztaság érdekében egy polimerizációs-depolimerizációs ciklust végeztünk az aktinon, hogy eltávolítsuk a még jelenlévő és számunkra nemkívánatos aktinkötő fehérjéket. A tropomiozin (Tm) preparálása szintén acetonos aktin forgácsból történt (Smillie et al., 1982). A MD/W- motor domént *Dictyostelium discoideum*-ból az ELTE Biokémiai Intézetében preparáltuk egy korábban kidolgozott módszer alapján (Malnasi-Csizmadia et al., 2000). A fehérjék tisztaságát illetve a komplexek kialakulását SDS-PAGE elektroforézis technikával rendszerint ellenőriztük.

Foszforeszcencia mérések előtt az aktint dializáltuk 2 mM Tris pH=8.0, 0.2 mM ATP, 0.1 mM CaCl₂ puffer ellen, majd mérés előtt polimerizáltuk 100 mM KCl és 2 mM MgCl₂ hozzáadásával. Az S1, MD/W- és Tm éjszakán át dializálódott 2 mM Tris, pH=8.0, 100 mM KCl, 2 mM MgCl₂ mérőpuffer ellen. Az aktin koncentrációját 10 μM-ra hígítottuk mérés előtt minden esetben. Az alacsony hőmérsékletű „steady-state” mérések 140 K-en történtek, a fehérjeoldat 60%-os glicerin tartalma mellett. A 0-20 °C közötti élettartam mérésekhez elengedhetetlen az O₂ eltávolítása és N₂-re való helyettesítése az oldatban (Gonnelli and Strambini, 1995). Foszforeszcencia spektrum felvételéhez a mintát 295 nm-en gerjesztettük, ahol a tirozin abszorpciója relatív kicsi. A triptofán spektrumot minden esetben korrigáltuk a tirozin, a nukleotid (ADP ill. ATP) és az oldat elnyelésével. A tirozin korrekcióhoz felhasználtuk a Tm spektrumát úgy, hogy a két spektrumot (Tm és adott mérendő minta) közös intenzitásra normáltuk 390 nm alatt, ahol a triptofán foszforeszcenciája eltűnik. A lecsengési görbéket exponenciálisok összegével közelítettük (Global Unlimited, LFD, University of Illinois), 3 exponenciális komponens illesztése minden esetben jobb eredményt adott, mint 2 exponenciális összegének alkalmazása.

Eredmények

I. Miozin szubfragmentum 1 irányfüggő, intramolekuláris flexibilitásának vizsgálata az ATP hidrolízis különböző állapotaiban

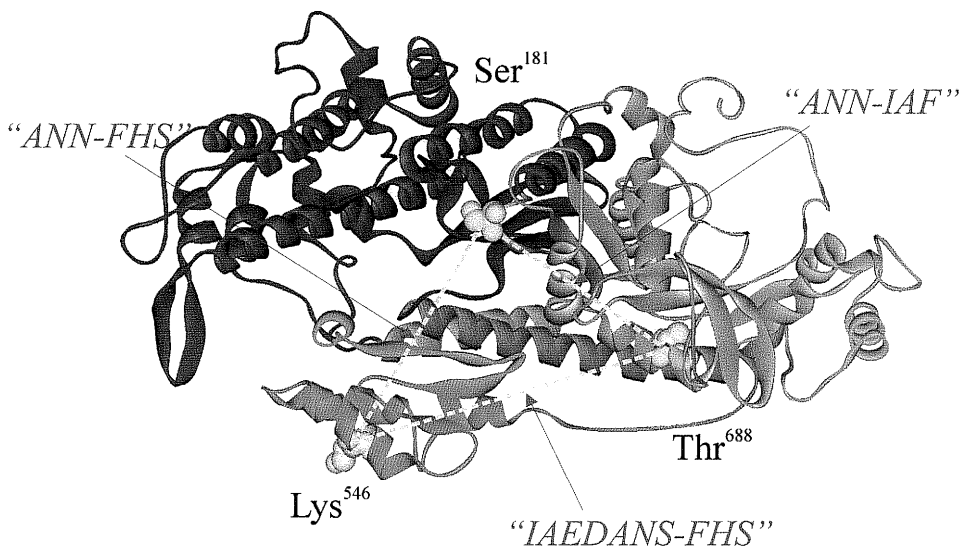
Vizsgáltuk a nyúl vázizomból származó miozin S1 intramolekuláris flexibilitását és konformáció-változását különböző, enzimatis és funkcionális szempontból aktív régiók között, hogy feltérképezzük a fehérje egyes területei közötti dinamikai tulajdonságokat különböző nukleotid állapotokban. Feltételeztük, hogy a kötött nukleotidtól függően a fehérje különböző irányú flexibilitása információt ad arról, hogy az S1 hogyan adaptálódik az ATP hidrolízis, mint legfőbb biológiai funkciójának elvégzéséhez. Célunk volt, hogy a dinamikai szempontból inhomogén S1 intramolekuláris flexibilitását térképezzük fel hőmérsékletfüggő FRET, „steady-state” anizotrópia és fluoreszcencia élettartam mérések alkalmazásával. Figyelembe véve, hogy az M.ATP és M.ADP.P_i (M=miozin) rövid élettartamú komplexek, karakterizálásukra nukleotid analógokat használtunk (ADP.BeF_x, ADP.AlF₄⁻ és ADP.V_i), amelyek alkalmasak arra, hogy a miozint e rövid élettartamú állapotokba befagyasszák és stabilizálják.

Különböző fluorofórokkal jelöltük az S1-et 3 ponton úgy, hogy a fluorofórok spektrális tulajdonságait tekintve 3 alkalmas FRET párt hozunk létre. A FRET párok egy képzeletbeli háromszög oldalait rajzolták ki (20. ábra). A párok a következők voltak:

Ser¹⁸¹: ANN (donor) - Lys⁵⁵³: FHS (akceptor),

Ser¹⁸¹: ANN (donor) - Cys⁷⁰⁷: IAF(akceptor),

Cys⁷⁰⁷: IAEDANS (donor) - Lys⁵⁵³: FHS (akceptor).



20. ábra: *Dictyostelium discoideum* miozin motor domén szalagmodellje látható. Kék színű a felső 50 kDa-os domén, zöld színű az alsó 50 kDa-os domén, szürke színű a 25 és 20 kDa-os fragmentumok maradványai, piros színű a switch II régió és világos kék színű a konverter domén.

A Ser¹⁸¹ az ATP-kötő zseb mélyén található, része a Gly¹⁷⁹-Thr¹⁸⁷ (GESGAGKT) konzervatív aminosavakat tartalmazó szekvenciának. OH⁻ csoportja közvetlenül részt vesz az ATP γ -foszfátjának kötésében (Fisher et al., 1995), 2.6 Å a kötéstávolság az OH⁻ csoport és a γ -foszfát oxigénje között (Cope et al., 1996). Habár a Ser¹⁸¹ mind a konvencionális, mind a nemkonvencionális miozinok között is konzervatív, helyettesítése alaninnal vagy threoninnal nem okoz változást az S1 motorfunkciójában. Hiratsuka 1989-es munkája alapján a 9-antroilnytrile (ANN) nevű fluorofór kovalensen és szelektíven kapcsolódik a miozin N-terminális 25 kDa-os fragmentum 12 szerinjének egyikéhez (Hiratsuka, 1989). A távolságmérés FRET-en alapuló módszerét felhasználva korábban megállapítottuk, hogy az ANN a Ser¹⁸¹-hez kötődik (Szarka et al., 2001).

A Lys⁵⁵³, az aktin-kötésben résztvevő alsó 50 kDa-os domén „helix-loop-helix” mintázat második, ún. S helixének (Asp⁵⁴⁷-Gly⁵⁵⁸) egyik konzervatív aminosava. A miozin aktinhoz való kötése több lépésben történik. Az S helix csak az erősen kötött állapotban van kötésben az aktinnal, a gyengén kötött állapotban nem, ahogy ezt Berger és munkatársai kioltási kísérletekkel bizonyították. Eredményeik

szerint az aktin jelenléte megakadályozta a Lys⁵⁵³-hoz kapcsolt FHS negatív töltésű kioltóval (KI) történő kioltását, míg ez nem volt megfigyelhető semleges és pozitív kioltók esetén. A gyengén kötött állapotban mind neutrális, mind töltött kioltókkal szemben a kiolthatóság azonos volt (MacLean et al., 2000). Korábban Bertrand (Bertrand et al., 1995) megfigyelte, hogy a Lys⁵⁵³ FHS-sel való jelölése aktin jelenlétében, rigor állapotban (erős kötés) nagymértékben blokkolódik, amelyből arra következtethetünk, hogy a kérdéses aminosav ténylegesen részt vesz az aktin-miozin közötti erős kötésben.

Az S1-ben 13 cisztein található, amelyek közül a Cys⁷⁰⁷ (SH1) és Cys⁶⁹⁷ (SH2) reaktivitása sokkal jelentősebb, mint a többi tizenegyé. E két thiol nukleotid jelenlétében oxidációval 3-14 Å-nyi bifunkcionális keresztkötőkkel összekapcsolható (Burke and Reisler, 1977). Miután megszületett az S1 krisztallográfiás modellje kiderült, hogy e két nagyreaktivitású cisztein egy α -helixen található, egymástól 18 Å-re. Mindez azt bizonyítja, hogy az ATP hidrolízis egy ciklusa során nagymértékű konformáció-változáson („melting”) megy át a molekulának ezen régiója.

A Ser¹⁸¹ (ANN) és Lys⁵⁵³ (FHS) közötti fehérje térrészt az 50 kDa-os alsó és felső emésztési fragmentum tölti ki (20. ábra), így a FRET eredményekből származtatott normált f' e két fragmentum egymáshoz viszonyított mozgásáról, valamint a köztük elhelyezkedő nukleotid-kötő zsebről informál. A nukleotid-kötő zseb végén kapcsolódik össze az alsó és felső 50 kDa-os fragmentum, és kapcsolódik tovább a könnyűlánc-kötő doménhez. A Ser¹⁸¹ (ANN) és a Cys⁷⁰⁷ (IAF) közötti mérések eredménye a felső 50 kDa-os fragmentumot karakterizálja (20. ábra). A fehérjerégió a Cys⁷⁰⁷ (IAEDANS) és Lys⁵⁵³ (FHS) között az alsó 50 kDa-os fragmentum része, amely az aktin-kötésben is részt vesz. Szerkezetét tekintve elsősorban a képzeletbeli háromszög egyik oldalával párhuzamos α -helixekből épül fel (20. ábra), elsősorban az aktin kötéshez szükséges mozgékonyaságról tudósít.

Az S1 ATPáz aktivitása

A natív, a jelölt és duplán jelölt S1 ATPáz aktivitásának eredményeit összefoglalva a 2. táblázat tartalmazza. A natív S1 ATPáz aktivitása 0.05 s⁻¹ volt, amelyet az aktin jelenléte (30 μ M) 5-10-szeresére növelt. Ehhez képest a jelölt fehérjék aktivitás

eredményeinek kis mértékű megváltozása arra enged következtetni, hogy a jelölési folyamat vagy nem változtatott az S1 Mg^{2+} -ATPáz aktivitás mértékén, vagy növelte azt a korábban leírt megfigyelésekkel összhangban.

[Aktin]	Natív S1	ANN-S1	ANN-IAF-S1	FHS-ANN-S1	IAEDANS-S1	IAEDANS-FHS-S1
0 μ M	0.05	0.08	0.05	0.04	0.19	0.19
17 μ M	0.25	0.20	0.15	0.09	0.36	0.27
30 μ M	0.45	0.40	0.27	0.17	0.61	0.33

2. Táblázat: Mg^{2+} -ATPáz aktivitás értékek láthatók s^{-1} -ben megadva jelöletlen és jelölt fehérjék esetén különböző aktin koncentrációk mellett.

„Steady-state” anizotrópia mérések

„Steady-state” anizotrópia és élettartam mérésekből a Perrin-egyenlet (11. egyenlet) felhasználásával kiszámolhatjuk azt a térfogatot, amelyen belül az adott fluorofór képes forogni. Az általunk használt fluorofórok mindegyikét az S1 nukleotidmentes állapotában vizsgáltuk, 6 és 26 °C között hét hőmérsékleti ponton. Az élettartam értékek egyik fluorofór esetén sem (vagy minimálisan) függtek a hőmérséklettől, így a későbbi számolásokhoz a szobahőmérsékleten mért átlagélettartam értékeket használtuk (3. táblázat). A látszólagos határanizotrópia értékeket megkapjuk az y-tengely metszeténél, ha az $1/r$ értékeket ábrázoljuk a T/η függvényében. A kapott egyenes meredekségéből számolható ki a fluorofórt is tartalmazó fehérje szegmens mozgása során bejárt térfogat (3. táblázat). A látszólagos határanizotrópia magas értékei arra engednek következtetni, hogy a fluoreszcens próbák rigidén kapcsolódnak a fehérjéhez. Ha egy átlagos fluorofórt 10 Å hosszúságúnak veszünk, rotációs mozgása által bejárt térfogat (kb. 10^3 \AA^3) 1-2 nagyságrenddel kisebb, mint a kísérletesen meghatározott mozgó térfogat nagysága, ezért valójában a fluorofórok mozgása helyett az egész fehérjeszegmens mozgását látjuk.

	<i>élettartam (ns)</i>	<i>látszólagos határanizotópia</i>	<i>térfogat (\AA^3)</i>
ANN (Ser ¹⁸¹)	12 ± 1	0.36	2.9*10 ⁴
FHS (Lys ⁵⁵³)	3.9 ± 0.1	0.37	1.1*10 ⁴
IAEDANS (Cys ⁷⁰⁷)	17.8 ± 0.3	0.30	5.8*10 ⁴
IAF (Cys ⁷⁰⁷)	3.6 ± 0.1	0.28	6.4*10 ⁴

3. Táblázat: Jelölt S1-ekfluorofórijainak a fehérje rigor állapotában mért élettartam adatai, a látszólagos határanizotrópia és a fluorofórt is tartalmazó fehérje szegmens mozgása során bejárt térfogat értékei láthatók.

Donor-akceptor közötti távolság mérése

A megfelelő donor és akceptor párok közötti távolság meghatározásához donor spektrumokat vettünk fel akceptor nélkül és jelenlétében. Kísérleteink során a donor spektrumok (ANN és IAEDANS) egyike sem volt érzékeny a különböző nukleotid állapotokra (ADP, ADP.BeF_x, ADP.AlF₄⁻, ADP.V_i), illetve az alkalmazott hőmérséklet tartományra (6-26 °C), azonos fluorofór koncentrációk esetén a spektrumok alakja és maximum helye a hullámhossz skálán mérési hibahatáron belül megegyezett. Egyedül az ANN spektrum ADP.V_i állapotban tolódott el kb. 5 nm-t a kék tartomány felé.

A transzferhatásfok (E, 3., 4. egyenlet), a donor kvantumhatásfoka (Φ_D), az átfedési integrál (J, 7. egyenlet), a Förster-féle kritikus távolság (R_0 , 6. egyenlet), a donor akceptor közötti távolság (R, 5. egyenlet) a mérési eredményekből számolhatók. Ezeket az alkalmazott hőmérséklet tartomány (6-26 °C) hat pontján minden nukleotid állapotban meghatároztuk. A 4. és 5. táblázat foglalja össze a transzferhatásfok és R_0 adatokat és a belőlük meghatározott távolságokat.

nukleotid állapot	ANN ^{Ser181} -FHS ^{Lys553}		IAEDANS ^{Cys707} - FHS ^{Lys553}		ANN ^{Ser181} -IAF ^{Cys707}	
	R_0 (Å)	E (%)	R_0 (Å)	E (%)	R_0 (Å)	E (%)
Rigor	38.9	68.6	46.3	55.5	39.7	63.1
ADP.BeF _x	36.6	69.6	44.5	49.8	37.3	74.8
ADP.AlF ₄ ⁻	40.7	68.9	46.2	53.0	41.5	72.4
ADP.V _i	37.7	66.2	45.6	45.2	38.4	84.7
ADP	36.3	66.9	45.5	52.3	37.1	76.3

4. Táblázat: Az három FRET pár esetén meghatározott Förster-féle távolság és transzferhatásfok értékei láthatók.

Az 5. táblázatban feltüntettük az elérhető kristályszerkezetekből meghatározható távolságadatokat is.

nukleotid állapot	Ser ¹⁸¹ -Lys ⁵⁵³		D. d.	Cys ⁷⁰⁷ -Lys ⁵⁵³		D. d.	Ser ¹⁸¹ -Cys ⁷⁰⁷		D. d.
	6 °C	22 °C		6 °C	22 °C		6 °C	22 °C	
Rigor	35.9	34.2	36.5	44.9	44.6	44.6	38.9	36.3	29.8
ADP.BeF _x	33.9	31.8	36.1	45.2	44.5	43.4	33.1	31.1	29.7
ADP.AlF ₄ ⁻	37.2	35.7	32.6	46.5	45.3	46.3	37.0	35.3	28.3
ADP.V _i	34.2	33.7	33.9	46.6	47.1	45.8	31.7	28.8	28.7
ADP	33.9	32.3	36.2	45.2	44.8	43.2	32.9	30.5	29.4

5. Táblázat: Távolságadatok (Å) két különböző hőmérsékleten. A mérési eredményeket összehasonlítottuk a *Dictyostellium discoideum* (D.d.) motor domén ugyanazon pontjai között mért távolságadatokkal.

Az alkalmazott FRET párok között számolt távolságok jó egyezést mutattak mind a csirke (Rayment et al., 1993b), mind a *Dictyostellium discoideum*-ból expresszált miozin II motor domén (Bauer et al., 2000; Fisher et al., 1995; Smith and Rayment, 1996) ugyanezen pontjai között mért távolságaival. Legnagyobb különbség a Ser¹⁸¹-Cys⁷⁰⁷ pontok közötti távolságban adódott. Megvizsgálva a különböző nukleotid (analógok) hatását ugyanazon fehérjerégióra azt tapasztaljuk, hogy a kötött

nukleotid minden esetben okozott néhány Å-nyi távolságváltozást, bár a változás irányát illetően a három FRET-pár esetén nem mutatható ki azonos tendencia. Ez érthető is, hiszen a fehérje három különböző régiója mind másképp járul hozzá az ATP ciklus során egymást követő konformációs lépésekhez.

Flexibilitás mérés

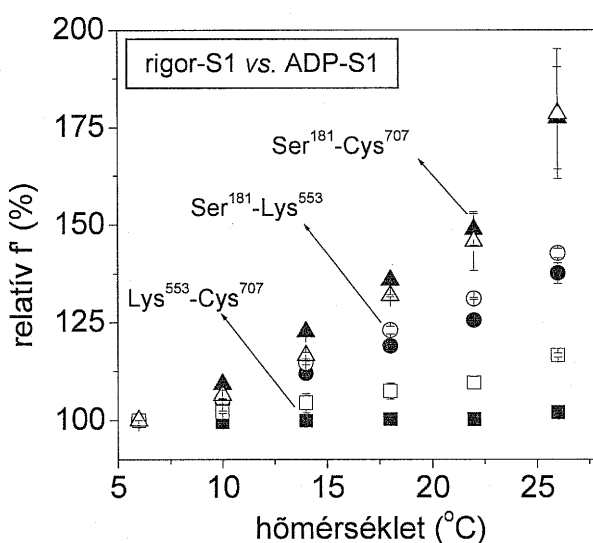
Az f' paramétert a különböző hőmérsékleteken felvett donor (akceptor jelenlétében és nélküle) spektrumokból határoztuk meg az *Anyagok és Módszerek* fejezetben leírtak szerint. Az f' paraméter mindegyik FRET-pár esetén minden alkalmazott nukleotid állapotban monoton növekedést mutatott a hőmérséklet függvényében, egyetlen eset kivételével, az ANN-IAF pár ADP·AlF₄⁻ állapotban. A távolságmérés eredményeiből látható, hogy nagy konformációs változás nem történt a miozin fejen belül az alkalmazott hőmérséklet tartományban. Ez azt jelenti, hogy a kapott f' paraméter változása donor-akceptor közötti fehérje térrész flexibilitásról informál. Ha az f' értékeket a legalacsonyabb hőmérsékleti pontra normáljuk, a függvények meredeksége összehasonlítható. A relatív f' nagyobb mértékű megváltozása nagyobb flexibilitású fehérjemátrix fluktuációjának eredménye, a kisebb meredekségű f' függvény rigidebb fehérjerégiót takar.

Flexibilitás mérés nukleotidmentes és ADP állapotban

A mérési eredmények szerint nukleotid mentes állapotban (rigor) a miozin S1 dinamikai szempontból heterogén, a különböző irányokban mért flexibilitás eltér egymástól. A Ser¹⁸¹(ANN)-Cys⁷⁰⁷ (IAF) közötti térrész a legflexibilisebb a képzeletbeli háromszög (20. ábra) oldalai közül, míg a legrigidebb oldal a Cys⁷⁰⁷ (IAEDANS)-Lys⁵⁵³ (FHS).

Az ANN-IAF fluorofórok közötti rigor állapotban megfigyelhető jelentős mértékű flexibilitás (mint a későbbiekben látni fogjuk) minden nukleotid állapotban megmarad (22. ábra). E két fluorofór az S1 felső 50 kDa-os doménjét karakterizálja. Elvi megfontolások szerint is, ezen régió szerkezetének és dinamikájának adaptálódnia kellett a nukleotid és főleg a γ -foszfát, koordinálását és disszociációját kísérő mozgásokhoz, ezért e jelentős flexibilitás megfigyelése érthető.

Röntgenkristallográfiai eredmények alapján a hátsó ajtó („back-door”) mind „open”, mind „closed” állapotban részlegesen zárt (Bauer et al., 2000; Fisher et al., 1995; Smith and Rayment, 1996), ami feltételezi, hogy a hidrolízis utáni inorganikus foszfát távozását a fehérje fluktuáló mozgása („breathing motion”) segíti elő. Aktin nélkül az inorganikus foszfát lassan (0.05 s^{-1}) disszociálódik az S1-ről, míg aktin jelenléte felgyorsítja annak távozását, ami arra enged következtetni, hogy az aktin-miozin komplex kialakulása tovább növeli ennek a fluktuáló mozgásnak az amplitúdóját. Méréseink alapján az ADP hiányától (rigor) vagy jelenlététől a két fluorofór közötti flexibilitás nem mutat függést (6. táblázat).



22. ábra: A három FRET-pár relatív f' vs. hőmérséklet függvénye nukleotidmentes (rigor, teli szimbólum) és ADP (üres szimbólum) állapotban.

Az ANN-FHS oldal vizsgálatok mérte f' paraméter változása kb. fele az ANN-IAF oldal esetén mért változásnak és hasonlóan itt sincs jelentős különbség a flexibilitásban a rigor és ADP állapotok között (22. ábra, 6. táblázat). ADP-indukált „lever arm” mozgás többféle miozinnál megfigyelhető, mint például a simaizomnál, ahol az elektronmikroszkópiai vizsgálatok eredményeként látható, hogy az ADP disszociációja az akto-S1-ről a „lever arm” végének 35 Å-nyi elmozdulását eredményezi (Whittaker et al., 1995). Hasonló hatás figyelhető meg *brush border* miozin I-nél is (Jontes et al., 1995). Harántcsíkolt vázizomnál az ADP-nek az S1

dinamikai tulajdonságaira gyakorolt hatása elhanyagolható, amely tényt kísérleteink is alátámasztottak.

nukleotid állapot	ANN-FHS-S1	IAEDANS-FHS-S1	ANN-IAF-S1
	df' (6-26 °C)(%)	df' (6-26 °C)(%)	df' (6-26 °C)(%)
Apo	37.6±3	2±1	77.4±13
ADP.BeF _x	30.8±5	10.1±0	57.3±2
ADP.AlF ₄	28.4±5	7.3±1	14.3±4
ADP.V _i	14.7±3	0±0	66.4±5
ADP	42.7±1	16.6±1	78.5±16

6. Táblázat: Az f' paraméter változása a 6-26 °C-os hőmérséklet tartományban.

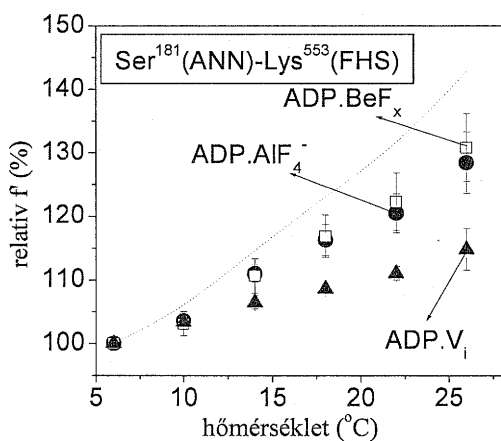
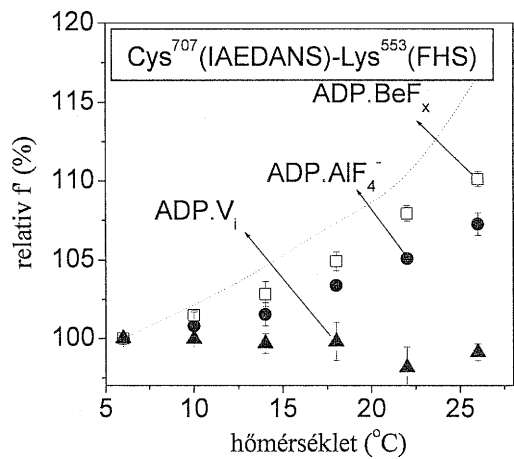
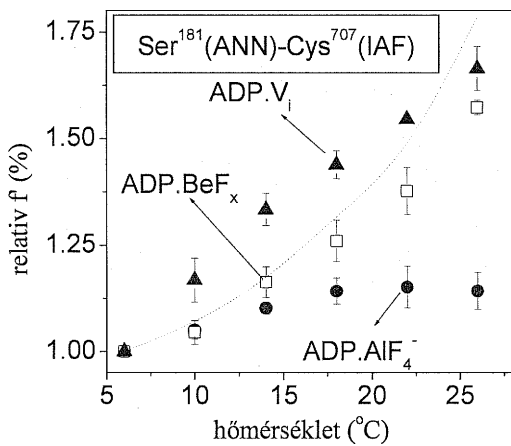
Az IAEDANS-FHS pár közrefogja az aktin kötésben résztvevő aminosavak nagy részét. Így a képzeletbeli háromszög másik két oldalához képest megfigyelhető jelentős rigiditás (22. ábra, 6. táblázat) feltehetően azzal a szerkezeti stabilitással van összefüggésben, amelyre az S1-nek az aktinnal való megfelelő kölcsönhatás kialakítása miatt van szüksége. Ez a rigiditás lehetséges, hogy az alsó 50 kDa-os domént felépítő, az IAEDANS-FHS iránnyal párhuzamosan futó α -helixeknek tulajdonítható. E fluorofór pár közötti flexibilitás függ az ADP bekötődésétől, annak jelenléte enyhe fellazulást okoz az amúgy rendkívül merev régióban. A megfigyelhető f' változás kevesebb, mint 5%-ról 15%-ra növekedik. Mivel szerkezeti (Bauer et al., 2000; Fisher et al., 1995) és gyorskinetikai (Mánási-Csizmadia et al., 2001b; Urbanke and Wray, 2001) vizsgálatok alátámasztják, hogy az S1 nukleotid-kötő zsebe mind nukleotidmentes, mind ADP állapotban „open” formában van jelen, a tapasztalt flexibilitás-változás nem valószínű, hogy a nukleotid-kötő zseb „open-closed” átmentéhez kapcsolódik; valószínűbb, hogy a Cys⁷⁰⁷-et is tartalmazó SH-helix, nukleotid hatására kialakuló lazább szerkezetével van összefüggésben. Így a megnövekedett flexibilitás inkább a Cys⁷⁰⁷ körül kialakuló lokális konformáció-változás következménye lehet.

Az ADP.BeF_x állapot

Az ADP.BeF_x nukleotid analógot molekula szerkezeténél fogva az ATP állapot, vagyis a „closed” állapot mimikálójának gondolják (Maruta et al., 1993; Phan and Reisler, 1992; Fisher et al., 1995). Ismert azonban az is, hogy e nukleotid állapotban az „open-closed” egyensúly hőmérséklet-függő, a vázizom S1-ben és a *Dictyostellium discoideum*-ból expresszált miozin II motor doménben a hőmérséklet csökkenésével az egyensúly az „open” állapot felé tolódik (Málnási-Csizmadia et al., 2001b; Urbanke and Wray, 2001). Az f' változásának mértéke minden fluorofór pár esetén kisebb volt az ADP.BeF_x állapotban, mint a rigor és ADP állapotokban (23. ábra). A csökkent flexibilitás jelentheti a fluorofórok körüli lokális konformáció változást, amelyet az ADP.BeF_x kötése indukál, de jelentheti az „open-closed” egyensúlyának eltolódását is. FRET méréseink alapján megállapítható, hogy a „closed” konformáció összességében rigidebbé, kompaktabbá teszi a katalitikus domént az „open” konformációhoz képest. Mivel eredményeink szerint mindhárom fluorofór pár esetén a ADP.BeF_x állapot f' változása közel van a rigor és ADP f' változásához (amelyek „open” állapotot indukálnak), ez arra enged következtetni, hogy az ADP.BeF_x állapot „open-closed” egyensúlya inkább az „open” felé tolódott el.

Az ADP.V_i állapot

Az ADP.P_i analógiának tartott ADP.V_i (Goodno, 1979; Goodno, 1982) bekötődéséhez kapcsolódik a legjelentősebb mértékű változás mindhárom fluorofór pár esetén (23. ábra). Ez a nukleotid állapot az ANN (akceptor jelenléte nélküli) spektrumát a rövidebb hullámhosszak felé tolja kb. 5 nm-rel, amely az ANN oldat felőli megközelíthetőségének redukálódását jelenti. IAEDANS-FHS és ANN-FHS esetén az f' változása a másik két nukleotid állapothoz képest jelentősen csökken, így erről a nukleotid állapotról állíthatjuk legbiztosabban, hogy a „closed” konformációt képviseli. A képzeletbeli háromszög harmadik oldala, az ANN-IAF pár esetén az ADP.V_i ellentétes hatást vált ki, mint a másik két oldal esetén, itt a megjelenő f' változás nagyobb mértékű, mint rigor vagy ADP állapotban, alakja telítési tendenciát mutat.



23. ábra: Az ADP.BeF_x, ADP.AlF₄⁻ és ADP.V_i állapotokban mért f' vs. hőmérséklet ábrák láthatók. Szaggatott vonallal az ADP állapot tendenciáját tüntettük fel.

Mindez valószínűleg a felső 50 kDa-os domén fluktuáló mozgásához való alkalmazkodást tükrözi. Az alsó és felső 50 kDa-os domén dinamikai és konformációs tulajdonságainak megváltozása fontos szerepet játszhat az energia továbbításában a katalitikus doméntől a „lever arm”-ig.

Az ADP.AlF₄⁻ állapot

Az ADP.AlF₄⁻ állapotról szerkezeti megfontolások alapján szintén az ADP.P_i állapot mimikálását feltételezik (Maruta et al., 1993; Bauer et al., 2000). Az ANN-FHS fluorofórok között az f' változása megközelítőleg ugyanannyi, mint ADP.BeF_x állapotban, míg ANN-IAF és IAEDANS-FHS párok esetén tovább csökken az ADP állapothoz képest (23. ábra). A kisebb mértékű f' változásból feltételezhetjük, hogy ez a konformációs állapot különbözik az ADP.BeF_x állapottól, tehát nem az „open” konformációt képviseli. Molekulaszerkezeti modell szerint mind az ADP.AlF₄⁻,

mind az ADP.V_i jelenléte „closed” állapotot indukál az S1-en, (Fisher et al., 1995; Smith and Rayment, 1996) hasonlóan a 4-30 °C közötti „pressure” és „temperature jump” kinetikai mérésekhez (Urbanke and Wray, 2001; Málnási-Csizmadia et al., 2001b). Méréseink alapján azonban az ADP.AIF₄⁻ és ADP.V_i állapot különbözik egymástól. ANN-FHS és IAEDANS-FHS párok esetén az ADP.AIF₄⁻ állapotban az f' változása a rigor („open”) és ADP.V_i („closed”) változásai közé esik. Ebből következtethetünk arra, hogy ehhez a nukleotid állapothoz mind a „closed” mind az „open” konformáció hozzájárul. Az ANN-IAF pár esetén figyelemreméltó effektus tapasztalható: az f' változása mindössze 10%, alakja 14-18 °C között telítési tendenciát mutat. Ennek háttérében egy hőmérséklet-indukált szerkezeti változás állhat, amely megváltoztatja a fluorofórok távolságát vagy orientációját egymáshoz képest, de lehet, hogy a fluorofórok tartalmazó szegmens fluktuációja korlátozódik.

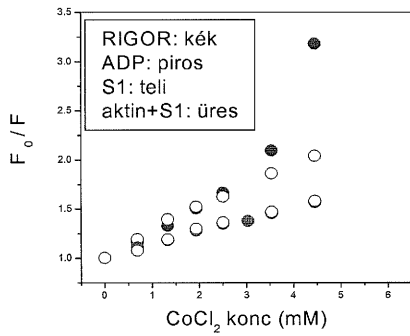
Összefoglalva, kísérleteink feltérképezték, hogy az S1 erőgenerálásához szükséges ATP hidrolízis egy ciklusa alatt milyen dinamikai változásokon halad át. Eredményeink szerint a fehérje különböző régiója másképp reagál a hidrolízis lépései okozta szerkezeti változásokra. Az aktin-kötő régió (alsó 50 kDa-os domén) egy rendkívül merev területe a fehérjének, a tőle kb. 4 nm-re lévő nukleotid-kötő zseb „open” és „closed” állapotai közötti átmenet valójában nem sokban zavarja meg e rigiditást. Az 50 kDa-os felső domén viszont rendkívül flexibilisnek bizonyult, amely az ATP ciklus különböző nukleotid állapotaiban is megmarad. Ez a flexibilitás feltehetően a gyors foszfátkötés, disszociáció és az ezt kísérő lokális strukturális átrendeződés miatt szükséges. A nagyfokú dinamikus mozgás teret és rugalmasságot ad a gyorsan lejátszódó konformációs átalakulásoknak. A dinamikai szempontból heterogén S1-re általánosságban jellemző, hogy „closed” állapotban a molekula rigidebb, mint „open” állapotban, amelynek háttérében állhat, hogy a rigidebb szerkezet mechanikai alapot nyújt az információ nukleotid-kötő zsebtől a „lever arm”-ig való terjedéséhez. Habár az irodalom az ADP.BeF_x molekulát az ATP-, az ADP.AIF₄⁻ és ADP.V_i molekulákat pedig az ADP.P_i állapotoknak felettették meg, kísérleteink alapján különbséget találtunk az analógoknak az S1-en mimikált állapotai között. Eredményeink szerint a tisztán „closed” állapotot az ADP.V_i hozta létre, míg a másik két nukleotid analóg az „open-closed” átmenet közötti egyensúly eltolásával mindkét állapot megjelenését megengedi.

II. Az S1 aktin-kötő régiójának szerkezeti vizsgálata fluoreszcencia kioltási kísérletekkel

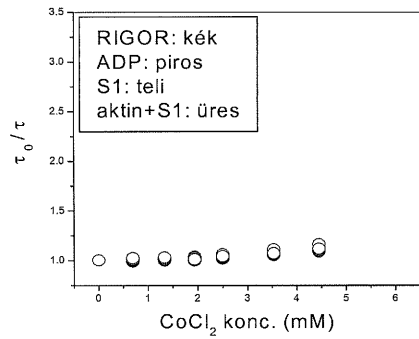
Az aktin-miozin kölcsönhatás elemi lépéseinek megismerése az izom alapkutatásának fókuszában áll. A komplex vizsgálata gyakran nehézséget okoz, hiszen a kinetikai és spektroszkópai mérésekhez a külső fluorofór alkalmazásának esetleges hátrányaival kell kompromisszumot kötni. Elektronmikroszkópos képek készíthetők ugyan az aktin-S1 komplexről, de a felvételek alacsony felbontásúak, a két fehérje közötti kötés nem vizsgálható részleteiben.

Kihhasználva azt a lehetőséget, hogy az S1 Lys⁵⁵³-as aminosava az S1 aktin-kötő felszínén található és fluoreszcein típusú fluorofórral (FHS) szelektíven jelölhető, módunk van az aktin kötésének spektroszkópai módszerek alkalmazásával történő vizsgálatára. Kísérleteinkben az FHS fluoreszcenciájának kioltását vizsgáltuk CoCl₂ pozitív kioltó alkalmazásával. Méréseink során az S1 nukleotidmentes (rigor) vagy ADP állapotban volt jelen, ATP és ADP.P_i állapotokban az S1 aktinhoz való affinitása olyan mértékben lecsökken, hogy a komplex vizsgálata technikai nehézségekbe ütközik. Vizsgáltuk, hogyan függ a Lys⁵⁵³ lokális konformációja az S1 ADP tartalmától. Berger és munkacsoportja az S1 aktin-kötő felszínét már karakterizálta FHS kioltási kísérleteken keresztül (MacLean et al., 2000), ahol a kioltók a negatív KI, a pozitív tallium és a semleges TEMPO voltak. Kísérleteinket továbbá kiterjesztettük mind „steady-state” mind élettartam mérésekre, hogy a kioltás folyamatának dinamikus és statikus járulékait meghatározhassuk.

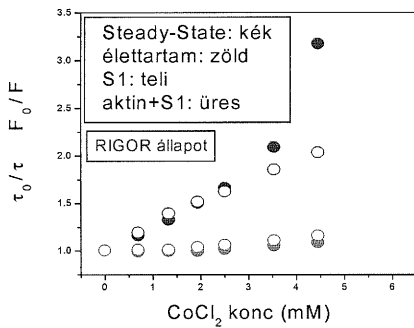
Berger és munkacsoportja eredményei alapján (MacLean et al., 2000) a semleges és pozitív kioltóval történő kioltás nem volt érzékeny sem az aktin sem az ADP jelenlétére, negatív kioltó alkalmazása esetén azonban a Stern-Volmer konstans a felére csökkent aktin jelenlétében, ami arra enged következtetni, hogy az aktin-S1 kötőfelszín elektrosztatikus tulajdonságai a komplexképződés során megváltoztak, nagyobb védelmet nyújtva a negatív töltésű jodiddal szemben.



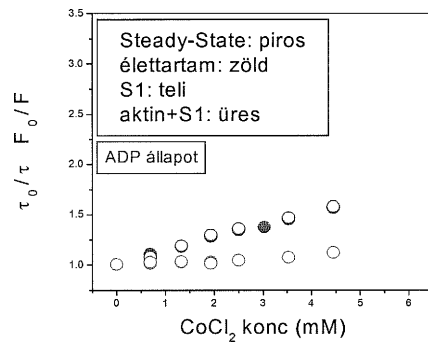
A



B



C



D

24. ábra: A: „Steady-state” spektrumokból, illetve B: élettartam adatokból származtatott Stern-Volmer ábrák, C: Rigor állapotú és D: ADP állapotú mérések összehasonlítása látható.

Eredményeink alapján látható, hogy a CoCl_2 kioltotta az FHS fluoreszcenciáját mind aktin jelenlétében és nélküle, mind rigor és ADP állapotban egyaránt (24. ábra). A „steady-state” spektrumok alakja nem függött az aktin jelenlététől. A „steady-state” spektrumokból számolt F_0/F a kioltó koncentrációjának függvényében monoton növekedést mutat, amely a sztatikus és a dinamikus kioltás folyamatát együttesen magában foglalhatja. Ugyanakkor a Stern-Volmer ábrákon látható, hogy az élettartam adatokból számolt τ_0/τ érték állandó a kioltó koncentrációjának függvényében, ezáltal megállapítható, hogy a kioltás mechanizmusának dinamikus komponense elhanyagolható. Így megállapítottuk, hogy az FHS fluoreszcencia kioltása sztatikus módon történik. Az aktin kötése nem változtatta meg a kioltás hatékonyságát, amiből következtethető, hogy az aktin nem okoz olyan szerkezeti vagy töltésviszonyokban bekövetkező változást, amelyet a pozitív töltésű kioltó alkalmazása detektálni tudna. Rigor állapotban a $K_{SV}=229.7 \text{ M}^{-1}$, a $k_+=5.89 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1}$

alkalmazása detektálni tudna. Rigor állapotban a $K_{SV}=229.7 \text{ M}^{-1}$, a $k_+=5.89 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ volt. Mindazonáltal a kioltás hatékonysága függ az S1 nukleotid tartalmától, ADP állapotban ugyanis a $K_{SV}=132.2 \text{ M}^{-1}$, kb. 40 %-kal csökken a nukleotidmentes állapothoz képest. A $k_+=3.34 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. MacLean és munkatársai hasonló nukleotid-függést kaptak negatív KI kioltó alkalmazása esetén is, amely eredmény valószínűsíti, hogy ADP kötés hatására a térbeli hozzáférhetőség és nem az elektrosztatikus viszonyok megváltozása tükröződik az eredményekből.

III. Az aktin szerkezeti vizsgálata Trp foszforeszcencia alkalmazásával

Az aktinnak, mind a monomer, mind a filamentum formája részletesen tanulmányozott, többek között ismereteink vannak arról, hogy az aktin milyen szerkezeti változásokon megy keresztül polimerizációkor vagy milyen szerkezeti, dinamikai különbségek adódnak az általa kötött kationtól (Ca^{2+} , Mg^{2+}) (Nyitrai et al., 1998) vagy nukleotidtól (ATP, ADP) (Nyitrai et al., 2000a) függően. A miozinban (HMM-ben, S1-ben) történő aktin vagy nukleotid hatására bekövetkező szerkezeti és kinetikai változások vizsgálata szintén széleskörű és behatóan tanulmányozott. A két molekula együttes vizsgálata adhat választ az erőgenerálás elemi lépéseinek molekuláris szintű megismerésére, de épp e rendszernek a tanulmányozása gyakran technikai nehézségekbe ütközik. Elsősorban azért, mert az akto-miozin rendszer nem kristályosítható, nem készíthető röntgen-krisztallográfiai méréseken alapuló térbeli szerkezeti modell. A ma rendelkezésünkre álló 3D szerkezet a korábbi eredményekre alapuló molekula-modellezéssel készült. Spektroszkópiai mérések általában alkalmasak a komplex konformációinak leírására, azonban a kontrakció bizonyos lépéseit, amelyekben az aktin és miozin kis affinitással kapcsolódnak egymáshoz (ATP. ADP.P_i állapot), csak magas fehérjekoncentrációk alkalmazásával lehet vizsgálni. További nehézség, hogy ha belső fluorofórok (triptofán) keresztül történnek a spektroszkópiai vizsgálatok, azok általában mindkét fehérjében előfordulnak. Külső fluorofórok alkalmazása esetén pedig fennáll a veszély, hogy azok megváltoztatják a natív fehérje szerkezetét és módosítják a működését.

A spektroszkópiai technikák között a foszforeszcencia spektroszkópia egy alkalmas, bár kivitelezési bonyolultsága miatt kevésbé elterjedt módszere a fehérjék tanulmányozásának. Előnye, hogy a fluorofóként használható triptofán a fehérjék többségében jelen van, mind jól struktúrált „steady-state” spektruma, mind élettartam lecsengése rendkívül érzékeny a környezeti paraméterekre. Hátránya is éppen ez, hiszen a fehérjék többségében való előfordulása miatt fehérjekomplexek kialakulása a sok egymásra szuperponálódó szignál miatt ritkán követhető nyomon szeparáltan.

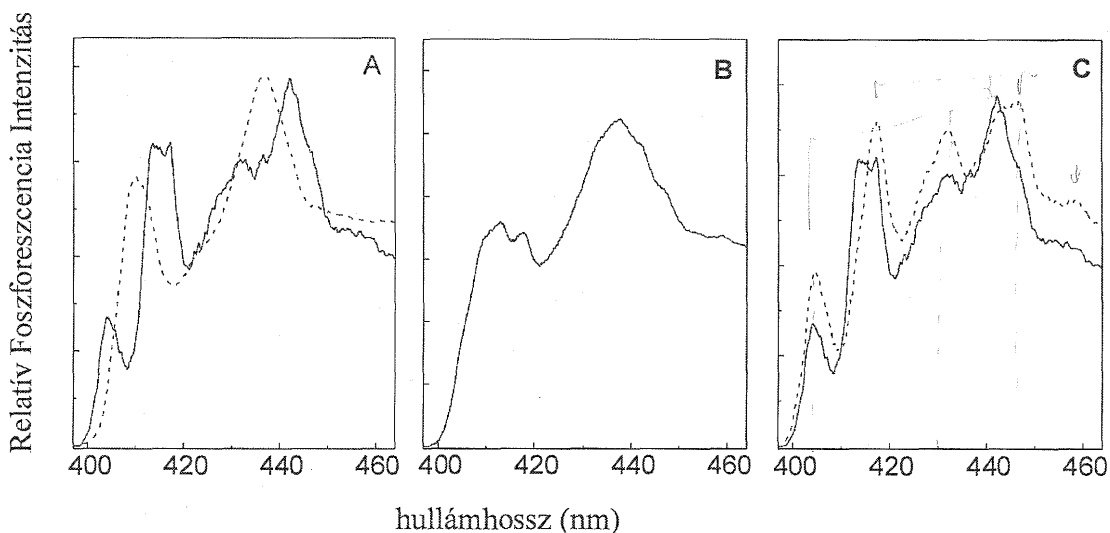
Az aktinban 4 db triptofán (Trp) található, mindegyik a szubdomén I-ben (13. ábra). Tudjuk, hogy az aktinnak ezen régiója részt vesz a miozin kötésben, így a kötőfelszínhez való közelség miatt a Trp-ok tudósíthatnak a komplex kialakulása

során bekövetkező intramolekuláris változásokról. Ismereteink szerint egyik Trp sem vesz részt közvetlenül a miozinhoz való kapcsolódásban. A miozin S1 nehéz láncában további 6 Trp található, amely lehetlenné teszi, hogy az akto-miozin komplex foszforeszcencia szignálját vizsgálva szétválasszuk a miozinban aktin hatására történő változásokat és az aktinban miozin hatására történő változásokat. A triptofánmentes motor domén (MD/W-) *Dictyostelium discoideum* által expresszált, enzimátikus funkcióját (ATPáz aktivitását) megtartó konstrukció alkalmazása (Malnasi-Csizmadia et al., 2000) lehetőséget ad számunkra, hogy foszforeszcencia spektroszkópiával vizsgáljuk az aktinban miozin kötés hatására bekövetkező változásokat. Kihhasználva azt a lehetőséget, hogy a szabályozásban résztvevő tropomiozin nem tartalmaz Trp aminosavat, megvizsgáltuk milyen hatással van jelenléte a fent említett komplexre.

Az F-aktin karakterizálása

Az F-aktin spektruma 140 K-en két, egymástól energetikailag távoleső 0,0-vibrációs átmenetet mutat. Az egyik csúcs 404.5 nm-en a másik 415.6 nm-en figyelhető meg (25,A ábra), amely két típusú kromofór csoport létezésére enged következtetni. Vizsgálataink szempontjából a spektrum magasabb hullámhosszakhoz tartozó értékei nem fontosak, ugyanis azok már nem a 0,0-vibrációs átmenetek, hanem például 0,1; 0,2;... átmenetek energiakülönbségei. A 0,0 átmenetek egymástól való távolsága alapján a két csoport erős, de ellentétes dipoláris kölcsönhatásban áll a környezetével. A spektrum nagyenergiájú komponense (404.5 nm) az oldatban szabadon lévő Trp spektrumához képest (406.4 nm) a rövidebb hullámhosszak felé van eltolódva („blue shifted”). Eszerint az e csoportba tartozó triptofán(ok) a fehérje felszínén található(k), az oldat számára nagymértékben hozzáférhetően. Ezt a feltételezést erősíti még, hogy a 140 K-ről 270 K-re történő melegítés során a spektrumnak ez a csúcsa csökken majd eltűnik tükrözve a hőmérséklet emelkedéssel párhuzamosan erősödő kioltó hatásokat. A kék oldali csúcs eltűnése ahhoz a hőmérsékleti tartományhoz rendelhető, amelyen a szabad triptofánok emissziója is megszűnik, ez további bizonyítékul szolgál, hogy a spektrum kék oldali csúcsa valóban felszíni triptofánok emissziójából származik. A foszforeszcencia spektrum vörös oldali komponense szélesebb, egy 414.1 nm-es és egy 416.7 nm-es csúcsból

tevődik össze. Ebbe a csoportba tartozó triptofán(ok) elrejtetten a fehérje belsejében található(k).

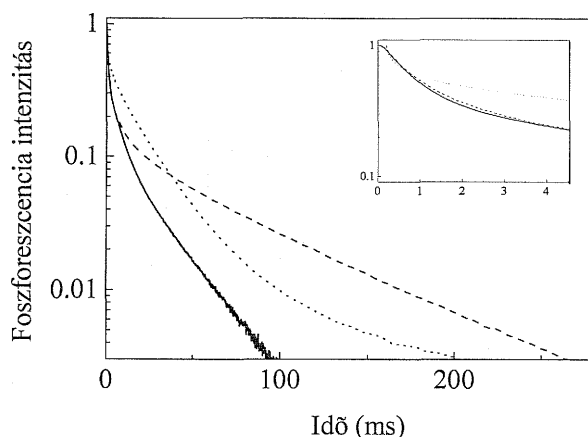


25. ábra: A: F-aktin (folytonos vonal) és S1 (szaggatott vonal) spektrumai; B: F-aktin-S1 1:1 arányú komplexe; C: F-aktin (folytonos vonal) és F-aktin-MD/W-komplexe (szaggatott vonal). A spektrumokat 140K-en vettük fel, a triptofánok gerjesztése 295 nm-en történt.

Ezeknek az elrejtett aminosavaknak a triplett állapota alacsonyabb energiájú a nem-poláros régiókhoz képest (411-412 nm), amelynek oka dipólus vagy töltött oldalláncokkal való kölcsönhatás kialakulásában kereshető. 140 K-ről való felmelegítés során a fehérje visszanyeri eredeti flexibilitását és mozgékonyágát, üvegszerű állapotból („glass matrix”) folyékony („fluid matrix”) állapotba megy át. Ezzel párhuzamosan a foszforeszcencia élettartam és kvantum hatásfok csökken, ugyanis a relaxációs folyamatokban a kioltó hatások mellett az egyéb nem-radiatív lecsengési utak aránya is megnövekedik. 230 K környékén a vörös oldali komplex csúcs 417 nm-es maximumnál kicsúcsosodik, a 270 K-re történő további melegítés már nem változtat a spektrum alakján.

Az aktin filamentum a 0.5 °C-on mért foszforeszcencia élettartam lecsengése heterogén, amely, hasonlóan a spektrumhoz, a triptofánok nagymértékben különböző lokális környezetére utal (26. ábra). Tapasztalat alapján az élettartam komponensek kapcsolatban állnak a fehérje mátrix lokális mobilitásával, empirikus kapcsolat van az élettartam és lokális viszkozitás között (Gonnelli and Strambini, 1995). Minél nagyobb a lokális viszkozitás annál hosszabb lesz az ott elhelyezkedő

kromofór élettartama. Az F-aktin élettartam lecsengés legjobb illesztését 3 exponenciális komponens összege adta, így a kromofórok környezetükkel való kapcsolatuk alapján 3 csoportját különböztethetjük meg: $\tau_1=0.7$ ms, $\tau_2=6.0$ ms és $\tau_3=33.0$ ms élettartam értékekkel.



26. ábra: F-aktin (folytonos vonal), S1 (pontozott vonal) és F-aktin-S1 komplex (szaggatott vonal) foszforeszcencia lecsengése. A görbéket 273.5 K-en vizes (puffer) környezetben vettük fel. A triptofánokat 295 nm-en gerjesztettük. A beszúrt ábra a lecsengés első 10 ms-át mutatja.

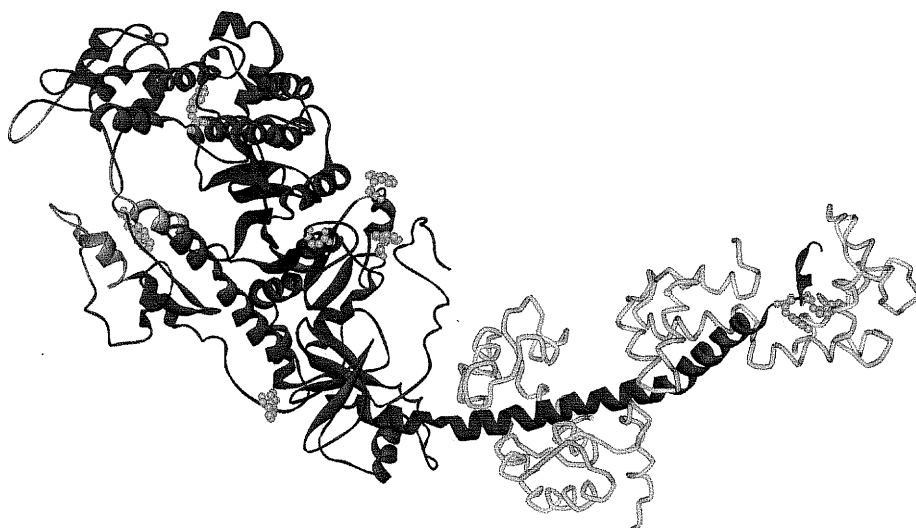
Az aktin monomerről készült röntgen-kristallográfiai modell alapján (Kabsch et al., 1990) a W79 aminosav a molekula felszínén helyezkedik el és nagy az oldat felé mutatott hozzáférhetősége. A W356 szintén molekula felszíni, de a triptofán indol gyűrűje a molekula belseje felé orientálódik. A W86 és W340 aminosavak a molekula belsejében, elrejtetten találhatóak, azonban a W86 közelében, mintegy 4 Å-nyi távolságra található a Cys¹⁰ kioltóként viselkedő aminosav, amely a kettejük közötti távolság alapján kb. 2 ms-ra csökkenti a W86 élettartamát (Lapidus et al., 2001).

A foszforeszcencia „steady-state” spektrumból a 4 triptofán 3 csoportba sorolható (1 kék csúcs, 2 vörös csúcs), hasonlóan az élettartam lecsengésből való következtetéshez ($\tau_1=0.7$ ms, $\tau_2=6.0$ ms, $\tau_3=33.0$ ms). Nagy valószínűséggel rendelhetjük 404.7 nm-és kék csúcsot és a 0.7 ms-os legrövidebb élettartamot a W79 felszínén elhelyezkedő aminosavhoz, hasonlóan csaknem biztosak lehetünk benne, hogy a 416.7 nm-es vörös csúcs és a 33 ms-os hosszú élettartam komponens a mélyen eltemetett W340 aminosavat jellemzi. A 404.1 nm-es csúcs és 6.0 ms-os

élettartam valószínű a W356 aminosav tulajdonsága, míg a W86 nem sorolható egyértelműen be egyik csoportba sem. Lehetséges, hogy a W86 aminosavat jellemző 4. kromofór csoport spektrális és időbeli jellemzői az egymásra szuperponálódó jelek miatt nem szeparálhatóak, de elképzelhető az is, hogy csak 3 emittáló kromofór csoport létezik, a W86 esetleg kioltódik a Cys¹⁰ által vagy közte és a W79 között megjelenő homo-energia transzfer által.

S1 és MD/W- okozta változások az aktinban

Az S1 nehéz lánc 6 triptofánt tartalmaz (27. ábra). 140 K-en felvett spektruma egy meglehetősen széles 0,0-vibrációs átmenetet tartalmaz, amelynek maximuma 409.1 nm-en található (25, A ábra).



27. ábra: Miozin S1 szalagmodellje, piros színnel jelölve az aktinkötő régió, zölddel a nehéz láncan található triptofánok pozíciói.

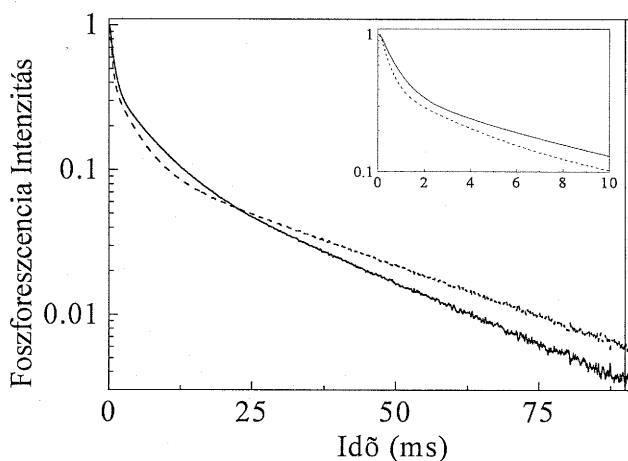
Az aktin-S1 reláció vizsgálatában kedvező tény, hogy az S1 spektrum maximuma az aktin spektrum két 0,0 átmenet között helyezkedik el, így a komplex spektruma könnyebben vizsgálható, a komplexben megjelenő csúcsok így könnyebben azonosíthatók.

Az MD/W- alkalmazása, aktinnal való komplex képzése lehetővé teszi, hogy csupán az aktin foszforeszcenciája legyen nyomonkövethető. E komplex „steady-

state” spektrumának kék csúcsa változatlan (405.1 nm) az aktin spektrumához képest, azonban az eredeti 414.1 nm-es és 416.7 nm-es csúcsok egy 417.4 nm-es maximummal helyettesítődnek, amely az aktin-S1 spektrumban megfigyelhető 417.5 nm-es maximumnak felel meg (25, C ábra). Az aktin spektrum vörös oldali 0,0 átmenet csúcsainak megváltozása az eltemetett triptofánok környezetében bekövetkező változásokat tükrözik, míg a felszíni W79-es aminosav emissziója változatlan marad. Mivel az a 413.3 nm-es csúcs, amely az aktin-S1 komplexet jellemezte az aktin-MD/W- kapcsolatban viszont nem jelenik meg, feltételezhető, hogy az az S1 409.1 nm-ről 413.3 nm-re történő eltolódása aktin kötés hatására.

Az S1 élettartam lecsengése hasonló az aktinéhoz, nagymértékű heterogenitást mutat és 3 élettartam komponenssel jellemezhető (26. ábra). Az aktin-S1 komplexben azonban megjelenik egy negyedik, $\tau_4 = 73$ ms hosszú élettartamú komponens (26. ábra). Ezen komponens azt mutatja, hogy egy vagy több triptofán környezete jelentősen rigidebbé, kompaktabbá vált az egyik vagy mindkét fehérjében. Figyelembe véve, hogy az 1:0.7 aktin:S1 aránynál a τ_4 amplitúdója 9%, míg 1:0.4 aktin:S1 aránynál 5%-ra csökken, valószínű, hogy a megjelenő hosszú komponens az S1 valamely triptofánjától/triptofánjaitól származik/származnak. Azonban az S1 nehézlánc 6 triptofánja közül nem azonosítható, hogy mely vagy melyek ezek a triptofánok. Szerkezeti megfontolások alapján ez lehet a W595, hiszen direkt részt vesz az aktinhoz való ködődésben, de másik jelöltünk lehet a „relay” hurkon elhelyezkedő W510, amely triptofánról ismeretes, hogy a nukleotid-kötő zsebtől való jelentős távolsága ellenére is fluoreszcenciája érzékeny a zseb „open” vagy „closed” állapotú pozíciójára. E kérdés megválaszolására különböző pozíciókba mutált egy-triptofán tartalmú motor domén konstrukciók alkalmazása jelenthet megoldást.

Aktin-MD/W- komplex élettartam lecsengésében teljes telítettség (1:1.2) esetén sem jelenik meg a τ_4 hosszú komponens, amely tovább erősíti azt a feltevést, hogy az az S1-hez tartozik (28. ábra).



28. ábra: F-aktin (folytonos vonal) és F-aktin-MD/W- komplex (szaggatott vonal) foszforeszcencia lecsengése. A triptofánok gerjesztése 295 nm-en történtek. A beszűrt ábra a lecsengés első 10 ms-át mutatja.

Az aktin-MD/W- 3 élettartam komponenssel jellemezhető (7. Táblázat), bár azok módosulnak az aktin filamentumon mért komponensekhez képest. τ_1 és τ_2 csaknem a felére csökken, 0.7 ms-ról 0.4 ms-ra és 6.0 ms-ról 3.8 ms-ra, míg τ_3 20%-kal megnő, 32.6 ms-ról 39.0 ms-ra.

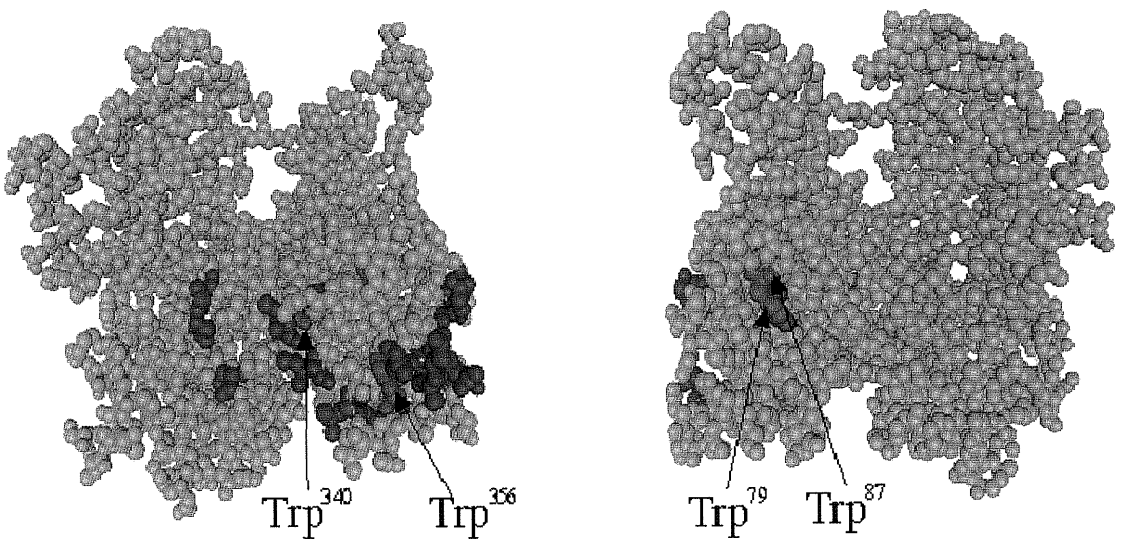
Minta	τ_1 (ms)	(α_1)	τ_2 (ms)	(α_2)	τ_3 (ms)	(α_3)	τ_4 (ms)	(α_4)
F-aktin	0.70	(62%)	6.0	(25%)	32.6	(13%)	-	-
F-aktin:Tm	0.72	(63%)	5.9	(24%)	33.0	(13%)	-	-
F-aktin:S1 (1:0.7)	0.56	(46%)	2.0	(33%)	13.6	(12%)	72.8	(9%)
F-aktin:MD/W- (1:1.2)	0.40	(61%)	3.8	(26%)	39.0	(13%)	-	-
F-aktin:MD/W-:Tm	0.38	(63%)	4.0	(25%)	40.0	(12%)	-	-

7. Táblázat: Élettartam és amplitúdó komponensek különböző komplexek esetén.

Az élettartamokhoz tartozó amplitúdók nem változnak számottevően. Tehát a kioltási folyamatok hatásfokának erősödésével a τ_1 és τ_2 a felszíni (W79) és felszín közeli (W356) triptofánok körüli lazább szerkezet kialakulásáról informál miozin

kötéskor. A τ_3 növekvő értékéből aktin molekula belsejében miozinnal való komplex képzés során egy merevebb szekezet formálódására következtethetünk.

Összefoglalva azt mondhatjuk, hogy az aktin-miozin kötés hatása leginkább a W356 aminosav (414.1 nm, τ_2) környezetének változásában figyelhető meg. Ha szerkezetileg vizsgáljuk, ez a triptofán az aktin két miozin-kötő régiója közé ékelődik, bár maga közvetlenül nem vesz részt a kötés kialakításban. Az aktin egyik miozin-kötő szakasza az Asp¹-Glu⁴, amely elektrosztatikus kölcsönhatást alakít ki, míg az Ile³⁴⁵ és Leu³⁴⁹ aminosavak hidrofób kölcsönhatást hoznak létre a miozinnal. A spektrum 414.1 nm-es csúcsának eltolódása 417.4 nm-re a dipoláris kölcsönhatások erősödésére, míg az élettartam komponens csökkenése a konformációs flexibilitás növekedésére utalnak.



29. ábra: Aktin monomer elöl és hátul nézetből. Pirossal jelöltük a triptofánokat, kékkel a miozin kötésben résztvevő régiókat.

Minta	W79		W86		W340		W356	
	Sp. csúcs (nm)	életidő (ms)	Sp. csúcs (nm)	életidő (ms)	Sp. csúcs (nm)	életidő (ms)	Sp. csúcs (nm)	életidő (ms)
F-aktin	404.5	0.7	?	0.7	416.7	32.6	414.1	6.0
F-aktin + MD/W-	405.0	0.4	?	0.4	417.5	39.0	417.5	3.8
struktúrális környezet	nyitott az oldat felé		eltemetett, de kioltódik Cys ¹⁰ által		eltemetett, rigid		elrejtett, flexibilis	

8. Táblázat: Az aktin triptofánjainak foszforeszcencia tulajdonságai összefoglalva. A W86-os triptofánhoz nem tudunk egyértelműen spektrális jellemzőt rendelni, ezt jelzi a kérdőjel.

Feltételeztük, hogy a felszíni W79-es aminosav (404.5 nm, τ_1) mikrokörnyezete érzékeny lesz a miozin kötésre, azonban a kísérleti eredmények alapján csupán enyhe konformációs különbség figyelhető meg a miozin jelenlétében. Méréseink alapján ezáltal direkt bizonyítékot nyerünk, hogy ez az aminosav nem vesz részt a miozin kötésben. Megfigyelésünket alátámasztja, hogy a röntgenkrisztallográfiai modellen ez a triptofán nem a feltételezett miozin-kötő aminosavak közelében található (29. ábra).

A mélyen eltemetett W340-es aminosav (416.7 nm, τ_3) az Ile³⁴² aminosav közelében helyezkedik el, amely kapcsolódik a miozinhoz, annak Pro⁵²⁹-Lys⁵⁵³ helix mintázatához. Miozin kötésre e kromofór körüli régió rigiditása megnő, holott távol a kötőfelszíntől, a molekula belsejében található.

Tropomiozin hatása az aktinra

Az aktinnal és/vagy MD/W- -nel kialakított kettős és hármas komplexek „steady-state” spektrumai és foszforeszcencia lecsengés élettartam komponensei nem különböztek a tropomiozin mentes adatoktól. Eszerint a tropomiozinak vagy valóban nincs hatása az aktin szubdomén I-re egy szabályozatlan (troponin komplex

nélküli) filamentumban, vagy ha van hatása, az általunk alkalmazott spektroszkópai módszerekkel e hatás nem kimutatható.

Következtetések

Kísérleteket végeztünk, hogy megvizsgáljuk

- I. milyen konformációs és dinamikai ^{jellemini} változásokon halad át az S1 az ATP hidrolízis egy ciklusa alatt; ^{hentes állapotait.}
- II. hogyan változik az S1 aktin-kötő felszínének hozzáférhetősége és töltésviszonyai aktin és/vagy ADP jelenlétében;
- III. milyen konformációs változásokat okoznak a filamentum szerkezetében az aktin-kötő fehérjék (miozin, tropomiozin).

Eredményeink alapján:

I.

- Az S1 intramolekuláris flexibilitása irányfüggő és különböző régióinak konformációja változik az ATP hidrolízis lépéseiben. Az S1 dinamikai heterogenitása az ATP ciklus során végig fennmarad.
- Az aktin-kötő régió (alsó 50 kDa-os domén) egy rendkívül merev területe a fehérjének, amely nem érzékeny a nukleotid-kötő zseb „open” vagy „closed” állapotaira.
- Az 50 kDa-os felső domén az ATP ciklus minden nukleotid állapotában rendkívül flexibilis, amely a gyors foszfát kötés, disszociáció és az ezt kísérő lokális struktúrális átrendeződés szerkezeti alapjait biztosítja.
- Az S1-re általánosságban jellemző, hogy „closed” állapotban a molekula rigidebb, mint „open” állapotban, amelynek hátterében az állhat, hogy a rigidebb szerkezet mechanikai alapot nyújt az információ nukleotid-kötő zsebtől a „lever arm”-ig való terjedéséhez.
- Különbséget találtunk az alkalmazott nukleotid analógoknak az S1-en mimikált állapotai között. Az ADP.V_i eltolta az „open-closed” egyensúlyt a „closed” állapot felé, míg az ADP.BF_x és ADP.AIF₄⁻ mind az „open” mind a „closed” állapot megjelenését megengedi.

rendkívül merev!
a nukleotid!
akkor hogyan kötődhet?

II.

- Az S1-hez kapcsolt FHS fluorofór CoCl_2 -dal történő kioltásának dinamikus komponense elhanyagolható, a kioltás sztatikus módon történik.
- Aktin jelenlétében és nélküle a kioltás hatékonysága hibahatáron belül megegyezik, amiből következtethető, hogy az aktin nem okoz olyan szerkezeti vagy töltésviszonyokban bekövetkező változást, amelyet a pozitív töltésű kioltó alkalmazása detektálni tudna.
- Mindazonáltal a kioltás hatékonysága függ az S1 nukleotid tartalmától, ADP kötés hatására a térbeli hozzáférhetőség (de valószínűleg nem az elektrosztatikus viszonyok) megváltozása tükröződik az eredményekből.

III.

- Az aktin filamentum triptofán foszforeszcencia spektruma és élettartam lecsengése egyaránt heterogén, utalva a triptofánok heterogén környezetben való elhelyezkedésére a molekulán belül. *Ez trivialis*
- A miozin kötés hatása az aktinban található triptofánok közül leginkább a W356 aminosav környezetének változásában figyelhető meg, holott ez az aminosav nincs közvetlen kapcsolatban az akto-miozin kötőfelszínnel.
- Az aktin felszínén elhelyezkedő W79-es aminosav mikrokörnyezete érzékeny a miozin kötésre, azonban a kísérleti eredmények alapján csupán enyhe konformációs különbség figyelhető meg a miozin jelenlététől függően. Ez azt mutatja, hogy a W79 nem vesz részt a miozin kötésben.
- A mélyen eltemetett W340-es aminosav körüli régió rigiditása fokozódik miozin kötésre, holott ez a triptofán a molekula belsejében eltemetetten található.
- A tropomiozinnak vagy nincs hatása az aktin triptofánokat tartalmazó régiójára, vagy ha van hatása, az általunk alkalmazott spektroszkópiai módszerekkel e hatás nem kimutatható. ✓

Irodalomjegyzék

- Bagshaw, C. R., D. R. Trentham, R. G. Wolcott, and P. D. Boyer. 1975. Oxygen exchange in the gamma-phosphoryl group of protein-bound ATP during Mg²⁺-dependent adenosine triphosphatase activity of myosin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 72:2592-6.
- Baker, J. P., and M. A. Titus. 1998. Myosins: matching functions with motors. *Curr Opin Cell Biol*. 10:80-6.
- Bauer, C. B., H. M. Holden, J. B. Thoden, R. Smith, and I. Rayment. 2000. X-ray structures of the apo and MgATP-bound states of Dictyostelium discoideum myosin motor domain. *J Biol Chem*. 275:38494-9.
- Bertrand, R., J. Derancourt, and R. Kassab. 1995. Production and properties of skeletal myosin subfragment 1 selectively labeled with fluorescein at lysine-553 proximal to the strong actin-binding site. *Biochemistry*. 34:9500-7.
- Burke, M., and E. Reisler. 1977. Effect of nucleotide binding on the proximity of the essential sulfhydryl groups of myosin. Chemical probing of movement of residues during conformational transitions. *Biochemistry*. 16:5559-63.
- Cope, M., J. Whisstock, I. Rayment, and J. Kendrick-Jones. 1996. Conservation within the myosin motor domain: implications for structure and function. *Structure*. 4:969-87.
- Csapó, A., and J. Gergely. 1950. *Nature*. 166:1078-9.
- Dominguez, R., Y. Freyzon, K. M. Trybus, and C. Cohen. 1998. Crystal structure of a vertebrate smooth muscle myosin motor domain and its complex with the essential light chain: visualization of the pre-power stroke state. *Cell*. 94:559-71.
- Doyle, T., J. Hansen, and E. Reisler. 2001. Tryptophan fluorescence of yeast actin resolved via conserved mutations. *Biophys J*. 80:427-34.
- Finer, J. T., R. M. Simmons, and J. A. Spudich. 1994. Single myosin molecule mechanics: piconewton forces and nanometre steps. *Nature*. 368:113-9.
- Fisher, A. J., C. A. Smith, J. B. Thoden, R. Smith, K. Sutoh, H. M. Holden, and I. Rayment. 1995. X-ray structures of the myosin motor domain of Dictyostelium discoideum complexed with MgADP.BeFx and MgADP.AlF₄. *Biochemistry*. 34:8960-72.

- Fiske, C. H., Subbarow, Y. 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 66:375-400.
- Geeves, M., and P. Conibear. 1995. The role of three-state docking of myosin S1 with actin in force generation. *Biophys J.* 68:194S-199S.
- Geeves, M. A., and K. C. Holmes. 1999. Structural mechanism of muscle contraction. *Annu Rev Biochem.* 68:687-728.
- Geisterfer-Lowrance, A., S. Kass, G. Tanigawa, H. Vosberg, W. McKenna, C. Seidman, and J. Seidman. 1990. A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: a beta cardiac myosin heavy chain gene missense mutation. *Cell.* 62:999-1006.
- Gonnelli, M., and G. B. Strambini. 1995. Phosphorescence lifetime of tryptophan in proteins. *Biochemistry.* 34:13847-57.
- Goodno, C. C. 1979. Inhibition of myosin ATPase by vanadate ion. *Proc Natl Acad Sci USA.* 76:2620-4.
- Goodno, C. C. 1982. Myosin active-site trapping with vanadate ion. *Methods Enzymol.* 85:116-23.
- Gratton, E., D. Jameson, G. Weber, and B. Alpert. 1984. A model of dynamic quenching of fluorescence in globular proteins. *Biophys J.* 45:789-94.
- Hanson, J., and E. H. Huxley. 1953. Structural basis of the cross-striation in muscle. *Nature.* 172:530-532.
- Hastings, J., and Q. Gibson. 1967. The role of oxygen in the photoexcited luminescence of bacterial luciferase. *J Biol Chem.* 242:720-6.
- Hershberger, M. V., A. H. Maki, and W. C. Galley. 1980. Phosphorescence and optically detected magnetic resonance studies of a class of anomalous tryptophan residues in globular proteins. *Biochemistry.* 19:2204-9.
- Hiratsuka, T. 1989. Nucleotide-induced specific fluorescent labeling of the 23-kDa NH₂- terminal tryptic peptide of myosin ATPase by the serine-reactive reagent 9-anthroynitrile. *J Biol Chem.* 264:18188-94.
- Holmes, K. C. 1997. The swinging lever-arm hypothesis of muscle contraction. *Curr Biol.* 7:R112-8.
- Holmes, K. C., and M. A. Geeves. 2000. The structural basis of muscle contraction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 355:419-31.
- Holmes, K. C., D. Popp, W. Gebhard, and W. Kabsch. 1990. Atomic model of the actin filament. *Nature.* 347:44-9.

- Isambert, H., P. Venier, A. C. Maggs, A. Fattoum, R. Kassab, D. Pantaloni, and M. F. Carrier. 1995. Flexibility of actin filaments derived from thermal fluctuations. Effect of bound nucleotide, phalloidin, and muscle regulatory proteins. *J Biol Chem.* 270:11437-44.
- Itakura, S., H. Yamakawa, Y. Toyoshima, A. Ishijima, T. Kojima, Y. Harada, T. Yanagida, T. Wakabayashi, and K. Sutoh. 1993. Force-generating domain of myosin motor. *Biochem Biophys Res Commun.* 196:1504-10.
- Johara, M., Y. Toyoshima, A. Ishijima, H. Kojima, T. Yanagida, and K. Sutoh. 1993. Charge-reversion mutagenesis of Dictyostelium actin to map the surface recognized by myosin during ATP-driven sliding motion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:2127-31.
- Jontes, J. D., E. M. Wilson-Kubalek, and R. A. Milligan. 1995. A 32 degree tail swing in brush border myosin I on ADP release. *Nature.* 378:751-3.
- Kabsch, W., H. G. Mannherz, D. Suck, E. F. Pai, and K. C. Holmes. 1990. Atomic structure of the actin:DNase I complex. *Nature.* 347:37-44.
- Kouyama, T., J. Kinoshita K, and A. Ikegami. 1985. Excited-state dynamics of bacteriorhodopsin. *Biophys J.* 47:43-54.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-5.
- Lakowicz, J. 1986. Principles of Fluorescence Spectroscopy. :305-339.
- Lanzetta, P., L. Alvarez, P. Reinach, and O. Candia. 1979. An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. *Anal Biochem.* 100(1):95-7. 100:95-7.
- Lapidus, L., W. Eaton, and J. Hofrichter. 2001. Dynamics of intramolecular contact formation in polypeptides: distance dependence of quenching rates in a room-temperature glass. *Phys Rev Lett.* 87:258101.
- Lehman, W., R. Craig, and P. Vibert. 1994. Ca(2+)-induced tropomyosin movement in Limulus thin filaments revealed by three-dimensional reconstruction. *Nature.* 368:65-7.
- Lorenz, M., K. J. Poole, D. Popp, G. Rosenbaum, and K. C. Holmes. 1995. An atomic model of the unregulated thin filament obtained by X-ray fiber diffraction on oriented actin-tropomyosin gels. *J Mol Biol.* 246:108-19.

- Lorenz, M., D. Popp, and K. C. Holmes. 1993. Refinement of the F-actin model against X-ray fiber diffraction data by the use of a directed mutation algorithm. *J Mol Biol.* 234:826-36.
- MacLean, J. J., L. R. Chrin, and C. L. Berger. 2000. Dynamics at Lys-553 of the acto-myosin interface in the weakly and strongly bound states. *Biophys J.* 78:1441-8.
- Málnási-Csizmadia, A., M. Kovács, R. J. Woolley, S. W. Botchway, and C. R. Bagshaw. 2001a. The dynamics of the relay loop tryptophan residue in the Dictyostelium myosin motor domain and the origin of spectroscopic signals. *J Biol Chem.* 276:19483-90.
- Málnási-Csizmadia, A., D. S. Pearson, M. Kovács, R. J. Woolley, M. A. Geeves, and C. R. Bagshaw. 2001b. Kinetic resolution of a conformational transition and the ATP hydrolysis step using relaxation methods with a Dictyostelium myosin II mutant containing a single tryptophan residue. *Biochemistry.* 40:12727-37.
- Málnási-Csizmadia, A., R. J. Woolley, and C. R. Bagshaw. 2000. Resolution of conformational states of Dictyostelium myosin II motor domain using tryptophan (W501) mutants: implications for the open- closed transition identified by crystallography. *Biochemistry.* 39:16135-46.
- Margossian, S. S., and S. Lowey. 1982. Preparation of myosin and its subfragments from rabbit skeletal muscle. *Methods Enzymol.* 85:55-71.
- Maruta, S., G. D. Henry, B. D. Sykes, and M. Ikebe. 1993. Formation of the stable myosin-ADP-aluminum fluoride and myosin-ADP-beryllium fluoride complexes and their analysis using ¹⁹F NMR. *J Biol Chem.* 268:7093-100.
- Maytum, R., S. S. Lehrer, and M. A. Geeves. 1999. Cooperativity and switching within the three-state model of muscle regulation. *Biochemistry.* 38:1102-10.
- McKillop, D. F., and M. A. Geeves. 1993. Regulation of the interaction between actin and myosin subfragment 1: evidence for three states of the thin filament. *Biophys J.* 65:693-701.
- Mermall, V., P. L. Post, and M. S. Mooseker. 1998. Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction. *Science.* 279:527-33.
- Miki, M., S. O'Donoghue, and C. Dos Remedios. 1992. Structure of actin observed by fluorescence resonance energy transfer spectroscopy. *J Muscle Res Cell Motil.* 13:132-45.

- Miller, L., M. Phillips, and E. Reisler. 1988. Polymerization of G-actin by myosin subfragment 1. *J Biol Chem.* 263:1996-2002.
- Milligan, R., r. M. Whittake, and D. Safer. 1990. Molecular structure of F-actin and location of surface binding sites. *Nature.* 348:217-21.
- Molloy, J., J. Burns, J. Kendrick-Jones, R. Tregear, and D. White. 1995. Movement and force produced by a single myosin head. *Nature.* 378:209-12.
- Mornet, D., R. Bertrand, P. Pantel, E. Audemard, and R. Kassab. 1981. Proteolytic approach to structure and function of actin recognition site in myosin heads. *Biochemistry.* 20:2110-20.
- Müller, H., and S. V. Perry. 1960. The chromatographic behaviour and adenosine triphosphatase activities of the meromyosins. *Biochim Biophys Acta.* 40:187-9.
- Norby, J. 1971. Studies on a coupled enzyme assay for rate measurements of ATPase reactions. *Acta Chem Scand.* 25:2717-26.
- Nyitrai, M., G. Hild, N. Hartvig, J. Belagyi, and B. Somogyi. 2000a. Conformational and dynamic differences between actin filaments polymerized from ATP- or ADP-actin monomers. *J Biol Chem.* 275:41143-9.
- Nyitrai, M., G. Hild, Z. Lakos, and B. Somogyi. 1998. Effect of Ca²⁺-Mg²⁺ exchange on the flexibility and/or conformation of the small domain in monomeric actin. *Biophys J.* 74:2474-81.
- Nyitrai, M., G. Hild, A. Lukacs, E. Bodis, and B. Somogyi. 2000b. Conformational distributions and proximity relationships in the rigor complex of actin and myosin subfragment-1. *J Biol Chem.* 275:2404-9.
- Perry, S. 2001. Vertebrate tropomyosin: distribution, properties and function. *J Muscle Res Cell Motil.* 22:5-49.
- Perry, S. V. 1950. The ATP-ase activity of isolated myofibrils. *J Biochem.* 47.
- Peyser, Y. M., K. Ajtai, T. P. Burghardt, and A. Muhlrads. 2001. Effect of ionic strength on the conformation of myosin subfragment 1- nucleotide complexes. *Biophys J.* 81:1101-14.
- Phan, B., and E. Reisler. 1992. Inhibition of myosin ATPase by beryllium fluoride. *Biochemistry.* 31:4787-93.
- Pollard, T., and A. Weeds. 1984. The rate constant for ATP hydrolysis by polymerized actin. *FEBS Lett.* 170:94-8.

- Rayment, I., H. M. Holden, M. Whittaker, C. B. Yohn, M. Lorenz, K. C. Holmes, and R. A. Milligan. 1993a. Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. *Science*. 261:58-65.
- Rayment, I., W. R. Rypniewski, K. Schmidt-Base, R. Smith, D. R. Tomchick, M. M. Benning, D. A. Winkelmann, G. Wesenberg, and H. M. Holden. 1993b. Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor. *Science*. 261:50-8.
- Sivaramakrishnan, M., and M. Burke. 1982. The free heavy chain of vertebrate skeletal myosin subfragment 1 shows full enzymatic activity. *J Biol Chem*. 257:1102-5.
- Smith, C. A., and I. Rayment. 1996. X-ray structure of the magnesium(II).ADP.vanadate complex of the Dictyostelium discoideum myosin motor domain to 1.9 Å resolution. *Biochemistry*. 35:5404-17.
- Somogyi, B., J. Matko, S. Papp, J. Hevessy, G. R. Welch, and S. Damjanovich. 1984. Forster-type energy transfer as a probe for changes in local fluctuations of the protein matrix. *Biochemistry*. 23:3403-11.
- Somogyi, B., J. Norman, and A. Rosenberg. 1986. Gated quenching of intrinsic fluorescence and phosphorescence of globular proteins. An extended model. *Biophys J*. 50:55-61.
- Spudich, J. A., and S. Watt. 1971. 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*. 246:4866-71.
- Strambini, G., and E. Gabellieri. 1987. Phosphorescence anisotropy of liver alcohol dehydrogenase in the crystalline state. Apparent glasslike rigidity of the coenzyme-binding domain. *Biochemistry*. 26:6527-30.
- Strambini, G. B., and M. Gonnelli. 1995. Tryptophan phosphorescence in fluid solution. *J. Am. Chem. Soc.* **117**:7646-7651.
- Strambini, G. B., and S. S. Lehrer. 1991. Tryptophan phosphorescence of G-actin and F-actin. *Eur J Biochem*. 195:645-51.
- Sutoh, K. 1982. Identification of myosin-binding sites on the actin sequence. *Biochemistry*. 21:3654-61.

- Sweeney, H., A. Straceski, L. Leinwand, B. Tikunov, and L. Faust. 1994. Heterologous expression of a cardiomyopathic myosin that is defective in its actin interaction. *J Biol Chem.* 269:1602-5.
- Szarka, K., E. Bódis, B. Visegrády, M. Nyitrai, F. Kilár, and B. Somogyi. 2001. 9-Anthrolylnitrile binding to serine-181 in myosin subfragment 1 as revealed by FRET spectroscopy and molecular modeling. *Biochemistry.* 40:14806-11.
- Takashi, R. 1979. Fluorescence energy transfer between subfragment-1 and actin points in the rigor complex of actosubfragment-1. *Biochemistry.* 18:5164-9.
- Trentham, D., R. Bardsley, J. Eccleston, and A. Weeds. 1972. Elementary processes of the magnesium ion-dependent adenosine triphosphatase activity of heavy meromyosin. A transient kinetic approach to the study of kinases and adenosine triphosphatases and a colorimetric inorganic phosphate assay in situ. *Biochem J.* 126:635-44.
- Urbanke, C., and J. Wray. 2001. A fluorescence temperature-jump study of conformational transitions in myosin subfragment 1. *Biochem J.* 358:165-73.
- Wagner, P. D. 1977. Fractionation of heavy meromyosin by affinity chromatography. *FEBS Lett.* 81:81-5.
- Wagner, P. D., and E. Giniger. 1981. Calcium-sensitive binding of heavy meromyosin to regulated actin in the presence of ATP. *J Biol Chem.* 256:12647-50.
- Wakelin, S., P. B. Conibear, R. J. Woolley, D. N. Floyd, C. R. Bagshaw, M. Kovacs, and A. Malnasi-Csizmadia. 2002. Engineering *Dictyostelium discoideum* myosin II for the introduction of site-specific fluorescence probes. *J Muscle Res Cell Motil.* 23(7-8):673-83.
- Weeds, A. G., and R. S. Taylor. 1975. Separation of subfragment-1 isoenzymes from rabbit skeletal muscle myosin. *Nature.* 257:54-6.
- White, H. D., B. Belknap, and W. Jiang. 1993. Kinetics of binding and hydrolysis of a series of nucleoside triphosphates by actomyosin-S1. Relationship between solution rate constants and properties of muscle fibers. *J Biol Chem.* 268:10039-45.
- Whittaker, M., E. M. Wilson-Kubalek, J. E. Smith, L. Faust, R. A. Milligan, and H. L. Sweeney. 1995. A 35-A movement of smooth muscle myosin on ADP release. *Nature.* 378:748-51.

- Xing, J., and H. C. Cheung. 1995. Internal movement in myosin subfragment 1 detected by fluorescence resonance energy transfer. *Biochemistry*. 34:6475-87.
- Yengo, C. M., L. R. Chrin, A. S. Rovner, and C. L. Berger. 2000. Tryptophan 512 is sensitive to conformational changes in the rigid relay loop of smooth muscle myosin during the MgATPase cycle. *J Biol Chem*. 275:25481-7.
- Yount, R. G., D. Lawson, and I. Rayment. 1995. Is myosin a "back door" enzyme? *Biophys J*. 68:44S-47S; discussion 47S-49S.

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Bódis, E., Szarka, K., Nyitrai, M., and Somogyi, B.: *Dynamic reorganisation of the motor domain of myosin subfragment 1 in different nucleotide states.* **Eur J Biochem.** 2003 Dec;270(24):4835-45.

Bódis, E., Strambini, G.B., Gonnelli, M., Málnási-Csizmadia, A. and Somogyi, B.: *Characterisation of F-actin tryptophan phosphorescence in the presence and absence of tryptophan-free myosin motor domain.* 2004, **Biophysical Journal** (in press)

Az értekezésben nem szereplő közlemények

M. Nyitrai, G. Hild, A. Lukács, E. Bódis, B. Somogyi (2000). *Conformational distributions and proximity relationships in the rigor complex of actin and myosin subfragment-1.* **J Biol Chem** 275(4): 2404-2409.

M. Nyitrai, G. Hild, E. Bódis, A. Lukács, B. Somogyi (2000). *Flexibility of Myosin-Subfragment-1 in its Complex with Actin as Revealed by Fluorescence Resonance Energy Transfer.* **Eur J Biochem** 267(14): 4334-4338.

K. Szarka, E. Bódis, B. Visegrády, M. Nyitrai, F. Kilar, B. Somogyi (2001). *9-Anthroylnitrile binding to serine-181 in myosin subfragment 1 as revealed by FRET spectroscopy and molecular modeling.* **Biochemistry-US** 40(49): 14806-14811.

Referált folyóiratban megjelent absztraktok

Somogyi, B., Nyitrai, M., Hild, G., Lukács, A., and Bódis, E.: *The dynamic and conformational properties of the catalytic and light-chain-binding domains of S1 in the acto-myosin complex.* 44th Annual Meeting of the American Biophysical Society. 2000. New Orleans, USA.

Bódis, E., Nyitrai, M., Hild, G., Hartvig, N., Belágyi, J., and Somogyi, B.: *Conformational and dynamic differences between actin filaments polymerized from ATP- or ADP-actin monomers.* Biophysical Society 45th Annual Meeting. 2001. Boston, USA

Lukács, A., Nyitrai, M., Bódis, E., Hild, G. and Somogyi, B.: *The effect of ADP on the flexibility and conformation of myosin-subfragment-1 in its complex with actin.* European Muscle Conference 2001. Pavia, Italy

Az értekezés alapjául szolgáló posztterek

Bódis, E., Nyitrai, M., Hild, G., Halasi, S., Lukács, A., and Somogyi, B.: A miozin aktin-kötő régiójának vizsgálata fluoreszcenciás módszerekkel: az aktin és az ADP hatása. XXIX. Membrántranszport Konferencia. 1999, május 24-28, Sümeg.

Bódis E., Szarka K., Nyitrai M. és Somogyi B.: Irányfüggő flexibilitás a miozin S-1 katalitikus doménjén belül. XXX. Membrántranszport Konferencia. 2000, május 23-26, Sümeg.

Szarka, K. Bódis, E., Nyitrai, M. and Somogyi, B.: Direction-dependent flexibility in the catalytic domain of myosin subfragmentum 1. 2001. Graz, Austria

Szarka K. Bódis E., Lukács A. Nyitrai M. és Somogyi B.: Miozin és tropomiozin hatása az aktin filamentum flexibilitására. Magyar Biofizikus Társaság XX. Vándorgyűlése. 2001. Budapest.

Lukács, A., Nyitrai, M., Bódis, E., Hild, G. and Somogyi, B.: The effect of ADP on the flexibility and conformation of myosin-subfragment-1 in its complex with actin. European Muscle Conference 2001. Pavia, Italy

Bódis E., Szarka K., Strambini GB., Gonelli M., Nyitrai M. and Somogyi B.: Az aktin-kötő fehérjék hatása az aktin filamentum konformációjára és flexibilitására. XXXII. Membrántranszport Konferencia. 2002., május 23-26, Sümeg