

Ph.D. értekezés

**Toxinok által létrehozott konformációs és dinamikai
változások az aktin filamentumban**

VISEGRÁDY BALÁZS

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar,
Biofizikai Intézet

2005

Program: Biokémia és molekuláris biológia

Programvezető: Dr. Sümegi Balázs

Alprogram: B-130: Funkcionális fehérjedynamika vizsgálata biofizikai módszerekkel

Alprogramvezető: Dr. Somogyi Béla

Témavezetők: Dr. Nyitrai Miklós

Dr. Lőrinczy Dénes

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm Dr. Somogyi Bélának, a PTE ÁOK Biofizikai Intézet intézetvezető egyetemi tanárának a munkám során nyújtott segítséget, valamint hogy intézetében lehetőséget biztosított Ph.D. tanulmányaim folytatására.

Köszönöm témavezetőimnek, Dr. Nyitrai Miklós és Dr. Lőrinczy Dénes egyetemi docenseknek, a munkám során nyújtott folyamatos szakmai segítséget, támogatást.

Köszönöm Bódis Emőkének és Dr. Hild Gábornak mindennapi baráti segítségnyújtásukat.

Köszönetet mondok a PTE ÁOK Biofizikai Intézet minden munkatársának a jó hangulatú munkahelyi légkörért, valamint segítségükért.

Köszönöm feleségemnek, gyermekeimnek, Édesanyámnak és Nagymamámnak a harmónikus családi légkör biztosítását, és támogatásukat, amellyel munkám eredményességéhez nagymértékben hozzájárultak.

Tartalomjegyzék

I. Irodalmi áttekintés	6
I.1 Az aktin.....	6
I.1.1 Történeti áttekintés.....	7
I.1.2 Az aktin szerkezete.....	9
I.2 Aktin-kötő, kis molekulásúlyú peptidszármazékok.....	14
II. Célkitűzések	22
III. Anyagok és módszerek	23
III.1 Felhasznált anyagok.....	23
III.2 Az aktin preparálása.....	23
III.3 Az aktin fluoreszcens jelölése.....	24
III.4 A fehérjekoncentráció és a jelölési arány meghatározása.....	26
III.5 „Steady-state” fluoreszcencia spektroszkópia.....	26
III.6 Fluoreszcencia rezonancia energia transzfer (FRET).....	28
III.7 Fluoreszcencia kioltás.....	29
III.8 Differenciális pásztázó kalorimetria (DSC).....	30
IV. Eredmények, megbeszélés	34
IV.1 Az aktin filamentum flexibilitásának és termikus paramétereinek vizsgálata Ca ²⁺ -aktin filamentumban.....	34
IV.1.1 Flexibilitásvizsgálat FRET segítségével.....	34
IV.1.2 A filamentum stabilitásának vizsgálata DSC alkalmazásával.....	37
IV.1.3 Fluoreszcencia kioltás.....	40
IV.2 A toxinok hatásának kooperativitása Mg ²⁺ -aktin filamentumban.....	42
IV.2.1 Az aktin filamentum toxinok jelenlétében kialakuló konformációs állapotai.....	42
IV.2.2 A toxin : aktin protomer sztöchiometria meghatározása.....	46
IV.2.3 A filamentumok köteggépződése („bundling”).....	48
IV.2.4 A kooperatív toxinhatás modellje.....	50

<i>IV.2.5 A Ca^{2+}- és Mg^{2+}-aktin filamentumokkal kapott eredmények összehasonlítása</i>	53
IV.3 A koopeartív hatás lehetséges biológiai jelentősége	55
V. Összefoglalás	57
Az értekezés alapjául szolgáló közlemények	58
Az értekezésben nem szereplő közlemények	58
Hivatkozott közlemények	59

I. Irodalmi áttekintés

I.1 Az aktin

Az eukarióta sejtek egyik leggyakrabban előforduló fehérjéje az aktin. A sejtmozgás és sejtalak változás a többsejtű állati szervezetek és számos egysejtű organizmus alapvető életfunkciója. Az embrionális fejlődés, a sebgyógyulás és a szövetképződés, az immunrendszer funkciói, a gyulladás, az angiogenezis, a tumoros sejtburjánzás és a metasztázis csak néhány a normális és patológiás folyamatok közül, amelyek során a sejt migrációja zajlik. A sejtmozgás fő „motorja”, egy sejt alakjának meghatározója a citoskeletális rendszer. A citoskeletont három különböző filamentális rendszer alkotja: a mikrofilamentumok, a mikrotubulusok, valamint az intermedier filamentumok. A mikrofilamentumok, és így a citoskeleton egyik legfőbb komponense az aktin (Lauffenburger and Horwitz, 1996; Pantaloni et al., 2001). Az aktin citoskeleton számos mechanizmuson keresztül tarja fenn a sejt polaritását, valamint szabályozza a mozgás irányát (Goode et al., 2000; Nabi, 1999). Az aktin továbbá a magasabb rendű szervezetekben a harántcsíkolt-, sima- és szívizom alapvető fehérjéje. A mikrotubuláris rendszer fontos szerkezeti szerepet tölt be élő sejtekben, és funkciója során közvetlen vagy közvetett kapcsolatban áll a mikrofilamentumokkal. Az intermedier filamentumok csoportja a harmadik és legheterogénebb filamentális rendszer, ami a sejtmozgásban nem tölt be központi szerepet, viszont a citoskeletális rendszer többi tagjával kölcsönhatva alapvető funkciót lát el a sejtek, valamint a szövetek mechanikai tulajdonságainak kialakításában (Nabi, 1999; Waterman-Storer and Salmon, 1999).

1.1.1 Történeti áttekintés

A XIX. sz.-ban elsőként Kühne vont ki aktin és miozin fehérjéket izomból. 1939-ben Engelhardt és munkatársai nyúl vázizomból izoláltak egy fehérjét, melyet miozinnak neveztek el. 1942-ben Szent-Györgyi Albert és munkatársa, Straub F. Brúnó azt tapasztalták, hogy a miozin preparálása során 0,6 M-nál alacsonyabb KCl koncentrációjú oldattal egy alacsony viszkozitású (miozin A), míg ennél töményebb oldattal egy magas viszkozitású (miozin B) miozint képesek az izomból kivonni (Straub, 1942). Megállapították, hogy a korábban Engelhardték által preparált fehérje valójában két fehérjének, a miozinnak, és egy másik fehérjének a komplexe. Ezt a fehérjét, amely a miozinnal képes volt viszkózus komplex kialakítására - az „it activated myosin” kifejezés alapján - aktinnak nevezték el. Straub és munkatársai 1942-ben leírták az ún. acetone forgácsból történő aktin preparálás módszerét (Straub, 1942). Ez a közlemény tekinthető az első, az aktin tulajdonságaival foglalkozó tanulmánynak.

Straub közleménye nyomán a későbbiekben megállapították, hogy az aktin alapvetően két formában fordul elő: monomer vagy globuláris (G), illetve a monomerek összekapcsolódása során képződő filamentális (F) aktinként. 1950-ben Straub és Feuer közleményben jelentették meg (Straub and Feuer, 1950), hogy a G-aktin molekulák kötött ATP molekulát tartalmaznak, amelyek az aktin polimerizációja során ADP-vé és P_i ionná hidrolizálódnak.

1963-ban Hanson és Lowy közölték az aktin monomerek filamentummá való összekapcsolódásának modelljét (Hanson and Lowy, 1963). Ebben a modellben - a monomer szerkezet részletes ismerete hiányában - a monomereket gömbök helyettesítették, amelyek a filamentumban spirálszerűen kapcsolódtak össze. Az elektronmikroszkópos eredmények alapján ez a modell további részletekkel egészült ki (Moore et al., 1970; Spudich et al., 1972; Wakabayashi et al., 1975). Az aktin monomerről ekkor már megállapították, hogy szerkezete egy kisebb és egy nagyobb alegységből épül fel. Megállapították továbbá, hogy az izom-összehúzódban az aktin filamentális formája vesz részt. A filamentális és monomer forma közötti kapcsolat leírására megszületett az ún. „treadmilling” (taposómalom) mechanizmus elmélete. E szerint a filamentumhoz asszociáló és onnan disszociáló protomerek száma időegységenként megegyezik, a

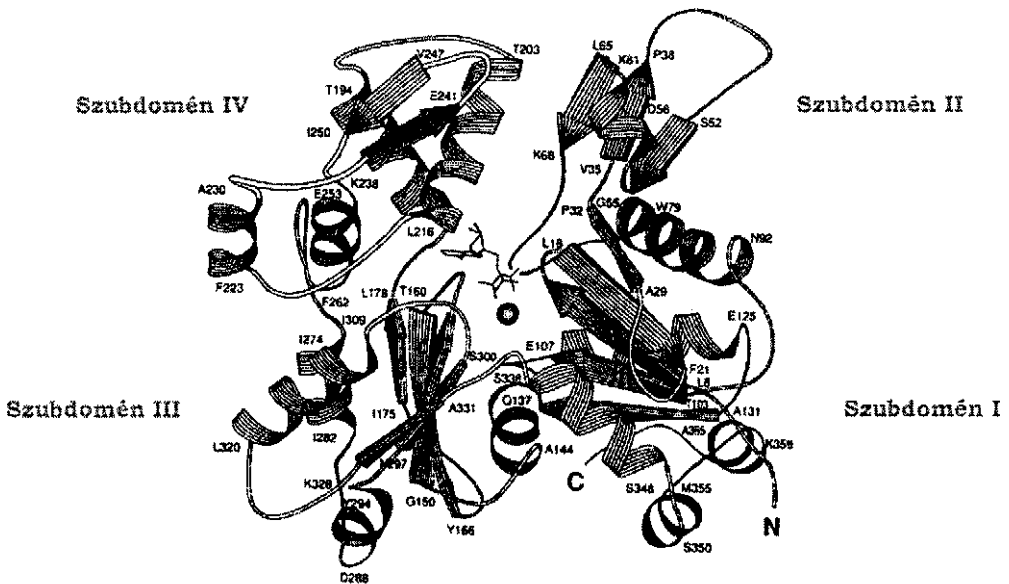
filamentum átlagos hossza így nem változik, mégis egy folyamatos dinamikus mozgás van jelen (dinamikus egyensúly). Az elméletet sikerült igazolni *in vivo* körülmények között is (Wegner, 1976).

1981-ben sikerült először aktin monomereket kristályosítani a röntgen-diffrakciós vizsgálatokhoz (Suck, 1981). A kristályszerkezet 6 Å-ös felbontásban adta vissza az aktin térszerkezetét, amely igazolta az aktin két nagyobb alegységből való felépítését.

1990-ben az aktin térszerkezetét 2,8 Å-ös felbontásban is meghatározták (Kabsch et al., 1990), amelyet további szerkezetek követtek (McLaughlin et al., 1993; Schutt et al., 1993). Az F-aktin modellszerkezetét először 1990-ben készítették el (Holmes et al., 1990; Milligan et al., 1990). Az eddigi legrészletesebb aktin-filamentum modellszerkezet 1993-ban, röntgen-diffrakciós és elektron mikroszkópai eredmények alapján készült (Lorenz et al., 1993).

I.1.2 Az aktin szerkezete

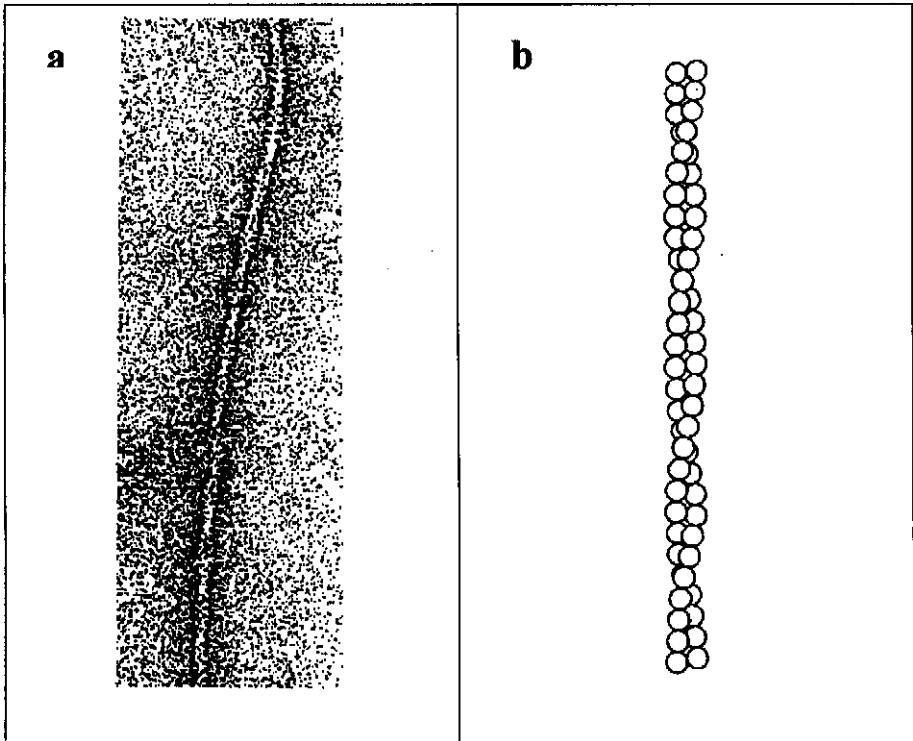
Az aktin egy 43 kDa molekulatömegű globuláris fehérje (1. ábra). Két fő doménből áll, melyek között egy hasadékbán helyezkedik el a nukleotid-, valamint a kation-kötő felszín (Kabsch et al., 1990). E két domén két polipeptid lánc szakasszal, a domének alján kapcsolódik össze, biztosítva ezzel azok egymáshoz viszonyított mozgását. A doméneket összekapcsoló régiót „hinge” vagy csuklópánt régióknak is nevezik. Az atomszerkezet meghatározása előtti tanulmányokban a doméneket nagy és kis doméneknek nevezték el annak ellenére, hogy tömegük közelítőleg megegyezik. A két domént a későbbiekben további szubdoménekre osztották fel: a kis domént szubdomén I és II-re, míg a nagy domént szubdomén III és IV-re (1. ábra). A „hinge” régió az N-, illetve C-terminális közelében helyezkedik el, amelyek a szubdomén I szomszédságában találhatóak.



1. ábra

Nyúl vázizomból származó G-aktin szalagmodellje. Az ábrán a kötött ATP (pálcika modell), illetve a kation (gömb) térbeli elhelyezkedése látható (Kabsch et al., 1990) (Protein Data Bank kód: 1ATN).

Az aktin filamentum szerkezetét először elektron-mikroszkópiás felvételek alapján határozták meg (2.a ábra) (Huxley, 1972).



2. ábra

(a) Az aktin filamentum elektronmikroszkópos felvétele (Huxley, 1972). (b) Az aktin filamentum sematikus szerkezete (a gömbök az aktin protomereket jelölik).

Az aktin filamentum a polimerizáció során az aktin monomerek összekapcsolódásával létrejött bal menetű hélix (Moore et al., 1970) (2.b ábra). A filamentum egy teljes periódusának hossza 72 nm. Egy teljes periódus 26 protomerből áll, ahol a protomerek 12 teljes fordulattal rendelkeznek a filamentumban. Egy monomer filamentumba való beépülésével a filamentum hossza 2,77 nm-rel nő meg (Squire, 1981). Mivel egy filamentumban lévő protomer elfordulása az előző protomerhez képest nagy (166°), és mivel meghatározott protomer-protomer kapcsolat van az egymással sztérikus

kapcsolatban álló, de egymást közvetlenül nem kötő protomerek között is. Így a filamentum egy 72 nm-es periódushosszal rendelkező két-szálú jobb menetes hélixnek is tekinthető. Az 1990-es években az aktin filamentum atomszerkezeti modelljét az elektronmikroszkópos felvételek (Holmes et al., 1990), és a röntgenkristallográfiás eredmények (Lorenz et al., 1993) alapján határozták meg (3. ábra).



3. ábra

Az aktin filamentum atomszerkezeti modellje (az egyes protomereket (Kabsch et al., 1990) különböző színek jelölik) (Holmes et al., 1990; Lorenz et al., 1993). (Az ábra a heidelbergi Max Planck Institute for Medical Research honlapjáról származik)

Mivel az aktin monomerek aszimmetrikusak (1. ábra), ezért a filamentum két vége eltérő szerkezetű („pointed end” és „barbed end”). A molekula 1. ábrán feltüntetett orientációjában a molekula alján elhelyezkedő szubdomén I és III felel meg a polimerizáció során kialakuló „barbed end”-nek. A filamentumban a szubdomén III és IV található a filamentum tengelye felé, míg a szubdomén I és II a tengelytől távolabbi pozíciókba rendeződik (Holmes et al., 1990; Miki et al., 1992).

Az atomi modell egyértelműen alátámasztja azt az elképzelést, amely szerint a filamentum két szála között jelentős protomer-protomer kölcsönhatás alakul ki. Az ilyen jellegű kapcsolatok a hosszú polimer szerkezetek esetében a szerkezeti stabilitás biztosításához elengedhetetlenek. A filamentum hossz tengelye irányában a protomerek közötti kölcsönhatás erősebb, mint a filamentum keresztirányában (Holmes et al., 1990). A protomerek oldalirányú, illetve hosszirányú összekapcsolódása a nukleotid kötésétől függetlennek bizonyult (Nonomura et al., 1975). Hasonló eredményre jutottak az aktin ADP.P_i molekulákat kötő állapotának vizsgálatával is (Orlova and Egelman, 1992).

A filamentum felépülése során megkülönböztetjük a nukleációs szakaszt, amely során néhány monomer dimerekké, vagy trimerekké kapcsolódik össze, illetve az elongációt, amikor a kialakult szerkezetekhez további monomerek kapcsolódnak, és oligomereket, majd hosszú polimereket építenek fel. A polimerizáció során beáll egy egyensúly, ahol a filamentum hossza már nem változik. Ebben az állapotában a filamentum dinamikus egyensúlyban van, és a „barbed end”-en a monomerek nettó asszociációja, míg a „pointed end”-en a monomerek nettó disszociációja jellemző. Ezt a folyamatos mozgást „treadmilling”-nek (taposómalom) nevezik. A „treadmilling” eredményeképpen a filamentumok mellett mindig található egy monomer aktin populáció, amit az ún. kritikus koncentrációval jellemeznek. A kritikus koncentrációnál alacsonyabb aktin koncentráció mellett az aktin nem képes filamentummá szerveződni. A kritikus koncentráció értéke függ a környezeti tényezőktől, illetve a monomerek nukleotid- és kation-kötésétől is.

Az aktin egyaránt képes monovalens, illetve bivalens kationok megkötésére (Estes, 1992). Az aktin monomer két doménje közötti nagy affinitású kation-kötő felszín mellett található még további három, kisebb affinitású kation-kötő régió is. A nagy affinitású kötéshely a kétértékű kationokhoz különböző affinitást mutat ($\text{Ca}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Sr}^{2+}$) (Loscalzo and Reed, 1976; Strzelecka-Golaszewska, 1973; Strzelecka-Golaszewska and Drabikowski, 1968; Strzelecka-Golaszewska et al., 1978), míg a többi, kisebb affinitású kation-kötő hely hasonló erősséggel köti a vizsgált kationokat (Carlier et al., 1986).

Az aktin a sejten belül fiziológias körülmények között Mg^{2+} -mal van telítve (Kopp et al., 1990; Kushmeric et al., 1986; Tsien et al., 1982). Ugyanakkor a Ca^{2+} jól stabilizálja

a monomer szerkezetét és laboratóriumi körülmények között általában e kation jelenlétében állítják elő az aktint. Az aktin Ca^{2+} -mal telített formájában a kritikus koncentráció értéke 10-szer nagyobb, mint Mg^{2+} -mal telített állapotában (Carlier et al., 1986; Kinoshita et al., 1991; Martonosi et al., 1964). A Ca^{2+} -aktin nukleációja nagyságrendekkel lassabb, mint a Mg^{2+} -aktiné (Tobacman and Korn, 1983), ugyanakkor a két ionnal mért elongációs sebesség közel azonos (Gershman et al., 1989).

Az aktin filamentumhoz kapcsolódó monomerekben ATP hidrolízis zajlik, ami két egymást követő lépésre bontható (Carlier, 1989): (i) az ATP β - γ foszfoészter kötésének felhasadása (a sebességi állandó értéke $20\text{ }^\circ\text{C}$ -on $0,035\text{ s}^{-1}$) (Melki et al., 1996); (ii) az anorganikus foszfát (P_i) fehérjéből történő lassú felszabadulása ($0,0026\text{ s}^{-1}$) (Melki et al., 1996). Az aktin polimerációjához az ATP nukleotid nem feltétlenül szükséges, a filamentum ADP jelenlétében is létrejön. Az ADP filamentum szerkezete flexibilisebb, stabilitása kisebb, mint az ATP-filamentumé (Carlier, 1991; Isambert et al., 1995; Nyitrai et al., 2000; Pollard et al., 1992). Kinetikai tanulmányok során igazolódott, hogy a filamentumok ATPáz aktivitása a filamentumok destabilizálódását is eredményezi (Pollard et al., 1992). Az ATPáz mechanizmus során a P_i filamentumból való kiszabadulása okozza a filamentum dinamikai változását, míg a foszfoészter kötés felhasadása ilyen jellegű változást nem eredményez (Carlier et al., 1988).

Az ATP hidrolízis és a filamentum növekedésének mechanizmusa összekapcsolódik, aminek következtében a filamentumok „barbed end”-jén mindig található egy ATP nukleotidokat kötő protomer szakasz (ATP „sapka”) (Carlier, 1991). Az ATP β - és γ -foszfátja koordinálja a Ca^{2+} iont a gelzolin-aktin kristályszerkezetében (McLaughlin et al., 1993), amely ion a sejtekben valószínűleg Mg^{2+} ionra cserélődik. Ahogy azt egy másik metalloenzim, a DNS polimeráz I esetében már sikerült meghatározni (Fothergill et al., 1995), valószínűleg az aktin esetében is fenn áll, hogy a kötött ion kulcsszerepet játszik a foszfoészter kötés hidrolízisében (Estes et al., 1992).

I.2 Aktin-kötő, kis molekulású peptidszármazékok

Napjainkban számos olyan kis molekulású peptidszármazék ismert, amely az aktin citoskeletonhoz képes kötődni, vagy pedig aktin-kötő fehérjékhez való kötődése során az aktin filamentum dinamikájának megváltozását idézi elő (Fenteany and Zhu, 2003). Az ilyen jellegű kölcsönhatások vizsgálata iránt a sejtbiológia, valamint biokémia kimagasló érdeklődést mutat. Az érdeklődés oka az, hogy az ilyen jellegű molekulák funkcionális vizsgálata során olyan vegyületre bukkanhatnak, amely akár egy tumor ellenes gyógyszer fejlesztése során alkalmas kiinduló vegyület lehet.

Az aktinhoz közvetlenül kötődni képes molekulák hatására nagymértékű változások következnek be a sejt alakjában, mozgásában, a sejtosztódásban, az endocitózis és exocitózisban, és egyéb, az aktin citoskeleton által ellátott funkciókban (Cooper, 1987; Fenteany and Zhu, 2003; Spector et al., 1999). Az aktinhoz közvetlenül kötő molekulák két nagy csoportba sorolhatók: (i) amelyek az aktin filamentum felépülését különböző mechanizmusok útján meggátolják, vagy a filamentum destabilizálódását eredményezik, és (ii) amelyek stabilizálják a filamentumot, és az aktin polimerizációját idézik elő.

Egy az aktin filamentumot stabilizáló, és a polimerizációt elősegítő ciklikus toxin a *phalloidin* (Löw and Wieland, 1974). E részletesen tanulmányozott molekula hatása eltér az aktin-kötő fehérje molekulák hatásától. A phalloidin kötőhelye a filamentumon a protomerek közti résben található (Barden et al., 1987; Faulstich et al., 1993; Steinmetz et al., 1998) ott, ahol a legtöbb aktin-kötő fehérjének nincs kötőfelszíne. A phalloidin fluoreszcens származékai (Wulf et al., 1979) így lehetőséget nyújtanak az aktin-kötő fehérjék funkcionális vizsgálataira, vagy az aktin citoskeleton láthatóvá tételére. Ez a toxikus vegyület ugyanakkor *in vivo* körülmények között nem képes a sejtmembránon keresztül a sejtbe jutni, így alkalmazásakor a sejtmembrán permeabilizálása szükséges, ami élő sejten való vizsgálatok esetén hátrányt jelent.

A *jasplakinolide* aktin filamentumot stabilizáló és polimerizációt serkentő toxin, amely az aktinhoz a phalloidinnal versengve kötődik. A jasplakinolide és a phalloidin számos tulajdonságában hasonló, míg más tekintetben eltérő hatást fejt ki az aktin filamentumra. A jasplakinolide-et mint ígéretes tumor ellenes alapanyagot tanulmányozták

a korábbiakban, hiszen számos rákos sejtben, például humán prosztatata és emlőrákban, valamint mieloid leukémia esetén citotoxikus hatást mutatott (Senderowicz et al., 1994; Stingl et al., 1992). A jaspalakinolide számára - szemben a phalloidinnel - a sejtmembrán permeábilis (Senderowicz et al., 1994; Stingl et al., 1992), így használatakor nem szükséges mikroinjektálás, vagy a sejtmembrán detergenssekkel való roncsolása. (Senderowicz et al., 1994; Stingl et al., 1992). A jaspalakinolide ezen tulajdonsága előnyt jelent az *in vivo* kísérletekben.

A jaspalakinolide-et azért választottuk kutatásunk tárgyává, mert alkalmazása esetén hatásának részletes ismerete elengedhetetlen, és a későbbiekben esetleges fluoreszcens származékainak előállításával szélesebb körű alkalmazására is lehetőség nyílhat.

1981; Faulstich et al., 1977; Schafer et al., 1975). A phalloidin gátolja az aktin ATPáz működése során képződő foszfát disszociációját (Dancker and Hess, 1990).

A phalloidin az aktin monomerekhez nem kötődik. A toxin filamentumhoz kötődése ezek alapján valószínűleg két vagy több protomerhez történő egyidejű kapcsolattal valósul meg. „Cross-linking” (keresztkötéses) vizsgálatokkal kimutatták, hogy a phalloidin kapcsolatban áll az aktinban a Met¹¹⁹, a Met³⁵⁵ és a Glu¹¹⁷ aminosavakkal. Kapcsolódik továbbá a Cys¹⁰ és Cys³⁷⁴ között kialakuló diszulfid hídhoz is (Faulstich et al., 1992; Nagashima and Asakura, 1980; Vandekerckhove et al., 1985), amely a szubdomén I hátsó felszínén található (1. ábra).

A phalloidin filamentumon belüli feltételezett kötőhelyét később molekulamodellizációs módszerrel határozták meg (Lorenz et al., 1993). A modellezés eredményei összhangban vannak a biokémiai megfigyelésekkel. A modellezés azt mutatta, hogy a toxin egy három protomer által kialakított zsebben helyezkedik el, ahol a phalloidin triptofánja az egyes protomerek aromás triptofánjai közé orientálódik.

A phalloidin ugyanakkor nem köt a *Tetrahymena*-ból (csillós egysejtű) származó aktinhoz, ami arra utal, hogy ez utóbbinak a szerkezete eltér a vázizomból származó aktin szerkezetétől. A szekvenciák analízise azt mutata, hogy bár 74,6 % azonosság van a *Tetrahymena* és a vázizom aktin között. A 190-200 szekvencia szakaszon ezen aktinok eltérnek egymástól. Ezek az aminosavak a vázizom aktinban hidrofilek, míg a *Tetrahymena* aktinban hidrofób tulajdonságúak. Élesztőből származó aktin filamentumon kimutatták, hogy kettős mutációt alkalmazva (R177A/D179A) az aktinban a fluoreszcens-phalloidin nem kötődik az aktinhoz (Drubin et al., 1993). Az Arg¹⁷⁷ és Arg¹⁷⁹ aminosavak oldalláncai a phalloidin tömegközéppontjától mérve 6 Å távolságban helyezkednek el mind a Lorenz, mind pedig a Holmes modell szerint. Mivel a phalloidin molekula mérete éppen 6 Å körül van, ez a megállapítás nyitva hagyja annak a lehetőségét, hogy kapcsolat legyen a phalloidin valamint az Arg¹⁷⁷ és/vagy Arg¹⁷⁹ aminosavak között (Schuler et al., 2000). Ugyanakkor az Arg¹⁷⁷ aminosav szerepe a phalloidin kötésében valószínűtlen, mert R177D aminosav cserét alkalmazva a phalloidin bekötése, és stabilizáló hatása változatlan marad (Schuler et al., 2000). Ezt a következtetést támasztja az is alá, hogy az Arg¹⁷⁷ közvetlen kölcsönhatásban áll a szomszédos protomer Ser¹⁹⁹-es aminosavjával. Bár a Met¹¹⁹, a Gln¹¹⁷ és Met³⁵⁵

aminosavak kölcsönhatnak a phalloidin egyes származékaival (Vandekerckhove et al., 1985), a phalloidin-aktin komplex alapján megállapítható térpozíciójuk túl távoli a phalloidin megkötéséhez.

A phalloidin kötőhelye három protomer között kialakuló zsebben helyezkedik el (Barden et al., 1987; Faulstich et al., 1993; Steinmetz et al., 1998). A phalloidin gyorsítja a nukleációt (dimerek és trimerek képzése), és a polimerizációt (Wendel and Dancker, 1987). Az aktin vizsgálata során megfigyelték, hogy a filamentum egyik szálában lévő szubdomén IV és a vele ellentétes szálban lévő szubdomén I képesek egymás konformációjának megváltoztatására (Orlova and Egelman, 1992; Orlova and Egelman, 1995; Wendel and Dancker, 1987). A két szál közötti kapcsolat fontos szerepet tölt be a filamentum stabilitásában. Nem meglepő tehát, hogy a phalloidin a két filamentumszál összekapcsolásával hatékonyan növeli a filamentum egészének a stabilitását.

Egyes tanulmányok (Faulstich et al., 1993; Vandekerckhove et al., 1985) arra mutatnak rá, hogy a phalloidin Leu(OH)⁷ oldallánca az aktinból kifelé orientálódik. Ezt a megfigyelést arany-klaszterhez kötött phalloiddinnel végzett elektron-mikroszkópiai vizsgálatok eredményei is igazolták (Steinmetz et al., 1998).

Wriggers és Schultern (Wriggers and Schulten, 1999) molekuladinamikai tanulmányok során arra a következtetésre jutott, hogy a metilezett-His⁷³ és Arg¹⁷⁷ aminosavaknak töltöttnek kell lenniük ahhoz, hogy az aktinról a foszfát disszociálhasson. Ez arra utal, hogy a foszfát disszociáció mechanizmusában ezen aminosavak szerepet játszanak. Bár mint fent tárgyaltuk, az Arg¹⁷⁷ aminosav szerepe a phalloidin kötésében valószínűtlen, a kötött phalloidin egyes megfigyelések szerint gátolja a foszfát disszociációját (Dancker and Hess, 1990). E tekintetben ugyanakkor nem egységes az álláspont, mivel újabb biokémiai eredmények nem támasztják alá ezeket a megfigyeléseket (Nyman et al., 2002).

Korábban a phalloidin-aktin komplex szerkezetét a phalloidin-aktin filamentum komplexből származó diffrakciós adatok alapján modellezés segítségével határozták meg (Lorenz et al., 1993). Napjainkban napvilágot látott egy tanulmány, amelyben diffrakciós adatok alapján közvetlenül határozták meg a kötött phalloidin radiális pozícióját, majd számítással az axiális és azimutális pozíciókat, illetve a phalloidin orientációját (Oda et al., 2005). Az így meghatározott aktin filamentumhoz kötött phalloidin szerkezet hasonlít

a Lorenz és munkatársai (Lorenz et al., 1993) által meghatározott szerkezetéhez. A phalloidin kötőhely az aktin filamentumban közel helyezkedik el az alsó protomer 198-201-es hurokjához, valamint a diagonális protomer 73-75 valamint 179-es aminosavaihoz, és távolabb van a felső protomertól (5. ábra) (Oda et al., 2005).

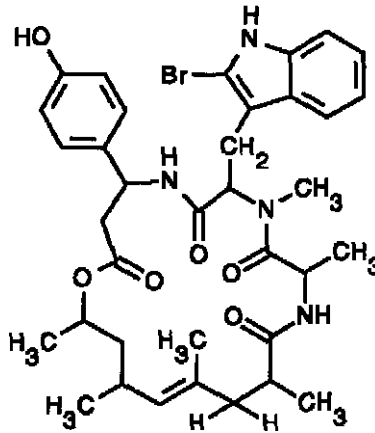


5. ábra

Oda és munkatársai által meghatározott, az aktin felszínén kötött phalloidin térpozíciója (Oda et al., 2005) (sztereo ábra). A három protomer között elhelyezkedő phalloidint elektron denzitásának megfelelően jelöli az ábra. A kölcsönhatásban részt vevő 73, 177, 179, és 196-200 aminosavakat gömb és pálca modell mutatja.

I.2.2 Jasplakinolide

A jasplakinolide a *Jaspis johnstoni*-ban (egy tengeri szivacsban) előforduló citotoxikus hatású peptid. Háromtagú gyűrűs szerkezete 15 szén atomból áll, amelyek három aminosavat (L-alanin, N-metil-2-bróm-triptofán, és β -tirozin) alkotnak (Crews et al., 1986) (6. ábra).



6. ábra A jasplakinolide szerkezete

In vitro körülmények között a jasplakinolide kötődik az aktin filamentumhoz ($K_d = 15$ nM) és depolimerizációs környezetben (pl. alacsony sókoncentráció mellett) is stabilizálni képes a filamentum szerkezetét (Bubb et al., 2000). Ezzel összhangban a jasplakinolide gyorsítja az aktin polimerizációját (Bubb et al., 1994). Ezen hatása olyan erős, hogy még nem polimerizáló körülmények között is polimerizációra készíti az aktint. Míg a phalloidin stabilizálja az aktin oligomereket, a jasplakinolide hasonló hatást nem mutat (Spector et al., 1999). A jasplakinolide Mg^{2+} -aktinra gyakorolt stabilizáló hatása erősebb, mint Ca^{2+} -aktinra (Estes et al., 1981). Prosztataraák sejtekben *in vivo* kísérletekkel igazolták, hogy a jasplakinolide képes a rodamin-phalloidint leszorítani az aktin filamentumról, ami valószínűsíti azt, hogy a két toxikus peptid kötőhelye az aktin filamentumon egybeesik, vagy ezen kötőhelyek nagymértékű átfedést mutatnak

(Senderowicz et al., 1995). Ugyanakkor a jasplakinolide *in vivo* körülmények között elősegíti az aktin filamentumok feldarabolódását, megváltoztatva ezzel a citoskeleton szerkezetét (Senderowicz et al., 1995; Spector et al., 1999). Ez a jelenség feltehetőleg a jasplakinolide aktin filamentumra gyakorolt szekunder hatásában rejlik, amely valószínűleg az aktin , illetve egyes aktin-kötő fehérjék szintézisének keresztül valósulhat meg (Bershadsky et al., 1995).

II. Célkitűzések

Munkánk során az alábbi célokat tűztük ki:

1. Az aktin filamentum dinamikájában phalloidin és jasplakinolide kötésének hatására bekövetkező változások leírása és azok összehasonlítása fluoreszcencia spektroszkópia alkalmazásával.
2. A toxinok hatása alatt álló, illetve a toxinmentes filamentum termodinamikai jellemzőinek meghatározása, és összehasonlítása kalorimetria segítségével.
3. Az aktin filamentum jellemzése szubsztöichiometrikus toxinkoncentrációk esetén.
4. A toxinok által kiváltott allosztérikus hatás kvantitatív modellel történő leírása.

III. Anyagok és módszerek

III.1 Felhasznált anyagok

A kísérletek során felhasznált anyagok az alábbi forrásokból származtak: kálium-klorid (KCl), magnézium-klorid ($MgCl_2$), kalcium-klorid ($CaCl_2$), nátrium-hidroxid (NaOH), 3-(*N*-morfolin)propán (MOPS), tris-(hidroxi-metil)amino-metán (TRIS), N-(((iodoacetyl)amino)etil)-5-naftilamin-1-szulfonát (IAEDANS), akrilamid, transzglutamináz, dimetilformamid (DMF) és phalloidin; Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO, USA). 5-(iodoacetamid)fluoreszcein (IAF), fluoreszcein cadaverin (FC), jaspilakinolide; Molecular Probes (Eugene, OR, USA). ATP, 2-merkaptóeanol, dimetilformamid (DMF); MERCK (Darmstadt, Germany), nátrium-azid (NaN_3); Fluka (Svájc).

III.2 Az aktin preparálása

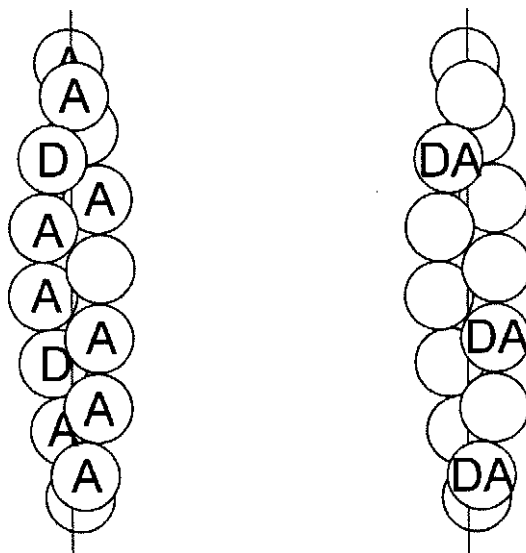
A munka során nyúl vázizomból származó aktint használtunk, melynek előállítását két lépésben történik. Elsőként az ún. acetonszuszpenzió készül el (Feuer et al., 1948), amely $-20\text{ }^\circ\text{C}$ -on hónapokig tárolható. A második lépésben, közvetlenül a kísérletek előtt az acetonszuszpenzióból történik az aktin izolálása (Spudich and Watt, 1971). Az izolálás során az aktin az alábbi pufferben volt (A puffer): 2 mM Tris/HCl, 0,2 mM ATP, 0,1 mM $CaCl_2$, 0,005 % NaN_3 , 0,5 mM 2-merkaptóeanol, pH 8,0. Az aktin polimerizálása 100 mM KCl és 2 mM $CaCl_2$, vagy $MgCl_2$ hozzáadásával történt a megfelelő aktin filamentum kialakításához. Mg^{2+} -aktin filamentum esetén a monomerben Ca^{2+} - Mg^{2+} ioncserére volt szükség, amelyet a polimerizálás előtt 0,2 mM EGTA és 0,1 mM $MgCl_2$ (végkoncentrációk) hozzáadásával végeztünk (Strzelecka-Golaszewska et al., 1993).

III.3 Az aktin fluoreszcens jelölése

Az aktin Cys³⁷⁴ aminosavát IAEDANS-szel az alábbi módon jelöltük: Polimerizáció után a 2 mg/ml koncentrációjú aktint szobahőmérsékleten inkubáltunk 10-szeres moláris túlsúlyban lévő IAEDANS-szel, fénytől védve (Miki et al., 1987). A reakciót MEA 10-szeres moláris feleslegben való hozzáadásával állítottuk le, majd a mintát 100 000 x g-n, 2 órán át, 4 °C-on centrifugáltuk. A pelletet duzzasztás után homogenizáltuk, majd éjszakán át A pufferrel szemben dializáltuk.

Az aktin Cys³⁷⁴ aminosavát IAF-fel a következőképpen jelöltük: 2 mg/ml koncentrációjú monomer aktinhoz 15-szörös moláris túlsúlyban IAF-et adtunk. Az IAF-et előzőleg 0,1 N-os NaOH-ban oldottuk fel, majd a pH érték - HCl oldattal való - szinten tartása mellett adtuk a mintához. A mintát a jelölővel 16 órán át 4 °C-on inkubáltuk. A mintát 100 mM KCl-dal és 2 mM MgCl₂-dal 2 órán keresztül szobahőmérsékleten polimerizáltuk, majd 100 000 x g-n, 2 órán át, 4 °C-on centrifugáltuk. A pelletet duzzasztás után homogenizáltuk, majd éjszakán át A pufferrel szemben dializáltuk.

A IAEDANS-aktin Glu⁴¹ aminosavat FC-nel az alábbiak szerint jelöltük: 2 mg/ml monomer IAEDANS-aktinhoz 15-szörös moláris feleslegben FC-t, valamint 1 mg/ml koncentrációban transzglutaminázt adtunk (végkoncentrációra számolva), majd 16 órán át inkubáltuk fénytől védve, 4 °C-on. A FC-t előzőleg DMF-ben oldottuk fel úgy, hogy a DMF térfogataránya a mintában 0,6 %-nál nem volt nagyobb (Takashi, 1988). A mintát polimerizáltuk, majd az előzőekben leírt módon centrifugálás, duzzasztás és homogenizálás után A pufferrel szemben dializáltuk.



7. ábra

Az (a) intermonomer és az (b) intramonomer FRET mérések során alkalmazott donor-akceptoros minták sematikus ábrája. Az ábrán a csak donorral (D) vagy csak akceptorral (A), valamint a donorral és akceptorral egyaránt jelölt (DA) protomereket tüntettük fel.

Azokban a mérésekben, ahol a donor és az akceptor különböző aktin monomereken volt a filamentumokban, a filamentumon belül kialakuló monomerek közötti, ún. *intermonomer* flexibilitást tanulmányoztuk. Azon méréseinkben, ahol ugyanazon monomer volt megjelölve mind a donorral, mind az akceptorral, a filamentumokban a protomereken belüli, ún. *intramonomer* flexibilitás leírása volt a célunk.

Az *intermonomer* flexibilitás mérésekhez a donor-jelölt (IAEDANS-jelölt) aktin monomereket 1:8 arányban akceptor-jelölt (IAF-jelölt) monomerekkel kevertük össze a donor-akceptor FRET párt tartalmazó minta készítése során, majd az aktin oldatokat polimerizáltuk (7.a ábra). A csak donort tartalmazó minta esetén a donor-jelölt aktin monomereket 1 : 8 arányban jelöletlen monomerekkel kevertük össze a polimerizálás előtt.

Az *intramonomer* flexibilitás vizsgálatokhoz a donorral és akceptorral egyaránt megjelölt aktin monomereket (IAEDANS-FC-aktin) jelöletlen monomerekkel 1 : 10 arányban kevertük össze a donor-akceptor jelölt minta esetében (7.b ábra). A csak donort

tartalmazó minta készítése során donor-jelölt aktin (IAEDANS-aktin) monomereket 1 : 10 arányban jelöletlen monomerekkel kevertünk össze. A minták végkoncentrációja 20 μM volt.

III.4 A fehérjekoncentráció és a jelölési arány meghatározása

Az aktin és az alkalmazott fluorofórok koncentrációját Shimadzu UV-2100 típusú spektrofotométer segítségével határoztuk meg. A koncentrációk az extinkciós koefficiensek ismeretében a Lambert-Beer törvény alapján meghatározhatók:

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

ahol I_0 és I az oldatba belépő, illetve az onnan kilépő fénysugár intenzitásai, A az abszorbancia, ϵ az extinkciós koefficiens, x a fénysugár oldatban megtett úthossza, míg c az oldott anyag koncentrációja. A koncentráció meghatározás során az alábbi extinkciós értékeket használtuk: G-aktin ($\epsilon_{280 \text{ nm}} = 1,11 \text{ ml mg}^{-1} \text{cm}^{-1}$), IAEDANS ($\epsilon_{336 \text{ nm}} = 6100 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$), IAF ($\epsilon_{496 \text{ nm}} = 77000 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$), FC ($\epsilon_{493 \text{ nm}} = 77500 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$).

III.5 „Steady-state” fluoreszcencia spektroszkópia

A „steady-state” fluoreszcencia kísérleteket egy termosztálható mintatartóval ellátott Perkin-Elmer LS50B típusú spektrofluoriméterrel végeztük. Az aktint a hozzá kovalensen kötött *extrinsic* fluorofórok segítségével vizsgáltuk. Külső fluorofórként olyan molekulákat választottunk, amelyek szelektíven köthetők az aktin meghatározott aminosavához (a Cys³⁷⁴ vagy a Glu⁴¹ aminosavakhoz), a fehérje tulajdonságait csak elhanyagolható mértékben változtatják meg, illetve spektrális tulajdonságaik miatt a FRET mérésekhez donor-akceptor párt alkotnak. A kiválasztott fluorofórok, az IAEDANS, IAF és FC mindegyike eleget tesz ezen kritériumoknak, továbbá a

fluoreszcencia spektroszkópia technikában széles körben elterjedt, rutinszerűen használt molekulák. A IAEDANS emissziós spektrumát 350 nm hullámhosszúságú fényvel való folyamatos gerjesztés mellett, a 420 - 470 nm hullámhossztartományon detektáltuk. Az alkalmazott fluorofórok spektrális paramétereit a 1. táblázat foglalja össze.

<i>fluorofór</i>	$\lambda_{Ex} (nm)$	$\lambda_{Em} (nm)$
IAEDANS	350	490
FC	493	517
IAF	490	515

1. táblázat

Az alkalmazott fluorofórok gerjesztési (λ_{Ex}) és emissziós (λ_{Em}) maximum értékei.

A hullámhosszakat monokromátorral választottuk ki. A gerjesztési és az emissziós rés mérete 5 nm, a spektrum felvételének sebessége 300 nm/perc volt. A hőmérséklet értékét a küvetatartóban mértük, és 6-36 °C-os tartományon változtattuk.

A spektrumokat korrigáltuk az ún. „inner filter” effektusra, amely a minta ön-abszorpciójából ered. Figyelembe véve a küvetta és fénynyaláb geometriai elrendezését, 1x1 cm-es fényúttal rendelkező küvetta esetében a következő összefüggést alkalmaztuk:

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

ahol az F_{kor} és F_{obs} a korrigált és mért intenzitásokat, az OD_{ex} és OD_{em} a gerjesztési, illetve az emissziós hullámhosszakon, az abszorpciók értékét 1 cm-es fényútra vonatkoztatva.

III.6 Fluoreszcencia rezonancia energia transzfer (FRET)

Fluoreszcencia rezonancia energia transzfer (FRET) meghatározott spektrális jellegű és térbeli elhelyezkedésű fluorofór párok között jöhet létre. A transzfer során a gerjesztett állapotú fluorofór (donor molekula) energiát ad át egy másik (vagy több másik) fluorofórnak. Ez az energiaátadás ún. „szinglet” állapotok között, foton emissziója nélkül jön létre. A molekulák között ütközéses kölcsönhatás nem jön létre, és a folyamat során hő nem keletkezik. A transzfer létrejöttének feltétele, hogy i.) a fluorofórok 1-10 nm távolságban helyezkedjenek el egymástól, ii.) a donor emissziós és az akceptor abszorpciós spektruma átfedést mutasson, iii.) a donor kvantumhatásfoka megfelelően nagy legyen, iv.) a donor emissziós, és az akceptor abszorpciós vektora kedvező szöget zárjon be egymással.

A FRET hatásfok az alábbi egyenlettel határozható meg a donor fluoreszcencia intenzitásának ismeretében:

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

ahol F_{DA} a donor akceptor jelenlétében, és F_D a donor akceptor nélkül mért fluoreszcencia intenzitása. A FRET alkalmazása során lehetőség van a donor és az akceptor molekulák távolságának (R) meghatározására (Förster, 1948). Definíció szerint R_0 az a távolság, amelynél az energia transzfer hatásfoka 0,5. A transzferhatásfok, valamint az R_0 ismeretében a fluorofórok távolsága (R) az alábbi összefüggéssel határozható meg:

$$E = R_0^6 / (R_0^6 + R^6) \quad (4)$$

A fenti paramétereiből származtatható egy újabb FRET paraméter, a normált FRET hatásfok (f'), amely definíció szerint a FRET hatásfoknak és a donor akceptor jelenlétében mért fluoreszcens intenzitásának a hányadosa (Somogyi et al., 1984):

$$f' = E / F_{DA} \quad (5)$$

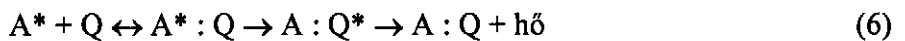
Munkánk során célunk volt a fehérje különböző állapotainak flexibilitásáról információkat szerezni, ezért hőmérsékletfüggő FRET kísérleteket végeztünk.

Az f' paraméter a donor és az akceptor közötti távolság eloszlásának kiszélesedésével van összefüggésben, ezért az f' érték hőmérsékleti profilja a donor és akceptor közötti fehérjemátrix flexibilitására jellemző. Ez a módszer akkor alkalmazható, ha a fehérjemátrixban konformációs változás nem következik be, illetve ha a donor és az akceptor átlagos távolsága nem változik. Ekkor az f' paraméter hőmérséklet-függésének tendenciája a fehérje két pontja közötti térrész flexibilitásáról ad információt. Ha nagyobb az f' hőmérsékletfüggésének a meredeksége, akkor flexibilisebb a donor és az akceptor közötti fehérjemátrix.

III.7 Fluoreszcencia kioltás

A gerjesztett fluorofór energiáját több különböző mechanizmus útján adhatja le. Ezek a következők szerint csoportosíthatók: radiatív (foton), azaz elektromágnesen hullám kibocsátásával járó folyamatok, illetve nem-radiatív, hő kibocsátásával járó folyamatok. A radiatív lecsengési folyamatokat, vagy lumineszcencia folyamatokat tovább bonthatjuk fluoreszcenciára, illetve foszforeszcenciára annak megfelelően, hogy milyen energiaállapotból kiindulva jön létre az elektromágneses hullámok kibocsátása.

A fenti folyamatok kiegészülnek abban az esetben, amikor a rendszerbe speciális, ún. kioltó molekulák vannak jelen (Q). Ezek a molekulák speciális elektronszerkezetük révén ütközve a fluorofórral annak fluoreszcenciáját kioltják. Ezt az esetet írja le az alábbi séma:



ahol A^* és A a gerjesztett, illetve alapállapotban lévő fluorofór molekula.

A fluoreszcencia kioltási kísérletekben akrilamid kioltó jelenlétében vizsgáltuk az IAEDANS-jelölt aktin filamentumok fluoreszcencia intenzitását a kioltó koncentrációjának függvényében. A kioltási kísérletek eredményei információt szolgáltathatnak a fluorofór környezetének szerkezetéről, dinamikájáról, illetve a fluorofór oldat felé mutatott hozzáférhetőségét illetően. A kioltás hatékonysága jellemezhető a klasszikus Stern-Volmer egyenlet alkalmazásával (Lakowicz, 1983):

$$F_0 / F = 1 + K_{SV} [Q] \quad (7)$$

ahol K_{SV} a Stern-Volmer kioltási állandó, F_0 a fluorofór fluoreszcencia intenzitása a kioltó nélkül, míg F a fluoreszcencia intenzitás $[Q]$ koncentrációjú kioltó jellétében. Továbbá:

$$K_{SV} = k_+ \tau_0 \quad (8)$$

ahol k_+ a bimolekuláris sebességi állandó, amely a fluorofór és a kioltó molekula közötti relatív transzportot jellemzi. A k_+ érték információt szolgáltat a fluorofór oldat felé mutatott hozzáférhetőségéről.

A kioltási kísérletek során az akrilamid törzsoldat koncentrációja 2 M volt. A törzsoldatokat közvetlenül a mérések előtt készítettük. A méréseket 20 °C-on végeztük.

III.8 Differenciális pásztázó kalorimetria (DSC)

A természetben végbemenő folyamatok során az anyag belső szerkezetének változása meghatározott törvényszerűségek szerint zajlik. Egy adott biológiai rendszer állapothatározói (nyomás, hőmérséklet, térfogat, koncentráció, stb.) a rendszer energiaállapotáról, belső rendezettségéről, stabilitásáról tájékoztatnak. Ezeket az összefüggéseket az állapotegyenletek írják le. A fehérjék térszerkezeti stabilitása

termodinamikai módszerekkel jól vizsgálható. Ezen módszerek közül is elsősorban azok bírnak jelentőséggel, amelyek a rendszer folyamatos melegítése vagy lehűtése során képesek kis hőeffektusokat is mérni.

Munkánk során a differenciális pásztázó kalorimetria (DSC) kísérleteket egy SETARAM Micro DSC-II kaloriméteren végeztük. A készülék a hőáram mérés elvén működik. Egy program szerint fűthető/hűthető hőelnyelő blokkban van a mérő és a referencia cella. A mért paraméterek a mintatartó, mint hőelnyelő hőmérséklete és a minta-referencia cella közti hőmérséklet különbség. A preparátum bemérése úgy történik, hogy a két cella hőkapacitása közel azonos legyen. A programozott fűtés során így a két edény hőmérséklete azonos módon változik, hőmérséklet különbségük zérus mindaddig (a referencia a minta pufferoldata), amíg valamilyen folyamat (endo/exoterm) nem történik a makromolekula rendszert tartalmazó mérőcellában. A hőmérséklet különbség előjelétől és annak nagyságától függően vagy a mérő vagy a referencia cellába kell többlet energiát táplálnunk az eredeti fűtési program és a cellák közti termikus egyensúly fenntartása érdekében. A rendszer kimenő jelként ezt az energiát (hőáram) adja meg vagy az idő, vagy az aktuális hőmérséklet függvényében. A folyamatról közvetlenül nyerhető információ így a kimenő jel integrálja, az ún. kalorimetrikus entalpia (a cellák állandó nyomás alatt vannak). Ebből grafikus feldolgozás során az alábbiak szerint egyszerűen megkapható a minta állandó nyomásra vonatkoztatott hőkapacitása. További termodinamikai paraméterek, pedig az alábbi termodinamikai összefüggések alapján számolhatók:

$$\frac{dH}{dt} = mC_p \frac{dT}{dt} \quad (9)$$

valamint

$$\frac{dH/dt}{m dT/dt} = C_p \quad (10)$$

ahol H a kalorimetrikus entalpiaváltozás, t az idő, m a tömeg, T a hőmérséklet, valamint C_p a hőkapacitás.

Az aktin filamentum hődenaturációját 0 és 100 °C között 0,3 °C / min fűtési, illetve hűtési sebesség mellett Hastelloy cellákban követtük nyomon. A vizsgált minták tömege átlagosan 850 mg volt. Kontrollként a mért minta puffer oldata szolgált. A rendszer alapvonalának stabilitása izoterm üzemmódban $\pm 0,2 \mu\text{W}$ hibahatáron belül volt. Az aktin koncentrációja 3 mg/ml volt, a méréshez referenciaként a minta mérőpuffer oldata szolgált. Az endoterm denaturáció kalorimetrikus entalpiaváltozását (ΔH) a hőáram-hőmérséklet görbe integráljából SETARAM program segítségével határoztuk meg. A mérés során kapott hődenaturációs átmenetekhez tartozó görbékből számított entalpiaváltozás értékeket (ΔH) a denaturációs csúcsokra (T_m) illesztett Gauss-görbék területarányaiból számítottuk ki, ORIGIN 6.0 programmal. A denaturáció entrópiaváltozását (ΔS) az alábbi képlettel kaptuk:

$$\Delta S = \Delta H / T_m \quad (11)$$

ahol T_m az aktuális átmenethez tartozó gőrbemaximum hőmérséklete.

A Gibbs-féle szabad entalpiaváltozást szobahőmérsékletre számítottuk ki a következő képlettel:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (12)$$

A legegyszerűbb, kísérleti eredményekkel egyező modell szerint, a fehérje hődenaturációja egy reverzibilis denaturációt követő irreverzibilis lépés során történik (Lumry and Eyring, 1954):



ahol N és D valamint I a natúr, reverzibilisen, illetve irreverzibilisen denaturálódott fehérje konformációkat jelzi, k_1 , k_{-1} és k_2 pedig a jelzett átmenetek sebességi állandói. Mivel $k_1 \gg k_2$, és $k_{-1} \gg k_2$, így a folyamat sebességét a $D \rightarrow I$ átmenet k_2 sebességi állandója határozza meg, és a teljes folyamat irreverzibilisnek tekinthető. Ez a modell képezi az alapját annak a módszernek, amit Sanchez-Ruiz és munkatársai irreverzibilis

folyamatokra dolgozott ki (Sanchez-Ruiz et al., 1988). A k_2 állandó hőmérséklet függése az Arrhenius egyenlettel meghatározható:

$$k_2 = \exp\left[-\frac{E_A}{R}\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T^*}\right)\right] \quad (14)$$

ahol E_A az aktiválási energia, T^* az a hőmérséklet, ahol a sebességi állandó értéke egységnyi, [$k_2(T^*) = 1 \text{ s}^{-1}$], R az egyetemes gázállandó, T pedig a kelvinben mért kísérleti hőmérséklet.

Az F-aktin esetén tapasztalt irreverzibilis denaturációs csúcsok vizsgálatakor a Lumry-Eyring séma (15. egyenlet) sebességi állandóira fennáll, hogy $k_2 < k_{-1}$ valamint $k_2 < k_1$. Ebben az esetben k_2 az ún. „rate-limiting” (a teljes folyamat sebességét meghatározó) sebességi állandó, így az aktiválási energia meghatározható a hőmérséklet változtatása során számított sebességi állandó meghatározásával. Sanchez-Ruiz és munkatársai több különböző módszert írtak le az aktiválási energia meghatározására (Sanchez-Ruiz et al., 1988), amelyek közül az alábbi alkalmazzuk:

$$\ln\left[\ln\left(\frac{\Delta H_{cal}}{\Delta H_{cal} - \Delta H}\right)\right] = \frac{E_A}{R}\left(\frac{1}{T_{1/2}} - \frac{1}{T}\right) \quad (15)$$

ahol ΔH_{cal} a denaturációs csúcshoz tartozó teljes kalorimetrikus entalpia, ΔH a kalorimetrikus entalpiaváltozás, míg $T_{1/2}$ a denaturációs csúcsmaximumhoz tartozó hőmérséklet. A 15. egyenlet bal oldali kifejezését $1/T$ függvényében ábrázolva egy $-E_A/R$ meredekségű egyenest kapunk, melyből az aktiválási energia meghatározható. Az így eredményül kapott aktiválási energia hibája az általunk alkalmazott alacsony felfűtési sebesség (0,3 K / perc) mellett 5 %.

IV. Eredmények, megbeszélés

IV.1 Az aktin filamentum flexibilitásának és termikus paramétereinek vizsgálata Ca²⁺-aktin filamentumban

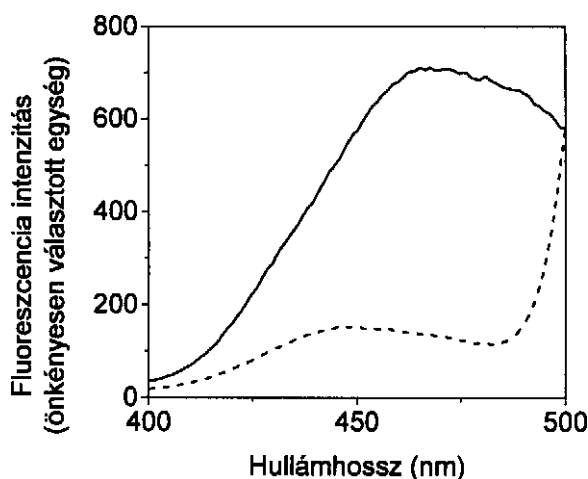
IV.1.1 Flexibilitásvizsgálat FRET segítségével

Munkánk során két toxikus peptidnek, a phalloidinnek és a jasplakinolide-nek az aktin filamentum flexibilitására gyakorolt hatását vizsgáltuk FRET módszerrel. Korábban FRET mérések során igazolódott, hogy az aktin filamentum flexibilitása nagyobb Ca²⁺-, mint Mg²⁺-ion kötése esetén (Hild et al., 1998). FRET módszert alkalmazva phalloidin hatására a Mg²⁺-F-aktin intermonomer flexibilitása csak kis mértékben, míg Ca²⁺-F-aktin esetében nagymértékben csökkent (Nyitrai et al., 2000). Jelen munkánkban - ezen eredmények alapján - az ATP jelenlétében polimerizált Ca²⁺-aktin filamentumot választottuk, mint alkalmas modellrendszert, a toxinok hatásának vizsgálatára. A Ca²⁺-F-aktinon végzett FRET kísérletekben a toxinkezelést minden esetben 1 : 1 toxin : aktin protomer arányban végeztük.

A jasplakinolide és a phalloidin nagy affinitással kötődik az aktin filamentumhoz (15 és 36 nM), így a 20 μ M aktin, illetve toxin koncentráció mellett az aktin protomerek több mint 99 %-a toxint kötött a mérések során.

Kísérleteink során aktin monomereket jelöltünk IAEDANS, illetve IAF fluoreszcens szondákkal, melyeket a polimerizáció során a natív monomerekkel a megfelelő arányban kevertük össze (ld. III.3 fejezet). Az így kialakított aktin filamentumon az intermonomer flexibilitást vizsgáltuk. Más esetben ugyanazon monomeren belül végeztünk kettős jelölést IAEDANS és FC fluoreszcens szondákkal az intramonomer flexibilitás vizsgálatához (ld. III.3). A FRET kísérletek során kapott eredményekből meghatároztuk az egyes hőmérsékletekhez tartozó relatív f' paramétereket. Az f' paraméter hőmérsékletfüggését folytonosnak és monoton növekedőnek találtuk (9. ábra), ami arra utal, hogy a filamentumban a vizsgált hőmérséklettartományon nem következett be olyan konformációs változás, amely az egyensúlyi donor-akceptor távolságot, vagy a donor és akceptor relatív orientációját

jelentősen megváltoztatta volna. Ezt a következtetésünket támasztotta alá az is, hogy a számolt donor-akceptor távolság a mért hőmérséklettartományban 5 %-os hibahatáron belül állandónak bizonyult. A FRET kísérletek esetén a donor fluoreszcencia intenzitása - az akceptor effektív fluoreszcencia kioltó hatása miatt - minden esetben alacsonyabb volt akceptor jelenlétében, mint a csak donorral jelölt minta esetén (8. ábra).



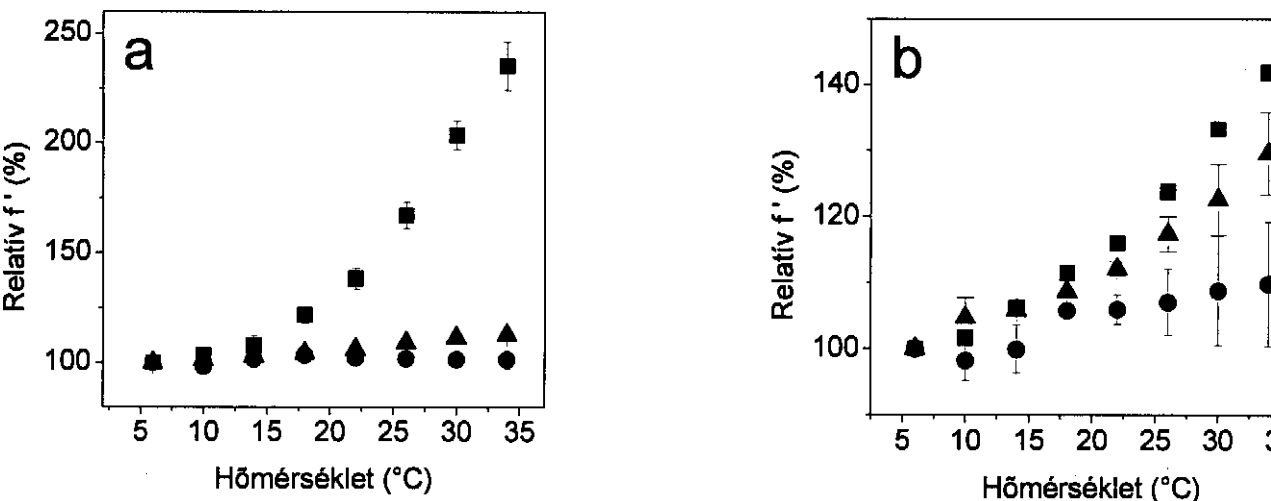
8. ábra

IAEDANS (donor) jelölt aktin filamentum fluoreszcencia emissziós spektruma akceptor nélküli (folytonos vonal), illetve akceptorral jelölt (szaggatott vonal) minta esetén. A mérést 350 nm gerjesztési hullámhossz mellett 5 nm-es gerjesztési és emissziós réssel, A pufferben végeztük, 20 μM aktin koncentráció mellett.

A FRET kísérletek során meghatároztuk a FRET hatásfok (4. egyenlet), majd az f' (5. egyenlet) változását 6-36 °C-os hőmérséklettartományban. Meghatároztuk a relatív f' értékét úgy, hogy normáltuk azokat a 6 °C-on számolt f' értékekkel. Az intermonomer FRET relatív f' változása Ca^{2+} -aktin filamentum esetében 135 % volt toxinkezelés

nélkül (9.a ábra). A relatív f' változása phalloidin hatására 13 %-ra csökkent, jasplakinolide esetében pedig mindössze 2 % volt (9.a ábra).

A toxinok jelenlétében tapasztalt kisebb mértékű relatív f' növekedés a filamentum erősebb protomer-protomer kölcsönhatását, a filamentális szerkezet stabilabbá válását jelzi. Mindkét toxin stabilizálta tehát a filamentumban a protomer-protomer kapcsolatokat. A jasplakinolide a phalloidinnál erősebb stabilizáló hatást mutatott.



9. ábra

A relatív f' hőmérsékletfüggő változása intermonomer (a) és intramonomer (b) FRET kísérletekben Ca^{2+} -aktin filamentum esetében. Az ábra a toxinmentes (■) mintákkal, illetve phalloidin (▲), vagy jasplakinolide (●) jelenlétében mért adatokat mutatja.

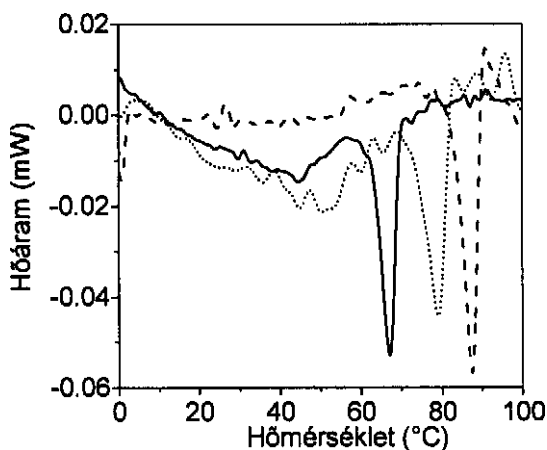
A filamentum dinamikai stabilitását a protomer-protomer kölcsönhatások, illetve a protomeren belüli kölcsönhatások egyaránt befolyásolhatják. A filamentum protomerein belüli szerkezeti változást intramonomer FRET kísérletekkel vizsgáltuk. A jelölés során létrehozott IAEDANS(Cys³⁷⁴)-FC(Gln⁴¹) kétszeresen jelölt monomerekben a jelölt

monomerek FRET mérés során számítással meghatározott távolsága 4,6 és 4,9 nm között volt. Ez az eredmény jól egyezik az aktin monomer kristályszerkezete alapján a Gln⁴¹ és az Arg³⁷² (a modellezett kristályszerkezetből hiányzik a Cys³⁷⁴-es aminosav, ezért a hozzá legközelebbi, meglévő aminosav távolságát határoztuk meg) között meghatározott távolsággal (4,7 nm). Az intramonomer flexibilitás vizsgálata során (9.b ábra) a relatív f' 42 %-os növekedést mutatott toxinkezelés nélkül. Phalloidin hatására a relatív f' növekedése 30 %, míg jasplakinolide esetében 10 % volt. Ezen eredmények azt mutatják, hogy mindkét toxin megkötésének hatására csökkent a filamentumba beépült aktin protomerek flexibilitása. A jasplakinolide stabilizáló hatása erősebb volt, mint a phalloidin hatása, hasonlóan az intermonomer mérések során kapott eredményekhez.

IV.1.2 A filamentum stabilitásának vizsgálata DSC alkalmazásával

A Ca²⁺-aktin filamentumok termális stabilitását DSC technika segítségével követtük nyomon. A kalorimetriás kísérleteket a 0 és 100 °C közötti hőmérséklettartományban végeztük Ca²⁺-aktin filamentumokon. A mérés során a visszahűtött minta ismételt felfűtésével igazoltuk, hogy a tapasztalt denaturációk irreverzibilisek voltak. A hőáram görbékben tapasztalt csúcsokat az aktin filamentum hődenaturációjaként azonosítottuk. A toxinmentes Ca²⁺-aktin filamentum esetében egy reprodukálható alacsony hőmérsékletű (40 és 50 °C közötti) denaturációt találtunk (10. ábra). A görbeintegrálok vizsgálata azt mutatta, hogy az ezen denaturációhoz tartozó kalorimetrikus entalpia phalloidin hatására kis mértékben növekedett, ugyanakkor jasplakinolide hatására csökkent. Korábban végzett DSC mérések során az aktin monomerek hődenaturációjához tartozó érték („melting point” vagy T_m) 53,4 °C volt (Bertazzon et al., 1990; Lőrinczy and Belágyi, 1995; Lőrinczy et al., 1998), így felvetődik, hogy a minták monomer tartalma lehet ezen denaturációk egyik oka. Ennek azonban elletmond, hogy a kísérletek során alkalmazott aktin filamentum koncentráció (69 μ M) mellett az aktinnak kevesebb, mint 0,5 %-a van

monomer formában, és ez az aktin monomer hányad nem elegendő a mért hatás kiváltásához. Ez a feltevés tehát nem szolgál megfelelő magyarázattal, a jelenség megértéséhez további vizsgálatok szükségesek.



10. ábra

A Ca^{2+} -aktin filamentum denaturációs görbéje toxinmentes (folytonos vonal), illetve 1 : 1 toxin : aktin protomer arányú phalloidin (pontozott vonal), vagy jasplakinolide (szaggatott vonal) kezelés esetében.

Egy nagyobb, a filamentum hődenaturációjához tartozó csúcsot találtunk magasabb hőmérsékleten ($> 60\text{ °C}$) (10. ábra). A denaturációs csúcsok maximumhelye (T_m) toxinmentes esetben $67,3 \pm 0,5\text{ °C}$ volt, míg phalloidin, illetve jasplakinolide kezelt aktin esetében $79,3 \pm 0,6$ és $87,7 \pm 0,7\text{ °C}$ -nak adódott (2. táblázat).

<i>Toxin</i>	T_m (°C)	ΔH (J/mol)	ΔS (J/molK)	ΔG (J/mol)
-	67,3 ± 0,5	720 ± 41	2,2 ± 0,1	128 ± 7
<i>phalloidin</i>	79,3 ± 0,6	936 ± 55	2,7 ± 0,2	210 ± 10
<i>jasplakinolide</i>	87,7 ± 0,7	1117 ± 64	3,1 ± 0,2	271 ± 15

2. táblázat

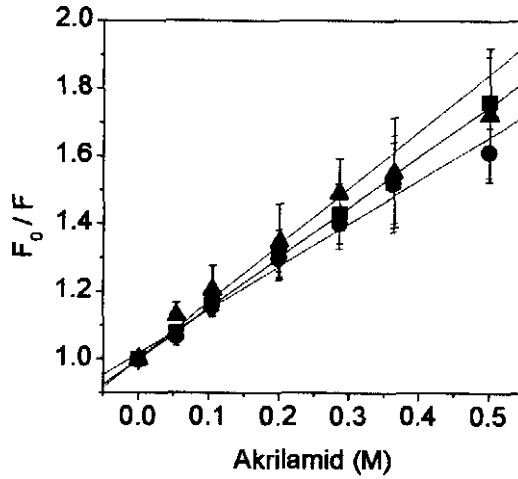
A DSC kísérletek során meghatározott termodinamikai paraméterek toxinmentes Ca^{2+} -aktin filamentum esetében, illetve phalloidin vagy jasplakinolide jelenlétében.

A phalloidinnal kezelt aktin filamentummal kapott eredmények jól egyeztek a korábbi vizsgálatok megfigyeléseivel (Le Bihan and Gicquaud, 1991; Levitsky et al., 2000). A magasabb T_m értékek a phalloidin, illetve a jasplakinolide kezelt esetekben a Ca^{2+} -aktin filamentum nagyobb hőstabilitását mutatják. A mérések során számított kalorimetrikus entalpia, entrópia, és a Gibbs-féle szabadentalpiaváltozás emelkedést mutattak a kezelt állapotban a kezeletlenhez képest, utalva arra, hogy a stabilabb szerkezet denaturációjához több energiára volt szükség. A DSC mérések - összhangban a FRET mérések eredményeivel - igazolták, hogy a jasplakinolide erősebb stabilizáló hatással van a Ca^{2+} -aktin filamentumra, mint a phalloidin.

IV.1.3 Fluoreszcencia kioltás

A Ca^{2+} -aktin filamentum protomerek Cys^{374} aminosavának, és környezetének hozzáférhetőségét vizsgáltuk fluoreszcencia kioltás alkalmazásával. Az aktin monomer N- és C-terminálisa is a szubdomén I-ben található (Kabsch et al., 1990). Korábban a szubdomén I-ben három aminosavat is találtak, amelyek fotoaktív phalloidin származékokkal kölcsönhatásba kerültek (Vandekerckhove et al., 1985). Ezek a Glu^{116} , Met^{119} és Met^{355} aminosavak, amelyek mindegyike a C-terminális közelében helyezkedik el. Ugyancsak a C-terminális közelében lévő Cys^{374} aminosavhoz phalloidin származékot kötöttek kovalensen, majd az így kapott komplex stabilitását tapasztalták, mint szabad phalloidint használva. Ugyanakkor, a szintén a szubdomén I-ben található Cys^{10} -en hasonló kísérletet végezve stabilizáló hatást nem tapasztaltak (Faulstich et al., 1993). A Cys^{374} -hez kötött fluorine reagenst használva kimutatták, hogy az aktin C-terminálisa nagy mozgási szabadsággal rendelkezik (Barden et al., 1989).

A kioltási kísérletek során IAEDANS-szel jelölt aktin filamentumon mértük az IAEDANS fluoreszcencia intenzitását különböző koncentrációjú akrilamid jelenlétében. Az IAEDANS a Cys^{374} aminosavhoz kötődik, mely a szubdomén I-ben található, így a mérések során ezen régió változását kívántuk nyomon követni. Az akrilamid hatását „steady-state” mérések során a fluoreszcencia intenzitás csökkenéséből határoztuk meg. A mért adatok a Stern-Volmer ábrázolásban egyenest eredményeztek (11. ábra). Ezen egyenesek meredekségéből (K_{SV}) meghatározható volt a bimolekuláris állandó értéke (k_+) (ld. 8. egyenlet) (3. táblázat). Az eredmények azt mutatják, hogy a kioltó molekulák számára a fluorofór hozzáférhetősége nem változik számottevően sem phalloidin, sem pedig jasplakinolide kötésének hatására.



11. ábra

Aktin filamentumon akrilamid jelenlétében mért fluoreszcencia intenzitás adatok Stern-Volmer ábrázolása toxinmentes (■), illetve phalloidin (▲), vagy jasplakinolide (●) kezelt esetben.

<i>Toxin</i>	Ksv (1/mol)	τ_0 (ns)	k_+ ($\times 10^7 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$)
-	$1,5 \pm 0,3$	18,0	$8,3 \pm 1,6$
<i>phalloidin</i>	$1,4 \pm 0,4$	17,8	$8,0 \pm 2,2$
<i>jasplakinolide</i>	$1,3 \pm 0,3$	17,7	$7,2 \pm 1,6$

3. táblázat

Az egyenesek meredeksége (Ksv), a kioltó nélkül mért fluoreszcencia élettartam adatok (τ_0), és a bimolekuláris kioltási állandók (k_+) kezeletlen és toxinnal kezelt Ca^{2+} -aktin filamentumok esetében.

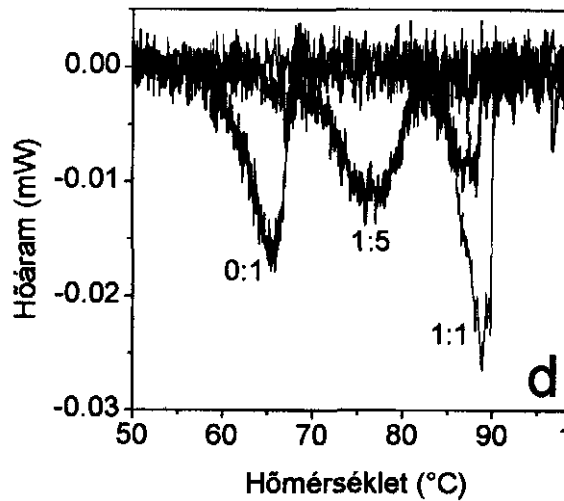
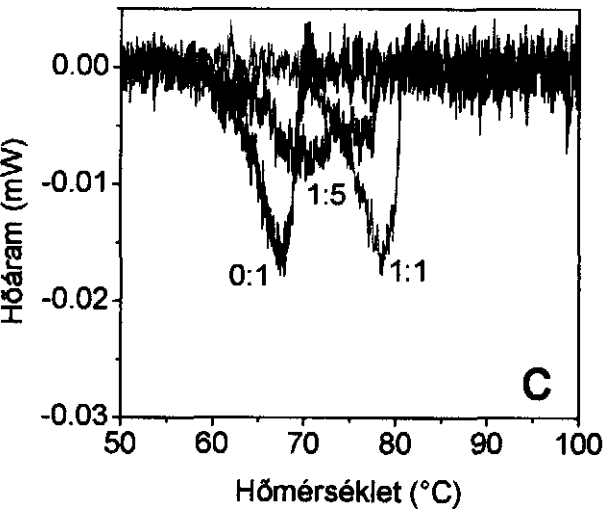
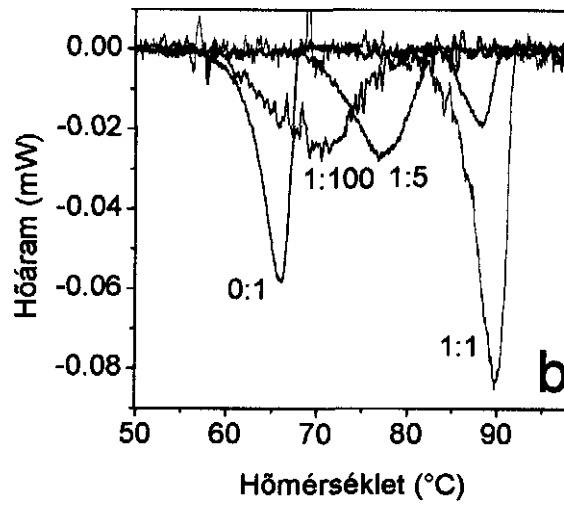
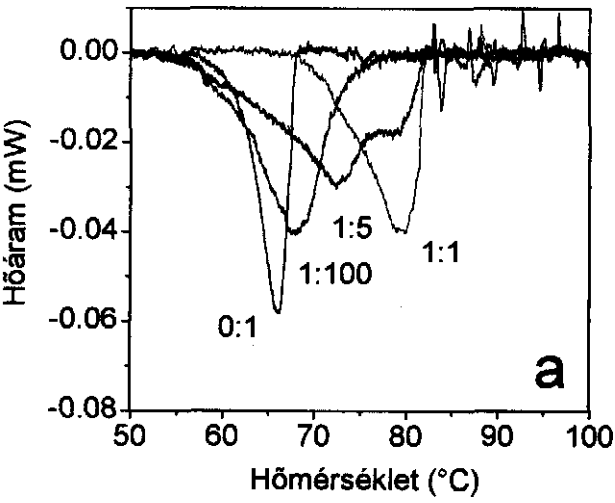
IV.2 A toxinok hatásának kooperativitása* Mg^{2+} -aktin filamentumban

Aktin filamentumhoz kötődő számos ligandum képes a filamentumban konformációváltozást okozni a kötőhelytől távolabbi protomerekben is. Ilyen kooperatív módon terjed a phalloidin hatása is. Munkánk során azt vizsgáltuk, hogy a jasplakinolide képes-e hasonló kooperatív hatás kialakítására, illetve a létrejövő hatás milyen távolságra terjed ki a filamentum mentén. Jelenlegi ismereteink szerint az aktin fiziológiás körülmények között Mg^{2+} iont köt. Kísérleteinkben a toxinok hatását ezért Mg^{2+} -aktin filamentumban követtük nyomon a DSC technika segítségével.

IV.2.1 Az aktin filamentum toxinokjelenlétében kialakuló konformációs állapotai

Az aktin filamentumokat 1 : 500, illetve 1 : 1 moláris arány között több, különböző toxin : aktin protomer arányban kezeltük a DSC kísérletekhez. A vizsgált minták DSC görbéi mindkét toxin esetében tipikusan három denaturációs csúccsal rendelkeztek szubsztöichiometrikus körülmények között (12.a,b ábra). Értelmezésünk szerint az egyes denaturációs átmenetek az aktin filamentumok különböző konformációs állapotait tükrözik.

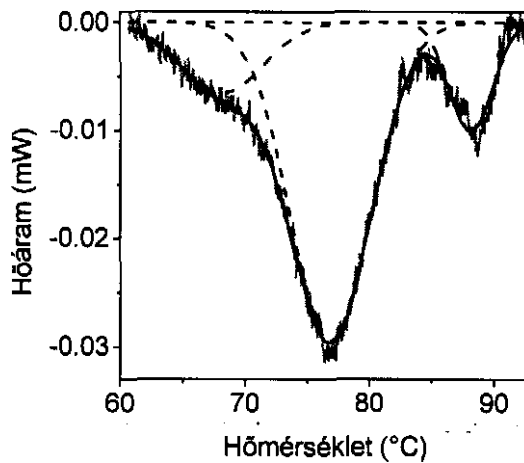
* Szemben a kooperativitás klasszikus értelmezésével, jelen munkánkban a kooperativitás alatt, a filamentum egy protomeréhez kötött toxin hatására, annak környezetében lévő protomereken tapasztalt stabilitás növekedését értjük.



12. ábra

A Mg^{2+} -aktin filamentum hődenaturációs görbéi toxinmentes (0 : 1, fekete vonal) esetben, illetve phalloidin (a, c) vagy jasplakinolide (b, d) kezelés után. Az ábra az 1 : 1 (zöld), 1 : 5 (kék), és 1 : 100 (piros) toxin : aktin protomer arányok mellett mért görbékét mutatja. Az aktin koncentrációja $69 \mu M$ (a, c), illetve $23 \mu M$ (b, d) volt.

A DSC görbék dekonvolúciós program segítségével analizáltuk. A több denaturációs csúccsal rendelkező DSC görbe esetén az egyes csúcsmaximumokhoz meghatároztuk a T_m értékeket, és az ehhez tartozó görbe alatti területeket. A görbe alatti terület meghatározásához a denaturációs görbét az egyes T_m értékekhez illesztett Gauss-görbék összegeként állítottuk elő (13. ábra). Az így meghatározott egyes Gauss-görbék területeinek aránya szerint osztottuk fel a teljes denaturációs görbe területét az egyes konformációkhoz tartozó kalorimetrikus entalpiaváltozások meghatározásához.



13. ábra

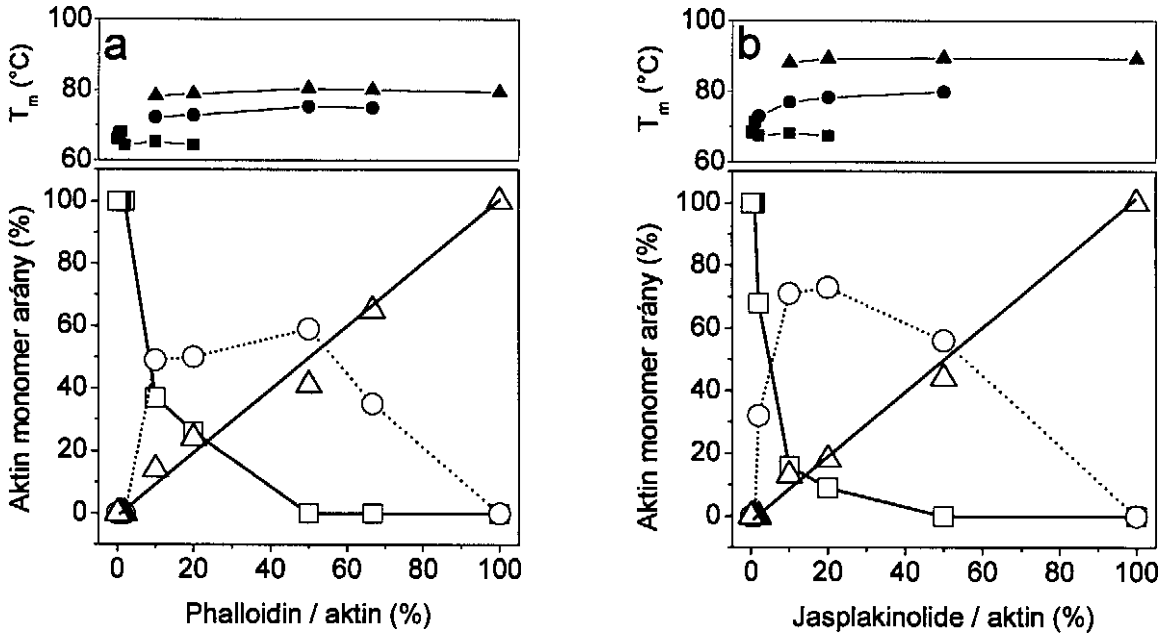
A DSC görbe felbontása Gauss-görbékre az 1 : 10 arányban jasplakinolide-del kezelt aktin filamentum esetében. Az ábrán a mért görbe (szürke vonal), az illesztett Gauss-görbék (szaggatott vonal), illetve a Gauss-görbék összegzéséből kapott eredő görbe van feltüntetve (fekete vonal).

A kalorimetrikus entalpiaváltozás (ΔH) a dekonvolált görbék integráljából meghatározható. A fehérje denaturációhoz szükséges teljes entalpia a toxinok hatásától függetlennek bizonyult (650 - 850 J / M). A különböző konformációkhoz tartozó T_m

értékeket az alacsonyabb, közepes és magas denaturációs hőmérsékleteknek megfelelően T_m^a , T_m^b és T_m^c -vel jelöltük (12.a,b,c,d ábra). A T_m^a értéke minden egyes toxin : aktin protomer arány esetében azonos volt a toxin mentes aktin esetében kapott T_m értékkel (12.a,b,c,d ábra). A T_m^c denaturációs hőmérséklet megegyezett azzal a hőmérsékleti maximummal, amit 1 : 1 arányú toxinkezelés esetén (phalloidin (~ 80 °C), illetve jaspalakolide esetében (~ 90 °C)) tapasztaltunk (12.a,b,c,d ábra). A phalloidin Mg^{2+} -aktin esetében is kevésbé stabil filamentális szerkezetet eredményezett, mint a jaspalakolide, amit az alacsonyabb denaturációs hőmérséklet mutatott. A hőabszorpciós görbe T_m^c -hez tartozó integrálja a toxinkoncentráció emelkedésével lineárisan nőtt (14.a,b ábra) mindkét toxin esetében. A T_m^c toxin : aktin protomer arány függésének meredeksége megközelítőleg 1 volt.

Ez a megfigyelés úgy értelmezhető, hogy az aktin filamentumokon belül van egy olyan protomer populáció, amely kötött toxint tartalmaz (14. a, b ábra). Az egyenes meredeksége mindkét toxin esetében ~1, tehát egy toxin molekula egy protomer szerkezetét stabilizálta. Mindkét toxin esetében közbülső toxin : aktin koncentráció arányok (< 1 : 1) esetén a DSC görbéken - a teljesen stabilizálódott (T_m^c), és a toxinmentes protomer állapotúnak megfelelő (T_m^a) denaturációs csúcsok mellett – megjelent egy harmadik (T_m^b) denaturációs csúcs is (14. a, b ábra). A T_m^b denaturációs csúcsokhoz tartozó protomer populáció ábrázolása a toxin : aktin protomer arány függvényében - mindkét toxin esetében - egy maximummal rendelkező görbét eredményezett (14. a, b ábra). Értelmezésünk szerint a T_m^b denaturációs csúcs azon protomerek hődenaturációját jelzi, amelyeket nem közvetlenül hozzájuk kötődő toxin molekulák stabilizálnak .Ugyanakkor ezeket az aktin protomereket a szomszédos, vagy távolabb lévő, toxint kötő protomerek kooperatív hatása stabilizálta. A T_m^b populáció szerkezeti stabilitása eltér a közvetlen toxinkötés hatására kialakuló állapottól, az ilyen módon stabilizált aktin protomerek kevésbé stabilak, mint a toxint közvetlenül kötők. Egy filamentumba bekötött toxinnmolekula tehát egy protomer stabilitásának maximális növekedését eredményezi (T_m^c), továbbá e protomer körül néhány protomer stabilitásának kisebb mértékű emelkedését idézi elő (T_m^b) közvetett, kooperatív módon. Phalloidin esetében a T_m^b populációhoz tartozó csúcs integráljának maximum értéke a toxin : aktin

protomer arány 20-40 %-ánál, jasplakinolide esetében viszont 10-20 %-ánál jelentkezett (ld. még IV.2.4 fejezet).



14. ábra

Felső ábra: a Mg^{2+} -aktin filamentum T_m^a (■), T_m^b (●) és T_m^c (▲) értékei a toxin:aktin protomer arány függvényében phalloidin (a), illetve jasplakinolide (b) esetében. Alsó ábra: a Mg^{2+} -aktin filamentum T_m^a (□), T_m^b (○) és T_m^c (Δ) értékekhez tartozó, különböző konformációjú protomereinek relatív koncentrációja a toxin:aktin protomer arány függvényében, phalloidin kezelt (a), illetve jasplakinolide kezelt (b) aktin esetében.

IV.2.2 A toxin : aktin protomer sztöchiometria meghatározása

A phalloidinról megállapították, hogy nagy affinitással képes aktin filamentumhoz kötni, valamint a kötés 1 : 1 moláris arányban történik (Dancker et al., 1975). Ezt

támasztották alá más munkacsoportok eredményei is, ahol fluoreszcens phalloidin származékot használtak (Cano et al., 1992), illetve arany-klaszterhez kötött phalloiddinnel kezelt aktinon végeztek szerkezeti analízist (Steinmetz et al., 1998). Más munkacsoportok ezzel szemben 1 : 2 phalloidin : aktin protomer arányt határoztak meg oldatban végzett kísérletekkel (Miyamoto et al., 1986), vagy molekulamodellzés segítségével, az aktin filamentum phalloidin-kötő helyének meghatározása során (Lorenz et al., 1993). Felmerül tehát a kérdés, hogy milyen moláris arányban kötődik a phalloidin az aktin filamentumhoz. A jelen munkánkban kapott eredmények értelmezése alapján a kötődés moláris aránya meghatározható, és az 1 : 1 toxin : aktin protomer moláris arányt adó eredményeket támasztja alá. A teljes stabilitást mutató protomer populáció (T_m°) aránya az aktin toxinokkal való teljes telítéséig változik, azzal egyenes arányban nő, az így kapott egyenes meredeksége ~ 1 (14.a ábra). Az 1 : 1 arányú (teljes) toxintelítés mellett csak a teljesen stabilizált (T_m°) protomer populáció van jelen. Ez a tény egyértelműen azt mutatja, hogy a filamentum 1 : 1 toxin : aktin protomer arányban telíthető toxin molekulákkal. Amennyiben az aktin csak 1 : 2 toxin : aktin arányban lenne képes phalloidint kötni, úgy a telített állapot 50 % toxinkezelés mellett következne be (14.a ábra), és a hődenaturációs görbék a telített állapottól kezdve nem változnának tovább. Ezzel a feltevéssel eredményeink nyilvánvalóan nem összeegyeztethetőek. A jasplakinolide esetében - a phalloiddinnel kapott eredményekhez hasonlóan - 1 : 1 arányú moláris kötődést tapasztaltunk (14.b ábra), így az 1 : 2 toxin : aktin protomer arányú kötődés az eredmények alapján ebben az esetben sem valószínűsíthető.

A jasplakinolide a phalloiddinnel versengve, azt kötőhelyéről leszorítva képes az aktin filamentumhoz kötődni (Bubb et al., 1994). Ezek alapján a két toxinnak valószínűleg közös - vagy nagymértékben átfedő - kötőhelye kell, hogy legyen (Bubb et al., 1994). A phalloidin - a legelfogadottabb modell szerint - az aktin filamentumon három protomer között kialakuló kötőfelszínhez kötődik (ld. I.2.1. fejezet) (Lorenz et al., 1993; Oda et al., 2003). Eredményeink szerint egy toxin molekula egy protomer teljes stabilitását képes maximális mértékben növelni (T_m° -vel jelzett csúcs) (14.a ábra). Ez a teljes stabilitású aktin populáció olyan aktin protomerekből áll, amelyeket a toxin molekulák közvetlen kölcsönhatás eredményeként stabilizálnak. Ha egy toxin molekula két vagy három protomert egyforma erősen lenne képes stabilizálni, úgy a teljes

filamentális stabilitást mutató protomerek aránya nem lineárisan változna, és már alacsonyabb toxinkoncentráció mellett telítésbe menne. A DSC adatok tehát egyértelműen arra utalnak, hogy egy toxinmolekula - mindkét toxin esetében - csak egy protomer teljes stabilitását okozza, azaz a toxinok kölcsönhatása a három protomerrel asszimmetrikus.

A phalloidin kötése során közel van az alsó, valamint a diagonális protomerhez (ld. I.2.1 fejezet) azonban viszonylag távol helyezkedik el a felső protomertől (5. ábra) (Oda et al., 2005). Ezen eredményeket az általunk kapott eredményekkel összevetve feltételezhetjük, hogy a phalloidin nem a tőle távolabb elhelyezkedő protomernek biztosít teljes stabilitást. Ezek alapján vagy a diagonális, vagy pedig az alsó protomer nyer teljes stabilitást a phalloidin-kötés során. Az mindenesetre megállapítható, hogy a diagonális, illetve az alsó protomerek közül csak az egyik stabilizálódik teljes mértékben.

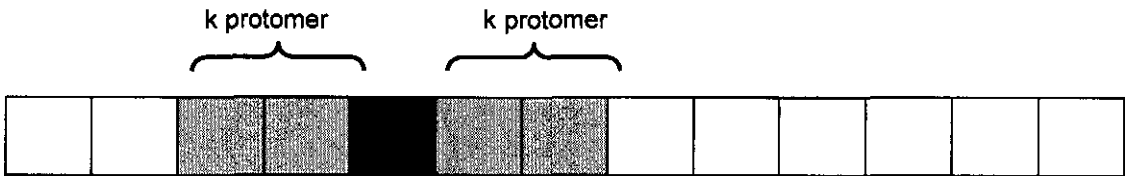
IV.2.3 A filamentumok köteggépződése („bundling”)

Korábbi kutatások során azt tapasztalták, hogy az aktin filamentumok magas aktin koncentráció mellett hossz tengelyük mentén, vagy keresztirányban képesek összetapadni. A hossz tengelyük mentén összetapadt filamentumok kötegeket („bundle”) hoznak létre (Harwell et al., 1980; Kulp and Herzfeld, 1995). Munkánk során a DSC kísérleteknél 69 μM aktin koncentrációt alkalmaztunk a mintákban, így szükségesnek ítéltük a köteggépződés lehetőségének, mint befolyásoló tényezőnek a kizárását. A feltételezett hatás ellenőrzése érdekében kontroll kísérleteket végeztünk 23 μM aktin protomer koncentráció mellett. Ez a koncentráció az alkalmazott DSC technikával kimutatható legalacsonyabb koncentráció, az ennél alacsonyabb koncentráción végzett kísérleteink a magas jel/zaj arány miatt nem szolgáltatottak megfelelő eredményeket. A kontroll kísérleteket toxin mentes, 1 : 5 illetve 1 : 1 toxin : aktin protomer arány mellett végeztük. Az eredmények a filamentum 100 %-os toxinkezelése mellett azt mutatták, hogy a toxinmentes aktin filamentum hődenaturációs csúcsa ($T_m^a = 65,6 \text{ }^\circ\text{C}$) phalloidin és jasplakinolide hatására 78,4 $^\circ\text{C}$ és 88,6 $^\circ\text{C}$ hőmérsékleti értékekre tolódott el (12.c,d ábra). A meghatározott moláris kalorimertikus entalpiaváltozás értékek (650-850 J/mol) a 69 μM aktin koncentráció mellett mért értékekkel jó egyezést mutattak. Bár a 23 μM

koncentrációval mért görbe jel/zaj aránya sokkal rosszabbnak bizonyult, mint a 69 μM -al kapott görbék esetén, a szubsztöichiometrikus toxinkezelés alkalmazása során felvett hődenaturációs görbéket minden esetben három csúcsra lehetett felbontani. Az 1 : 5 toxin : aktin protomer arány mellett tapasztalt T_m hődenaturációs érték 64,2, 70,5 és 76,1 $^{\circ}\text{C}$ volt phalloidin, míg 67,0, 77,1 és 86,7 $^{\circ}\text{C}$ volt jaspalakinolide esetében. Az egyes hődenaturációs csúcsokhoz tartozó aktin konformációk aránya pedig 17,5 (T_m^a), 49,2 (T_m^b), és 33,3 % (T_m^c) volt phalloidin, illetve 13,5 (T_m^a), 64,2 (T_m^b), és 22,3 % (T_m^c) volt jaspalakinolide esetében. Ezen adataink azt mutatták, hogy a 23 μM aktin koncentráció mellett végzett mérések jó egyezést mutattak a 69 μM mellett kapott eredményekkel az egyes aktin konformációk relatív koncentrációját illetően. Ebből arra következtettünk, hogy a köteggépződés a kalorimetriás méréseinkben nem volt detektálható hatással az aktin hődenaturációs tulajdonságaira.

IV.2.4 A kooperatív toxinhatás modellje

Eredményeink szerint a toxin hatása alatt álló filamentum protomerei három szerkezeti állapotban jelennek meg: a toxint közvetlenül kötő, egy távolabb bekötött toxin hatása alatt álló, illetve a toxin hatása alatt nem álló állapotban. A kvantitatív leírás során feltételeztük, hogy a toxin molekulák az aktin filamentumhoz véletlenszerűen kötődnek, és minden kötött toxin molekula maga körül kooperatív hatást vált ki, amely a szomszédos k darab protomerre terjed ki (15. ábra).



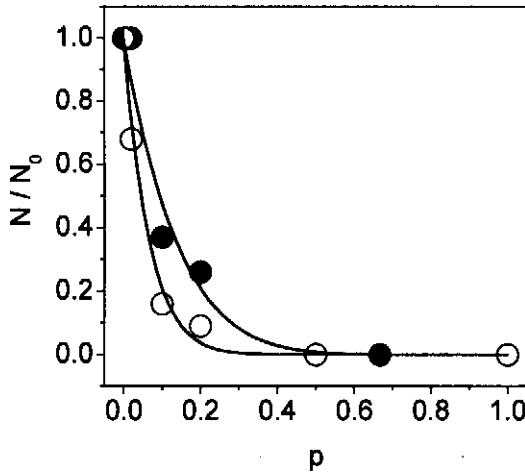
15. ábra

Toxin által kooperatív módon stabilizált aktin filamentum sematikus ábrája (a protomereket négyzetek jelölik), ahol egy toxint közvetlenül kötő, és ezáltal stabilizált protomer (fekete négyzet) maga körül mindkét irányban k protomert képes részlegesen stabilizálni.

Ha annak a valószínűsége, hogy egy aktin protomer toxint köt p , akkor $1 - p$ annak a valószínűsége, hogy egy kiválasztott protomer nem köt toxint. Hogy egy kiválasztott protomer a toxin hatásától mentesnek mutakozzon, a következő kritériumoknak kell megfelelnie: i.) ne kössön toxin molekulát ii.) a környezetében lévő $2k$ protomer ne kössön toxint. Ha N_0 a filamentumban a protomerek száma, akkor $(1 - p)N_0$ számú protomer nem köt toxint. Ez esetben $(1 - p)^{2k}$ annak valószínűsége, hogy egy protomer környezetében lévő $2k$ protomer sem köt toxint. Legyen N azon protomerek száma a filamentumban, amelyek toxinhatástól mentesnek mutakoznak. Ekkor annak valószínűsége, hogy egy protomer ne legyen toxin hatása alatt a filamentumban (N/N_0) :

$$N/N_0 = (1 - p)^{2k+1} \quad (16)$$

Az N/N_0 értékét a kísérleti eredményekből a DSC görbék T_m^a denaturációs csúcshoz tartozó integráljaiból, p értékét pedig az alkalmazott toxin : aktin protomer arányból tudtuk meghatározni. A 16. egyenlettel görbét illesztettünk a mérési pontokra (16. ábra), és az illesztés során meghatároztuk k értékét. A k értéke phalloidinnél $3,0 \pm 0,5$ aktin protomernek, jasplakinolide-nél pedig $6,9 \pm 1,1$ protomernek adódott.



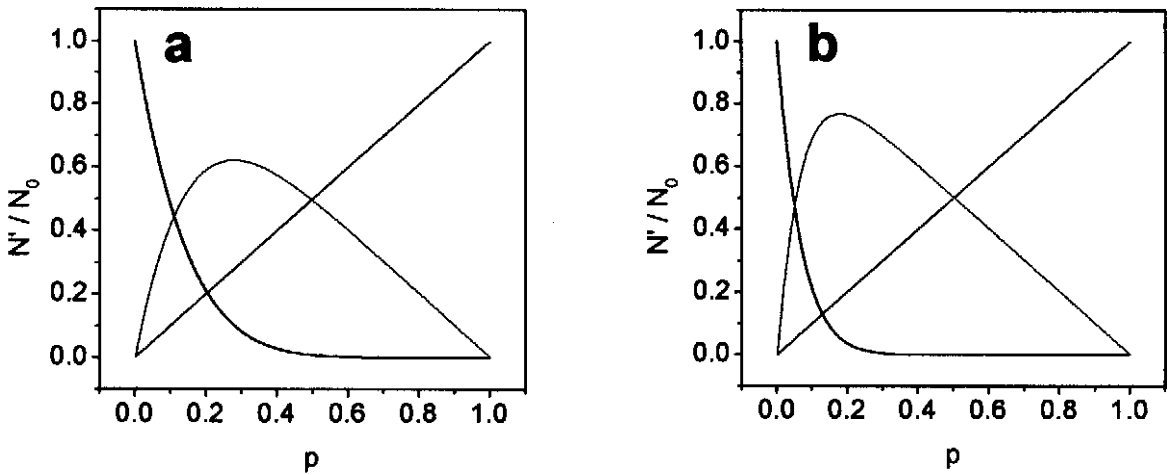
16. ábra

Toxin hatásától mentesnek talált protomerek aránya (N/N_0) a toxint kötő protomerek hányadának (p) függvényében phalloidin (●), illetve jasplakinolide esetén Mg^{2+} -aktin filamentumban. A (16) egyenlettel a mérési pontokra illesztett görbéket fekete vonalak jelzik.

A kooperatív egység ezek alapján $2k + 1 = 7$ aktin protomer phalloidin, és 15 aktin protomer jasplakinolide esetében. Az allosztérikus hatás tehát a toxin kötőhelyétől távolabbra terjed ki jasplakinolide kötése esetén, mint a phalloidin esetében. Ugyanakkor, ezen eredményekből nem állapítható meg, hogy a kooperatív protomerek a toxint kötő

protomerhez képest szimmetrikusan, vagy ettől eltérően (pl. valamilyen kitüntetett irány mentén) helyezkednek-e el.

A matematikai modell alapján meghatározott T_m^a populáció koncentráció függvényében történő változása, valamint a T_m^c populáció lineáris változása alapján a T_m^b populáció változása meghatározható (17. ábra). Az így eredményül kapott T_m^b görbe egy csúccsal rendelkezik, ami illeszkedik a kísérletes eredményekhez. A T_m^b populáció maximuma phalloidin esetén 0,27, míg jasplakinolide esetében 0,18 toxin : aktin protomer arány mellett jelentkezett.



17. ábra

A matematikai modell alapján meghatározott, közvetetten stabilizálódott protomerek (T_m^b) populációjának változása (zöld vonal) az alkalmazott toxin koncentráció függvényében (a) phalloidin illetve (b) jasplakinolide esetében. Az ábrán a toxinok által nem stabilizált (T_m^a) valamint teljesen stabilizált (T_m^c) protomerek aránya fekete, illetve piros színnel jelzett.

IV.2.5 A Ca^{2+} - és Mg^{2+} -aktin filamentumokkal kapott eredmények összehasonlítása

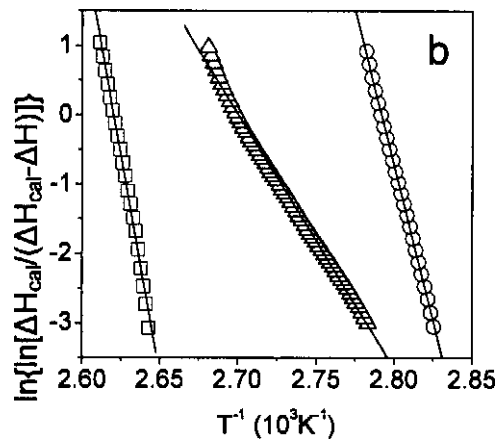
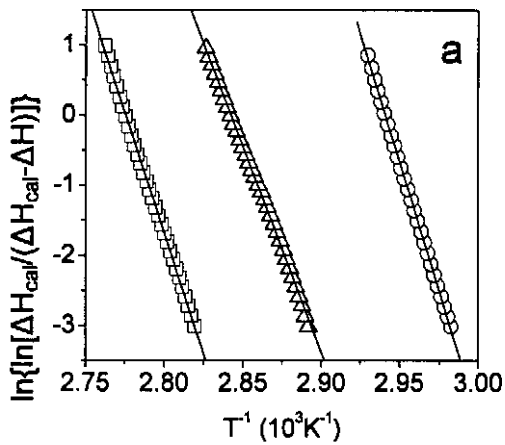
Munkánk során telítési toxinkezelés mellett tapasztalt, teljes stabilitást mutató Ca^{2+} - és Mg^{2+} -F-aktin esetében hasonlítottuk össze a DSC kísérletek során kapott denaturációs görbék T_m értékeit. A T_m értékek a kötött kationtól függetlennek bizonyultak (4. táblázat). A toxinmentes Mg^{2+} -F-aktin ugyanakkor mintegy 1,2 °C-kal magasabb hőmérsékleten mutatott denaturációs csúcst, mint a Ca^{2+} -F-aktin. Ez arra utal, hogy a hődenaturáció tekintetében mindkét toxin ugyanazt a konformációs állapotát alakítja ki az aktin filamentumoknak, mintegy uniformizálják az aktin szerkezetét. Nyitrai és munkatársai a phalloidin hasonló, uniformizáltan stabilizáló hatását írták le ADP- és ATP- Mg^{2+} -G-aktinból polimerizált filamentumnak FRET-tel történt vizsgálata során (Nyitrai et al., 2000). Eredményeik szerint, bár a toxinmentes filamentumok flexibilitása eltért egymástól, a phalloidin kötésének hatására mindkét típusú filamentum flexibilitása egyformán stabilnak mutatkozott.

<i>Toxin</i>	T_m (°C)	
	Ca^{2+} -actin	Mg^{2+} -actin
<i>none</i>	67,3 ± 0,5	68,5 ± 0,5
<i>phalloidin</i>	79,3 ± 0,6	79,3 ± 0,5
<i>jasplakinolide</i>	87,7 ± 0,7	89,8 ± 0,7

4. táblázat

A toxinok nélkül, illetve 1 : 1 toxin : aktin protomer arány mellett végzett toxinkezelés után meghatározott T_m értékek Ca^{2+} - és Mg^{2+} -F-aktin estében.

Az 1 : 1 toxin : aktin protomer arány mellett kezelt Ca^{2+} - és Mg^{2+} -F-aktinnal történt mérések eredményeit a Sanchez-Ruiz és munkatársai által leírt kinetikai modell (ld. III.8 fejezet) alapján analizáltuk az eredményeket. Az $\ln\{\ln[\Delta H_{\text{cal}}/(\Delta H_{\text{cal}}-\Delta H)]\}$ értéke az abszolút hőmérséklet reciprokának függvényében ábrázolva a modellnek megfelelően minden esetben egyenest adott (18. ábra).



18. ábra

Az $\ln\{\ln[\Delta H_{cal}/(\Delta H_{cal}-\Delta H)]\}$ érték ábrázolása az abszolút hőmérséklet reciprokának függvényében. Az ábra a (a) Ca^{2+} - és (b) Mg^{2+} -F-aktinnal toxinkezelés nélkül (kör), valamint 100 %-os phalloidin (háromszög) és jasplakinolide (négyzet) kezelés mellett számolt adatokat mutatja.

Az egyenesek meredekségéből meghatározott átlagos aktiválási energia értékeit az 5. táblázat tartalmazza. A Ca^{2+} -F-aktinnal toxinkezelés nélkül kapott aktiválási energia 602 kJ/mol -nak adódott. A jasplakinolide kezelés hatására az aktiválási energia értéke 5 %-os hibahatáron belül nem változott, phalloidin kezelés hatására azonban 19 %-kal csökkent.

Toxinmentes Mg^{2+} -F-aktin esetében az aktiválási energia értéke 738 kJ/mol volt. Jaspilakinolide hatására az aktiválási energia értéke 33 %-kal nőtt, phalloidin hatására azonban számottevően, 63 %-kal csökkent.

<i>Toxin</i>	E_A (kJ/mol)	
	Ca^{2+} -F-actin	Mg^{2+} -F-actin
-	602,00	738,00
<i>phalloidin</i>	485,70	273,04
<i>jasplakinolide</i>	570,19	984,45

5. táblázat

A toxinmentes, illetve 100 %-os toxinkezelés hatása alatt álló Ca^{2+} - és Mg^{2+} -F-aktin denaturációs görbék alapján meghatározott aktiválási energia értékei (E_A).

A phalloidin esetében tapasztalt denaturációs görbe csúcsainak szélesedése (12.a ábra), valamint az aktiválási energia csökkenése arra utal, hogy a fehérjemátrixban történő változások eredményeképpen a protomerek közötti termikus kooperatív kapcsolat gyengül (az itt leírt termikus kooperativitás semmilyen összefüggésben nem áll a korábban leírt toxinok okozta kooperatív stabilitással, ezért is áll megkülönböztetésül a termikus jelző).

Összességében megállapítható, hogy míg Ca^{2+} -F-aktin esetén a termikus kooperativitás nem változott számottevően, addig Mg^{2+} -F-aktin esetében a phalloidin a termikus kooperativitás számottevő csökkenését idézte elő. A jasplakinolide azonban mindkét filamentum típus esetén a termikus kooperativitás növekedését okozta.

IV.3 A kooperatív hatás lehetséges biológiai jelentősége

Az aktin filamentum kooperativitásának biológiai jelentősége máig nem tisztázott, azonban néhány megállapítást jelen ismereteink szerint is tehetünk. Az aktin filamentum rendszer *in vivo* aktin-kötő fehérje molekulák összetett hatása alatt áll. Az aktinhoz kötődő fehérjemolekulák megváltoztatják a filamentum konformációját és dinamikai tulajdonságait. Amennyiben egy lokális kölcsönhatás távolabbi molekularészletekben is változást okoz, úgy elképzelhető, hogy az aktin filamentumon ilyen formán tovaterjedő

hatásnak információ továbbító szerepe van. Amennyiben a kooperatív hatás során a molekulák kisebb koncentrációban képesek elérni a kívánt biológiai hatást, úgy ez az élő rendszerek energiagazdálkodásában lehet előnyös, mivel kisebb energia-befektetés mellett nagyobb hatásfokú működést biztosít.

V. Összefoglalás

Munkánk során összehasonlítottuk az aktin filamentumban phalloidin és jasplakinolide hatására bekövetkező molekuláris szintű dinamikai és szerkezeti változásokat. Megállapítottuk, hogy mindkét toxin stabilizáló hatást gyakorolt az aktin filamentum intermonomer és intramonomer flexibilitására. Igazoltuk, hogy intermonomer és intramonomer esetekben is a jasplakinolide stabilizáló hatása volt a nagyobb. Kimutattuk, hogy ugyanakkor mindkét toxin növelte az aktin filamentum hőstabilitását is. A jasplakinolide stabilizáló hatása ebben a tekintetben is erősebb volt, mint a phalloidiné. Mindezen eredményeink egybehangzóan igazolták, hogy a jasplakinolide a phalloidinnél nagyobb mértékben képes stabilizálni az aktin filamentumot.

Megállapítottuk, hogy mindkét toxin hatása kooperatív módon terjed az aktin filamentumok mentén. A kooperatív kölcsönhatás eredményeképpen kialakult szerkezetben mindkét toxin esetében három különböző hőstabilitású protomer populációt tudunk megkülönböztetni: a toxin által közvetlenül stabilizált (toxint kötő protomerek), a toxin hatására közvetetten (kooperatív módon) stabilizált (a toxint kötő protomer toxint nem kötő szomszédai), illetve a toxinhatástól mentes populációkat.

A fenti jelenség értelmezésére egy kvantitatív modellt állítottunk fel. Kiindulási feltételnek választottuk, hogy a toxinok aktin protomerekhez való kötődése véletlenszerű. Mérési eredményeink alapján feltételeztük, hogy a protomerekhez kötött toxin nem csak a kötött protomerek stabilitását növeli, hanem az azokkal szomszédos $2k$ (szimmetrikusan vagy aszimmetrikusan elhelyezkedő) protomer stabilitását is részlegesen emeli. Ezen modell alapján meghatároztuk a kooperatív egység nagyságát $(2k + 1)$ Mg^{2+} -aktin filamentumra, amely phalloidin esetében 7 protomer volt, míg jasplakinolide esetében 15 protomernek adódott.

Igazoltuk, hogy a jasplakinolide és a phalloidin az aktin filamentumhoz 1 : 1 toxin : aktin protomer moláris arányban képes kötődni. Mindkét vizsgált toxin esetében megállapítottuk, hogy egy filamentumhoz kötött toxin csak egy protomer stabilitásának maximális növekedését eredményezi.

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Visegrády B, Lőrinczy D, Hild G, Somogyi B, Nyitrai M. The Effect of Phalloidin and Jasplakinolide on the Flexibility and Thermal Stability of Actin Filaments. FEBS Lett. 2004, 565(1-3), 163-6.

Visegrády B, Lőrinczy D, Hild G, Somogyi B, Nyitrai M. A Simple Model for the Cooperative Stabilisation of Actin Filaments by Phalloidin and Jasplakinolide FEBS Lett. 2005, 579(1-3), 6-10.

Az értekezésben nem szereplő közlemények

Visegrády B, Konecsni T, Grobuschek N, Schmid MG, Kilar F, Aboul-Enein HY, Gübitz G. Chiral Separation of Thiazide Diuretics by HPLC on Chiralcel OD-RH(R), Chiralcel OJ-R(R) and Chirobiotic-T(R) Phases. J Biochem Biophys Methods. 2002, (1-3), 15-24.

Kilár F, Visegrády B. Mapping of Stereoselective Recognition Sites on Human Serum Transferrin by Capillary Electrophoresis and Molecular Modelling. Electrophoresis. 2002, (6), 964-71.

Szarka K, Bódis E, Visegrády B, Nyitrai M, Kilár F, Somogyi B. 9-Anthroylnitrile Binding to Serine-181 in Myosin Subfragment 1 as Revealed by FRET Spectroscopy and Molecular Modeling. Biochemistry. 2001, 40(49), 14806-11.

Visegrády B, Than NG, Kilár F, Sümegei B, Than GN, Bohn H. Homology Modelling and Molecular Dynamics Studies of Human Placental Tissue Protein 13 (galectin-13). Protein Eng. 2001, (11), 875-80.

Than NG, Visegrády B, Berente Z, Than GN, Sümegei B. Humán Placenta Protein 13 (PP13): aminosav-szekvencia, szerkezet és funkció. Biokémia. 2000. március, XXIV. Évf. 1.szám

Hivatkozott közlemények

- Barden, J.A., M. Miki, B.D. Hambly, and C.G. Dos Remedios. 1987. Localization of the phalloidin and nucleotide-binding sites on actin. *Eur J Biochem* 162(3):583-588.
- Barden, J.A., L. Phillips, B.A. Cornell, and C.G. Dos Remedios. 1989. *Biochemistry* 28:5895-5901.
- Bershadsky, A.D., U. Gluck, O.N. Denisenko, T.V. Sklyarova, I. Spector, and A. Ben-Ze'ev. 1995. The state of actin assembly regulates actin and vinculin expression by a feedback loop. *J Cell Sci* 108 (Pt 3):1183-1193.
- Bertazzon, A., G.H. Tian, A. Lamblin, and T.Y. Tsong. 1990. Enthalpic and entropic contributions to actin stability: calorimetry, circular dichroism, and fluorescence study and effects of calcium. *Biochemistry* 29:291-298.
- Bubb, M.R., A.M. Senderowicz, E.A. Sausville, K.L. Duncan, and E.D. Korn. 1994. Jasplakinolide, a cytotoxic natural product, induces actin polymerization and competitively inhibits the binding of phalloidin to F-actin. *J Biol Chem* 269(21):14869-14871.
- Bubb, M.R., I. Spector, B.B. Beyer, and K.M. Fosen. 2000. Effects of jasplakinolide on the kinetics of actin polymerization. An explanation for certain in vivo observations. *J Biol Chem* 275(7):5163-5170.
- Cano, M.L., L. Cassimeris, M. Joyce, and S.H. Zigmond. 1992. Characterization of tetramethylrhodaminyl-phalloidin binding to cellular F-actin. *Cell. Motil. Cytoskeleton* 21(2):147-158.
- Carlier, M.F. 1989. Role of nucleotide hydrolysis in the dynamics of actin filaments and microtubules. *Int Rev Cytol* 115:139-170.
- Carlier, M.F. 1991. Actin: protein structure and filament dynamics. *J Biol Chem* 266(1):1-4.

- Carlier, M.F., D. Didry, R. Melki, M. Chabre, and D. Pantaloni. 1988. Stabilization of microtubules by inorganic phosphate and its structural analogues, the fluoride complexes of aluminum and beryllium. *Biochemistry* 27(10):3555-3559.
- Carlier, M.F., D. Pantaloni, and E.D. Korn. 1986. Fluorescence measurements of the binding of cations to high-affinity and low-affinity sites on ATP-G-actin. *J Biol Chem* 261(23):10778-10784.
- Cooper, J.A. 1987. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J Cell Biol* 105(4):1473-1478.
- Crews, P., L. Manes, and M. Boehler. 1986. Jaspalkinolide, a cyclodepsipeptide from the marine sponge, *Jaspis* sp. *Tetrahedron Lett.* 27:2797-2800.
- Dancker, P., and L. Hess. 1990. Phalloidin reduces the release of inorganic phosphate during actin polymerization. *Biochim Biophys Acta* 1035(2):197-200.
- Dancker, P., I. Low, W. Hasselbach, and T. Wieland. 1975. Interaction of actin with phalloidin: polymerization and stabilization of F-actin. *Biochim. Biophys. Acta* 400(2):407-414.
- Drubin, D.G., H.D. Jones, and K.F. Wertman. 1993. Actin structure and function: roles in mitochondrial organization and morphogenesis in budding yeast and identification of the phalloidin-binding site. *Mol Biol Cell* 4(12):1277-1294.
- Estes, J.E., L.A. Selden, and L.C. Gershman. 1981. Mechanism of action of phalloidin on the polymerization of muscle actin. *Biochemistry* 20(4):708-712.
- Estes, J.E., L.A. Selden, H.J. Kinosian, and L.C. Gershman. 1992. Tightly-bound divalent cation of actin. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 13(3):272-284.
- Falcigno, L., S. Costantini, G. D'Auria, B.M. Bruno, S. Zobeley, G. Zanotti, and L. Paolillo. 2001. Phalloidin synthetic analogues: structural requirements in the interaction with F-actin. *Chemistry* 7(21):4665-4673.
- Faulstich, H., D. Heintz, and G. Drewes. 1992. Interchain and intrachain crosslinking of actin thiols by a bifunctional thiol reagent. *FEBS Lett* 302(3):201-205.
- Faulstich, H., A.J. Schafer, and M. Weckauf. 1977. The dissociation of the phalloidin-actin complex. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* 358(2):181-184.
- Faulstich, H., S. Zobeley, D. Heintz, and G. Drewes. 1993. Probing the phalloidin binding site of actin. *FEBS Lett* 318(3):218-222.

- Fenteany, G., and S. Zhu. 2003. Small-molecule inhibitors of actin dynamics and cell motility. *Curr Top Med Chem* 3(6):593-616.
- Feuer, G., F. Molnár, E. Pettkó, and F.B. Straub. 1948. Studies on the composition and polymerisation of actin. *Hung. Acta Physiol.* 1:150-163.
- Förster, T. 1948. Intramolecular energy migration and fluorescence. *Ann Phys* 2:55-75.
- Fothergill, M., M.F. Goodman, J. Petruska, and A. Warshel. 1995. Structure-energy analysis of the role of metal ions in phosphodiester bond hydrolysis by DNA polymerase I. *Am. Chem. Soc.* 117:11619-11627.
- Gershman, L.C., L.A. Selden, H.J. Kinoshian, and J.E. Estes. 1989. Preparation and polymerization properties of monomeric ADP-actin. *Biochim Biophys Acta* 995(2):109-115.
- Goode, B.L., D.G. Drubin, and G. Barnes. 2000. Functional cooperation between the microtubule and actin cytoskeletons. *Curr Opin Cell Biol* 12(1):63-71.
- Hanson, J., and J. Lowy. 1963. The structure of F-actin and of actin filaments isolated from muscle. *J. Mol. Biol.* 6:46-60.
- Harwell, O.D., M.L. Sweeney, and F.H. Kirkpatrick. 1980. Conformation changes of actin during formation of filaments and paracrystals and upon interaction with DNase I, cytochalasin B, and phalloidin. *J Biol Chem* 255(3):1210-1220.
- Hild, G., M. Nyitrai, J. Belagyi, and B. Somogyi. 1998. The influence of divalent cations on the dynamic properties of actin filaments: a spectroscopic study. *Biophys. J.* 75(6):3015-3022.
- Holmes, K.C., D. Popp, W. Gebhard, and W. Kabsch. 1990. Atomic model of the actin filament. *Nature* 347(6288):44-49.
- Huxley, H.E. 1972. Molecular basis for contraction in cross-striated muscles. In *The structure and function of muscle*. second edition. Bourne GH, editor. 301-387.
- 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(19):11437-11444.
- 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(6288):37-44.

- Kinosian, H.J., L.A. Selden, J.E. Estes, and L.C. Gershman. 1991. Thermodynamics of actin polymerization; influence of the tightly bound divalent cation and nucleotide. *Biochim Biophys Acta* 1077(2):151-158.
- Kobayashi, N., S. Endo, H. Kobayashi, H. Faulstich, T. Wieland, and E. Munekata. 1995. Comparative study on the conformation of phalloidin, viroisin, and related derivatives in aqueous solution. *Eur J Biochem* 232(3):726-736.
- Kopp, S.J., J.T. Barron, and J.P. Tow. 1990. Phosphatic metabolites, intracellular pH and free [Mg²⁺] in single, intact porcine carotid artery segments studied by ³¹P-NMR. *Biochim Biophys Acta* 1055(1):27-35.
- Kulp, D.T., and J. Herzfeld. 1995. Crowding-induced organization of cytoskeletal elements. III. Spontaneous bundling and sorting of self-assembled filaments with different flexibilities. *Biophys Chem* 57(1):93-102.
- Kushmeric, M.J., P.F. Dillon, R.A. Meyers, T.R. Brown, J.M. Krisanda, and H.L. Sweeney. 1986. *J Biol Chem* 261:14420-14429.
- Lakowicz, J.R. 1983. Measurements of fluorescence lifetimes. In Principles of Fluorescence Spectroscopy. *Plenum Press, New York and London.*:52-95.
- Lauffenburger, D.A., and A.F. Horwitz. 1996. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 84(3):359-369.
- Le Bihan, T., and C. Gicquaud. 1991. Stabilization of actin by phalloidin: a differential scanning calorimetric study. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181(2):542-547.
- Levitsky, D.I., E.V. Rostkova, V.N. Orlov, O.P. Nikolaeva, L.N. Moiseeva, M.V. Teplova, and N.B. Gusev. 2000. Complexes of smooth muscle tropomyosin with F-actin studied by differential scanning calorimetry. *Eur. J. Biochem.* 267(6):1869-1877.
- 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(3):826-836.
- Lőrinczy, D., and J. Belágyi. 1995. Scanning calorimetric and EPR studies on thermal stability of actin. *Thermochimica Acta* 259:153-164.
- Lőrinczy, D., F. Könczöl, B. Gaszner, and J. Belágyi. 1998. Structural stability of actin filaments studied by DSC and EPR. *Thermochimica Acta* 322:95-100.

- Loscalzo, J., and G.H. Reed. 1976. Spectroscopic studies of actin-metal-nucleotide complexes. *Biochemistry* 15:5407-5413.
- Löw, I., and T. Wieland. 1974. The interaction of phalloidin, some of its derivatives, and other cyclic peptides with muscle actin as studied by viscometry. *FEBS Lett* 44:340-343.
- Lumry, R., and H.J.P.C. Eyring, 110. 1954. *J Phys Chem* 58:110.
- Martonosi, A., C.M. Molino, and J. Gergely. 1964. The Binding of Divalent Cations to Actin. *J Biol Chem* 239:1057-1064.
- McLaughlin, P.J., J.T. Gooch, H.G. Mannherz, and A.G. Weeds. 1993. Structure of gelsolin segment 1-actin complex and the mechanism of filament severing. *Nature* 364(6439):685-692.
- Melki, R., S. Fievez, and M.F. Carrier. 1996. Continuous monitoring of Pi release following nucleotide hydrolysis in actin or tubulin assembly using 2-amino-6-mercapto-7-methylpurine ribonucleoside and purine-nucleoside phosphorylase as an enzyme-linked assay. *Biochemistry* 35(37):12038-12045.
- Miki, M., C.G. dos Remedios, and J.A. Barden. 1987. Spatial relationship between the nucleotide-binding site, Lys-61 and Cys-374 in actin and a conformational change induced by myosin subfragment-1 binding. *Eur. J. Biochem.* 168(2):339-345.
- Miki, M., S.I. O'Donoghue, and C.G. Dos Remedios. 1992. Structure of actin observed by fluorescence resonance energy transfer spectroscopy. *J Muscle Res Cell Motil* 13(2):132-145.
- Milligan, R.A., M. Whittaker, and D. Safer. 1990. Molecular structure of F-actin and location of surface binding sites. *Nature* 348(6298):217-221.
- Miyamoto, Y., M. Kuroda, E. Munekata, and T. Masaki. 1986. Stoichiometry of actin and phalloidin binding: one molecule of the toxin dominates two actin subunits. *J. Biochem. (Tokyo)* 100(6):1677-1680.
- Moore, P.B., H.E. Huxley, and D.J. DeRosier. 1970. *J Mol Biol* 50:279-295.
- Nabi, I.R. 1999. The polarization of the motile cell. *J Cell Sci* 112 (Pt 12):1803-1811.
- Nagashima, H., and S. Asakura. 1980. Dark-field light microscopic study of the flexibility of F-actin complexes. *J Mol Biol* 136(2):169-182.

- Nonomura, Y., E. Katayama, and S. Ebashi. 1975. Effect of phosphates on the structure of the actin filament. *J Biochem (Tokyo)* 78(5):1101-1104.
- Nyitrai, M., G. Hild, N. Hartvig, J. Belagyi, and B. Somogyi. 2000. Conformational and dynamic differences between actin filaments polymerized from ATP- or ADP-actin monomers. *J. Biol. Chem.* 275(52):41143-41149.
- Nyitrai, M., G. Hild, N. Hartvig, J. Belagyi, and B. Somogyi. 2000. Conformational and dynamic differences between actin filaments polymerized from ATP- or ADP-actin monomers. *J Biol Chem* 275(52):41143-41149.
- Nyman, T., H. Schuler, E. Korenbaum, C.E. Schutt, R. Karlsson, and U. Lindberg. 2002. The role of MeH73 in actin polymerization and ATP hydrolysis. *J Mol Biol* 317(4):577-589.
- Oda, T., Z.D. Crane, C.W. Dicus, B.A. Sufi, and R.B. Bates. 2003. Dolastatin 11 connects two long-pitch strands in F-actin to stabilize microfilaments. *J. Mol. Biol.* 328(2):319-324.
- Oda, T., K. Namba, and Y. Maeda. 2005. Position and orientation of phalloidin in F-actin determined by X-ray fiber diffraction analysis. *Biophys J.*
- Orlova, A., and E.H. Egelman. 1992. Structural basis for the destabilization of F-actin by phosphate release following ATP hydrolysis. *J. Mol. Biol.* 227(4):1043-1053.
- Orlova, A., and E.H. Egelman. 1995. Structural dynamics of F-actin: I. Changes in the C terminus. *J Mol Biol* 245(5):582-597.
- Pantaloni, D., C. Le Clairche, and M.F. Carrier. 2001. Mechanism of actin-based motility. *Science* 292(5521):1502-1506.
- Pollard, T.D., I. Goldberg, and W.H. Schwarz. 1992. Nucleotide exchange, structure, and mechanical properties of filaments assembled from ATP-actin and ADP-actin. *J Biol Chem* 267(28):20339-20345.
- Sanchez-Ruiz, J.M., J.L. Lopez-Lacomba, M. Cortijo, and P.L. Mateo. 1988. Differential scanning calorimetry of the irreversible thermal denaturation of thermolysin. *Biochemistry* 27(5):1648-1652.
- Schafer, A., J.X. De Vries, H. Faulstich, and T. Wieland. 1975. Phalloidin counteracts the inhibitory effect of actin on deoxyribonuclease I. *FEBS Lett* 57(1):51-54.

- Schuler, H., M. Nyakern, C.E. Schutt, U. Lindberg, and R. Karlsson. 2000. Mutational analysis of arginine 177 in the nucleotide binding site of beta-actin. *Eur J Biochem* 267(13):4054-4062.
- Schutt, C.E., J.C. Myslik, M.D. Rozycki, N.C. Goonesekere, and U. Lindberg. 1993. The structure of crystalline profilin-beta-actin. *Nature* 365(6449):810-816.
- Senderowicz, A.M., G. Kaur, E. Sainz, C. Laing, W.D. Inman, J. Rodriguez, P. Crews, L. Malspeis, M.R. Grever, and E.A. Sausville. 1995. Jasplakinolide's inhibition of the growth of prostate carcinoma cells in vitro with disruption of the actin cytoskeleton. *J Natl Cancer Inst.* 87(1):46-51.
- Senderowicz, A.M.J., G. Kaur, E. Sainz, E.A. Sausville, and K.L.K. Duncan. 1994. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* (35):409.
- Spector, I., F. Braet, N.R. Shochet, and M.R. Bubb. 1999. New Anti-Actin Drugs in the Study of the Organization and Function of the Actin Cytoskeleton. *Microscopy Research and Technique* 47:18-37.
- Spudich, J.A., H.E. Huxley, and J.T. Finch. 1972. Regulation of Skeletal Muscle Contraction. II. Structural Studies of the Interaction of the Tropomyosin-Troponin Complex with Actin. *J Mol Biol* 246:4866-4871.
- 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(15):4866-4871.
- Squire, J.M. 1981. The structural basis of muscular contraction. Plenum Press, New York.
- Steinmetz, M.O., D. Stoffler, S.A. Muller, W. Jahn, B. Wolpensinger, K.N. Goldie, A. Engel, H. Faulstich, and U. Aebi. 1998. Evaluating atomic models of F-actin with an undecagold-tagged phalloidin derivative. *J. Mol. Biol.* 276(1):1-6.
- Steinmetz, M.O., D. Stoffler, S.A. Muller, W. Jahn, B. Wolpensinger, K.N. Goldie, A. Engel, H. Faulstich, and U. Aebi. 1998. Evaluating atomic models of F-actin with an undecagold-tagged phalloidin derivative. *J Mol Biol* 276(1):1-6.
- Stingl, J., R.J. Andersen, and J.T. Emerman. 1992. In vitro screening of crude extracts and pure metabolites obtained from marine invertebrates for the treatment of breast cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 30(401-406.).

- Straub, F.B. 1942. Studies. (*from the Institute of Medical Chemistry University, Szeged*) II:3-15.
- Straub, F.B., and G. Feuer. 1950. Adenosinetriphosphate the functional group of actin. *Biochim. Biophys. Acta* 4:455-470.
- Strzelecka-Golaszewska, H., J. Moraczewska, S.Y. Khaitlina, and M. Mossakowska. 1993. Localization of the tightly bound divalent-cation-dependent and nucleotide-dependent conformation changes in G-actin using limited proteolytic digestion. *Eur J Biochem* 211(3):731-742.
- Strzelecka-Golaszewska, H. 1973. Effect of Tightly Bound Divalent Cation on the Equilibria between G-Actin-Bound and Free ATP. *Biochim Biophys Acta* 310:60-69.
- Strzelecka-Golaszewska, H., and W. Drabikowski. 1968. *Biochim Biophys Acta* 162:581-595.
- Strzelecka-Golaszewska, H., E. Prochniewicz, and W. Drabikowski. 1978. Interaction of Actin with Divalent Cations. II. Characterization of Protein - Metal Complexes. *Eur J Biochem* 88:219-227.
- Suck, D. 1981. Three-dimensional structure of the complex of skeletal muscle actin and bovine pancreatic DNase I at 6 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:4319-4323.
- Takashi, R. 1988. A novel actin label: a fluorescent probe at glutamine-41 and its consequences. *Biochemistry* 27(3):938-943.
- Tobacman, L.S., and E.D. Korn. 1983. The kinetics of actin nucleation and polymerization. *J Biol Chem* 258(5):3207-3214.
- Tsien, R.Y., T. Pozzan, and T.J. Rink. 1982. Calcium homeostasis in intact lymphocytes: cytoplasmic free calcium monitored with a new, intracellularly trapped fluorescent indicator. *J Cell Biol* 94(2):325-334.
- Vandekerckhove, J., A. Deboben, M. Nassal, and T. Wieland. 1985. The phalloidin binding site of F-actin. *Embo J* 4(11):2815-2818.
- Wakabayashi, T., H.E. Huxley, L.A. Amos, and A. Klug. 1975. Three-dimensional image reconstruction of actin-tropomyosin complex and actin-tropomyosin-troponin T-troponin I complex. *J Mol Biol* 93:477-497.

- Waterman-Storer, C.M., and E. Salmon. 1999. Positive feedback interactions between microtubule and actin dynamics during cell motility. *Curr Opin Cell Biol* 11(1):61-67.
- Wegner, A. 1976. Head to tail polymerization of actin. *J Mol Biol*(108):139-150.
- Wendel, H., and P. Dancker. 1987. Influence of phalloidin on both the nucleation and the elongation phase of actin polymerization. *Biochim Biophys Acta* 915(2):199-204.
- Wieland, T. 1986. Peptides of poisonous amanita mushrooms, Springer-Verlag, Heidelberg.
- Wriggers, W., and K. Schulten. 1999. Investigating a back door mechanism of actin phosphate release by steered molecular dynamics. *Proteins* 35(2):262-273.
- Wulf, E., A. Deboen, F.A. Bautz, H. Faulstich, and T. Wieland. 1979. Fluorescent phalloxin, a tool for the visualization of cellular actin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(9):4498-4502.
- Zanotti, G., L. Falcigno, M. Saviano, G. D'Auria, B.M. Bruno, T. Campanile, and L. Paolillo. 2001. Solid state and solution conformation of [Ala7]-phalloidin: a synthetic phalloxin analogue. *Chemistry* 7(7):1479-1485.