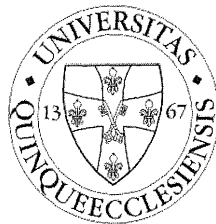


Ph.D. ÉRTEKEZÉS

**Funkcionális fehérjedinamikai vizsgálatok fluoreszcencia és
femtosekundumos időfelbontású tranziens abszorpciós
spektroszkópai módszerekkel**

Lukács András



Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Biofizikai Intézet

2007

A program megnevezése: Biokémia és molekuláris biológia

Programvezető: Dr. Sümegei Balázs

Alprogram B-130: Funkcionális fehérjedinamika vizsgálata biofizikai módszerekkel

Alprogramvezető: Dr. Somogyi Béla[†]

Témavezetők: Dr. Somogyi Béla[†]

Dr. Nyitrai Miklós

Dr. Marten H. Vos

Tartalomjegyzék

| | |
|--|----------|
| Köszönetnyilvánítás | 5 |
| Előszó | 7 |
| I. Az aktomiozin komplex dinamikájának vizsgálata fluoreszcencia spektroszkópai módszerekkel..... | 9 |
| 1. Bevezetés..... | 9 |
| 1.1 Az izom felépítése | 10 |
| 1.1.1 A szarkomer | 10 |
| 1.1.2 A miozin | 11 |
| 1.1.3 Az aktin | 14 |
| 1.1.4 Az aktomiozin kölcsönhatás. A kontrakciós ciklus..... | 16 |
| 2. Célkitűzések | 18 |
| 3. Módszerek és eszközök | 19 |
| 3.1 Fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer (FRET) | 19 |
| 3.2 A FRET alkalmazása helikális szimmetriával rendelkező fehérjék esetén..... | 22 |
| 3.3 Fehérje flexibilitásának karakterizálása FRET segítségével..... | 26 |
| 3.4 Fehérjepreparálás és fluoreszcens jelölés..... | 30 |
| 4. Eredmények és következtetések | 32 |
| 4.1 Konformációs eloszlások és távolságok a rigor aktomiozin komplexben | 32 |
| 4.2 Az aktomiozin komplex flexibilitásának vizsgálata..... | 39 |
| 4.3 Összefoglalás..... | 41 |
| 5. Irodalomjegyzék | 42 |

| | |
|---|----|
| II. A fotoliáz fotoaktivációjának vizsgálata femtoszekundumos tranziens abszorpciós mérések segítségével | 45 |
| 1. Bevezetés | 45 |
| 1.1 A fotoliáz..... | 45 |
| 1.1.1 <i>A fotoliáz szerkezete</i> | 46 |
| 1.2 Fotoreaktiváció illetve fotoaktiváció az E. coli fotoliázban..... | 49 |
| 2. Célkitűzések | 51 |
| 3. Módszerek és eszközök | 52 |
| 3.1 Fehérjepreparálás | 52 |
| 3.2 Tranziens abszorpciós mérések | 53 |
| 3.2.1 <i>Pumpa-próba módszer</i> | 53 |
| 3.2.2 <i>Titán-zafír lézer</i> | 55 |
| 3.2.3 <i>Nem-kollineáris parametrikus erősítő (NOPA)</i> | 62 |
| 3.2.4 <i>A pumpa-próba rendszer részletes bemutatása</i> | 67 |
| 3.3 Adatgyűjtés és kiértékelés..... | 70 |
| 4. Eredmények és következtetések | 74 |
| 4.1 A W382F mutáns | 74 |
| 4.1.1 <i>Tranziens abszorpciós mérések a W382F mutáns</i> | 76 |
| 4.1.2 <i>Javasolt reakciómechanizmus</i> | 77 |
| 4.2 A W359F mutáns | 78 |
| 4.2.1 <i>Tranziens abszorpciós mérések a W359F mutáns</i> | 78 |
| 4.2.2 <i>A reakciómechanizmusra vonatkozó következtetések</i> | 82 |
| 4.3 Összefoglalás..... | 86 |
| 5. Irodalomjegyzék | 88 |
| III. Összegzés..... | 93 |
| IV. Publikációk..... | 94 |

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek és mentoromnak Somogyi Béla professzornak azért a támogatásért, segítségért, amelyet az évek folyamán kaptam tőle. Lényegretörő gondolkodásmódja folyamatosan lenyűgözött; csodáltam és nagyon inspirált az a könnyedség, amellyel egy jelenséget pillanatok alatt matematikai formulákba öntött. Ő oltotta belém az érdeklődést a modern spektroszkópai technikák, műszerek iránt, ennek köszönhetően kerültem kapcsolatba az értekezésben ismertetett femtoszekundumos spektroszkópai eljárásokkal is. Mindezek mellett hálás vagyok neki azért is, hogy nemcsak a témavezetőm és főnököm volt, hanem barátok is lehettünk az évek során.

Köszönettel tartozom Nyitrai Miklósnak a segítségéért és támogatásáért, aki mellett megtanulhattam, hogy hogyan kell szisztematikusan és kitartóan tudományos munkát végezni.

Köszönöm közvetlen kollégáimnak Bódis Emőkének, Hild Gábornak, Visegrády Andrásnak, Visegrády Balázsnek a barátságát és segítségét, akikkel emlékezetes időt tölthettem a Biofizikai Intézetben.

Köszönöm Bányász Ákos kollégám szakmai segítségét illetve azt, hogy „kikövezte” előtűnk a párizsi utunkat.

Ezúton szeretném megköszönni Szipőcs Ferenc kollégám barátságát és segítségét, akitől sok optikai és lézeres „trükköt” tanulhattam meg.

Itt szeretnék köszönetet mondani Marten H. Vosnak, „francia” témavezetőmnek, hogy bevezetett a femtoszekundumos spektroszkópia varázslatos világába. Köszönettel tartozom azért a tudományos látásmóderért, amelyet elkezdhettem mellette megtanulni.

Köszönöm Klaus Brettel professzornak, hogy segített megismerkednem a fotoliázok működésével.

Köszönetet szeretnék mondani feleségemnek, Ibolyának szeretetéért és folyamatos támogatásáért, illetve azért, hogy korrektúrázta a kéziratot.

Hálával tartozom szüleim állandó segítségéért, akiknek támogatása nélkül a párizsi utunk nem valósulhatott volna meg.

Előszó

A fehérjék biológiai funkcióinak megértéséhez elengedhetetlen a szerkezet, illetve a dinamika ismerete. A szaklapok illetve a népszerűsítő kiadványok illusztrációit nézegetve kézzel fogható az a látványos előrehaladás, amely a fehérjeszerkezet meghatározásában az elmúlt évtizedekben történt. A szerkezet-meghatározás fejlődése mellett azonban a különböző spektroszkópai eljárások segítségével a fehérjedinamikai vizsgálatok területén is jelentős előrehaladás történt: a femtoszekundumos spektroszkópai módszerekkel például már atomi szinten vizsgálhatóak a fehérjékben bekövetkező változások.

Jelen munka két nagyobb részre osztható, amelyben a fehérjedinamikai vizsgálatok két egymástól jól elkülöníthető módszerét és az azzal elért eredményeimet mutatom be.

Az első részben a Pécsi Orvostudományi Egyetem Biofizikai Intézetében Dr. Somogyi Béla és Dr. Nyitrai Miklós irányításával a *Funkcionális fehérjedinamika vizsgálata biofizikai módszerekkel* című program keretében végzett munkámat kívánom bemutatni. Az ismertetett kísérletek során az aktomiozin komplexnek az izomkontrakcióban kulcsfontosságú szerepet betöltő dinamikai tulajdonságait vizsgáltuk fluoreszcencia spektroszkópai módszerekkel.

Az értekezés második részében a párizsi *Ecole Polytechnique, Laboratoire d'Optique et Biosciences* intézetben Dr. Marten H. Vos és Klaus Brettel irányításával a *Fehérjék funkcionális dinamikája* elnevezésű Marie Curie program keretében végzett munkámat mutatom be. Az ismertetett kísérletek során a DNS hibáit javító enzim, a fotoliáz fotoaktivációjának mechanizmusát vizsgáltuk femtoszekundumos transziens abszorpciós spektroszkópai módszerekkel.

Rövidítések és szimbólumok jegyzéke

| | |
|--------------------|---|
| 8-HDF | 8-hidroxi-7,8-didemetil-5-deazariboflavin |
| ADP | adenozin 5'-difoszfát |
| ATP | adenozin 5'-trifoszfát |
| BBO | β -bárium borát (kristály) |
| DAS | <i>decay associated spectra</i> |
| DTT | dithiothreitol |
| DTE | 1,4-Ditioeritritol |
| DMF | dimetil-formamid |
| E | fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer határfok |
| $E(t)$ | elektromos télerősség |
| EDTA | etilén diamin tetraecetsav |
| EGTA | etilén glikol bis(β -aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetraecet sav |
| ESA | <i>excited state absorption</i> |
| FAD | flavin adenin dinukleotid |
| FADH [•] | redox semleges FAD szabad gyök |
| FADH ^{•*} | gerjesztett FADH [•] |
| FADH ⁻ | kétszeresen redukált FAD |
| FRET | fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer |
| κ^2 | orientációs faktor |
| IAEDANS | 1,5-IAEDANS; 5-[2-(2-jodoacetamido)etilamino]-1-naftalénszulfon sav |
| IAF | 5-(jodoacetamido)fluorescein |
| MEA | 2-merkaptóetanol |
| MTHF | meteniltetrahidrofolát |
| NOPA | <i>noncollinear optical parametric amplification</i> |
| OPA | <i>optical parametric amplification</i> |
| P _i | szervetlen foszfát |
| ω | körfrekvencia |
| SHG | <i>second harmonic generation</i> |
| SVD | <i>singular value decomposition</i> |
| τ | fluoreszcencia élettartam |
| W | triptofán |
| W ^{•+} | oxidált triptofán szabadgyök |

I. Az aktomiozin komplex dinamikájának vizsgálata fluoreszcencia spektroszkópiai módszerekkel

1. Bevezetés

Az izomműködés mechanizmusát igen intenzíven kutatták az elmúlt században, és ez a lendület megmaradt az új század elején is. A tudományterület külön érdekessége számunkra, hogy az izomműködés kutatása igazi hungarikum, számos kulcsfelfedezés és eredmény kapcsolható magyar kutatókhoz.

A modern izomkutatás több forradalmi felfedezése köthető például Szent-Györgyi Alberthez és munkatársaihoz, akik a negyvenes évek elején – a háború alatt – mindössze néhány viszkoziméterrel, egy Pulfrich spektrofotométerrel és két centrifugával lefektették az izomműködés biokémiai alapjait.

Szent-Györgyi és munkatársai a legendás kísérletsorozatuk első lépéseként a miozin tulajdonságait vizsgálták, amikor arra lettek figyelmesek, hogy a „miozin” viszkozitása függ attól, hogy mennyi ideig vonták ki magas sótartalom mellett az izomból. Hosszú extrakció eredménye egy viszkózus fehérje, amelynek viszkozitása ATP hozzáadását követően lecsökkent. Straub ismerte fel, hogy a viszkozitás megnövekedése annak a következménye, hogy a miozin mellett egy új fehérjét is sikerült kivonni az izomból, amelyet aktinnak¹ nevezett el. Szent-Györgyi ismerte fel, hogy az aktinból és miozinból álló komplex ATP hatására összehúzódik, míg a miozin önmagában nem, vagyis az izomkontrakcióhoz az aktin és a miozin kölcsönhatására van szükség. Ez a felfedezés forradalmasította az izomkutatást, amelynek következtében *in vitro* körülmények között is sikerült az izomkontrakciót reprodukálni.

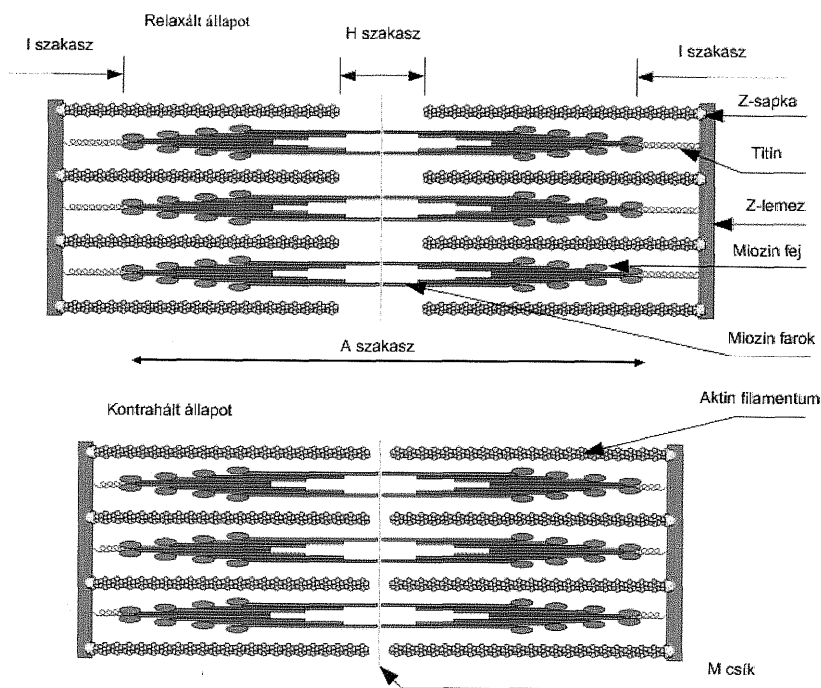
Az említett korszakalkotó eredmények és az ahhoz vezető kísérletek publikálása külön tudománytörténeti érdekesség. A kísérleteket *Studies from the Institute of Medical Chemistry University Szeged*² címen, angol nyelven nyomtatták ki kis példányszámban, így Magyarország határain kívül ezeknek a publikációknak a léte nem volt ismert. Szent-Györgyi az eredményeket végül egy kéziratban foglalta össze és még a háború alatt, 1945-ben eljutatta Svédországba, ahol először az *Acta Physiologica Scandinavica*-ban jelent meg³, majd 1951-ben könyv alakban⁴.

A következő fejezetekben tárgyalt izomfehérjéket tehát több mint fél évszázaddal korábban is vizsgálták már magyar kutatók. Az ő munkáikra is építve, új módszerekkel próbáltunk új ismereteket szerezni az izomműködésről.

1.1 Az izom felépítése

1.1.1 A szarkomer

A későbbiekben ismertetett kísérleteket kivétel nélkül harántcsíkolt izomból nyert fehérjéken végeztük. A kontraktilis fehérjemátrix morfológiai alapegysége a szarkomer, amely Z-lemeztől Z-lemezig tart. A harántcsíkolt izom szarkomerjei vékony filamentumokból valamint vastag filamentumokból állnak. A vékony filamentumok három különböző típusú fehérjéből állnak (aktin, tropomiozin, illetve troponin), és Z-lemeztől a szarkomer közepéig érnek, hosszúságuk 1 μm körüli. A vastag filamentumok miozin molekulákból állnak, és a szarkomer közepén helyezkednek el, hosszúságuk körülbelül 1,6 μm . A szarkomer különböző szakaszainak osztályozása a fénymikroszkópos felvételek alapján történt meg, ennek megfelelően a nevezéktan is a mikroszkópfelvételek értelmezését követi.



I.1. ábra A szarkomer fénymikroszkópos képe és vázlatos felépítése.

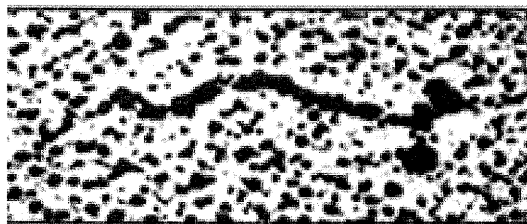
A Z-lemezhez közel eső régió az I (izotróp) zóna, itt helyezkednek el a vékony filamentumok. A szarkomer nagy részét kitölti az úgynevezett A (anizotróp) zóna, amelyen a vékony és vastag filamentumok átfedése látható. A szarkomer centrális részében helyezkedik el a H-zóna, amelyben már csak vastag filamentumok vannak jelen, a H-zóna közepe pedig az úgynevezett M-csík, amely a vastag filamentum miozinefejeket nem tartalmazó része.

A jelenleg is elfogadott modell szerint az izomösszehúzódás során az aktin és a miozin filamentumok elcsúsznak egymáshoz képest („sliding filaments”), ez vezet a szarkomer kontrakciójához. A kontrakció során sem a miozin, sem az aktin filamentumok hossza nem változik. Az összehúzódáshoz szükséges energiát az ATP hidrolízisekor felszabaduló energia biztosítja⁵.

1.1.2 A miozin

A vázizmot alkotó összes izomfehérje-mennyiség 40-50%-át teszik ki a miozin molekulák, 1 gramm vázizomban mintegy 70-100 mg miozin található⁶. A miozin egy globuláris fehérje, amely alacsony sókoncentráció ($\leq 0,03$ M KCl) mellett nem, magas sókoncentrációk ($\geq 0,6$ M KCl) esetén azonban jól oldódik; ennek megfelelően 0,6 M KCl oldat segítségével ki lehet vonni az izomból.

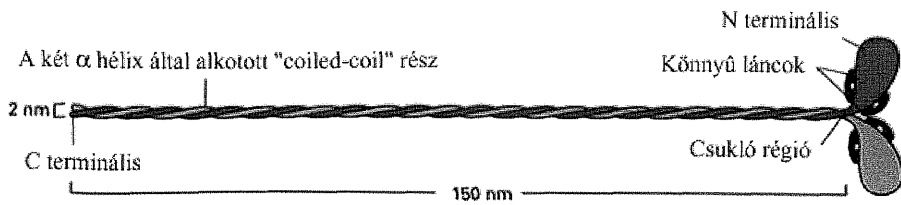
Szerkezeti szempontból a miozin egy hosszú, aszimmetrikus molekula, amelyen első ránézésre megkülönböztethető egy feji és egy farki rész.



I.2. ábra Miozin molekula elektron mikroszkópos felvétele.

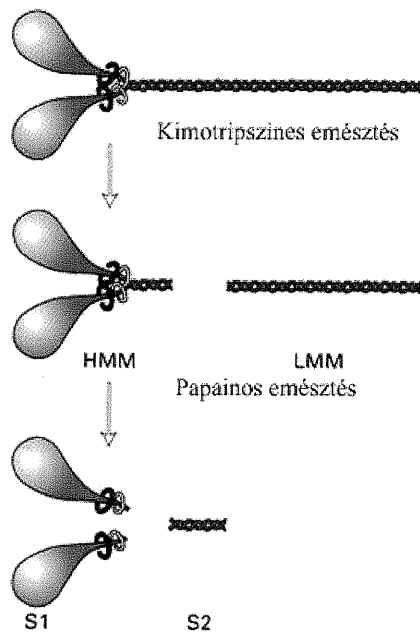
Erős denaturáló ágensek (5 M HCl vagy 8 M urea) jelenlétében a miozin hat polipeptid lánca ra esik szét: két nehéz lánca, amelyek tömege egyenként 200 000 Da körüli, illetve négy könnyűlánca, amelyek közül kettőnek a tömege 20 000 Da, kettőnek pedig 15 000 Da. A két nehéz lánca egy kettős hélixet alkot, amelynek egyik

végén mindkét lánc globuláris alakot vesz fel. Ezek a miozin fejei, amelyekhez hozzákapcsolódnak a könnyűláncok, fejenként kettő-kettő.



I.3. ábra A miozin molekula szerkezete. A nehéz láncok C terminális része „coiled-coil” típusú polimert alkot, az N terminális rész globuláris struktúrája alkotja a miozin fejeit.

Proteolitikus emésztéssel a miozin több fragmentumra bontható. Kimotripszines emésztést követően kapjuk a 350 kDa körüli nehéz (HMM, „heavy meromyosin”) és a 150 kDa körüli könnyű meromiozint (LMM, „light meromyosin”).

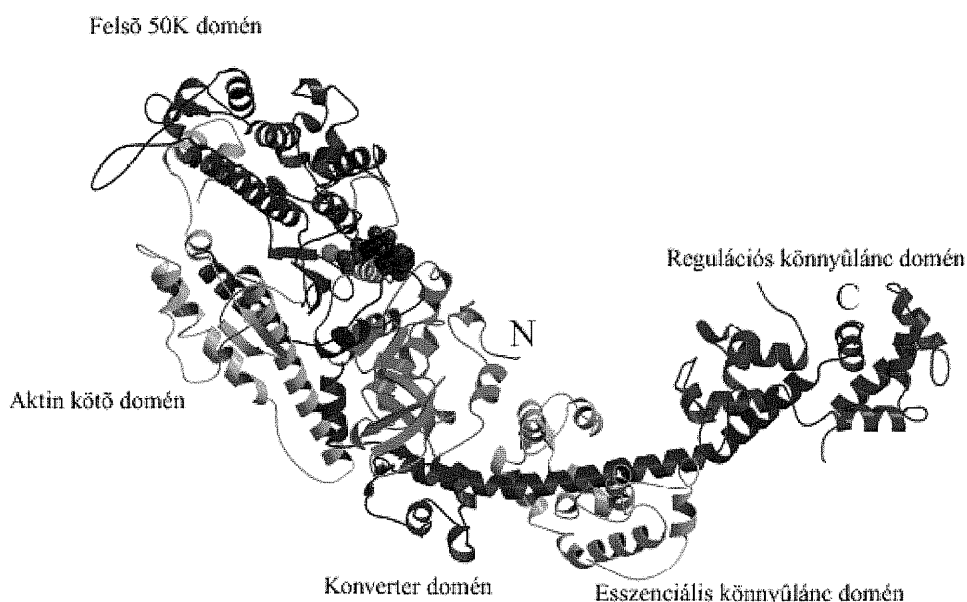


I.4. ábra A miozin proteolitikus emésztése során kapott fragmentumok. A HMM és az S1 önmagában is képes az aktin filamentum mozgására.

A HMM papainnal történő emésztéssel tovább bontható az S1 (subfragmentum 1) és S2 (subfragmentum 2) fragmensekre. Az emésztés során kapott alkotók közül a HMM-nek és az S1-nek jut kitüntetett szerep, mindkét komponens képes ugyanis az

aktinhoz kötődni, rendelkezik ATPáz aktivitással, valamint képes az aktin filamentum mozgatására.

A miozinnak azt a tulajdonságát, hogy ATP-t hidrolizál, 1939-ben fedezte fel egy orosz kutató-páros, Engelhardt és Ljubimova⁷, akik *mechanokémiának* nevezték el azt a folyamatot, amelynek során a miozin az ATP által „szállított” energiát mechanikai energiává alakítja. Érdekes módon Engelhardt és Lyubimova felefedezése heves elutasítást váltott ki több neves tudós részéről, mint például a Nobel-díjas Cori illetve a szintén Nobel-díjas Meyerhof, akik nem tudták elfogadni, hogy egy akkora molekula, mint a miozin enzimként funkcionál és ezért nagy és végül sikertelen erőfeszítéseket tettek, hogy a miozin ATPáz aktivitására alternatív választ találjanak.



I.5. ábra A miozin-S1 röntgenkristallográfiás szerkezete.

Az S1 további emésztése során sikerült tisztázni, hogy ez a fragmens a miozin legkisebb olyan aktív egysége, amely képes az aktin mozgatására⁸. Az ezzel kapcsolatos kísérletek során ugyanis kiderült, hogy bár az S1 tovább hasítható egy motor doménre és egy nyaki regulációs doménre, a motor domén ATPáz aktivitása ellenére sem képes már az aktin filamentumok mozgatására⁹.

A fej két ellentétes oldalán helyezkedik el az aktin-kötő és a nukleotid-kötő régió, amelyek két hélixen keresztül kommunikálnak egymással. A nyaki régióban a C terminálshoz közel található egy 85 Å hosszú α -hélix, amelyhez kötődik a regulációs

könnyűlánc, illetve az esszenciális könnyűlánc. Ezek együttesen úgy hatnak, mint egy emelőkar – innen az emelőkar modell elnevezés (a modellről a kontrakcióról szóló fejezetben lesz szó) – amely a nukleotid-kötő régió kis konformációváltozásait nagy szögű elmozdulásokká erősíti.

A miozin biológiai szempontból egyik legfontosabb tulajdonsága, hogy képes aktint kötni, az így létrejött komplex elnevezése aktomiozin. Az aktin kötés erősen specifikus, más fehérje nem képes az aktin helyettesítésére. Élettani szempontból ennek a kötésnek kiemelkedő jelentősége van: ha az aktomiozin komplex létrejön, az izom erő kifejtésére képes.

1.1.3 Az aktin

Az aktint 1942-ben fedezték fel, amikor Straub és munkatársai arra lettek figyelmesek, hogy ha a nyúlból preparált miozint csak rövid ideig vonták ki magas sókoncentráció (0,6 M KCl) mellett, akkor a kapott fehérje viszkozitása alacsony volt. Ha azonban a ledarált rostokat egy napon keresztül tárolták a hideg szobában, akkor az eredmény egy magas viszkozitású fehérjeoldat volt. Straub felismerte: az a különbség a két „miozin” között (most már tudjuk, hogy a második esetben aktomiozin komplexet kapott), hogy egy új fehérjét sikerült kivonnia az izomból, amely viszkózussá teszi a miozint. Straubnak később sikerült az izolálást tökéletesítenie: az eljárás során acetonnal tisztította meg a kivont aktomiozin komplexet. Az általa kidolgozott módszer képezi az aktin izolálásának az alapját mind a mai napig¹. Straub a későbbiekben azt is felismerte, hogy az aktinnak van egy kevésbé viszkózus, illetve egy erősen viszkózus formája. Előbbi a monomer aktin (G-aktin), amelyet fiziológias mennyiségű só hozzáadásával lehet polimerizálni, ennek az eredménye a viszkózus filamentális aktin (F-aktin). Jóval Szent-Györgyiék kísérleteit követően derült fény arra, hogy az aktin nemcsak az izomban található meg, hanem például a citoskeleton egyik építő eleme, ennek megfelelően az eukarióta sejtekben előforduló egyik leggyakoribb fehérje.

A karakterizálás során sikerült megállapítani, hogy az aktin monomer egy 43 kDa molekulatömegű globuláris fehérje, amely két fő doménból áll. Mindkét domén tovább osztható két-két szubdoménre.

A két fő domén között található az úgynevezett kation- és nukleotid-kötő hasadék, amelyben két vegyértékű kationok (fiziológias esetben Mg^{2+} , *in vitro* körülmények között az aktinpreparálás oldatai és a kationokhoz való affinitás miatt Ca^{2+}) illetve ATP, ADP.P_i, valamint ADP helyezkedhet el. Nukleotidmentes környezetben az aktin denaturálódik.



I.6. ábra A G-aktin szerkezete. Kékkel jelöltük az I-es domént, pirossal pedig a II-es domént. Protein Data Bank kód: 1ATN.

Fiziológias sókoncentrációk mellett az aktin gyorsan polimerizálódik, egy kettős hélixet alkotva. Az aktin filamentumok mellett mindig található egy olyan aktin populáció, amely monomer formában van jelen. Egyensúly esetében a monomerek koncentrációja a kritikus koncentráció, amely alatt az aktin már nem képes polimerizálódásra. A kritikus koncentráció értéke több paramétertől (például a nukleotidok és a kationok koncentrációjától) függ.

Straub elképzelése szerint az aktin polimerizáció szerephez jut az izomösszehúzóds esetén, erre azonban hosszú évtizedekig nem sikerült bizonyítékot találni; 2001-ben sikerült igazolni, hogy a polimerizáció simaizmokban végbemegy¹⁰.



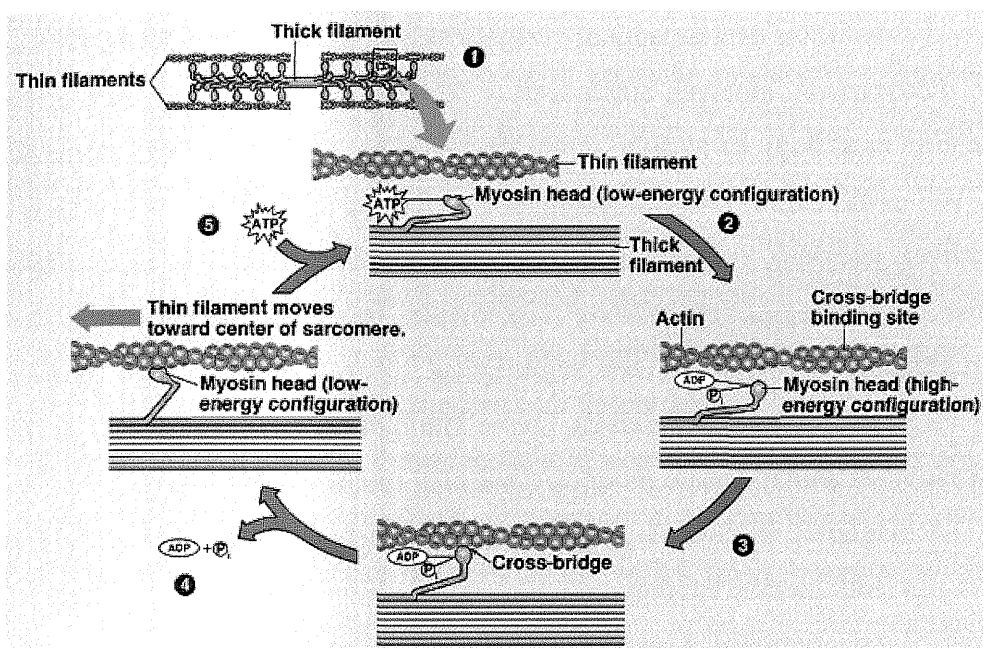
I.7. ábra Az F-aktin egy bal menetes hélixet alkot, amelyben 13 aktin monomer követi egymást hat fordulatban, 36 nm-es periódussal. A menetemelkedés monomerenként 2.75 nm.

1.1.4 Az aktomiozin kölcsönhatás. A kontrakciós ciklus

Az aktomiozin kölcsönhatás leírására a legelfogadottabb a lengő emelőkar modell („swinging lever arm”), amely szerint az S1 farki része az ATP hidrolízis következtében létrejövő orientációs változások során egyfajta emelőként húz egyet az aktin filamentumon.

Nukleotidmentes állapotban az S1 az aktinhoz erősen kötött (rigor) állapotban található, miközben 45°-os szöget zár be az aktin filamentummal. Az S1 nukleotid-kötő zsebe ilyenkor nyitott állapotban található. A miozin fejek aktin-kötésének affinitása nukleotidfüggő; a rigor állapottal összevetve az ATP állapot affinitása erősen lecsökken,

aminek következtében a miozin fej disszociál az aktin filamentumról, és a nukleotid-kötő zseb zárt állapotba kerül. Az ATP hidrolízist követően a nukleotid zsebben ADP és inorganikus foszfát (P_i) lesz jelen, a fej pedig elfordul és gyengén hozzákötődik az aktin filamentumhoz; a nukleotid-kötő zseb újra nyitott állapotba kerül, ami lehetővé teszi a foszfát disszociációját.



Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

1.8. ábra A kontrakciós ciklus. Forrás: <http://www.cptc.ctc.edu/library>.

Ezt követően a nukleotid-kötő zsebben csak ADP található, aminek következtében az aktin-miozin kötés erősebb lesz, mivel az ADP állapotban a miozin aktinhoz való affinitása meghaladja az ATP és az ADP.Pi állapot affinitását. A következő lépésben (ez a húzási szakasz) disszociál az ADP, ami az S1 konverter doménjának közel 70°-os elfordulásával jár, amely pedig az emelőkar elfordulásához vezet. Ez vezet az aktin filamentum mintegy 10 nm-es elmozdulásához.

2. Célkitűzések

Tekintettel arra, hogy az izomösszehúzódás során kiemelt szerep jut az aktomiozin komplexben bekövetkező konformációváltozásoknak, lényeges ismernünk az aktomiozin komplex különböző régióinak dinamikai paramétereit az egyes fázisokban. Munkám célja az aktomiozin komplex katalitikus doménjének, illetve a könnyűlánc-kötő domén flexibilitásának a vizsgálata volt, rigor állapotban.

A flexibilitás és a dinamikai vizsgálatok elvégzéséhez első lépésként találni kell olyan módszereket, amelyek alkalmasak a fehérjedinamikai paraméterek jellemzésére. Tekintettel arra, hogy az aktin monomeren Cys-374, az S1 katalitikus doménon a Cys-707, az esszenciális könnyűláncon pedig a Cys-177 nagy reaktivitású cisztein szelektíven jelölhető, fluoreszcencia spektroszkópiai módszereket lehet alkalmazni. A kérdéses fehérjerégiók egymáshoz viszonyított helyzetét fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer (FRET) mérések segítségével lehet jellemezni. Első lépésként tehát olyan FRET módszerek alkalmazása illetve kidolgozása a cél, amelyek segítségével jól jellemezhetőek a kölcsönható fehérjék dinamikai tulajdonságai.

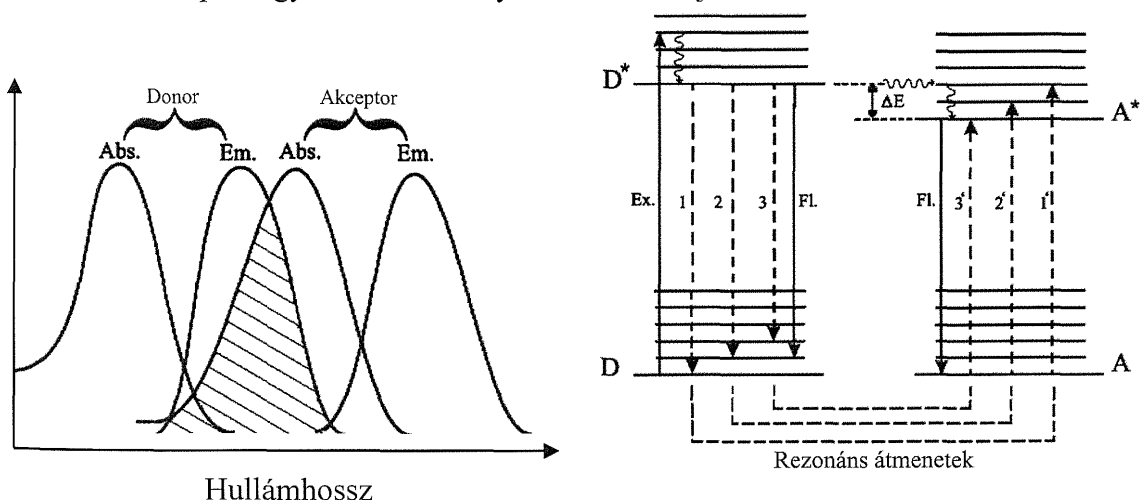
A megfelelő módszerek megtalálását követően annak a feltérképezése a feladat, hogy a nukleotidmentes állapotban (amelynek esetében a miozin fej erős kötésben van az aktin filamentummal) a miozin-S1 katalitikus doménje, illetve könnyűlánc-kötő doménje milyen dinamikai tulajdonságokkal rendelkeznek.

3. Módszerek és eszközök

3.1 Fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer (FRET)

Az izomműködésben kölcsönható fehérjék működésének vizsgálata során fontos információ az egyes fehérjekomponensek egymástól való távolsága, illetve egymáshoz viszonyított orientációja. Ezeknek a paramétereknek a meghatározására alkalmas a fluoreszcencia spektroszkópiai vizsgálatok egyik speciális módszere, a fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer (FRET). A fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer jelenségéről elsőként Jean Perrin számolt be 1927-ben¹¹; ezt követően fia, Francois Perrin adott kvantummechanikai magyarázatot az azonos molekulák között fellépő homotranszferről¹². A fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer jelenségének teljes körű leírása Theodore Förstertől származik, aki 1948-ban jelentette meg híres cikkét, amely a FRET kvantummechanikai magyarázatát tartalmazta¹³.

Röviden összefoglalva, a fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer egy dipól-dipól csatoláson keresztül megvalósuló szinglet-szinglet energiatranszfer, amelynek során az energia-donor molekula foton emisszió nélkül ad át energiát az akceptor molekulának. A transzfer megvalósulásának feltételei: i) az energia donor lumineszcens; ii) a donor emissziós spektruma és az akceptor abszorpciós spektruma között van átfedés; iii) a donor-akceptor távolság nem halad meg egy felső határt (~10 nm); iv) a donor és az akceptor egymáshoz viszonyított orientációja kedvező.



I.9. ábra A fluoreszcencia rezonancia transzfer feltétele a donor emissziós spektrumának és akceptor abszorpciós spektrumának az átfedése. Folyamatos vonallal a radiatív, szaggatott vonallal pedig a nem radiatív átmenetek láthatóak.

A transzfer sebességi állandója a következőképpen számítható:

$$k_T(r) = \frac{Q_D \kappa^2 (9000 \ln 10)}{\tau_D r^6 128 \pi^5 N_A n^4} \int_0^\infty F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda, \quad (I.1)$$

ahol Q_D a donor kvantumhatásfoka, τ_D pedig a donor fluoreszcencia élettartama akceptor nélkül; r a donor-akceptor távolság; κ^2 az orientációs faktor, a donor-akceptor egymáshoz viszonyított orientációját jellemző paraméter, amelyet a számítások során legtöbbször az izotróp eloszlásra jellemző $2/3$ értékkel közelítünk; n a közeg törésmutatója, amelynek értéke vizes oldatok esetében 1.4; N_A pedig az Avogadro szám; F_D a korrigált fluoreszcencia intenzitás a λ és $\lambda + \Delta\lambda$ tartományon, ε_A az akceptor extinció állandója $M^{-1} \text{cm}^{-1}$ -ben megadva. Mivel $\int_0^\infty F_D(\lambda) d\lambda = 1$, az (1)-es egyenletben szereplő integrál a következő formában is felírható:

$$J(\lambda) = \frac{\int_0^\infty F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{\int_0^\infty F_D(\lambda) d\lambda}, \quad (I.2)$$

ahol $J(\lambda)$ a donor emissziós és az akceptor abszorpciós spektrumának az átfedését jellemző átfedési integrál.

Annak érdekében, hogy az (1)-es egyenletet egyszerűbb alakban alkalmazhassuk, bevezetjük az R_0 értéket, amely az a donor-akceptor távolság, amelynek esetében $k_T = \frac{1}{\tau_D}$, vagyis a molekulák fele energiáttranszferrel, a másik fele pedig fluoreszcencia

emisszióval relaxálódik. Ebben az esetben

$$R_0^6 = \frac{Q_D \kappa^2 (9000 \ln 10)}{128 \pi^5 N_A n^4} \int_0^\infty F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda. \quad (I.3)$$

Bár a (3)-as egyenlet első ránézésre továbbra is igen komplexnek tűnik, a legtöbb komponens egyszerűen behelyettesíthető, és a következő alakot veszi fel:

$$R_0^6 = 8.79 \times 10^{-25} \kappa^2 n^{-4} Q_D J(\lambda) [\text{cm}^6], \quad (I.4)$$

ahol Q_D egy referencia ismeretében egyszerűen meghatározható, $J(\lambda)$ pedig a mért emissziós és abszorpciós spektrumok alapján könnyen számítható. R_0 ismeretében tehát az energiáttranszfer sebességi állandója a következő alakra egyszerűsíthető:

$$k_T = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6 \quad (\text{I.5})$$

Ennek megfelelően az energiatranszfer hatásfoka a transzfer sebességi állandója illetve a radiatív és a nem radiatív folyamatok sebességi állandói összegének hányadosa:

$$E = \frac{k_T}{\tau_D^{-1} + k_T} \quad (\text{I.6})$$

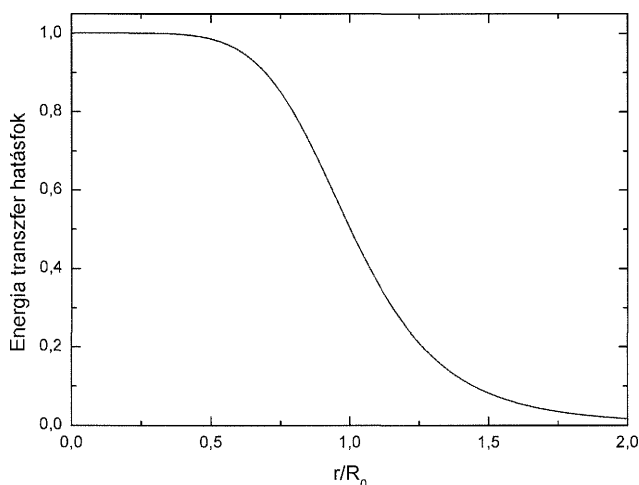
Az (5)-ös egyenletből behelyettesítve k_T értékét adódik, hogy:

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6}, \quad (\text{I.7})$$

A gyakorlatban az E értéke a steady-state spektrumokból illetve a fluoreszcencia élettartamokból határozható meg:

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D}, \quad (\text{I.8})$$

ahol τ_{DA} és F_{DA} az akceptor jelenlétében, a τ_D és F_D pedig az akceptor hiányában mért fluoreszcencia élettartam, illetve fluoreszcencia intenzitás.



I.10. ábra A FRET hatásfokának távolságfüggése.

A (7)-es egyenletből jól látszik, hogy az energiatranszfer hatásfoka erőteljesen függ a donor-akceptor távolságtól; ha r értéke megközelíti a $2R_0$ -t, az energiatranszfer gyakorlatilag eltűnik. A módszert ennek megfelelően a 10-100 Å tartományban lehet alkalmazni. A donor-akceptor pár r^{-6} távolságfüggése miatt a FRET-et molekuláris vonalzóknak is szokták nevezni^{14, 15}, amelynek segítségével például a specifikusan jelölt fehérjerégiók közötti távolság meghatározható.

3.2 A FRET alkalmazása helikális szimmetriával rendelkező fehérjék esetén

Az általunk kidolgozott módszer a fehérjékben fellelhető helikális szimmetriákat használja ki, segítségével távolságokat tudunk meghatározni, illetve következtetéseket tudunk levonni a fehérje konformációs állapotára vonatkozóan. A módszert, amelyet eredetileg aktin filamentumra dolgoztak ki¹⁶, mi az aktomiozin komplex-alkalmazásokhoz fejlesztettük tovább¹⁷, de valójában bármilyen helikális struktúra esetén alkalmazható. A módszert az aktomiozin komplex esetében fogom ismertetni.

Egy donor – egy akceptor esetében a FRET hatásfok az alábbiak szerint számítható:

$$E = \frac{(R_0 / R)^6}{1 + (R_0 / R)^6} \quad (I.9)$$

Az általunk vizsgált esetben a donor egy aktin-kötő fehérjén helyezkedett el, az akceptorok pedig az aktin protomereken. Ennek megfelelően egy donor több akceptorral állt kölcsönhatásban. Ebben az esetben a megfigyelt FRET hatásfok az individuális FRET hatásfokok összege¹⁸, és az alábbi módon számítható:

$$E = \frac{\sum_{i=1}^N (R_0 / R_i)^6}{1 + \sum_{i=1}^N (R_0 / R_i)^6} \quad (I.10)$$

ahol R_i az egyedi donor-akceptor távolságokat jelenti, N pedig az akceptorok számát.

Az egyszerűség kedvéért a transzferhatásfok kiszámítása során csak a donorhoz legközelebb fekvő öt monomeren levő akceptor járulékát vettük figyelembe.

Az egyedi R_i távolságok kiszámításakor vettük figyelembe az aktin helikális szerkezetét: mivel az F-aktint egy 13/6 geometriájú hélixként lehet jellemezni (6 fordulatban 13 monomer követi egymást), amelyben két egymást követő aktin monomer egymáshoz képest 166°-kal fordul el, köztük levő távolság (a z tengely mentén) pedig 27,5 Å.

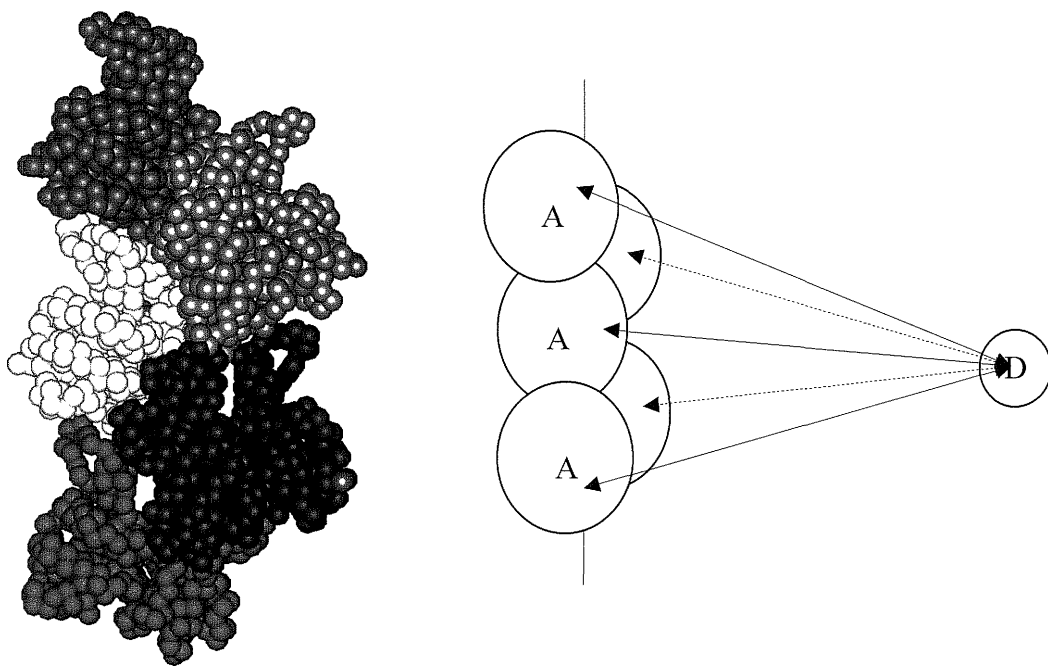
Ennek megfelelően az akceptorok térbeli elhelyezkedése könnyen felírható; az aktin filamentum képzeletbeli tengelyéhez rögzített Descartes koordinátarendszerben az akceptorok x, y, z koordinátája a következőképpen számítható:

$$x_i = r \cos((3-i)166^\circ) \quad (\text{I.11a})$$

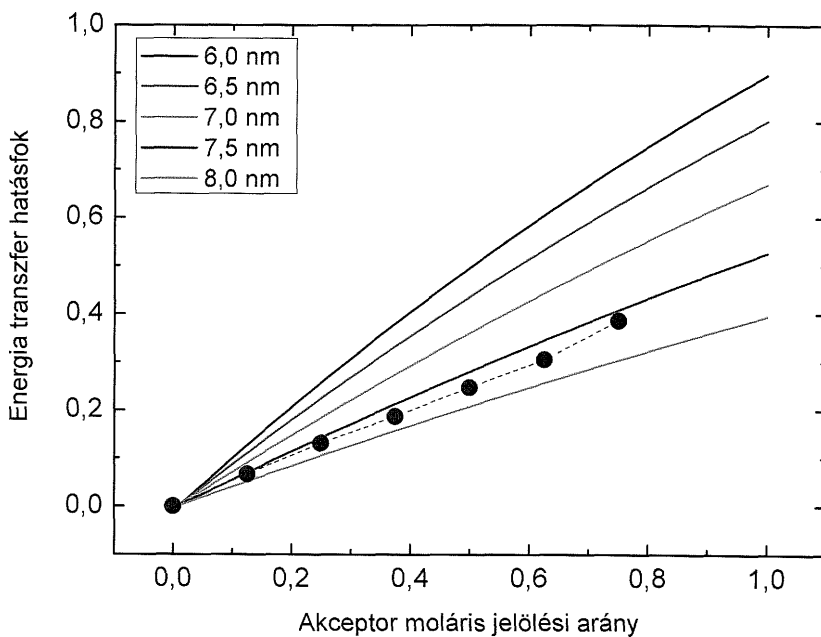
$$y_i = r \sin((3-i)166^\circ) \quad (\text{I.11b})$$

$$z_i = (3-i)27.5 \text{ \AA}, \quad (\text{I.11c})$$

ahol r az akceptor radiális koordinátája, vagyis a z tengelytől mért távolsága. Esetünkben r értéke a röntgenkristallográfiás adatokból ismert volt ($\sim 25 \text{ \AA}$), az akceptorok ugyanis az aktin monomer 374-es ciszteinjéhez kötődtek specifikusan.



I.11. ábra Az aktin filamentum röntgen kristallográfiás szerkezete, valamint egymást követő öt monomer távolsága egy tetszőleges donor molekulától.



I.12. ábra Számított energiatranszfer hatásfok az akceptor moláris arány függvényében abban az esetben amikor a donor a hélix tengelyétől különböző távolságokra helyezkedett el. A fekete színű pontok egy valós FRET mérés során mért transzferhatásfok értékek az akceptor moláris jelölési arány függvényében.

Az energiatranszfer hatásfokának számításakor figyelembe kell venni a monomerek betöltöttségét, vagyis azt, hogy az adott monomeren található-e akceptor vagy sem. A lehetőségek száma egy kis módosítással binomiális eloszlást követ; az energiatranszfer hatásfokának kiszámításához ugyanis nem kell figyelembe vennünk azt az esetet, amikor egyetlen monomeren sem helyezkedik el akceptor. Ennek megfelelően összesen 31 esetet különböztethetünk meg.

Az akceptor moláris arány (g) ismeretében annak a valószínűsége, hogy k számú monomer van megjelölve, a következő módon számítható:

$$p_k = g^k (1-g)^{5-k}, \quad (\text{I.12})$$

ahol k a betöltött monomerek száma, g pedig a jelölési arány.

Az energiatranszfer hatásfoka g akceptor jelölési arány esetében ennek megfelelően:

$$E_g = \sum_{k=1}^5 p_k E_k, \quad (\text{I.13})$$

ahol E_k a k számú jelölt monomer esetében számított energiatranszfer hatásfok, p_k pedig az elrendezés valószínűsége.

A I.12. ábrán látható az energiatranszfer hatásfokának függése a jelölési aránytól, különböző távolságok esetében; az ábrán a donornak a hélix tengelyétől mért távolsága van feltüntetve. Az ábrán egy valós mérést is feltüntettem, amelynek során a donor a miozin-S1 707-es ciszteinjéhez kapcsolódott. Az ábrán látható, hogy a mért és a számított energiatranszfer hatásfok értékek közötti eltérés minimalizálásával meg lehet határozni a donor molekula helyzetét a tengelyhez képest.

Azzal a feltételezéssel, hogy a donor és az akceptor molekulák közötti távolság nem rögzített, hanem egy eloszlást követ, a módszer a fehérjék heterogenitásának jellemzésére is alkalmassá tehető¹⁹.

A donor-akceptor távolságot az $\omega(R)$ Gauss-eloszlás segítségével közelítettük a következő módon:

$$\omega(R) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left[-\frac{(R-R_c)^2}{2\sigma^2}\right], \quad (\text{I.14})$$

ahol R_c a tengelytől való távolság középértéke, σ pedig a félértékszélessége.

Ennek megfelelően az energiatranszfer hatásfokának számítása a következőképpen módosul:

$$E_g = \sum_{jk} p_k \omega(R_j) E_{jk}. \quad (\text{I.15})$$

A módszer alkalmazása a gyakorlatban úgy történt, hogy az akceptor moláris arány függvényében mért fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer hatásfok értékekre illesztve egy *MatLab* programnyelvben írt algoritmus segítségével kerestük azokat az R_c és σ értékeket, amelyek esetén a mért értékektől való eltérés a legkisebb volt.

3.3 Fehérje flexibilitásának karakterizálása FRET segítségével

Az előző fejezetben említett módszer mellett egy másik FRET módszert is alkalmaztunk a vizsgálataink tárgyát képező fehérjék dinamikai tulajdonságainak feltérképezésére. A Somogyi professzor és munkatársai által kidolgozott²⁰ majd kiterjesztett²¹ módszer előnye, hogy nemcsak speciális szimmetriákkal rendelkező fehérjék esetén alkalmazható és modellfüggetlen; az előző módszerrel szemben viszont hátránya, hogy csak kvalitatív képet ad a fehérje flexibilitásáról.

A módszer azt a tényt használja ki, hogy a FRET mérések során az energiatranszfer hatásfokon keresztül mért (E) k_t sebességi állandó valójában egy átlag érték, amely tartalmazza a donor-akceptor fluktuációját.

$$\langle k_t \rangle = ck_f \langle R^{-6} \kappa^2 \rangle \quad (\text{I.16})$$

Könnyen kimutatható, hogy ha a donor-akceptor pár fluktuál egymáshoz képest, k_t értéke megnő a „fagyott”, vagyis a fluktuáció nélküli esethez képest. Azt az egyszerű esetet tekintve, amikor az akceptor az $(R-r)$ és az $(R+r)$ értékek között végez oszcilláló mozgást nulla idő alatt, k_t átlagértéke a következőképpen alakul:

$$\langle k_t \rangle = \frac{1}{2} cR^{-6} \left[\left(1 - \frac{r}{R} \right)^{-6} + \left(1 + \frac{r}{R} \right)^{-6} \right] \quad (\text{I.17})$$

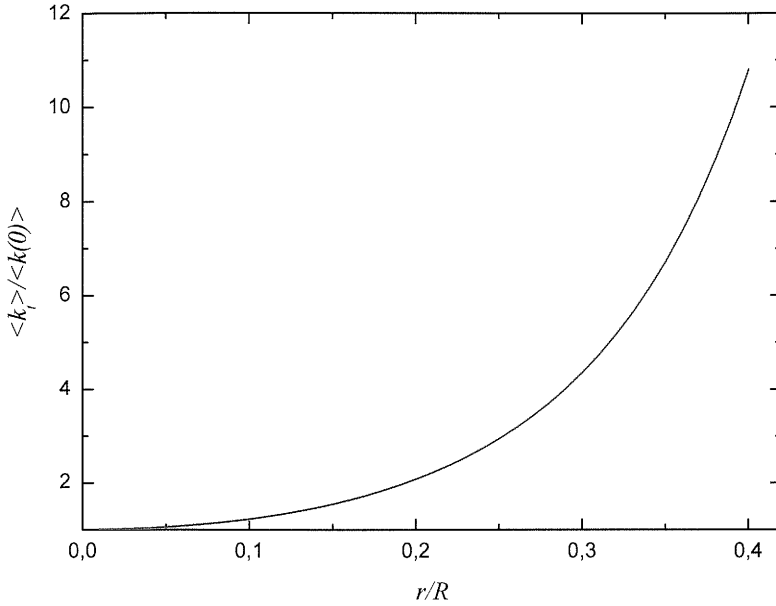
„Fagyott” esetben, vagyis amikor a donor-akceptor távolság nem fluktuál, az energiatranszfer sebességi állandója :

$$\langle k_0 \rangle = cR^{-6} \quad (\text{I.18})$$

Ennek megfelelően az oszcilláló és a „fagyott” rendszerben végbemenő energiatranszfer sebességi állandóinak az aránya a következő:

$$\frac{\langle k_t \rangle}{\langle k_0 \rangle} = \frac{1}{2} \left[\left(1 - \frac{r}{R} \right)^{-6} + \left(1 + \frac{r}{R} \right)^{-6} \right] \quad (\text{I.19})$$

Jól látszik (I.13.ábra), hogy nagyobb fluktuáció esetén $\langle k_t \rangle$ értéke is nagyobb, amiből arra következtethetünk, hogy $\langle k_t \rangle$ mérésével nyomon tudjuk követni a donor-akceptor pár fluktuációjának változását. A fluktuáció változtatásának legegyszerűbb kísérleti módja a hőmérséklet megváltoztatása.



I.13. ábra $\langle k_t \rangle$ függése a donor-akceptor távolság fluktuációjától.

Látszik, hogy k_t meghatározása a fluktuáció nélküli esetben visszavezethető a FRET hatásfokának illetve a donornak az akceptor jelenlétében mért kvantumhatásfokának (Φ_{DA}) mérésére.

Mivel $\Phi_{DA} = \frac{k_f}{k_f + k_t + k_0}$ és $E = \frac{k_t}{k_f + k_t + k_0}$, bevezethetünk egy paramétert, amely arányos k_t -vel:

$$f = \frac{E}{\Phi_{DA}} = \frac{k_t / (k_f + k_t + k_0)}{k_f / (k_f + k_t + k_0)} = \frac{k_t}{k_f} \quad (\text{I.20})$$

Valós esetben f kiszámításánál azonban figyelembe kell vennünk, hogy a mért energiatranszfer hatásfok, illetve a kvantumhatásfok az egyedi donor-akceptor párok esetében megfigyelhető értékek átlagai.

Ennek megfelelően:

$$f = \frac{\langle E \rangle}{\langle \Phi_D \rangle} = \frac{\langle k_t / (k_f + k_{ti} + k_{0i}) \rangle}{\langle k_f / (k_f + k_{ti} + k_{0i}) \rangle}, \quad (\text{I.21})$$

ahol k_{ti} és k_{i0} az i . donor-akceptor párhoz tartozó sebességi állandók.

Feltételezve, hogy $k_{ii} \ll k_f + k_{oi}$, k_{ii} és $1/(k_f + k_{ii} + k_{oi}) = \tau_{DAi}$ független változóknak tekinthetők.

Ilyen módon f a következő alakban írható fel:

$$f = \frac{\langle k_{ii} \tau_{DAi} \rangle}{\langle k_{ii} \tau_{DAi} \rangle} = \frac{\langle k_{ii} \rangle \langle \tau_{DAi} \rangle}{k_f \langle \tau_{DAi} \rangle} = \frac{1}{k_f} \langle k_{ii} \rangle, \quad (I.22)$$

ahol azt feltételeztük, hogy k_f értéke a fluktuáció alatt nem változott meg.

A kapott egyenletet a (8)-as egyenlettel összevetve azt kapjuk, hogy

$$f = c \langle R_i^{-6} \kappa_i^2 \rangle \quad (I.23)$$

Egy donor – egy akceptor párok esetében tehát f paraméter a donorral és akceptorral jelölt fehérjematrix fluktuációinak jellemzésére alkalmas paraméter²⁰.

Lényeges kérdés, hogy használható-e az f paraméter az előző fejezetben vázolthoz hasonló esetekben, amikor egy donor és több akceptor van jelen.

Ha a fehérje m akceptort tartalmaz, akkor m számú fluktuációról beszélhetünk, amelyek esetében az energiatranszfer sebességi állandója ${}_j k_{ii}$ ($j=1,2,\dots,m$). Ennek megfelelően m akceptor jelenlétében a donor kvantumhatásfokát a következőképpen lehet kiszámítani:

$$\langle \Phi_{DAi} \rangle = \left\langle \frac{k_f}{k_f + k_{oi} + \sum_{j=1}^m {}_j k_{ii}} \right\rangle \quad (I.24)$$

Feltételezve, hogy az alapesethez hasonlóan k_f ezúttal is állandó:

$$\langle \Phi_{DAi} \rangle = k_f \left\langle \frac{1}{k_f + k_{oi} + \sum_{j=1}^m {}_j k_{ii}} \right\rangle = k_f \langle \tau_i \rangle \quad (I.25)$$

Ha $\tau_{\text{átlag}} = \langle \tau_i \rangle$, akkor

$$\langle \Phi_{DAi} \rangle = k_f \tau_{\text{átlag}} \quad (I.26)$$

Az energiáttranszfert a következőképpen lehet kiszámítani:

$$\langle E_i \rangle = \left\langle \frac{\sum_{j=1}^m {}_j k_{ti}}{k_f + k_{oi} + \sum_{j=1}^m {}_j k_{ti}} \right\rangle = \sum_{j=1}^m \left\langle \frac{{}_j k_{ti}}{k_f + k_{oi} + \sum_{j=1}^m {}_j k_{ti}} \right\rangle, \quad (I.27)$$

ahol kihasználtuk azt a feltételezést, hogy az egyes ${}_j k_{ti}$ ($j=1,2, \dots, m$) értékek egymástól független folyamatokat jellemeznek.

Feltételezve, hogy minden esetre igaz, hogy ${}_j k_{ti} \ll (k_f + k_{oi} + \sum_{\substack{l=1 \\ l \neq j}}^m {}_l k_{ti})$, akkor az összes

${}_j k_{ti}$ és $\tau_i = \frac{1}{k_f + k_{oi} + \sum_{j=1}^m {}_j k_{ti}}$ függetlennek tekinthető, ezért a (19)-es egyenlet a

következő alakban írható fel:

$$\langle E_i \rangle = \sum_{j=1}^m \langle {}_j k_{ti} \rangle \left\langle \frac{1}{k_f + k_{oi} + \sum_{j=1}^m {}_j k_{ti}} \right\rangle = \sum_{j=1}^m \langle {}_j k_{ti} \rangle \langle \tau_i \rangle = \tau_{\text{átlag}} \sum_{j=1}^m \langle {}_j k_{ti} \rangle \quad (I.28)$$

$$f = \frac{\langle E_i \rangle}{\langle \Phi_{DA} \rangle} = \frac{1}{k_f} \sum_{j=1}^m \langle {}_j k_{ti} \rangle \quad (I.29)$$

$$f = c \sum_{j=1}^m \langle {}_j R_i^{-6} {}_j \kappa_i^2 \rangle = \sum_{j=1}^m f_j, \quad (I.30)$$

$$\text{ahol } f_j = c_j \langle R_i^{-6} {}_j \kappa_i^2 \rangle \quad (I.31)$$

Ebből tehát látható, hogy az f paraméter egy donor – több akceptor esetében is alkalmas a fehérjékben fellépő fluktuációk, konformációváltozások nyomon követésére²⁰.

A későbbiekben ismertetett méréseink során praktikus okokból nem az f paraméterrel, hanem egy azzal arányos paraméterrel (f') jellemeztük a fehérjék flexibilitását. Tekintettel arra, hogy a fluoreszcencia intenzitása a kvantumhatásfokkal arányos mennyiség, bevezettük az f' paramétert, ahol

$$f' = \frac{\langle E \rangle}{\langle F_{DA} \rangle} \quad (I.32)$$

3.4 Fehérjepreparálás és fluoreszcens jelölés

Aktin izolálás

Az aktin izolálásához először vázizomból aceton forgácsot készítettünk²², ezt követően izoláltuk az aktint Spudich és Watt eljárása alapján⁸. Izolálás után az aktint puffer A-ban (4 mM TRIS-HCl, pH 7.3, 0.2 mM ATP, 0.1 mM CaCl₂, 0.5 mM DTT) tároltuk.

Miozin S1 preparálás

A miozin S1 izolálásához a nyúl vázizomból először a miozint vontuk ki, Margossian és Lowey módszerével²³. Ezt követően α -kimotripsinnel való emésztéssel nyertük ki az S1-et²⁴. Az S1 koncentrációját spektrofotométer segítségével határoztuk meg: $A_{S1}^{1\%} = 7.45^{25}$.

A miozin S1 Cys-707 IAEDANS jelölése

A jelölés előtt az S1-et egy éjszakán át hidegszobában dializáltuk 50mM TES pH 7.0, 60 mM KCl, 0.2 mM PMSF puffer ellen. A jelölés előtt a fehérjét óvatosan szobahőmérsékletre melegítettük. Az IAEDANS-t DMF-ben oldottuk fel, a jelölést megelőzően (a DMF térfogata kevesebb volt az ösztérfogat 1 %-nál.) Az IAEDANS-t 10-szeres moláris túlsúlyban adtuk a fehérje mellé, majd 1 órán át kevertettük mágneskeverővel. A reakciót az IAEDANS-hez képest 100-szoros moláris túlsúlynak megfelelő MEA oldattal állítottuk le. Az S1-et ezt követően oszlop-kromatográfiás szűréssel tisztítottuk meg a szabad festéktől. A jelölést követően a fehérjét hidegszobában egy egész éjszakán át dializáltuk 25 mM TES, pH 7.0, 80 mM KCl, 2 mM EGTA, 4mM MEA puffer ellenében.

A miozin S1 Cys-177 IAEDANS jelölése

A Cys-177 jelöléséhez első lépésként a Cys-707-et blokkolni kellett 2,4-dinitro-fluorobenzene (FDNB)-nel²⁶: az S-1-et (70-120 μ M) 0.2M N-(2-

hydroxyethyl)piperazine-N'-2-ethanesulfonate (PIPES), pH8.0, pufferben inkubáltuk 5-szörös moláris túlsúlyban jelenlevő FDNB ellen 0 °C-on, 1 órán át. A nem reagált FDNB-t oszlopkromatográfiás szűréssel távolítottuk el, 50 mM TES, 0.25 M NaCl, pH7.0 pufferrel. A blokkolást követően – ekkor már az egyetlen reaktív cisztein a Cys-177 – a fehérjét 7-szeres moláris túlsúlyban levő IAEDANS-szel jelöltük 4 °C-on öt órán keresztül. (Az IAEDANS feloldása az előzőben leírthoz hasonlóan történt meg). A reakciót 50mM DTE hozzáadásával állítottuk le, ezzel távolítottuk el egyúttal az FDNB-t. Ezt követően egy éjszakán keresztül jégen tartottuk, majd a felesleges festéket és a DTE-t oszlopkromatográfiás szűréssel (Sephadex-G25) távolítottuk el, 20mM MOPS, pH7.5, 20mM NaCl, 2mM MgCl₂, 0.2mM DTE puffert használva. A mérések során figyelembe vettük, hogy a blokkolás ellenére a jelölő mintegy 10 %-a a Cys-707-hez kötődött.

Aktin IAF-jelölése

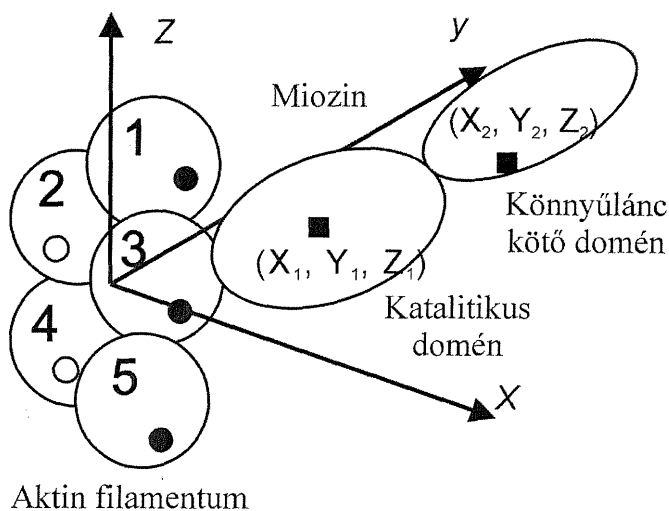
Az aktin Cys-374-es aminosavjának IAF-jelöléséhez monomer aktinhoz adtunk 10-szeres moláris túlsúlyban levő festéket, majd 3-4 órán keresztül hagytuk inkubálódni. Ezt követően az aktint 12-16 órán keresztül polimerizáltuk 4 °C-on. A jelölési eljárás után a mintát 100.000 x g-vel 2 órán keresztül centrifugáltuk, 4 °C-on, majd a kapott üledéket A-pufferben oldottuk fel és egy éjszakán át dializáltuk a mérő puffer ellenében.

4. Eredmények és következtetések

4.1 Konformációs eloszlások és távolságok a rigor aktomiozin komplexben

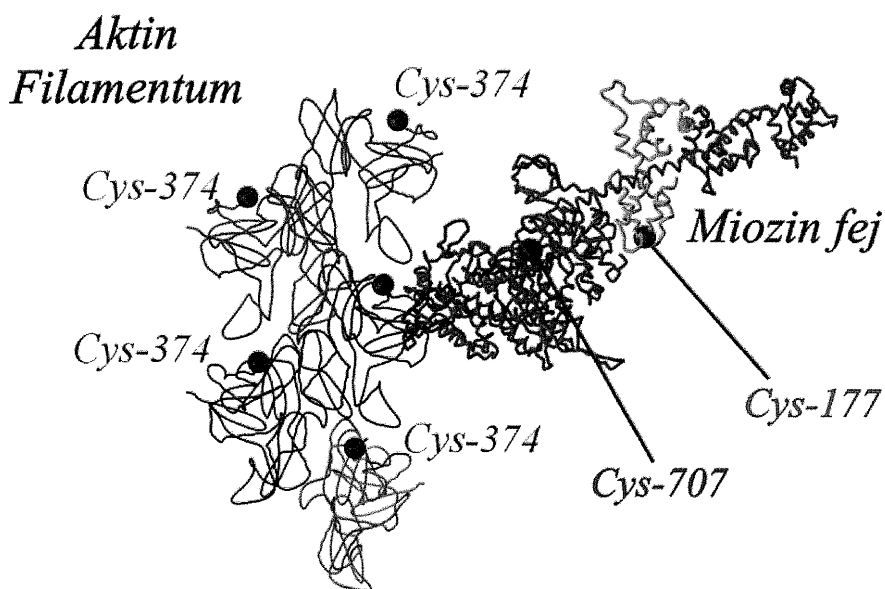
Mint azt a bevezetőben már ismertettem, az izomösszehúzódás során az aktin és a miozin ciklikus kölcsönhatása biztosítja a két filamentális rendszer egymáshoz képest történő elmozdulását. A két fehérje komplexén belül a kontrakció során bekövetkező konformációs módosulások meghatározó szerepet játszanak az erőkifejtés létrejöttében. A jelenleg leginkább elfogadott, ún. emelőkar („lever arm”) modell szerint a miozin fej könnyű-lánc-kötő doménjének az aktin filamentum tengelyéhez képest történő, a kötött nukleotidok által szabályozott elfordulása biztosítja a két filamentális rendszer relatív elmozdulásához szükséges molekuláris háttérret. Az itt ismertetett kísérletek során a miozin S1 úgynevezett katalitikus doménjének, illetve a „lever arm” részét képező könnyűlánc-kötő doménnek a távolságát határoztuk meg rigor állapotban, vagyis abban az esetben, amikor a miozin fej nukleotid-mentes állapotban van¹⁷.

A távolságok meghatározására a 2. fejezetben ismertetett, helikális fehérjékre kidolgozott FRET módszerünket alkalmaztuk. A katalitikus domén és az aktin filamentum közötti távolság meghatározása érdekében a miozin S1 707-es ciszteinjét jelöltük specifikusan az IAEDANS nevű fluoreszcens festékkel, amely jelen esetben a donor szerepét töltötte be. A könnyűlánc-kötő domén–aktin filamentum távolság meghatározásának érdekében a donort az S1 177-es ciszteinjéhez kötöttük.



I.14. ábra Az S1-en található donor molekulák valamint az aktin filamentumon található akceptor molekulák geometriai elhelyezkedése, valamint az aktin filamentum tengelyéhez illeszkedő koordináta rendszer.

Mindkét esetben az akceptorok (IAF) az aktin filamentumot alkotó monomerekhez (Cys-374) voltak kötve. A távolabbi akceptorok elhanyagolható járuléka miatt a FRET mérések során a donorhoz legközelebb eső öt akceptor (vagyis öt monomer) járulékát vettünk figyelembe (I.14 és I.18. ábra).



I.15. ábra Az aktomiozin szerkezeti modellje. A szerkezeten feltüntettük azokat az aminosavakat, amelyekhez a donor (Cys-707, Cys-177) valamint az akceptor (Cys-374) molekulákat kötöttük.

A donor fluoreszcenciájának mérése során az IAEDANS-t 365 nm-en gerjesztettük, a fluoreszcencia intenzitást általában 430-470 nm-en detektáltuk, az „inner filter” jelenség torzító hatását kiküszöbölendő a fluoreszcencia intenzitást a következő módon korrigáltuk:

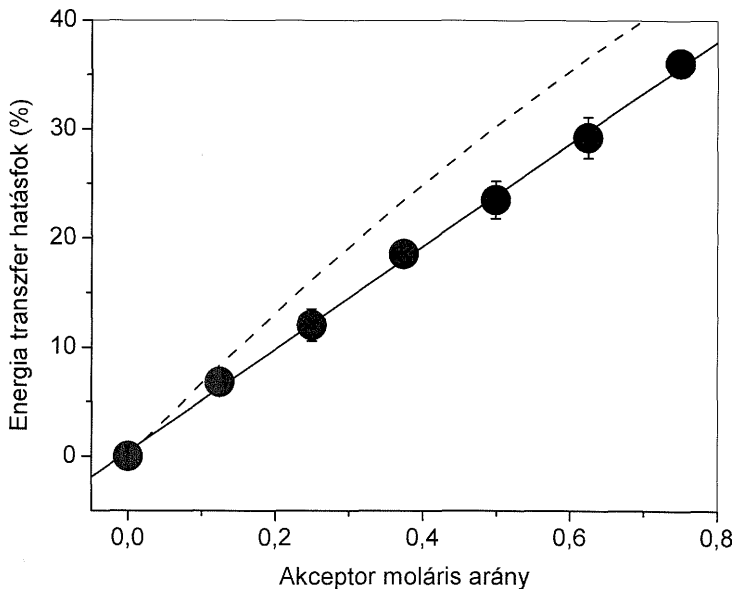
$$F_{\text{kor}} = F_{\text{obs}} 10^{(OD_{\text{ex}} + OD_{\text{em}})/2}, \quad (\text{I.33})$$

ahol F_{kor} a korrigált fluoreszcencia intenzitás, F_{obs} a mért fluoreszcencia intenzitás, OD_{ex} a minta abszorpciója a gerjesztési hullámhossznál, OD_{em} pedig az emisszió hullámhosszánál mért abszorpció. Az energiatranszfer hatékonyságát a donor akceptor nélkül illetve akceptor jelenlétében mért fluoreszcencia intenzitása alapján, a (8)-as egyenlet alkalmazásával számítottuk ki.

| Akceptor moláris arány | FRET hatások | |
|---------------------------|-----------------|-----------------|
| | $E^{Cys-707}$ | $E^{Cys-177}$ |
| 0.12 | 6.84 (0.17) | 9.74 (4.97) |
| 0.25 | 12.01 (1.46) | 17.21 (4.62) |
| 0.37 | 18.56 (0.17) | 22.89 (2.24) |
| 0.50 | 23.52 (1.72) | 27.68 (3.72) |
| 0.62 | 29.23 (1.88) | 30.69 (1.35) |
| 0.75 | 36.07 (0.78) | 33.33 (2.55) |

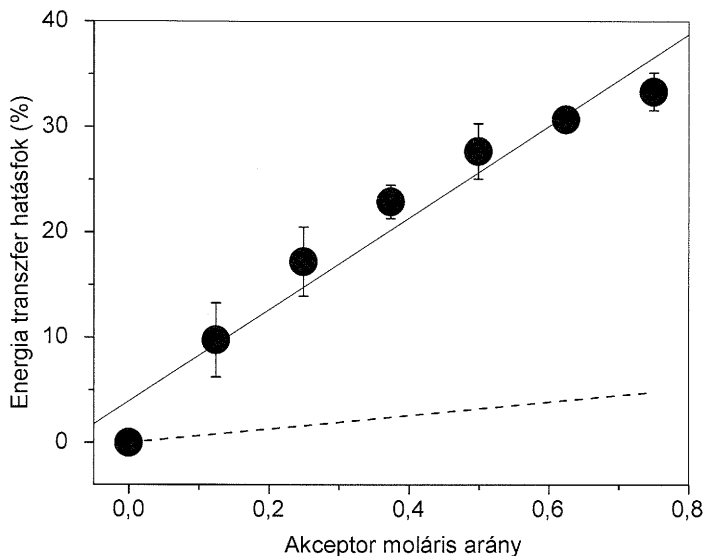
1. táblázat A táblázatban a különböző akceptor moláris arányok esetében mért energiáttranszfer hatások, zárójelben az adott értékhez tartozó hiba található.

Abban az esetben, amikor a donort az S1 Cys-707 aminosavhoz kötöttük, a fluoreszcencia energiáttranszfer hatások lineárisan változott az akceptor moláris arány függvényében, ami tipikusan az egy donor-egy akceptor rendszerekre igaz (I.16. ábra).



I.16. ábra. Az ábrán a mért fluoreszcencia energia transzfer hatások látható a Cys-707 esetében (fekete körök). Folytonos vonallal van feltüntetve a legjobb lineáris illesztés, szaggatott vonallal pedig a röntgenkristallográfiás adatokból számolt, mozdulatlanságot feltételező értékek.

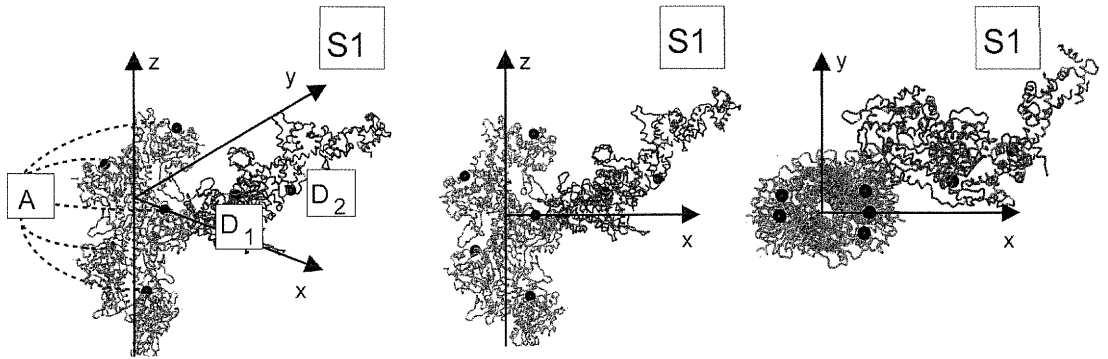
Ha a donort a Cys-177 aminosavhoz illesztettük, a mért értékek akceptor moláris arány függése már nem volt lineáris, és jelentős eltérést mutattak az egy donor – egy akceptor esetet feltételező illesztéstől (I.17. ábra).



I.17. ábra. Az ábrán a mért fluoreszcencia energia transzfer hatások látható a Cys-177 esetében (fekete körök). Folytonos vonallal van feltüntetve az egy donor-egy akceptor esetet feltételező legjobb illesztés, szaggatott vonallal pedig a röntgenkristallográfiás adatokból számolt mozdulatlanságot feltételező értékek.

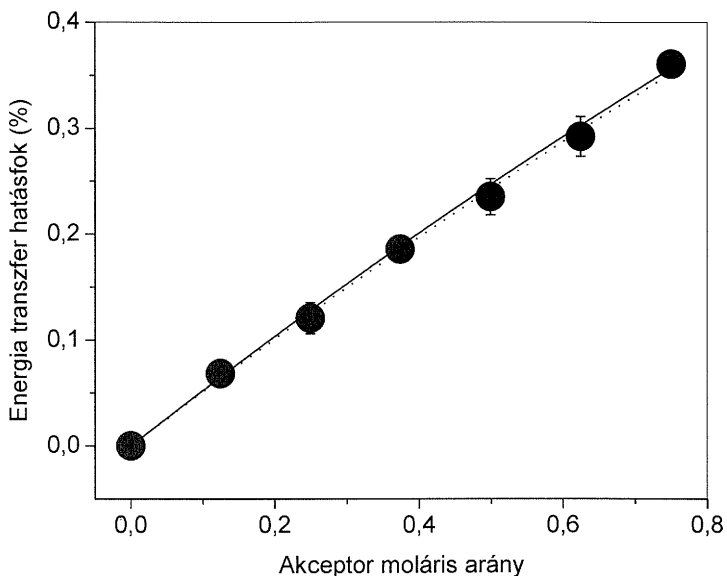
A I.16-17. ábrán feltüntettük azokat a feltételezett fluoreszcencia energiatranszfer értékeket, amelyeket a röntgenkristallográfiás adatok behelyettesítésével számoltunk. A számítások során a következő távolsági adatokat használtuk: $R_1=63,9 \text{ \AA}$; $R_2=99,8 \text{ \AA}$; $R_3=51,7 \text{ \AA}$; $R_4=103,7 \text{ \AA}$; $R_5=88,8 \text{ \AA}$, ha a donor a Cys-707-es aminosavhoz volt kötve, illetve $R_1=92,17 \text{ \AA}$; $R_2=134,7 \text{ \AA}$; $R_3=88,8 \text{ \AA}$; $R_4=138,89 \text{ \AA}$; $R_5=119,9 \text{ \AA}$, ha a donor a Cys-177-es aminosavhoz volt kötve.

A mért fluoreszcencia energiatranszfer hatások értékeit a 2.2 fejezetben ismertetett módszer segítségével értékeltük ki, két esetet különböztetve meg: homogén illetve heterogén eloszlású S1 populációt feltételezve. A homogén esetben minden S1 molekula ugyanabban a konformációban található, ennek megfelelően a donor ugyanolyan távolságra helyezkedik el a filamentumhoz képest, a heterogén esetben az S1 molekulák egy konformációeloszlással rendelkeznek (I.19. és I.20. ábra). Ez utóbbi esetben a FRET hatások számításánál azt feltételeztük, hogy az aktin tengelytől mért távolságok egy Gauss-eloszlást követnek.



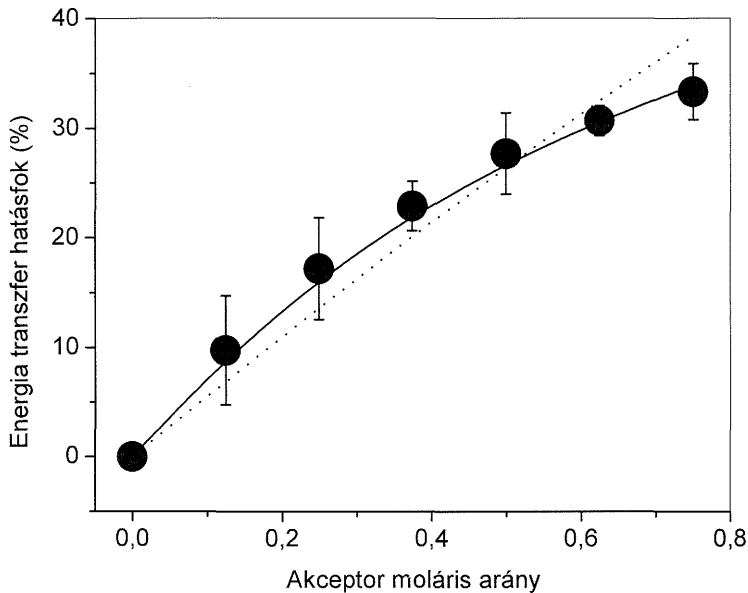
I.18. ábra. Az aktomiozin komplex röntgenkristallográfiás szerkezete, az alkalmazott donorokkal és akceptorokkal, több nézetben.

Abban az esetben, ha a donor a katalitikus doménon (Cys-707) helyezkedett el, homogén konformációeloszlást feltételezve az illesztés szemmel láthatóan jó minőségű. A számított FRET hatások eltérése a mért értékektől akkor a legkisebb, amikor a donor aktin filamentumtól mért távolsága $x=77 \pm 3 \text{ \AA}$, $y=5 \pm 5 \text{ \AA}$, $z=3 \pm 4 \text{ \AA}$. Figyelembe véve, hogy a radiális távolság (az akceptor távolsága az aktin tengelyétől) 25 \AA , a donornak a legközelebbi aktin monomertől mért távolsága $52 \pm 3 \text{ \AA}$. Ez az érték jó egyezést mutat más szerzők egy donor – egy akceptor esetet feltételező számításaival²⁷⁻³⁰. Mint azt a későbbiekben majd láthatjuk a katalitikus domén esetében a homogén és a heterogén eset hasonló eredményre vezet.



I.19. ábra. Az energia transzfer hatásfokának függése a Cys-707 esetében. Folytonos vonallal ábrázoltuk a heterogén eloszlást, szaggatottal pedig a homogén eloszlást feltételező illesztéseket. Fekete körökkel ábrázoltuk a mért értékeket.

A könnyűlánc-kötő doménon elhelyezkedő donor (Cys-177) esetében, homogén eloszlást feltételezve, a számított energiáttranszfer értékek látványosan eltérnek a mért értékektől, heterogén konformációeloszlást feltételezve azonban sikerült jó illesztést kapni a mért értékekre (I.20. ábra).



I.20. ábra. Az energia transzfer hatásokának függése a Cys-177 esetben. Folytonos vonallal ábrázoltuk a heterogén eloszlást, szaggatottal pedig a homogén eloszlást feltételező illesztéseket.

Ennek a heterogenitásnak két fő oka lehet: heterogén eloszláshoz vezet, ha az akceptor-jelölést követően az aktin polimerizációja nem véletlenszerűen ment végbe³¹. Ugyancsak heterogén eloszlást figyelhetünk meg, ha a „lever arm” több konformációs állapotban van jelen. A nem véletlenszerű polimerizáció ellenőrzése érdekében az aktint falloidin jelenlétében polimerizáltuk³¹, az így végzett mérések azonban ugyanarra az eredményre vezettek. Ennek megfelelően a nem véletlenszerű polimerizáció által létrehozott heterogenitást kizártuk.

A tapasztalt heterogenitás háttérében – feltételezésünk szerint – az áll, hogy az S1 molekula és ezen belül is a könnyűlánc-kötő domén számos konformációban létezik, amelyben a donor-akceptor távolság tág intervallumon belül változhat.

A donor-akceptor távolság karakterizálása érdekében az energiatranszfer számításánál azt feltételeztük, hogy a donor-akceptor távolság Gauss-eloszlást követ. Az eloszlás átlagértékét és a félértékszélességét az illesztésből határoztuk meg. Ahogy az a I.20. ábrán látszik, a donor-akceptor távolságeloszlás feltételezése jó illesztéshez vezet. A legjobb illesztés esetén a Cys-177 távolsága az aktin tengelytől $98 \pm 3 \text{ \AA}$, ennek megfelelően $73 \pm 3 \text{ \AA}$ a legközelebbi aktin monomertől. Az eloszlás félértékszélessége $102 \pm 4 \text{ \AA}$ volt. Annak a magyarázata, hogy a donor-akceptor távolság és valószínűleg a könnyűlánc ilyen nagy intervallumon belül mozoghat, egyik lehetséges oka a protein mátrix nagyfokú flexibilitása. Elképzelhető azonban az is, hogy ez a nagy távolságeloszlás nem a fehérjemátrix flexibilitásával, hanem nagyszámú rigid konformáció jelenlétével magyarázható.

A távolságeloszlást feltételező illesztést elvégeztük abban az esetben is, amikor a donor a katalitikus doménon helyezkedett el. Az előzetes várakozásoknak megfelelően a távolságeloszlás feltételezése nem javította az illesztés minőségét. Az illesztés eredményeképpen az átlagtávolság $52 \pm 2 \text{ \AA}$ -nak adódott, ami megegyezett a homogén esetben kapott értékkel, a távolságeloszlás félértékszélessége $5 \pm 3 \text{ \AA}$ volt.

A Cys-177 aktin filamentumtól való távolságára kapott érték (73 \AA) eltér a mások által korábban megfigyelt értékektől ($50\text{-}60 \text{ \AA}$), de viszonylag közel van a röntgenkristallográfiás adatokból számolt 89 \AA -hoz. Az, hogy a mi általunk kapott távolság közelebb van a röntgenkristallográfiás eredményekhez, mint a korábbi FRET mérések eredményei, valószínűleg a több akceptor figyelembe vétele, illetve a távolságeloszlás feltételezése miatt adódott.

Méréseink megerősítik azt az EPR spektroszkópiával kapott megfigyelést³³, mely szerint a katalitikus domén és a könnyűlánc-kötő domén el tud fordulni egymáshoz képest. Méréseink egyeznek annak a szaturációs transzfer-EPR kísérletnek a megfigyelésével is, amely arra a következtetésre jutott, hogy a katalitikus domént és a könnyűlánc-kötő domént egy flexibilis csukló köti össze³⁴.

4.2 Az aktomiozin komplex flexibilitásának vizsgálata

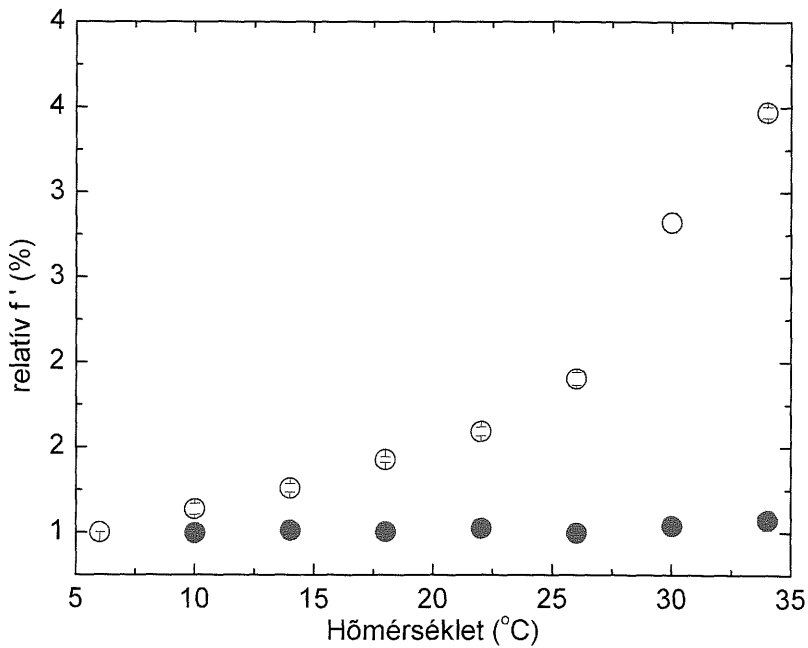
Az előző fejezetben bemutattam azokat a méréseket és számításokat, amelyek segítségével sikerült megállapítanunk, hogy nukleotidmentes (rigor) állapotban, amikor a miozin fej aktin-kötő affinitása a legnagyobb, a katalitikus domén aktinhoz viszonyított helyzete rögzített. Donor-akceptor távolságeloszlásban gondolkodva a katalitikus domén és az aktin filamentum közötti távolságot egy kis félértékszélességű távolságeloszlással lehet leírni, ami arra utal, hogy nukleotidok nélkül a katalitikus domén erősen kötött állapotban van. A könnyűlánc-kötő domén és az aktin közötti távolság ezzel szemben egy nagy (102 Å) félértékszélességgel rendelkező távolságeloszlással írható le, ami a könnyűlánc mozgására utal. Nem egyértelmű azonban, hogy ez egy nagyon flexibilis katalitikus domén–könnyűlánc-kötő domén kapcsolatnak köszönhető, vagy több egyidőben jelen levő konformációnak, amelyek esetében a katalitikus domén és a könnyűlánc-kötő domén kapcsolat rigid.

Az S1 dinamikai tulajdonságainak további feltérképezése érdekében a 2.3 fejezetben ismertetett módszerrel vizsgáltuk az aktomiozin komplex flexibilitását. A fehérjemátrix flexibilitásának vizsgálatához a (24)-es képletnek megfelelően az energiáttranszfer hatásfokának és a donor akceptor jelenlétében mért fluoreszcencia intenzitásának arányát mértük hőmérséklet függésében.

| T (°C) | J (M ⁻¹ cm ⁻¹ nm ⁴) | Katalitikus domén – aktin transzfer (Cys-707) | | Könnyűlánc-kötő domén- aktin transzfer (Cys-177) | |
|-----------|--|--|---------------|---|---------------|
| | | Φ_D | R_o (nm) | Φ_D | R_o (nm) |
| 6 | 21,4 | 0,57 | 5,14 | 0,50 | 5,04 |
| 10 | 21,1 | 0,57 | 5,13 | 0,50 | 5,03 |
| 14 | 20,7 | 0,57 | 5,12 | 0,49 | 5,00 |
| 18 | 20,4 | 0,57 | 5,11 | 0,49 | 4,98 |
| 22 | 20,0 | 0,58 | 5,11 | 0,49 | 4,96 |
| 26 | 19,8 | 0,58 | 5,10 | 0,49 | 4,95 |
| 30 | 19,4 | 0,59 | 5,09 | 0,49 | 4,93 |
| 34 | 19,1 | 0,59 | 5,08 | 0,49 | 4,93 |

2. táblázat. Az átfedési integrál (J), a kvantumhatásfok (Φ_D) és a Förster-féle kritikus távolság (R_o) hőmérsékletfüggése. a Cys⁷⁰⁷-hez, illetve a Cys¹⁷⁷-hez kapcsolt donor esetében.

Az f' paraméter hőmérsékletfüggése információt szolgáltat a fehérjemátrix flexibilitásában bekövetkezett változásokról, illetve esetleg a hőmérsékletváltozás által indukált konformációváltozásokról²⁰. Tekintettel arra, hogy az átfedési integrál hőmérsékletfüggése torzíthatja az f' paramétert, ezért az f' értékét minden hőmérsékleten normáltuk a hozzá tartozó átfedési integrál értékével (2. táblázat).



I.21. ábra. Az f' paraméter hőmérsékletfüggése abban az esetben, ha a donor a katalitikus doménhez (piros körök), illetve ha az esszenciális könnyűlánc doménhez (kék körök) volt kötve.

Az f' paraméter hőmérsékletfüggését vizsgálva feltűnő, hogy abban az esetben, ha a donor a katalitikus doménen helyezkedett el, az f' értéke alig változik a hőmérséklet növekedésével. Ezzel szemben, ha a donor az esszenciális könnyűláncra helyezkedett el, akkor f' értéke monoton módon nőtt. A módszer 2.3 fejezetben bemutatott megfontolásai alapján: ha f' hőmérsékletfüggése meredekebb a fehérjemátrix flexibilisebb (ha nem következik be lényeges konformációváltozás.) Ennek alapján azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a donor és az akceptorok között elhelyezkedő fehérjemátrix flexibilisebb az esszenciális könnyűlánc és az aktin között, mint a katalitikus domén és az aktin között.

Felidézve azt, hogy a katalitikus domén esetében a távolságeloszlás félértékszélessége nagyon keskeny, f' értéke pedig a teljes hőmérséklettartományon közel állandó és nincs konformációváltozás, arra következtethetünk, hogy nukleotidmentes állapotban a katalitikus domén és az aktin kötése erős, a két jelölő közötti fehérjemátrix merev.

Az esszenciális könnyűlánc esetében megfigyeltek alapján ugyanakkor kijelenthető: az f' paraméter látványos hőmérsékletfüggése arra utal, hogy a donor és az akceptorok közötti fehérjemátrix flexibilis. Az f' paraméter mérésével sikerült kizárni annak a lehetőségét, hogy a könnyűlánc-kötő domén esetében megfigyelt széles távolságeloszlás oka egy nagyszámú, de egyenként merev fehérjemátrix.

4.3 Összefoglalás

Az eredményeket összegezve: sikerült kidolgozni egy olyan fluoreszcencia rezonancia energiatranszferen alapuló módszert, amely helikális szimmetriával rendelkező rendszerek esetén távolságmérésre lehet használni.

Sikerült a módszert gyakorlatba ültetni, és azt az aktomiozin komplex esetében használni. A módszer segítségével sikerült kvantitatív képet kapni a miozin-S1 katalitikus illetve könnyűlánc-kötő doménjének az aktin filamentumhoz viszonyított elhelyezkedéséről.

A távolságeloszlás feltételezésével sikerült kvantitatív képet kapni a katalitikus domén és a könnyűlánc-kötő domén flexibilitásáról.

Az f' paraméter mérésén alapuló módszer alkalmazásával sikerült kvalitatív képet kapnunk a fent említett módszer által kapott távolságeloszlások jelentéséről. Ennek megfelelően a katalitikus domén erős kötésben van az aktin filamentummal, a könnyűlánc-kötő domén viszont erősen fluktuál az aktin filamentumhoz képest.

Méréseink megerősítik azokat a korábbi megfigyeléseket, mely szerint a katalitikus domén és a könnyűlánc-kötő domén el tud fordulni egymáshoz képest. Méréseink eredményein egyeznek azokkal a megfigyelésével is, amely szerint a katalitikus domént és a könnyűlánc-kötő domént egy flexibilis csukló köti össze.

5. Irodalomjegyzék

1. Straub, F. B. Actin (ed. Szent-Györgyi, A.) (Szeged, 1942).
2. A "Studies" mindhárom kötete letölthető a PTE ÁOK Biofizikai Intézetének Aktin Citoszkeleton Kutatócsoportjának a honlapjáról. <http://actin.aok.pte.hu>.
3. Szent-Györgyi, A. Studies on muscle. *Acta Physiologica Scandinavica* 9 (1945).
4. Szent-Györgyi, A. Chemistry of muscular contraction. (1951).
5. Hanson, J. & Huxley, H. E. Structural basis of the cross-striations in muscle. *Nature* 172, 530-2 (1953).
6. Bárány, M. & Bárány, K. <http://www.uic.edu/classes/phyb/phyb516/>.
7. Engelhardt, V. A. & Lyubimova, M. N. Myosin and adenosinetriphosphatase. *Nature* 144, 668 (1939).
8. Spudich, J. A. & Watt, S. The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. *J. Biol. Chem.* 246, 4866-4871 (1971).
9. Itakura, S. et al. Force-Generating Domain of Myosin Motor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 196, 1504-1510 (1993).
10. Barany, M., Barron, J. T., Gu, L. & Barany, K. Exchange of the actin-bound nucleotide in intact arterial smooth muscle. *J Biol Chem* 276, 48398-403 (2001).
11. Perrin, J. Fluorescence et induction moléculaire par résonance. *Comptes Rendus* 184, 1097-1100 (1927).
12. Perrin, F. Théorie quantique des transferts d'activation entre molécules de même espèce. Cas des solutions fluorescentes. *Ann Phys (Paris)* 17, 283-314 (1932).
13. Förster, T. H. Zwischen Molekulare Energie Wanderung und Fluoreszenz. *Ann. Phys* 2, 55-75 (1948).
14. Stryer, L. & Haugland, R. P. Energy transfer: a spectroscopic ruler. *Proc Natl Acad Sci U S A* 58, 719-26 (1967).
15. Stryer, L. Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. *Annu Rev Biochem* 47, 819-46 (1978).
16. Taylor, D. L., Reidler, J., Spudich, J. A. & Stryer, L. Detection of Actin Assembly by Fluorescence Energy-Transfer. *Journal of Cell Biology* 89, 362-367 (1981).

17. Nyitrai, M., Hild, G., Lukacs, A., Bodis, E. & Somogyi, B. Conformational distributions and proximity relationships in the rigor complex of actin and myosin subfragment-1. *Journal of Biological Chemistry* 275, 2404-2409 (2000).
18. Gennis, R. B. & Cantor, C. R. Use of nonspecific dye labeling for singlet energy-transfer measurements in complex systems. A simple model. *Biochemistry* 11, 2509-17 (1972).
19. Nyitrai, M., Hild, G., Bodis, E., Lukacs, A. & Somogyi, B. Flexibility of myosin-subfragment-1 in its complex with actin as revealed by fluorescence resonance energy transfer. *European Journal of Biochemistry* 267, 4334-4338 (2000).
20. Somogyi, B. et al. Förster-type energy transfer as a probe for changes in local fluctuations of the protein matrix. *Biochemistry* 23, 3403-3411 (1984).
21. Somogyi, B., Lakos, Z., Szarka, A. & Nyitrai, M. Protein flexibility as revealed by fluorescence resonance energy transfer: an extension of the method for systems with multiple labels. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology* 59, 26-32 (2000).
22. Feuer, G., Molnár, F., Pettkó, E. & Straub, F. B. Studies on the composition and polymerisation of actin. *Hung. Acta Physiol.* 1, 150-163 (1948).
23. Margossian, S. S. & Lowey, S. Preparation of myosin and its subfragments from rabbit skeletal muscle. *Methods Enzymol.* 85, 55-71 (1982).
24. Weeds, A. G. & Taylor, R. S. Separation of subfragment-1 isoenzymes from rabbit skeletal muscle myosin. *Nature* 257, 54-56 (1975).
25. Wagner, P. D. & Weeds, A. G. Studies on the role of myosin alkali light chains. Recombination and hybridization of light chains and heavy chains in subfragment-1 preparations. *J. Mol. Biol.* 109, 455-473 (1977).
26. Kasprzak, A. A., Chaussepied, P. & Morales, M. F. Location of a contact site between actin and myosin in the three-dimensional structure of the acto-S1 complex. *Biochemistry* 28, 9230-9238 (1989).
27. Takashi, R. Fluorescence energy transfer between subfragment-1 and actin points in the rigor complex of actin subfragment-1. *Biochemistry* 18, 5164-5169 (1979).

28. Trayer, H. R. & Trayer, I. P. Fluorescence energy transfer between the myosin subfragment-1 isoenzymes and F-actin in the absence of nucleotides. *Eur. J. Biochem.* 135, 47-59 (1983).
29. Xing, J. & Cheung, H. C. Internal movement in myosin subfragment-1 detected by fluorescence resonance energy transfer. *Biochemistry* 34, 6475-6487 (1995).
30. Miki, M. & Wahl, P. Fluorescence energy transfer between points in acto-subfragment-1 rigor complex. *Bichim. Biophys. Acta* 790, 275-283 (1984).
31. Moens, P. D. J., Yee, D. J. & dos Remedios, C. G. Determination of the radial coordinate of Cys-374 in F-actin using fluorescence resonance energy transfer spectroscopy: effect of phalloidin on polymer assembly. *Biochemistry* 33, 13102-12108 (1994).
32. Suzuki, Y., Yasunaga, T., Ohkura, R., Wakabayashi, T. & Sutoh, K. Swing of the lever arm of a myosin motor at the isomerization and phosphate-release step. *Nature* 396, 380-383 (1998).
33. Rooparine, O., Szent-Györgyi, A. G. & Thomas, D. D. Microsecond rotational dynamics of spin-labeled myosin regulatory light-chain induced by relaxation and contraction of scallop muscle. *Biochemistry* 37, 14428-14436 (1998).
34. Adhikari, B., Hideg, K. & Fajer, P. G. Independent mobility of catalytic and regulatory domains of myosin heads. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 9643-9647 (1997).

II. A fotoliáz fotoaktivációjának vizsgálata femtoszekundumos tranziens abszorpciós mérések segítségével

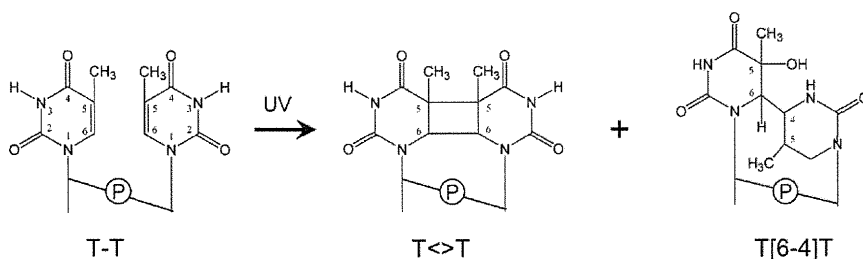
1. Bevezetés

1.1 A fotoliáz

UV fény hatására a DNS-ben a szerkezet kémiai megváltozásához vezető fotoreakciók zajlanak le. Ezek közül a két legismertebb a ciklobután pirimidin dimer (Pyr◊Pyr) illetve a pirimidin-pirimidon(6-4) (Pyr[6-4]Pyr) kialakulása, amelynek során két egymást követő timin primidin gyűrűi kapcsolódnak egybe.

Vizsgálatunk középpontjában a fotoliáz nevű enzim működése állt, amely képes arra, hogy fotokémiailag katalizálja a DNS hibákat javító reakciót¹.

A fotoliáz a flavoproteinek családjába tartozik, amelyek esetében a flavin kofaktor számos biokémiai reakcióban játszik intermedier szerepet; a flavoproteinekben található flavin kromofór jellegzetes abszorpciós spektrummal rendelkezik UV és látható hullámhosszokon egyaránt; legtöbbjük esetében a fiziológiai funkciót nem befolyásolja a fényabszorpció. A fotoliáz ebből a szempontból kivételt képez, az enzim működését ugyanis – és ennek következtében a DNS-szál javítását – egy UV/látható foton abszorpciója katalizálja.



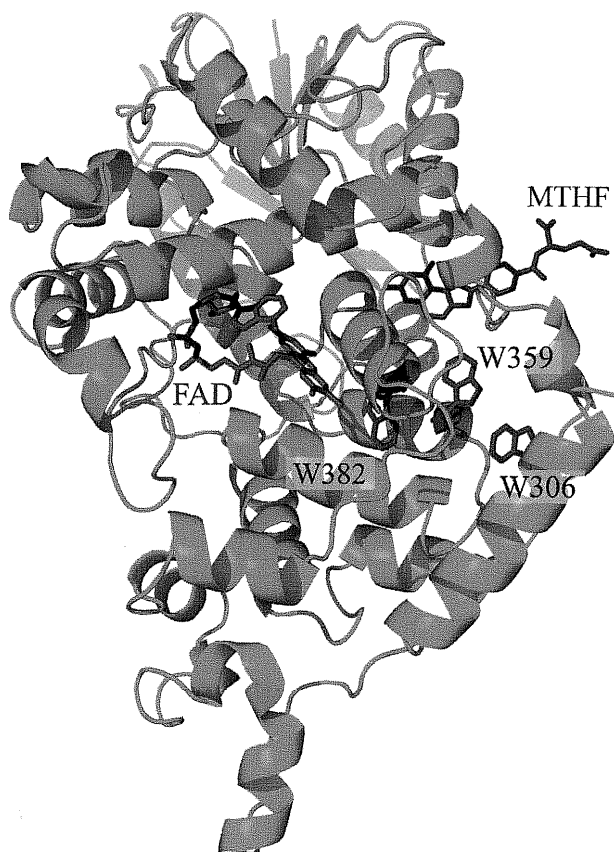
II.1. ábra. Az ábrán a pirimidin ciklobután illetve a pirimidin-pirimidon (6-4) fototermékek kialakulása látható. Hasonló fototermékek alakulhatnak ki bármilyen két egymást követő pirimidin gyűrű között: T-T, T-C, C-T és C-C esetében.

A javítási ciklus során a hibás DNS-hez specifikusan kapcsolódott fotoliáz kétszeresen redukált állapotban levő flavin kofaktora (FADH⁻) egy elektront injektál a pirimidin dimerre, aminek következtében a kötés felhasad. A fotoliázokat a javított terméktől függően ciklobután pirimidin dimer fotoliázok, a II-es típusú fotoliázok pedig a (6-4) fototermékek javítását végzik el.

1.1.1 A fotoliáz szerkezete

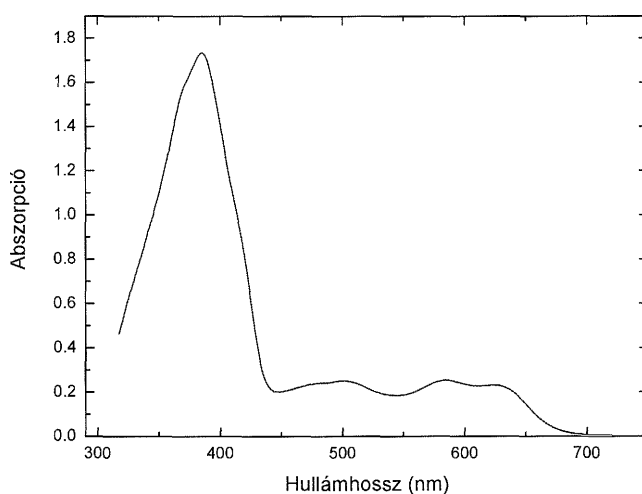
A fotoliázok olyan 450-550 aminosavból álló globuláris, monomer fehérjék, amelyek két nemkovalensen kötött kofaktort tartalmaznak. Ezek közül az egyik az eddig ismert típusok mindegyikében a flavin adenin dinukleotid (FAD), a második pedig vagy egy pterin (MTHF), vagy egy deazaflavin (8-HDF) kromofór.

A flavin az egyik leggyakrabban előforduló kofaktor (legkevesebb 151 enzim tartalmazza FAD és/vagy FMN formában), a fotoliázban a FAD formája található meg, három redox állapotban: oxidált, egy elektronnal redukált illetve két elektronnal redukált állapotban. A fotoliáz esszenciális kofaktora, a flavin³⁻⁵, a katalízis során specifikusan kötődik a sérült DNS szakaszhoz. DNS javítására a flavin csak a kétszeresen redukált – FADH⁻ – állapotában alkalmas. Vizsgálataink tárgya az a folyamat – fotoaktiváció – volt, amelynek során a flavin a kétszeresen redukált FADH⁻ állapotba kerül.



II.2. ábra. Az *E. coli* fotoliáz szerkezete. MTHF fotoantenna (kék), FAD kofaktor (piros), a fotoaktivációban fontos szerepet betöltő három triptofán (lila).

A fotoliáz másik kofaktora az általunk vizsgált esetben az MTHF kromofór, amit fotoantennának is neveznek (az *A. Nidulans*, illetve *T. Thermophilus* fotoliázok esetében 8-HDF). A katalízis az enzim-szubsztrát kötésre hatást nem gyakorló MTHF illetve 8-HDF kofaktorok nélkül is végbemegy^{6,7}, jelenlétük azonban jelentősen (10-100-szoros mértékben) megnöveli a javítás sebességét¹. Ez annak köszönhető, hogy az MTHF vagy 8-HDF kofaktorok extinkciós maximuma (400 nm körül) jelentősen nagyobb, mint az FADH⁻ kofaktoré (II.3. ábra), az így abszorbeált energia pedig szintén eljut – fluoreszcencia rezonancia energiatranszferrel – a flavin kofaktorhoz^{6, 8-10}.



II.3. ábra. *E. coli* fotoliáz abszorbciós spektruma. A 380 nm körüli abszorbciós csúcs az MTHF, az 500, 580 és 625 nm-nél mért abszorbciós csúcsok a flavin kofaktor abszorbciójának feleltethetők meg.

Annak igazolása érdekében, hogy az antenna kromofór és a flavin kofaktor között valóban fellép a FRET, megmérték az *E. coli*, illetve az *A. nidulans* fotoliáz antennáinak (MTHF és 8-HDF) fluoreszcencia élettartamát kofaktor jelenlétében és hiányában is.

E. coli fotoliáz esetében, a fluoreszcencia emissziót 470 nm-en detektálva, az MTHF fluoreszcencia élettartama 354 ps volt a flavin hiányában, illetve 134 ps annak jelenlétében¹¹. Figyelembe véve az (II.1)-es képletet, az energia transzferhatásfok 62 %-os.

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D}, \quad (\text{II.1})$$

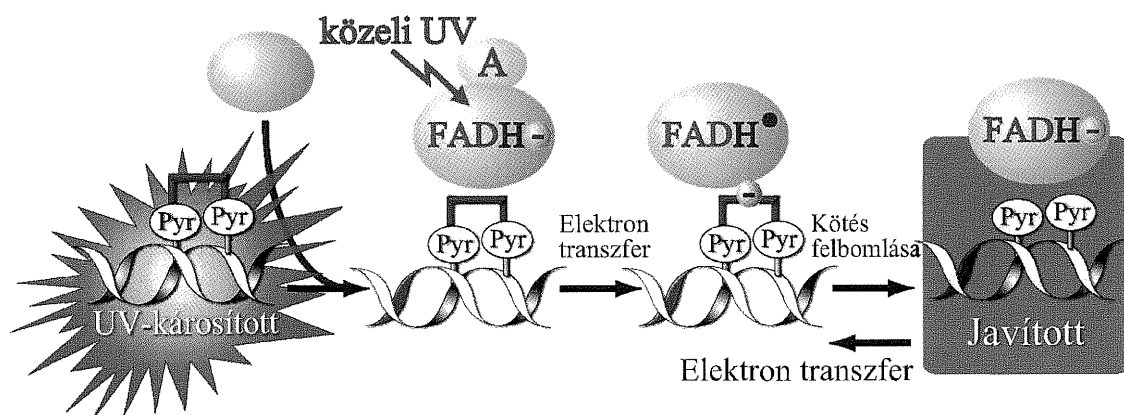
ahol az I. rész 3.1 fejezetében ismertetettek alapján E a fluoreszcencia energiatranszfer hatásfoka, τ_{DA} az akceptor jelenlétében, τ_D pedig az annak hiányában mért fluoreszcencia élettartama a donor molekulának.

A. nidulans esetében – 435 nm-es hullámhosszon mérve – a 8-HDF fluoreszcencia élettartama 2 ns volt a flavin hiányában, illetve 50 ps annak jelenlétében, ami közel 98%-os transzferhatásfokot feltételez. A FRET mérések segítségével még jóval a szerkezet meghatározása előtt sikerült megbecsülni az antenna-flavin távolságot. Ezek alapján az *A. nidulans*-ban a 8-HDF–flavin távolság 15 Å-nek adódott¹, míg a röntgenkristallográfiás szerkezet-meghatározás eredménye 17,5 Å¹² volt. *E. coli* fotoliázban az MTHF és a flavin közötti távolságot a FRET mérések alapján 22 Å-re becsülték¹, a röntgenkristallográfiával kapott érték azonban ettől jelentősen eltér, 16,5 Å¹³. Az eltérés oka mindkét esetben az, hogy szerkezeti információk hiányában mindkét esetben a κ^2 értékére a teljesen izotróp esetben megvalósuló 2/3 értéket használták. A röntgenkristallográfia segítségével meghatározott szerkezetből azonban látszik, hogy a kofaktorok egymáshoz viszonyított helyzete kizárja olyan, hogy az orientációs faktor jelentősen eltér a feltételezett 2/3-tól. A szerkezeti adatok ismeretében módosított κ^2 értéke *A. nidulans* fotoliáz esetében esetében 1,6, *E. coli* fotoliáz esetében pedig 0,2¹. Ezen orientációs faktor értékeknek az alkalmazásával a FRET mérésekből kapott távolságok jobb egyezést mutatnak a röntgenkristallográfiás szerkezeti adatokkal.

1.2 Fotoreaktiváció illetve fotoaktiváció az *E. coli* fotoliázban

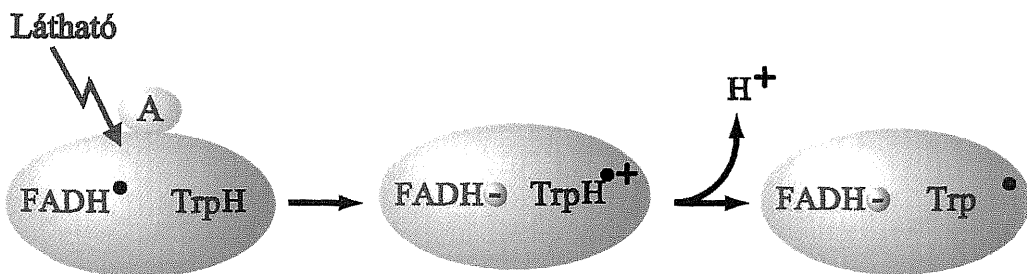
A fotoliázban két fotoindukált elektrontranszfer folyamat megy végbe: a DNS javítást végző fotoreaktiváció illetve a flavin kofaktort redukáló fotoaktiváció.

A fotoreaktiváció során egy közeli UV/látható foton által indukált folyamat zajlik le, amelynek során a ciklobután-pirimidin kötés felhasad. A reakció mechanizmusa a következő: a pirimidin dimerhez kötődött fotoliáz antennája (MTHF) elnyel egy UV/kék fotont, majd fluoreszcencia rezonancia energiáttranszferrel gerjeszti a kétszeresen redukált állapotban található FADH^- -t (a flavin gerjesztése közvetlenül is megtörténhet). A gerjesztett állapotban levő FADH^- -ről ~ 170 ps alatt egy elektron ugrik a $\text{Pyr} \rightleftharpoons \text{Pyr}$ gyűrűre¹⁴. Mivel a ciklobután 5-5 és 6-6 kötéseit ezt követően már sértik a Hückel-szabályt, ennek megfelelően a $\text{Pyr} \rightleftharpoons \text{Pyr}$ felbomlik két pirimidinre. Ezt követően az elektron ~ 560 ps alatt visszatranszferálódik a félig redukálódott flavinra, amely ennek következtében újra a teljesen redukálódott FADH^- állapotba kerül (lásd a II.4. ábrán).



II.4. ábra. A fotoreaktiváció mechanizmusa.

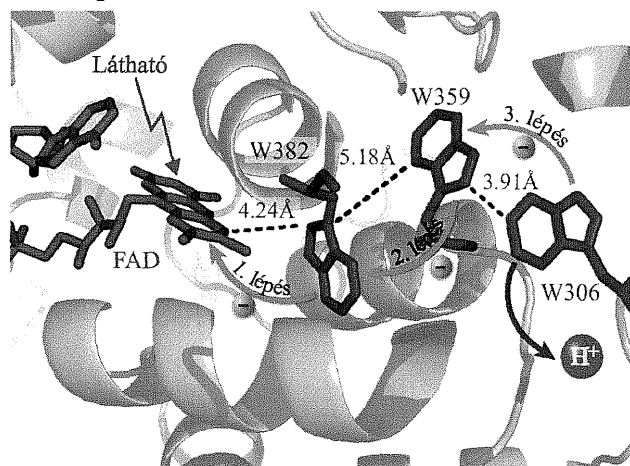
Egy kivétellel az összes eddig izolált fotoliázban igaz az, hogy a flavin kofaktor alapesetben az FADH^\bullet állapotban található meg. Ahhoz azonban, hogy a fotoreaktiváció végbemenjen, a flavin kofaktornak a kétszeresen redukált FADH^- állapotban kell lennie. A fotoliázban végbemegy egy második fotoreakció is, amelynek során külső redukálószer jelenlétében az FADH^\bullet redukálódik, és a katalitikusan aktív FADH^- állapotba kerül. A folyamat neve ennek megfelelően fotoaktiváció.



II.5. ábra. Az izolált fotoliázokban a flavin kofaktor minden esetben félig redukált állapotban található. A fotoaktiváció során a flavin kofaktor látható fényvel való gerjesztést követően kétszeresen redukált állapotba kerül.

Az *A. nidulans* fotoliáz esetében a fotoaktiváció során, az FADH^\bullet gerjesztését követően egy közeli triptofánról egy elektron kerül a félig redukált flavin kofaktorra. Ezt követően kevesebb mint 500 ns alatt létrejön a kétszeresen redukált FADH^- állapot¹⁵.

Az *E. coli* -ből származó fotoliáz esetében – mint azt a továbbiakban részletesen tárgyalni fogom – az FADH^\bullet redukálása egy három tagból álló triptofán láncon (W382-W359-W306) keresztül haladó elektrontranszfer segítségével valósul meg¹⁶ (II.6. ábra), amelynek során a terminális elektron-donor a flavin kofaktortól 15 Å távolságban elhelyezkedő, oldószerral kölcsönhatásban álló W306-os triptofán¹⁷. A W306 redukálása egy külső elektron donorral stabilizálja a flavin kofaktor FADH^- állapotát, külső elektron donor hiányában a töltés rekombináció következtében a kofaktor visszakerül az FADH^\bullet állapotba^{16, 18}.



II.6. ábra A fotoaktiváció feltételezett lépései.

2. Célkitűzések

Vizsgálataim során a W382-W359-W306 triptofánlánc mentén végbemenő elektrontranszfer folyamat részletesebb megértését tűztem ki célul. Kollégáim korábbi munkája, amelynek során mutagenezissel egy a triptofánhoz hasonló geometriájú, de redox-semleges fenilalaninnal cserélték ki a W382-es triptofánt igazolta az a feltételezést, hogy a fotoaktiváció első lépéseként a W382-es triptofánról egy elektron ugrik a flavin kofaktorra.

A mérések elkezdésekor tehát a következő kérdések megválaszolását tűztem ki célul:

- 1) Megfigyelhető-e a flavin kofaktor redukálódása abban az esetben, ha a W359-es triptofánt a hasonló geometriájú, de redox inert fenilalaninre cseréljük?
- 2) Létrejön-e a W359→W382 elektrontranszfer lépés a fotoaktiváció során?
- 3) Milyen gyors a W359→W382 elektrontranszfer folyamat?

3. Módszerek és eszközök

3.1 Fehérjepreparálás

A mutáns W359F fotoliázt a pKE (A) vektorból kaptuk meg, mely a pKK223-3 vektor *E. coli* vad típusú fotoliáz génjét tartalmazza. A Quick Change mutagenézis módszerét (Stratagene) alkalmaztuk, a

CTGGTGAAAGATTTATTGATCGACTTTCGCGAA

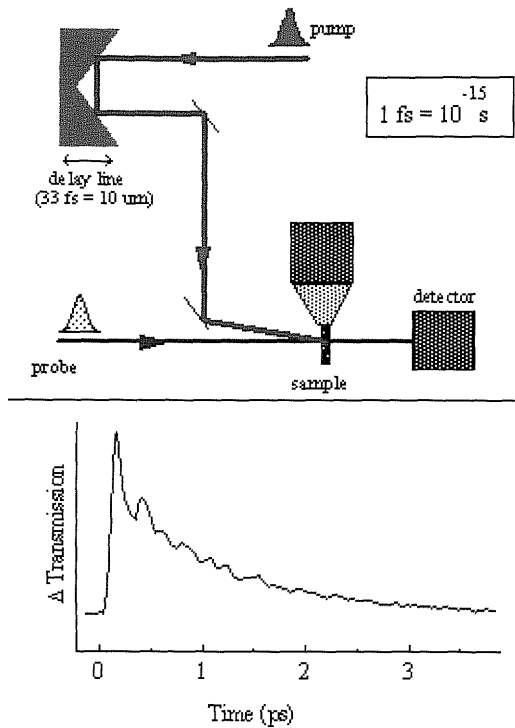
GGCGAGCG DNS-szekvenciát és fordított sorrendű komplementerét használva primerként. A mutált gént *E. coli* KY29 (B) fotoreaktiváció deficiens törzsben expresszáltuk; a törzs saját fotoliázát klóramfenikol rezisztencia markerrel (C) inaktiváltuk. Ampicilint és klóramfenikolt tartalmazó közegben való növesztést (37°C-on) követően a mutáns fotoliázt IPTG-vel indukáltuk 27°C-on. A sejteket ultrahangos szonikálással tártuk fel 10 mM MEA jelenlétében. Ezt két centrifugáló lépés követte (43,000g 75 percen keresztül), majd a fotoliázt heparin-Sepharose CL-6B gyantán (Amersham Pharmacia) tisztítottuk 0.1 - 1.1 M NaCl grádiens alkalmazásával, 0.01 M kálium-foszfát, pH 7.0 és 10 mM 2-MEA jelenlétében. Ezt újabb kromatográfiás tisztítólépés követte SP-Sepharose Fast Flow gyantán (Amersham Pharmacia) 0.04 - 0.3 M NaCl grádiens alkalmazásával. A FAD oxidációjának elkerülése érdekében az oldatok nitrogén áram alatt készültek. A fehérje becsült tisztasága 98 % feletti.

3.2 *Tranziens abszorpciós mérések*

3.2.1. *Pumpa-próba módszer*

Az ultragyors folyamatok vizsgálatához feltétlenül szükséges, hogy a vizsgálni kívánt jelenséget (fotoreakció, fluoreszcencia emisszió) elindító folyamat gyorsabb legyen, mint maga a jelenség. Fotokémiai reakciók vizsgálatakor a reakciót ultragyors, többnyire femtoszekundumos lézerekkel indítják el, ezt követően detektálják a reakció időbeni lefolyását. Ehhez természetesen olyan elektronikára, detektorrendszerre van szükség, amely képes a gyors változások követésére. A fluoreszcencia spektroszkópiában több módszert alkalmaznak az ultragyors folyamatok vizsgálatára, ilyen például az időkorrelált egyfotonszámlálás, illetve a *streak camera* módszerek. Ezek alkalmazásához azonban rendkívül gyors elektronikai eszközökre van szükség, amelyekkel azonban még mindig csak pikoszekundumos időfelbontást sikerült elérni¹⁹,²⁰. Alternatív módszerként alkalmazhatóak az úgynevezett pumpa-próba elven alapuló módszerek, amelyek esetében a detektáló elektronika válaszüzeje nem jelent megkötöttséget. A pumpa-próba módszerek során ugyanis az időbeli korlátot az alkalmazott lézerimpulzusok hossza jelenti, ennek megfelelően a jelenleg elterjedt femtoszekundumos lézerekkel az említett fluoreszcencia spektroszkópiai módszereknél két-három nagyságrenddel gyorsabb időfelbontást sikerült elérni.

A tranziens abszorpciós pumpa-próba rendszer alapelve könnyen megérthető a következő ábrából: a gerjesztő pumpa impulzust követően, a mintát meghatározott időpontokban, úgynevezett próbaimpulzusokkal világítjuk meg, és detektáljuk a minta transzmisszióját. A II.7. ábrán vázolt berendezés egyik legnagyobb előnye abban áll, hogy ezzel a módszerrel megkerülhető a detektorok időfelbontásának problematikája. Az ábrán látható ugyanis, hogy a késleltető vonal 10 μm -es elmozdulása mindössze 33 fs késést jelent. Az általunk használt Newport (M-UTM150CC.1) transzlátor felbontása 1 μm -es, amely 3.3 fs-os késleltetést tesz lehetővé. A vázolt tranziens abszorpciós berendezés tehát néhány femtoszekundumos időközönként méri az abszorpcióváltozást, ennek megfelelően a femtoszekundumos időskálán lezajló abszorpciós változások mérésére alkalmas.



II.7. ábra. A tranziens abszorpció elrendezés illetve a mért görbe. (Forrás: Vos M H, 1999²¹.)

A detektált abszorpcióváltozás mögött a következő jelenségek húzódnak meg:

1. Kiféheredés vagy „bleaching”. Ebben az esetben a kezdeti időpillanatban a gerjesztés következtében az alapállapot abszorpciója jelentősen csökken, így a minta oldali detektor több fényt detektál, mint a referencia ágban levő. A mért abszorpcióváltozás ilyen módon negatív értéket vesz fel, és a relaxációval párhuzamosan (ahogyan az alapállapot abszorpció nő), abszolút értéke csökken, vagyis a nullához közelít.
2. Stimulált emisszió. A gerjesztett állapotban lévő mintából a próba impulzus hatására fotonok lépnek ki, ennek megfelelően ismét nagyobb a transzmisszió, mint a referencia ágban, vagyis a mért abszorpcióváltozás ezúttal is negatív.
3. Fotoindukált abszorpció vagy gerjesztett állapoti abszorpció („excited state absorption”, ESA). Ez esetben a gerjesztett állapotban a minta abszorbeál, ennek megfelelően a mintán kevesebb fény megy át, mint a referencia ágban. A mért abszorpcióváltozás ezúttal tehát pozitív.

Kísérleteinket egy saját építésű femtoszekundumos időfelbontású tranziens abszorpciós berendezéssel végeztük el. Tekintettel arra, hogy egészen a legutóbbi ideig nem álltak rendelkezésre kommerciális femtoszekundumos tranziens abszorpciós berendezések, a technológiát alkalmazó laborok sajátépítésű pumpa-próba berendezésekkel végzik kísérleteiket. Érdemes ezért kitérnünk az általunk használt rendszer sajátosságaira. (Az elmúlt évben végül két cég is – a Newport és a Del Mar Photonics – piacra lépett saját pumpa-próba berendezéseivel, amelyek egyelőre nem terjedtek el a laboratóriumokban. Ennek egyik oka, hogy az említett berendezések viszonylag drágák, és a műszaki tartalom tekintetében is jobbak a saját építésű rendszerek.)

3.2.2 Titán-zafír lézer

Az általunk használt tranziens abszorpciós berendezés femtoszekundumos időfelbontású mérések elvégzésére alkalmas. Ehhez természetesen femtoszekundumos impulzusokat emittáló módusszinkronizált lézerre van szükség.

Alap esetben egy lézer rezonátorban számos állóhullám, vagyis módus lehet jelen; ezek számát a lézeraktív anyag sáv szélessége, illetve a rezonátor hossza határozza meg. Ha a rezonátor hossza ugyanis a $\lambda/2$ egész számú többszöröse, akkor konstruktív interferencia lép fel, ellenkező esetben a destruktív interferencia miatt fellépő veszteségek nagyobbak, mint a lézeraktív anyag erősítése. Ennek megfelelően a rezonátorban azok a λ_n hullámhosszú longitudinális módusok lehetnek jelen, amelyekre teljesül a következő feltétel:

$$\lambda_n = 2L/n, \quad (\text{II.2})$$

ahol L a rezonátor hossza, n pedig egész szám. Frekvenciában kifejezve:

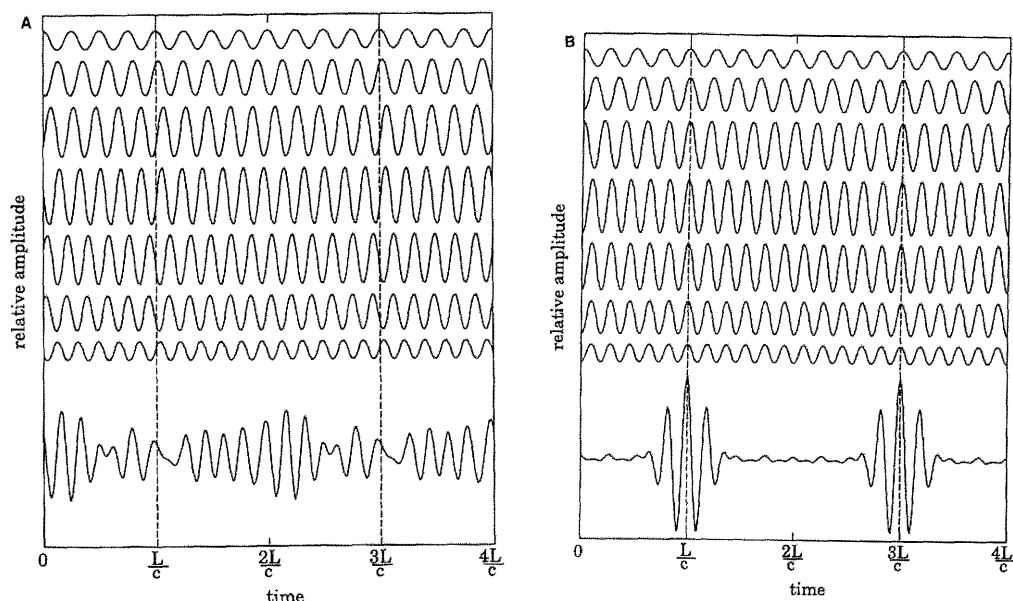
$$\nu_n = nc/2L \quad (\text{II.3})$$

Két módus között a frekvenciakülönbség ennek megfelelően:

$$\delta\nu = \nu_{n+1} - \nu_n = c/2L \quad (\text{II.4})$$

A rezonátorban jelenlevő módusok számát így a lézeraktív anyag sáv szélességének és a két módus közötti frekvenciakülönbségnek a $\Delta\nu/\delta\nu$ hányadosa adja meg. A rezonátorban jelenlevő módusok fázisa egymáshoz képest véletlenszerű, ha azonban sikerül elérni, hogy azonos legyen a fázisuk, akkor a rezonátorban csak egy impulzus

fog „közlekedni”, $t = 2L/c$ körüljárási idővel. A fázisok rögzítését módusszatolásnak vagy módusszinkronizációnak nevezzük (II.8. ábra), és az előállítás módjától függően beszélünk aktív illetve passzív módusszinkronizációról. Az aktív módusszinkronizálás egy kívülről vezérelhető elem, nagyon gyakran például egy akusztó-optikai modulátor, segítségével valósul meg. Passzív módusszinkronizálás esetén a rezonátor nem tartalmaz kívülről vezérelhető elemet, a fázisok szinkronizálása egy passzív elem alkalmazásával (telítődő abszorbens, Kerr-lencse) valósul meg.



II.8. ábra Az ábrán hét longitidinalis módus, illetve azok szuperpozíciója látható véletlenszerű fázis (A) és azonos fázis esetében (B). (Forrás: Enoch Small, 1991².)

3.2.2.1 Kerr-lencsés módusszinkronizálás

A rövid impulzusok előállításához az egyik legelterjedtebb és legkedveltebb módszer a Kerr-lencsés módusszinkronizálás²², amely a passzív módusszinkronizálási módok közé tartozik. A módszer hatalmas előnye, hogy nincs szükség vezérlő elektronikára (aktív módusszinkronizálás) vagy drága telítődő abszorbensre (passzív módusszinkronizálás).

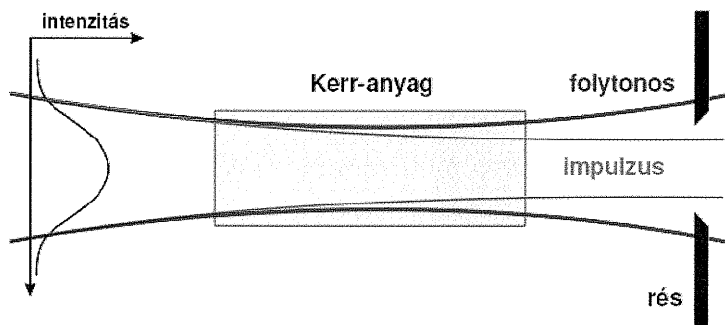
A Kerr-lencsés módusszinkronizálás, ahogyan az a nevéből is következik, az optikai Kerr-effektus jelenségét használja ki, amelynek az a lényege, hogy nagy intenzitás esetén a közeg törésmutatója intenzitásfüggő lesz:

$$n(I) = n_0 + n_2(I) + \dots, \quad (\text{II.5})$$

ahol n_0 a szokásos, n_2 pedig a nemlineáris törésmutató.

Tekintettel arra, hogy esetünkben a lézernyaláb intenzitása a keresztmetszeténél egy Gauss-függvénnyel írható le, a Kerr-hatás következtében a közeg törésmutatója ennek megfelelő törésmutató profillal fog rendelkezni. Ennek eredményeként egy plánpáralel közeg egy intenzív impulzussal szemben lencseként fog viselkedni, alacsony intenzitásúak esetén azonban az – önfókuszálásnak nevezett – jelenség nem figyelhető meg.

A Kerr-lencses módusszinkronizálásnak két fajtája van, a hard- illetve szoft-apertúrás módusszinkronizálás. Mindkét esetben a cél a folytonos üzemmód „elnyomása” és az impulzus üzemmód felerősítése. Ennek érdekében a szoft-apertúrás módusszinkronizálás esetében a rezonátort úgy tervezzük meg, hogy az impulzus üzemmódban nagyobb legyen az erősítés, mint a folytonos (CW) üzemmódban. Ebben az esetben a módusszinkronizálást az egyik rezonátortükör mozgatásával indítjuk el; a kis elmozdulás eredményeként a nyaláb enyhén divergenssé válik és a CW teljesítmény lecsökken. A tükör mozgatásával ugyanakkor egy „zaj” impulzus kezd el közlekedni a rezonátorban, amely a lézerkristályban létrejövő Kerr-hatás következtében felerősödik. Néhány körülfutást követően egyetlen rövid impulzus fog közlekedni a rezonátorban, „elnyomva” a CW működést.



II.9. ábra A hard-apertúrás Kerr-lencses módusszinkronizálás elve.

A hard-apertúrás módusszinkronizálás esetében egy rést helyezünk el a rezonátorban, amely a folytonos működés számára jelentős veszteséget okoz; impulzus üzemmódban azonban, tekintettel az önfókuszálásra, a nyaláb veszteség nélkül halad át a résen (ahogyan ez a II.9. ábrán látható).

3.2.2.2. Diszperziókompenzálás

A megfelelő módusszinkronizációs módszer megtalálása mellett az alkalmas lézeraktív anyag kiválasztása is kulcskérdés a rövid impulzusok előállításához. Minél több longitudinális módust szinkronizálunk, annál rövidebb a generált impulzus, ehhez pedig – mint az a $\Delta v/\delta v$ hányadosból következik – nagy sáv szélességű lézeraktív anyagra van szükség.

Az elmúlt két évtized talán leggyakrabban alkalmazott lézeraktív anyaga a Ti^{3+} ionokkal szennyezett zafír kristály (Al_2O_3), amely széles erősítési sávja (670-1070 nm) és kedvező hővezetési tulajdonságai miatt alkalmas a femtoszekundumos lézerimpulzusok előállításához²³. A titán-zafír kristály felfedezése nyitotta meg gyakorlatilag az utat a femtoszekundumos lézerek elterjedése előtt, alkalmazásával ugyanis „könnyen” építhetők akár 10-30 fs-os impulzusú lézerek, de sikerült létrehozni 5 fs alatti lézerimpulzusokat is²⁴. A kereskedelmi forgalomban kapható („tabletop”) femtoszekundumos lézerek többsége kb. 100 fs-os.

Femtoszekundumos impulzusokat azonban csak akkor lehet előállítani, ha sikerül kompenzálni az impulzusnak a rezonátorban levő optikai elemek miatti időbeni megnyúlását.

Az optikai elemek törésmutatója (n) ugyanis frekvenciafüggő (diszperzív), aminek következtében a fázis is frekvenciafüggő lesz:

$$\phi = \frac{\omega L n(\omega)}{c} \quad (II.6)$$

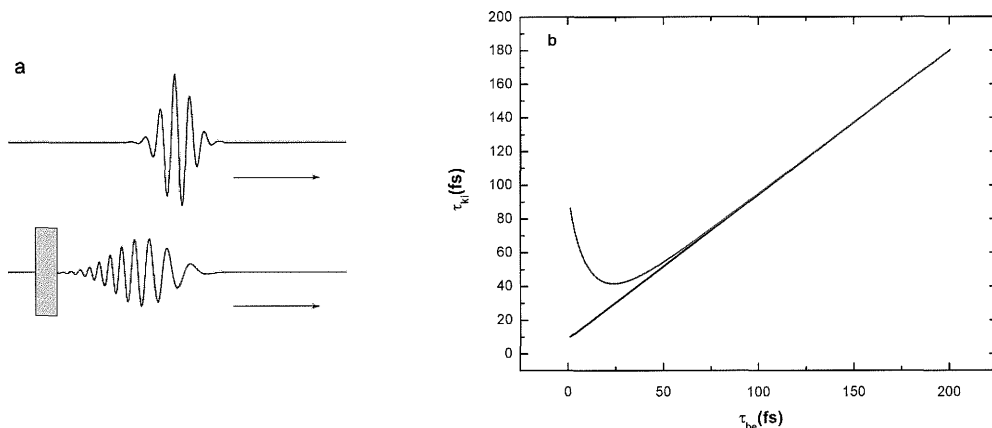
Ha a fázist ω_0 középfrekvencia körül Taylor sorba fejtjük, szemléletes képet kapunk azokról az effektusokról, amelyek akkor lesznek jelentősek, ha rövid impulzus halad át egy diszperzív közegen.

$$\varphi(\omega) = \varphi(\omega_0) + (\omega - \omega_0)\varphi'(\omega_0) + \frac{1}{2}(\omega - \omega_0)^2\varphi''(\omega_0) + \frac{1}{6}(\omega - \omega_0)^3\varphi'''(\omega_0) + \dots, \quad (II.7)$$

$$\text{ahol } \varphi'(\omega_0) = \left. \frac{\partial \varphi}{\partial \omega} \right|_{\omega=\omega_0}, \quad \varphi''(\omega_0) = \left. \frac{\partial^2 \varphi}{\partial \omega^2} \right|_{\omega=\omega_0}, \quad \varphi'''(\omega_0) = \left. \frac{\partial^3 \varphi}{\partial \omega^3} \right|_{\omega=\omega_0}, \dots$$

A fázis első deriváltja az impulzus késését jellemzi a vákumbeli terjedéshez képest, elnevezése csoport késleltetés („group delay”). A rövid impulzusok előállítása szempontjából leglényegesebb tag a fázis második deriváltja, amelyet csoport sebesség diszperzióknak hívunk („group velocity dispersion”, GVD). A GVD az

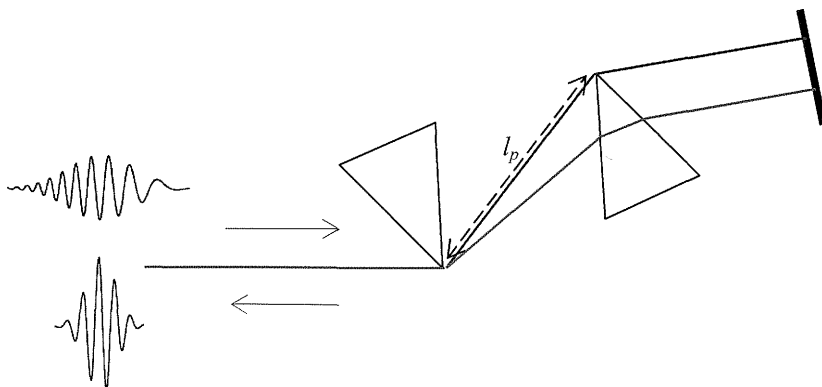
impulzusterjedésnek azt a tulajdonságát jellemzi, amelynek során egy (pozitívan) diszperzív közegben a hosszabb hullámhosszak „előresietnek”, a rövidebbek pedig „lemaradnak” (II.10. ábra).



II.10. ábra a) Egy impulzus megnyúlása diszperzív közegben. b) Impulzus megnyúlása 10 mm BK7-es üvegen való áthaladás után. Pirossal ábrázoltam a közegen való áthaladás utáni impulzushosszat. Jól látszik, hogy a diszperzió a 30 fs alatti impulzusok estében okoz jelentős megnyúlást.

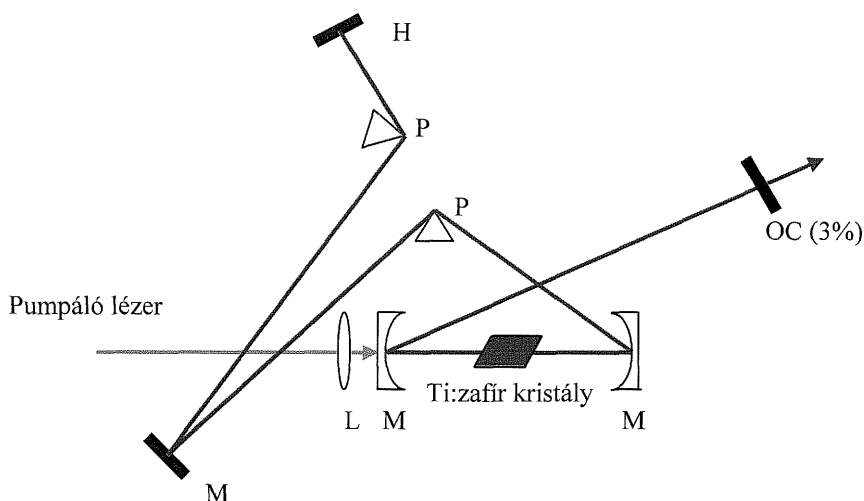
A fázis, frekvencia szerinti harmadik deriváltja („third order dispersion”, TOD) az impulzus torzulását írja le, ez a jelenség a 10 fs körüli illetve alatti impulzushosszak esetén válik jelentőssé.

A rezonátorban használt optikai elemek általában pozitív diszperziót „visznek” a rendszerbe, aminek következtében az impulzus időben „szétfolyik”. A rövid impulzusok előállítására érdekében ezt a pozitív diszperziót kompenzálni kell, vagyis olyan optikai elemeket kell használni, amelyek negatív diszperziót hoznak létre. A diszperzió kompenzálására több módszer is létezik, az általunk használt oszcillátorban (II.11. ábra) egy prizmapár segítségével „nyomtuk” megfelelő méretűre az impulzushosszat.



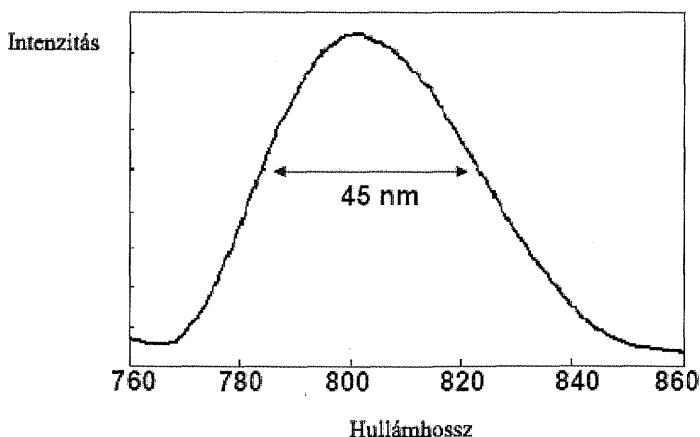
II.11. ábra A prizmás impulzuskompresszor.

Ahogy az a II.11. ábrán is látszik a prizmás impulzus-kompresszió során a prizmák anyaga (vagyis a törésmutatója), illetve a prizmák csúcsai közötti l_p távolságot úgy választjuk meg, hogy a hosszabb hullámhosszak fázisba kerüljenek a rövidebbekkel. A prizmás kompresszor alkalmazásával elért legrövidebb impulzusok hossza kb. 10 fs-os, ez alatti impulzusok eléréséhez más módszerre van szükség.



II.12. ábra Az általunk használt lézer-oscillátor felépítése. H: nagy reflexiójú tükör, P:prizma, M:gömbtükör, L:lencse, OC:kicsatolótükör.

A méréseimhez használt pumpa-próba rendszer alapeleme egy házi építésű soft-apertúrás Kerr-lencsés módon módusszinkronizált titán-zafir lézer oszcillátor volt (II.12. ábra), amely 80 MHz ismétlési frekvenciával, kb. 25-30 fs-os rövidségű impulzusok előállítására volt alkalmas (II.13. ábra)



II.13. ábra Az általunk használt titán zafir lézer-oscillátor kimenete.

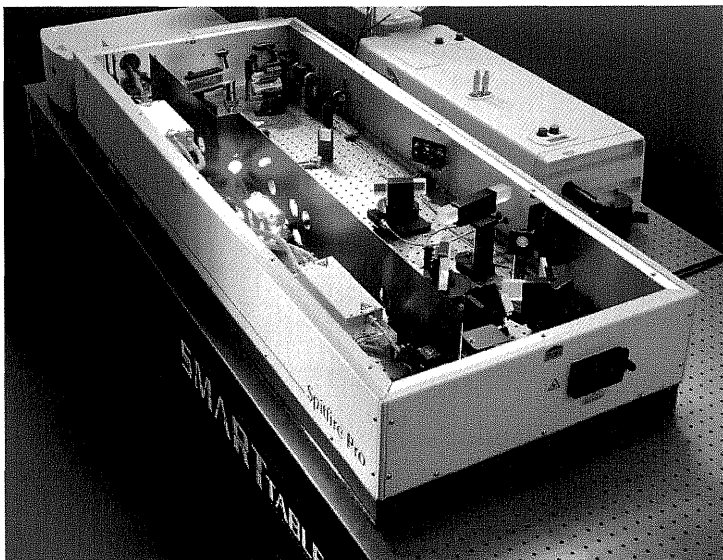
3.2.2.3. Regeneratív erősítő

A méréseimhez használt pumpa-próba rendszer fontos eleme egy úgynevezett regeneratív erősítő, amelynek segítségével a titán-zafír lézer által előállított impulzusok energiáját sikerült „felerősíteni”. A regeneratív erősítő 1kHz ismétlési frekvencia mellett kb. 0.5 mJ energiájú impulzusok előállítására volt alkalmas.

Az ilyen nagy energiájú impulzusokra azokhoz a nemlineáris folyamatokhoz volt szükségünk, amelyekkel a pumpa-próba rendszer pumpa impulzusait, illetve próba impulzusait előállítottuk.

A regeneratív erősítő működését a következőképpen lehetne – a végletekig leegyszerűsített módon – összefoglalni: a titán zafír oszcillátor impulzusait egy Q-kapcsolt lézerrel pumpált, rezonátorba helyezett titán-zafír kristályba vezetjük, ami stimulált emisszióhoz vezet. Az így keletkezett impulzust néhány körülfutás idejére a rezonátorban „járatjuk”, ami által, minden egyes kört követően egyre nagyobb energiára tesz szert. Mintegy tíz körülfutást követően az impulzust, aminek már néhány nagyságrenddel nagyobb az energiája, kicsatoljuk.

Pumpa-próba rendszerünkhöz, a Spectra Physics által gyártott Spitfire regeneratív erősítőt használtuk, amelynek pumpálása a Spectra Physics Merlin típusú Q-kapcsolt, frekvenciakétszerezett Nd:YLF lézerrel (527 nm, 10 mJ, 1kHz, 250 ns, Merlin, Spectra Physics) valósul meg.



II.14. ábra A kísérletek során használt Spitfire típusú regeneratív erősítő.

3.2.3 Nem-kollineáris parametrikus erősítő (NOPA)

3.2.3.1 Az optikai parametrikus erősítés

Az optikai parametrikus erősítők („optical parametric amplifier”, OPA) közkedvelt fényforrások az ultragyors jelenségeket vizsgáló laborokban, használatukkal ugyanis néhány μJ energiájú femtoszekundumos impulzusokat lehet előállítani széles hullámhossztartományon, az alkalmazott frekvenciakonvertáló kristálytól függően. A méréseimhez használt pumpa-próba rendszerbe egy speciális optikai parametrikus erősítőt építettem be, aminek segítségével rövid (~ 50 fs) impulzusú, az 550-700 nm-en hangolható pumpa impulzusok álltak a rendelkezésemre. Ezzel a fényforrással sikerült elkerülnöm a fotoliáz MTHF kromoforjának gerjesztését, amely korábban hibás következtetésekhez vezetett a fotoaktiváció mechanizmusára vonatkozóan¹⁸.

Az optikai parametrikus erősítés az optikai parametrikus generálás egyik speciális esetének felel meg. Az optikai parametrikus generálás (OPG) során egy nagyenergiájú ω_p impulzus egy nemlineáris kristályon való áthaladáskor spontán módon ω_s és ω_i fotonokra „hasad”. A folyamat során teljesülnie kell az energia- és az impulzus- megmaradásnak, vagyis a bemenő és a keletkező fotonokra teljesülniük kell a következő feltételeknek:

$$\omega_p = \omega_s + \omega_i, \quad (\text{II.8})$$

$$\vec{k}_p = \vec{k}_s + \vec{k}_i, \quad (\text{II.9})$$

ahol a p index a „pump”, az s a *signal*, az i pedig az *idler*-re utal (a konvenciók szerint a *signal* nagyobb energiájú, az *idler* pedig a kisebb energiájú fotont jelenti).

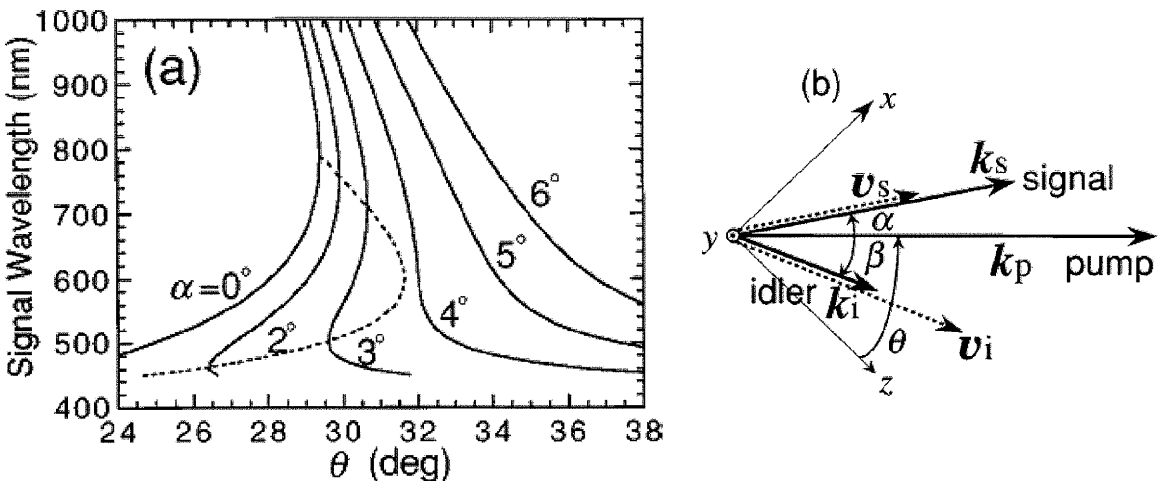
A fázisillesztési feltétel nem teljesül automatikusan minden kristályban, számos kettőtörő kristályban azonban megvalósulhat, ha a pumpanyaláb a kristály optikai tengelyével megfelelő szöget (θ_m) zár be.

Ha a nemlineáris kristályt, amelyben a folyamat megvalósul, egy rezonátorba helyezük, amelyben a parametrikus erősítés nagyobb, mint a veszteségek, a rezonátor egy lézerhez hasonlóan „működni” kezd; ekkor beszélünk optikai parametrikus oszcillátorról (OPO).

Optikai parametrikus erősítés valósul meg, ha a pumpaimpulzus mellé az ω_s impulzust keverjük, melynek következtében ω_s felerősödik a kristályon való áthaladást követően; a fázisillesztési feltételnek természetesen itt is teljesülnie kell.

Abban az esetben, ha a bemenő pumpa és „signal” nyaláb egymással 0 fokos szöget zárnak be, kollineáris optikai parametrikus erősítőről beszélünk; ha a pumpa és a „signal” nyaláb α szöget zárnak be egymással, akkor beszélünk nem kollineáris optikai erősítőről (NOPA).

Kollineáris esetben a „signal” és az „idler” impulzusok csoportsebességének eltérése miatt („group velocity mismatch”, GVM) adott θ_m esetén a fázisillesztés és egyben az erősítés csak egy keskeny hullámhossz-tartományban jöhet létre, aminek következtében az impulzus nem lesz kellően rövid (az így elérhető legrövidebb impulzusok a 30-50 fs-os tartományba esnek).



II.15. ábra a) A fázisillesztési tartomány a pumpa és a *signal* nyaláb által bezárt szög függvényében BBO esetében (I-es típusú illesztés). Jól látszik, hogy a 4° -hoz közeli szögek esetén a fázisillesztés nagyon széles spektrumon valósul meg. b) A nem-kollineáris fázisillesztés geometriája. A pumpa és a *signal* impulzusok egymással α szöget zárnak be, a keletkező idler és a pumpa által bezárt szög pedig β . (Forrás: Shirakawa, 1997.)

A nem-kollineáris elrendezéssel elkerülhető ez a probléma, kis α szög esetén a fázisillesztés széles hullámhossz tartományon megvalósul (II.15. ábra), vagyis sikerül rövid impulzust előállítanunk²⁵⁻²⁸.

A nemkollineáris elrendezés segítségével sikerült átlépni a 20 fs-os határt, a legrövidebb (~ 5 fs) NOPA impulzust, diszperziókompenzáló elemként prizmát és fáziskorrigáló tükröt („double chirped mirror”) használva.

3.2.3.2. Fehér fény kontinuum-keltés

Kollineáris és nem-kollineáris optikai erősítők esetében gyakran az erősített „signal” impulzus egy úgynevezett fehér fény kontinuum.

A fehér fény kontinuum létrehozása során a feljebb ismertetett optikai Kerr-effektus következményét, az önfázis-moduláció jelenségét használjuk ki. Nagy intenzitások esetében ugyanis – az $n(I) = n_0 + n_2(I) + \dots$ összefüggés miatt – az (5) összefüggés által leírt fázisnak lesz egy nemlineáris tagja is:

$$\phi_{nl} = \frac{\omega L n_2 I(t)}{c} \quad (\text{II.10})$$

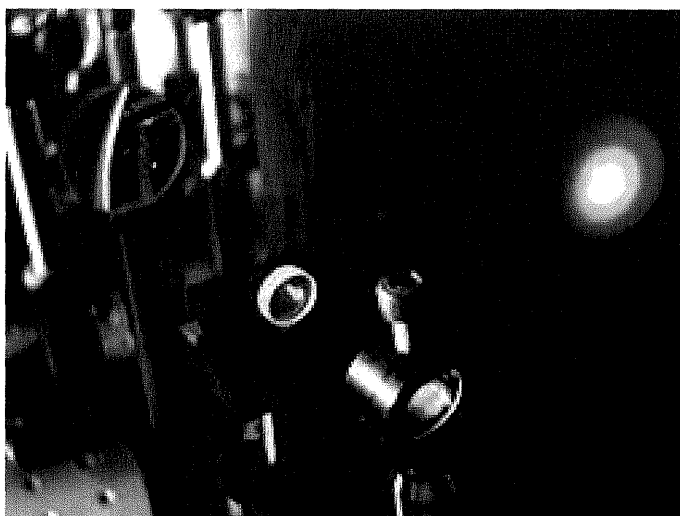
Mivel az x irányba terjedő impulzus elektromos tere a következőképpen adható meg:

$$E(t) \cos(\omega t - kx), \quad (\text{II.11})$$

ahol k hullámszám $\omega n/c$ -vel egyenlő. Nagy intenzitású nyaláb esetében az elektromos tér tartalmazni fog egy, a nemlineáris törésmutató tagtól (n_2) függő frekvencia komponens is, aminek következtében a térerősség a következőképpen módosul:

$$E(t) \cos(\omega t + \xi t - kx), \quad (\text{II.12})$$

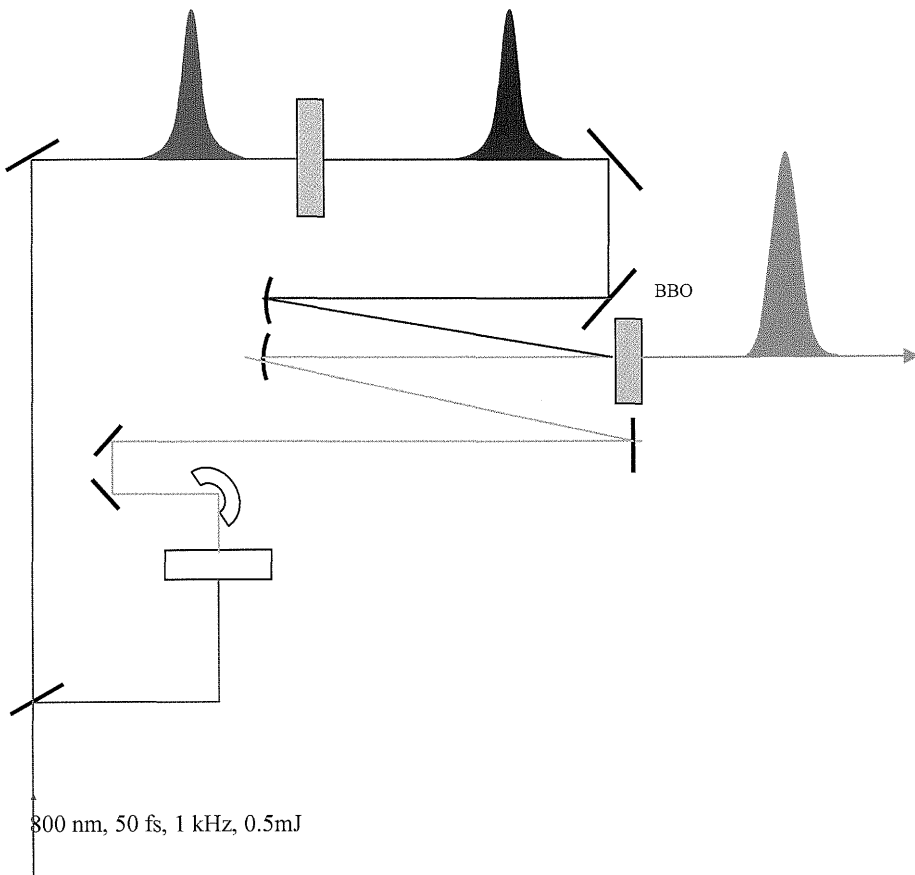
ahol ξ függ a nemlineáris törésmutatótól, az impulzus szélességétől és intenzitásától, valamint a közegben megtett úttól. A jelenség következtében az impulzus spektrálisan kiszélesedik, így egy széles spektrumú, fehér fény kontinuumnak nevezett impulzussal fogunk rendelkezni (II.17. ábra).



II.17. ábra Fehér fény kontinuum-keltés („white light generation, WLG) egy zafír kristályban.

3.2.3.3. A NOPA gyakorlati megvalósítása

Az általam a pumpa-próba rendszerbe beépített NOPA felépítése az alábbi ábrán látható. Az erősítől kilépő nyalábot egy féligáteresztő tükörrel kettéválasztottam. Ezt követően az egyik nyalábot egy 31° -osra vágott (θ_m), 0.5 mm-es BBO kristályba fókuszáltam, aminek következtében sikerült frekvenciakétszereznem az alapnyalábot. A frekvenciakétszerezett nyalábot a II.18. ábrán látható módon egy második hasonló paraméterekkel rendelkező BBO kristályba tereltem.



II.18. ábra A NOPA vázlatos elrendezése.

A másik nyalábot egy zafír kristályba fókuszáltam, aminek eredménye a fent említett és a II.17. ábrán látható fehér fény kontinuum. A *signal* nyalábként szolgáló fehér fény kontinuumot egy parabolatükör segítségével gyűjtöttem össze, majd egy késleltető ágba tereltem. Erre azért volt szükség, mert a kék pumpanyalábnak és a fehér „signal” nyalábnak egy időben kell a kristályba érkeznie, hogy az optikai parametrikus erősítés megvalósuljon.

A gyakorlatban a NOPA beállítása két fázisban valósult meg: az első lépésben beállítottam az optimális szöget – a fázisillesztéshez szükséges szöveget az SNLO nevű szoftverrel²⁹ számoltam ki –, ennek eredménye az úgynevezett superfluoreszcens gyűrű megjelenése a pumpa-nyaláb körül. Ezt követte az egyenlő úthosszak beállítása, amelynek megvalósulása esetében a superfluoreszcens gyűrűn egy pontban megjelenik az erősített nyaláb (II.19. ábra) A pumpa-impulzus energiája 8-10 μJ volt, míg az erősített nyaláb energiája pedig az irodalmi adatoknak megfelelően 2 μJ körül alakult.



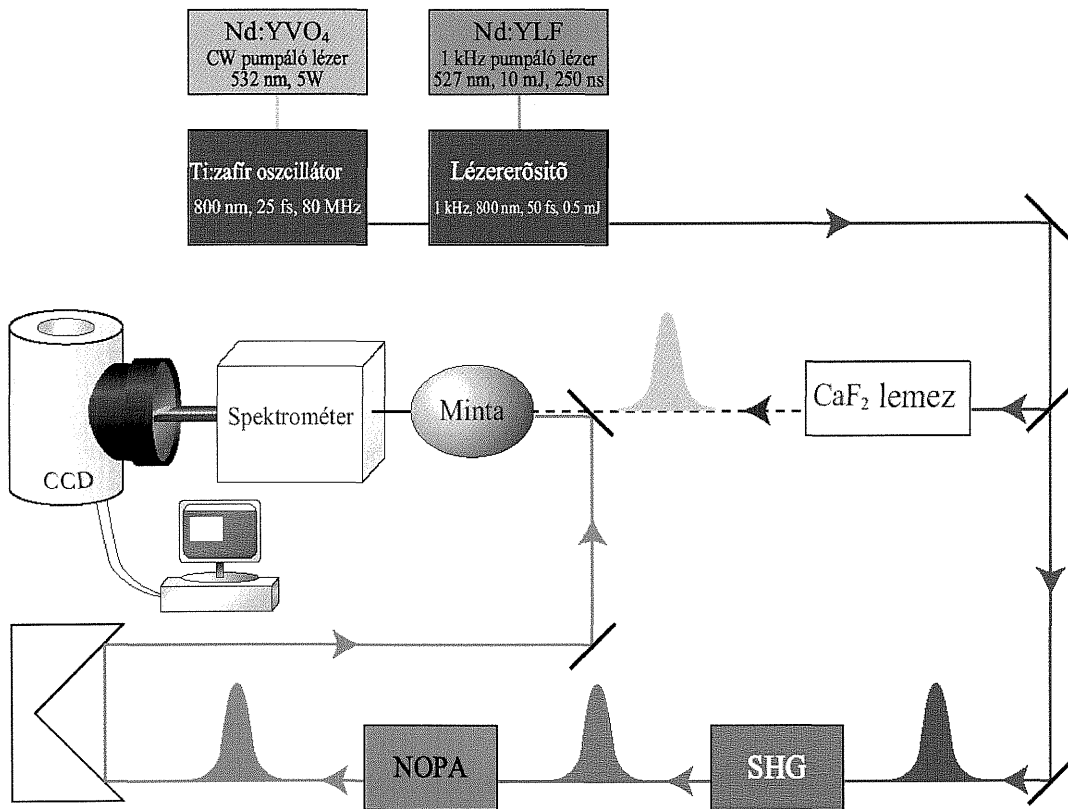
II.19. ábra A pumpa-próba rendszerbe épített NOPA működés közben.

Az itt ismertetett nem-kollineáris optikai parametrikus erősítő 100-150 nm-es hangolást tett lehetővé. A gyakorlatban a hullámhossz-hangolás a parabolatükör után található késleltető egység segítségével illetve a pumpa és a *signal* impulzus között szög enyhe állításával valósítható meg.

3.2.4 A pumpa-próba rendszer részletes bemutatása

A pumpa-próba mérési elvből adódóan a rendszer három blokkra osztható: a pumpa és a próba impulzust előállító egységekre illetve a detektáló részre (II.20. ábra). A pumpa impulzust, az előző fejezetben ismertetett nem-kollineáris optikai erősítőtől a késleltető egységbe tereltük, aminek a segítségével tudjuk a pumpa és a próba impulzus között eltelt időt beállítani.

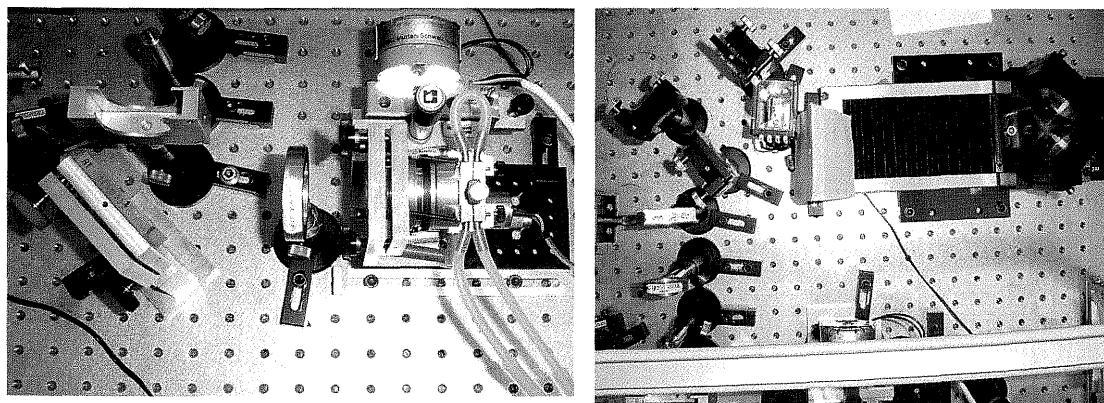
A próba impulzust – ami esetünkben fehér fény kontinuum – egy 1 mm vastag CaF_2 lemez segítségével állítottuk elő. Annak érdekében, hogy a fehér fény kontinuum előállításához használt nagy energiájú impulzusok ne tegyenek kárt a kristályban, a CaF_2 lemezt egy keretbe fogtuk, amelyet kb. 1 Hz frekvenciával folyamatosan mozgattunk. A kristályban található inhomogenitások miatt a nyaláb kristályba való fókuszálása során körültekintően kellett eljárni, ellenkező esetben a keret mozgásával szikronban a fehér fény kontinuum „vibrálni” kezd, vagyis intenzitása nem állandó.



II.20. ábra A pumpa-próba rendszer vázlatos felépítése.

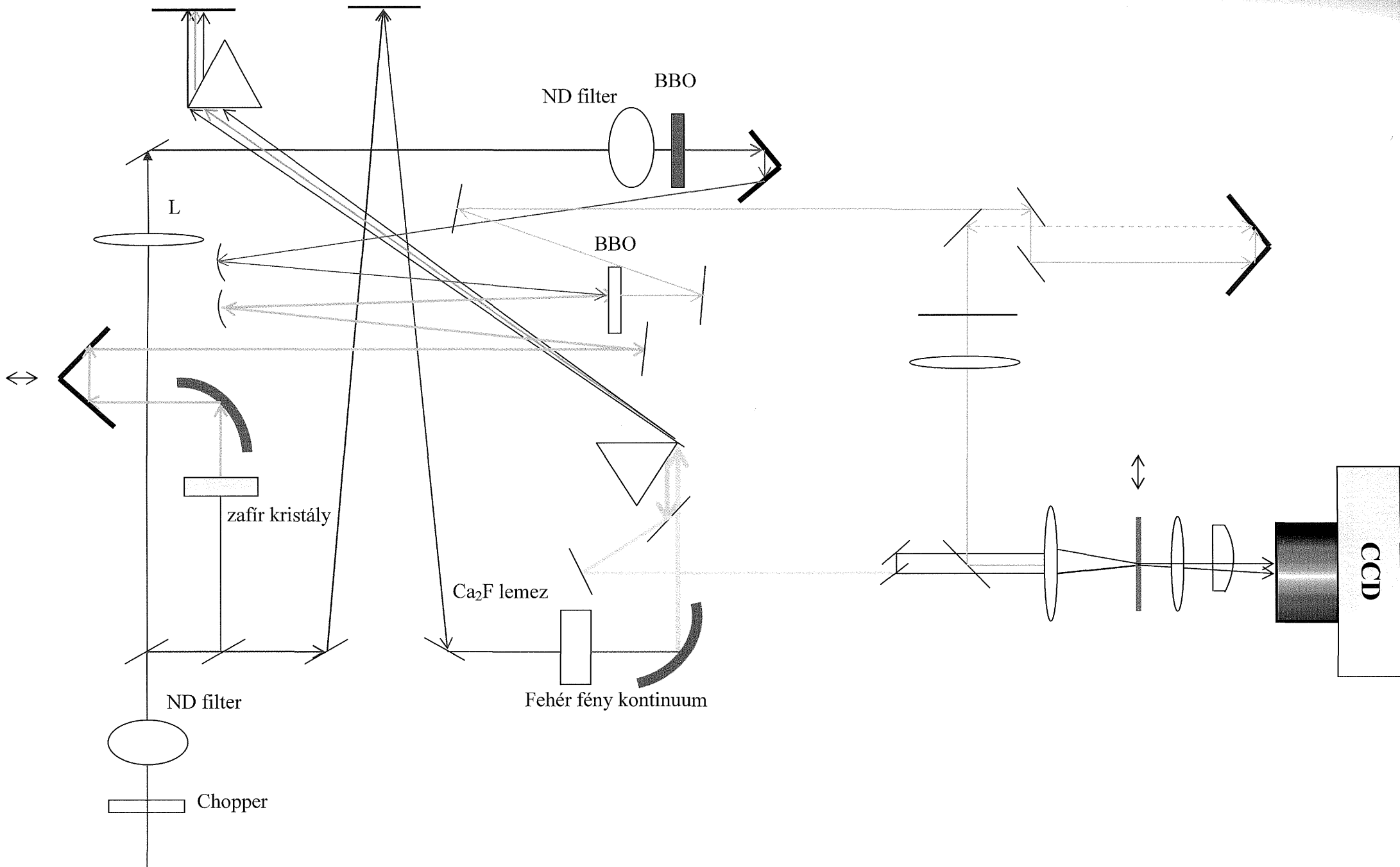
A CaF_2 lemezben keltett fehér fény kontinuumot egy prizmapár segítségével „nyomtuk” össze ~ 50 fs-ra (II.20. ábra); az így kapott kellően rövid impulzusú nyalábot pedig egy tükör segítségével ketté osztottuk (kb. 50-50 %). A referenciának tekintett ágat egyenesen a CCD-be (Roper Scientific, SPEC-10) tereltük, a másik nyalábot – ez a próba – pedig a mintába fókuszáltuk.

A mérések elvégzésének előfeltétele – és egyben egy fontos technikai feladat – a pumpa és a próba nyalábok térbeli átfedésének megvalósítása. Az átfedés ellenőrzését a gerjesztő hullámhossztól függően, benzolban oldott okta-etil-porfirinnel valamint etanolban oldott nile-blue festékkel ellenőriztem. Mindkét festék jelentős abszorpcióval (~ 100 mOD) rendelkezik a vizsgált gerjesztő hullámhosszakon. Tekintettel arra, hogy az általunk vizsgált időtartományon az okta-etil-porfirin abszorpcióváltozása állandó, segítségével ellenőriztem a késleltető egység párhuzamosságát (II.21. ábra). Abban az esetben ugyanis, ha a késleltető egységben a nyalábok nem párhuzamosak, akkor nagyobb késleltetések esetén (> 300 ps) a pumpa nyaláb elmozdul a próba nyalábhoz képest. Ilyen módon, a megfigyelt abszorpcióváltozás mögött nem egy valós biológiai-kémiai folyamat áll, hanem a nyalábok közötti átfedés megváltozása.



II.21. ábra . Az ábrán a mintatartó valamint a késleltető egység látható.

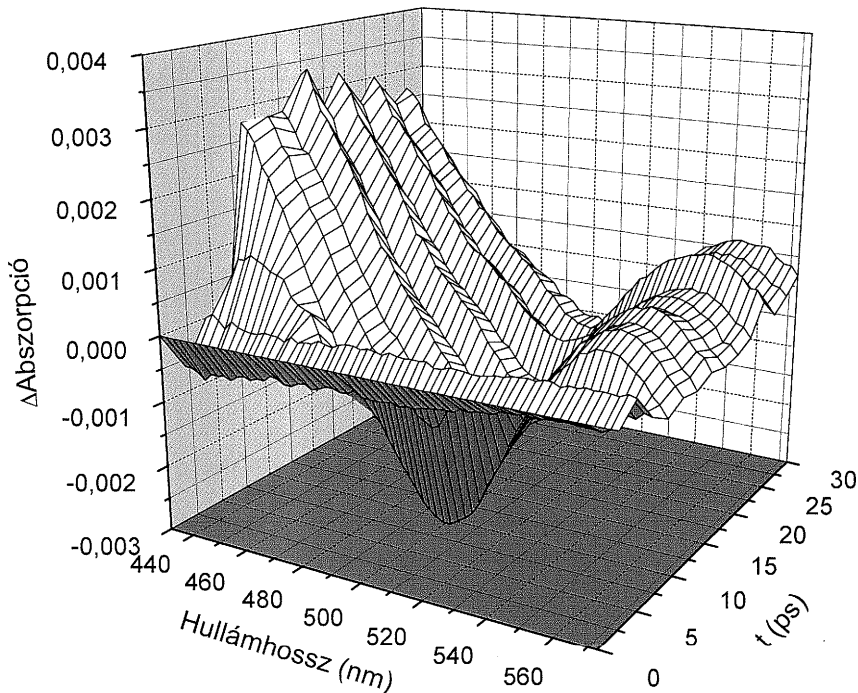
A mintát tartalmazó küvetát egy körkörös és függőleges mozgást végző mintatartóba helyeztük annak érdekében, hogy a pumpa impulzusok mindig „friss” fotoliázt gerjesszenek. A minta mozgatásával ugyanakkor sikerült csökkenteni a fotoliáz aggregációját, ezzel együtt a szórást.



II.22. ábra . A pumpa próba rendszer részletes összeállítása.

3.3 Adatgyűjtés és kiértékelés

A berendezésben használt CCD segítségével az adatgyűjtő szoftver az egyes hullámhosszakon, az adott késleltetésnél mért transzmissziót tárolta, ebből számoltuk ki az abszorpcióváltozásokat, aminek eredménye a $\Delta A(\lambda, t)$ mátrix (II.23. ábra).

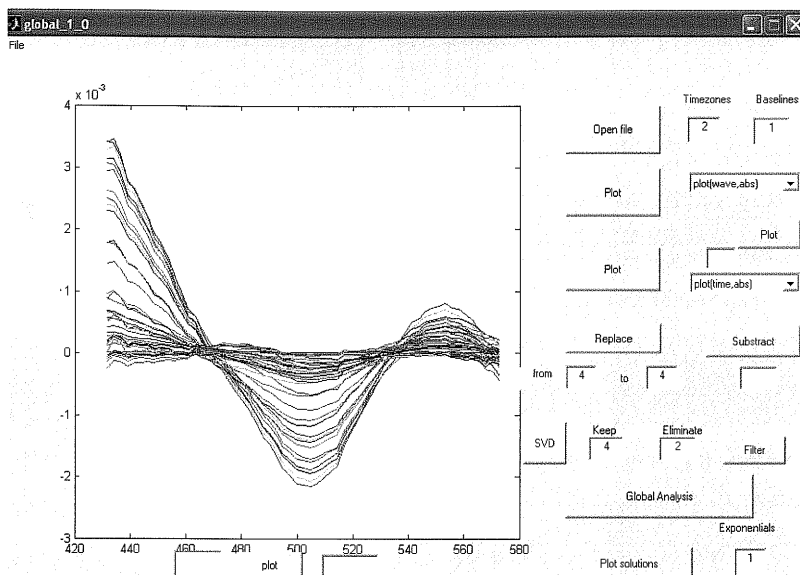


II.23. ábra . ΔA értéke egy tipikus fotoliáz-mérés során.

A kapott tranziens abszorpciós adatokat kétféleképpen értékeltük ki. Mindkét módszer a globális analízisnek nevezett kiértékelési eljárás családjába tartozik, melynek során azt az egyszerű feltételezést tesszük, hogy az abszorpció-változás alkalmasan megválasztott számú exponenciálisok összegeként közelíthető a következő módon:

$$\Delta A(\lambda, t) = \sum_i A_i(\lambda) e^{-k_i t}, \quad (\text{II.13})$$

ahol az A_i az adott a k_i sebességi állandóhoz tartozó spektrum („decay associated spectra”, DAS). A globális analízist a Provencher által írt SPLMOD³⁰ algoritmus Matlab platformra illesztett³¹, általam továbbfejlesztett változatával végeztük el (II.24. ábra).



II.24. ábra A képen az általam készített, az adatok analizését végző szoftver felülete látható.

Az algoritmus eredményként az 1-5 exponenciális feltételezésével elvégzett tartozó illesztések időállandóit ($1/k_i$), az időállandókhoz tartozó spektrumokat (DAS) illetve a $t=0$ és a $t=\infty$ időkhöz tartozó spektrumokat kapjuk meg.

A SPLMOD algoritmus használata mellett a mért tranziens abszorpciós adatokat minden esetben kiértékeljük a SVD-analízisnek ³²⁻³⁴ nevezett eljárással is.

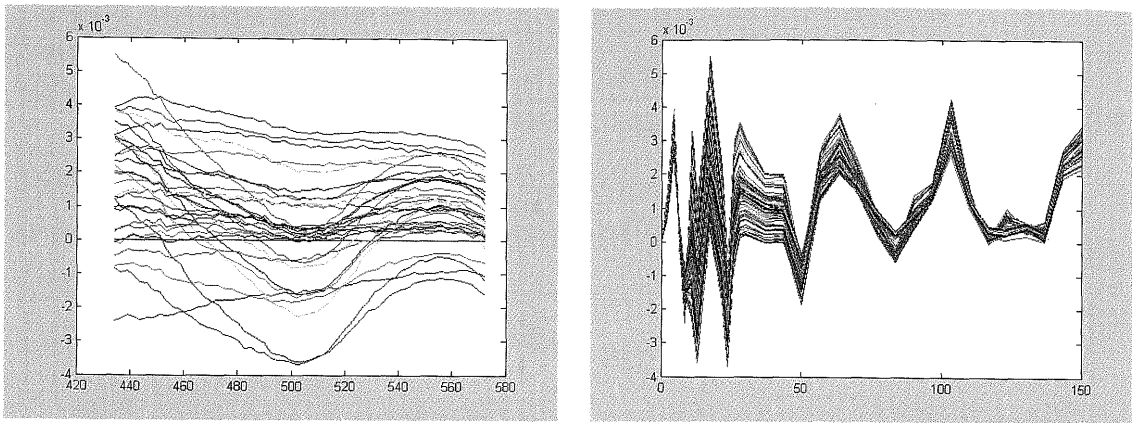
Az SVD („singular value decomposition) analízis, mint a neve is mutatja, azt a jól ismert alapelvet használja ki, hogy egy $m \times n$ méretű ($m > n$) mátrix felírható három mátrix szorzataként:

$$\mathbf{A} = \mathbf{U} \cdot \mathbf{S} \cdot \mathbf{V}^T, \quad (\text{II.14})$$

ahol \mathbf{S} egy $n \times n$ méretű diagonális mátrix, amelynek S_{ii} elemei az \mathbf{A} sajátértékei csökkenő sorrendben. \mathbf{U} egy $m \times n$, \mathbf{V} pedig egy $n \times n$ méretű mátrix.

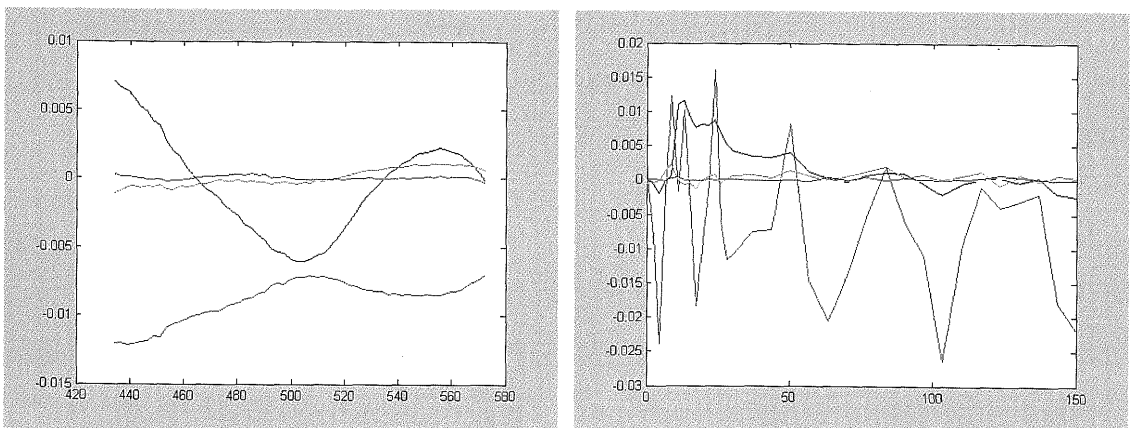
Jelen esetben a dekompozíciót követően \mathbf{U} oszlopai a sajátértékekhez tartozó spektrumokat, \mathbf{V} oszlopai pedig a megfelelő spektrum időbeni változását tartalmazza.

Többnyire az első négy-öt S_{ii} elem különbözik nullától szignifikánsan, a többi a zajt tartalmazza. A mért abszorpció-változás ilyen módon rekonstruálható az első négy-öt sajátérték megtartásával (a többi S_{ii} elem helyére nullát teszünk).



II.25. ábra. Az ábrán egy nagyon zajos mérés spektrumi és kinetikája látható. (A függőleges tengelyen az abszorpcióváltozás, a vízszintes tengelyen a hullámhossz, valamint az idő látható.) Az SVD algoritmus alkalmazásával a zaj nagy részét sikerült kiszűrni.

Ezáltal lehetővé válik a zaj kiszűrése anélkül, hogy maga a mért jel szignifikánsan megváltozna (II.25-27 ábra). A módszer előnye, hogy ilyen módon az illesztési feladat néhány – maximum négy-öt, a legtöbb esetben kevesebb – kinetikai görbe illesztésére redukálódik. A „konvencionális” globális analízis során, ezzel szemben, több tíz, akár több száz exponenciálisra van szükség.



II.26. ábra. Az ábrán az előző mérés öt legnagyobb sajátértékéhez tartozó spektrumok illetve kinetikai görbék láthatók (a piros a legnagyobb, a kék a második legnagyobb sajátértéket jelzi).

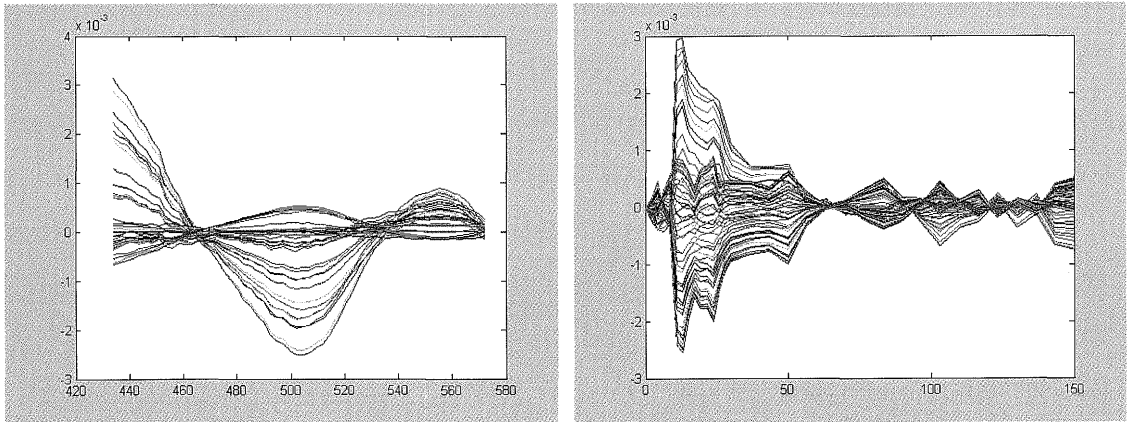
Az SVD analízis során az időállandók megkeresése és a hozzájuk tartozó DAS spektrumok megkonstruálása a következő egyenletek segítségével történik:

$$V_i(t) = \sum_{j=1}^n a_{ij} e^{-k_j t}, \quad (II.15)$$

$V_i(t)$ a \mathbf{V} mátrix S_{ii} sajátértékhez tartozó oszlopa, k_j pedig a j . sebességi állandó. A k_j -hez tartozó DAS spektrum a következő képlettel számítható ki:

$$DAS_j(\lambda) = \sum_{i=1}^s U_i S_{ii} a_{ij}, \quad (\text{II.16})$$

ahol U_i az \mathbf{U} mátrix i . oszlopa, s pedig a szignifikáns sajátértékek száma.



II.27. ábra. Az ábrán a zajt tartalmazó komponens kiszűrése után rekonstruált spektrumok illetve kinetikai görbék láthatóak.

4. Eredmények és következtetések

4.1 A W382F mutáns

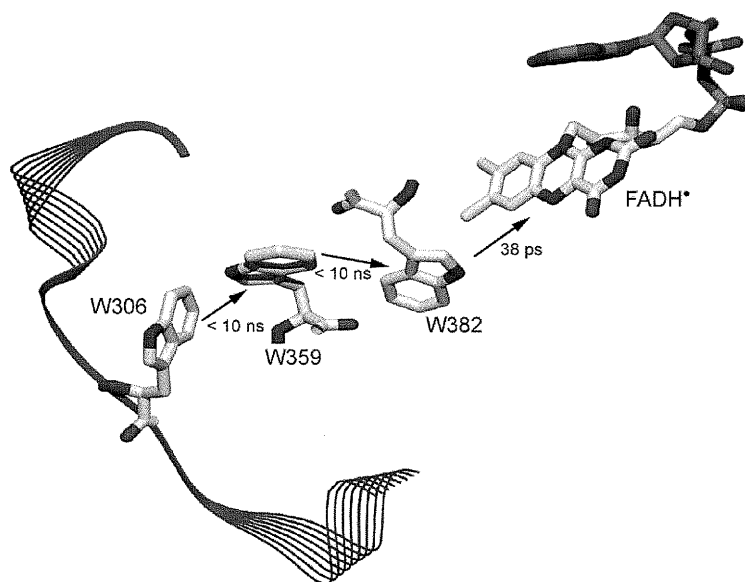
Ahogy az a bevezetőben már említettem, a fotoreaktiválás mellett egy második fotoreakció is végbemegy a fotoliázban, függetlenül attól, hogy jelen van-e a szubsztrát, vagy sem. Redukálószer jelenlétében, látható foton abszorpcióját követően az enzimen végbemegy a fotoaktiváció folyamata, amelynek végterméke a kofaktor katalitikus, $FADH^-$ formája. Ez a fotoreakció a flavin kofaktor semleges szabad gyök ($FADH^\bullet$), illetve oxidált FAD^{ox} állapotában is végbemegy. Vizsgálataink tárgya az *E. coli* fotoliázban végbemenő fotoaktiváció mechanizmusa volt.

Az *E. coli* fotoliáz 15 triptofánjának a redox semleges mutagenézissel megvalósított fenilalaninre való cserélésével, korábban sikerült beazonosítani a terminális elektron donort; a W306 triptofán fenilalaninre cserélése megakadályozta a fotoaktivációt, változatlanul hagyva az $FADH^\bullet$ gerjesztett állapotát illetve a szubsztrátkötést³⁵. Annak ellenére, hogy a szerkezeti adatok leginkább az *E. coli* fotoliázban az $FADH^\bullet \leftarrow W382 \leftarrow W359 \leftarrow W306$ elektron transzfer láncot valószínűsítették leginkább, nem volt közvetlen bizonyíték a W382-es és a W359-es számú triptofánok részvételére a folyamatban.

Korábbi kísérletek kimutatták¹⁶, hogy a W382-es és a W359-es triptofánok intermedierként vesznek részt az elektron transzfer folyamatban. A folyamat kinetikája ugyanis, melynek során a kofaktor redukálása megvalósul (~30 ps), gyorsabbnak bizonyult, mint a flavin és a W306-os triptofán távolságából feltételezett direkt elektron transzfer. Ennek megfelelően az elektron transzfer megvalósulására a következő reakciómechanizmust javasolták¹⁶:

- 1) Elektron transzfer a W382-es triptofánról a gerjesztett $FADH^\bullet$ -re ~30 ps alatt ($R=4.2 \text{ \AA}$).
- 2) Elektron transzfer a W359-es triptofánról a W382-es gyökre ($R=5.2 \text{ \AA}$) kevesebb mint 10 ns alatt.
- 3) Elektron transzfer a W306-os triptofánról a W359-es gyökre kevesebb mint 10 ns alatt.
- 4) Proton kilökődés a W306-os gyökről a vizes fázisba ~300 ns alatt.

A javasolt reakciósema teljes mértékben eltért a korábbi³⁶⁻³⁸ (elsősorban a Sancar csoport által megfogalmazott) hipotézisektől. Az eltérések valószínűleg abból adódtak, hogy az említett kísérletekben az alkalmazott lézerrel (ahol a gerjesztő fény hullámhossza 355 nm körül volt) nem a flavin FADH^\bullet állapotát, hanem az FAD^{ox} állapotot gerjesztették.



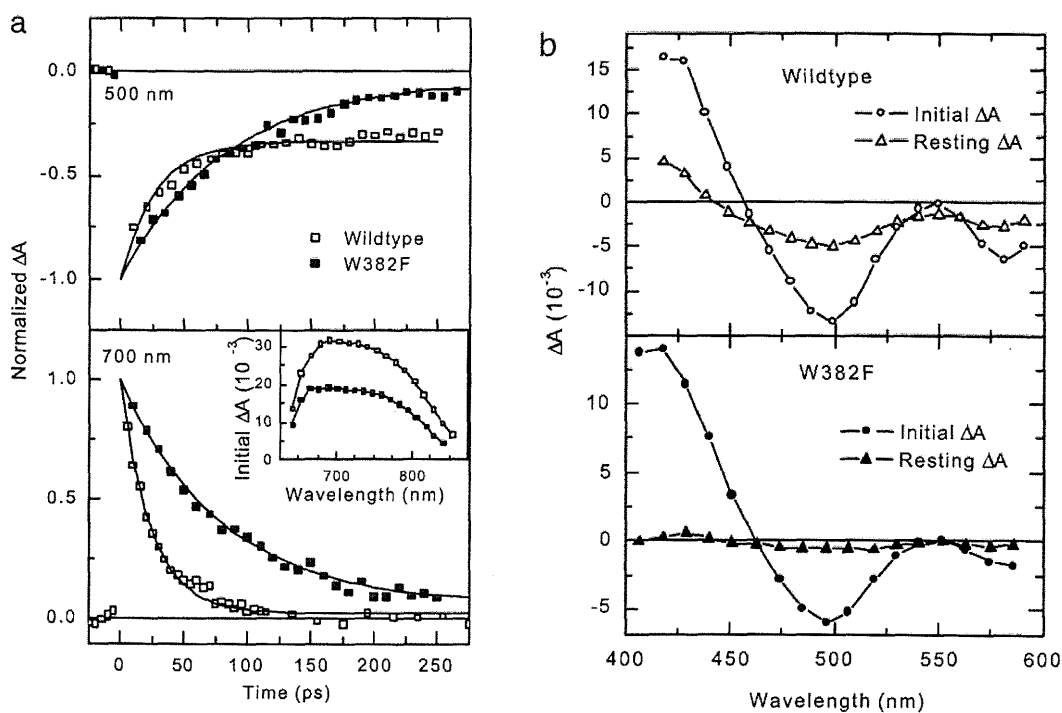
II.28. ábra. A fotoaktiváció javasolt mechanizmusa.

A három triptofán elektrontranszferben betöltött szerepének vizsgálata érdekében a triptofánokat mutagenézissel egyenként egy hasonló geometriájú, de az elektrontranszfer szempontjából inert fenilalaninre cseréltük (W382F, W359F). Kollégáimnak a W382F mutánson végzett kísérletei¹⁸ tisztázták a kofaktorhoz legközelebb álló triptofán (W382) szerepét az elektron transzfer folyamatban, illetve az $\text{FADH}^{\bullet*}$ állapot saját relaxációs idejét.

Az ultragyors lézerspektroszkópai kísérletek során a 620 nm körüli gerjesztéssel a fotoliáz tranziens abszorpcióját a 400-600 nm közötti, illetve 650-850 nm hullámhossz tartományokon mérték (a 600-650 nm közötti sávban, a gerjesztő fény erős szóródása miatt lehetetlen volt a tranziens abszorpció mérése).

4.1.1 Tranziens abszorpciós mérések a W382F mutáns

A közeli infravörösben (650-850 nm) sem a FADH^\bullet , sem a FADH^- , sem az oxidálódott triptofán nem abszorbeál alapállapotban, az abszorpcióváltozás az FADH^\bullet gerjesztett állapoti ($\text{FADH}^{\bullet*}$) abszorpciójának köszönhető. Ahogyan az a következő ábrán látszik, közeli infravörösben mind a vad típus, mind a mutáns (W382F) 250 ps alatt nulla közeli értékre relaxálódott, a sebességi állandók azonban láthatóan eltértek egymástól: a vad típus esetében a sebességi állandó $(24 \text{ ps})^{-1}$ körül, míg a mutáns esetében $(80 \text{ ps})^{-1}$ körül adódott. A 400-600 nm tartományban végzett mérések gyakorlatilag ugyanazokat a sebességi állandókat adták: $(\sim 27 \text{ ps})^{-1}$, illetve $(\sim 81 \text{ ps})^{-1}$.



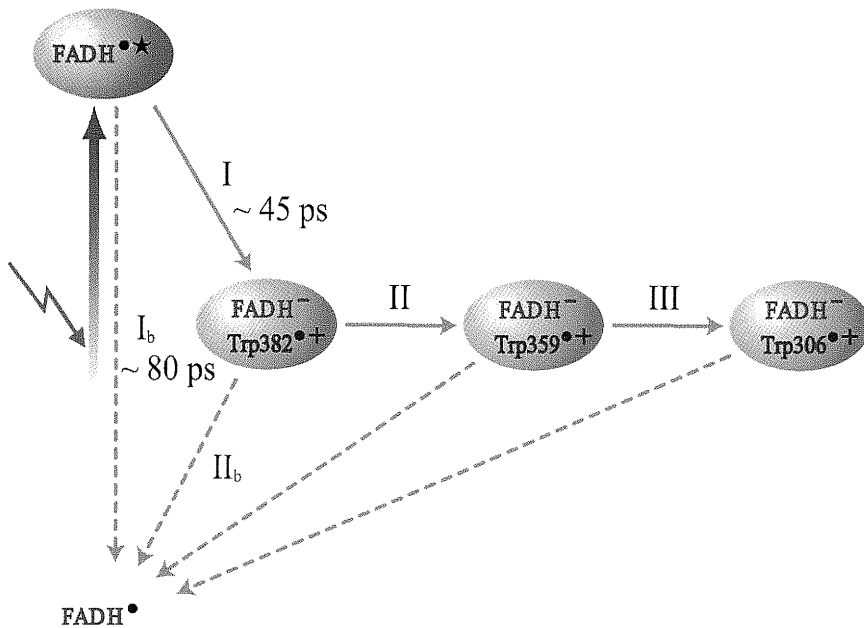
II.29. ábra a) Az abszorpcióváltozás kinetikája 500 és 700 nm esetében; b) A számított aszimptotikus spektrumok a vad típus és a mutáns esetében. Forrás: Byrdin, 2003¹⁸.

Szembetűnő különbség, hogy míg a vad típus esetében a kezdeti abszorpcióváltozás ~ 66 százalékkal csökkent a mérés 250 pikoszekundumos időtartama alatt, addig a W382F esetében több mint 90 százalékkal. Az $t=0$ időpillanathoz („initial” ΔA) tartozó aszimptotikus spektrum mindkét esetben nagyon hasonló alakot ölt: 500 és 580 nm körül mind a vad típus, mind a mutáns esetében megjelenik egy csúcs, ami az

FADH^\bullet alapállapotú abszorpció kifehéredésével (*bleaching*) magyarázható (II.29. ábra). A spektrumokból az is látszik, hogy míg 550 nm-nél az FADH^\bullet -nek az 500 és 580 nm-nél mérttel összemérhető abszorpciója van, a tranziens spektrumban nem látható kifehéredés. Ez arra utal, hogy ezen a hullámhosszon az FADH^\bullet gerjesztett állapotának 550 nm körül is van némi abszorpciója, a 420 nm körül megfigyelt jelentős gerjesztett állapotú abszorpció mellett.

4.1.2 Javasolt reakciómechanizmus

A $t=\infty$ időpillanathoz tartozó („resting” ΔA) aszimptotikus spektrum a vad típus esetében az ($\text{FADH}^- + \text{triptofán kation szabad gyök}$) és az ($\text{FADH}^\bullet + \text{semleges triptofán}$) spektrumok különbségének felel meg^{16,39}. Ez a spektrum viszont nem figyelhető meg a mutáns esetében, ami arra utal, hogy nem jön létre elektrontranszfer, vagyis a W382-es triptofán az elsődleges elektron donor. Ennek megfelelően a mutáns esetében megfigyelt $(80 \text{ ps})^{-1}$ körüli sebességi állandó az FADH^\bullet saját relaxációs idejének felel meg.



II.30. ábra A W382F mutánsban végzett kísérletek során sikerült meghatározni az I és I_b folyamatok sebességi állandóit: $\sim 80 \text{ ps}$ illetve $\sim 45 \text{ ps}$.

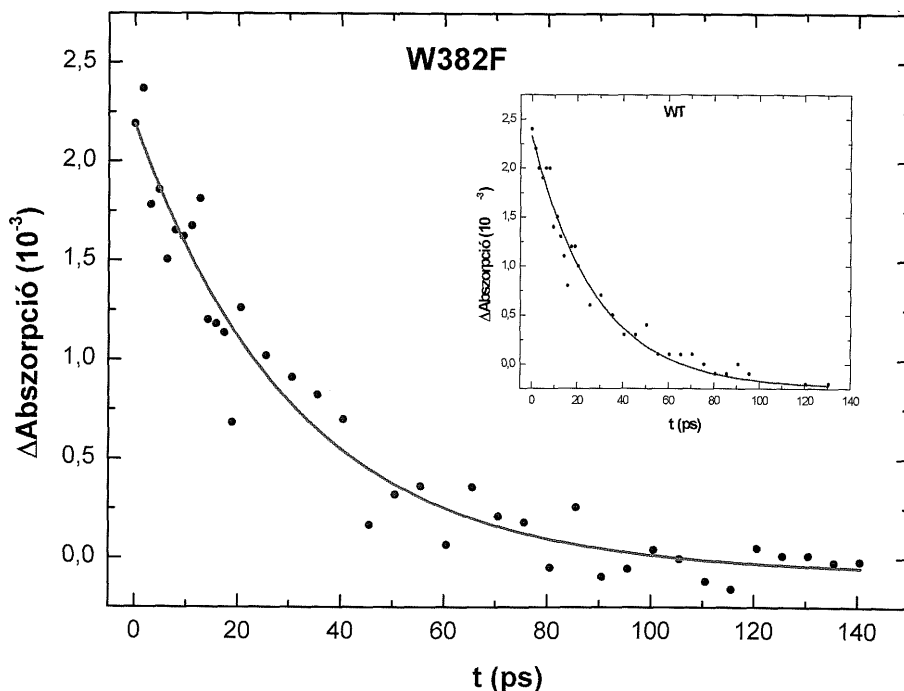
A vad típusnál megfigyelt relaxációs idő ennek megfelelően két kompetitív folyamat – az FADH^\bullet állapot elektrontranszfer következtében megvalósuló, illetve saját relaxációjának – eredménye. Ennek megfelelően a vad típusnál megfigyelt 26-29

pikoszekundumos relaxációs időből az következik (saját méréseim során többnyire a sebességi állandó $(28-29 \text{ ps})^{-1}$ körül adódott), hogy az elektron transzfer mintegy 38-45 ps alatt megy végbe.

4.2 A W359F mutáns

4.2.1 Tranziens abszorpciós mérések a W359F mutánson

Méréseim során a W359-es triptofánnak a fotoaktivációhoz vezető elektrontranszferben betöltött szerepét vizsgáltam. Ennek érdekében tranziens abszorpciós méréseket végeztem mind a vad típuson, mind a W359F mutánson, amelyben a W359-es triptofánt a hasonló geometriájú fenilalaninre cseréltük. A vad típuson végzett méréseket nem feltétlenül lett volna szükséges megismételni, de tekintettel arra, hogy az előző fejezetben ismertetett mérések egy másik pumpa-próba rendszerrel⁴⁰ készültek, az összehasonlíthatóság érdekében mind a vad típuson, mind a W359F mutánson elvégeztem ugyanazt a kísérletsorozatot.

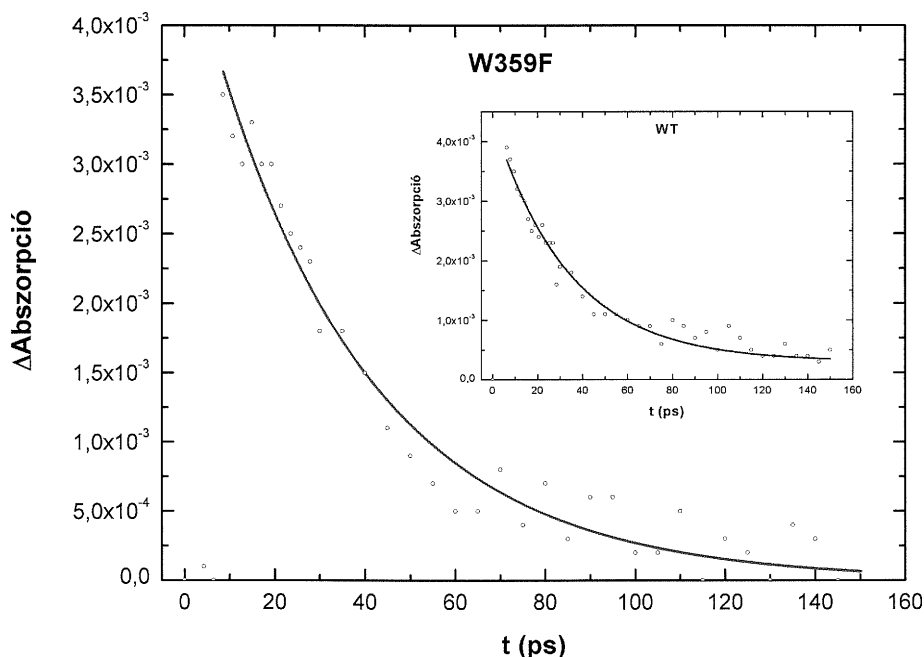


II.31. ábra. Az abszorpcióváltozás kinetikája mutáns és vad típusú fotoliázban (kis kép) 680 nm-en.

A kísérleteket ezúttal is két részletben végeztük: a 420-590 nm közötti tranziens abszorpciós mérésekhez 620 nm-es pumpa impulzust alkalmaztunk, a 630-700 nm közötti tartományban végzett mérésekhez pedig 550 nm-es pumpaimpulzust használtunk. A 630-700 nm-en kapott eredményeket vizsgálva rögtön feltűnik, hogy a mutáns esetében az abszorpcióváltozás kinetikája egyezést mutat a vad típusban megfigyelttel. A II.31. ábrán látható esetben a vad típus sebességi állandója $(\sim 27 \text{ ps})^{-1}$, míg a mutánsban $(\sim 29 \text{ ps})^{-1}$.

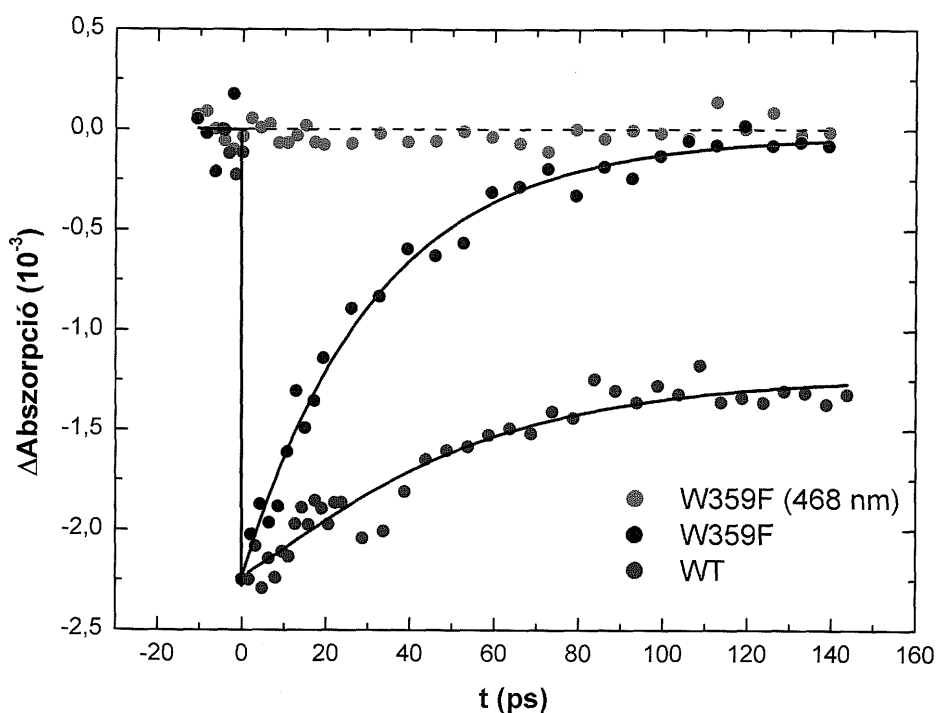
Mivel ezen a tartományon az abszorpcióváltozást csak az $\text{FADH}^{\bullet*}$ állapot befolyásolja, a sebességi állandók egyezéséből azt a következtetést lehet levonni, hogy a mutáns W359F fotoliázban a gerjesztett flavin kofaktor a vad típusnál megismert módon, vagyis elektron transzferrel relaxálódik.

A másik tartományt (420-470 nm) vizsgálva, ahol fotoindukált abszorpció lép fel az enzimből, mind a vad típus, mind a mutáns esetében hasonló kinetikát figyelhetünk meg: 434 nm-en a gerjesztett állapot relaxációjának sebességi állandója szintén $\sim 30 \text{ ps}$ (II.32. ábra).



II.32. ábra Az abszorpcióváltozás kinetikája mutáns és vad típusú fotoliázban (kis kép) 434 nm-en.

A 470-590 nm tartományban a relaxáció élettartama az előzőekhez hasonlóan mind a vad típus, mind a mutáns esetében ~30 ps. Feltűnő különbség azonban, hogy amíg a vad típusban 150 ps után is marad abszorpciókülönbség, ez a mutáns esetében gyakorlatilag teljesen eltűnik (lásd II.33. ábra).

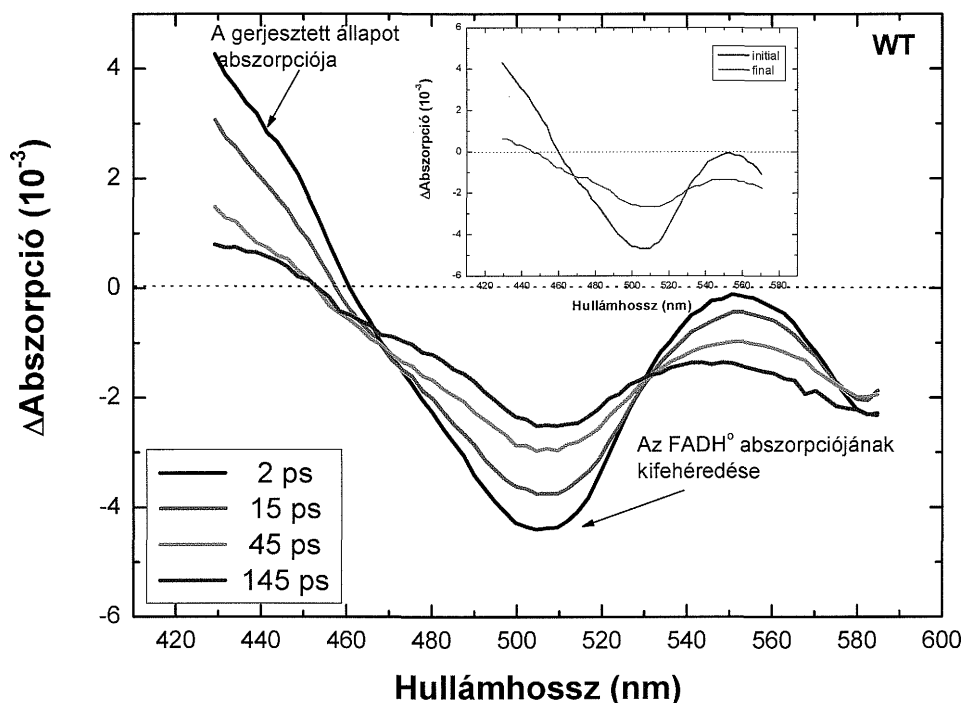


II.33. ábra. Az abszorpcióváltozás kinetikája a vad típus (kék) és a mutáns esetében (fekete). Pirossal ábrázoltuk az izobesztikus pontban mért abszorpcióváltozást.

A vad típus és a W359F mutáns tranzien্স spektrumait összehasonlítva jól látszik, hogy mindkét mintában fotoindukált abszorpció lép fel a 420-460 nm, az 520-580 nm tartományban, illetve a 630-700 nm tartományban (a II.34. ábrán ez utóbbi tartományt nem tüntettük fel). A W382F mutánsához hasonlóan kifehéredést figyelhetünk meg a 480-530 nm tartományon. A W382F mutánsához és a vad típushoz képest eltérés mutatkozik 560 nm-en, ahol a W359F mutánsban erősebb az indukált abszorpció, mint a megelőző esetekben. Ennek oka valószínűleg a FADH kofaktor izoalloxazin és adenin környezetének enyhe megváltozása.

A tranziens spektrumokat vizsgálva a legfeltűnőbb különbség a 145 ps esetén mért spektrumok, illetve a globális illesztéssel számított $t=\infty$ aszimptotikus spektrumok esetében figyelhető meg.

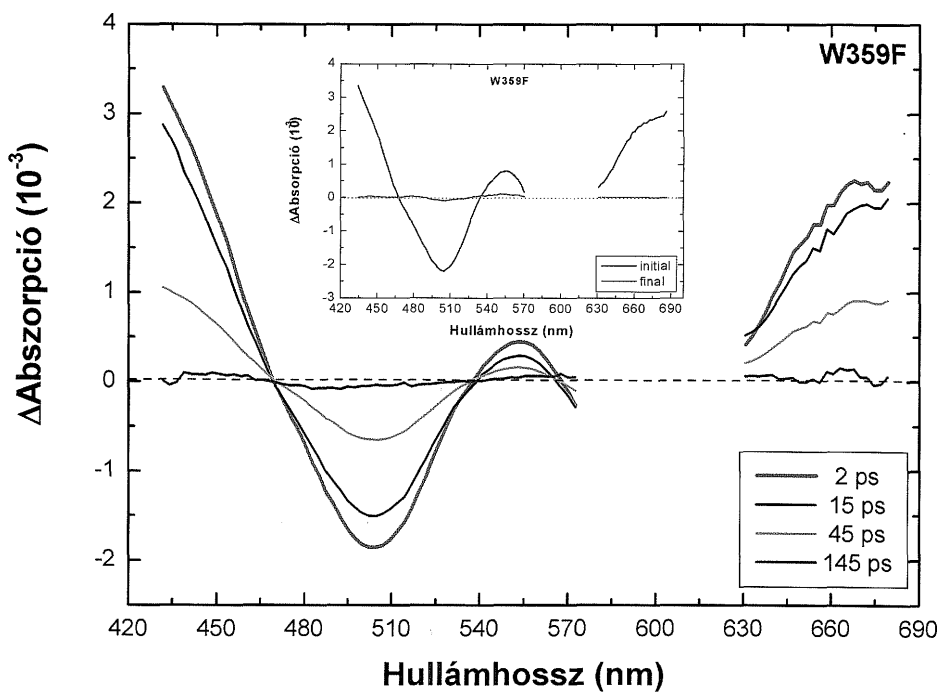
A vad típus tranziens spektrumait elemezve látszik, hogy a 145 ps-os mérési ablakban a minta gyakorlatilag felveszi a $t=\infty$ időpillanathoz tartozó „nyugalmi” vagy „végső” spektrumot (ez a II.34. ábrán belüli kis ábra pirossal ábrázolt spektruma). A korábbiakban ismerttetettnek megfelelően ez a „végső” spektrum feleltethető meg az $\text{FADH}^- \text{W}^+$ állapotnak. A mutáns esetében ez a spektrum azonban hiányzik (II.35 ábra): a 145 pikoszekundumos késleltetés esetén mért abszorpcióváltozás (ennek megfelelően a „végső” aszimptotikus spektrum is) a vizsgált spektrális tartományon gyakorlatilag nulla.



II.34. ábra Vad típusú fotolízis tranziens abszorpciós spektruma különböző késleltetések esetén. A kis ábrán pirossal ábrázoltuk az $\text{FADH}^- \text{W}^+$ állapotnak megfelelő aszimptotikus, $t=\infty$ „végső” spektrumot. Kékkel tüntettük fel a $t=0$, „kezdeti” aszimptotikus spektrumot.

4.2.2 A reakciómechanizmusra vonatkozó következtetések

A kinetikai eredményeket és a tranziens spektrumok kapcsán megfigyelteket egybevetve a következő megállapításokat tehetjük: a ~ 30 ps relaxációs idő a töltésszétválasztás létrejöttére utal, ellenkező esetben a W382F mutáns fotoliáz esetében megfigyelt 80 ps körüli relaxációs időt kellett volna visszakapnunk. A $t=\infty$ időpillanathoz tartozó spektrum, a W382F esetében megfigyeltekhez hasonlóan az $\text{FADH}^-\text{W}^{\bullet+}$ állapot hiányára utal a W359F-ben. Összegezve tehát, a kapott eredmények arra utalnak, hogy bár az elsődleges transzfer lépés a W382-es triptofánról a flavin kofaktorra megtörténik, a flavin nem marad a kétszeresen redukált FADH^- állapotban, vagyis a kezdeti töltésszétválasztást követően egy gyors töltés-visszarendeződésnek kell bekövetkeznie.



II.35. ábra W382F mutáns fotoliáz tranziens abszorpciós spektruma különböző késleltetések esetén. A „kezdeti” $t=0$ aszimptotikus spektrum (kis ábra, kék) megegyezik a vad típusnál tapasztalttal, a „végső” spektrum (kis ábra, piros) azonban eltér, nem jelenik meg az $\text{FADH}^-\text{W}^{\bullet+}$ állapotnak megfelelő spektrum.

A II.30. ábrán látható reakciómechanizmust leíró differenciálegyenletrendszer megoldásával, illetve a mérések során kapott sebességi állandók behelyettesítésével sikerült megbecsülnünk ennek a töltésrekombinációnak a felső határát.

Az izobesztikus pontban (468 nm) az abszorpció változás minden időpillanatban kisebb, mint az abszorpcióváltozás maximumának (504 nm) 5%-a. A vad típuson végzett korábbi méréseinkből tudjuk, hogy a 468 nm-en megfigyelt $FADH^-W^{\bullet+}$ – $FADH^\bullet$ abszorpcióváltozás az 504 nm hullámhosszon mért érték 76%-a¹⁶, ennek megfelelően az $FADH^-W^{\bullet+}$ állapotnak megfeleltethető abszorpcióváltozás az 504 nm-en mért érték ~6.5 %-a.

A reakcióséma a következő csatolt differenciál egyenletrendszerrel írható le:

$$\frac{dc_{FADH^{\bullet\bullet}}}{dt} = -(k_I + k_{Ib}) \cdot c_{FADH^{\bullet\bullet}} \quad (II.17)$$

$$\frac{dc_{FADH^-W^{\bullet+}}}{dt} = k_I c_{FADH^{\bullet\bullet}} - k_{IIb} c_{FADH^-W^{\bullet+}} \quad (II.18)$$

$$\frac{dc_{FADH^\bullet}}{dt} = k_{Ib} c_{FADH^{\bullet\bullet}} + k_{IIb} c_{FADH^-W^{\bullet+}} \quad (II.19)$$

Ha a $t=0$ időpillanatban a teljes populáció az $FADH^{\bullet\bullet}$ állapotban van, vagyis $c_{FADH^{\bullet\bullet}}(0) = 1$, az $FADH^-W^{\bullet+}$ állapot betöltöttsége az alábbi módon számítható :

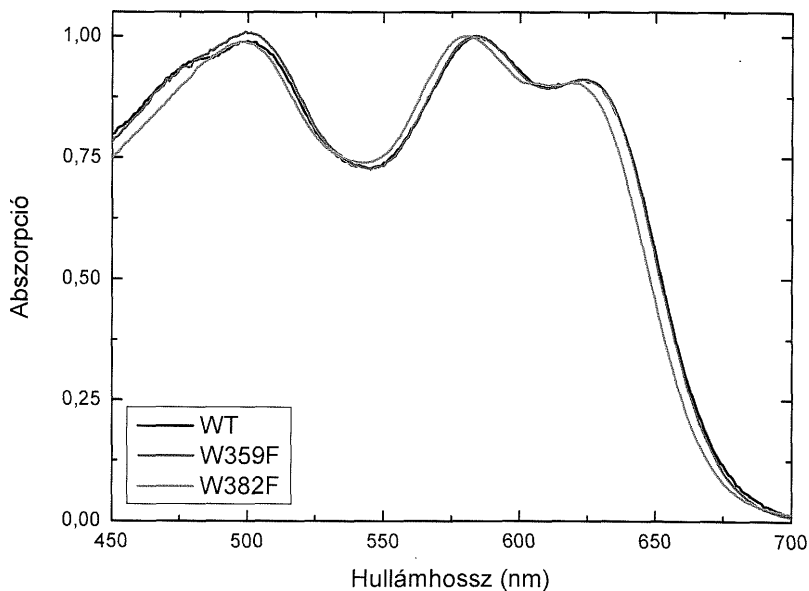
$$c_{FADH^-W^{\bullet+}}(t) = \frac{k_I}{k_{IIb} - (k_I + k_{Ib})} (e^{-(k_I - k_{Ib})t} - e^{-k_{IIb}t}) \quad (II.20)$$

Figyelembe véve, hogy $k_I = (45 \text{ ps})^{-1}$ és $k_{Ib} = (80 \text{ ps})^{-1}$, hogy ha az állapot maximális koncentrációja < 0.065 , akkor a fenti képletből a sebességi állandó $k_{IIb} > (4 \text{ ps})^{-1}$, vagyis a töltésrekombináció sebessége $< (4 \text{ ps})^{-1}$.

Az $FADH^-$ állapot létrejöttének a már ismertetett elektrontranszfer folyamaton kívül két további oka is lehet:

i) A triptofán kicserélése fenilalaninra az enzim olyan szerkezeti módosulásához vezetett, amely megakadályozza a hatékony elektron transzfert, így csak az I_b folyamat valósul meg 30 ps alatt.

Elméletileg elképzelhető, hogy a W359F mutánsban az FADH^\bullet és a W382 pozíciója, illetve mikrokörnyezete oly mértékben változott, hogy nincs mód a hatékony elektrontranszferre. Ebben az esetben azonban nehezen magyarázható az a megfigyelés, hogy az $\text{FADH}^{\bullet*}$ állapot relaxációjának időállandója a vad típusnál is, és a W359F esetében is ugyanaz az érték (~ 30 ps). Ebből ugyanis az következne, hogy a W359F mutáns esetében az II_b folyamat sebessége szignifikánsan gyorsabb, mint a W382F mutáns esetében mért időállandó (80 ps). Az $\text{FADH}^{\bullet*}$ állapot feltételezett 30 ps-on belüli lecsengése ellentmond több flavoprotein esetén mért 80 ps-hoz közeli értékeknek⁴¹. Egy közel kétszeres eltérés az eddig tapasztalt időállandóktól viszonylag valószínűtlennek látszik. A 80 ps körüli időállandó azért is valószínűsíthető, mert a flavin kofaktortól távolabb lévő triptofán módosítása kisebb változással járt a flavin környezetében – ahogy ez az abszorpciós görbékből látható (II.36. ábra) –, mint a W382-es triptofán cseréje.



II.36. ábra A vad típusú, a W382F és a W359F mutáns fotoliázok abszorpciós spektruma. Jól látható, hogy a triptofáncsere nem okozott jelentős szerkezeti változást (különösen a W359F esetében nem).

ii) A vad típusú fotoliázban az elektrontranszfer nem az eddig elképzelt módon zajlik, hanem a „superexchange” mechanizmussal, amelyben a W382-es triptofán egy virtuális intermedier.

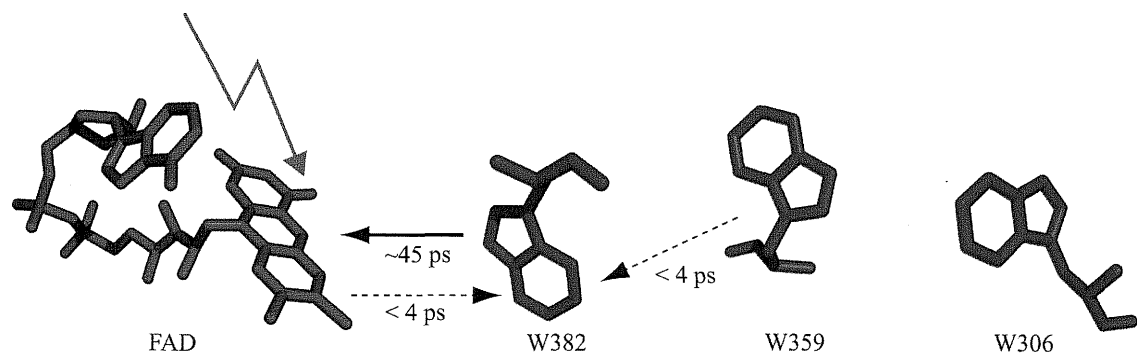
Az $\text{FADH}^{\bullet*}$ és a W306 közötti elektrontranszport elviekben megvalósulhat egy virtuális híd segítségével, „superexchange” útján is. Ez azonban csak akkor lehetséges, ha az intermedier állapot magasabb energiaszintet jelent, mint a donor állapot⁴². Ez a feltétel esetünkben azonban nem teljesül, az $\text{FADH}^- \text{W382}^{\bullet+}$ (~ 500 meV) állapot energiája ugyanis jelentősen kisebb, mint az $\text{FADH}^{\bullet*}$ donor állapot energiája^{16, 43, 44}. Az $\text{FADH}^{\bullet*}$ W306-os triptofánon keresztül való redukálódását modellező számítások szerint a „superexchange” $\sim 1 \mu\text{s}$ alatt történik meg a legkedvezőbb esetben, ez azonban 4-5 nagyságrenddel lassabb a kísérletileg megfigyelt értéknél. Mindezt egybevetve kizártuk annak a lehetőségét, hogy a vad típusban a $\text{FADH}^- \text{W382}^{\bullet+}$ csak egy virtuális állapot, és ezért nem volt megfigyelhető.

4.3 Összefoglalás

Tekintettel arra, hogy a vad típusú fotoliázban külső redukálószer jelenlétében végbemeget a fotoaktiváció, illetve az ehhez szükséges elektrontranszfer folyamat, arra következtethetünk, hogy a másodlagos elektrontranszfer sebessége megegyezik a töltésrekombináció sebességével, vagy akár gyorsabb annál.

Abból a becslésből, hogy a töltés rekombináció (II_b) <4 ps alatt valósul meg, az következik, hogy a II-es folyamat sebessége hasonló nagyságrendű, vagyis mintegy három nagyságrenddel gyorsabb, mint a korábban becsült 10 ns-os felső határ¹⁶. Ez arra utal, hogy a vad típusban az $FADH^-W382^{\bullet+}$ állapot nincs jelen minden időpillanatban, ami egyúttal arra is utal, hogy a ~ 30 ps alatt létrejövő fázisban a pozitív töltés inkább a W359 és/vagy a W306-as triptofánon helyezkedik el, nem pedig a W382-es triptofánon.

45



II.37. ábra A fotoaktiváció mechanizmusa a W359F mutánsban végzett mérések eredményeinek ismeretében.

Méréseim eredményeit tehát a következőkben lehet összegezni:

- 1) Sikertelenül igazoltam, hogy a W359 triptofánnak a redox semleges fenilalaninre cserélése megakadályozza azt az elektrontranszfer folyamatot, amelynek következtében a flavin kofaktor redukált állapotba kerül. A W359F esetében ugyanis a flavin kofaktor nem marad redukált állapotban, amiből arra következtettünk, hogy a triptofán-fenilalanin cserével blokkoltuk a flavin kofaktor redukálásához szükséges elektrontranszfert.

- 2) Sikerült fényt derítenem arra, hogy a W359F fotoliázban, több ismert flavoproteinhez hasonlóan, a flavin gerjesztett állapota egy rövid élettartamú oxidáció által relaxálódik.
- 3) Méréseim bizonyítékot szolgáltatnak arra is, hogy a $W382 \rightarrow FADH^{\bullet*}$ elektrontranszfer lépés elengedhetetlen a W359-es (és valószínűleg a W306-os) triptofán oxidálásához.
- 4) Sikerült megbecsülnöm a másodlagos elektrontranszfer lépés kinetikáját: az $FADH^- W382^{\bullet+}$ állapotot megvalósító töltésszétválasztást egy gyors elektrontranszfer lépés követi ($W359 \rightarrow W382^{\bullet+}$) < 4 ps alatt.

5. Irodalomjegyzék

1. Sancar, A. Structure and Function of DNA Photolyase and Cryptochrome Blue-Light Photoreceptors. *Chem. Rev.* 103, 2203-2238 (2003).
2. Small, E. W. Laser sources and microchannel plate detectors for pulse fluorometry (ed. Joseph, R. L.) (Plenum Press, New York, 1991).
3. Sancar, G. B. et al. Action Mechanism of Escherichia-Coli DNA Photolyase.3. Photolysis of the Enzyme-Substrate Complex and the Absolute Action Spectrum. *Journal of Biological Chemistry* 262, 492-498 (1987).
4. Heelis, P. F. & Sancar, A. Photochemical properties of Escherichia coli DNA photolyase: a flash photolysis study. *Biochemistry* 25, 8163 - 8166 (1986).
5. Jorns, M. S., Baldwin, E. T., Sancar, G. B. & Sancar, A. Action Mechanism of Escherichia-Coli DNA Photolyase.2. Role of the Chromophores in Catalysis. *Journal of Biological Chemistry* 262, 486-491 (1987).
6. Heelis, P. F., Payne, G. & Sancar, A. Photochemical Properties of Escherichia-Coli DNA Photolyase - Selective Photodecomposition of the 2Nd Chromophore. *Biochemistry* 26, 4634-4640 (1987).
7. Jorns, M. S., Wang, B. & Jordan, S. P. DNA-Repair Catalyzed by Escherichia-Coli DNA Photolyase Containing Only Reduced Flavin - Elimination of the Enzymes 2Nd Chromophore by Reduction with Sodium-Borohydride. *Biochemistry* 26, 6810-6816 (1987).
8. Payne, G. & Sancar, A. Absolute Action Spectrum of E-Fadh₂ and E-Fadh₂-Mthf Forms of Escherichia-Coli DNA Photolyase. *Biochemistry* 29, 7715-7727 (1990).
9. Jorns, M. S., Wang, B. Y., Jordan, S. P. & Chanderkar, L. P. Chromophore Function and Interaction in Escherichia-Coli DNA Photolyase - Reconstitution of the Apoenzyme with Pterin and or Flavin Derivatives. *Biochemistry* 29, 552-561 (1990).
10. Lipman, R. S. A. & Jorns, M. S. Direct Evidence for Singlet Singlet Energy-Transfer in Escherichia-Coli DNA Photolyase. *Biochemistry* 31, 786-791 (1992).

11. Kim, S. T. et al. Determination of Rates and Yields of Interchromophore (Folate-]Flavin) Energy-Transfer and Intermolecular (Flavin-]DNA) Electron-Transfer in Escherichia-Coli Photolyase by Time-Resolved Fluorescence and Absorption-Spectroscopy. *Biochemistry* 30, 11262-11270 (1991).
12. Tamada, T. et al. Crystal structure of DNA photolyase from *Anacystis nidulans*. *Nature Structural Biology* 4, 887-891 (1997).
13. Park, H.-W., Kim, S.-T., Sancar, A. & Deisenhofer, J. *Science* 268, 1866-1872 (1995).
14. Kao, Y. T., Saxena, C., Wang, L. J., Sancar, A. & Zhong, D. P. Direct observation of thymine dimer repair in DNA by photolyase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 16128-16132 (2005).
15. Aubert, C., Mathis, P., Eker, A. P. M. & Brettel, K. Intraprotein electron transfer between tyrosine and tryptophan in DNA photolyase from *Anacystis nidulans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 5423-5427 (1999).
16. Aubert, C., Vos, M. H., Mathis, P., Eker, A. P. M. & Brettel, K. Intra-protein radical transfer during photoactivation of DNA photolyase. *Nature* 405, 586-590 (2000).
17. Li, Y. F., Heelis, P. F. & Sancar, A. Active site of DNA photolyase: tryptophan-306 is the intrinsic hydrogen atom donor essential for flavin radical photoreduction and DNA repair in vitro. *Biochemistry* 30, 6322-9 (1991).
18. Byrdin, M., Eker, A. P. M., Vos, M. H. & Brettel, K. Dissection of the triple tryptophan electron transfer chain in *Escherichia coli* DNA photolyase: Trp382 is the primary donor in photoactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 8676-8681 (2003).
19. Il'ichev, Y. V., Kuhnle, W. & Zachariasse, K. A. Intramolecular charge transfer in dual fluorescent 4-(dialkylamino)benzonitriles. Reaction efficiency enhancement by increasing the size of the amino and benzonitrile subunits by alkyl substituents. *Journal of Physical Chemistry A* 102, 5670-5680 (1998).

20. Druzhinin, S. I. et al. Dynamics of ultrafast intramolecular charge transfer with 4-(dimethylamino)benzonitrile in acetonitrile. *Journal of Physical Chemistry A* 110, 2955-2969 (2006).
21. Vos, M. H. & Martin, J.-L. Femtosecond processes in proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1411, 1-20 (1999).
22. Spence, D. E., Kean, P. N. & Sibbett, W. 60-Fsec Pulse Generation from a Self-Mode-Locked Ti-Sapphire Laser. *Optics Letters* 16, 42-44 (1991).
23. Moulton, P. F. Spectroscopic and Laser Characteristics of Ti-Al₂O₃. *Journal of the Optical Society of America B-Optical Physics* 3, 125-133 (1986).
24. Nisoli, M. et al. Compression of high-energy laser pulses below 5 fs. *Optics Letters* 22, 522-524 (1997).
25. Driscoll, T. J., Gale, G. M. & Hache, F. Ti Sapphire 2Nd-Harmonic-Pumped Visible Range Femtosecond Optical Parametric Oscillator. *Optics Communications* 110, 638-644 (1994).
26. Gale, G. M., Cavallari, M., Driscoll, T. J. & Hache, F. Sub-20-Fs Tunable Pulses in the Visible from an 82-Mhz Optical Parametric Oscillator. *Optics Letters* 20, 1562-1564 (1995).
27. Gale, G. M., Cavallari, M. & Hache, F. Femtosecond visible optical parametric oscillator. *Journal of the Optical Society of America B-Optical Physics* 15, 702-714 (1998).
28. Gale, G. M., Hache, F. & Cavallari, M. Broad-bandwidth parametric amplification in the visible: Femtosecond experiments and simulations. *Ieee Journal of Selected Topics in Quantum Electronics* 4, 224-229 (1998).
29. <http://www.sandia.gov/imr1/XWEB1128/snloftp.htm>.
30. Provencher, S. W. & Vogel, R. H. (eds.) *Regularization Techniques for Inverse Problems in Molecular Biology* (Birkhauser, Boston, 1983).
31. Morgan, J. E., Verkhovsky, M. I., Puustinen, A. & Wikström, M. Identification of a "Peroxy" Intermediate in Cytochrome bo₃ of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 34, 15633-15637 (1995).
32. Nagarajan, V., Parson, W. W., Davis, D. & Schenck, C. C. Kinetics and free energy gaps of electron-transfer reactions in *Rhodobacter sphaeroides* reaction centers. *Biochemistry* 32, 12324-36 (1993).

-
33. Liebl, U. et al. Energy and electron transfer upon selective femtosecond excitation of pigments in membranes of *Heliobacillus mobilis*. *Biochemistry* 35, 9925-9934 (1996).
 34. Press, W. H., Flannery, B. P., Teukolsky, S. A. & Vetterling, W. T. *Numerical Recipes* (Cambridge University Press, New York, 1989).
 35. Li, Y. F., Heelis, P. F. & Sancar, A. Active-Site of DNA Photolyase - Tryptophan-306 Is the Intrinsic Hydrogen-Atom Donor Essential for Flavin Radical Photoreduction and DNA-Repair *In Vitro*. *Biochemistry* 30, 6322-6329 (1991).
 36. Heelis, P. F., Okamura, T. & Sancar, A. Excited-State Properties of *Escherichia-Coli* DNA Photolyase in the Picosecond to Millisecond Time Scale. *Biochemistry* 29, 5694-5698 (1990).
 37. Okamura, T., Sancar, A., Heelis, P. F., Hirata, Y. & Mataga, N. Doublet Quartet Intersystem Crossing of Flavin Radical in DNA Photolyase. *Journal of the American Chemical Society* 111, 5967-5969 (1989).
 38. Heelis, P. F., Sancar, A. & Okamura, T. Excited Quartet States in DNA Photolyase. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology* 16, 387-390 (1992).
 39. Byrdin, M., Brettel, K., Aubert, C., Eker, A. & Vos, M. H. in *Flavins and Flavoproteins 2002* (eds. Chapman, S., Perham, R. & Scrutton, N.) 701-706 (Rudolf Weber, Berlin, Cambridge, UK, 2002).
 40. Martin, J.-L. & Vos, M. H. Femtosecond spectroscopy of ligand rebinding in heme proteins. *Methods Enzymol.* 232, 416-430 (1994).
 41. Pan, J. et al. Excited-state properties of flavin radicals in flavoproteins: femtosecond spectroscopy of DNA photolyase, glucose oxidase and flavodoxin. *J. Phys. Chem. B* 108, 10160-10167 (2004).
 42. Bixon, M. & Jortner, J. Electron transfer via bridges. *J. Chem. Phys.* 107, 5154-5170 (1997).
 43. Popovic, D. M., Zmiric, A., Zaric, S. D. & Knapp, E.-W. Energetics of Radical Transfer in DNA Photolyase. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 3775-3782 (2002).

44. Cheung, M. S., Daizadeh, I., Stuchebrukhov, A. A. & Heelis, P. F. Pathways of Electron Transfer in *Escherichia coli* DNA Photolyase: Trp306 to FADH. *Biophys. J.* 76, 1241-1249 (1999).
45. Lukacs, A. et al. Role of the Middle Residue in the Triple Tryptophan Electron Transfer Chain of DNA Photolyase: Ultrafast Spectroscopy of a Trp-->Phe Mutant. *J Phys Chem B Condens Matter Mater Surf Interfaces Biophys* 110, 15654-15658 (2006).

III. Összegzés

Az értekezés két egymástól eltérő biológiai folyamattal foglalkozik. Az első részben az izomműködés két kulcsfehérjéje (az aktin és a miozin) közötti kölcsönhatás vizsgálata volt a cél, míg a második részben a fotoliáz nevű enzim működésének egyik jellemző folyamatát, a fotoaktivációt tanulmányoztam. A két rész közötti legfőbb kapocs az a közös koncepció, hogy a fehérjék alkotóelemeinek mozgásai befolyásolják azok funkcióját. A funkcionális fehérjedinamika mellett a két blokkot ugyanakkor összeköti a választott vizsgálati módszer, az optikai spektroszkópia is, amely a biofizikai kutatások egyik legkedveltebb módszere.

Az értekezést úgy építettem fel, hogy a biológiai eredmények mellett be kívántam mutatni azt a fluoreszcencia spektroszkópiái és tranziens abszorpciós spektroszkópiái „arzenált” is, amellyel a fehérjedinamikai tulajdonságok eredményesen vizsgálhatóak. Ez a bemutatás természetesen távolról sem teljes körű, elsősorban azokra a módszerekre koncentráltam, amelyekben metodikai fejlesztéseket hajtottam (hajtottunk) végre.

Ennek megfelelően *Az aktomiozin komplex dinamikájának vizsgálata fluoreszcencia spektroszkópiái módszerekkel* című részben bemutattam két általunk kifejlesztett és sikerrel alkalmazott fluoreszcencia spektroszkópiái módszert, amelyek segítségével néhány nanométeres távolságok mérhetőek, valamint karakterizálható a fehérjék fluktuációja (és az ezzel kapcsolatban álló flexibilitás.) A két módszert sikerrel alkalmaztuk az aktin és a miozin kölcsönhatásának jellemzésére az izomkontrakció során.

A fotoliáz fotoaktivációját vizsgáló részben, a mechanizmusra vonatkozó konkrét megfigyelések mellett bemutattam azt a műszeres és szoftveres fejlesztést, amely lehetővé tette a vizsgálatok elvégzését és kiértékelését. A fotoliáz szelektív gerjesztéséhez szükségünk volt egy hangolható femtoszekundumos fényforrásra. Ennek érdekében egy nemkollineáris optikai erősítőt állítottam össze, amelyet sikerrel alkalmaztam a tranziens abszorpciós mérések során. Az általam írt felhasználóbarát szoftverrel pedig az adatok kiértékelését sikerült lényegesen leegyszerűsíteni. Ezeknek a metodikai és műszeres fejlesztéseknek segítségével sikerült részletesen jellemeznem az *E. coli* fotoliáz fotoaktivációját.

IV. Publikációk

Az értekezés alapjául szolgáló saját közlemények

1. M. Nyitrai, G. Hild, B. Bódis, A. Lukács, B. Somogyi. Flexibility of Myosin-Subfragment-1 in its Complex with Actin as Revealed by Fluorescence Resonance Energy Transfer. *Eur J Biochem* **267**(14): 4334-4338, 2000; IF: 2.849
2. M. Nyitrai, G. Hild, A. Lukács, E. Bódis, B. Somogyi. Conformational distributions and proximity relationships in the rigor complex of actin and myosin subfragment-1. *J Biol Chem* **275**(4): 2404-2409, 2000 ; IF: 7.258
3. Andras Lukacs, André P.M. Eker, Martin Byrdin, Sandrine Villette, Jie Pan, Klaus Brettel and Marten H. Vos. Role of the Middle Residue in the Triple Tryptophan Electron Transfer Chain of DNA Photolyase: Ultrafast Spectroscopy of a Trp-->Phe Mutant. *J Phys Chem B* **110**, 15654-15658, 2006; IF: 4,033

Összesített impakt faktor: 14,140

Az értekezés alapjául szolgáló saját poszterek, előadások

1. Lukács A., Nyitrai M., Hild G., Bódis E., Somogyi B.. A miozin és az aktin relatív pozíciója az akto-miozin komplexen belül: fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer folyamatok számítógépes szimulációja. XXIX. Membrántranszport Konferencia, Sümeg, 1999
2. Lukács A., Nyitrai M., Halasi S., Bódis E., Somogyi B. Fluoreszcencia élettartam mérési eredmények kiértékelésének alternatív módszerei: a fluoreszcencia emisszió sebességi állandójának alkalmazása fázisfluorimetriás adatok kiértékelése során. XIX. Biofizikai Vándorgyűlés, Kecskemét, 1999
3. M. Nyitrai, G. Hild, A. Lukács, E. Bódis, S. Halasi, B. Somogyi. The dynamic and conformational properties of the catalytic and light-chain-binding domains of S1 in

- the acto-myosin complex. 5th Symposium on Instrumental Analysis, Graz, Austria, 1999
4. Nyitrai M., Hild G., Bódis E., Halasi S., Lukács A., Somogyi B. Az akto-miozin komplex flexibilitása rigor és ADP állapotokban: fluoreszcencia rezonancia energiáttranszfer vizsgálatok. XXII. Országos Lumineszcencia-Spektroszkópia Konferencia, Pécs, 1999
 5. Nyitrai M., Hild G., Lukács A., Bódis E., Halasi S., Somogyi B. A miozin S1 katalitikus és könnyu-lánc-kötő doménjeinek dinamikai tulajdonságai akto-miozin komplexben. XIX. Biofizikai Vándorgyűlés, Kecskemét, 1999
 6. M. Nyitrai, G. Hild, A. Lukács, E. Bódis, S. Halasi, B. Somogyi. The dynamic and conformational properties of the catalytic and light-chain-binding domains of S1 in the acto-myosin complex. XXVIII. European Muscle Congress, York, UK, 1999
 7. B. Somogyi, M. Nyitrai, G. Hild, A. Lukács, E. Bódis. The dynamic and conformational properties of the catalytic and light-chain-binding domains of S1 in the acto-myosin complex. 44th Annual Meeting of the American Biophysical Society, New Orleans, USA, 2000
 8. A. Lukács, M. Nyitrai, E. Bódis, G. Hild and B. Somogyi. The effect of ADP on the flexibility and conformation of myosin-subfragment-1 in its complex with actin XXX. European Muscle Conference, Pavia, Italy, 2001
 9. A. Lukács, M. Nyitrai, J. Gallay, M. Vincent, E. Bódis, B. Somogyi Nucleotide induced flexibility of acto-S1 complex revealed by fluorescence spectroscopy 10th European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules, Szeged, 2003
 10. Andras Lukacs, Marten H. Vos, André P. M. Eker, Martin Byrdin, Klaus Brettel. Mechanism of radical transfer during photoactivation of the flavoprotein DNA photolyase 15th International Conference on Ultrafast Phenomena, Pacific Grove, California, USA, 2006

Az értekezés alapjául szolgáló egyéb saját közlemények

1. M. Nyitrai, G. Hild, A. Lukács, J. Belágyi and B. Somogyi. The flexibility of actin filaments as revealed by fluorescence resonance energy transfer: the influence of divalent cations, *J. Muscle Res. Cell M.*, Vol 20 , 1, 1999 IF: 2.905

2. Bela Somogyi, Miklos Nyitrai, Gabor Hild, Andras Lukacs, Emoke Bodis The dynamic and conformational properties of the catalytic and light-chain-binding domains of S1 in the acto-myosin complex, *Biophys. J.* Vol 78, Number 1, 2000 IF: 4.524
3. A. Lukács, M. Nyitrai, E. Bódis, G. Hild and B. Somogyi. The effect of ADP on the flexibility and conformation of myosin-subfragment-1 in its complex with actin *J Muscle Res Cell Motil*, 22(7):563-621, 2001. IF: 2.905

Könyvfejezetek

1. Andras Lukacs, Marten H. Vos, André P. M. Eker, Martin Byrdin, Klaus Brettel. Mechanism of radical transfer during photoactivation of the flavoprotein DNA photolyase *Ultrafast Phenomena XV*, Springer Series in Chemical Physics, 2006
2. András Lukács, Zoltán Várallyay, Róbert Szipőcs. Cubic phase distortion of single attosecond pulses being reflected on narrowband Mo/Si filtering mirrors. *Trends in Optics and Photonics Series Vol 98*, p. 806-810, 2005
3. B. Rozsa, E. S. Vizi, G.Katona, A. Lukács, Z. Várallyay, A. Sággy, L. Valenta, P. Maák, J. Fekete, Á. Bányász, R. Szipőcs. Real time 3D nonlinear microscopy. *Trends in Optics and Photonics Series Vol 98* p. 858-863