

Ph.D. ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Funkcionális fehérjedinamikai vizsgálatok fluoreszcencia és femtosekundumos időfelbontású tranziens abszorpciós spektroszkópai módszerekkel

Lukács András



Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Biofizikai Intézet

2007

Ph.D. ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Funkcionális fehérjedinamikai vizsgálatok fluoreszcencia és femtoszekundumos időfelbontású tranziens abszorpciós spektroszkópiai módszerekkel

Lukács András

Program: Biokémia és molekuláris biológia
Programvezető: Dr. Sümegi Balázs
Alprogram B-130: Funkcionális fehérjedinamika vizsgálata biofizikai módszerekkel
Alprogramvezető: Dr. Somogyi Béla[†]
Témavezetők: Dr. Somogyi Béla[†]
Dr. Nyitrai Miklós
Dr. Marten H. Vos



Pécsi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Biofizikai Intézet

2007

1. Az aktomiozin komplex dinamikájának vizsgálata fluoreszcencia spektroszkópiai módszerekkel

Bevezetés

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 miozin

Szerkezeti szempontból a miozin egy hosszú, aszimmetrikus molekula, amelyen egy feji és egy farki rész különböztethető meg.

Erős denaturáló ágensek (5 M HCl vagy 8 M urea) jelenlétében a miozin hat polipeptid láncra esik szét: két nehéz láncra, amelyek tömege egyenként 200 000 Da körüli, illetve négy könnyűláncra, amelyek közül kettőnek a tömege 20 000 Da, kettőnek pedig 15 000 Da. A két nehéz lánc egy kettős hélixet alkot, amelynek egyik végén mindkét lánc globuláris alakot vesz fel. Ezek a miozin fejei, amelyekhez hozzákapcsolódnak a könnyűláncok, fejenként kettő-kettő.

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”). A HMM papainnal történő emésztéssel tovább bontható az S1 (szubfragmentum 1) és S2 (szubfragmentum 2) fragmensekre. Az emésztés során kapott alkotók közül a HMM-nek és az S1-nek jut kitüntetett szerep, mindkét komponens kötődik ugyanis az aktinhoz, rendelkezik ATPáz aktivitással, valamint képes az aktin filamentum mozgatására.

Az S1 további emésztése megmutatta, hogy ez a fragmens a miozin legkisebb olyan aktív egysége, amely az aktint mozgatni tudja¹.

A fej két ellentétes oldalán helyezkednek el az aktin-kötő és a nukleotid-kötő régiók, 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, amely a nukleotid-kötő régió kis konformációs változásait nagy szögű elmozdulásokká erősíti.

Az aktin

Az aktin monomer egy 43 kDa molekulatömegű globuláris fehérje, amely két fő doménből áll. Mindkét domén tovább osztható két-két szubdoménre.

A két fő domén között található az úgynevezett kation- és nukleotid-kötő hasadék, amelyben kétvegyértékű kationok (fiziológiás 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.

Fiziológiás 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.

Az aktomiozin kölcsönhatás. A kontrakciós ciklus

Az aktomiozin kölcsönhatás leírására a legelfogadottabb a lengő emelőkar („swinging lever arm”) modell, 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 hosszanti tengelye 45°-os szöget zár be az aktin filamentummal. Az S1 nukleotid-kötő zsebe ilyenkor nyitott állapotban található. A miozin fejek aktinkötésének 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-kötő zsebben ADP és inorganikus foszfát (P_i) lesz jelen, a fej

pedig elfordul és gyengén kötődik az aktin filamentumhoz; a nukleotid-kötő zseb újra nyitott állapotba kerül, ami lehetővé teszi a foszfát disszociációját.

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 vezethet – terheletlen esetben - az aktin filamentum mintegy 10 nm-es elmozdulásához.

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 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 doménen a Cys-707, az esszenciális könnyűláncon pedig a Cys-177 nagy reaktivitású cisztein, fluorofórokkal 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 kiválasztását 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.

Alkalmazott módszerek

Az aktomiozin komplex dinamikai tulajdonságainak jellemzésére két – saját fejlesztésű – fluoreszcencia spektroszkópai módszert alkalmaztunk. Mindkét módszer a fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer (FRET) elnevezésű jelenségre épül. Röviden összefoglalva, a fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer egy dipól-dipól csatoláson keresztül megvalósuló szinglet-szinglet energiatranszfer, amelynek során a donor molekula foton emissziója nélkül ad át energiát az akceptor molekulának.

A gyakorlatban az energiatranszfer hatásfoka a steady-state spektrumokból illetve a fluoreszcencia élettartamokból határozható meg:

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

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.

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 ki², mi az aktomiozin komplex-alkalmazásokhoz fejlesztettük tovább³. 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:

$$E = \frac{(R_0 / R)^6}{1 + (R_0 / R)^6}, \quad (\text{I.2})$$

ahol R a donor-akceptor távolság, R_0 pedig az a donor-akceptor távolság (Förster távolság), amelynek esetében az energiatranszfer hatásfoka 0,5 (50%).

Az általunk vizsgált esetekben 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 összege⁴, és az alábbi módon számítható:

$$E = \frac{\sum_{i=1}^N (R_0 / R_i)^6}{1 + \sum_{i=1}^N (R_0 / R_i)^6}, \quad (I.3)$$

ahol R_i az egyedi donor-akceptor távolságokat jelenti, N pedig az akceptorok számát. Tekintve, hogy a távolabbi monomerek járuléka igen kicsi, 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 figyelembe vettük az aktin helikális szerkezetét: 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 $27,5 \text{ \AA}$.

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

$$x_i = r \cos((3-i)166^\circ) \quad (I.4a)$$

$$y_i = r \sin((3-i)166^\circ) \quad (I.4b)$$

$$z_i = (3-i)27.5 \text{ \AA}, \quad (I.4c)$$

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

Az energiatranszfer hatásfokának számításakor figyelembe kell venni a monomerek betöltöttségét, vagyis azt, hogy az adott monomeren található-e akceptor. 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:

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

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

Az energiatranszfer hatásfoka g akceptor jelölési arány esetében ennek megfelelően:

$$E_g = \sum_{k=1}^5 p_k E_k, \quad (I.6)$$

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

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 tehető³. A donor-akceptor távolságot az $\omega(R)$ Gauss-eloszlás segítségével közelítettük a következő módon:

$$\omega(R) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left[-\frac{(R-R_c)^2}{2\sigma^2}\right], \quad (I.7)$$

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

Ennek megfelelően az energiatranszfer hatásfokának számítása a következőképpen módosul:

$$E_g = \sum_{jk} p_k \omega(R_j) E_{jk}. \quad (I.8)$$

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

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 módszer lényege, hogy az energiatranszfer mechanizmusának köszönhetően bevezethető egy olyan f' paraméter, amelynek hőmérsékletfüggő változása a fehérjemátrix flexibilitására jellemző mennyiség⁵. Minél meredekebben változik f' a hőmérséklet függvényében, annál flexibilisebb a donor-akceptor pár között elhelyezkedő fehérjemátrix.

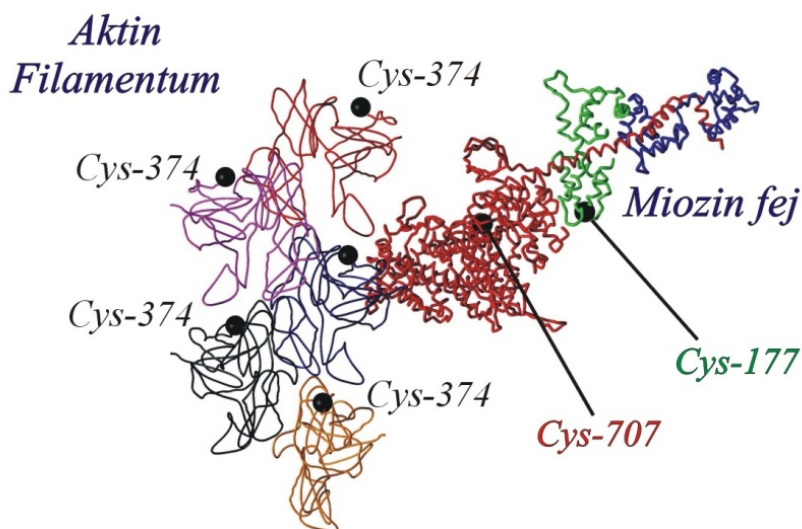
$$f' = \frac{\langle E \rangle}{\langle F_{DA} \rangle} \quad (I.9)$$

Eredmények és következtetések

Konformációs eloszlások és távolságok a rigor aktomiozin komplexben

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 háttérrel. Az itt ismertetett kísérletek során a miozin S1 úgynevezett katalitikus doménjének, illetve a „lever arm” részét képező könnyűlánc-kötő doménnek aktintól mért távolságát határoztuk meg rigor állapotban, vagyis abban az esetben, amikor a miozin fej nukleotidmentes állapotban van⁶.

A távolságok meghatározására a helikális fehérjékre kidolgozott FRET módszert 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.



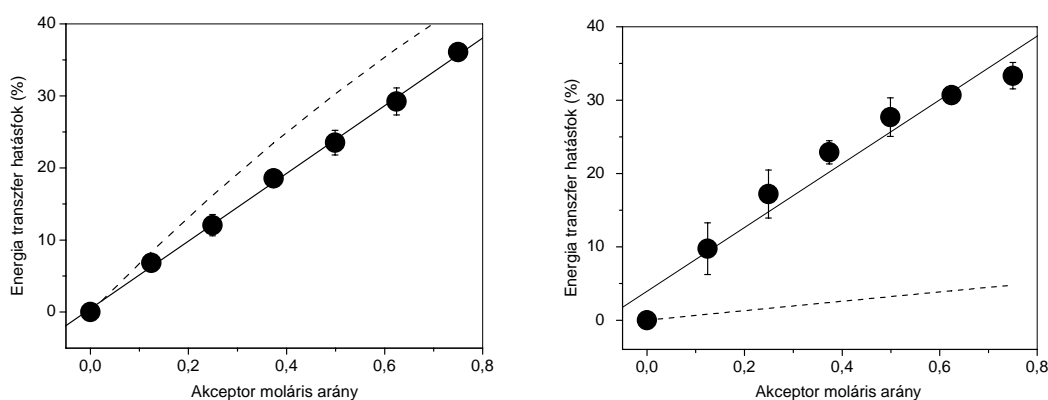
I.1. ábra Az aktomiozin szerkezeti modellje. A szerkezeten feltüntettük azokat az aminosavakat, amelyekhez a donor (Cys-707, Cys-177) valamint az akceptor (Cys-374) molekulákat kötöttük.

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) járulékat vettünk figyelembe.

Abban az esetben, amikor a donort az S1 Cys-707 aminosavhoz kötöttük, a fluoreszcencia energiatranszfer hatásfoka lineárisan változott az akceptor moláris arány függvényében, ami tipikusan az egy donor-egy akceptor rendszerekre jellemző (I.2a. ábra).

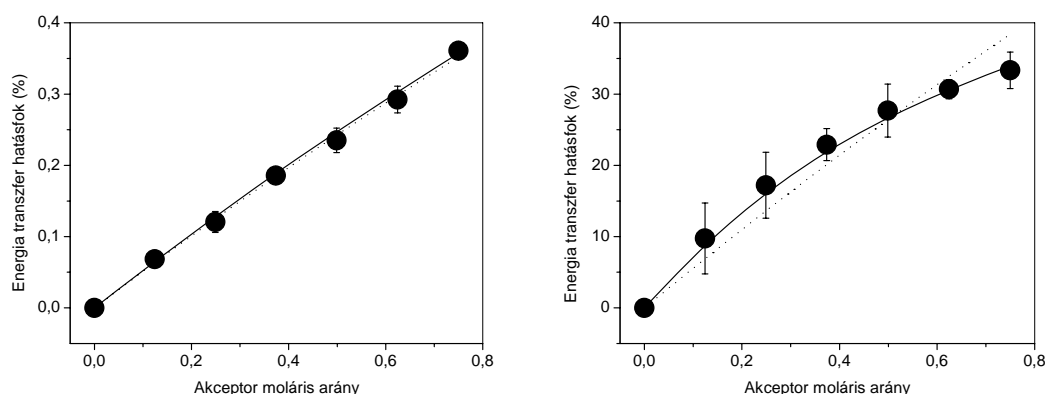
Ha a donort a Cys-177 aminosavhoz illesztettük, a mért értékeknek az akceptor moláris aránytól való függése már nem volt lineáris, és jelentős eltérést mutattak az egy donor – egy akceptor esetet feltételező tendenciától (I.2b. ábra).



I.2. ábra. Az ábrán a mért fluoreszcencia energia transzfer hatásfok látható a Cys-707 (a) esetében (fekete körök) illetve a Cys-177 esetében (b). Folytonos vonallal van feltüntetve a legjobb lineáris illesztés, szaggatott vonallal pedig a röntgenkristallográfiás adatokból számolt, mozdulatlanságot feltételező értékek.

A mért fluoreszcencia energiatranszfer hatásfok értékeket a módszerekről szóló fejezetben ismertetett eljárás 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.3. ábra). Ez utóbbi esetben a FRET hatásfokának számításánál azt feltételeztük, hogy az aktin tengelytől mért távolságok egy Gauss-eloszlást követnek.

Abban az esetben, ha a donor a katalitikus doménen (Cys-707) helyezkedett el, homogén konformációeloszlást feltételezve az illesztés szemmel láthatóan jó minőségű.



I.3. ábra. Az energia transzfer hatásoknak függése a Cys-707 (a) és Cys-177 (b) esetében. Folytonos vonallal ábrázoltuk a heterogén eloszlást, szaggatottal pedig a homogén eloszlást feltételező illesztéseket. Fekete körökkel ábrázoltuk a mért értékeket.

A számított FRET hatások eltérése a mért értékektől akkor a legkisebb, amikor a donor aktin filamentumtól mért távolságát az $x=77 \pm 3 \text{ \AA}$, $y=5 \pm 5 \text{ \AA}$, $z=3 \pm 4 \text{ \AA}$ koordinátákkal adtuk meg. 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 számításaival⁷⁻¹⁰. Mint azt a későbbiekben majd láthatjuk a katalitikus domén esetében a homogén és a heterogén eset feltételezése hasonló eredményre vezet.

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

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 ennek megfelelően 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, de merev 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 átlagos távolság $52 \pm 2 \text{ \AA}$ -nak adódott, ami megegyezett a homogén esetben kapott értékkel. A távolságeloszlás félértékszélessége $5 \pm 3 \text{ \AA}$ volt.

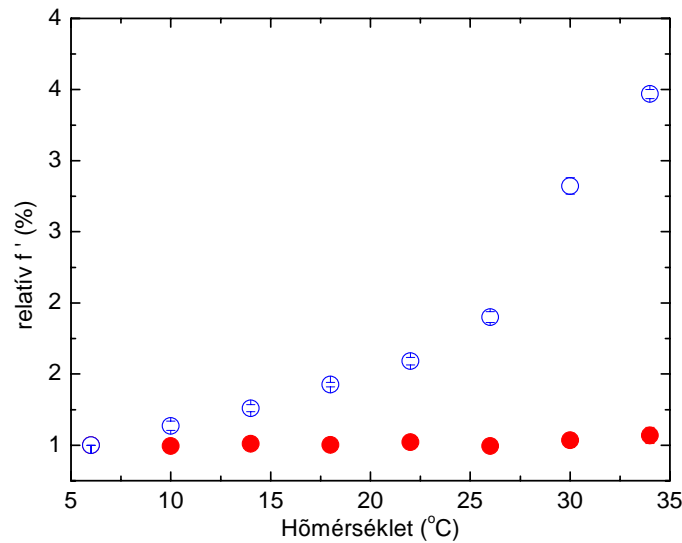
A Cys-177 aktin filamentumtól való távolságára kapott érték (73 \AA) eltér a mások által korábban megfigyelt értékektől ($50\text{-}60 \text{ \AA}$), de viszonylag közel van a röntgenkristallográfiás adatokból számolt 89 \AA -hoz. Az, hogy a mi általunk kapott távolság közelebb van a röntgenkristallográfiás 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 megfigyelést¹¹, 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 össze¹².

Az aktomiozin komplex flexibilitásának vizsgálata

Az S1 dinamikai tulajdonságainak további feltérképezése érdekében az alkalmazott módszerek fejezetben ismertetett FRET eljárással vizsgáltuk az aktomiozin komplex flexibilitását. A fehérjemátrix flexibilitásának vizsgálatához az energiatranszfer hatásfokának és a donor akceptor jelenlétében mért fluoreszcencia intenzitásának arányát mértük a hőmérséklet függvényében.

Az f' paraméter hőmérsékletfüggése információt szolgáltat a fehérjemátrix flexibilitásában bekövetkezett változásokról, illetve esetleg a hőmérsékletváltozás által indukált konformációváltozásokról⁵. Tekintettel arra, hogy az átfedési integrál hőmérsékletfüggése torzíthatja az f' paramétert, az f' értékét minden hőmérsékleten normáltuk a hozzá tartozó átfedési integrál értékével.



I.4. 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 (I.4. ábra) vizsgálva feltűnő, hogy abban az esetben, ha a donor a katalitikus doménon helyezkedett el, az f' értéke alig változik a hőmérséklet növekedésével. Ezzel szemben, ha a donor az esszenciális könnyűláncon helyezkedett el, akkor az f' értéke monoton módon, és meredeken nőtt. A módszer értelmében: 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 meredek 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.

Összefoglalás

Sikerült kidolgoznunk egy olyan fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer mérésen alapuló módszert, amely helikális szimmetriával rendelkező rendszerek esetén távolságeloszlások meghatározására lehet használni.

A módszert a gyakorlatba ültettük, és azt az aktomiozin komplex esetében használtuk. Az eljárás segítségével kvantitatív képet kaptunk a miozin-S1 katalitikus, illetve könnyűlánc-kötő doménjének az aktin filamentumhoz viszonyított elhelyezkedéséről.

A távolságeloszlások feltételezésével kvantitatív képet kaptunk a katalitikus domén és a könnyűlánc-kötő domén flexibilitásáról is.

Az f' paraméter hőmérsékletfüggésének mérésén alapuló módszer alkalmazásával pontosítottuk a fent említett módszer által kapott távolságeloszlások jelentését. 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 megfigyeléseket¹¹, amelyek szerint a katalitikus domén és a könnyűlánc-kötő domén el tud fordulni egymáshoz képest.

2. A fotoliáz fotoaktivációjának vizsgálata femtoszekundumos tranziens abszorpciós mérések segítségével

Bevezetés

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 \rightleftharpoons 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 fotokémiaailag katalizálja a DNS hibákat javító reakciót¹³.

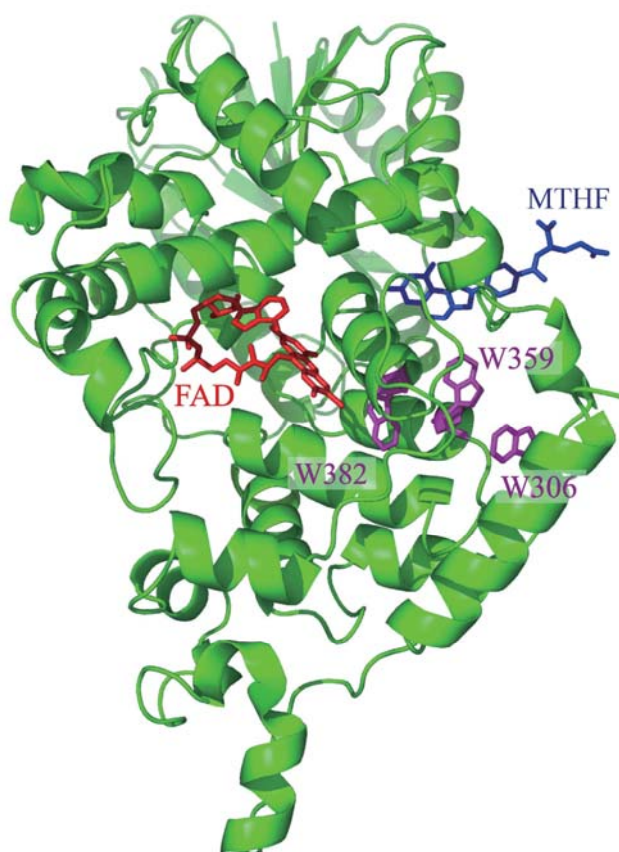
A fotoliáz a flavoproteinek családjába tartozik, amelyek esetében a flavin kofaktor számos biokémiai reakcióban játszik intermediér szerepet; a flavoproteinekben található flavin kromofór jellegzetes abszorpciós spektrummal rendelkezik UV és látható hullámhosszokon egyaránt; legtöbbjük esetében a fiziológiai 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.

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.

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 flavin¹⁴⁻¹⁶, 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.1. 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-szubstrát kötésre hatást nem gyakorló MTHF illetve 8-HDF kofaktorok nélkül is végbemegy^{17, 18}, jelenlétük azonban jelentősen (10-100-szoros mértékben) megnöveli a javítás sebességét¹³. Ez annak köszönhető, hogy az MTHF vagy 8-HDF kofaktorok extinkciós maximuma (400 nm körül) jelentősen nagyobb, mint az FADH^- kofaktoré, az így abszorbeált energia pedig szintén eljut – fluoreszcencia rezonancia energiatranszferrel – a flavin kofaktorhoz^{17, 19-21}.

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 $\text{Pyr} \rightleftharpoons \text{Pyr}$ gyűrűre²². 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.

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.

Az *E. coli*-ból 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 meg²³ (II.2. ábra), amelynek során a terminális elektron-donor a flavin kofaktortól 15 \AA távolságban elhelyezkedő, oldószerrel kölcsönhatásban álló W306-os triptofán²⁴. 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^{23,25}.

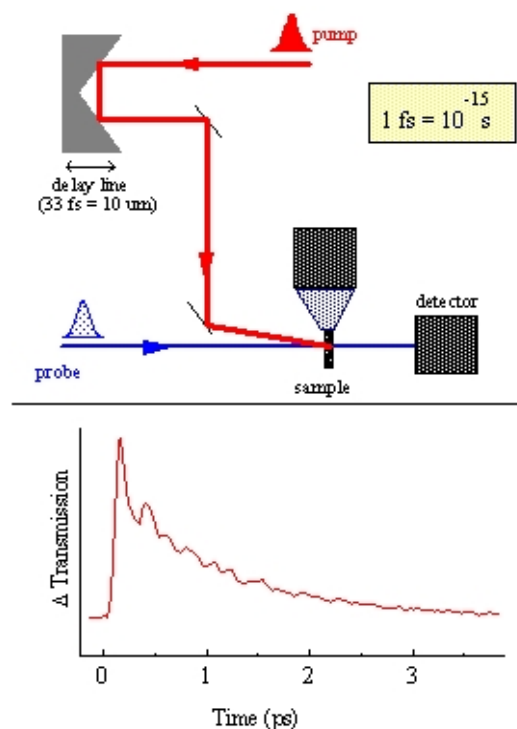
2. Célkitűzések

Vizsgálataim során a W382-W359-W306 triptofánlánc mentén végbemenő elektrontranszfer folyamat részletesebb megértését tűztem ki célul. Kollégáim korábbi munkája, amelynek során mutagenézissel egy a triptofánhoz hasonló geometriájú, de redox-semleges fenilalaninnel 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?

Alkalmazott módszerek

Vizsgálataimat a pumpa-próba módszerrel megvalósított tranziens abszorpciós mérésekkel végeztem. 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 vázolt tranziens abszorpciós berendezés (II.2. ábra) tehát néhány femtoszekundumos időközönként méri az abszorpcióváltozást, ennek megfelelően a femtoszekundumos időskálán lezajló abszorpciós változások mérésére alkalmas.



II.2. ábra. A tranziens abszorpciós elrendezés illetve a mért görbe. (Forrás: Vos M H, 1999²⁶.)

A detektált abszorpcióváltozás mögött a következő jelenségek húzódnak meg:

1. Kifehéredés vagy „bleaching”.
2. Stimulált emisszió.
3. Fotoindukált abszorpció vagy gerjesztett állapotú abszorpció („excited state absorption”, ESA).

Eredmények és következtetések

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 kísérletei²⁵ tisztázták a kofaktorhoz legközelebb álló triptofán (W382) szerepét az elektron transzfer folyamatban, illetve az FADH^{•*} állapot saját relaxációs idejét.

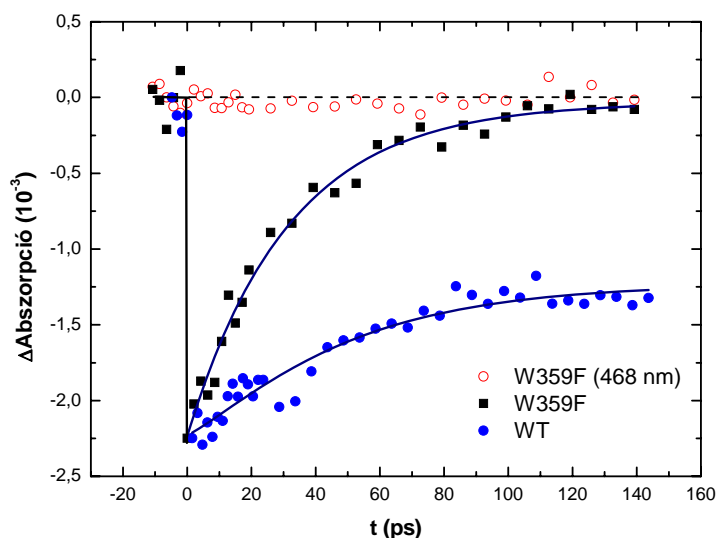
A vad típus esetében a sebességi állandó $(24 \text{ ps})^{-1}$ körül, míg a mutáns esetében $(80 \text{ ps})^{-1}$ körül adódott a teljes mért spektrális tartományon. A mutáns esetében megfigyelt hosszabb relaxációs idő arra utal, hogy nem jön létre elektrontranszfer, vagyis a W382-es triptofán az elsődleges elektron donor. A mutáns esetében megfigyelt $(80 \text{ ps})^{-1}$ körüli lecsengés az FADH^{•*} saját relaxációs idejének felel meg.

A vad típusnál megfigyelt 30 ps körüli relaxációs idő ennek megfelelően két kompetitív folyamat – az FADH^{•*} állapot elektrontranszfer következtében megvalósuló, illetve saját relaxációjának – eredménye. Ennek megfelelően az elsődleges elektron transzfer lépés mintegy 38-45 ps alatt megy végbe.

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 megfigyelhető, hogy a mutáns esetében az abszorpcióváltozás kinetikája egyezést mutat a vad típusban megfigyelttel. Mivel ezen a tartományon az abszorpcióváltozást csak az FADH^{•*} 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.

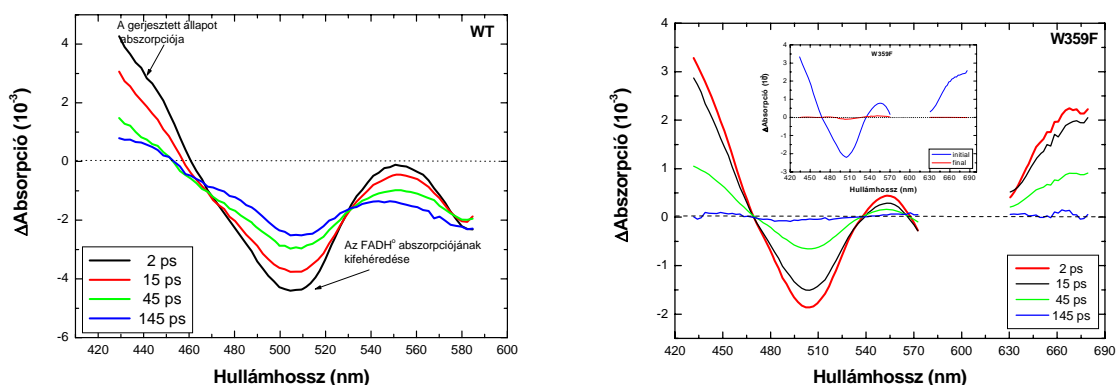
A másik tartományt (420-470 nm) vizsgálva, ahol fotoindukált abszorpció lép fel az enzimben, mind a vad típus, mind a mutáns esetében hasonló kinetikát figyelhetünk meg: 434 nm-en a gerjesztett állapot relaxációjának sebességi állandója szintén $\sim 30 \text{ ps}$.

A 470-590 nm tartományban a relaxáció élettartama az előzőekhez hasonlóan mind a vad típus, mind a mutáns esetében $\sim 30 \text{ ps}$. Feltűnő különbség azonban, hogy amíg a vad típusban 150 ps után is marad abszorpciókülönbség, ez a mutáns esetében gyakorlatilag teljesen eltűnik (II.3. ábra).



II.3. ábra. Az abszorpcióváltozás kinetikája a vad típus (teli körök) és a mutáns esetében (négyzetek). Üres körökkel ábrázoltuk az izobesztikus pontban mért abszorpcióváltozást.

A vad típus transziens spektrumait elemezve látszik, hogy a 145 ps-os mérési ablakban a minta gyakorlatilag felveszi a $t = \infty$ időpillanathoz tartozó „nyugalmi” vagy „végső” spektrumot, amely az $\text{FADH}^- \text{W}^{\bullet+}$ állapotnak feleltethető meg. A mutáns esetében ez a karakterisztikus spektrum azonban eltűnik: a 145 pikoszekundumos késleltetés esetén mért abszorpcióváltozás (ennek megfelelően a „végső” aszimptotikus spektrum is) a vizsgált spektrális tartományon gyakorlatilag nulla (II.4 ábra).



II.4. ábra Vad típusú (WT) és mutáns (W359F) fotoliáz transziens abszorpciós spektruma különböző késleltetések esetén.

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.

A reakciómechanizmust leíró differenciál-egyenletrendszer megoldásával, illetve a mérések során kapott sebességi állandók behelyettesítésével sikerült megbecsülnünk ennek a töltés rekombinációnak a felső határát, amely 4 ps körül adódott.

Összefoglalás

Méréseim eredményeit tehát a következőkben lehet összegezni:

- 1) Sikerült igazolnom, 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 redukáláshoz szükséges elektrontranszferet.
- 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 szolgáltatottak 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.

Irodalomjegyzék

1. Spudich, J. A. & Watt, S. The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. *J. Biol. Chem.* 246, 4866-4871 (1971).
2. 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).
3. 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).
4. 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).
5. 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).
6. 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).
7. Takashi, R. Fluorescence energy transfer between subfragment-1 and actin points in the rigor complex of actin subfragment-1. *Biochemistry* 18, 5164-5169 (1979).
8. 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).
9. Xing, J. & Cheung, H. C. Internal movement in myosin subfragment-1 detected by fluorescence resonance energy transfer. *Biochemistry* 34, 6475-6487 (1995).
10. Miki, M. & Wahl, P. Fluorescence energy transfer between points in actin subfragment-1 rigor complex. *Biochim. Biophys. Acta* 790, 275-283 (1984).
11. 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).
12. 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).
13. Sancar, A. Structure and Function of DNA Photolyase and Cryptochrome Blue-Light Photoreceptors. *Chem. Rev.* 103, 2203-2238 (2003).
14. 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).
15. Heelis, P. F. & Sancar, A. Photochemical properties of Escherichia coli DNA photolyase: a flash photolysis study. *Biochemistry* 25, 8163 - 8166 (1986).
16. 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).
17. 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).
18. 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).
19. 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).
 20. 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).
 21. Lipman, R. S. A. & Jorns, M. S. Direct Evidence for Singlet Singlet Energy-Transfer in Escherichia-Coli DNA Photolyase. *Biochemistry* 31, 786-791 (1992).
 22. 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).
 23. 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).
 24. 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).
 25. 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).
 26. Vos, M. H. & Martin, J.-L. Femtosecond processes in proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1411, 1-20 (1999).

Publikációk

Az értekezés alapjául szolgáló saját közlemények

1. Nyitrai, M., G. Hild, B. Bódis, A. Lukács és 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. Nyitrai, M., G. Hild, A. Lukács, E. Bódis és 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. Lukacs, A., A.P.M. Eker, M. Byrdin, S. Villette, J. Pan, K. Brettel és M.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. és 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. és 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. Nyitrai, M., G. Hild, A. Lukács, E. Bódis, S. Halasi és 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. és Somogyi B. Az akto-miozin komplex flexibilitása rigor és ADP állapotokban: fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer vizsgálatok. XXII. Országos Lumineszcencia-Spektroszkópia Konferencia, Pécs, 1999

5. Nyitrai M., Hild G., Lukács A., Bódis E., Halasi S. és Somogyi B. A miozin S1 katalitikus és könnyu-lánc-kötő doménjeinek dinamikai tulajdonságai akto-miozin komplexben. XIX. Biofizikai Vándorgyűlés, Kecskemét, 1999
6. Nyitrai, M., G. Hild, A. Lukács, E. Bódis, S. Halasi és 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. Somogyi, B., M. Nyitrai, G. Hild, A. Lukács és 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. Lukács, A., M. Nyitrai, E. Bódis, G. Hild és 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. Lukács, A., M. Nyitrai, J. Gallay, M. Vincent, E. Bódis és 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. Lukacs, A., M.H. Vos, A.P.M. Eker, M. Byrdin és K. Brettel. Mechanism of radical transfer during photoactivation of the flavoprotein DNA photolyase 15th International Conference on Ultrafast Phenomena, Pacific Grove, California, USA, 2006

Egyéb saját közlemények

1. Nyitrai, M., G. Hild, A. Lukács, J. Belágyi és 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. Somogyi, B., M. Nyitrai, G. Hild, A. Lukács és E. Bódis 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. Lukács, A., M. Nyitrai, E. Bódis, G. Hild és 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, 2001. IF: 2.905

Könyvfejezetek

1. Lukacs, A., M.H. Vos, A.P. M. Eker, M. Byrdin és K. Brettel. Mechanism of radical transfer during photoactivation of the flavoprotein DNA photolyase *Ultrafast Phenomena XV*, Springer Series in Chemical Physics, 2006
2. Lukács, A., Z. Várallyay és R. Szipócs. 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. Rozsa, B., E.S. Vizi, G. Katona, A. Lukács, Z. Várallyay, A. Sággy, L. Valenta, P. Maák, J. Fekete, Á. Bányász és R. Szipócs. Real time 3D nonlinear microscopy. *Trends in Optics and Photonics Series*, Vol 98, p. 858-863., 2005

Ph.D. THESIS

**Functional dynamics of proteins revealed by fluorescence and
femtosecond transient absorption spectroscopy**

András Lukács



University of Pécs
Faculty of Medicine
Department of Biophysics

2007