
Izomszövet eredetű aktin izoformák termodinamikai és spektroszkópiai vizsgálata

PhD értekezés

Készítette: Orbán József

Témavezetők: DR. LŐRINCZY DÉNES

DR. HILD GÁBOR

Doktori Iskola: Interdiszciplináris Orvostudományok
Doktori Iskola vezető: Dr. Sümegi Balázs
Program: B-130; Funkcionális fehérjedinamika vizsgálata
biofizikai módszerekkel
Programvezető: Dr. Nyitrai Miklós

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar,

Biofizikai Intézet



2008

"We are drowning in a sea of data and starving for knowledge." (Sydney Brenner, 2002)

Köszönetnyilvánítás:

Köszönettel tartozom egész családomnak, hogy a természet csodái iránti érdeklődésemet felkeltették és kezdeti ismeretszerző lépéseimet támogatták.

Tisztelettel tartozom tanárainknak, akik érdeklődésemet a természetismeret biológiának és fizikának nevezett tárgyai irányába terelték, illetve ezirányú tudásom bővítéséhez hozzájárultak. Közülük is elsősorban Dr. Sánta Imrének, aki mind egyetemista, mind PhD hallgató koromban segítségem és tanítóm volt.

Nagy köszönettel tartozom prof. Somogyi Bélának † és Dr. Nyitrai Miklósnak, akik lehetőséget és teret biztosítottak kutatói munkásságom kibontakozásához, egyben sok hasznos tanáccsal láttak el és szakmai ismeretüket megosztva segítettek előrejutni.

Kiemelt köszönetet érdemelnek a témavezetésért, segítőkész tudományos támogatásért, építő jellegű kritikákért, e disszertáció témáját jelentő szakterületbeli jártasságom fejlesztéséért; dr. Hild Gábor és prof. Lőrinczy Dénes.

Köszönettel tartozom ezen kívül mindazon Biofizikai Intézeti dolgozóknak, akik segítették munkámat.

Köszönöm azoknak is, akik barátilag támogattak.

I. TARTALOMJEGYZÉK

I.	TARTALOMJEGYZÉK	3
II.	RÖVIDÍTÉSEK	5
III.	BEVEZETÉS	7
IV.	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	9
IV.1.	A miozin molekula jellemzői	9
IV.2.	Az akto-miozin komplex működési ciklusa	10
IV.3.	Az aktin molekula tulajdonságai	12
IV.4.	Az aktin filamentum tulajdonságai	13
IV.5.	Aktin izoformák	14
IV.6.	A szív és a vázizom szövetek összehasonlítása	16
IV.7.	Az izomműködés alapjai	16
IV.8.	Az izomműködés szabályozása	18
IV.9.	Aktin polimerizáció – a filamentum kialakulása	19
IV.10.	Környezeti paraméterek hatása	20
IV.10.1.	A kationok szerepe	21
IV.10.2.	A nukleotidok szerepe	22
IV.10.2.a.	Az aktin ADP·P _i állapota	23
IV.10.2.b.	Nukleotid analógok	24
IV.10.3.	A toxinok szerepe	25
IV.10.3.a.	Falloidin	25
IV.10.3.b.	Jasplakinolid	26
V.	CÉLKITŰZÉSEK	28
VI.	ANYAGOK és AKTIN PREPARÁLÁS	30
VI.1.	Anyagok, vegyszerek	30
VI.2.	Alkalmazott pufferek	30
VI.3.	Aktin preparálás izomszövetből	31
VI.4.	Kétértékű ionok cseréje	31
VI.5.	ADP-aktin előállítása	31
VI.6.	Pirén-jelölt G-aktin előállítása	32
VII.	VIZSGÁLATI ÉS MÉRÉSTECHNIKÁK	33
VII.1.	Gél-elektroforézis	33
VII.2.	Spektrofotometria	34
VII.2.1.	A koncentrációk meghatározása	34
VII.2.2.	A pirén-aktin gerjesztési és emissziós spektruma	35
VII.3.	Csatolt ATPáz aktivitás teszt	36

TARTALOMJEGYZÉK

VII.4.	Fluoreszcencia spektroszkópia - polimerizációs teszt.....	37
VII.5.	A „stopped flow” technika	38
VII.6.	Differenciális pásztázó kalorimetria	39
VII.6.1.	DSC - műszer és technika	39
VII.6.2.	DSC mérések kivitelezése.....	42
VII.6.3.	A DSC görbék kiértékelésének módja	43
VII.6.4.	Az F-aktin termodinamikai kooperativitása.....	45
VIII.	EREDMÉNYEK.....	48
VIII.1.	Miozin-S1 és aktin kölcsönhatása	48
VIII.1.1.	Aktin aktiválta S1 ATPáz aktivitás.....	48
VIII.1.2.	Akto-miozin komplex kinetikai paraméterei.....	49
VIII.1.2.a.	Az S1 ATP indukálta disszociációja az aktinról.....	49
VIII.1.2.b.	S1 ATP indukálta disszociációja ADP jelenlétében.....	50
VIII.1.2.c.	Az S1 affinitása az aktinhoz ADP hiányában.....	51
VIII.1.2.d.	Az S1 affinitása az aktinhoz ADP jelenlétében.....	52
VIII.2.	A kétértékű ionok hatása - ionerősség.....	52
VIII.3.	A pH hatása - izoformák.....	55
VIII.4.	Nukleotidok hatása	56
VIII.5.	ADP·P _i analógok hatása.....	59
VIII.6.	Toxinok hatása.....	61
VIII.7.	A toxinok és a foszfát analógok együttes hatása	62
IX.	KÖVETKEZTETÉSEK	66
X.	BIOLÓGIAI JELENTŐSÉG.....	69
XI.	FÜGGELÉK	71
XI.1.	Vázizom aktin izoforma	71
XI.2.	Aktin izoformák.....	72
XI.3.	Közlemények	73
XII.	IRODALOMJEGYZÉK.....	76
XIII.	ÁBRAJEGYZÉK	84
	A szerző cikkei	86

II. RÖVIDÍTÉSEK

<u>Anyag jelölése</u>	<u>Megnevezés</u>
ATP	adenozin-5'-trifoszfát
ADP	adenozin-5'-difoszfát
akrilamid	akrilamid, a PAG egyik alkotója
AlCl ₃	alumínium klorid
AlF ₄ ⁻	alumínium fluorid ion
BeF _x	BeF ₂ (OH) ⁻ · H ₂ O és BeF ₃ ⁻ · H ₂ O komplexek együttes jelölése
BeSO ₄	berillium szulfát
bisz-akrilamid	N,N-metil-bisz-akrilamid, a PAG másik alkotója
brómfenolkék	SDS-PAGE-ELFO fehérje színező festékanyaga
CaCl ₂	kalcium klorid
coumassie blue	kék jelölő festék gélelektroforézishez
DMF	dimetil formamid
EGTA	etilén-glikol-bisz(β-aminoetil-éter)-N,N,N',N'-tetraecetsav
falloidin	falloidin, sejtmeleg
glükóz	β-D(+)-glükóz
hexokináz	hexokináz, enzimatis határfok: 1 mmol glükóz/min, pH 7,6; 25 °C-on
jasplakinolid	jasplakinolid, sejtmeleg
KCl	kálium klorid
MEA	β-merkaptóetanol (vagy 2-hidroxietyl-merkaptán)
MgCl ₂	magnézium klorid
MOPS(NaOH)	3-(N-Morfolino)propánszulfid sav + NaOH; pH 6,5-7,9 ΔpK _a /°C: -0,006
NaF	nátrium fluorid
NaN ₃	nátrium azid
PA(G)	poliakrimalid (gél), az elektroforézis futtatóközege
pirén	N-(1-pirén)-jodoacetamid, fluorofór jelölő
pirén-aktin	pirén fluorofórral jelölt aktin
SDS	nátrium-dodecilszulfát
T _m	tropomiozin (a T _m : 'olvadási hőmérséklet'-et jelent!)
Tn: TnT, TnC, TnI	troponin-komplex; tropomiozin-, Ca ²⁺ -kötő és inhibitor alegységek
TRIS(HCl)	Tris-(hidroximetil)-aminometán + HCl; pH 7,0-9,0 ΔpK _a /°C: -0,031

RÖVIDÍTÉSEK

Az aktin preparálását és környezeti feltételeit tekintve az alábbi rövidítések fordulhatnak elő (sorrendben):

<i>toxin kötés</i>	<i>kation</i>	<i>nukleotid (analóg)</i>	<i>szöveti eredet</i>	<i>izoforma</i>	<i>mono- /polimer</i>	
falloidin-	Mg²⁺	ATP	vázizom	α (alfa)	G- (monomer)	aktin
		ADP·P _i				
		ADP				
jasplakinolid-	Ca ²⁺	BeF _x ·ADP	szívizom		F- (filamentum)	
		AlF ₄ ·ADP				

A vastagítással kiemelték az általánosabb, illetve az általunk többször vizsgált formák.

További rövidítések:

ABP: aktinkötő fehérjékkel (angol: „actin-binding protein”)

DSC: differenciális pásztázó kalorimetria, (angol: „differential scanning calorimetry”)

DNáz I: dezoxi-ribonukleáz I, a DNS-t polinukleotidokra hasító enzim

FRET: Förster-típusú rezonancia energia transzfer

kDa: kilodalton, molekulatömeg mértékegysége

PDB: fehérje adatbázis (angol: „Protein Data Base”, <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>)

T_m: a fehérje denaturálódásának hőmérséklete, (angol: „melting temperature”)

Szinonimák:

pozitív- / szakállas- / gyorsan növekvő- / feji – vég

negatív- / hegyes- / depolimerizáló- / farki – vég

vázizom- / szkeletális- eredetű aktin

szívizom- / kardiális- eredetű aktin

α-helikális / jobbmenetes spirál – szerkezet

balmenetes- / genetikus spirál – szerkezet

kétértékű- / bivalens – kation

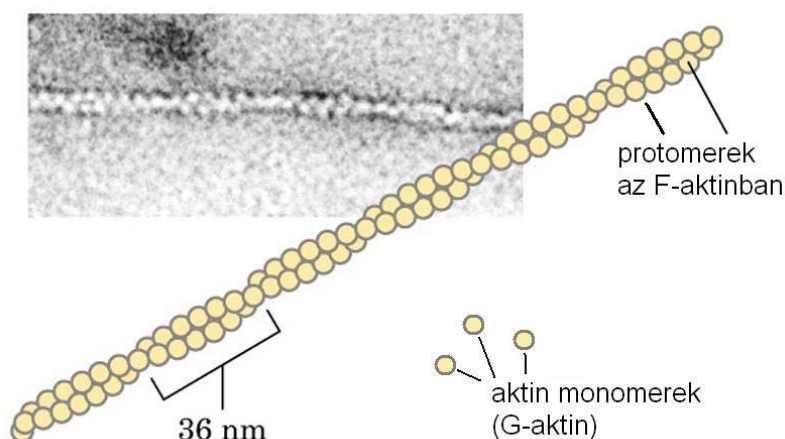
a.u. / m.e.: „arbitrary unit” / tetszőleges egység (grafikonoknál)

III. BEVEZETÉS

Kühne volt az első kutató, aki fehérjét preparált izomszövetből még a XIX. század végén, azonban ő még nem volt tisztában annak funkciójával és jelentőségével. Engelhardt¹ és kutatócsoportja a miozin felfedezője és egyben névadója, ők nyúl vázizomból preparálták az addig ismeretlen fehérjét. Az ő módszerükkel létrehozható preparátumnak a vizsgálata során Szent-Györgyi Albert és Straub F. Brúnó ionkoncentrációtól függően eltérő viszkozitású anyagot kaptak, amelyeket kezdetben miozin-A és miozin-B névvel illették². Később megállapították, hogy a preparátum nem csak egyféle fehérjét, a miozint, hanem még egy azzal komplexet képező fehérjét is tartalmaz. Az utóbbit miozin ATPáz aktivitását aktiváló hatása miatt („activated myosin”) aktinnak nevezték el.

Már Straub és Feuer is bizonyította^{3, 4}, hogy az aktin monomerek ATP-t kötnek és az ATP a polimerizáció során ADP-vé alakul szervesen foszfát (P_i) keletkezése mellett, ami az ATP aktin általi hidrolíziséből származik.

Az aktin filamentumról megismertek alapján felállított modellben – az atomi szintű térszerkezet ismeretének hiányában – a monomereket gömböknek tekintették és összekapcsolódásuk eredményeként spirálszerűen csavarodott (kettős) filamentumot feltételeztek⁵. Ezt az elméletet támasztották alá a sok technikai problémát felvető röntgen-kristallográfias módszerrel⁶⁻⁸, és az egyszerűbb, de kisebb felbontású elektronmikroszkópiával szerzett ismeretek



1. ábra: Az elektronmikroszkópos képek alapján kialakított kettős alfa-hélix szerkezet modellje. A monomerekből felépülő filamentum spirális szerkezetű.

(forrás: http://courses.cm.utexas.edu/jrobertus/ch339k/overheads-1/ch7_muscle-struct.jpg)

(1. ábra). A modellben így számos pontosság vált lehetővé és egyben kötelezővé. Ekkor már ismert volt, hogy az aktin monomer két eltérő nagyságú domént tartalmaz, ezért a filamentum térszerkezetével kapcsolatos viták a kisebb és a nagyobb domének filamentum tengelyéhez viszonyított elhelyezkedéséről szóltak a 60-as 70-es években.

Az aktin monomerek kristályosításának problémái miatt röntgen-kristallográfiával először csak 1981-ben, DNáz I-gyel való együttes kristályosítással sikerült a szerkezetet 6 Å-ös felbontással meghatározni és egyben alátámasztani a két doménből álló aktin struktúrának az elméletét⁹. A mai napig kiemelt jelentőségű az 1990-ben 2,8 Å-ös pontossággal meghatározott atomi szintű térszerkezet, amit nyúl vázizomból preparált aktinról nyertek¹⁰.

Ekkorra már meghatározták az aktin monomer térfogatát ($40 \text{ \AA} \cdot 40 \text{ \AA} \cdot 30 \text{ \AA}$), de a nagy pontosságú mérés miatt fény derült arra is, hogy a 2 domén tovább bontható két-két aldoménre. További szerkezetvizsgálatok is következtek a 90-es években^{11, 12}, amelyek lehetőséget adtak mindjárt kétféle modell létrehozására. A Holmes és munkatársai által létrehozott modell kisebb módosításokkal ugyan, de a mai napig inkább elfogadott, mint a Lorenz féle modell.

Napjainkban az aktin molekulához kapcsolódó kutatások középpontjában inkább az aktin más aktinkötő fehérjékkel (ABP: „actin-binding protein”) való kölcsönhatása¹³ illetve a aktin alapú sejtszerkezet változásának és szabályozásának megismerése áll. E mellett azonban nem feledkezhetünk meg arról, hogy számos információ rejlik még az egyes aktin izoformák és a belőlük felépülő filamentum szerkezetének és működésének összehasonlításában. Ilyen szempontból jelen dolgozat kiegészítője az intézetünkben folyó korábbi munkáknak. Ez az aktinhoz kapcsolódó legfontosabb fehérjével, a miozinnal¹⁴⁻¹⁶ való kölcsönhatás mélyebb megértését is segíti^{17, 18}. A dolgozat megértését segítő további intézeti eredmények az adott fejezetekben szerepelnek.

IV. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

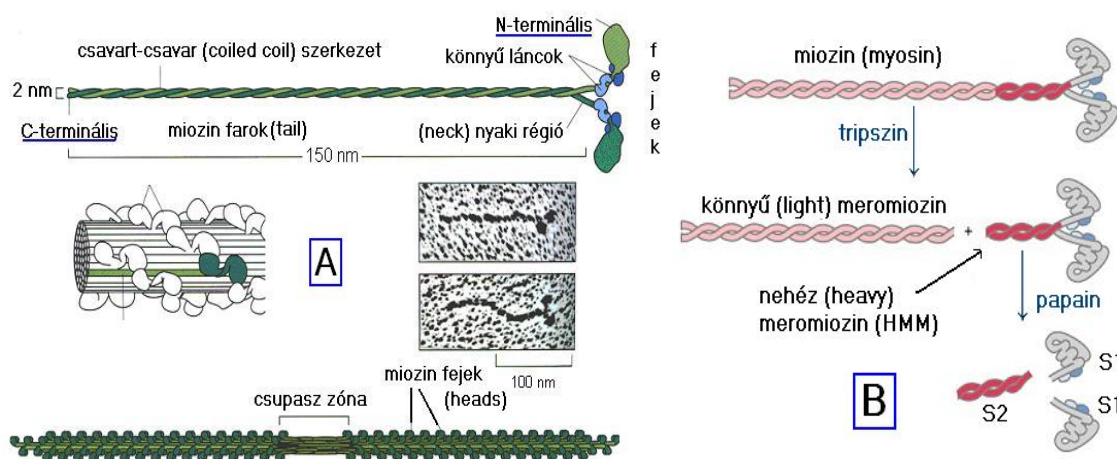
Mind történelmi, mind tartalmi okok miatt a miozin – mint az egyik legfontosabb aktinhoz kötődő molekula – ismertetése az irodalmi bevezető elején történik meg.

IV.1. A miozin molekula jellemzői

A miozin szupercsaládot jelenleg több, mint 24 osztályba sorolják, melyek a különböző feladatokra specializált és ennek megfelelően szekvenciálisan kissé eltérő miozinokat különítik el és rendezik csoportokba. Az eltérések elsősorban a helikális farki régióban, valamint a csukló mozgásra, azaz az erőkifejtésre képes nyaki régióban tapasztalhatók¹⁹.

A miozinnak e népes és szerteágazó funkciójú fehérje-családjából a miozin II-es (továbbiakban: miozin) molekula megtalálható minden állati sejtben. Számos sejtfunkcióban vesz részt, mint pl. citoplazma áramlás, valamint az izommozgást segítő kontrakciós mechanizmusban betöltött szerep²⁰. Ezen funkciók elvégzésében az aktinhoz való speciális kötése alapvető jelentőségű. ATP hidrolíziséből származtatva az energiát, a miozin képes elmozdítani az aktin filamentumot a hosszanti tengelye mentén.

A miozin molekula geometriailag aszimmetrikus a hosszúkás, csavart farki rész („rod”) és a kompaktabb feji rész („head”) miatt. A farki rész segíti a miozin molekulák kötegekké összekapaszkodását, így jön létre a vastag filamentum. A feji rész a mozgáshoz szükséges aktint- és ATP-t kötő régiókat tartalmazza, míg a farki részben például regulációs szakaszok találhatóak (2. ábra, A).



2. ábra: A miozin molekula. A) A miozin molekula és azok által (kötegekké összekapaszkodva) kialakított vastag filamentum szerkezeti modellje a fontosabb régiók megnevezésével. B) A miozinnal különböző proteolitikus hasítással nyerhető részletek. Vizsgálataink során a miozin szubfragmentum 1-et (S1) használtuk. (forrás: A.) <http://www.sci.u-szeged.hu/zoolcell/sbea/Figs/> és B.) http://courses.cm.utexas.edu/jrobertus/ch339k/overheads-1/ch7_muscle-struct.jpg)

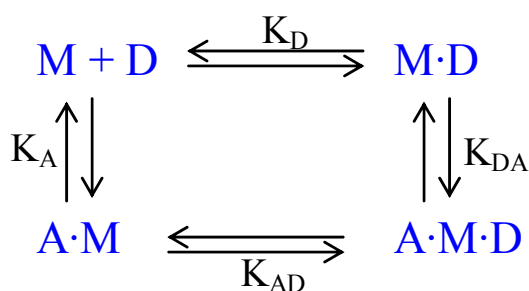
A kb. 500 kDa tömegű miozin molekula hat polipeptid láncból áll össze: két *nehézlánc* („heavy chain”) és négy *könnyűlánc* („light chain”). A két nehéz lánc kettős hélix szerkezetet mutat, amelyek egyik végükön kialakítják a feji végre jellemző globuláris alakot. Ezekhez az ún. miozin fejekhez kapcsolódnak a könnyűláncok; fejenként kettő-kettő. Csirke miozin I-es szubfragmentumának (S1, lásd később) szerkezetét határozták meg először atomi szinten röntgendiffrakciós módszerrel²¹, ami alapján később megállapították, hogy funkcionálisan két doménből: a motor- és a regulációs doménekből áll. Az előbbi tartalmazza az aktin- és az ATP-kötő/hasító helyet, míg az utóbbi a motor domént a miozin rúddal összekötő 2 könnyűláncot és a nehézlánc egy részét foglalja magába.

Enzimatis emésztéssel ez az összetett szerkezet megbontható (2. ábra, B). Ha α -kimotripsint alkalmazunk az emésztéshez, akkor S1 („subfragmentum 1”) és S2 („subfragmentum 2”) fragmensekre bontható a miozin molekula nehéz meromiozin (HMM) egysége. Az S1 – mint oldható, ~120 kDa tömegű proteolitikus fragmentum – fontos vizsgálataink szempontjából, ugyanis képes az aktinhoz kötődni és rendelkezik ATPáz aktivitással^{22, 23}. Az egész miozin molekulából a feji vég és azon belül is az ún. S1 tartalmazza az erő kifejtés szempontjából fontos régiókat. Ugyan az S1 tovább hasítható egy motor doménre és egy nyaki doménre, azonban a motor domén ATPáz aktivitása ellenére húzóerő kifejtésére nem képes^{24, 25}.

Egy miozin molekula két S1-et tartalmaz, azaz két feji résszel tudja kötni az aktin filamentum protomerjeit. A működőképes egyfejű miozin felfedezése után kiderült, hogy a két fej megléte nem szükséges, de energia szempontú hatékonyságnövelő szerepet, illetve a fejek egymásra hatása révén szabályozási szerepet tulajdoníthatunk neki²⁶.

IV.2. Az akto-miozin komplex működési ciklusa

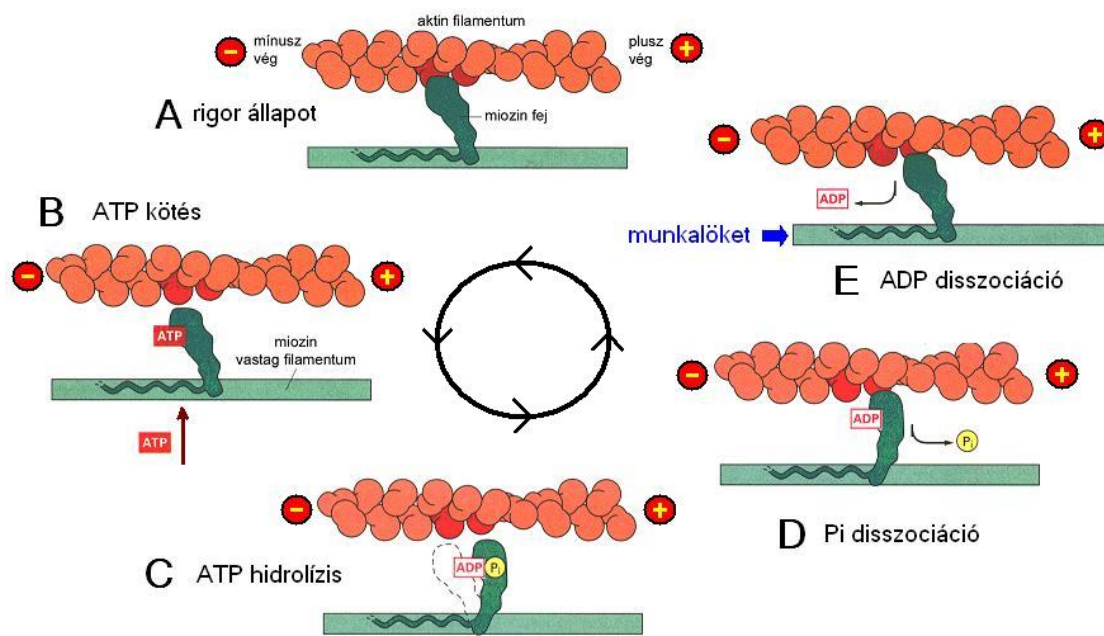
Az izomműködés szempontjából az aktin és a miozin egyik legfontosabb tulajdonsága, hogy képesek egymással specifikus kötést létrehozni, így jön létre az ún. akto-miozin komplex. Az izomműködés során a két komponens térbeli helyzetének változását a “sliding filaments” elmélet írja le^{27, 28}. Működés közben a komponensek egymáshoz kötődnek, illetve szétválnak és ez a fizikai mechanizmus ciklikusan ismétlődik (1. séma)^{29, 30}. A különböző



1. séma: Az aktin és miozin kapcsolatának erősen kötő állapotaira vonatkozó egyensúlyi viszonyai.

M: miozin, D: ADP, A: aktin, a ponttal elválasztott egységek az adott molekulák komplex, azaz egymáshoz kötött állapotát jelzik. Az egyes lépésekhez tartozó affinitási értékek (K)

kötési állapotokban a miozin más-más nukleotidot (ATP ill. ADP) köt és az aktin filamentummal – a nukleotid állapotnak megfelelően – más-más kapcsolatot létesít. ATP-t kötő állapotban a miozin fej és az aktin kapcsolódása gátolt, majd a gyors hidrolízis hatására a miozin fej (ADP·P_i állapot) kezdetben kis affinitással kötődik az aktin filamentumhoz (3. ábra).



3. ábra: Az akto-miozin komplex fiziko-kémiai ciklusának sémája: mely a vékony- és vastag filamentumok egymás melletti elcsúszásának alapját képezi.

(forrás: <http://www.sci.u-szeged.hu/zoolcell/sbea/Figs/slidfil.gif>)

A hidrolízisből származó energia a miozin fejnek nyaki, vagy szabályozó doménjében lassú konformációváltozást idéz elő és az akto-miozin komplexet az erősen kötő (nagy affinitású) állapotba juttatja (A·M·D). A „swinging lever arm”^{*} elmélet szerint ez alatt a nyaki régióban végbemenő konformációváltozás hatására erőt fejt ki a miozin és a két filamentum egymáshoz képest elcsúszik³³. Ezek után a szervetlen foszfát, majd az ADP is disszociál a miozin fejről miközben a komplex erősen kötő állapotban marad (A·M). Ez az állapot csak egy újabb ATP kötésének hatására módosul, ami a miozin aktinhoz való affinitását csökkenti, azaz a komplex szétválásához vezet. Ezek a fiziko-kémiai állapotok a vékony és vastag filamentumrendszer működésének alapját képező ismétlődő körfolyamat főbb lépéseit határozzák meg²⁹. (összefoglaló irodalom^{34, 35}).

* A swinging lever arm (csukló emelőkar) elmélet a swinging crossbridge (csukló keresztíd) elmélet továbbfejlesztett változata. Lásd még a 31. és 32. cikkekben.

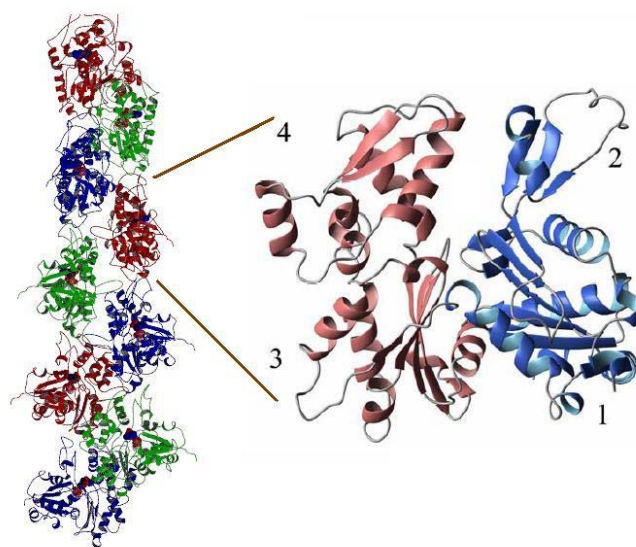
A nagy affinitású kötő állapotot rigor állapotnak is nevezzük, mert a hullamerevség (rigor mortis) alatt is ilyen állapotba kerül a komplex. Ekkor a miozin fej nem képes elereszteni az aktin filamentumot ATP hiányában és ezáltal az izmokat állandó merevségben tartja.

IV.3. Az aktin molekula tulajdonságai

A természetben fellelhető aktin izoformák az aminosav-sorrendjüket tekintve nagymértékű hasonlóságot mutatnak. A sejtszerkezet és számos sejtműködés alapvető építő és funkcionális egysége az eukarióta sejtekben, így például alapvető feladata a sejten belüli transzportfolyamatokban, a sejtmozgásokban, az endo- és exocitózis folyamatában, a fagocitózisban és a citokinézisben való aktív részvétel³⁶. A sejtmozgások közül a lamellipodium, filopodium képzéséért, az intracelluláris transzportfolyamatok esetén egyes vezikulumok mozgatásáért felelős³⁷⁻³⁹.

A mikrofilamentális hálózat alapját képező aktin hálózat szerkezetileg és dinamikailag adaptálódik a különböző strukturális és funkcionális elvárásokhoz. A mikrotubulusokkal és intermedier filamentumokkal közösen alkotják a citoskeletális rendszer hármasan összetett egységét. Ugyan a sejtszerkezetet többnyire statikusnak képzeljük, valójában a folytonosan változó aktin filamentum polimerizációs-depolimerizációs dinamikája számos sejt folyamatban tölt be fontos szerepet. A mikrofilamentális szerkezet létrejöttében, az aktin filamentumok kialakulásának helyét, idejét, irányultságát, a hálózat bonyolultságának mértékét és még sok jellemzőjét számos aktinkötő fehérje szabályozza.

Az aktin monomer 42,3 kDa molekulatömegű globuláris fehérje⁴⁰, ami szerkezetileg két doménre és doménként további két-két szubdoménre osztható. A kisebbik domén tartalmazza az 1-144 (N-terminális) és 338-375 (C-terminális), míg a nagyobb domén a köztes, 145-337 peptidszakaszt. A két domén között található hasadékban helyezkednek el a kation- és a nukleotid-kötő helyek¹⁰. A kötött kation és a nukleotid minősége erőteljesen befolyásolja a monomerek polimerizációs és a filamentum depolimerizációs sebességét. Az aktin monomer és a filamentum is érzékeny a mikrokönyezete fiziko-kémiai tulajdonságaira, amik közül mi a kötött kation



4. ábra: A globuláris aktin monomer (jobb) és a filamentum (bal) térbeli szerkezete. A kis domén az 1-2 (kék), a nagy domén a 3-4 aldoméneket (rózsaszín) tartalmazza. Protein Data Bank kód: 1ATN (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>).

minőségének, a *pH*-nak, az ionerősség-nek és a nukleotidoknak a hatását vizsgáltuk elsősorban.

A két domén mérete és tömege kis mértékben eltér, emiatt kis (1-es és 2-es szubdomén) és nagy (3-as és 4-es szubdomén) doméneknek nevezték el ezeket (4. ábra). Az 1-es aldomén tartalmazza mind a C-, mind az N-terminális végek kb. 30-30 aminosavját. A domének összeköttetését két polipeptid-szakasz biztosítja (144-155 és 331-338 aminosavak); ezt a szakaszt csuklópánt (ang.: „hinge”) régióknak nevezik, ami lehetővé teszi a két domén egymáshoz viszonyított helyzetének változ(tat)ását. A molekula ennek köszönhetően nyitott- és zárt szerkezetet tud kialakítani a kötött nukleotidtól függően. A kötött kétértékű kation fiziológiásan a Mg^{2+} -ion⁴¹, ami a nukleotiddal együtt kötődik az aktinhoz. A nukleotid-kötő helyhez ATP, vagy annak hidrolízise során keletkező termékei, az ADP·P_i, illetve az ADP kötődik.

IV.4. Az aktin filamentum tulajdonságai

Az aktin molekula *in vivo* és *in vitro* körülmények közötti előfordulási formái a globuláris monomer (G-aktin) és a filamentális (F-aktin) homopolimer, ami a monomerek összekapcsolódásával alakul ki. Az első filamentum-szerkezeti vizsgálatok elektronmikroszkópiával készültek⁶. Ezek és a további vizsgálatok alapján a filamentum szerkezetét és kialakulását illetően több elmélet keletkezett, melyek közös eleme a ténylegesen kialakuló 12 nm széles kettős spirál szerkezet⁴².

A kialakult spirál tekinthető úgy, mint egy *balmenetes hélix*, illetve *genetikus hélix*, ahol a periódus 2,75 nm⁶, és monomerről monomerre való oldalváltást és beépülést feltételez, 166°-os monomerenkénti szögelfordulással. A Holmes-i modell alapján felfogható azonban két protofilamentum összekapcsolódásából származó jobbmenetes (α -) hélixnek is, ahol 13 monomer adja a 72 nm-es menetemelkedés periódusát⁴³.

A fiziko-kémiai körülmények meghatározzák az aktin monomerek disszociációs- (k_{off}) és asszociációs (k_{on}) sebességi állandóját, valamint az aktin filamentumba beépült molekulák mellett mindig előforduló és azzal kémiai egyensúlyt fenntartó monomerek mennyiségét is. A szabadon lévő monomerek koncentrációját az aktin *kritikus koncentrációjának*[§] nevezzük (*cc.* $\sim k_{off}/k_{on}$). Ezt megfogalmazhatjuk úgy is, hogy ennél kisebb aktin koncentrációk esetén az aktin az adott körülmények között nem polimerizál. A kritikus koncentráció értéke vázizomból preparált magnézium-aktin esetén 100 nM⁴⁴. Ezt az értéket befolyásolja számos környezeti feltétel, mint például az aktin molekula, illetve környezetének ion- és nukleotid-tartalma, valamint az aktin-kötő fehérjék (ABP).

[§] Kritikus koncentráció; angol: „critical concentration”; rövidítése a későbbiekben: *cc*

Az aktin filamentumba beépülő monomerekben (*protomer*^{**}) a 3-as és 4-es szubdomének a filamentum tengelye, azaz belseje felé mutatnak, míg a másik két szubdomén inkább a filamentum külső felét képezi^{43, 45}, meghatározva az aktin-kötő fehérjék számára a reakció-képes felszint. További irányultsági információt jelent az, hogy a 2-es és 4-es szubdomének a filamentum hegyes, míg az 1-es és 3-as szubdomének a szakállas vég irányában helyezkednek el.

A filamentum szerkezetét és működését bonyolultabbá teszi, hogy a protomerek térszerkezete és a kötött nukleotidok eltérése miatt a két vég nem azonos. Megkülönböztetünk tehát egy pozitív- és egy negatív véget, amelyeket a miozin fejekkel dekorált aktin filamentumok negatív festéssel készített elektronmikroszkópos képe alapján neveztek el. A filamentum egyik végét ennek megfelelően szakállas- („barbed end”) míg a másikat szög- („pointed end”) végnek is nevezzük⁶ – a nyílvevő megfelelő végeire hasonlító aktomiozin komplex kinézete miatt.

Korábbi feltételezések szerint a protomerek közötti kötése erősséget – mindkét irányban – a hozzájuk kötött nukleotid minőségétől függetlennek hitték⁴⁶, még az ADP·P_i állapotban is⁴⁷. Ez a feltételezés mind az irány-, mind a nukleotid-függetlenség szempontjából helytelennek bizonyult. A filamentum hossz tengelye irányában a protomerek közötti kölcsönhatás erősebb, mint keresztirányban (Holmes modell, lásd feljebb), de a kereszt-kötések szerepe szintén fontos a filamentum stabilitásának kialakításában.

A filamentumba beépült monomerek némi mozgástérrel rendelkeznek, mely a protomerek filamentum-tengely körüli forgásában, saját tengely körüli billegésben, vagy rotációban és a monomerek filamentum-tengelytől mért távolságának dinamikus változásában nyilvánul meg. Ezen mozgásoknak szerepet tulajdonítanak az aktin filamentum aktinkötő fehérjékkel való kölcsönhatásában, ezek közül is elsősorban a miozinnal való interakciójában és az azon alapuló citoskeletális mozgásokban³².

IV.5. Aktin izoformák

Az aktinnak ugyan több mint 100 egyedi szekvenciájú formája létezik, azonban ezek közül a térszerkezeti, illetve funkcionális izoformák kiemelkedő homológiája mellett a különböző élőlényekben előforduló azonos izoformák erős szekvenciális konzervativizmusa figyelemre méltó (90-100%)⁴⁴. Meglepő tény, hogy a gerincesek különböző szöveteiben expresszálódó izoformák között olykor nagyobb az eltérés, mint különböző gerinces fajok azonos izoformái között (lásd: Függelék). A konzervativizmus oka valószínűleg az evolúciós fejlődés során kiszelektálódó mutációk melyek az adott funkcióra optimalizált szekvenciájú és szerkezetű/dinamikájú molekula (gén) továbbörökítését engedték meg. Ennek következmé-

** Protomernek nevezzük a filamentumba már beépült aktin monomert.

nyeként, az adott feladatra specializálódás miatt, egy-egy izoforma élettani folyamatokból való kiesése elváltozásokat, illetve hiányos működést, esetleg a kapcsolódó funkció teljes kiesését okozza, ami többnyire végzetes az élőlény számára^{48, 49}. A nem-, vagy csak szemikonzervatív aminosavak nem feltétlenül szerep nélküli pozíciókat jelölnek, sőt számos csoportban az aminosavcserének igenis fontos funkciót tulajdoníthatunk az eltérő feladatok ellátásában. Tehát a létező izoformák nem csak „életképes” mutációk, hanem célspecifikus eszközök, melyek együttes jelenléte és összehangolt munkája szükséges a sejt-, szövet-, szervfunkciók megfelelő ellátásához⁵⁰.

Az emlősökben előforduló aktin 6 izoformája kétdimenziós gélelektroforézises elválasztás alapján 3 csoportba sorolható, amelyek izoelektromos pontjukban^{††} eltérést mutatnak (α : $pI = 5,40$, β : $pI = 5,42$, γ : $pI = 5,44$)⁵¹. Az aktin izoformák leginkább a fehérje N-terminális végén található aminosavak közül néhányban térnek el egymástól. A hat izoforma közül a β -izoforma a nem-izom sejtekben, a $\gamma 1$ - általánosan a citoplazmában és a $\gamma 2$ - a bélfal simaizom izomsejtekben található meg, az α - izoformák pedig az izomsejtek fő izoformái. Ezen izoformák funkcionális és szerkezeti összehasonlítása a mai napig nem teljes.

Az α izoforma 375 aminosavat tartalmaz és a teljes aktin molekulacsalád mérete 367-380 aminosav között változik. Az aktint kódoló gén az evolúció során szinte változatlan formában maradt fenn. A nagyfokú konzervativizmusnak köszönhetően az eukariótákban megtalálható aktin izoformák közötti hasonlóság az aminosav összetétel szintjén minimum 85%.

Az α -izoformák között is megkülönböztetünk vázizom- (szkeletális-) és szívizom (kardiális-) α -aktin izoformákat, melyek az anatómiailag és élettanilag megkülönböztetett (harántcsikolt-) vázizomban, illetve szívizomban fordulnak elő.

Az elsőként feltérképezett aktin szekvencia Elzinga és csoportja munkájának eredménye, akik meghatározták a nyúl vázizmából kinyert molekula primer szerkezetét⁴⁰. Szintén ők határozták meg a szívizom α -aktin izoforma aminosav-szekvenciáját⁵².

A vázizom- α -aktin a leginkább kutatott és ezáltal a legjobban ismert izoforma, csak 4 aminosavban tér el a szívizom- α -aktin izoformától^{40, 53, 54}. Ezek a Met299Leu és Thr360Ser cserét, valamint két – sorrendjükben – felcserélt aminosavat jelentenek a 4. és 5. aminosavak helyén: $\text{Glu}^4\text{Asp}^5 \rightarrow \text{Asp}^4\text{Glu}^5$ (lásd: Függelék; 71. oldal)⁵⁵. Nagymértékű szerkezeti és fizikokémiai hasonlóságuk ellenére az aktin molekulák funkcionálisan és termodinamikai stabilitásuk terén eltérést mutatnak^{56, 57}. Számos irodalmi adat bizonyítja, hogy az eltérő izoformáknak funkcionálisan eltérő élettani szerep tulajdonítható^{50, 58-60}.

^{††} Izoelektromos pont (pI): az a pH érték, ahol a fehérje össztöltése nulla. A semlegesség miatt a gélelektroforézis során az adott pontról a molekula már nem mozog tovább.

IV.6. A szív és a vázizom szövetek összehasonlítása

A vázizomban a több sejt összeolvadásával létrejövő izomrostok nem ágaznak el, hosszuk a mm-estől a több cm-es tartományba esik. Határozott harántcsíkolatot mutat a szerkezetük. Minden rostot egy *plazmalemma*ból álló, ún. *szarkolemma* vesz körül. Ez a rész tartalmazza a motoros véglemezeket, ami a szövetet behálózó idegsejtek axonjainak beágyazódási és szinaptikus kapcsolati helye. Szintén itt találhatóak a Ca^{2+} -ionokat felhalmozó, majd azt idegi ingerület hatására a sejtplazmába ürítő endoplazmatikus retikulumok, valamint számos más funkciójú sejt szervecske.

A szívizom eltér mind a sima-, mind a harántcsíkolat vázizom szövetétől, de közelebb áll szerkezetileg az utóbbihoz. A különbség az eltérő erő kifejtési formának és más-más elvárásokhoz való adaptációnak köszönhető. A vázizom gyors, ritkán ismétlődő, nagy erejű összehúzó mozgásokat hozhat létre; a szívizom ugyan szintén nagy erejű, de viszonylag lassabb erő kifejtésű, és ugyanakkor rendszeres munkát végző izomszövet. A szövetben az izomsejtek nem képeznek többmagvú rostokat, valamint gyakran elágaznak. A vázizomtól eltérően a szívizom működését nem a motoros, hanem a vegetatív idegek szabályozzák. Míg a szkeletális izmok motoros beidegződése révén akár az izomnak csak egyes részegységei (néhány izomrost) is ingerelhetők, addig a szívizomzat „*mindent vagy semmit*” elven működve húzódik össze. Ennek oka az, hogy a szorosan összekapcsolódó sejtek között kiemelkedően nagyszámú („gap-junction”) kapcsolat áll fenn. Az ezáltal kialakuló gyors ingerületvezetés miatt a szívizom szövetet funkcionális szincíciumnak nevezzük.

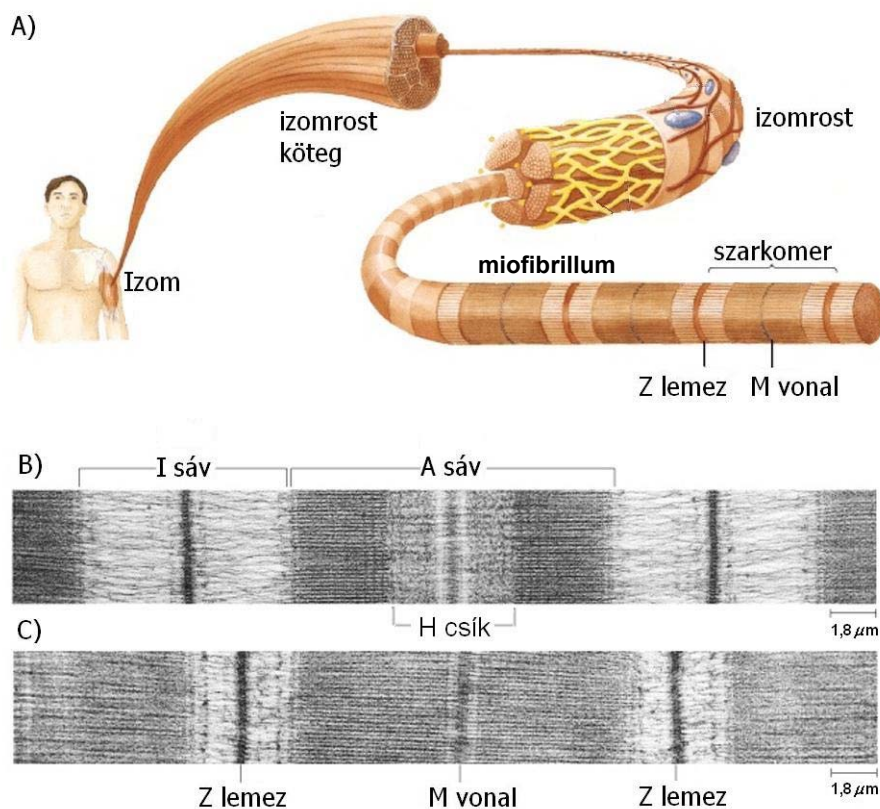
A két izomszövet sejtjeiben az egyes aktin izoformák nem egyforma mértékben vannak jelen. A vázizomban csak a vázizom- α -aktin izoforma található meg, míg a szívizomban a szívizom- α -aktin izoforma is jelen van. Számos korábbi vizsgálat kimutatta, hogy a szívben a vázizom- és szívizom izoformák mennyiségének aránya körülbelül 1:4^{60, 61}. Ettől az értéktől való eltérést mind az életkor, mind szív-, illetve érrendszeri betegségek, vagy bármilyen okból megnövekedett vérkeringési terhelés egyaránt okozhat.

Kizárólagosan szív- α -aktin izoformát tartalmazó acetone forgácsot (szívizomból) nem lehet készíteni, ezért a méréseink többségénél az izoformák elnevezés helyett a szívizom- és vázizom *eredetű* aktin megnevezés a helyes.

IV.7. Az izomműködés alapjai

Magasabb szerveződési szintet képviselő, többsejtű állatoknál az aktin és a hozzá kapcsolódó fehérjék speciális szerkezetet kialakítva lehetővé teszik az élőlény mozgását (vázizom). A vázizom által megvalósított mozgások szerkezeti egysége a *szarkomer*, amely a fénymikroszkópos technikákkal felismert harántcsíkolatot mutató izomszövet anatómiai egysége is egyben. A harántcsíkolat izomsejt felépítésére jellemző, hogy mioblasztok asszoci-

ációjából alakul ki. Az így létrejövő soksejtmagvú *szincícium* (illetve plazmódium) térfogatának nagy részét a kétféle filamentális rendszerből, a főként aktint tartalmazó ún. *vékony filamentumból* és a miozint tartalmazó ún. *vastag filamentumokból* álló *miofibrillumok* teszik ki.



5. ábra: Az izom anatómiai- és élettani felépítése:

(A) fáziskontraszt mikroszkópos képalkotás alapján. (B) relaxált (C) kontrahált állapotú szarkomerek. (forrás: <http://www.hik.hu/tankonyvtar/site/books/b107/ch02s03s01.html>)

E kétféle filamentumrendszer tagjai egymással párhuzamosan elrendeződve képezik a jól felismerhető csíkokat, amelyek a filamentumok, illetve a miofibrillumok tengelyére merőlegesen jelennek meg. A csíkozottság kialakulásáért elsősorban a kétféle filamentum eltérő törésmutatója, valamint a filamentumok egyes részeken való átfedése felelős. Az egyszeresen törő szakasz (*izotróp, I csík*) csak vékony filamentumot (döntően aktint), a kétszeresen törő szakasz (*anizotróp, A csík*) a két filamentum-típust átfedéssel, a *H csík* pedig csak a vastag filamentumokat (miozint) tartalmazza. Megkülönböztetjük még a *Z lemezt*, amely a szarkomerek határát és az *M csíkot*, ami a vastag filamentum miozinféjeket nem tartalmazó részét jelzi (5. ábra).

Viszonylag korán felismerték a kutatók azt, hogy az izomkontrakcióhoz mindkét filamentum együttes jelenléte szükséges. A felismert szerkezethez tartozó, a mai napig elfogadott működési modellt azonban csak az izomvizsgálatok megkezdése után jóval később,

1954-ben írták le^{28, 62}. A „*sliding filaments*”, azaz „*csúszó filamentumok*” elmélet szerint izomkontrakció esetén az aktint tartalmazó vékony- és a miozint tartalmazó vastag filamentumok egymás mellett elcsúsznak^{27, 28}. Így teszik lehetővé a szarkomer(ek) és ezáltal az izomsejtek összehúzódását anélkül, hogy az egyes filamentumok hossza változna. Az elcsúszás eredménye erő kifejtés, és/vagy elmozdulás lehet.

Nyugalmi állapotú izomszövetben a két filamentum csak kismértékben fedí át egymást, majd az összehúzódás során a két filamentum egymás mellett párhuzamosan elcsúszva és egyben növelve az átfedést csökkentik a két vékonyfilamentum köteg végéhez kapcsolódó Z-lemezek távolságát. Sok szarkomer egyidejű összehúzódása makroszkópikus izomösszehúzódást eredményezhet.

Az erő kifejtés energiát igényel, amit a rendelkezésre álló nagyenergiájú molekulák (ATP, kreatinfoszfát, glikogén) hidrolízise biztosít. Az izomműködés elsődleges energiaforrása az ATP. Ugyan az aktin is hidrolizál ATP-t miközben polimerizál, de ATP az aktivitásának nem tulajdonítunk jelentőséget az erő kifejtés szempontjából, vagyis az akto-miozin komplex fiziko-kémiai ciklusában és a munkavégzésben csak a miozin ATP bontása fontos. Nem feledkezhetünk meg azonban az (általunk is vizsgált) ATP-, illetve ADP-G aktinből polimerizált filamentumok eltérő tulajdonságain alapuló – feltételezhetően – eltérő affinitást mutató miozinnal, és ebből kiindulva az eltérő hatékonyságú akto-miozin komplexről. Ez az eltérés azonban az aktin filamentum előéletével és nem az akto-miozin komplex kémiai ciklusával kapcsolatos.

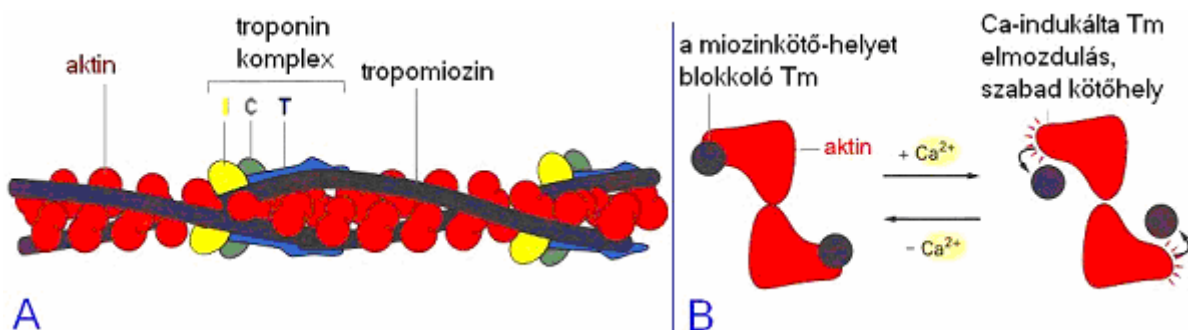
Az izomműködésben az aktin és a miozin mellett számos más fehérje (tropomiozin, troponin-komplex, titin) is részt vállal, de a filamentumok egymás melletti elcsúszását, illetve az azt segítő „megkapaszkodást” e két molekula sztereospecifikus kötése teszi lehetővé.

IV.8. Az izomműködés szabályozása

In vitro vizsgálataink során sem *tropomiozin* (Tm) sem *troponin* (Tn)-komplex nem volt jelen az oldatokban, tehát azok befolyásoló hatása nem bonyolította a mérési eredmények kiértékelését, de mégis fontos a szerepük említése. A harántcsíkolt izomban a kontrakció szabályozása főleg az aktin filamentum hozzáférhetőségének szabályozásán keresztül történik. Az aktin filamentum a tropomiozinnal és troponin-komplexszel együtt alkotja a vékony filamentumot (6. ábra).

A *Tn-komplex* három alegységből áll: *T*, *I* és *C*. Az első az aktin és a *Tm* egymáshoz viszonyított helyzetét határozza meg, összekötő kapcsot képezve közöttük. A *TnI* alegység inhibitor funkciója miatt kapta elnevezését; feladata Ca^{2+} -ionok hiánya esetén a miozin aktin filamentumhoz való kötődésének közvetett gátlása. A Ca^{2+} -ionok jelenlétét érzékeli a harmadik, kalmodulin típusú kalcium kötő fehérjecsaldába tartozó *TnC* alegység.

A *Tm* egy homo- vagy heterodimerből felépülő jobbmenetes spirált (alfa hélix) képező „coiled-coil” szerkezetű fehérje^{42, 63}, ami az aktin spirális filamentuma köré tekeredik és 7 aktin protomert fed le. Elhelyezkedése sokmindentől függ, de pontos fekvését elsősorban a Tn-komplex határozza meg.



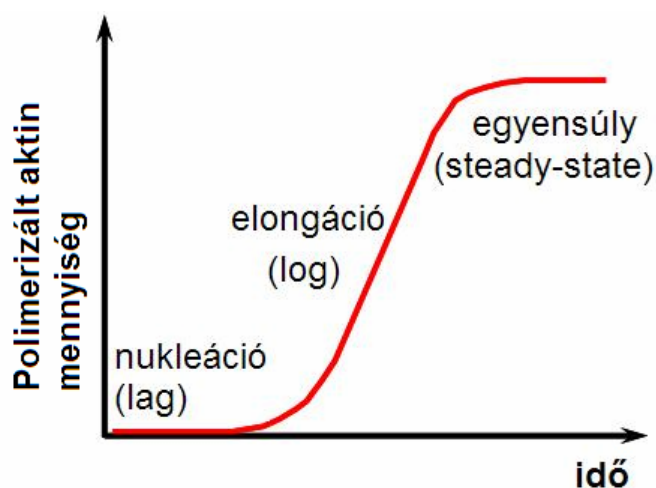
6. ábra: A vékony filamentum felépítése és szabályozó szerepe. Az aktin- (vékony-) és miozin- (vastag-) filamentumok kapcsolódásának szabályozását a troponin-komplex és a tropomiozin végzi. (forrás: <http://www.sci.u-szeged.hu/zoolcell/sbea/Figs/tropomio.gif>)

A McKillop és Geeves által kialakított⁶⁴ „háromállapotú dinamikus térbeli modell” alapján a *Tm* három pozíciót vehet fel: a) blokkolt, b) zárt és c) nyitott⁶⁵. A Ca^{2+} hatására módosuló *Tn-komplex* a tropomiozin helyzetét megváltoztatva teszi hozzáférhetővé a miozin fejek számára az aktin filamentum felszínét^{32, 66}.

A teljesség igénye nélkül megemlítem, hogy a Ca^{2+} -ion koncentráció is erős kontroll alatt áll. A szabályozó az izomszövetet behálózó idegvégződéseken keresztül érkező akciós potenciál, ami a sejtorganelumban felhalmozott Ca^{2+} -ion készlet sejt plazmába ürítését váltja ki.

IV.9. Aktin polimerizáció – a filamentum kialakulása

A filamentum kialakulása három fő lépésre osztható (7. ábra). Az első lépés a lassabb folyamat és így ez a polimerizáció gyorsaságának fő meghatározója a 1.) **nukleáció**, azaz a monomerek összekapcsolódása egy maggá, ami az 2.) **elongációt**, azaz a meghosszabbodást teszi lehetővé. Ezt követi a 3.) **dinamikus egyensúly** által meghatározott fázis. A nukleusz feltételezések szerint 2-3 monomerből áll⁶⁷, ami meghatározza és már magában hordozza a később kialakuló fila-



7. ábra: Aktin polimerizáció lépései. Nukleáció: „lag” fázis; elongáció: „log” fázis; egyensúly: „steady-state” fázis.

mentum szerkezetét, így a további monomerek már sokkal gyorsabban képesek a nukleuszhoz kapcsolódni.

A gyors elongációs folyamatnak két korlátozó tényezője van, egyrészt a rendelkezésre álló monomerek száma, másrészt az a tény, hogy a filamentumhoz nem csak kötődnek, hanem arról le is válnak monomerek. Végeredményben a monomer koncentráció (és egyéb feltételek közrejátszása mellett), valamint a disszociációs- és asszociációs fok következtében kialakul egy dinamikus egyensúly, amelynek beállta után a filamentum hossza nem változik.

A filamentumba beépülő és onnan disszociáló monomerek dinamikája a filamentum két végén nem azonos. A filamentum egyik végét szakállas- („barbed end”) míg a másikat szögös- („pointed end”) végnek is nevezzük⁶. Az utóbbira inkább a monomerek nettó leválása, az előbbire pedig inkább azok nettó kötődése jellemző, ezért ezt gyorsan növekedő végnek is nevezik. A hegyes végén a protomerek inkább ADP-t, a szakállas végén inkább ATP-t, illetve ADP·P_i-t kötnek.

Az ATP hidrolízis lassabb lehet ($0,02 \text{ s}^{-1}$)⁶⁸⁻⁷⁰, mint a szakállas végén mérhető monomer asszociációs sebesség ($2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), ezért ezen a végén ún. ATP (ill. ADP·P_i) sapka alakulhat ki. Ezeket az ATP-telített végeket jobban köti a miozin.

A *depolimerizáció* a polimerizáció, azaz a filamentum felépülésének ellentétes folyamata, ami többet jelent a már említett egyensúlyi folyamat hatására jelentkező, filamentum végi monomerek disszociációjánál. Ebben a folyamatban a filamentum akár teljesen leépülhet, monomerekre szétesve. Ezt az eseményt előidézhethi néhány környezeti feltétel nem megfelelő irányú változása, de a sejtben inkább az aktinkötő fehérjék által szabályozott idejű és mértékű depolimerizáció fordul elő.

IV.10. Környezeti paraméterek hatása

Az izomszövet(ek)ből preparált aktin dinamikai és szerkezeti tulajdonságai a környezet eltérő fiziko-kémiai tulajdonságainak hatására jelentősen megváltozhatnak. Nagymértékű flexibilitásbeli és szerkezeti különbségek mutathatók ki egyes esetekben az aktin monomerekben és filamentumokban egyaránt. Az aktin *in vivo* betöltött szerepében egyaránt fontosak annak statikus és dinamikai tulajdonságai. Az előbbi alapvető fontosságúnak tekinthető pl. az aktin filamentumok szerkezetére épülő statikus sejtszerkezeti rendszer kialakulásában. A fehérje dinamikai tulajdonságai, illetve a molekula struktúrájának megváltozása azonban a sejt működésében szintén jelentős szerepet tölt be. A változások fontosak az izom- ill. sejtműködés molekuláris szintjén megjelenő, a fiziológiás és patológiás körülmények esetén is az aktuális feladathoz való alkalmazkodás szempontjából – természetesen az aktin molekula tulajdonságai által meghatározott határok között. A változások, eltérések, hibás működések, illetve ezek okának megismerése fontos mind az

orvos-, mind az élettudományok számára.

A nukleotidok szempontjából, a kötött nukleotid formának is meghatározó szerepe van. Nem hanyagolható el azonban a H^+ -ionok koncentrációja sem. Az izomsejtekben a *pH* értéke 7,2-7,4 között változik fiziológias körülmények esetén. Minőségi szempontból az ionok között a kétértékű kationok (Ca^{2+} / Mg^{2+}) a legjelentősebbek, de az ionerősséget jelentősen befolyásoló K^+ -ion koncentrációja is fontos.

A különböző eredetű és különböző izoformájú aktinok egyes tulajdonságaikban különbözhetnek, például termodinamikai és mechanikai stabilitásuk, vagy polimerizációs jellemzőik tekintetében.

IV.10.1. A kationok szerepe

Az aktin képes mind egyértékű, mind kétértékű kationok kötésére⁴¹. A számos kötőhely közül a domének közötti zsebben található egy nagy affinitású kation-kötőhely, továbbá három kisebb affinitású kötő-régió is.

A kötött ionok meghatározzák a molekula fizikai tulajdonságait, és emiatt a környezet iontartalma, az összetevők minősége és mennyisége alapvető fontosságú⁷¹⁻⁷⁴. Az alacsony affinitású kötőhelyek nagyjából azonos mértékben kötik a különböző bivalens kationokat^{75, 76}. Ezzel szemben a magas affinitású kétértékű kationt kötő hely szelektív az ionok tekintetében; azok kötéserősségi sorrendje: $Ca^{2+} > Mg^{2+}$ ⁴⁴.

Az aktin molekula a sejten belül fiziológias körülmények között Mg^{2+} -ot köt⁷⁷. A jellemző ionkoncentrációk a citoplazmában: Mg^{2+} – 0,5 mM, Ca^{2+} – 0,1 μ M! A sejten található kalcium és magnézium koncentrációk miatt és méginkább a jelenlévő, polimerizációt befolyásoló aktinkötő fehérjék miatt az egyensúly a Mg^{2+} javára tolódik el. Az *in vivo* mérhető paraméterek egyik esetben sem feltétlenül egyeznek meg az *in vitro* körülmények esetén mért értékekkel, hiszen az aktin-kötő fehérjék módosíthatják azokat.

A Ca^{2+} -ról megállapították, hogy jobban stabilizálja az aktin monomert⁷⁸⁻⁸⁰, mint a Mg^{2+} -ion, tehát a laboratóriumi vizsgálatok számára Ca^{2+} -ot kötő formában állítják elő az aktint. Az általunk is használt aktin preparálási metódus végeredményeképpen monomer aktin állítható elő, mert kritikus koncentrációja Ca^{2+} jelenlétében körülbelül 10-szer nagyobb, mint azonos Mg^{2+} -ion koncentráció esetén. A Ca^{2+} -kötő aktin nukleációja nagyságrendekkel lassabb, mint a Mg^{2+} -kötőé, ellenben az elongációs sebességben nincs számottevő eltérés.

Az ioncsere hatására létrejövő szerkezeti változásokat EPR-rel és fluoreszcencia spektroszkópiával vizsgálva kimutatható volt, hogy Ca^{2+} -nak Mg^{2+} -ra történő cserélésekor az aktin monomerben a Cys³⁷⁴ aminosav körüli peptidszakasz merevebbé válik⁷⁸, ami a filamentum rigiditásának növekedésében is megnyilvánul. A polimer flexibilitásbeli változásának okai a protomerek struktúrájának és az inter-protomer kapcsolatoknak a változása^{72, 79}.

Az oldatok ionerőssége az alábbi egyenlet alapján határozható meg:

$$I = \frac{1}{2} \sum_i z_i^2 c_i \quad (1.)$$

ahol I az ionerősség, z_i az adott ion töltéseinek száma és c_i az adott ion koncentrációja.

IV.10.2. A nukleotidok szerepe

A monomer aktin ATP jelenlétében (A puffer) több mint egy hétig képes funkcionalitását megőrizni, azonban ADP-t kötő, de méginkább nukleotid-mentes környezetben hamar denaturálódik⁴⁴. Az aktin monomer a sejtekben ATP-t kötő formában kapcsolódik a filamentum gyorsan növekvő végéhez, majd további monomerek kapcsolódása miatt a korábban bekötött protomer halad a filamentum hosszanti tengelye mentén a hegyes vég felé. Az előrehaladás közben az aktin által kiváltott ATP hidrolízis következtében a β - és γ -foszfát közötti foszfoészter kötés felhasad. A keletkező ADP és szerves foszfát (P_i) a nukleotid-kötő zsebben az aktinhoz kötve marad egy ideig ($ADP \cdot P_i$ állapot), majd az inorganikus foszfát távozik először. A hidrolízis sebességi állandója 0,02 és 0,035 s⁻¹ értékek között mozog, míg a foszfát leválása 0,0026 és 0,006 s⁻¹ sebességi állandóval történik^{70, 81, 82}. Ennek következtében kiszámolható, hogy körülbelül 2 perces féléletidővel az ATP-G-aktinból asszociált filamentum ADP-F-aktinná alakul. Az újonnan bekötő ATP-monomerek miatt kialakulhat egy ATP-sapka, melynek hossza – az előbbieket mellett – a számos körülmény által befolyásolt asszociáció sebességétől függ. A továbbiakban ATP-F-aktin jelölés azt jelenti, hogy a kiindulási forma ATP-t kötő monomer. Nem a végeredményben kialakuló ADP-F-aktint jelöli, hiszen mindig az alakul ki, de fontos az eredet és kimutatható a különbség!

Figyelembe véve, hogy az aktin monomerekben a nukleotidok kicserélődése kb. 1000-szer olyan gyorsan megy végbe, mint az aktin filamentum protomerjeiben, ezért az ADP-ATP csere a depolimerizáció után, azaz a protomer leválását követően megy végbe^{44, 81}. Természetesen mind a nukleotidcsere-, mind a depolimerizáció sebességét számos egyéb tényező befolyásolja.

Fontos tudni, hogy az ATP hidrolízise nem szükséges lépés a polimerizációhoz, hiszen ADP-aktin is képes a polimerizációra^{83, 84}. Az ATP-t kötő monomerek esetén azonban nagyobb a polimerizáció sebessége, mint ADP-t kötő esetben. Az ATP-aktinból létrejövő filamentum számos fizikai tulajdonsága eltér az ADP-aktinból polimerizáltétól.

Az aktin filamentum működésében a különböző nukleotidkötő állapotoknak fontos szerepük van^{81, 85}. Míg az ATP forma egy stabil, rigidebb és inkább a filamentum meghosszabodását segítő forma, addig az ADP-kötés kevésbé rigid protomer térszerkezetet eredményez^{86, 87}, így a filamentum hajlékonyabbá válik és inkább a depolimerizációs leépülés

felé tolódik az egyensúly^{81, 83, 87, 88}. Megállapították, hogy nem a hidrolízis, hanem a szervetlen foszfát leválása tölti be a két állapot közötti kapcsoló szerepét, ennek hatására történik változás a filamentum dinamikai tulajdonságában⁸⁹. A filamentum nukleotidfüggő tulajdonságainak eltérésének alapja a röntgenkristallográfiás módszerrel is kimutatott monomerek térszerkezetének különbsége, ami elsősorban a 2-es szubdomén szerkezetében kialakuló különbségeken alapul^{10, 90} (lásd később).

Az ATP hidrolízisnek időjelző szerepe is van, hiszen a monomer ATP-t kötő formában kapcsolódik a filamentumhoz, majd ADP-G-aktinként távozik és a citoplazmában alakul vissza ATP-G-aktinná. A „treadmilling” (taposómalom) elmélet^{38, 91-93} alapján minden ciklus alatt egy aktin molekula egy ATP-t hasít, valamint a szakállas végen beépülő ATP-aktin monomerek a hegyes végről ADP-monomerként disszociálnak. Ezek alapján nem csak a monomer, de a filamentum életkorát is mutatja a protomerek nukleotid-kötő állapota, ami ezáltal az öregedés* jelzője. Az aktin a ciklusban csak egyirányban haladhat az ATP hidrolízis irreverzibilitása miatt, de az időbeli egyenirányítottság mellett térbeli irányítottságot – polarizáltságot – is eredményez az ATP-dús feji- és ADP-t tartalmazó farki vég kialakulása miatt.

IV.10.2.a. Az aktin ADP·P_i állapota

Az ADP·P_i állapotú F-aktinnak a kutatások alapján számos fizikai jellemzője azonos az ATP-F-aktin állapottal, de vannak attól eltérő tulajdonságai is. Az aktin viszonylag rövid ideig található ebben a formában, ezért vizsgálata sokszor nehézkes. A jelenleg használt mérési módszerek nem engednek rálátást az átmeneti állapotot jelentő „valós” ADP·P_i-F-aktin tulajdonságaira, másrészt a mérések többnyire erősen befolyásolják ezt állapotot. Ennek megfelelően csak mesterségesen előidézett formában lehet tanulmányozni. Ez az állapot előállítható P_i illetve foszfát-, vagy nukleotid analógok hozzáadásával.

A P_i egy ideig kötve marad a nukleotid zsebben az ADP-től függetlenül, majd disszociációja okoz *molekulaszerkezeti változásokat*⁸⁹. A legjelentősebb eredmény a nyitott/zárt állapot kristallográfiás módszerrel és elektronmikroszkóppal való megkülönböztetése az ADP/ATP (ill. ADP·P_i) -állapotoknak megfelelően^{94, 95}. Ezen kívül felismerték, hogy a nukleotidkötő zsebet körülölelő régiók térszerkezete változik, elsősorban a 2-es aldoméné.

A filamentum egészének mechanikai-, termodinamikai tulajdonságainak és élettani szerepének változása a szerkezeti változások következménye, az ATP hidrolízis után létrejövő rigidebb forma, a P_i-disszociáció után szerkezetileg visszaalakul⁹⁶.

A korábbi, statikus aktin filamentum modelltől elszakadva Isambert és Carlier kijelentette, hogy valószínűsíthető, hogy az ATP hidrolízis után létrejövő rigidebb forma,

* „Ageing”: az aktin filamentum és a beépült monomerek nukleotidkötő állapota alapján a filamentum öregedését jelenti.

majd a P_i -disszociáció utáni visszaalakulás felhasználható erőkifejtésre (mechanikai munkára). Tehát a *filamentum egészének mechanikai és termodinamikai tulajdonságainak és élettani szerepének változása* a szerkezeti változások következménye⁹⁶. Ez a kijelentés a mai napig nem igazolt, de az aktin filamentum nukleotidkötő állapotának és az akto-miozin komplex dinamikájának összefüggése egyre inkább nyilvánvalóvá válik.

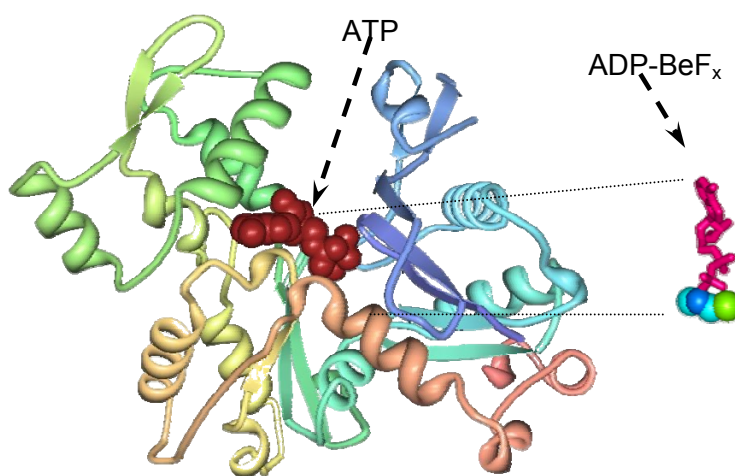
Az aktin filamentum $ADP \cdot P_i$ állapotának vizsgálatához méréseink során a fent említett módszerek közül a nukleotid analógok használatát választottuk.

IV.10.2.b. Nukleotid analógok

A *berillium-* és az *alumínium-fluorid komplexek* szerkezeti analógjai és egyben kompetítorai az *anorganikus foszfátnak*, nagy (mikromoláris⁴⁴) affinitással, 1:1 sztöchiometriai arányban kapcsolódnak az ADP -F-aktinhoz⁹⁷. Az ADP -vel komplexet képezve az aktin nukleotidkötő zsebében pedig az $ADP \cdot P_i$ állapot *nukleotid analógjainak* tekinthetők. Az oldatban előforduló $BeF_2(OH)^- \cdot H_2O$ és $BeF_3^- \cdot H_2O$ komplexek aránya nem meghatározható, emiatt és a szakirodalomban való elterjedtsége miatt, a továbbiakban alkalmazott BeF_x jelölés a két forma együttes előfordulására utal. Az alumínium egyértelműen az AlF_4^- formát hozza létre az oldatban fluorid-ionok jelenlétében.

Számos kutatólaboratóriumban, különböző módszerekkel kimutatták, hogy a BeF_x befolyásolja az F-aktin háromdimenziós szerkezetét és konformációs változásokat idéz elő az aktin molekulában az 1-es és 2-es régió struktúrájának megváltoztatásával, miközben beköt a nukleotidkötő zsebbe (8. ábra). Kimutatható mind a $(Mg^{2+})ADP$ -G-, mind a $(Mg^{2+})ADP$ -F-aktin proteolitikus emészthetőségében a változás berillium fluorid jelenlétében⁹⁸.

Mühl-rád kutatócsoportja kimutatta a nukleotid analóg hatás kooperatív terjedését a filamentum mentén, akár 1:14 molarányú aktin protomer : nukleotid analóg koncentráció esetén. Feltételezések szerint a szerkezeti változás eredményeképpen az $ADP \cdot P_i$ átmeneti állapothoz – általánosan elfogadottan – hasonló szerkezetű és fizikai tulajdonságú



8. ábra: Aktin monomer szalagdiagramja: ATP-vel a nukleotidkötő zsebben (Protein Data Bank: 1NWK), illetve az $ADP \cdot P_i$ analóg $ADP \cdot BeF_x$ komplexszel (PDB: 4UKD). A nukleotid analóg az ATP helyére köt a két domén közötti zsebben.

aktin filamentum alakul ki az említett ionos komplexek hatására.

Akár a polimerizáció előtt, akár a polimerizáció után adjuk az analógot az ADP-aktinhoz, a filamentumot tartósan az ADP·P_i állapotban tartja. A foszfát analógok alkalmazásával tehát lehetőség nyílik arra, hogy ezt a konformációs állapotot szimuláló formában vizsgálhassuk az aktint.

IV.10.3. A toxinok szerepe

Az fehérjékhez kötődő toxinok mérgező tulajdonságuk ellenére hasznos vegyületek is lehetnek gondosan megtervezett és kivitelezett, általános vagy lokális alkalmazás esetén. Sok kutató ezek között véli megtalálni számos betegség ellenszerét. Orvosi alkalmazása mellett azonban, fluoreszcens módosulatuk mikroszkópiás vizsgálatokban hasznos információkat szolgáltat, mind a toxin hatásmechanizmusáról, mind az esetlegesen kiiktatott – olykor életfontosságú – sejtműködési folyamatról.

Kétféle csoportba lehet osztani a mérgeket aszerint, hogy a filamentum kialakulására és stabilitására pozitív (polimerizációt fokozó, szerkezeti stabilitást növelő), vagy negatív (aggregációt segítő, vagy destabilizáló) módon hatnak. A citoszkeleton működőképessége szempontjából mindkét eset végzetes lehet.

Ezen tanulmány az ismertebb falloidin és a rákos daganatok elleni harcban ígéretesebbnek tartott jasplakinolid hatását mutatja be. Mindkettőről elmondható, hogy nagy affinitással kötődik az aktin filamentumhoz és egyben stabilizálja annak szerkezetét. Növelik a polimerizációs sebességet, meggátolják a monomerek disszociációját, ezáltal a taposómalom ciklikus folyamatából kivonják a már kötött molekulákat. A két toxin kompetitora egymásnak az aktinhoz való kötésben, mert kötőhelyük azonos⁹⁹. A hasonlóságok mellett azonban vannak eltérések is a hatásmechanizmusukban. Az aktinhálózat szerkezetének, dinamikájának és megújulásának korlátozása miatt toxikusak a sejtek számára, de mégis fontos információkhoz juttathatnak akár *in vivo*, akár *in vitro* vizsgálatokban alkalmazzuk ezeket.

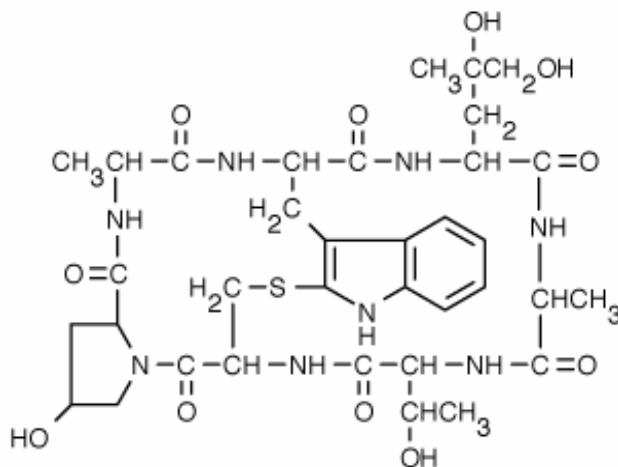
IV.10.3.a. Falloidin

A falloidin (9. ábra) a fallotoxinok családjába tartozó, 7 aminosavból álló bi-ciklikus polipeptid¹⁰⁰⁻¹⁰², a *Bazidio-mycetes* családba tartozó gyilkos galóca (*Amanita phalloides*) terméke^{103, 104}.

Sejtméreg, ami a citoszkeleton szerkezetét rombolja azáltal, hogy működésképtelen aktin filamentum aggregációkat hoz létre¹⁰⁵. A toxin nagy affinitással ($K_d = 30-36$ nM) kötődik az F-aktinhoz^{103, 106, 107}, viszont nem kötődik az aktin monomerekhez. Már kis arányú jelenléte esetén is stabilizálja az aktin filamentumokat^{108, 109}, aminek következménye a kritikus koncentráció értékének drasztikus csökkenése (maximális telítettség mellett; 20 nM-

os értékig). A falloidin gyorsítja a nukleáció és a polimerizáció folyamatát¹¹⁰⁻¹¹³. Sztöchiometriáját tekintve az eltérő számértékeket feltüntető szakirodalomból úgy tűnik, hogy az 1:1 falloidin molekula és aktin protomer kötési arány felel meg a valóságnak¹¹⁴.

A falloidin kötőhelye a két szomszédos protomer közötti résben található¹¹⁵⁻¹¹⁷. Hidat képez a protomerek között ott, ahol a legtöbb aktin-kötő fehérjének nincs kötőfelszíne, tehát azok működését nem befolyásolja, de stabilizálja az α -hélix szerkezetet. A fenti okok miatt, a toxin fluoreszcens emisszióra alkalmas változatait előszeretettel alkalmazzák spektroszkópiái, de még inkább mikroszkópiái vizsgálatoknál. *In vivo*, sejtekben való használatához a sejtben való expresszálas, vagy a mikroinjektálás technikáját alkalmazzák, ugyanis nem képes a sejtmembránon átjutni. Számos kutatócsoport többféle mérés technikához alkalmazta és alkalmazza, hogy az aktin polimerizációs folyamatát gyorsítsák, vagy a filamentum szerkezetét stabilizálják^{107, 108, 115, 116, 118-125}.



9. ábra: A falloidin szerkezeti képlete. Molekula képlete: Ala¹-D-Thr²-Cys³-cis-4-hidroxi-Pro⁴-Ala⁵-2-merkapto-Trp⁶-(OH)₂Leu⁷ (Cys³-Trp⁶ tioéter keresztkötéssel, ami a kettős gyűrűs szerkezetet létrehozza).

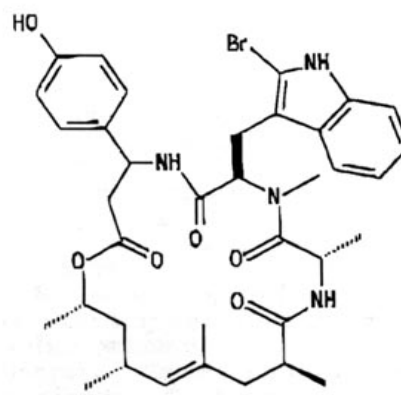
(forrás: <http://en.wikipedia.org>)

A toxicitás szempontjából a 3-6. aminosavak jelenléte, valamint a Cys³ kiralitása fontos, az F-aktinhoz kötés szempontjából pedig a tioéter kötés és a Thr² jelenléte kiemelkedő. Az első és utolsó aminosav oldalláncának jelentősége elenyésző, így pl. a molekula fluorofórrá alakításához ezek módosíthatók¹²⁶.

IV.10.3.b. Jasplakinolid

A jasplakinolid a falloidinre számos tulajdonságában és működésében is hasonlító molekula, aktin filamentumot stabilizáló¹⁰⁹ és polimerizációt serkentő^{99, 127} a *Jaspis johnstoni* tengeri szivacs-fajban előforduló citotoxikus hatású ciklikus peptid (10. ábra). Szintén nagy affinitással ($K_d = 15$ nM) köt az aktin filamentumhoz és sztöchiometriája is azonos. A falloidinnal ellentétben a nukleációt is serkenti^{99, 127}.

1986-os felfedezése óta¹²⁸ számos kutatócsoport



10. ábra: Jasplakinolid molekula szerkezeti képlete.

(forrás: <http://en.wikipedia.org>)

alkalmazta vizsgálataihoz^{129, 130}. Hatása koncentráció- és időfüggő továbbá reverzibilisen visszaalakítható. Közepes koncentrációkon (150 nM) a kortikális aktin hálózatot módosítja, illetve sejtmag körüli aktin filamentum aggregációt indukál, magasabb koncentráción (200 nM felett) a teljes aktin filamentumrendszer természetes térbeli elrendeződésének felbomlását eredményezi¹³⁰.

Számos rákos sejtben, például humán prosztatata-¹³¹ és emlőrák¹³² esetén citotoxikus hatást mutatott, ezért rákellenes szerként alkalmazták. A jasplakinolid számára a sejtmembrán átjárható, emiatt használatakor nem szükséges a sejt egységét (integritását) felborító permeabilizálást alkalmazni. Ez a tulajdonsága előnyt jelent az *in vivo* kísérletekben. Fluoreszcens származékainak előállítására a mai napig kutatások- és kísérletek tárgya, széleskörű alkalmazásra adna lehetőséget.

V. CÉLKITŰZÉSEK

Vizsgálataim során az elsődleges cél az aktin molekula és dinamikájának alaposabb megismerése volt, s bár a miozinnal alkotott komplexét is vizsgáltuk, ebben az esetben is inkább az aktin oldaláról tekintettünk a problémára, szemben az irodalomban már megalapozott miozin-központú vizsgálatokkal. Az aktin és miozin kölcsönhatásának számos paraméterét megvizsgáltuk a különböző (szív-, vázizom szövet) eredetű aktin és miozin-S1 segítségével.

Nagyon sokáig az aktin, illetve a vékony filamentumot csak statikus elemnek tekintették a miozin filamentum mellett. Nem tulajdonítottak neki nagyobb szerepet, mint kapaszkodó rúd, vagy esetleg kötél, ami mentén a munkavégző egység – azaz motor – a miozin elmozdul. Valójában a miozin nyaki régiójának szerkezetváltozása az aktin filamentumok elmozdulását eredményezi a statikus helyzetűnek tekinthető miozin filamentumokkal párhuzamosan. Mára azonban kialakult az a nézet, hogy az aktin molekula nem statikus szerkezetű, ezáltal a filamentum is dinamikusan változhat. Ennek a változékonyságnak a citoskeletális rendszerben, valamint az izomkontrakcióban betöltött szerepére egyre több hipotézis születik és az egyes szerkezeti állapotok megismerésén keresztül eljuthatunk egy a mainál tökéletesebb modell megalkotásához.

Ennek megfelelően vizsgálataink középpontjában az egyes aktin izoformák különböző környezeti feltételek mellett kialakuló szerkezeti eltéréseinek és azonosságainak megismerése állt. Az aktin molekula polimerizációs dinamikájába engedett betekintést a polimerizációs teszt használata. A molekulászerkezet eltérését és kémiai ágensok hatására létrejövő változását kalorimetriával, a miozinnal való kölcsönhatást pedig „stopped-flow” technikával vizsgáltuk. Ugyan az alkalmazott módszerek nem atomi szintű, hanem molekuláris szintű vizsgálatokra alkalmasak, de más technikákkal kiegészítve képesek a molekulastruktúra változásainak kimutatására. A statisztikai alapon működő, globális analízisre alkalmas kalorimetria kellő érzékenységű műszer esetén is legfeljebb domén szintű eltérések kimutatásához megfelelő, ugyanakkor a spektroszkópiai oldalról alaposan kivizsgált környezeti hatások termodinamikai leírása sok esetben még nem volt ismert. Ezt a hiányosságot igyekeztünk pótolni és termodinamikai oldalról is megtámogatni, vagy megkérdőjelezni a korábbi elméleteket. Az általunk kitűzött célok eléréséhez a használt technikák hasznosnak és elegendőnek bizonyultak.

Célunk volt vázizom- és szívizom eredetű szövetekből preparált aktin(ok) vizsgálata, azok szövetspecifikus eltéréseinek, illetve homológián alapuló azonosságainak megismerése érdekében.

Az egyes izoformák tulajdonságai közül az alábbiak megvizsgálását tűztük ki célul:

1. *Az ionerősség hatása, valamint a már ismert, eltérő affinitással kötő, kétértékű kationok (Mg^{2+}/Ca^{2+}) hatása.*

2. *A pH hatása.*

A fehérjékre ható mikrokörnyezeti feltételek egyik legismertebb tényezője a H^+ -ionok koncentrációja.

3. *A nukleotidok és nukleotid analógok hatása.*

Az aktin ATPáz aktivitással rendelkezik. Az ATP hasítására bekövetkező dinamikai és strukturális változások még nem teljes mértékben ismertek és a változások szerepköre sem pontosan meghatározott mind a mai napig. Munkánk során célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk az ATPáz ciklus köztes állapotának – az $ADP \cdot P_i$ állapotnak – tulajdonságait, illetve az azt mimikáló nukleotid analógok (BeF_x - és $AlF_4 \cdot ADP$) hatását.

Célunk volt különböző, az akto-miozin komplex kapcsolatát jellemző kinetikai paraméter meghatározása a vázizomból és szívizomból preparált S1 és a különböző aktin izoformák jelenlétében:

4. *Az akto-miozin komplex dinamikáját jellemző paraméterek meghatározása („stopped flow” technikával)*

5. *Miozin-S1 ATPáz aktivitásának, valamint az aktin által kifejtett aktiváló hatás vizsgálata.*

Célul tűztük ki a szerkezetmódosító toxinok jelenlétében és hiányában tapasztalt eltérések összehasonlítását és értelmezését:

6. *Toxinok egyedi hatása.*

Az aktin molekulához kötődő toxinok – habár mesterséges állapotot idéznek elő – segítséget nyújtanak az aktin szerkezeti tulajdonságainak és funkciójának közvetett módon való megismerésében.

7. *Toxinok és nukleotid analógok együttes hatása.*

Feladatul tűztük ki az előbbi szempontok kiegészítéseként, hogy megvizsgáljuk a nukleotid analógok és toxinok közös hatását a térszerkezetre termodinamikai jellemzőik összehasonlítása révén.

VI. ANYAGOK és AKTIN PREPARÁLÁS

VI.1. Anyagok, vegyszerek

A használt anyagok listáját a *Rövidítések* fejezet tartalmazza.

VI.2. Alkalmazott pufferek

A pufferanyag a kalorimetriás vizsgálatok esetén pH 7,4 felett MOPS, míg pH 7,4 alatt és más vizsgálatok esetén TRIS (HCl) volt. MOPS (NaOH) puffer használatát annak nagyobb mértékű – hőmérsékletváltozással szemben mutatott – pH stabilitása indokolta, ami a kalorimetriás méréseknél jelentős: TRIS-nél $\Delta pK/^\circ C = -0,031$, míg MOPS esetén $-0,006$.

A mérések során alkalmazott pH értékek 6,9 / 7,4 / 8,0 voltak, amelyek közül a középső érték felel meg a fiziológiás értéknek (7,3-7,4). Az alacsony pH például patológiás esetekben fordulhat elő. TRIS puffert használtunk a $pH = 6,9-8,0$ tartományban általános célokra, vagy MOPS alapú puffert a $pH = 7,4-8,0$ tartományban a kalorimetriás mérésekhez.

Az aktin preparálás utolsó lépéseként a preparátumot *A pufferben* (2 mM TRIS vagy MOPS puffer, 0,2 mM ATP; 0,1 mM $CaCl_2$; 0,5 mM MEA; 0,005 m/v% NaN_3) dializáltuk egy éjszakán (10-12 óra) át. Az aktin polimerizációja előtt az ioncserét az *M puffer* biztosította (4 mM TRIS/HCl; 0,3 mM $MgCl_2$; 2 mM EGTA), minimum 5 perces inkubációs idő mellett. A polimerizációt a *B pufferrel* indítottuk el (lásd alább), vázizom esetén 2 óra, szívizom esetén 3 óra a polimerizációs idő).

A vizsgálatok során a sókoncentráció szempontjából alacsony-, közepes- és magas sókoncentrációt különböztetünk meg (adott *B pufferrel* beállított végkoncentráció értékek):

Magas sókoncentráció (fiziológiás):

2 mM $MgCl_2$; 100 mM KCl;

Alacsony sókoncentráció:

0,5 mM $MgCl_2$; 10 mM KCl;

A *B puffer* további tartalma: 4 mM TRIS, vagy MOPS puffer. Tartalmazhat még 0,2 mM ATP, 0,5 mM MEA és 0,005 m/v% nátrium-azid végkoncentrációhoz szükséges koncentrációban az említett anyagokat, de ezek jelenléte csak kivételes esetekben indokolt.

VI.3. Aktin preparálás izomszövetből

Az aktin kivonás Feuer és csoportja³ által előírt lépéseit követve készítettük el az acetonnal extrahált izomforgácsot. Az izolálás lépéseit először Straub² adta meg, mi a Spudich és Watt²⁵ által továbbfejlesztett változatot használtuk minden preparáláskor. A feltárás és elkülönítés szempontjából mindkét – általunk vizsgált – izoforma azonosnak tekinthető, ezért ugyanazzal a módszerrel vontuk ki a megfelelő szövetekből. Az aktin preparálás egyik forrása a házi nyúl hátizma a másik forrás pedig szarvasmarha szív volt.

Az aktin preparálása minden esetben két lépésben történt:

Először elkészítettük az acetonforgácsot³, és az aktint a mérést megelőzően ebben a formában tároltuk. Második lépésben az aktin molekula többi összetevőtől való izolálása – tisztítása – és koncentrációja történt. E két lépés során távolítottuk el az aktint kötő miozint, majd a tropomiozint.

Munkánk során az aktin preparálások egyik kiindulási szerve a nyúl hátizma (*Orictolagus cuniculus*, *musculus psoas*) a másik forrás pedig szarvasmarha szív (*Bos taurus*, *cor.*) volt. A szív teljes egészére az izoformák korábban említett aránya nem állandó, ezért a vázizom izoformát nagyobb mennyiségben tartalmazó *pitvar és aorta* részeket leválasztottuk. Mindkét forrás kiválasztásában szerepet játszott, hogy az adott állatokból preparált aktinok régóta használtak és számos kutatócsoport által alaposan jellemzettek, de legfőbb érv az azonos humán izoforma-típusokkal való teljes szekvenciális azonosság volt (IV.5. és XI. fejezet).

VI.4. Kétértékű ionok cseréje

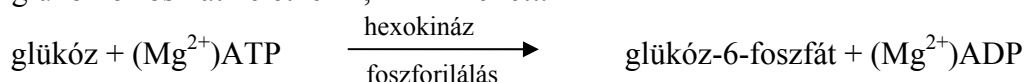
Az A-puffer összetétele miatt a preparálás végén az aktin monomerek formájában, ATP-t és Ca^{2+} -ot kötve fordul elő az oldatban (Ca^{2+} -ATP-G-aktin). Az esetek többségében a vizsgálatokhoz nem kalcium, hanem magnézium-kötő formát használtunk, a fiziológiásan előforduló Mg^{2+} -aktin miatt. A szükséges $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ioncserét 5 percig *M-pufferrel* szobahőmérsékleten inkubálva értük el¹³³. A puffer hatásának lényege az, hogy a Ca^{2+} -ionokat megköti a benne található EGTA. Az aktinnak szükséges a kétértékű ion jelenléte, ezért a puffer tartalmaz Mg^{2+} -iont is. A előzőektől nagymértékben eltérő mérési feltételek esetén a mérés előtt a mintát közvetlenül a kívánt körülményeknek megfelelő pufferben 1 éjszakán át (10-12 óra) dializáltuk.

VI.5. ADP-aktin előállítása

Az A-pufferben lévő G-aktin ATP-t köt. A nukleotid ADP-re való cseréjéhez az aktin oldatot ATP-mentes A-pufferben 6 órán keresztül dializáltuk. Az ATP ADP-vé átalakítását a

mérés előtt eppendorf csőben, vagy küvettában összeállított aktin oldathoz 1,65 mg/ml hexokinázt, 0,5 mg/ml glükózt és 1 mM ADP-t hozzáadva 1 óra hosszan, 4 °C-on való inkubálás mellett végeztük. ADP-F-aktin előállításához a szükséges sókoncentráció és egyéb paraméterek beállítása mellett a mintát 12 órán keresztül polimerizáltuk. Ez az idő elégségesnek tekinthető, hogy az esetlegesen az oldatban maradt-, illetve aktinhoz kötött ATP molekulák ADP-vé hidrolizáljanak. Végeredményben, az oldatban már nem található ATP és így a disszociáló ADP helyére csak egy másik ADP molekula tud bekötni.

Az ATP hasítást a hexokináz enzim végzi; amely a lehasított P_i-t a szubsztrátjához köti, így glükóz-6-foszfát keletkezik, ADP mellett.



VI.6. Pirén-jelölt G-aktin előállítása

Pirén-jódacetamid (pirén) jelöléshez a G-aktint 1 mg/ml-es koncentrációra hígítva magas sókoncentrációs (100 mM KCl, 2 mM MgCl₂) körülmények között a vázizom eredetű aktint 2 órán keresztül, a szívizom eredetűt 3 órán át polimerizáltuk szobahőmérsékleten. A kialakult 1 mg/ml-es F-aktin oldathoz az 1 mg/ml 1,1-1,2 százalékának (0,0011-0,0012 mg/ml) megfelelő koncentráció beállításához szükséges pirén törzsoldat mennyiséget hozzáadtuk. Annak hozzáadásától számított 18 órán keresztül, szobahőmérsékleten, fénytől elzárva, állandó, lassú keverés mellett inkubáltuk. A DMF-ben oldott jelölő törzsoldatának koncentrációja 5 mg/ml volt. A jelölést követően a mintát 400000 g-n, 4 °C-on, 45 percen keresztül centrifugáltuk, majd az üledéket 1-2 ml A pufferben-oldatban 1 órán keresztül duzzasztottuk. A mintákat ezután homogenizáltuk, majd éjszakán át az aktin oldat térfogatának minimum 200-szorosának megfelelő mennyiségű A pufferben dializáltuk, ezáltal biztosítottuk a be nem kötött pirén molekulák dializációját az aktin mellől és így minimálisra csökkentettük az oldatban található szabad pirén molekulák fotometriás zavaró hatását. A mintákat a tisztítás miatt egy utolsó, felhasználás előtti 400000 g-s, 30 perces centrifugálásnak vetettük alá 4 °C-on, amiből a G-aktint tartalmazó felülúszót használtuk fel. A centrifugálást Beckman Coulter OPTIMA MAX asztali ultracentrifugával (GVOP-3.2.1.-2004-04-0190/3.0) végeztük.

A polimerizációs teszteknel használt 5%-os jelölési arányt úgy érhetjük el, hogy a preparált aktin-oldatunk egy részét nem jelöljük meg pirénnel. Megfelelő arányban összekeverve a jelölt és jelöletlen G-aktin oldatunkat elérhetjük, hogy az oldatban az összaktin mennyiségének csak az 5%-a legyen jelölt. Az összemérendő mennyiségek kiszámításakor figyelembe kell venni azt, hogy a nem 100%-os jelölési arányú törzsoldat tartalmaz jelöletlen aktin monomereket is.

VII. VIZSGÁLATI ÉS MÉRÉSTECHNIKÁK

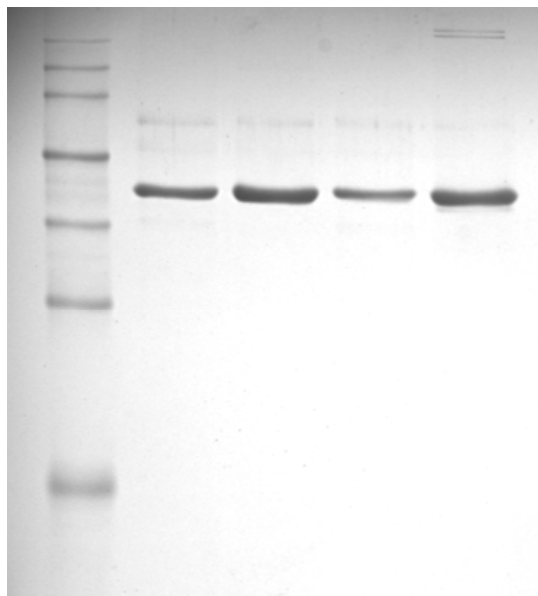
A természetben, a fehérjékkel végbemenő folyamatok valamint azok belső szerkezetének változása meghatározott törvényszerűségek szerint zajlik. Ezekről a folyamatokról többféle módszerrel nyerhetünk információt, de mindegyik technika csak bizonyos mélységig enged betekintést, illetve a technika alapos ismeretére van szükség, hogy az általa nyert adatokat információvá alakíthassuk, értelmezni tudjuk.

VII.1. Gél-elektroforézis

Az aktin preparátumok tisztaságát gél-elektroforetikus eljárással vizsgáltuk meg. A fehérjék elkülönítésére és így az aktin preparátum tisztaságának ellenőrzésére – többek között – nátrium-dodecilsulfátos poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE) használható. A technika kivitelezésének lényege, hogy a fehérjét főzéssel *denaturálva*, elektromos térerősség hatására egy adott közegben futtatjuk és így az eltérő mobilitású komponensek szeparálódnak (11. ábra).

A fehérjefrakciók elektrolitoldattal telített poliakrilamid gélben (PAG), elektromos térerő hatására különböző sebességgel vándorolva elkülönülnek egymástól. A PAG olyan térhálós szerkezetű polimer, amelynek rácsmérete tág határokon belül állítható a polimer alkotásában résztvevő akrilamid és a bisz-akrilamid koncentrációjának alapos megválasztásával. Az akrilamid koncentrációjának növelésével a keresztkötések száma növekszik, ezáltal a térháló sűrűbbé válik, ennek következtében méret szerint jobban elkülönülnek a molekulák. Az így elért nagyobb feloldás pontosabb fehérjeazonosítást eredményez.

A denaturálás előtt a *Laemmlí puffert* alkalmaztunk, majd futtatás után a festéshez coumassi blue oldatot használtunk. A Coumassie kézzel való festés után a gélből kioldottuk a fehérjéhez nem kötődő festéket és így szabad szemmel is látható módon szeparálódnak az egyes fehérje komponensek. Az adatrögzítés és kiértékelés fényel való megvilágítás mellett felvett elektroforetikus fotókkal (11. ábra) történt.



11. ábra: Aktin SDS-PAGE gélelektroforézis eredménye. A baloldalon a marker, mellette vész- és szív eredetű aktin kétféle mennyiségben (2-2). A marker lentől felfelé: 15, 25, 35, 50, 75, 100, 150 kDa molekulatömeg.

VII.2. Spektrofotometria

VII.2.1. A koncentrációk meghatározása

Minden fotometriai mérés során az alapvonal felvételhez, azaz a viszonyítási értékek meghatározásához az adott minta fehérjét nem tartalmazó puffer-oldatát használtuk. A kísérletek előkészítéséhez az aktinnak, illetve annak fluoreszcens markerrel való jelölési arányának és az aktin, illetve miozin ATPáz aktivitásának meghatározásához Shimadzu UV-2100 típusú spektrofotométert használtunk.

A meghatározások a Lambert-Beer törvény alkalmazásával történtek, a híg oldatokra való érvényességi megkötés szigorú figyelembevételével:

$$\lg \frac{I_0}{I} = A = OD = \varepsilon_{(\lambda)} \cdot c \cdot x \quad (2.)$$

Ahol az I_0 az oldatot megvilágító-, I pedig a mintából kilépő fénynyaláb intenzitása. Az A az abszorbanciát, vagy az azzal azonos optikai denzitást (OD), $\varepsilon_{(\lambda)}$ a hullámhossztól függő extinkciós koefficiens, c az oldott anyag – pl. aktin – koncentrációját, x pedig a fény oldatban megtett optikai úthosszát jelenti. Ez utóbbi esetünkben mindig 1 cm-t jelentett a rendelkezésünkre álló kvarcküvetta mérete miatt.

Az aktin bármely előfordulási formájában meghatározható a koncentráció az előbbi egyenlet átrendezésével. Figyelembe véve, hogy melyik forma (G / F) melyik hullámhosszához tartozó OD és ε értékkel

$$\text{dolgozunk: } c_{aktin} = \frac{OD_{\lambda}}{\varepsilon_{\lambda}}.$$

Az F-aktin koncentrációját úgy adjuk meg, hogy a kiindulási G-aktin koncentrációjával egyezik meg, tehát nem a kialakult filamentumok számától, hanem azok építőelemeitől a monomerektől függ (1. táblázat).

Fluoreszcencián alapuló (fluorimetriás) vizsgálatokhoz pirént használunk, mint külső fluorofór jelölő. A jelölt mintát alkalmaztuk a „stopped-flow” és a polimerizációs méréseknél. Az aktinban található aromás aminosavak által meghatározott ε érték (adott hullámhosszon),

1. táblázat: a koncentrációk meghatározásához szükséges extinkciós koefficiensek. Az aktin esetén a moláris koncentráció számításnál 1 mg/ml 23 μM -nak felel meg. Ref: irodalmi referenciák.

megnevezés	hullámhossz (nm)	jelölés	érték ($\text{ml} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)	ref
G-aktin	280	ε_{280}^G	1,11	134
G-aktin	290	ε_{290}^G	0,63	134
F-aktin	280	ε_{280}	1,17	134
F-aktin	290	ε_{290}	0,66	134
Pirén	344	$\varepsilon_{344}^{\text{pirén}}$	$1/45 \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$	135

valamint a jelölőre jellemző hullámhosszhoz tartozó ε értékek alapján mindkettő koncentrációja meghatározható. A pirénnel jelölt aktin oldat *aktin koncentráció*jának meghatározása:

$$c_{aktin} = \frac{OD_{290} - 0,127 \cdot OD_{344}}{\varepsilon_{290}}$$

Az aktinnál figyelembe kell venni, hogy a jelölőnek is van abszorpciós járuléka az adott hullámhosszon, innen származik a korrekciós faktor. Az aktinhoz kötött *pirén koncentráció*jának kiszámítása az alábbi egyenlet alapján történik:

$$c_{pirén} = \frac{OD_{344}}{\varepsilon_{344}^{pirén}}$$

A kapott értékek alapján egyszerű aránypárral meghatározható a jelölés hatékonysága, azaz a jelölési arány ($c_{pirén} / c_{aktin} \cdot 100\%$).

VII.2.2. A pirén-aktin gerjesztési és emissziós spektruma

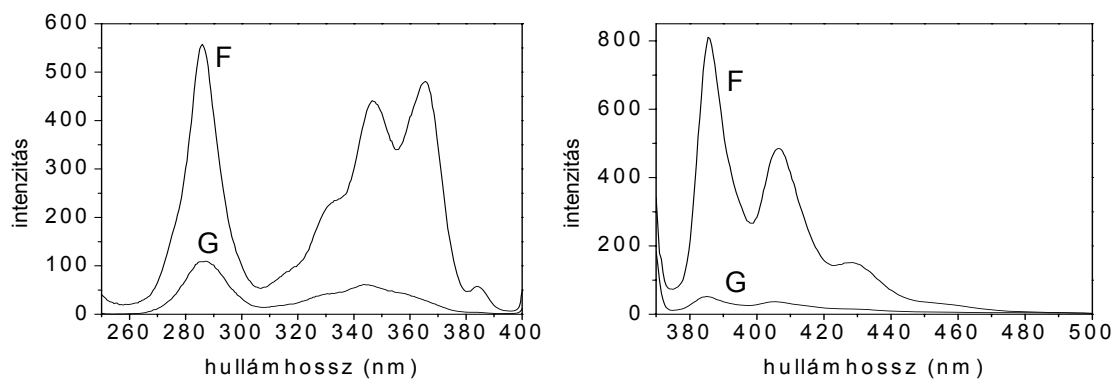
A fehérjék megismerését segíti a kovalensen kötődő, (*külső*) fluorofórok emissziójának vizsgálata. A jelölő jól mutatja, ha a kötéséhez közeli régiókban szerkezeti változás történik, vagy más okból de a marker fluoreszcencia hatásfoka megváltozik.

Az aktint jelölő pirén a Cys³⁷⁴ aminosavhoz kötődik, amelynek ként tartalmazó oldalláncához (szulfhidril csoport) erősen és szelektíven tud kötődni többféle jelölő molekula.

A hullámhosszakat monokromátorral választottuk ki. A gerjesztési és az emissziós rés mérete 5 nm, a spektrum felvételének sebessége 300 nm/perc volt. Az oldat hőmérsékletét termosztáttal állandó, 20 °C-os értéken tartottuk, az értéket közvetlenül a küvettatartóban mérte a műszer. A méréseket termosztálható mintatartóval ellátott Perkin-Elmer LS 50B típusú lumineszcencia spektrométerrel vagy Horiba Jobin Yvon Fluorolog-3 Fluoriméterrel (GVOP-3.2.1.-2004-04-0228/3.0) végeztük.

A mérésekhez 5%-os pirén jelölésű aktint használtunk. A gerjesztési hullámhosszt 250 és 400 nm közötti tartományban változtattuk. Az emissziós spektrum felvételekor a gerjesztési hullámhossz 365 nm volt, az emissziót 370 és 500 nm közötti tartományban mértük.

A polimerizáció során a gerjesztési- (állandó emissziós hullámhossz mellett mérve), illetve az emissziós spektrum (állandó gerjesztési hullámhossz mellett mérve) változik.

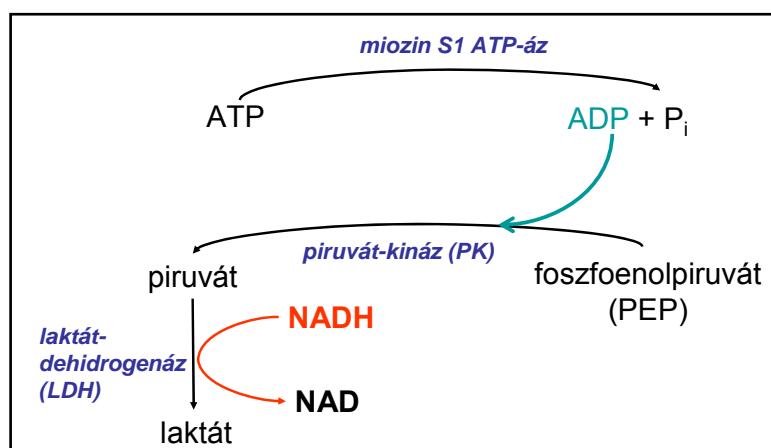


12. ábra: Pirén-jelölt G-aktin (G) és F-aktin (F) spektrumai. Baloldali a gerjesztési-, jobb: emissziós spektrum.

A 12. ábráról leolvasható módon a pirénnel jelölt aktin a 280 és 290 nm-en előforduló abszorpciós csúcsai a fehérje aromás oldalláncot tartalmazó aminosavjaitól (triptofán, tirozin, fenilalanin) származnak, míg a pirén eredményezi a 350 és 365 nm-es gerjesztési csúcsokat. A 330 és 385 nm-en a pirén abszorpciója a másik két csúcshoz képest nem számottevő. Az emissziós görbék alapján a pirén csúcsok a 387, 407 és 432 nm-es hullámhosszokon jelentkeznek, melyek közül az utolsó kis intenzitású. Ezek alapján a legjobb fluoreszcencia hatásfok eléréséhez bármely fluoreszcenciás vizsgálathoz 365 nm-es gerjesztést használva, 407 nm-en mértük az emittált fluoreszcencia jel intenzitását.

VII.3. Csatolt ATPáz aktivitás teszt

Az aktin aktiválta miozin-S1 ATPáz aktivitásának méréséhez Trentham és munkatársai módszerét használtuk ¹³⁶ (13. ábra). A méréseket egy JASCO UV 2100 típusú fotométerrel végeztük, 340 nm-es hullámhosszon mérve az abszorban-
cia időbeli változását. Ezen a hullámhosszon követhető a nikotinsavamid-dinukleotid hidrogénkötő formájának (NADH) mennyiségi változása ($\epsilon^{340nm} = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). A NADH csökkenésének oka, hogy az NAD-ionná (NAD⁺) oxidálódik a hozzáadott laktóz dehidrogenáz (LDH) enzim hatására. Így az S1 ATP-bontásához csatolva az LDH aktivitását mérjük valójában.



13. ábra: A csatolt ATPáz aktivitás mérési módszer molekuláris folyamatábrája (enzimekkel).

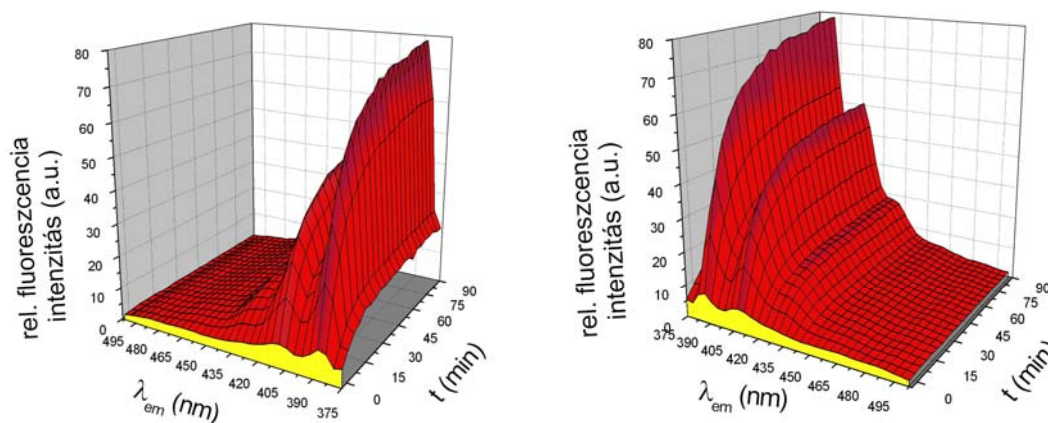
Ezzel párhuzamosan a keletkező ADP segítségével a piruvát kináz (PK) a foszfoenolpiruvátot (PEP) piruváttá alakítja. Minden csatolási lépés 1:1 arányú, aminek következtében

az ATP fogyasztásával egyenesen arányos a NADH mennyiségének csökkenése. A NADH fogyasztásának mértékét mutató abszorpciót az idő függvényében ábrázolva egyenest kaptunk, melynek meredekségéből határoztuk meg az ATP hidrolízis mértékét. Az összehasonlítás végett az eltérő eredetű izomból preparált S1-ekből, mindig azonos koncentrációt adtunk az oldatokhoz. Az S1-hez hozzáadott aktin növeli az S1 ATPáz aktivitását. A méréseket TRIS pufferben, pH 8,0-on, 25 °C-ra termosztált küvetében végeztük.

VII.4. Fluoreszcencia spektroszkópia - polimerizációs teszt

Polimerizációs tesztekhez az aktint pirénnel jelöltük (Cys³⁷⁴) és a korábban meghatározott fluoreszcencia-intenzitás növekedést mértük^{135, 137}.

A kísérleteket egy Perkin-Elmer LS50B típusú spektrofluoriméterrel vagy Horiba Jobin Yvon Fluorolog-3 Fluoriméterrel (GVOP-3.2.1.-2004-04-0228/3.0) végeztük. A vizsgált mintának a hőmérsékletét minden esetben 25 °C-on tartottuk, hogy a hőmérséklet diffúzióra és a fluoreszcenciára kifejtett hatását minimalizáljuk. Az előbbi a monomerek egymásra találási, azaz kapcsolódási valószínűségét és így a polimerizáció sebességét befolyásolja közvetlenül. A fluoreszcencia hőmérsékletfüggése miatt – növekvő hőmérséklet mellett csökken az intenzitás – az összekapcsolódó molekulák számával arányos növekedés, azaz a fluoreszcencia jel és filamentum hossz lineáris kapcsolata torzulna, közvetett módon. Mindkét jelenség mérési mellékterméket és félreértelmezhető polimerizációs görbét eredményezhet.



14. ábra: 365 nm-es gerjesztéssel felvett, 5%-os pirén jelölésű aktin emissziós spektrumának (375-500 nm) a polimerizáció hatására bekövetkező időbeli változása.

A fentiekben megadott indokok alapján a vizsgálatokhoz 365 nm-es gerjesztés mellett, 407 nm-en mértük az emittált fluoreszcencia jel intenzitását. A gerjesztési és emissziós rések nagyságát egy-egy méréssorozaton belül egyformára állítottuk (3-10 nm) és 1 másodperces integrálási idő-intervallumot használtunk. A 12. ábra a pirén-jelölt G- és F-aktin emissziós- és gerjesztési spektrumait, míg a 14. ábra az emissziós spektrum polimerizáció ideje alatti változását mutatja. Erről az ábráról könnyen leolvasható, hogy 407 nm-es hullámhosszon

történik a legjelentősebb változás.

VII.5. A „stopped flow” technika

A „*stopped flow*” az egyik leggyakrabban használt gyorskinetikai mérés technika. „Stopped flow” műszerrel kis mennyiségű oldatok vizsgálatát végezhetjük. A minták *speciális fecskendőkből* áramlanak egy nagy hatékonyságú *keverőn* keresztül a *vizsgálati cellába*. A vizsgálati cellában, a mintában lezajló reakció előrehaladásával történő fotometriai változás abszorpciós-, vagy fluorimetriás mérés technikával követhető. A mérés határozott előnye, hogy mind a keveredési holtidő, mind az időbeli felbontás ~1 ms-os. Ez a pontosság számos kémiai reakció vizsgálatához szükséges.

Vizsgálataink során a kinetikai paraméterek meghatározásához a pirénnel jelölt F-aktin fluoreszcenciájának változását követtük. Megmértük a miozin molekulák S1 szubfragmentumának aktin filamentumhoz kötésének, illetve arról leválásának kinetikai paramétereit. Megvizsgáltuk az ADP miozin-S1-hez való affinitását is, mert a miozinhoz kötött nukleotid (ADP vagy ATP) erősen meghatározza az akto-miozin komplex kialakulását és disszociációját jellemző kinetikai paramétereket. Minden mérést 20 °C-on végeztünk.

A mérés alapja a már 1981-ben Kouyama és Mihashi által felfedezett, Cys³⁷⁴-en fluorofórral jelölt aktinon mért fluoreszcencia kioltási hatás¹³⁸. A pirénnel jelölt aktin monomer és abból polimerizált filamentum kapcsolódása a miozinhoz, illetve az S1-hez a le nem fedett Cys³⁷⁴-en lévő fluorofór intenzitásának körülbelül 70%-os csökkenését eredményezi a kötés hatására. Az intenzitás csökkenésének dinamikájából tudunk adatokat nyerni az S1-aktin komplex kapcsolódási-szétválási dinamikájára.

Az általunk használt Applied Photophysics !SX18MV típusú műszer, melynek egy Acorn RISC számítógépen futó !SX18MV v 4.47 program a vezérlő, illetve adatfeldolgozó szoftvere. Ugyanezzel a szoftverrel minimális, de a legszükségesebb matematikai feladatokat is elvégezhetjük (átlagszámítás, illesztés).

A mért intenzitás görbék egyfázisú exponenciális ($I = A \cdot \exp(k \cdot t) + c$) görbével illeszthetők, ahol I a mért intenzitással analóg mennyiség, A az amplitúdóra utaló preexponenciális konstans, k a reakció sebességi állandóját megadó exponenciális konstans, t az idő és c pedig a reakció végén beálló intenzitásértéket jellemző additív konstans. Az amplitúdó a fluoreszcencia intenzitással arányos detektálási jel változásával (annak mértékével) egyezik meg és negatív előjelű lecsengési, pozitív előjelű növekedési görbék esetén.

Az illesztés előtt 4-5 mérési görbét (szoftveresen) átlagoltunk. Az illesztés jóságát a normalizált variancia értékek alapján fogadtuk (10^{-4} -nél kisebb), vagy vetettük (10^{-4} -nél nagyobb) el. Az illesztett exponenciálisokból nyert amplitúdó, vagy amplitúdóváltozás, illetve sebességi állandó adatokkal további adatfeldolgozási lépéseket végeztünk. Az amplitúdó

értékeket a változó koncentrációjú kémiai ágens (S1, ADP, ATP) koncentrációja függvényében ábrázolva egyenessel, vagy affinitási görbével illesztettük:

$$y = \frac{1}{2} \left[\left(\frac{(A+x+K_i)F_{\max}}{A} \right) - \sqrt{\left(\frac{(A+x+K_i)F_{\max}}{A} \right)^2 - \frac{4xF_{\max}^2}{A}} \right] \quad (3.)$$

ahol az A a bemért F-aktin koncentrációját, F_{\max} a maximális fluoreszcencia intenzitás változást, x a kémiai ágens koncentrációját, K_i pedig a keresett disszociációs konstans értékét jelenti¹³⁹.

ADP jelenlétében az ATP okozta aktin miozinról való disszociációjának mérésekor a kapott sebességi állandókból (k_{obs}) az alábbi egyenlet segítségével kaptuk meg a K_{AD} értékeket:

$$\frac{k_{obs}}{k_0} = \left(1 + \frac{[ADP]}{K_{AD}} \right)^{-1} \quad (4.)$$

ahol $[ADP]$ az ADP koncentrációja az oldatban, k_0 az ADP hiányában mérhető sebességi állandó (k_{obs}), K_{AD} pedig az ADP-nek az akto-miozin komplexszel kialakított disszociációs egyensúlyi állandója^{14, 139}.

A pirén-jelölt minták méréséhez 365 nm-es gerjesztési hullámhosszon, 0,1-0,5 nm-es gerjesztési rések mellett gerjesztettük a pirén-F-aktint is tartalmazó oldatunkat, majd egy WG385 (385 nm-en felüláteresztő) szűrőn átjutó emissziós intenzitás időbeli változását detektáltuk.

VII.6. Differenciális pásztázó kalorimetria

VII.6.1. DSC - műszer és technika

Az általunk vizsgált biológiai rendszer termodinamikai paraméterei, azaz állapotváltozói (nyomás, hőmérséklet, térfogat, koncentráció, stb.) a rendszer belső rendezettségéről, stabilitásáról tájékoztatnak. A folyamatokat irányító összefüggéseket az állapotegyenletek írják le. A fehérjék térszerkezeti stabilitása és termodinamikai stabilitása között kapcsolat van, ez utóbbi kalorimetrikus módszerekkel jól vizsgálható.

A differenciális pásztázó kaloriméter a biológiai és biokémiai folyamatokban lezajló strukturális és konformációs változások nagy érzékenységgű mérési eszköze¹⁴⁰⁻¹⁴⁵. A technika alkalmas az aktin filamentum hőstabilitásának globális vizsgálatára, de információt szerezhetünk (szub)molekuláris eltérésekről és interprotomer kapcsolatokról is. A kalorimetriás vizsgálatok egyik kritikus pontja az, hogy az egyes állapotokat kellően stabilan kell tartani a környezeti paraméterek megfelelő beállításával. Ilyen állapotokat vizsgáltunk az

aktin filamentum stabilitására ható többféle mikrokörnyezet kialakításával.

A mintát és a referenciát tartalmazó mérőcellák egymástól és a környezettől hőszigeteltek. A készülék a két cella hőmérsékletét egyidejűleg, azonos és egyenletes sebességgel emeli úgy, hogy mérés során a két cella mindig azonos hőmérsékletű legyen. A berendezés a hőmérséklet emeléséhez szükséges teljesítményeket méri külön-külön az egyik és másik cellában. Ha kiszámítjuk ezek különbségét megkapjuk a csak a mintát jellemző, korrigált hőelnyelési teljesítményt.

A Robert-Mayer egyenlet: $C_p - C_V = R$ szerint minden anyag esetén az állandó nyomáson és állandó térfogaton mért hőkapacitások különbsége azonos. Ebből vezethető le, hogy az állandó nyomáson mérhető hőkapacitás arányos az anyag szabadsági fokainak számával:

$$C_p = \frac{f + 2}{2} \cdot R, \quad (5.)$$

ahol R a Regnault-állandó, f a szabadsági fokok száma.

Bármilyen okból is változik meg az aktin filamentum, vagy a protomerek szabadsági foka, annak változását a kaloriméter érzékenyen észleli. A hőmérséklet növekedésével azonban feltételezhetjük, hogy akár egyszerre, akár külön-külön az aktin egyes régióinak (szubdoménjeinek) vibrációs mozgása megváltozik főleg, ha egy-egy molekularészlet kitekeredik (denaturálódik). A legfontosabb tehát, hogy állandó nyomást biztosítsunk a mérés során, ezt a speciálisan kialakított mintacella biztosítja.

Amennyiben egy endoterm vagy egy exoterm folyamat játszódik le a mérőcellában, az azonos hőmérséklet fenntartásához a mérőcella és a referenciacella fűtése eltérő teljesítményt igényel. A hőmérsékletkülönbség előjelétől és annak nagyságától függően vagy a mérő, vagy a referencia cellába kell több energiát táplálnunk a cellák azonos hőmérsékletének kialakítása érdekében. A rendszer kimenő jelként ezt az energiát (hőáram) adja meg megfelelő előjellel az idő, vagy az aktuális hőmérséklet függvényében. A folyamatról nyerhető legegyszerűbb információ a mért jel (DSC görbe) idő szerinti integrálja, ami az ún. kalorimetrikus entalpiát (ΔH_{cal}) adja meg. Az entalpia a teljesítmény-idő szorzataként kapott energia jellegű mennyiség, amit akkor használhatunk, ha a folyamat állandó nyomáson zajlik.

Az alapvető termodinamikai paraméterek az ismert termodinamikai összefüggések alapján számolhatók a hőáram és hőkapacitás segítségével:

$$C_p = \left(\frac{dH}{dT} \right)_p = \left(\frac{dU + pdV}{dT} \right)_p \quad (6.)$$

ahol C_p az állandó nyomáson mért hőkapacitás, dH pedig az infinitezimális entalpia-változást

jelenti. Az entalpiaváltozás kiszámítható fajhő és a hőmérsékletváltozás ismeretében:

$$\Delta H = C_p \Delta T \quad (7.)$$

Az egyenlet mindkét oldalát Δt -vel osztva megkapjuk a differencia hányadosokra vonatkozó egyenletet:

$$\frac{\Delta H}{\Delta t} = C_p \frac{\Delta T}{\Delta t} \quad (8.)$$

Ebből a Δt értékének nullához való infinitezimális közelítésével áttérhetünk az alábbi differenciál egyenletre:

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

A differenciálegyenlet bal oldala a kalorimetriás mérések során a minta és környezete között létrejövő kapcsolat során mérhető hőáramot (hőmennyiség/idő) jelenti, míg a jobb oldali tag az anyagi minőségtől függő hőkapacitás és a meghatározható értékű felfűtési sebesség szorzataként számolható. A mért hőáram és a beállított felfűtési sebesség alapján tehát egyszerűen számítható az anyagot jellemző hőkapacitás:

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

A kapott kalorimetriás görbék kiértékelésénél még hasznos információt hordoz a Gibbs-féle makroszkópikus szabadentalpia-változás (ΔG^0):

$$\Delta G^0 = -RT \ln(K_{eq}) = \Delta H - T\Delta S \quad (11.)$$

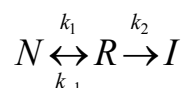
ahol ΔS az entrópia-változás, illetve R az egyetemes gázállandó ($R = 8,314 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\text{mol}^{-1}$). Számolásaink során a ΔH megegyezik a DSC görbéből meghatározható ΔH_{cal} kalorimetrikus entalpiaváltozással. A Gibbs-féle szabadentalpia-változást mindig szobahőmérsékletre ($T = 25 \text{ }^\circ\text{C} = 298 \text{ K}$) számítottuk ki.

A denaturációhoz tartozó entrópiaváltozást (ΔS) az alábbi képlet alapján számoltuk:

$$\Delta S = \Delta H / T_m \quad (12.)$$

ahol T_m a denaturációs átmenethez tartozó „olvadáspont”, ami az a hőmérsékleti pont, ahol a fehérjemennyiség fele denaturálódott. Ez a hőmérsékleti pont egy szimmetrikus denaturációs görbe esetén a maximális kitéréséhez tartozó hőmérsékletnek felel meg. Ezen a hőmérsékleten a legnagyobb az egységnyi idő alatt denaturálódó filamentum egységek száma.

A legegyszerűbb, kísérleti eredményekkel egyező modell szerint, a fehérje irreverzibilis hődenaturációja egy reverzibilis denaturációs lépést követően történik¹⁴⁶:



ahol N és R valamint I a natúr, reverzibilisen, illetve irreverzibilisen denaturálódott fehérje konformációkat jelzi, k_1 , k_{-1} és k_2 pedig a jelzett átmenetek sebességi állandói. Mivel $k_1 \gg k_2$, és $k_{-1} \gg k_2$, így a folyamat sebességét a $R \rightarrow I$ átmenet k_2 sebességi állandója határozza meg, és a teljes folyamat irreverzibilisnek tekinthető. Ez a modell képezi az alapját annak a módszernek, amit Sanchez-Ruiz és munkatársai irreverzibilis folyamatokra dolgoztak ki^{147, 148}. A k_2 sebességi konstans értéke nem állandó; hőmérséklet függése az Arrhenius egyenlettel meghatározható:

$$k_2 = \exp\left[-\frac{E_A}{R}\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T^*}\right)\right] \quad (13.)$$

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

A sebességi állandó a mért DSC görbéből meghatározható ΔH_{cal} – kalorimetrikus entalpiaváltozás – és egy adott hőmérsékletig elnyelt energia (ΔH ; aktuális entalpiaváltozás) alább feltüntetett kifejezése segítségével helyettesíthető:

$$\ln\left[\ln\left(\frac{\Delta H_{cal}}{\Delta H_{cal} - \Delta H}\right)\right] = -\frac{E_A}{R}\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_m}\right) \quad (14.)$$

VII.6.2. DSC mérések kivitelezése

Az aktin végkoncentrációját mindig $69 \mu\text{M}$ -ra (3 mg/ml) állítottuk be a vizsgálatokhoz. Az F-aktin állapothoz a korábban meghatározott módon (30. oldal: *Alkalmazott pufferek* fejezet) jutottunk a preparált G-aktin formából. A polimerizáció beindításával (B-puffer) egyidőben adtuk a mintához a nukleotid analógot létrehozó oldatokat. Az ATP-t tartalmazó oldatok esetén 2 órán át, szobahőmérsékleten ($20\text{-}22 \text{ }^\circ\text{C}$) polimerizálódott az aktin. A toxinokat mindig a polimerizáció kezdete után 1 órával adtuk a mintához és utána minimum további 1 órát szobahőmérsékleten tartottuk. Ezt követően a minták egy éjszakán ($10\text{-}12 \text{ óra}$) át hűtőben inkubáltuk $4 \text{ }^\circ\text{C}$ -on. Az ADP-t tartalmazó, vagy alacsonyabb ionerősségű aktin-oldatok polimerizációs idejét a korábban lemerített polimerizációs tesztek alapján határoztuk meg. A kalorimetriás mérés során az így kapott oldatból $965 (\pm 20) \mu\text{l}$ mennyiségű F-aktin-oldat került a DSC készülék mintatartó cellájába. Kontrollként a mért minta aktin nélküli puffer (és preparációs kiegészítőket tartalmazó) oldata szolgált. Az alkalmazott toxinok nem befolyásolják a denaturációs görbe lefutását, ezért ezeket kihagytuk a kontroll mintákból.

Az aktin vizsgálatára a $0\text{-}100 \text{ }^\circ\text{C}$ tartományt használtuk, amiből csak a 40 fok feletti tartomány vált számunkra érdekessé. Minden esetben elhanyagolhattuk a kis (kritikus koncentrációnyi) mennyiségű G-aktin populáció termikus járulékát^{143, 144, 149}.

A vizsgálatok során a mérésekhez 1 ml térfogatú Hastelloy cellákat használtunk.

Kontrollként a mintacellától termikusan függetlenített referencia cellába a fehérjét (aktint) nem tartalmazó pufferoldatot tettük. A rendszer alapvonalának instabilitása izoterm üzemmódban kisebb, mint $\pm 0,2 \mu\text{W}$. A fűtési/hűtési sebesség $0,3 \text{ K/perc}$ volt minden esetben. Az általunk használt kaloriméter mérések előtti kalibrációt nem igényelt.

VII.6.3. A DSC görbék kiértékelésének módja

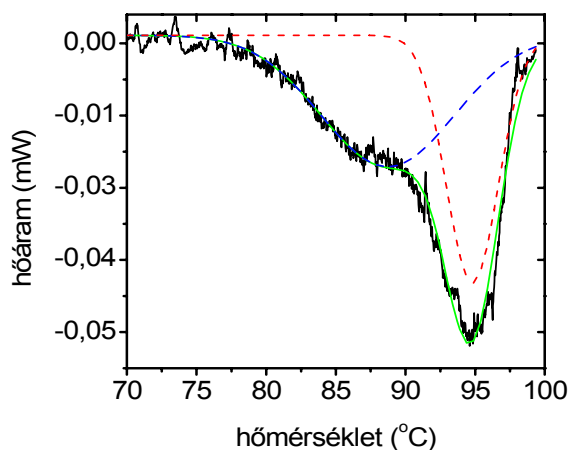
Az eredmények kiértékelése és az ábrák MicroCal™ Origin® 6.0 programmal készültek.

Az anyagok fázisátalakulását kísérő hőelnyelési folyamat – mint pl. az olvadás („melting”) – analógiájára, a fehérje denaturálásához szükséges energia is jól jellemzi az anyagot (aktin), például a görbe csúcsértékének hőmérsékleti pontja által. Ezt az analógia miatt olvadáspontnak („melting point”) is nevezzük, amit a T_m jelöléssel rövidítünk.

Feltételezve azt, hogy minden azonos típusú szerkezeti változás azonos energiát igényel, a T_m az a hőmérséklet, ahol az aktin filamentumok, illetve a protomerek egységnyi idő alatt legnagyobb mértékben denaturálódnak. Ennek megfelelően a kapott DSC görbe, vagy a görbére illesztett Gauss-görbe maximális értékénél a hőmérsékleti tengelyen leolvasható érték adja a T_m értéket. Összetett görbéknél az egyes komponensekre illesztett Gauss-görbék maximumához tartozó hőmérsékletek adják az adott komponens „olvadáspontját”.

Egyszerű DSC görbék esetén a fentiekben már megadott módon, egyszerű „görbe alatti terület” számítással (integrálással) kiszámítható a kalorimetrikus entalpiaváltozás. A több hődenaturációs átmenetből felépülő komplex folyamatok esetén a denaturációs görbékre illesztett Gauss-görbék területeiből számíthatók a komponensekre vonatkozó ΔH_{cal} értékek.

Az illesztést mutatja a 15. ábra, amit BeF_x jelenlétében, 1:0,8 koncentráció-arányú aktin:falloidin esetén kapott kalorimetriás görbével végeztünk el. Az



15. ábra: Összetett DSC görbék dekonvolúciója.

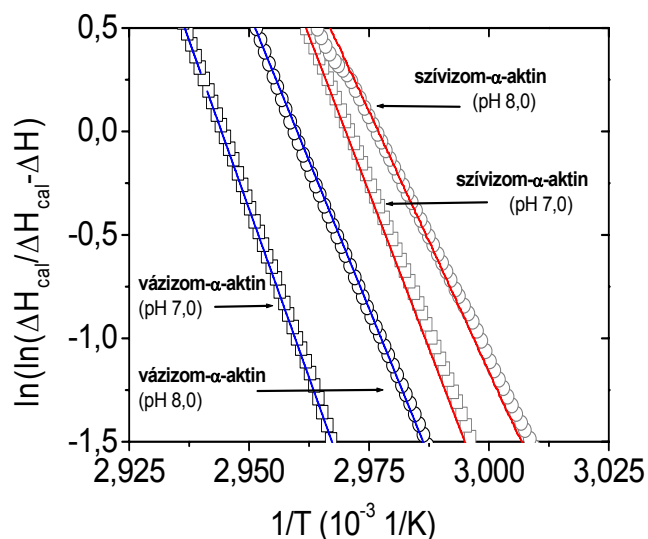
Falloidint nem telítési koncentrációban tartalmazó BeF_x -F-aktin DSC görbéje ([aktin]: [falloidin] = 1:0,8). A mért adatok (—■—), és az illesztett összeggörbe (—■—), aminek komponensei: a BeF_x -ot kötő aktin Gauss-görbéje (—■—), valamint a BeF_x -ot és falloidint kötő aktin Gauss-görbéje (—■—) ($69 \mu\text{M}$ ATP-vázizom-aktin; (MOPS pH=7,3; 100 mM KCl, 2 mM MgCl_2 ; 10 mM NaF, 3 mM BeSO_4).

illesztést akkor fogadtuk el, ha a kalorimetriás görbe értékeit jól követő összeggörbét adott, illetve az illesztett és a kalorimetriás görbe eltéréseinek szummázott értéke 5%-nál kisebb volt.

Az entalpiaváltozás, azaz a denaturáció során elnyelt hőmennyiség meghatározásához az alapvonal korrekció után – kontroll cella hőfelvételi görbéje segítségével – a hőmérséklet adatokat transzformáltuk idő adattá. A 0,3 K/perc-es felfűtési sebesség ismeretében, a hőmérséklet értékeket 200-zal szoroztuk, majd hozzáadtunk 273-at az abszolút hőmérsékleti skálára való áttéréshez. A mintatartóba bemért aktin valós anyagmennyiségével normáltuk mérési eredményeket, ezáltal egymással összehasonlíthatóvá tettük azokat. A teljesítmény-idő grafikon létrehozása után a görbe alatti terület integrálását végeztük el. A kapott integrál-érték a minta által felvett hőmennyiséggel arányos, ez pedig az aktin filamentum denaturációjához szükséges energiával (ΔH_{cal}).

Az F-aktin esetén tapasztalt irreverzibilis denaturációs csúcsok vizsgálatakor a Lumry-Eyring séma sebességi állandóira fennáll, hogy $k_2 < k_{-1}$ valamint $k_2 < k_1$. Ebben az esetben k_2 az ún. „rate-limiting”¹ sebességi állandó, így az aktiválási energia meghatározható a hőmérséklet változtatása során kapott sebességi állandó kiszámolásával. Sanchez-Ruiz és munkatársai több különböző módszert írtak le az aktiválási energia meghatározására¹⁴⁸, amelyek közül a 14. egyenletet alkalmaztuk, ahol ΔH_{cal} a denaturációs csúcshoz tartozó teljes kalorimetrikus entalpia, ΔH az adott pillanathoz tartozó kalorimetrikus entalpiaváltozás, míg T_m a denaturációs csúcsmaximumhoz tartozó hőmérséklet.

A 14. egyenlet alapján, ha a baloldali komplex kifejezésből kapott értékeket $1/T$ függvényében ábrázoljuk, akkor egy egyenest kapunk (18. ábra). Az egyenes meredeksége és tengelymetszete:



16. ábra: Az aktivációs energia számításához szükséges Sanchez-Ruiz ábrázolás. A példaként feltüntetett ábra tartalmazza a Mg^{2+} -iont kötő F-aktin filamentumokra vonatkozó illesztett egyeneseket, pH 7,0 (\square) és pH 8,0 (\circ), valamint szívizom (—) és vázizom (—) izoformák megfelelő kombinációi esetén. (69 μ M ATP-F-aktin, 100 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$).

¹ A teljes folyamat sebességét végeredményben meghatározó folyamat.

$$\frac{E_A}{R} \text{ és } -\frac{E_A}{RT_m}$$

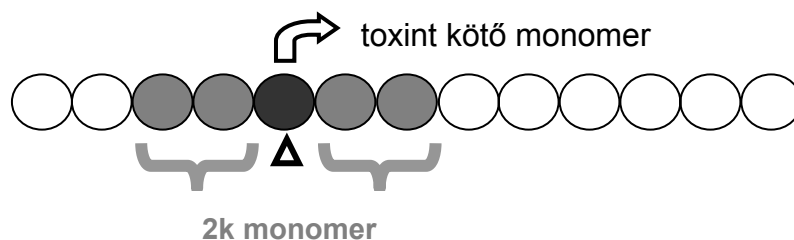
Az elsőbből meghatározható az aktiválási energia, majd ennek és a tengelymetszetnek a segítségével T_m értéke kiszámolható és összevethető a DSC görbéről leolvasott „olvadásponttal”. Ez a fentiekhez hasonló módon visszaellenőrzést tesz lehetővé a Gauss-görbék, illetve a Sanchez-Ruiz ábrázolás illesztési pontosságának ellenőrzésére. Az így eredményül kapott aktiválási energia hibája az álta-lunk alkalmazott alacsony felfűtési sebesség (0,3 K/perc) mellett kisebb mint 5%.

A párhuzamos egyenesek azonos aktiválási energiájú, míg a meredekebbek nagyobb denaturációs energiaigényű fehérjét jeleznek. Az y tengelymetszetek az illesztett egyenesek alapján meghatározhatók.

VII.6.4. Az F-aktin termodinamikai kooperativitása

Számos kutatócsoport leírta már az aktin kooperatív viselkedését bizonyos környezeti hatások esetén. A fehérjék – főleg az enzimek – miközben kifejtik biológiai aktivitásukat, jelentős szerkezeti változásokon mehetnek keresztül. A strukturális változások továbbterjedéséhez a fehérjén belül az érintett régiók megfelelő kooperativitására van szükség. Az egyedi molekulák szintjén értelmezhető intramolekuláris kooperáció mellett azonban az aktin filamentumot felépítő protomerek kooperációja is előfordul. Míg az előbbi a fehérjén belül az egyes régiók szerkezetének, addig az intermolekuláris kooperáció a szomszédos protomerek térszerkezetének összehangolt változását jelenti.

A kooperativitásra utaló kezdeti kísérletek során a filamentumok stabilitásának és funkcionális tulajdonságainak valamint egyes spektroszkópiai jeleknek a nem lineáris változását mutatták ki a filamentumhoz kötődő molekulák esetében. Ilyen hatást mutatnak például a falloidin és a berillium-fluorid, a miozin és bizonyos regulációs fehérjék.



17. ábra: A toxinhatás kooperativitási modellje. A körök az aktin protomereket, a háromszög a toxint szimbolizálja. A fekete teli kör a toxint fizikailag kötő-, a szürke körök a kooperatív hatás alatt álló, a fehérek pedig a *nem befolyásolt* protomereket jelölik.

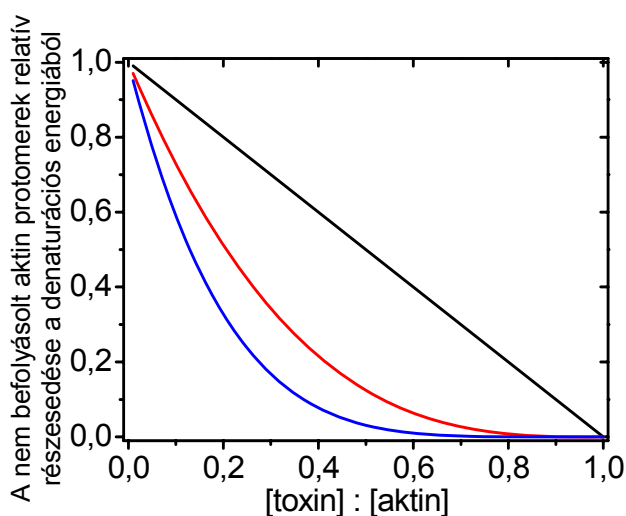
A kooperativitás mértéke a befolyásolt protomerek számával arányos. A maximális kooperativitási hatás akkor jön létre, ha a szomszédos protomerek ugyanazt a konformációs szerkezetet veszik fel, mint a kötött protomer; ez teljesen azonos fiziko-kémiai

tulajdonságokat eredményez. Ebben az esetben a filamentumban csak kétféle konformáció létezik: 1.) a kötött és (a meg nem különböztethető), kooperatív hatás alatt álló, valamint 2.) a hatás alatt nem álló molekuláké. Lehetséges azonban olyan kooperációs hatás is, hogy a szomszédos molekulák konformációja megváltozik, de nem teljes mértékben, azaz valahol az ágens által nem befolyásolt és a hatás alatt lévő konformáció „közötti” állapotot vesz fel. Ebben az esetben háromféle szubpopuláció létezik: 1.) ágenst közvetlenül kötő; 2.) kooperatív hatás alatt álló és 3.) nem befolyásolt protomerek.

A korábban már használt kooperativitási modell (17. ábra) segítségével megvizsgálható az ágens molekula kooperativitásának mértéke^{114, 150}. A modell alkotásánál feltételezték, hogy a toxin molekulák az aktin filamentumhoz véletlenszerűen kötődnek, és minden kötött toxin molekula maga körül kooperatív hatást vált ki, amely mindkét irányban a szomszédos k darab protomerre terjed ki. Annak a valószínűsége, hogy egy aktin protomer toxint köt, legyen p . Ennek értéke az oldatban jelenlévő aktin- és toxin molekulák számától, azaz koncentrációjuk arányától függ, feltételezve a toxinok 1:1-es kötési sztöchiometriáját:

$$p = \frac{[\text{toxin}]}{[\text{aktin}]} \quad (15.)$$

Így $(1 - p)$ annak a valószínűsége, hogy egy tetszőlegesen kiválasztott protomer nem köt toxint. Ezek alapján bármely protomer bármilyen mértékű toxin-hatástól való mentességének feltételei: a) ne kössön toxin molekulát b) a környezetében lévő $2k$ protomer se kössön toxint. Ha N_0 a filamentumban a protomerek száma, akkor $(1 - p)N_0$ számú protomer nem köt toxint. Ez esetben $(1 - p)^{2k}$ annak valószínűsége, hogy egy protomer környezetében lévő $2k$ protomer sem köt toxint. Legyen N a toxinhatástól mentes protomerek száma a filamentumban, ekkor annak valószínűsége, hogy egy protomerre a toxin semmilyen hatást nem fejt ki:



18. ábra: Kooperativitási modell. Eltérő kooperativitási fokok esetén az alkalmazott ágens által nem befolyásolt aktin populáció részesedése a teljes denaturációs energiából. A denaturációs energia a teljes energiával, míg az ágens koncentráció az aktin koncentrációjával normált (1:1-es kötési sztöchiometria esete). Fekete vonal a $k=0$, a piros a $k=1$, a kék vonal pedig $k=2$ kooperativitási faktor értékhez tartozó görbét reprezentálja.

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

Az N/N_0 értékét a kísérleti eredményekből a DSC görbék adott T_m denaturációs csúcsaihoz tartozó integráljaiból, p értékét pedig az alkalmazott [toxin] : [aktin protomer] arányból számíthatjuk ki. Az előbbi egyenlet segítségével görbét illesztettünk a mérési pontokra és meghatároztuk a kooperativitás mértékét (k).

$2k+1$ azoknak a protomereknek a száma, amelyet egy toxin molekula (valamilyen mértékben) stabilizálni képes, azaz a kooperatívan viselkedő filamentumszakasz „hossza”. A ko-operatív szakasz hosszának növekedésével a nem befolyásolt monomerek részesedése a teljes denaturációs energiaszükségletből egyre radikálisabban csökken (18. ábra).

VIII. EREDMÉNYEK

VIII.1. Miozin-S1 és aktin kölcsönhatása

VIII.1.1. Aktin aktiválta S1 ATPáz aktivitás

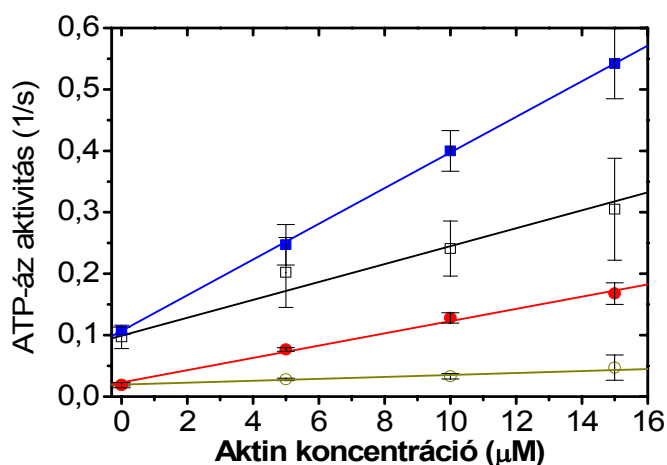
A 19. ábra alapján megállapítható, hogy az S1 Mg^{2+} -ATPáz aktivitását befolyásolja az aktin jelenléte. A méréshez a csatolt tesztelési módszert használtuk, ahol a NADH fogyasztást követtük fotométer segítségével 20 °C-on. Az S1, aktin nélküli ATPáz aktivitását mutatják a tengelymetszetek (vázizom: 0,1 1/s és szívizom: 0,019 1/s). Ez alapján látható, hogy a vázizom eredetű S1-nek (zöld és kék vonal) nagyobb az aktivitása a szívizom

eredetűnél (fekete és piros vonal). Az egyenesek meredeksége mutatja, hogy az azonos szöveti eredetű aktin és S1 preparátumok esetén (váz S1-váz aktin: ■; szív S1-szív aktin: ●) magasabb ATPáz aktivitást kapunk, mint az eltérő szövetből vett minták használatakor (váz S1-szív aktin: □; szív S1-váz aktin: ○).

Ez azt valószínűsíti, hogy nem csak az aktin izoformának van jelentős szerepe az eltérő szív- és vázizom működésben, hanem a két molekula együttes adaptációja volt szükséges az eltérő dinamikai kívánalmaknak való megfeleléshez.

A mérések során az F-aktin ATPáz aktivitását a miozin-S1 ATPáz aktivitásához képest elhanyagolhatónak vettük⁴⁴. Az aktivitás értékeket és standard hibákat minden esetben 4-5 mérés alapján számítottuk.

Az ATPáz aktivitás tesztek a későbbiekben a preparált miozin-S1 működőképességének, azaz kísérletekben való felhasználhatóságának eldöntését segítette.



19. ábra: Az aktin aktiválta S1 ATPáz aktivitás vizsgálat eredménye. Különböző eredetű aktin és miozin-S1-ek párosítása mellett kapott aktin aktiválta S1 ATPáz aktivitás mérésének eredménye. Jelmagyarázat a szövegben.

VIII.1.2. Akto-miozin komplex kinetikai paramétereit

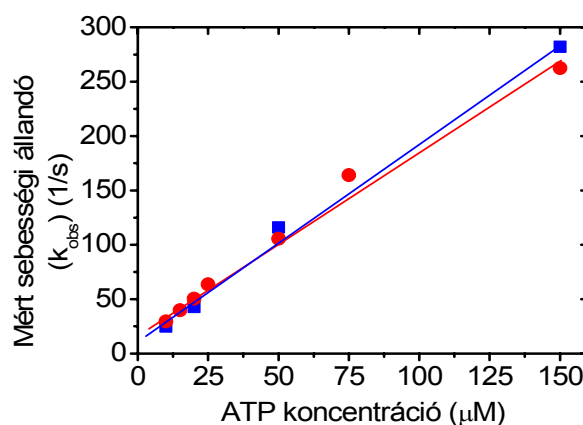
VIII.1.2.a. Az S1 ATP indukálta disszociációja az aktinról

A következő fejezetek stopped-flow technikával végzett méréseinél a bemért kémiai anyagok/molekulák koncentrációja a stopped flow technikánál megszokott módon „x/y” értékek formájában jelennek meg, ahol az „x” az összekeverés előtti, „y” pedig a végkoncentrációt jelöli. Az összekeverés utáni érték a kiindulási értéknek fele, ugyanis a két fecskendőből azonos térfogatmennyiség jut a mintacellába.

Minden esetben (a következő fejezetekben is) egy-egy adatpont 4-5 mérés átlagából származik. Mindegyik esetben a standard hiba értéke kisebb volt, mint 5%. A mérési eredményeket ismételt fehérje preparálásból származó oldatokkal – ismét – ellenőriztük, illetve pontosítottuk.

A „stopped flow” technikával végzett méréseket 1/0,5 μM -os aktin és 1,2/0,6 μM -os váz-S1 végkoncentráció mellett végeztük. Az 5%-os pirén jelölésű F-aktint falloidinnel stabilizáltuk, hogy az aktint biztosan filamentum formában tartsuk a kritikus koncentrációhoz közeli értékek ellenére is. A falloidin hozzáadása nem befolyásolja az aktin és miozin kapcsolódási dinamikáját¹⁵¹. Változó koncentrációjú ATP oldatot hozzákeverve az akto-S1 komplexhez, követtük az S1 disszociációját kísérő pirén fluoreszcencia-intenzitás növekedését. A sebességi állandót a fluoreszcencia intenzitás görbékre illesztett exponenciális függvény exponenciális kitevőjében szereplő konstans tagja adta. Az illesztés előtt 4-5 mérési görbét szoftveresen átlagoltunk, az illesztés jóságát a normalizált variancia értékek alapján fogadtuk (10^{-4} -nél kisebb), vagy vetettük (10^{-4} -nél nagyobb) el.

A másodrendű sebességi állandók az illesztett egyenesek meredeksége alapján $1,83 \cdot 10^6 \pm 0,1 \cdot 10^6$ (vázizom) és $1,68 \cdot 10^6 \pm 0,2 \cdot 10^6$ (szívizom) $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ voltak (20. ábra). Az értékek a mérési hibahatáron belül azonosnak tekinthetők, azaz a miozin S1 ATP hatására azonos sebességgel válik el mindkét aktin izoforma által alkotott filamentumtól.

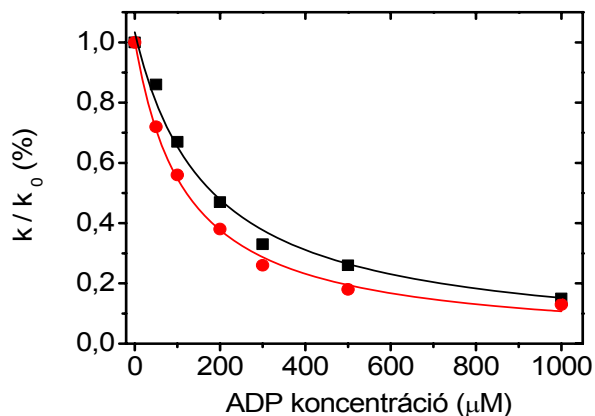


20. ábra: Az S1 ATP indukálta disszociációja az F-aktinról: a másodrendű sebességi állandók meghatározása váz- (—) és szívizom (—) eredetű F-aktinok esetén. Az ATP koncentrációtól lineárisan függ a mért sebességi állandó (k), az illesztett egyenes meredekségéből pedig meghatározható a másodrendű sebességi állandó.

VIII.1.2.b. S1 ATP indukálta disszociációja ADP jelenlétében

Az S1 affinitása az ADP-hez aktin jelenlétében: K_{AD} meghatározása

A miozin-S1 affinitását az aktin filamentumhoz az S1-hez kapcsolódó, illetve a mikro környezetben található nukleotid minősége jelentősen befolyásolja. Az aktin jelenlétében mérhető affinitás mérését $1/0,5 \mu\text{M}$ -os aktin és $1,2/0,6 \mu\text{M}$ -os váz-S1 végkoncentráció mellett végeztük az előbbi méréshez hasonlóan. Az 5%-os mértékben pirénnel jelölt F-aktint itt is falloidinnel stabilizáltuk. Az ATP végkoncentrációja $50/25 \mu\text{M}$ volt minden mintában, míg a hozzákevert ADP végkoncentrációja $0-1000 \mu\text{M}$ között változott. A mérési pontok alapján, a 4. egyenlet segítségével meghatározható az egyensúlyi állandó, mely az S1-nek az ADP-hez való affinitását jellemzi aktin jelenlétében (K_{AD}). A szívizom esetén $119 \pm 6 \mu\text{M}$, vázizom esetén $172 \pm 17 \mu\text{M}$ adódott az illesztés alapján (21. ábra). A kb. 1,5-szeres érték ugyan nem jelentős eltérés, a különbség azonban azt mutatja, hogy a vázizom izoforma stabilabb komplexet képez a vázizom eredetű miozin S1-gyel, mint a szívizom izoforma.



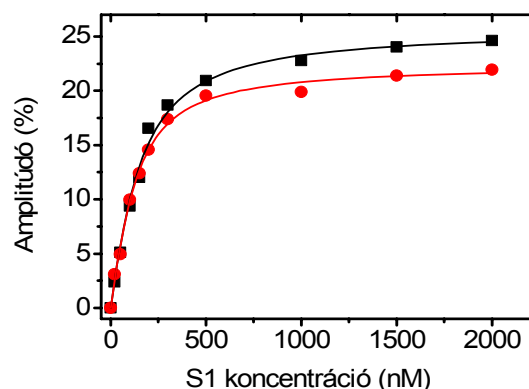
21. ábra: Az S1 affinitása az ADP-hez aktin jelenlétében: K_{AD} meghatározása eltérő eredetű F-aktinok esetén (szívizom: —●—, vázizom: —■—). A mért értékeket a szimbólumok, az illesztett görbéket pedig a vonalak jelölik.

VIII.1.2.c. Az S1 affinitása az aktinhoz ADP hiányában

 K_A meghatározása

A mérések előtt az állandó koncentrációban jelenlévő pirénnel jelölt aktint (50/25 nM) változó koncentrációjú S1-el (0-2000 nM) reagáltattuk, és a keveréket állandó koncentrációjú ATP-vel (50/25 μ M) elegyítettük a „stopped flow” kísérletben. A vizsgálat során, az aktinhoz kötött pirén fluoreszcencia intenzitás amplitúdójának növekedését követtük. A növekedés annak köszönhető, hogy a keverés előtti ATP mentes állapotban az aktin erősen kötődik az S1-hez és az ATP beinjektálása és S1-hez kötése miatt az akto-miozin komplex disszociál. A kialakult fluoreszcencia intenzitás a szabad F-aktinhoz tartozik és ez adja az

ATP hozzáadása hatására végbemenő intenzitásértékek viszonyítási alapját. A keverőcellában végbemenő akto-miozin komplex disszociációja miatt kialakuló intenzitásváltozás értékeket a reakció végállapotához tartozó intenzitással normáltuk, azaz relatív amplitúdóváltozásokat (%) határoztunk meg minden egyes ATP koncentrációhoz. A kapott relatív intenzitásváltozás értékei telítődési jelenséget mutatnak a koncentráció függvényében. Hiperbolát illesztve a méréspontokra a K_A értéke 98 ± 9 nM vázizom- és 72 ± 6 nM volt szívizom eredetű aktin esetén (22. ábra). A K_{AD} disszociációs állandó meghatározásakor kapott eredményekhez hasonlóan a két izoformához tartozó disszociációs állandó közötti eltérés nem jelentős. Az adatok alapján a két izoforma esetén az affinitások is közel azonosak, de itt is a vázizom- α -aktin izoforma kisebb affinitása mutatható ki.

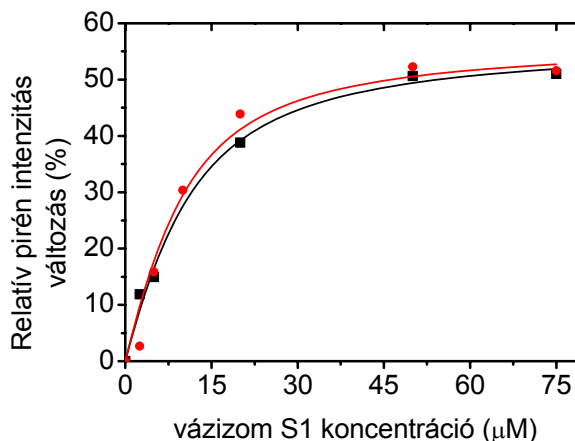


22. ábra: K_A meghatározása vázizom-S1 és eltérő eredetű F-aktinok esetén. A grafikon a szívizom aktinhoz (—●), illetve vázizom aktinhoz (—■) tartozó mérési értékeket és az adatpontokra illesztett hiperbolákat mutatja.

VIII.1.2.d. Az S1 affinitása az aktinhoz ADP jelenlétében

 K_{DA} meghatározása

A mérésekhez, az egyik reakciós elegy pirénnel jelölt aktint ($8/4 \mu\text{M}$) ADP-vel ($3/1,5 \text{ mM}$) és változó koncentrációjú S1-et ($0-75 \mu\text{M}$) tartalmazott. A másik fecskendő állandó koncentrációjú ATP-t ($600/300 \mu\text{M}$) tartalmazott, ezeket kevertük össze. Az előzőkhez hasonlóan a kiindulási és a végállapotban mérhető pirén fluoreszcencia intenzitás amplitúdójának relatív (%-os) változását követtük a koncentráció függvényében. A kapott eredményekre hiper-bolákat illesztve (3. egyenlet) a K_{DA} értéke $6,0 \pm 2,0 \mu\text{M}$ vázizom-, és $4,8 \pm 2,0 \mu\text{M}$ volt szívizom eredetű aktin esetén (23. ábra).



23. ábra: K_{DA} meghatározása vázizom-S1 és eltérő eredetű F-aktinok esetén. Fekete négyzet jelöli a vázizomhoz, piros teli kör a szívizomhoz tartozó értékeket.

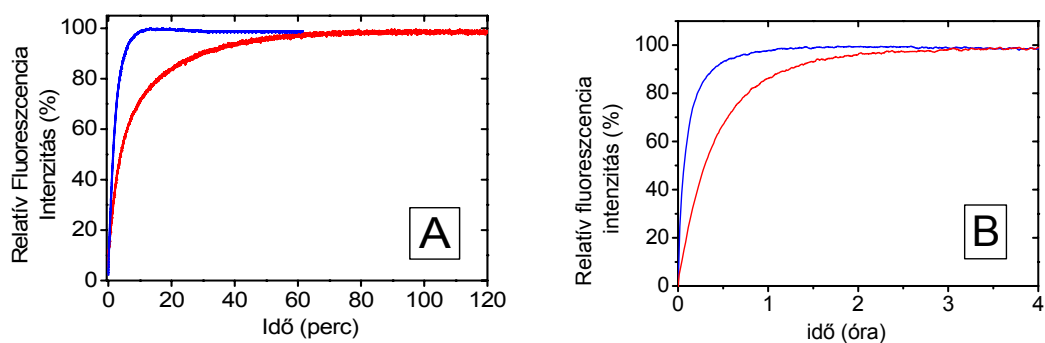
A kapott eredmények a standard hibák által meghatározott hibahatárokat figyelembe véve nem térnek el jelentősen. A vázizom izoforma nagyobb affinitása magyarázhatja az aktin-aktiválta S1 ATPáz mérésekben tapasztaltakat azáltal, hogy az ott mutatkozó nagyobb vázizom-aktin által kiváltott vázizom S1 aktiválási hatást az erősebb vázizom-aktin affinitás okozza.

Összefoglalva az előző méréseket, az ATPáz aktivitás és a polimerizációs mérés kismértékű eltérést mutat az aktin izoformákra vonatkozólag. A gyorskinetikai mérésekkel kapott eredmények közül az S1-nek ATP indukálta disszociációja az aktinról nem mutatott különbséget. A K_A és a K_{AD} és K_{DA} mérésekkel csak kis eltérés mutatható ki a két α -aktin izoforma között az akto-miozin komplex dinamikáját tekintve, de ezek a kis eltérések mind a vázizom izoforma nagyobb – miozinhoz való – affinitását mutatják. Ennek megfelelően kijelenthető hogy, ha kismértékben is, de a vázizom- α -aktin erősebb komplexet képez a miozinnal (miozin-S1-gyel), mint a szívizom- α -aktin izoforma.

VIII.2. A kétértékű ionok hatása - ionerősség

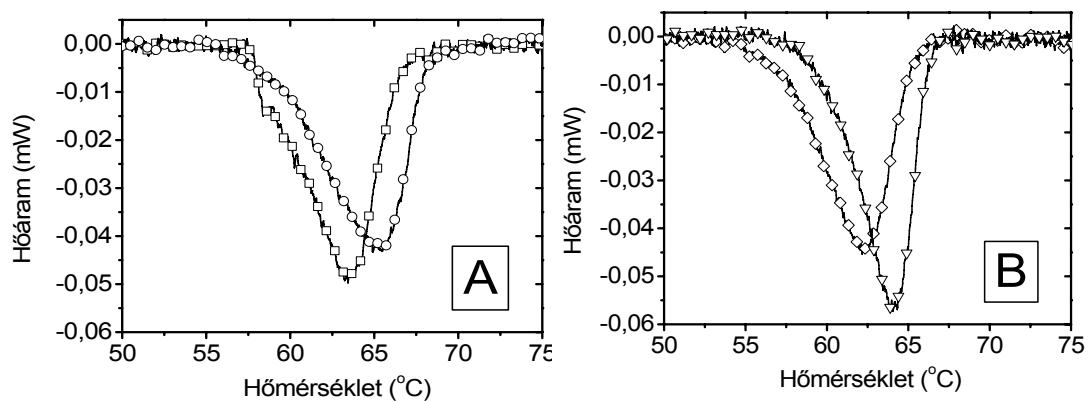
Az ionerősség polimerizációra kifejtett hatásának vizsgálatához pirénnel jelölt váz- és szívizomból preparált Mg^{2+} -F-aktint használtunk. Más kutatócsoportok korábbi tapasztalatait^{75, 152} megerősítő eredményeket kaptunk. A pirén fluoreszcenciája a korábban

már említett módon nyújt információt a polimerizált aktin mennyiségéről. A méréseket 3,5 μM G-aktin koncentráció mellett, 20 °C-on és $pH=7,3$ -on, magas (100 mM KCl, 2 mM MgCl_2) és alacsony (10 mM KCl mellett 0,5 mM MgCl_2) sókoncentráció mellett végeztük. Jól látszik a különbség a két izoforma polimerizációs képessége között mindkét sókoncentráción (24. ábra).



24. ábra: Polimerizációs teszt különböző ionerősség hatására. (5% pirén jelölésű vazizom- (—) vagy szívizom-aktin (—), 23 μM). A) magas sókoncentráción, B) alacsony sókoncentráción mért tendencia.

A továbbiakban DSC méréseket végeztünk különböző kétértékű kationok jelenléte mellett polimerizált aktin izoformákkal. A Ca^{2+} -ion Mg^{2+} -ionra történő cseréjét a korább megadott módon végeztük. A polimerizációhoz az állandó 100 mM KCl mellett 2 mM MgCl_2 -koncentrációt (magas sókoncentráció) állítottunk be a fehérje környezetében.



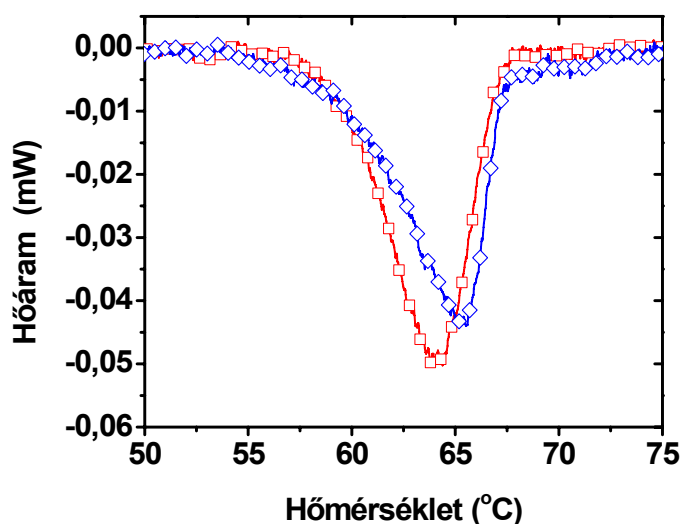
25. ábra: Mg^{2+} -iont kötő szívizom- α - és vazizom- α -aktin denaturációs görbéi.

(2 mM MgCl_2 , 100 mM KCl, $(\text{Mg}^{2+})\text{ATP-F}$ -aktin)

A) pH 7,0-hez tartozó görbék; szívizom- α -aktin (\square), vazizom- α -aktin (\circ).

B) pH 8,0-hez tartozó görbék; szívizom- α -aktin (\diamond), vazizom- α -aktin (∇).

A DSC mérések során a T_m és egyéb termodinamikai értékek a kötött kationtól függetlennek bizonyultak (25. ábra), a számolt értékek eltérése a $\pm 0,5$ °C-os hibaértékhez képest kicsinek bizonyult. Hasonló eredményeket mutattak a korábbi spektroszkópiai vizsgálatok is¹⁵³. Amennyiben mégis különbséget teszünk, akkor az alábbi következtetéseket vonhatjuk le a DSC görbék és az adatok alapján.



26. ábra: Ca^{2+} -iont kötő aktin izoformák DSC görbéi. Szívizom (Ca^{2+})ATP- α -aktin (\square) és vázizom (Ca^{2+})ATP- α -aktin (\diamond). (magas sókoncentráció: 100 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , pH 8,0)

Az izoformákat tekintve, a kalciumot és magnéziumot kötő állapotok esetén a vázizom izoformához tartozó T_m értéke $0,9$ °C-kal, illetve $1,9$ °C-kal nagyobb volt, mint a szívizom izoformáé. A stabilabb vázizom szerkezetet támasztja alá a többi termodinamikai paraméter is (2. Táblázat,¹⁵⁴), bár Mg^{2+} -kötés esetén az eltérés jóval nagyobb, mint Ca^{2+} esetén (25., 26. ábra). Nagyobb kalorimetrikus entalpia, entrópiaváltozás és szabadenergia értékek stabilabb szerkezetet jelentenek. A szívizom izoformánál tapasztalható nagyobb ionfüggés arra enged következtetni, hogy a szívben az ionösszetételnek nagyobb hatása és szerepe lehet a működésben.

2. Táblázat: Aktin izoformák termodinamikai jellemzői a kétértékű kationok függésében				
	szívizom- α -aktin		vázizom- α -aktin	
	Ca^{2+}	Mg^{2+}	Ca^{2+}	Mg^{2+}
T_m (°C)	64,4	62,2	65,3	64,1
ΔH_{cal} (kJ·mol ⁻¹)	578,8	768,4	889,9	872
ΔS (J·mol ⁻¹ ·K ⁻¹)	1715	2293	2631	2587
ΔG (kJ·mol ⁻¹) (25°C)	76,3	96,6	119,0	114,0

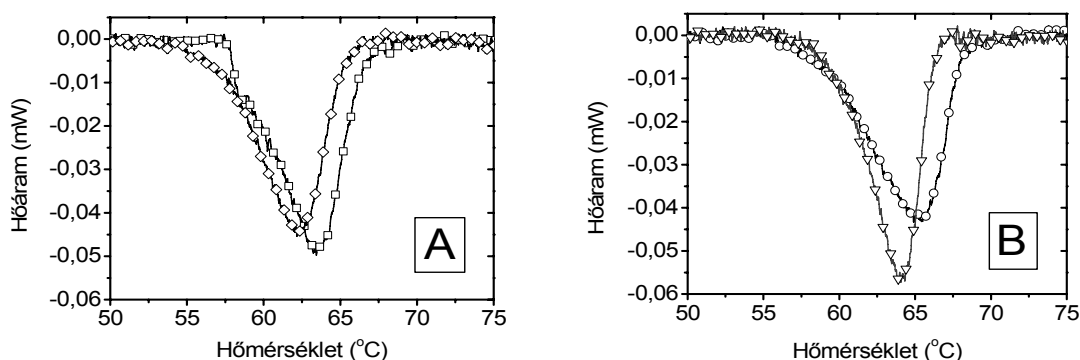
A különböző ionok kötése szempontjából csak a szívizom izoforma esetén találtunk jelentősebb eltérést. A magnézium-kötő filamentumok T_m -je rendre 2,2 és 1,2 °C-kal kisebb volt, mint kalcium kötéskor a szívizom és vázizom tekintetében, egyezően a korábbi spektroszkópiás mérések eredményeivel⁷².

A T_m értékek kismértékű eltérése ellenére a termodinamikai jellemzők összessége alapján kijelenthető, hogy a vázizom izoforma esetén a Ca^{2+} -iont kötő forma, ha kismértékben is, de stabilabb. Ezzel szemben a szívizom izoformának a Mg^{2+} -kötés előnyösebb, hiszen stabilabb szerkezet jön létre.

Összességében kijelenthető, hogy a DSC technikával kimutatott kationfüggő eltérések kismértékűek, ami látszólagos ellentétet mutat a korábbi spektroszkópiai mérésekkel^{72, 80}. Azok esetén a kation csere jelentős hatással volt mind a monomerek, mind a filamentumok dinamikai tulajdonságaira. Azonban a spektroszkópiailag meghatározott dinamikai tulajdonságok és a DSC módszerrel meghatározott termodinamikai tulajdonságoknak nem feltétlenül kell egybeesnie, hiszen nem ugyanazokat a fizikai tulajdonságokat vizsgáljuk a két technikával!

VIII.3. A pH hatása - izoformák

Az aktin filamentum mikrokörnyezetének paraméterei közül, mint minden fehérje esetén a pH-nak nagy jelentősége lehet. Erre vonatkozólag a kalorimetriás mérések által kapott eredmények alapján megállapítható, hogy a DSC görbék (27. ábra; a, b,¹⁵⁵) alapján mutatkozó eltérések viszonylag kismértékűek, de a korábbi spektroszkópiai vizsgálatokkal egybeesőek¹⁵³. A T_m értékek közelsége mellett a számolt entalpia- és entrópiaváltozások, valamint az aktivációs energia értékek is közel azonosak.



27. ábra: Aktin izoformák DSC görbéje - pH hatás.

(69 μM ATP-F-aktin, 100 mM KCl, 2 mM MgCl_2)

A) szívizom- α -aktin izoforma; pH 7,0 (\square) és pH 8,0 (\diamond)

B) vázizom- α -aktin izoforma; pH 7,0 (o) és pH 8,0 (∇).

3. táblázat: α -aktin izoformák termodinamikai paramétere a pH függvényében.

(69 μ M (Mg^{2+})ATP-F-aktin, 100 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$)

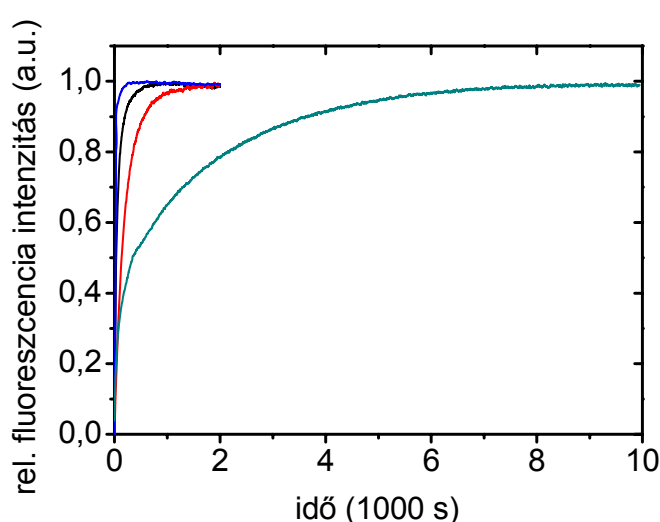
	<i>szívizom-α-aktin</i>		<i>vázizom-α-aktin</i>	
	<i>pH 7.0</i>	<i>pH 8.0</i>	<i>pH 7.0</i>	<i>pH 8.0</i>
T_m ($^{\circ}C$)	63,4	62,2	65,3	64,1
ΔH_{cat} ($kJ \cdot mol^{-1}$)	806,4	768,4	932,5	872,0
ΔS ($J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$)	2397	2296	2756	2587
E_A ($kJ \cdot mol^{-1}$)	483,7	331,9	547,0	446,7

A denaturációhoz szükséges aktivációs energia a szívizom izoforma esetén kisebbnek bizonyult. Ezt támasztja alá a többi termodinamikai paraméter is (3. táblázat,154), ami a váz izoforma nagyobb stabilitását jelenti. Alacsonyabb pH értéken nagyobb energia befektetése szükséges a denaturációhoz mindkét izoforma esetén, ami azt jelenti, hogy a pH 7,0 termodinamikailag stabilabb formát eredményez. Az izoformák pH függésének tendenciája azonosnak tekinthető, ami a molekulák nagymértékben azonos szekvenciájának köszönhető.

VIII.4. Nukleotidok hatása

Mind a polimerizációra, mind a termodinamikai stabilitásra vonatkozólag megvizsgáltuk a nukleotidok hatását, hogy kiegészítsük a korábbi FRET alapú, nukleotid-függő konformációra és filamentum dinamikára vonatkozó mérések eredményeit⁸⁷.

A polimerizációs tesztek (lásd: előrébb) a korábbi mérések eredményeit igazolták, miszerint az ADP aktin is képes polimerizálni, azaz az ATP hasítás nem szükséges a filamentum kialakulásához. Továbbá az ATP-t kötő forma gyorsabban polimerizál, mint az ADP-t kötő forma mindegyik izoforma esetén (28. ábra). Az eddigi



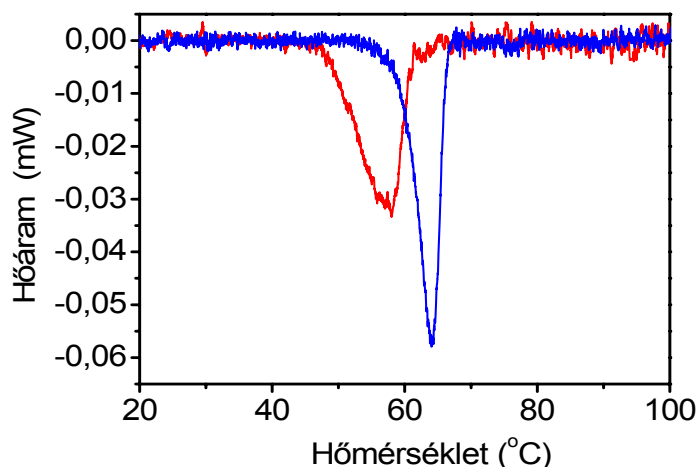
28. ábra: Nukleotidok hatása az aktin izoformák polimerizációjára. Vázizom-ATP-F-aktin (—); szívizom-ATP-F-aktin (—); vázizom-ADP-F-aktin (—); szívizom-ADP-F-aktin (—); (23 μ M aktin, 100 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, 5% pirén jelölés). Az aktin oldatok 0,2 mM ADP-t, vagy 0,2 mM ATP-t tartalmaztak a polimerizálás kezdetén.

vizsgálatokhoz képest újdonság az, hogy a szívizom izoforma lassabban polimerizál a

vázizom izoformához képest, főleg ADP-t kötő állapotban.

Ez utóbbi megállapítás miatt a DSC vizsgálatokat megelőzően az ADP-aktin oldatok polimerizációs idejét az ATP-vázizom izoforma 2 órájához képest minden esetben 12 órára (szobahőmérsékleten) növeltük a polimerizáció teljességének érdekében.

A kalorimetriás méréseknél a 69 μM -os aktin koncentráció kiemelt jelentőségű, mert ez jóval nagyobb, mint az ADP aktin kritikus koncentrációja ($\sim 3 \mu\text{M} \rightarrow \sim 4\%$), ennek megfelelően az aktin több, mint 95%-a filamentális formában volt jelen, vagyis a monomer forma termodinamikai hozzájárulása elhanyagolható. Tehető ez azért is mert a monomerek denaturációs csúcsa 50°C alatt van, azaz nem változtat a filamentum formához tartozó denaturációs csúcson (nem közölt adat).



29. ábra: Nukleotid hatás vázizom-F-aktin denaturációs görbéi alapján. (MOPS pH 8,0; 100 mM KCl, 2 mM MgCl_2 ; hexokináz, glükóz, ADP). Az ADP-t kötő forma (—), az ATP-t kötő forma (—). T_m : $58,4^\circ\text{C}$ és $65,3^\circ\text{C}$.

Az oldatok hexokinázt is tartalmaztak, ezért ellenőrző méréseket végeztünk csak *A puffert* tartalmazó kontroll- és hexokinázt, glükózt és ADP-t a leírásban megadott mennyiségben tartalmazó minta oldatokkal. A kapott kalorimetriás görbéken semmilyen, az aktint is tartalmazó oldatok DSC görbéinek kiértékelését zavaró hatást nem tapasztaltunk (nem közölt adatok).

A mérések eredményei alapján mindkét aktin izoforma esetén, minden termodinamikai paraméter egyértelműen az ATP-t kötő filamentumok nagyobb hődenaturációs ellenállóképességét bizonyítja az ADP-t kötőkéhez képest¹⁵⁶.

Már a T_m értékek jelentős eltérése is ezt mutatja, körülbelül 10, illetve 7°C -kal (29. ábra, 4. táblázat) csökken az ADP-filamentumok denaturációs maximumának helye, szívizom, illetve vázizom izoforma esetén. Az ATP-t kötő izoformák között az eltérés kisebb, kb. 2°C (4. táblázat), mint az ADP kötés esetén mérhető kb. 4°C (izoformák tekintetében!)^{156, 157}. A denaturációs hőmérséklet eltolódása mellett megfigyelhető még a DSC görbék (félérték)szélességének növekedése, amennyiben az ATP helyett ADP-t kötő G-aktinból jött létre a filamentum. A kiszélesedett görbe a filamentumon belüli, precízebben az intraprotomer-, azaz doménszintű kooperativitás mértékének lecsökkenését jelenti.

4. táblázat: Nukleotid hatás. Szívizom- és vázizom- α -aktin izoforma termodinamikai jellemzői. Az entrópia változást 250 °C-os (298 K) hőmérsékletértékkal számoltuk. (69 μ M Mg-F-aktin, MOPS pH 8,0). *FWHM*: félértékszélessége az adott állapothoz tartozó csúcshoz. Az abszolút hiba értéke nem haladta meg az 5%-ot.

	<i>szívizom izoforma</i>		<i>vázizom izoforma</i>	
	+ATP	+ADP	+ATP	+ADP
T_m (°C)	63,4	54,2	65,3	58,4
ΔH_{cal} (kJ·mol ⁻¹)	806,4	393	932,5	810
ΔS (J·mol ⁻¹ ·K ⁻¹)	2397	1202	2756	2444
ΔG (kJ·mol ⁻¹) (25°C)	104	40	125	276
E_A (kJ·mol ⁻¹)	483,7	254,0	547,0	310,8
<i>FWHM</i> (°C)	1,8	7,5	1,4	1,6

A szívizom eredetű ADP-F-aktin preparátumon végzett DSC méréseink során nyert kalorimetriás görbék endoterm átalakulásra utalnak és két jól elkülöníthető csúcshoz rendelkeznek. A két csúcshoz tartozó T_m értékek ($54,3 \pm 0,4$ °C és $59,9 \pm 2,1$ °C) két megkülönböztethető fehérje populáció jelenlétére utalnak. Az utóbbi érték jól megfeleltethető az ADP-vázizom izoforma korábbi méréseinkben tapasztalt T_m ($58,4 \pm 0,2$ °C) értékének. Az azonosságot az is alátámasztja, hogy mindkét izoforma ATP-t kötő filamentumainak T_m értékei jóval magasabbak. Az alacsonyabb hőmérsékletű csúcs ennek megfelelően a szívizom izoformához, a magasabb pedig a vázizom izoformához társítható^{156, 157}.

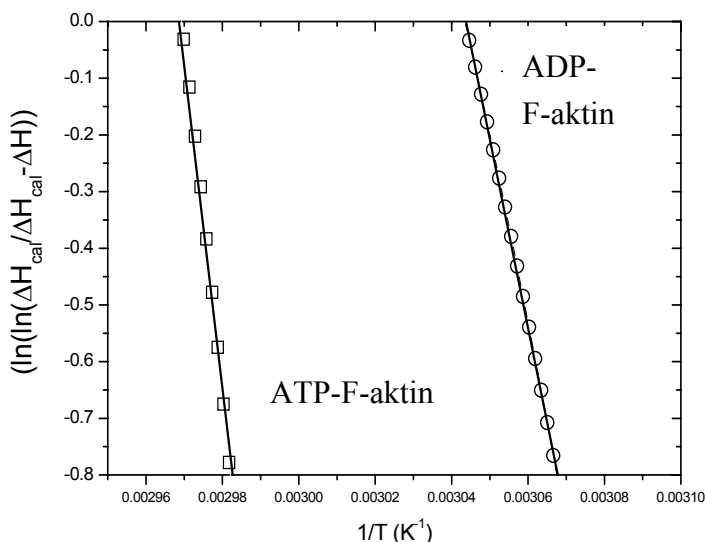
5. táblázat: Adattáblázat az ADP-t kötő F-aktin izoformák DSC görbéire illesztett Gauss-görbék elemzése (!) alapján.

ADP-t kötő formák	<i>szívizom</i>	<i>vázizom</i>
T_m (°C)	54,3	61,3
ΔH_{cal} (kJ·mol ⁻¹)	346,7	337,9
ΔS (J·K ⁻¹ ·mol ⁻¹)	1059,2	1010,7
ΔG (kJ·mol ⁻¹) (25°C)	36,3	41,7

Két Gauss-görbe illesztésével a területarányok alapján meghatároztuk, hogy a két izoforma előfordulási aránya 89 ± 7 % (T_m : 54,3 °C) és 11 ± 7 % (T_m : 60,3 °C), ami megfeleltethető a mások által mért 16-24%-os α -vázizom izoforma szívizomban való előfordulási mértékének¹⁵⁷.

A számolt termodinamikai paraméterek közül leginkább az átmeneti hőmérsékleti

pontok eltérése mutatja, hogy a szívizom izoforma termodinamikailag kevésbé stabil forma a vázizom izoformához képest. Az illesztett Gauss-görbék kisebb félértékszélessége (FWHM) is a nagyobb molekulán belüli kooperációra utal a vázizom esetében (nem közölt adatok).

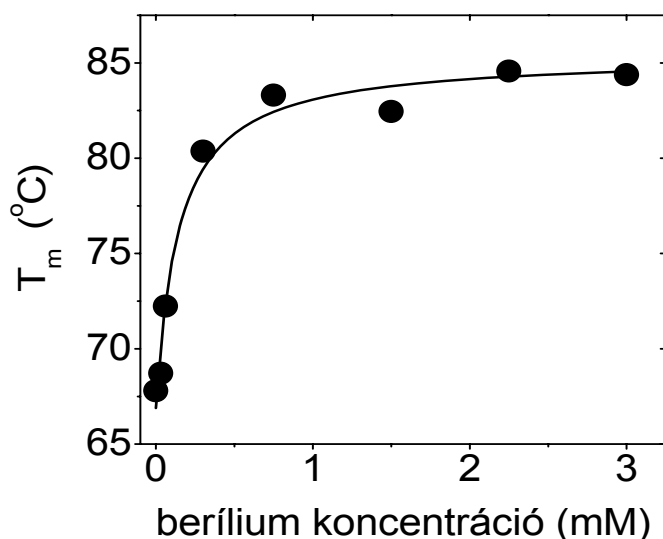


30. ábra: Aktivációs energia számolás Sanchez-Ruiz-féle ábrázolás segítségével. Adatok és illesztett görbék ATP (\square) illetve ADP (\circ) vázizom- α -aktin filamentumok esetén. A meredekebb egyenes nagyobb aktivációs energiát jelent.

Az aktivációs energiaértékek (E_A) is az izoformák összehasonlításakor a vázizom izoforma nagyobb stabilitását támasztja alá mindkét nukleotid jelenlétében. Páronként összehasonlítva ATP jelenlétében a vázizom izoforma 547,0 kJ/mol értéke a szívizom 483,7 kJ/mol-os értékével, az ADP-t kötő formák esetén pedig szintén a nagyobb vázizomhoz tartozó 310,8 kJ/mol áll szemben a szívizom izoformához tartozó 254,0 kJ/mol-os aktiválási energiaértékkel. Az azonos izoformák esetén mindkét esetben az ATP-t kötő forma mutatja a nagyobb hőstabilitást: 547,0 és 310,8 kJ/mol a vázizom izoforma és 483,7 és 254,0 kJ/mol értékek a szívizom izoforma ATP-, illetve ADP-kötő formái esetén. Ezeket az értékeket a mért DSC görbék Sanchez-Ruiz-féle ábrázolásával kapott egyenes(ek) meredekségéből tudtuk kiszámítani (30. ábra).

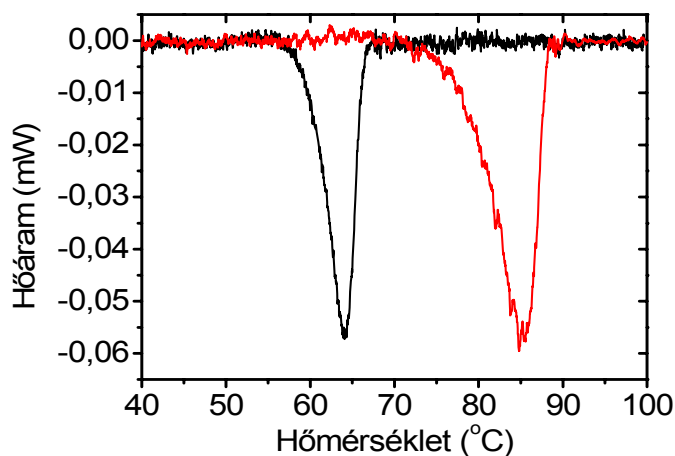
VIII.5. ADP·P_i analógok hatása

Első lépésként azt vizsgáltuk mi a hatása az F-aktin denaturációs átmeneti hőmérsékletére a különböző koncentrációban hozzáadott BeF_x -nak (31. ábra). Ennek kimutatására változó koncentrációjú NaF-ot (0,1-10 mM) és BeSO_4 -t (0,03-3 mM) használtunk, állandó 10:3 koncentráció-aránnyal. Habár a különböző koncentrációban kialakuló BeF_x -komplex telítési hatását eléri már az 1 mM Be-ion koncentráción, de a továbbiakban a 10 mM NaF, 3 mM BeSO_4 (illetve AlCl_3) koncentráció értékeket használtuk annak érdekében hogy biztosan elegendő BeF_x legyen az oldatban a reprodukálható maximális hatás eléréséhez.



31. ábra: BeF_x hatás vizsgálata titrálással. Változó BeF_x koncentráció mellett a T_m növekedésre hiperbolát illesztve (fekete vonal) a fél-telítési koncentráció értéke $0,14 \pm 0,05$ mM-nak, a telítési hatáshoz tartozó T_m pedig $84,8$ °C-nak adódott.

A BeF_x átmeneti hőmérsékletet növelő hatása mindenképpen a nukleotid analóg szerepnek tulajdonítható. Bizonyításképpen tesztmérést végeztünk azonos ionerősségű, de BeF_x -ot nem tartalmazó aktin-oldatokkal is. Az ionerősséget az 1. egyenlet alapján határoztuk meg. Az így kapott ionerősség értéket KCl hozzáadásával (BeF_x hiányában) állítottuk be. Az eredményként kapott kalorimetriás görbe T_m értéke is magasabb érték fele tolódott, de csak kb. 5 °C-kal ($T_m = 69,4$ °C), szemben a BeF_x kb. 15 °C-os eltolási értékével ($T_m = 84,8$ °C, 31. ábra, 32. ábra). Mindez azt bizonyítja, hogy a nukleotid analógok hatása specifikus, nem egyszerű ionerősség változást jelent!



32. ábra: BeF_x (foszfát-analóg) hatása F-aktinra. Az analóg hatásától mentes F-aktin denaturációs görbéje (—) BeF_x hatására eltolódott (—) és kiszélesedett. (10 mM NaF, 3 mM BeSO_4).

VIII.6. Toxinok hatása.

Visegrády és munkatársai^{109, 114} munkája alapján: a T_m értékek toxinhatás mellett a kötött kationtól függetlennek bizonyultak (6. táblázat), bár a toxinmentes filamentumok flexibilitása eltért egymástól. Ez arra utal, hogy termodinamikai szempontból mindkét toxin az aktin filamentumnak ugyanazt az állapotát hozza létre. Mg^{2+} -F-vázizom aktin esetén végzett FRET* vizsgálatok is a falloidin hasonló stabilizáló hatását írták le¹⁸.

6. táblázat: A toxinok nélkül-, illetve telítési toxinkoncentráció ([toxin] : [aktin protomer] = 1 : 1) esetén meghatározott T_m értékek Ca^{2+} - és Mg^{2+} -F-aktin estében. A toxin hiányában mutatott eltérés toxin jelenlétében relatíve kisebb¹⁰⁶.

alkalmazott toxin	T_m (°C)		E_A (kJ·mol ⁻¹)	
	Ca^{2+} -F-aktin	Mg^{2+} -F-aktin	Ca^{2+} -F-aktin	Mg^{2+} -F-aktin
toxin nélkül	67,3 ± 0,5	65,6 ± 0,5	533,4	556,8
falloidin	79,3 ± 0,6	78,4 ± 0,5	546,6	380,4
jasplakinolid	87,7 ± 0,7	88,6 ± 0,6	429,2	544,1

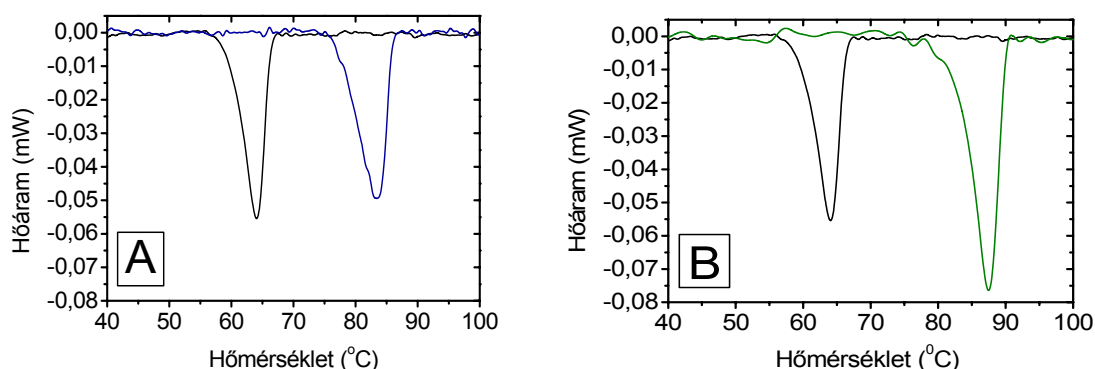
A korábbi vizsgálatok¹⁰⁹ kimutatták, hogy Ca^{2+} -F-aktinnal toxinkezelés nélkül kapott aktiválási energia értékéhez képest a jaspplakinolid kezelés hatására az aktiválási energia értéke csökkent, falloidin kezelés hatására azonban hibahatáron belül (2%) nőtt. Toxinmentes Mg^{2+} -F-aktin esetében az aktiválási energia értéke jaspplakinolid hatására hibahatáron belül csökkent (2%), falloidin hatására azonban számottevően; 2/3-ra csökkent.

A falloidin esetében tapasztalt denaturációs görbe csúcsainak szélesedése, valamint az aktiválási energia csökkenése arra utal, hogy a fehérjemátrixban történő változások eredményeképpen a protomerek közötti termikus kooperatív kapcsolat gyengül[†] (33. ábra, A).

Összességében megállapítható, hogy míg Ca^{2+} -F-aktin esetén a termikus kooperativitás nem változott számottevően, addig Mg^{2+} -F-aktin esetében a falloidin a termikus kooperativitás számottevő csökkenését idézte elő. A jaspplakinolid azonban mindkét kation kötése esetén a termikus kooperativitás növekedését okozta (33. ábra, B). A Mg^{2+} -F-aktinra vonatkozó megállapításokat saját méréseim is alátámasztották. Célunk nem a korábbi tapasztalatok megerősítése volt, hanem egy biztos toxin-hatás ismeret megszerzése volt, melyet a további mérések összehasonlítási alapjául használhattunk.

* FRET: fluoreszcencia rezonancia energia transzfer, spektroszkópián alapuló, molekulán belüli távolságmérésre alkalmas technika.

† A termikus kooperativitás nem azonos a toxinok okozta kooperatív hatással, ezért használjuk a termikus jelzőt.



33. ábra: Toxin-hatás telítési koncentráció esetén ($[aktin] : [toxin] = 1:1$).

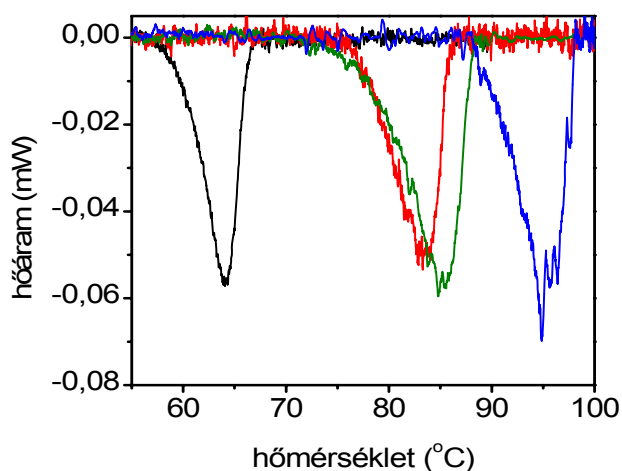
(MOPS pH 8,0; magas sókoncentráció, $(Mg^{2+})ATP$ -váizom- α -aktin)

A) ábra: DSC görbék falloidin jelenlétében (kék) és hiányában (fekete).

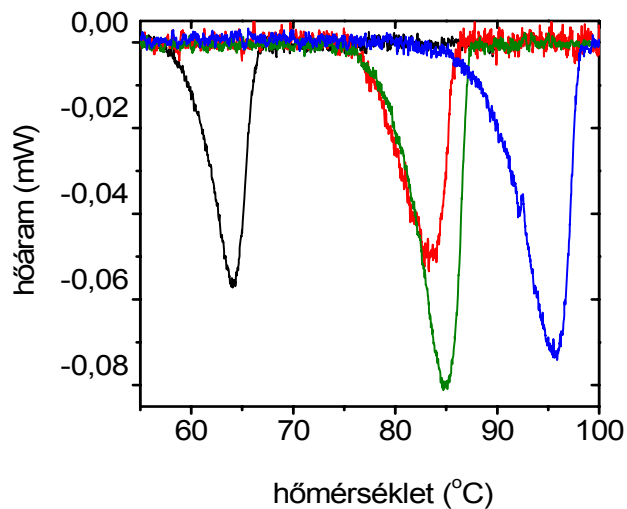
B) ábra: DSC görbék jaspalinolid jelenlétében (zöld) és hiányában (fekete).

VIII.7. A toxinok és a foszfát analógok együttes hatása

Az előző két fejezetben külön-külön tárgyalt toxin és nukleotid analógok által kifejtett stabilizáló hatások felvetették az ötletet, hogy kivizsgáljuk hatásmechanizmusuk azonosságát/különbségét. Nukleotid analógok és falloidin nélkül az aktin filamentumokra jellemző átmeneti hőmérséklet (T_m) 64,1 °C volt. A nukleotid analógok ($ADP \cdot BeF_x$: 84,8 °C; $ADP \cdot AlF_4$: 84,7 °C) vagy a falloidin (82,3 °C) kötődésének a hatására a T_m értéke megnőtt, ami azt mutatta, hogy megnőtt a filamentumok termikus stabilitása. Amikor mind a falloidint, mind a nukleotid analógokat az oldatokhoz adtuk, a filamentumok termikus stabilitása tovább nőtt (95,5 °C $ADP \cdot BeF_x$, és 95,9 °C $ADP \cdot AlF_4$ esetében) (34., 35. ábra).

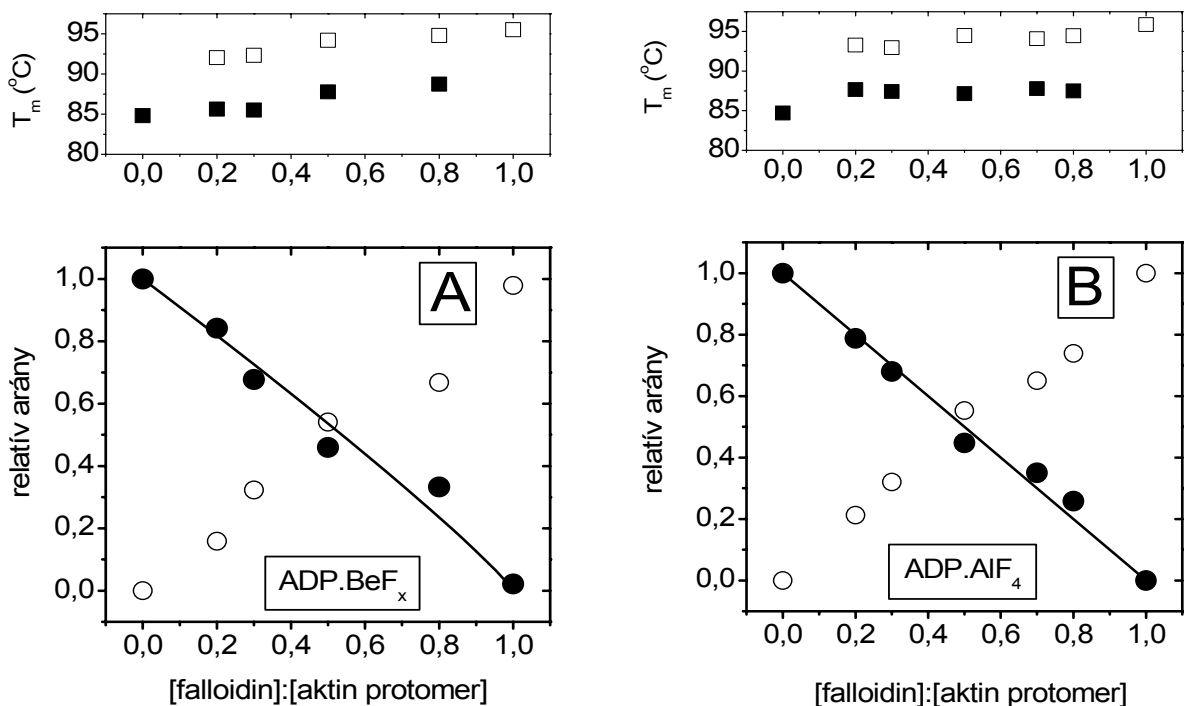


34. ábra: Toxin (falloidin) és foszfát-analóg (BeF_x) hatás. A kalorimetriás eredmények foszfát analógok és falloidin nélkül (—), falloidin jelenlétében (—), $ADP \cdot BeF_x$ jelenlétében (zöld vonal), valamint $ADP \cdot BeF_x$ és falloidin együttes jelenlétében (—). (69 μM ATP-vázizom- α -F-aktin; 10 mM NaF, 3 mM $BeSO_4$; magas sókoncentráció (100 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$); MOPS pH 7,3).



35. ábra: Toxin (falloidin) és foszfát-analóg (AIF₄) hatás. Nem befolyásolt (natur) F-aktin (—); falloidint kötő aktin (—); AIF₄-ot kötő aktin (—); AIF₄-ot és falloidint kötő aktin (—); (69 μM ATP-vázizom-α-F-aktin; 10 mM NaF, 3 mM ALCl₃; magas sókoncentráció (100 mM KCl, 2 mM MgCl₂); MOPS pH 7,3).

Az, hogy a nukleotid analógok által stabilizált filamentumok termikus stabilitását a falloidin tovább tudta növelni azt mutatta, hogy a falloidin és a nukleotid analógok más-más molekuláris mechanizmusokon keresztül fejtik ki hatásukat az aktin filamentumokra. Egy korábbi munkánkban ismertetett stratégia szerint¹¹⁴ megvizsgáltuk azt is, hogy a falloidin kooperatív módon kötődik-e az ADP·BeF_x- vagy ADP·AIF₄-aktin filamentumokhoz.



36. ábra: Falloidin hatás nukleotid analógok jelenlétében. A különböző falloidin koncentrációk mellett mért kalorimetriai adatok kiértékelése ADP·BeF_x (A) és ADP·AIF₄ (B) esetében. Tele körök jelölik a falloidin által nem befolyásolt aktin részarányát, üres körök a falloidin által stabilizált aktinét. A részarányokat a kalorimetriás görbék Gauss görbékre való bontásából számoltuk ki.

Azt tapasztaltuk, hogy ellentétben a nukleotid analógok nélkül polimerizált filamentumokon mértekkel^{109, 114}, az ADP·BeF_x- és ADP·AIF₄-aktin filamentumok nem kooperatív módon kötik a falloidint, azaz a falloidin hatása nem terjed át a szomszédos

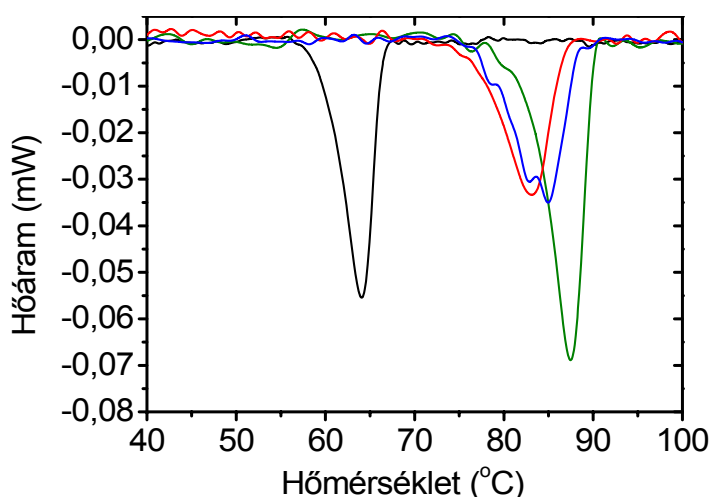
protomerekre. Megállapítottuk, hogy a falloidin által kiváltott konformációs módosulásoknak a filamentum hossza mentén való terjedése nem lehetséges a nukleotid analógok által stabilizált aktin filamentumok esetében¹⁵⁸.

A 14. egyenlet alkalmazásával a kooperatív kölcsönhatások révén stabilizált aktin monomerek száma $0,05 \pm 0,1$, illetve $-0,01 \pm 0,03$ volt ADP·BeF_x- és ADP·AlF₄-aktin filamentumok esetében¹⁵⁸ (36. ábra). Ezen paraméter értéke nukleotid analógok nélkül 3-nak adódott¹¹¹. A falloidin és ADP·AlF₄ hatása az aktin konformációjára hasonló az ADP·BeF_x-éhoz. A termodinamikai paraméterek alapján mindkét foszfátanalóg kötése ugyanazt a szerkezetet idézi elő a protomerekben¹⁵⁸.

7. Táblázat: Nukleotid analóg (ADP·BeF_x vagy ADP·AlF₄) és falloidin hatás az aktin filamentumra. Termodinamikai jellemzők: denaturációs hőmérséklet (T_m), kalorimetrikus entalpiaváltozás (ΔH_{cal}), entrópia változás (ΔS) és szabadenergia változás (ΔG) a DSC adatok analiziséből származnak. A szabadenergia változás 20 °C-on számolt érték.

Tulajdonság	– FALLOIDIN			+ FALLOIDIN		
	<i>aktin</i>	<i>ADP·BeF_x- aktin</i>	<i>ADP·AlF₄ - aktin</i>	<i>aktin</i>	<i>ADP·BeF_x- aktin</i>	<i>ADP·AlF₄- aktin</i>
T_m (°C)	64,1	84,8	84,7	82,3	95,5	95,9
ΔH_{cal} (kJ·mol ⁻¹)	706	1258	1240	845	1124	1196
ΔS (J·mol ⁻¹ ·K ⁻¹)	2095	3515	3466	2378	3051	3242
ΔG (kJ·mol ⁻¹) (25°C)	92	228	224	148	230	246

Jasplakinolidnak a nukleotid analóggal (ADP·BeF_x) telített aktin filamentumhoz való hozzáadása esetén a denaturációs görbe maximuma nem tolódott el magasabb hőmérsékletre (8. táblázat, 37. ábra), ami arra utal, hogy a jasplakinolid a nukleotid analóg hatását már nem tudja tovább erősíteni és valószínűleg azonos módon hatnak¹⁵⁹. A pontosabb meghatározáshoz nem termodinamikai jellegű kiegészítő vizsgálatok szükségesek.



3

7. ábra: BeF_x és jasplakinolid hatás DSC görbái. A mért DSC görbék közül a nem befolyásolt aktint a fekete vonal, a toxint kötő a piros, az analógot kötő populációt a kék vonal jelöli. A zölddel ábrázolt vonal a toxin és nukleotid analóg együttes hatása alatt álló F-aktint jelöli.

8. táblázat: BeF_x és jasplakinolid hatásának termodinamikai adatai. A toxin és nukleotid analóg hatásától mentes és azok egyedi, illetve együttes hatása alatt álló F-aktin termodinamikai adatai. (jaspla: jasplakinolid)				
	aktin	+BeF_x	+jaspla	+jaspla +BeF_x
<i>T_m</i> (°C)	67,4	83,7	87,3	85,6
ΔH_{cal} (kJ·mol⁻¹)	872	648	1007	622
ΔS (J·mol⁻¹·K⁻¹)	2587	1817	2775	1735
ΔG (kJ·mol⁻¹) (25°C)	114	115	193	113
E_A (kJ·mol⁻¹)	446	497	542	399

A termodinamikai adatok a DSC görbékből kiolvasott információkat támasztják alá, azaz mind a toxin, mind a nukleotid analóg külön-külön is stabilizálja az aktint, együttes hozzáadásakor azonban inkább a nukleotid analóghoz közeli értékeket kapunk. Az átmeneti hőmérséklet jelentősen eltolódik (67,4 °C-ról) a nukleotid analóg (83,7 °C) és a toxin hatására (87,3 °C). A nem kezelt aktin filamentum denaturálása közben létrejövő entrópiaváltozáshoz (2587 J/mol⁻¹K⁻¹) képest az analóg kötése kisebb (1817 J/mol⁻¹K⁻¹), toxin hatása pedig nagyobb (2775 J/mol⁻¹K⁻¹) változást eredményez. A toxinnal és nukleotid analóggal egyszerre kezelt filamentumok termodinamikai értékeinek hasonlósága a csak analógot kötő filamentum adataihoz annyit jelent, hogy a toxin a nukleotid analóg által kialakított ADP·P_i állapotú filamentum szerkezetében és termodinamikai stabilitásában változtatást már nem képes létrehozni.

IX. KÖVETKEZTETÉSEK

IZOFORMÁK:

Különbőség mutatható ki az eltérő izoformák polimerizációs dinamikája és hőstabilitása között. Méréseink is alátámasztják, hogy a csak néhány aminosavnyi eltérés is fontos különbséget eredményezhet a fehérjék fiziko-kémiai tulajdonságaiban, mely különbségek az aktin szövetspecifikus működésében is megnyilvánulnak. Összefoglalva; a mérési eredményeink szerint az eltérések a következők:

Polimerizációs kinetikát tekintve a szívizom izoforma érzékenyebb az ionerősség változására. Azonos környezeti feltételeket (kationok, *pH*, nukleotidok, ionerősség) biztosítva mindig lassabban polimerizál, mint a vázizom izoforma.

Kalorimetriás módszerrel alátámasztottuk a más mérés technikák által kimutatott eltérést, mely alapján az α -vázizom aktin stabilabbnak bizonyult az α -szívizom aktin izoformával összehasonlítva, főleg annak Ca^{2+} jelenlétében polimerizált formájában. A szívizom α -aktin termodinamikai jellemzőit tekintve is érzékenyebben reagál a környezeti feltételekre (kötött kétértékű kationok, *pH*, nukleotidok).

1. Az aktin molekulában meghatározott nagy- és alacsony affinitású kation-kötőhelyekhez bekötő ionok a termodinamikai stabilitást nem változtatták meg olyan mértékben, mint a többi kémiai ágens. A molekula mikrokörnyezetében jelen lévő kétértékű ionok (Mg^{2+} , Ca^{2+}) ugyan a molekulák élettartamát befolyásolják, azonban a hődenaturáció szempontjából azonos szerkezetet hoznak létre. Amennyiben a két különböző iont kötő filamentumot összehasonlítjuk, akkor a vázizom izoforma Ca^{2+} -iont kötő formája, ezzel szemben a szívizom izoformának a Mg^{2+} -kötő formája bizonyult stabilabbnak. Méginkább elhanyagolható az egyértékű ionok által kifejtett stabilizáló hatás, melyeknek csak mennyiségüktől függő polimerizációt serkentő (kritikus koncentrációt csökkentő) hatásukat mutattuk ki, de a termodinamikai paramétereiket nem befolyásolják.

2. A *pH* elhanyagolható hatása ellenére a fehérjék *in vivo* fiziológiás *pH* értékhez való optimalizációját, a *pH* 7,0-n (mindkét izoformánál) mérhető termodinamikai paraméterek nagyobb értékeivel támasztottuk alá. A fiziológiás *pH* környékén tehát mindkét α -aktin izoforma ellenállóbbnak bizonyult a hődenaturációval szemben, mint más *pH* értékeken.

3. Megállapítottuk, hogy kaloriméter segítségével az aktin α -szívizom- és α -vázizom izoformái ADP-t kötő állapotban megkülönböztethetők. Kimutattuk, hogy mind ADP, mind ATP jelenlétében az α -vázizom izoforma a termodinamikailag stabilabb, habár az ATP-t kötő izoformák stabilitása közötti eltérés kismértékű. Mindkét izoforma esetén a DSC görbék félértékszélessége nagyobb ADP-t kötő, mint ATP-t kötő formában. Ezek alapján az

intramolekuláris kooperáció mértékéről megállapítható, hogy ATP kötés esetén nagyobb, mint ADP-t kötő esetben. A szívizom eredetű ADP-t kötő aktin filamentum DSC görbében a két izoforma denaturációs csúcsa jól elkülöníthető, azaz ADP-t kötő esetben az izoformák termodinamikailag jól szeparálhatóan járulnak hozzá a teljes aktin populáció hődenaturációs folyamatához. A kötött nukleotidnak jelentős szerepe van tehát a filamentum élettani szerepének meghatározásában, hiszen a különböző stabilitású és rigiditású filamentumok eltérő módon vehetnek részt a celluláris folyamatokban és az izomkontrakcióban.

Akto-miozin komplex kinetikai paraméterei:

4. Az aktin és miozin kölcsönhatását meghatározó, általunk vizsgált kinetikai paraméterek közül az affinitási értékek (K_A és a K_{AD} és K_{DA}) eltérnek a két izoforma esetében. A különböző eredetű aktin és vázizom eredetű miozin-S1 kapcsolatát jellemző további kinetikai paraméterek szignifikánsan nem különböznek. A nagyobb affinitást a vázizom aktin izoforma mutatta, ami az általa alkotott akto-miozin komplex hatékonyabb működését eredményezi.

5. Az aktin indukálta S1 ATPáz aktivitás alapján az azonos szöveti eredetű miozin S1 és aktin esetén az aktiválás mértéke nagyobb, mint az eltérő eredetű S1-aktin kölcsönhatáskor. Összességében a vázizom eredetű aktin molekulák nagyobb aktivitást mutatnak a szívizom eredetűeknél. Ennek a különbségnek az alapja az előző pontban említett nagyobb mértékű affinitás lehet. Az azonos szöveti eredetű preferencia az akto-miozin komplex funkciójának optimalizálására szolgáló együttes adaptációt feltételez (mindkét molekula részéről).

Összességében megállapítható, hogy a szívizom α -aktin izoforma polimerizációs dinamikája mindkét nukleotidkötő állapotban lassabb, a kialakult filamentum az általunk vizsgált környezeti feltételek mellett termodinamikailag kevésbé stabil szerkezetet hoz létre, valamint az akto-miozin komplexet kisebb affinitással hozza létre, mint a vázizom α -aktin izoforma.

TOXINOK és NUKLEOTID-ANALÓGOK:

6. A korábbi mérésekkel azonos módon a falloidin és a jasplakinolid vázizom eredetű aktin filamentumra kifejtett közel azonos mértékű stabilizáló hatását mutattuk ki. Az F-aktin hődenaturációs stabilitásának növekedését bizonyítják a magasabb értékű termodinamikai paraméterek. Ezek az eredmények azonban csak alapjául szolgáltak a nukleotid állapotok vizsgálatának.

7. Megállapítottuk, hogy a falloidin és az egyes nukleotid analógok (BeF_x / AlF_4) eltérő

mechanizmusokkal stabilizálják az aktin filamentumokat.

- A falloidin által kiváltott stabilizáló hatás a nukleotid analóggal telített F-aktin esetén már nem kooperatív. A nukleotid analógokkal kialakított ADP·P_i állapot nem teszi lehetővé a toxinok által kifejtett hatás szomszédos protomerekre való áttérését a filamentumon belül.

Jasplakinolid – a falloidinnál tapasztaltakkal szemben – és nukleotid analóg jelenlétében additív stabilizáló hatás nem mutatkozik, ennek megfelelően interprotomer kooperativitás (kimutatása) egyáltalán nem lehetséges. A nukleotid analógnak a filamentum szerkezetét módosító hatása gátolta a jasplakinolid hatásának kifejtését. Ennek oka valószínűleg az, hogy a toxin filamentumhoz való affinitása erősen lecsökken az ADP·P_i állapotú szerkezet kialakulása esetén.

- A jasplakinolid és a falloidin hatása számos hasonlóságuk mellett és ellenére a fentiekben leírt eltérő vonásokkal (is) rendelkezik.

X. BIOLÓGIAI JELENTŐSÉG

Az aktin izoformák dinamikai-, termodinamikai és strukturális természetének eltérése hatással lehet az egyes izomszövet-típusok működésére, figyelembe véve, hogy az izoformák aránya eltér a szívizomban és a vázizomban. Ez a különbség az egyes izomszövet-típusok eltérő funkciójának felel meg. Ebből kifolyólag a szívizomban található természetes izoforma arány mechanikai-, vagy patológiás hatás következtében történő megváltozása a szívizomzat új feltételekhez való alkalmazkodását, vagy működési elégtelenségét okozhatja.

A kötött kationoknak a filamentum szerkezetének kialakításában nincs jelentős szerepe. Ezt a feltételezést támasztja alá, hogy a sejtek eleve igyekeznek állandó szinten tartani az ionok koncentrációját, ezáltal biztosítani a működéshez szükséges feltételeket (ionerősség, ozmotikus viszonyok). Ellenkező esetben, pl. a szarkomer összehúzódását befolyásoló Ca^{2+} -hullám befolyásolhatná a fiziológiásan inkább Mg^{2+} -ot kötő F-aktin szerkezetét és az aktomiozin komplex fizikokémiai paramétereit, ez azonban redundánsan feleslegessé tenné a Ca^{2+} -függő Tn-Tm komplex szabályozó szerepét. Összességében a kationok a polimerizáció folyamatában jelentősek, a dinamikus egyensúly beállta után szerepük a szerkezet megtartására korlátozódik. Jelentős szerkezetmódosító hatást nem feltételezünk.

A nukleotidoknak ennél jóval nagyobb szerepe van a kialakuló, illetve már kialakult F-aktin szerkezetben. Hatásuk azonban ezeknek is inkább a polimerizáció előtt azaz a monomer állapotban jelentős (ez a „treadmilling” egyik lényege), hiszen a filamentumban a nukleotid csere több nagyságrenddel kisebb, mint G-aktinban. Számos aktin-kötő molekula esetén kimutatták már, hogy másképpen köti az ATP-t ($\text{ADP}\cdot\text{P}_i$), illetve az ADP-t kötő filamentumot, -szakaszt, valamint nukleotidcsere sebességét befolyásoló hatásuk is lehet. Ezek alapján kijelenthető, hogy mind az aktin filamentum dinamikus megújulását, mind a filamentum térszerkezetét és ezeken keresztül a citoskeletális rendszerben mutatkozó funkcióképességét alapvetően befolyásolják.

A toxinok szerkezetstabilizáló hatása kooperatív, ha ATP-G-aktinból létrejövő ADP-F-aktinhoz adjuk, míg az ATP ($\text{ADP}\cdot\text{P}_i$) szerkezetet szintén stabilizáló nukleotid analógok hatására a filamentumban a toxin kiváltotta stabilizáló hatás az egyes protomerek között nem továbbtódik, illetve hatás sem tapasztalható. Mások által bizonyítottan a nukleotid analógok hatása is kooperatívan terjed az F-aktinban. A kooperativitás szerepe az lehet, hogy kis energiabefektetés hatására (kevés ATP jelenlétében) is nagyobb filamentum szakaszok szerkezeti változása jöhhessen létre, ezáltal minimalizálva az aktin funkcióképes szerkezetének fenntartásához/kialakításához szükséges energiát. A nukleotid analógoknál tapasztalt kooperáció hiányából arra következtethetünk, hogy a filamentum szempontjából az ATP/ $\text{ADP}\cdot\text{P}_i$ állapot egy olyan (fontos) stabil állapot, amelynél az aktin filamentum szerkezetének további kooperatív változása nem szükséges/lehetséges. Itt figyelembe kell vevünk, hogy a toxinok nem feltétlenül valós élettani állapotokról adnak információt, viszont

hiányukban és jelenlétükben tapasztalt eltérések mégis informálnak minket az aktin filamentum szerkezetéről és szerepéről.

Az izoformák között tapasztalt dinamikai és szerkezeti eltérés alapú termodinamikai különbségek a már említett szövetspecifikus funkciókhoz való alkalmazkodást szolgálják. A vázizmok gyors, nagymértékű erő kifejtéséhez a stabilabb szerkezetű filamentum párosul. Ez indokolja pl. egyes kardiomyopathiás betegeknél a megnövekedett terhelésű szívben tapasztalható vázizom izoforma arányának növekedését.

Eredményeink tükrében azonban az akto-miozin komplex izoformákon alapuló eltéréseit más szempontokból is szükséges megvizsgálni. Biológiai oldalról nézve a miozin izoformák szerepét, fizika szempontjából pedig az erő kifejtésbeli- és az akto-miozin ciklus fizikai paramétereinek eltérését érdemes tisztázni, hogy erre alapozva tovább lehessen lépni az komplexebb izomműködés szabályozásának pontosabb megértéséhez.

XI. FÜGGELÉK

XI.1. Vázizom aktin izoforma

F/1. Különböző állatfajok vázizom α -aktin izoformáinak aminosav-szekvenciája:

A vázizom izoformát a következő állatokra határozták meg: ember, patkány, egér, házi sertés, házi nyúl, szarvasmarha, csirke. Az ismétlések elkerülése miatt az aminosav szekvenciát csak egyszer tüntetem fel.

Swiss Prot kódok:

```
[ sp | P68133 | ACTS_HUMAN ] [ sp | P68136 | ACTS_RAT ]
[ sp | P68134 | ACTS_MOUSE ] [ sp | P68137 | ACTS_PIG ]
[ sp | P68138 | ACTS_BOVIN ] [ sp | P68135 | ACTS_RABIT ]
[ sp | P68139 | ACTS_CHICK ]
```

```

      10      20      30      40      50      60      70
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
MCDEDETTAL VCDNGSGLVK AGFAGDDAPR AVFPSIVGRP RHQGMVGMG QKDSYVGDEA QSKRGILTLLK

      80      90     100     110     120     130     140
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
YPIEHGIITN WDDMEKIWHH TFYNELRVAP EEHPTLLTEA PLNPKANREK MTQIMFETFN VPAMYVAIQA

     150     160     170     180     190     200     210
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
VLSLYASGRG TGIVLDSDGD VTHNVPIYEG YALPHAIMRL DLAGRDLTDY LMKILTERGY SFVTTAEREI

     220     230     240     250     260     270     280
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
VRDIKEKLCY VALDFENEMA TAASSSSLEK SYELPDGQVI TIGNERFRCP ETLFQPSFIG MESAGIHETT

     290     300     310     320     330     340     350
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
YNSIMKCDID IRKDLYANNV MSGGTTMYPG IADRMQKEIT ALAPSTMKIK IIAPPERKYS VWIGGSILAS

     360     370
....|....|....|....|...
LSTFQQMWIT KQEYDEAGPS IVHRKCF
```

Az aminosavak kódtáblázata:

Aminosav	Alanin	Cisztein	Aszparaginsav	Glutaminsav	Fenilalanin	Glicin	Hisztidin
Röv.	A	C	D	E	F	G	H
	Ala	Cys	Asp	Glu	Phe	Gly	His
Aminosav	Izoleucin	Lizin	Leucin	Metionin	Aszparagin	Prolin	Glutamin
Röv.	I	K	L	M	N	P	Q
	Ile	Lys	Leu	Met	Asn	Pro	Gln
Aminosav	Arginin	Szerin	Treonin	Valin	Triptofán	Tirozin	
Röv.	R	S	T	V	W	Y	
	Arg	Ser	Thr	Val	Trp	Tyr	

XI.2. Aktin izoformák

F/2. Szív- és vázizom α -aktin izoformák aminosav-szekvenciájának összehasonlítása (a kiemelt jelentőségű részletekre korlátozva):

Az aminosav-sorrendek a HUMAN GENE program keretében meghatározott és a SWISS-PROT¹, illetve a PDB² által rendelkezésre bocsátott adatbázis alapján, a ClustalX, illetve a BioEdit ingyenes analízáló programokkal készültek.

ACTS_HUMAN: Ember (Homo sapiens sapiens)

P68133|ACTS_HUMAN Actin, alpha skeletal muscle 1 - Homo sapiens (Human).

P68032|ACTC_HUMAN Actin, alpha cardiac muscle 1 - Homo sapiens (Human).

Az aktin izoformák aminosav-sorrendjének részlete az előbb feltüntetett izoforma sorrendnek megfelelően helyezkedik el, ahol az összehasonlítási alapot képező vázizom izoforma minden aminosavja fel van tüntetve, a szívizom izoformánál viszont csak az eltérések.

Az egyes humán izoformák általunk használt állatfajokban előforduló izoformákkal aminosavsorrendjükben teljes mértékben megegyeznek.

```

      10      20      30      40      50      60      70
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
MCDEDEETLAL VCDNGSGLVK AGFAGDDAPR AVFPSIVGRP RHQGVVMVGMG QKDSYVGDEA QSKRGILTLK
...DE.....

      80      90      100     110     120     130     140
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
YPIEHGIITN WDDMEKIWHH TFYNELRVAP EEHPTLLTEA PLNPKANREK MTQIMFETFN VPAMYVAIQA
.....

      150     160     170     180     190     200     210
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
VLSLYASGRT TGIVLDSGDG VTHNVPIYEG YALPHAIMRL DLAGRDLTDY LMKILTERGY SFVTTAEREI
.....

      220     230     240     250     260     270     280
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
VRDIKEKLCY VALDFENEMA TAASSSLEK SYELPDGQVI TIGNERFRCP ETLFQPSFIG MESAGIHETT
.....

      290     300     310     320     330     340     350
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
YNSIMKCDID IRKDYANNV LMSGGTTMPG IADRMQKEIT ALAPSTMKIK IIAPPERKYS VWIGGSILAS
.....

      360     370
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
LSTFQQMWIT SKQEYDEAGPS IVHRKCF
.....S.....

```

¹ Swiss Prot: <http://www.expasy.ch/cgi-bin/sprot-search-ful>

² PDB: RCSB Protein Data Bank; <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>

XI.3. Közlemények

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

József Orbán, Szulamit Halasi, Gábor Papp, Szilvia Barkó and Beáta Bugyi; THERMODYNAMIC CHARACTERIZATION OF DIFFERENT ACTIN ISOFORMS; Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, Vol. **82** (2005) pp. 287–290, IF: 1,425

Gábor Papp, Beáta Bugyi, Zoltán Ujfalusi, Szulamit Halasi and József Orbán; THE EFFECT OF pH ON THE THERMAL STABILITY OF α -ACTIN ISOFORMS; Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, Vol. **82** (2005) pp. 281–285, IF: 1,425

József Orbán, Kinga Pozsonyi, Krisztina Szarka, Szilvia Barkó, Emőke Bódis and Dénes Lőrinczy; THERMAL CHARACTERISATION OF ACTIN FILAMENTS PREPARED FROM ADP-ACTIN MONOMERS; Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, Vol. **84** (2006) 3, pp. 619-623, IF: 1,438

Roland Kardos, Andrea Vig, József Orbán, Gábor Hild, Miklós Nyitrai, Dénes Lőrinczy; THE EFFECT OF JASPLAKINOLIDE ON THE THERMODYNAMIC PROPERTIES OF ADP·BEF_x BOUND ACTIN FILAMENTS; Thermochemica Acta, Vol. **463** (2007), pp. 77-80, IF: 1,562 (2007-es)

József Orbán, Dénes Lőrinczy, Miklós Nyitrai, Gábor Hild; NUCLEOTIDE DEPENDENT DIFFERENCES BETWEEN THE α -SKELETAL AND α -CARDIAC ACTIN ISOFORMS; BBRC, Vol. **368** (2008), pp. 696-702, IF: 2,855 (2006-os)

József Orbán, Dénes Lőrinczy, Gábor Hild and Miklós Nyitrai; NON-COOPERATIVE STABILIZATION EFFECT OF PHALLOIDIN ON ADP·BEF_x- AND ADP·ALF₄-ACTIN FILAMENTS; Biochemistry, Vol. **47** (2008), pp. 4530-4534, IF: 3,368 (2007-es)

Az értekezésben nem szereplő közlemény:

Szulamit Halasi, Gábor Papp, Beáta Bugyi, Szilvia Barkó, József Orbán, Zoltán Ujfalusi, Balázs Visegrády; THE EFFECT OF PYRENE LABELLING ON THE THERMAL STABILITY OF ACTIN FILAMENTS; Thermochemica Acta, Vol. **445** (2006), 185-189, IF: 1,417

A cikkek összesített impakt faktora: 13,49

Az értekezéshez kapcsolódó poszterek:

Orbán József, Nyitrai Miklós, Somogyi Béla, Hild Gábor - **Aktin izoformák spektroszkópiai és funkcionális tulajdonságainak jellemzése** – kiemelt poszter és előadás, 34. Membrán-transzport Konferencia (2004, Sümeg)

József Orbán, Szulamit Halasi, Gábor Papp, Szilvia Barkó and Beáta Bugyi - **Thermodynamic characterization of different alpha-actin isoforms**. 16. Ulm-Freiburger Kalorimetrietage (2005, Freiberg, Németország)

Papp Gábor, Bugyi Beáta, Ujfalusi Zoltán, Halasi Szulamit és *Orbán József* - **The effect of pH on the thermal stability of alpha-actin isoforms**. 16. Ulm-Freiburger Kalorimetrietage (2005. március, Freiberg, Németország)

Halasi Szulamit, Papp Gábor, Bugyi Beáta, Barkó Szilvia, *Orbán József*, Ujfalusi Zoltán és Visegrády Balázs – **The Effect of Pyrene Labelling on the Thermal Stability of Actin Filaments**. 16. Ulm-Freiburger Kalorimetrietage (2005. március, Freiberg, Németország)

Beáta Bugyi, Gábor Papp, *József Orbán*, Szulamit Halasi and Balázs Visegrády - **The effect of toxins on the thermal stability of actin filaments as revealed by differential scanning calorimetry**. 16. Ulm-Freiburger Kalorimetrietage (2005, Freiberg, Németország)

Orbán József, Pozsonyi Kinga, Lőrinczy Dénes, Nyitrai Miklós, Hild Gábor és Somogyi Béla - **Aktin izoformák jellemzése a differenciális pásztázó kalorimetria módszerével**. 35. Membrán-transzport konferencia (Sümeg, 2005. május)

József Orbán, Miklós Nyitrai, Katalin Ajtai, Béla Somogyi, Gábor Hild - **Spectroscopic and functional differences between actin isoforms**. FEBS Special Meeting on 'Cytoskeletal dynamics: from cell biology to development and disease (Helsinki, Finnország, 2005. 06. 12-16.)

Roland Kardos, Andrea Vig, *József Orbán*, Gábor Hild, Miklós Nyitrai and Dénes Lőrinczy - **The Effect of Jasplakinolide on the Thermodynamic Properties of ADP-BeF_x Bound Actin Filaments**. 17. Ulm-Freiburger Kalorimetrietage (2007, Freiberg, Németország)

József Orbán, Andrea Vig, Roland Kardos, Béla Somogyi, Gábor Hild, Dénes Lőrinczy and Miklós Nyitrai - **The Effect of Phalloidin on the Thermal Properties of the Skeletal ADP.BeF_x-F-actin**. Time and Space Resolved Methods in Molecular Biophysics Conference (Hünfeld, Németország, 2007. 05. 17-20.)

Vig Andrea, Kardos Roland, *Orbán József*, Nyitrai Miklós, Lőrinczy Dénes, Hild Gábor - **Aktin filamentumok termodinamikai viselkedése ADP.BeF_x jelenlétében.** 37. Membrán-Transzport Konferencia (Sümege, 2007. 05. 22-25.)

József Orbán, Andrea Vig, Roland Kardos, Béla Somogyi, Gábor Hild, Miklós Nyitrai and Dénes Lőrinczy - **Thermodynamic Characterization of BeF_x.ADP-F-Actin in the Presence of Different Cytotoxins as Revealed by Differential Scanning Calorimetry.** Regional Biophysical Conference (Balatonfüred, 2007. augusztus)

Orbán József, Lőrinczy Dénes, Hild Gábor, Somogyi Béla és Nyitrai Miklós - **A falloidin nem-kooperatív módon kötődik az ADP.BeF_x- és ADP.AIF₄-aktin filamentumokhoz.** Magyar Biokémiai Egyesület (MBKE) 2007. évi vándorgyűlése (Debrecen, 2007. 08. 26.-29)

Dudás Réka, Vig Andrea, Kupi Tünde, *Orbán József*, Nyitrai Miklós, Hild Gábor - **ADP-F-aktin hatása a vázizom-S1 ATPáz aktivitására.** 38. Membrán-Transzport Konferencia (Sümege, 2008. 05. 20-23.)

Andrea Vig, Réka Dudás, Tünde Kupi, *József Orbán*, Gábor Hild, Dénes Lőrinczy and Miklós Nyitrai - **The Effect of Phalloidin on cardiac ADP- Actin Filaments.** XV. International Conference on Biological Calorimetry (Pécs, 2008 május 24-30.)

Réka Dudás, Tünde Kupi, Andrea Vig, *József Orbán*, Miklós Nyitrai, Dénes Lőrinczy and Gábor Hild - **The effect of phalloidin on skeletal muscle ADP-actin filaments.** XV. International Conference on Biological Calorimetry (Pécs, 2008 május 24-30.)

Tünde Kupi, Réka Dudás, Andrea Vig, *József Orbán*, Miklós Nyitrai, Gábor Hild and Dénes Lőrinczy - **Effect of AMP PNP as a Nucleotide Analogue on Actin Filaments.** XV. International Conference on Biological Calorimetry (Pécs, 2008 május 24-30.)

XII. IRODALOMJEGYZÉK

Az alábbi irodalomjegyzékben a [TOXIN] jelölésű cikkek jasplakinoliddal, vagy falloidinnal kapcsolatosak. A [**] jelölésű hivatkozások dos Remedios [32] áttekintő cikkéből valók, de pontos megadásukat fontosnak találtam az irodalom követhetősége szempontjából.

-
1. [**] Engelhardt, V. A. & Lyubimpova, M. N. Myosin and adenosinetriphosphatase. *Nature* 144, 668 (1939).
 2. Straub, F. B. Actin. Studies from the Institute of Medical Chemistry, Szeged 2, 3:15 (1942).
 3. Feuer, G., Molnár, F., Pettkó, E. & Straub, F. B. Studies on the composition and polymerisation of actin. *Hung. Acta Physiol.* 1, 150-163 (1948).
 4. Straub, F. B. & Feuer, G. [Adenosine triphosphate, the functional group of actin.]. *Kísérl. Orvostud.* 2, 141-51 (1950).
 5. Hanson, J. & Lowy, J. The Structure Of Actin Filaments And The Origin Of The Axial Periodicity In The I-Substance Of Vertebrate Striated Muscle. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 160, 449-60 (1964).
 6. Moore, P. B., Huxley, H. E. & DeRosier, D. J. Three-dimensional reconstruction of F-actin, thin filaments and decorated thin filaments. *J. Mol. Biol.* 50, 279-95 (1970).
 7. Spudich, J. A., Huxley, H. E. & Finch, J. T. Regulation of skeletal muscle contraction. II. Structural studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin. *J. Mol. Biol.* 72, 619-32 (1972).
 8. Wakabayashi, T., Huxley, H. E., Amos, L. A. & Klug, A. Three-dimensional image reconstruction of actin-tropomyosin complex and actin-tropomyosin-troponin T-troponin I complex. *J. Mol. Biol.* 93, 477-97 (1975).
 9. [**] Suck, D., Kabsch, W. & Mannherz, H. G. Three-dimensional structure of the complex of skeletal muscle actin and bovine pancreatic DNase I at 6-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 4319-23 (1981).
 10. Kabsch, W., Mannherz, H. G., Suck, D., Pai, E. F. & Holmes, K. C. Atomic structure of the actin:DNase I complex. *Nature* 347, 37-44 (1990).
 11. [**] McLaughlin, P. J., Gooch, J. T., Mannherz, H. G. & Weeds, A. G. Structure of gelsolin segment 1-actin complex and the mechanism of filament severing. *Nature* 364, 685-92 (1993).
 12. [**] Schutt, C. E., Myslik, J. C., Rozycki, M. D., Goonesekere, N. C. & Lindberg, U. The structure of crystalline profilin-beta-actin. *Nature* 365, 810-6 (1993).
 13. Baum, J., Papenfuss, A. T., Baum, B., Speed, T. P. & Cowman, A. F. Regulation of apicomplexan actin-based motility. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 621-8 (2006).
 14. Nyitrai, M., Szent-Györgyi, A. G. & Geeves, M. A. Interactions of the two heads of scallop (*Argopecten irradians*) heavy meromyosin with actin: influence of calcium and nucleotides. *Biochem. J.* 370, 839-48 (2003).
 15. Nyitrai, M., Szent-Györgyi, A. G. & Geeves, M. A. A kinetic model of the cooperative binding of calcium and ADP to scallop (*Argopecten irradians*) heavy meromyosin. *Biochem. J.* 365, 19-30. (2002).
 16. Nyitrai, M. & Geeves, M. A. Adenosine diphosphate and strain sensitivity in myosin motors. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 359, 1867-77 (2004).
 17. Nyitrai, M., Hild, G., Lukács, A., Bódis, E. & Somogyi, B. Conformational distributions and proximity relationships in the rigor complex of actin and myosin subfragment-1. *J. Biol. Chem.* 275, 2404-9 (2000).

18. Nyitrai, M., Hild, G., Bódis, E., Lukács, A. & Somogyi, B. Flexibility of myosin-subfragment-1 in its complex with actin as revealed by fluorescence resonance energy transfer. *Eur. J. Biochem.* 267, 4334-8 (2000).
19. Titus, M. A. Myosins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5, 77-81 (1993).
20. Sellers, J. R. Myosins (ed. Sheterline, P.) (Oxford University Press, Oxford, 1999).
21. [**] Rayment, I. et al. Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. *Science* 261, 58-65 (1993).
22. Engelhardt, V. A. & Lyubimpova, M. N. Myosin and adenosinetriphosphatase. *Nature* 144, 668 (1939).
23. Müller, H. *Biochim. Biophys. Acta* 40, 187-9 (1960).
24. Itakura, S. et al. Force-generating domain of myosin motor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196, 1504-10 (1993).
25. Spudich, J. A. & Watt, S. The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin. *J. Biol. Chem.* 246, 4866-71 (1971).
26. Cooke, R. The mechanism of muscle contraction. *CRC Crit Rev Biochem* 21, 53-118 (1986).
27. Huxley, H. & Hanson, J. Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. *Nature* 173, 973-6 (1954).
28. Huxley, A. F. & Niedergerke, R. Structural changes in muscle during contraction; interference microscopy of living muscle fibres. *Nature* 173, 971-3 (1954).
29. Nyitrai, M., Stafford, W. F., Szent-Györgyi, A. G. & Geeves, M. A. Ionic interactions play a role in the regulatory mechanism of scallop heavy meromyosin. *Biophys. J.* 85, 1053-62 (2003).
30. Thomas, D. D. & Remedios, C. G. *Actin-Myosin and Actin-Based Regulation* (ed. Hennig, W.) (Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2002).
31. Geeves, M. A. & Holmes, K. C. The molecular mechanism of muscle contraction. *Adv. Protein Chem.* 71, 161-93 (2005).
32. dos Remedios, C. G. & Moens, P. D. Actin and the actomyosin interface: a review. *Biochim. Biophys. Acta* 1228, 99-124 (1995).
33. Geeves, M. A. Stretching the lever-arm theory. *Nature* 415, 129-31 (2002).
34. Geeves, M. A. The dynamics of actin and myosin association and the crossbridge model of muscle contraction. *Biochem. J.* 274 (Pt 1), 1-14 (1991).
35. Geeves, M. A. & Holmes, K. C. Structural mechanism of muscle contraction. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 687-728 (1999).
36. Chowdhury, H. H., Popoff, M. R. & Zorec, R. Actin cytoskeleton and exocytosis in rat melanotrophs. *Pflugers Arch.* 439, R148-9. (2000).
37. Pollard, T. D. Actin cytoskeleton. Missing link for intracellular bacterial motility? *Curr. Biol.* 5, 837-40 (1995).
38. Pollard, T. D., Blanchoin, L. & Mullins, R. D. Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29, 545-576. (2000).
39. Pollard, T. D. & Borisy, G. G. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112, 453-65. (2003).
40. Elzinga, M., Collins, J. H., Kuehl, W. M. & Adelstein, R. S. Complete amino-acid sequence of actin of rabbit skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 70, 2687-91 (1973).
41. Estes, J. E., Selden, L. A., Kinosian, H. J. & Gershman, L. C. Tightly-bound divalent cation of actin. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 13, 272-84 (1992).
42. Milligan, R. A., Whittaker, M. & Safer, D. Molecular structure of F-actin and location of surface binding sites. *Nature* 348, 217-21 (1990).

43. Holmes, K. C., Popp, D., Gebhard, W. & Kabsch, W. Atomic model of the actin filament. *Nature* 347, 44-9 (1990).
44. Sheterline, P., Clayton, J. & Sparrow, J. *Actin* (Oxford University Press, USA, 1999).
45. Miki, M., O'Donoghue, S. I. & Dos Remedios, C. G. Structure of actin observed by fluorescence resonance energy transfer spectroscopy. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 13, 132-45 (1992).
46. Nonomura, Y., Katayama, E. & Ebashi, S. Effect of phosphates on the structure of the actin filament. *J. Biochem.* 78, 1101-4 (1975).
47. Orlova, A. & Egelman, E. H. Structural basis for the destabilization of F-actin by phosphate release following ATP hydrolysis. *J. Mol. Biol.* 227, 1043-53. (1992).
48. Crawford, K. et al. Mice lacking skeletal muscle actin show reduced muscle strength and growth deficits and die during the neonatal period. *Mol. Cell Biol.* 22, 5887-96 (2002).
49. McHugh, K. M., Crawford, K. & Lessard, J. L. A comprehensive analysis of the developmental and tissue-specific expression of the isoactin multigene family in the rat. *Dev. Biol.* 148, 442-58 (1991).
50. Rubenstein, P. A. The functional importance of multiple actin isoforms. *Bioessays* 12, 309-15 (1990).
51. Garrels, J. I. & Gibson, W. Identification and characterization of multiple forms of actin. *Cell* 9, 793-805 (1976).
52. Elzinga, M., Maron, B. J. & Adelstein, R. S. Human heart and platelet actins are products of different genes. *Science* 191, 94-5 (1976).
53. Collins, J. H. & Elzinga, M. The primary structure of actin from rabbit skeletal muscle. Completion and analysis of the amino acid sequence. *J. Biol. Chem.* 250, 5915-20 (1975).
54. Elzinga, M. & Collins, J. H. The primary structure of actin from rabbit skeletal muscle. Five cyanogen bromide peptides, including the NH₂ and COOH termini. *J. Biol. Chem.* 250, 5897-905 (1975).
55. Vandekerckhove, J. & Weber, K. The complete amino acid sequence of actins from bovine aorta, bovine heart, bovine fast skeletal muscle, and rabbit slow skeletal muscle. A protein-chemical analysis of muscle actin differentiation. *Differentiation* 14, 123-33 (1979).
56. Drummond, D. R., Hennessey, E. S. & Sparrow, J. C. Stability of mutant actins. *Biochem. J.* 274 (Pt 1), 301-3 (1991).
57. Strzelecka-Golaszewska, H., Zmorzynski, S. & Mossakowska, M. Bovine aorta actin. Development of an improved purification procedure and comparison of polymerization properties with actins from other types of muscle. *Biochim. Biophys. Acta* 828, 13-21 (1985).
58. Mossakowska, M. & Strzelecka-Golaszewska, H. Identification of amino acid substitutions differentiating actin isoforms in their interaction with myosin. *Eur. J. Biochem.* 153, 373-81 (1985).
59. Steinmetz, M. O. et al. Polymerization, three-dimensional structure and mechanical properties of Dictyostelium versus rabbit muscle actin filaments. *J. Mol. Biol.* 303, 171-84. (2000).
60. Vandekerckhove, J., Bugaisky, G. & Buckingham, M. Simultaneous expression of skeletal muscle and heart actin proteins in various striated muscle tissues and cells. A quantitative determination of the two actin isoforms. *J. Biol. Chem.* 261, 1838-43 (1986).
61. Bergen, H. R., 3rd, Ajtai, K., Burghardt, T. P., Nepomuceno, A. I. & Muddiman, D. C. Mass spectral determination of skeletal/cardiac actin isoform ratios in cardiac muscle. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17, 1467-71 (2003).

62. Huxley, A. F. A high-power interference microscope. *J. Physiol.* 125, 11-3P (1954).
63. [**] Perry, S. V. Vertebrate tropomyosin: distribution, properties and function. *J. Muscle. Res. Cell. Motil.* 22, 5-49 (2001).
64. McKillop, D. F. & Geeves, M. A. Regulation of the interaction between actin and myosin subfragment 1: evidence for three states of the thin filament. *Biophys. J.* 65, 693-701 (1993).
65. [**] Maytum, R., Lehrer, S. S. & Geeves, M. A. Cooperativity and switching within the three-state model of muscle regulation. *Biochemistry* 38, 1102-10 (1999).
66. Ohtsuki, I., Maruyama, K. & Ebashi, S. Regulatory and cytoskeletal proteins of vertebrate skeletal muscle. *Adv. Protein. Chem.* 38, 1-67 (1986).
67. Pollard, T. D. & Cooper, J. A. Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions. *Annu. Rev. Biochem.* 55, 987-1035 (1986).
68. Blanchoin, L. & Pollard, T. D. Hydrolysis of ATP by polymerized actin depends on the bound divalent cation but not profilin. *Biochemistry* 41, 597-602 (2002).
69. Pollard, T. D. Polymerization of ADP-actin. *J. Cell. Biol.* 99, 769-77 (1984).
70. Pollard, T. D. Rate constants for the reactions of ATP- and ADP-actin with the ends of actin filaments. *J. Cell. Biol.* 103, 2747-54 (1986).
71. Dancker, P. & Low, I. Dual effect of Ca^{2+} on ultrasonic ATPase activity and polymerization of muscle actin. *Biochim. Biophys. Acta.* 484, 169-76 (1977).
72. Hild, G., Nyitrai, M., Belágyi, J. & Somogyi, B. The influence of divalent cations on the dynamic properties of actin filaments: a spectroscopic study. *Biophys. J.* 75, 3015-22 (1998).
73. Orlova, A. & Egelman, E. H. Structural dynamics of F-actin: I. Changes in the C terminus. *J. Mol. Biol.* 245, 582-97 (1995).
74. Orlova, A., Prochniewicz, E. & Egelman, E. H. Structural dynamics of F-actin: II. Cooperativity in structural transitions. *J. Mol. Biol.* 245, 598-607 (1995).
75. Carlier, M. F., Pantaloni, D. & Korn, E. D. The effects of Mg^{2+} at the high-affinity and low-affinity sites on the polymerization of actin and associated ATP hydrolysis. *J. Biol. Chem.* 261, 10785-92 (1986).
76. Carlier, M. F., Pantaloni, D. & Korn, E. D. Fluorescence measurements of the binding of cations to high-affinity and low-affinity sites on ATP-G-actin. *J. Biol. Chem.* 261, 10778-84 (1986).
77. Kopp, S. J., Barron, J. T. & Tow, J. P. Phosphatic metabolites, intracellular pH and free $[\text{Mg}^{2+}]$ in single, intact porcine carotid artery segments studied by ^{31}P -NMR. *Biochim. Biophys. Acta* 1055, 27-35 (1990).
78. Nyitrai, M., Hild, G., Belágyi, J. & Somogyi, B. Spectroscopic study of conformational changes in subdomain 1 of G-actin: influence of divalent cations. *Biophys. J.* 73, 2023-32 (1997).
79. Nyitrai, M., Hild, G., Belágyi, J. & Somogyi, B. The flexibility of actin filaments as revealed by fluorescence resonance energy transfer. The influence of divalent cations. *J. Biol. Chem.* 274, 12996-3001 (1999).
80. Nyitrai, M., Hild, G., Lakos, Z. & Somogyi, B. Effect of Ca^{2+} - Mg^{2+} exchange on the flexibility and/or conformation of the small domain in monomeric actin. *Biophys. J.* 74, 2474-81 (1998).
81. Pollard, T. D., Goldberg, I. & Schwarz, W. H. Nucleotide exchange, structure, and mechanical properties of filaments assembled from ATP-actin and ADP-actin. *J. Biol. Chem.* 267, 20339-45 (1992).
82. Carlier, M. F. Measurement of P_i dissociation from actin filaments following ATP hydrolysis using a linked enzyme assay. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 143, 1069-75 (1987).
83. Carlier, M. F. Nucleotide hydrolysis in cytoskeletal assembly. *Curr. Opin. Cell. Biol.*

- 3, 12-7 (1991).
84. Carlier, M. F. et al. The hydrolysis of ATP that accompanies actin polymerization is essentially irreversible. *FEBS Lett.* 235, 211-4 (1988).
 85. Zheng, X., Diraviyam, K. & Sept, D. Nucleotide effects on the structure and dynamics of actin. *Biophys. J.* 93, 1277-83 (2007).
 86. Janmey, P. A. et al. Effect of ATP on actin filament stiffness. *Nature* 347, 95-9 (1990).
 87. Nyitrai, M., Hild, G., Hartvig, N., Belágyi, J. & Somogyi, B. Conformational and dynamic differences between actin filaments polymerized from ATP- or ADP-actin monomers. *J. Biol. Chem.* 275, 41143-9 (2000).
 88. Carlier, M. F. Actin: protein structure and filament dynamics. *J. Biol. Chem.* 266, 1-4 (1991).
 89. Carlier, M. F. & Pantaloni, D. Binding of phosphate to F-ADP-actin and role of F-ADP-Pi-actin in ATP-actin polymerization. *J. Biol. Chem.* 263, 817-25 (1988).
 90. Otterbein, L. R., Graceffa, P. & Dominguez, R. The crystal structure of uncomplexed actin in the ADP state. *Science* 293, 708-11. (2001).
 91. Cleveland, D. W. Treadmilling of tubulin and actin. *Cell* 28, 689-91 (1982).
 92. Neuhaus, J. M., Wanger, M., Keiser, T. & Wegner, A. Treadmilling of actin. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 4, 507-27 (1983).
 93. Wegner, A. Treadmilling of actin at physiological salt concentrations. An analysis of the critical concentrations of actin filaments. *J. Mol. Biol.* 161, 607-15 (1982).
 94. Moraczewska, J., Strzelecka-Golaszewska, H., Moens, P. D. & dos Remedios, C. G. Structural changes in subdomain 2 of G-actin observed by fluorescence spectroscopy. *Biochem. J.* 317 (Pt 2), 605-11 (1996).
 95. Sablin, E. P. et al. How does ATP hydrolysis control actin's associations? *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 99, 10945-7 (2002).
 96. [TOXIN] Isambert, H. et al. Flexibility of actin filaments derived from thermal fluctuations. Effect of bound nucleotide, phalloidin, and muscle regulatory proteins. *J. Biol. Chem.* 270, 11437-44 (1995).
 97. Combeau, C. & Carlier, M. F. Probing the mechanism of ATP hydrolysis on F-actin using vanadate and the structural analogs of phosphate BeF_3 and AlF_4 . *J. Biol. Chem.* 263, 17429-36 (1988).
 98. Mühlrad, A., Cheung, P., Phan, B. C., Miller, C. & Reisler, E. Dynamic properties of actin. Structural changes induced by beryllium fluoride. *J. Biol. Chem.* 269, 11852-8. (1994).
 99. [TOXIN] Bubb, M. R., Senderowicz, A. M., Sausville, E. A., Duncan, K. L. & Korn, E. D. Jasplakinolide, a cytotoxic natural product, induces actin polymerization and competitively inhibits the binding of phalloidin to F-actin. *J. Biol. Chem.* 269, 14869-71 (1994).
 100. [TOXIN] Low, I., Dancker, P. & Wieland, T. Stabilization of F-actin by phalloidin. Reversal of the destabilizing effect of cytochalasin B. *FEBS Lett.* 54, 263-5 (1975).
 101. [TOXIN] Low, I., Dancker, P. & Wieland, T. Stabilization of actin polymer structure by phalloidin: ATPase activity of actin induced by phalloidin at low pH. *FEBS Lett.* 65, 358-60 (1976).
 102. [TOXIN] Low, I. & Wieland, T. The interaction of phalloidin. Some of its derivatives, and of other cyclic peptides with muscle actin as studied by viscosimetry. *FEBS Lett.* 44, 340-3 (1974).
 103. [TOXIN] Wieland, T. Modification of actins by phallotoxins. *Naturwissenschaften* 64, 303-9 (1977).
 104. [TOXIN] Wieland, T. The toxic peptides from Amanita mushrooms. *Int. J. Pept. Protein Res.* 22, 257-76 (1983).
 105. [TOXIN] Lee, E., Shelden, E. A. & Knecht, D. A. Formation of F-actin aggregates in

- cells treated with actin stabilizing drugs. *Cell. Motil. Cytoskeleton* 39, 122-33 (1998).
106. [TOXIN] Dancker, P., Low, I., Hasselbach, W. & Wieland, T. Interaction of actin with phalloidin: polymerization and stabilization of F-actin. *Biochim. Biophys. Acta.* 400, 407-14 (1975).
 107. [TOXIN] Faulstich, H., Schafer, A. J. & Weckauf, M. The dissociation of the phalloidin-actin complex. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* 358, 181-4. (1977).
 108. [**][TOXIN] Burtnick, L. D. Modification of actin with fluorescein isothiocyanate. *Biochim. Biophys. Acta* 791, 57-62 (1984).
 109. [TOXIN] Visegrády, B., Lőrinczy, D., Hild, G., Somogyi, B. & Nyitrai, M. The effect of phalloidin and jasplakinolide on the flexibility and thermal stability of actin filaments. *FEBS Lett.* 565, 163-6. (2004).
 110. [TOXIN] Pinaev, G., Schutt, C. E. & Lindberg, U. The effect on actin ATPase of phalloidin and tetramethylrhodamine phalloidin. *FEBS Lett.* 369, 144-8 (1995).
 111. [TOXIN] Steinmetz, M. O., Goldie, K. N. & Aebi, U. A correlative analysis of actin filament assembly, structure, and dynamics. *J. Cell Biol.* 138, 559-74 (1997).
 112. [TOXIN] Wendel, H. & Dancker, P. Influence of phalloidin on ATP hydrolysis during actin polymerization. *Biochim. Biophys. Acta* 915, 205-9 (1987).
 113. [TOXIN] Wendel, H. & Dancker, P. Influence of phalloidin on both the nucleation and the elongation phase of actin polymerization. *Biochim. Biophys. Acta* 915, 199-204 (1987).
 114. [TOXIN] Visegrády, B., Lőrinczy, D., Hild, G., Somogyi, B. & Nyitrai, M. A simple model for the cooperative stabilisation of actin filaments by phalloidin and jasplakinolide. *FEBS Lett.* 579, 6-10 (2005).
 115. [TOXIN] Barden, J. A., Miki, M., Hambly, B. D. & Dos Remedios, C. G. Localization of the phalloidin and nucleotide-binding sites on actin. *Eur. J. Biochem.* 162, 583-8 (1987).
 116. [TOXIN] Faulstich, H., Zobeley, S., Heintz, D. & Drewes, G. Probing the phalloidin binding site of actin. *FEBS Lett.* 318, 218-22 (1993).
 117. [TOXIN] Steinmetz, M. O., Stoffler, D. & Aebi, U. Actin: dissecting the structural basis of its oligomerization, polymerization, and polymorphism. *Biol. Bull.* 194, 337-40; discussion 340-1 (1998).
 118. [**][TOXIN] Barden, J. A. et al. Structure and function of contractile proteins in muscle fibres. *Aust Paediatr J* 24 Suppl 1, 31-3 (1988).
 119. [**][TOXIN] Chantler, P. D. & Gratzer, W. B. Effects of specific chemical modification of actin. *Eur. J. Biochem.* 60, 67-72 (1975).
 120. [**][TOXIN] Miki, M., Barden, J. A., dos Remedios, C. G., Phillips, L. & Hambly, B. D. Interaction of phalloidin with chemically modified actin. *Eur. J. Biochem.* 165, 125-30 (1987).
 121. [**][TOXIN] Milligan, R. A., Whittaker, M. & Safer, D. Molecular structure of F-actin and location of surface binding sites. *Nature* 348, 217-21 (1990).
 122. [**][TOXIN] Moens, P. D., 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, 13102-8 (1994).
 123. [**][TOXIN] Popp, D. & Holmes, K. C. X-ray diffraction studies on oriented gels of vertebrate smooth muscle thin filaments. *J. Mol. Biol.* 224, 65-76 (1992).
 124. [**][TOXIN] Warrick, H. M. et al. In vitro methods for measuring force and velocity of the actin-myosin interaction using purified proteins. *Methods Cell Biol.* 39, 1-21 (1993).
 125. [TOXIN] De La Cruz, E. M. & Pollard, T. D. Kinetics and thermodynamics of phalloidin binding to actin filaments from three divergent species. *Biochemistry* 35,

- 14054-61 (1996).
126. [TOXIN] Falcigno, L. et al. Phalloidin synthetic analogues: structural requirements in the interaction with F-actin. *Chemistry* 7, 4665-73 (2001).
 127. [TOXIN] Bubb, M. R., Spector, I., Beyer, B. B. & Fosen, K. M. Effects of jasplakinolide on the kinetics of actin polymerization. An explanation for certain in vivo observations. *J. Biol. Chem.* 275, 5163-70 (2000).
 128. [TOXIN] Crews, J., Manes & Boehler. Jasplakinolide, a cyclodepsipeptide from the marine sponge, *Jaspis* sp. *Tetrahedron Letters* 27, 2797-2800 (1986).
 129. [TOXIN] Gallo, G., Yee, H. F., Jr. & Letourneau, P. C. Actin turnover is required to prevent axon retraction driven by endogenous actomyosin contractility. *J. Cell. Biol.* 158, 1219-28 (2002).
 130. [TOXIN] Ou, G. S., Chen, Z. L. & Yuan, M. Jasplakinolide reversibly disrupts actin filaments in suspension-cultured tobacco BY-2 cells. *Protoplasma* 219, 168-75 (2002).
 131. [TOXIN] Senderowicz, A. M. et al. Jasplakinolide's inhibition of the growth of prostate carcinoma cells in vitro with disruption of the actin cytoskeleton. *J. Natl. Cancer Inst.* 87, 46-51 (1995).
 132. [TOXIN] Stingl, J., Andersen, R. J. & Emerman, J. T. In vitro screening of crude extracts and pure metabolites obtained from marine invertebrates for the treatment of breast cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 30, 401-6 (1992).
 133. Strzelecka-Golaszewska, H., Moraczewska, J., Khaitlina, S. Y. & Mossakowska, M. Localization of the tightly bound divalent-cation-dependent and nucleotide-dependent conformation changes in G-actin using limited proteolytic digestion. *Eur. J. Biochem.* 211, 731-42 (1993).
 134. Houk, T. W., Jr. & Ue, K. The measurement of actin concentration in solution: a comparison of methods. *Anal Biochem* 62, 66-74 (1974).
 135. Cooper, J. A., Walker, S. B. & Pollard, T. D. Pyrene actin: documentation of the validity of a sensitive assay for actin polymerization. *J. Muscle. Res. Cell. Motil.* 4, 253-62 (1983).
 136. Trentham, D. R., Bardsley, R. G., Eccleston, J. F. & Weeds, A. G. Elementary processes of the magnesium ion-dependent adenosine triphosphatase activity of heavy meromyosin. A transient kinetic approach to the study of kinases and adenosine triphosphatases and a colorimetric inorganic phosphate assay in situ. *Biochem. J.* 126, 635-44 (1972).
 137. Cooper, J. A. & Pollard, T. D. Methods to measure actin polymerization. *Methods. Enzymol.* 85 Pt B, 182-210 (1982).
 138. Kouyama, T. & Mihashi, K. Fluorimetry study of N-(1-pyrenyl)iodoacetamide-labelled F-actin. Local structural change of actin protomer both on polymerization and on binding of heavy meromyosin. *Eur. J. Biochem.* 114, 33-8 (1981).
 139. Gutfreund, H. *Kinetics for the Life Sciences* (Cambridge University Press, 2002).
 140. Cooper, A., Nutley, M. A. & Wadood, A. in *Protein-Ligand Interactions: hydrodynamics and calorimetry* (eds. Harding, S. E. & Chowdhury, B. Z.) 287-318 (Oxford University Press, Oxford, 2001).
 141. Golitsina, N. L. et al. Differential scanning calorimetric study of the complexes of modified myosin subfragment 1 with ADP and vanadate or beryllium fluoride. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 17, 475-85 (1996).
 142. Levitsky, D. I. et al. Differential scanning calorimetric studies on myosin and actin. *Biochemistry (Mosc)* 63, 322-33 (1998).
 143. Lőrinczy, D. & Belágyi, J. Scanning calorimetric and EPR studies on thermal stability of actin. *Thermochimica Acta* 259, 153-164. (1995).
 144. Lőrinczy, D., Könczöl, F., Gaszner, B. & Belágyi, J. Structural stability of actin filaments studied by DSC and EPR. *Thermochimica Acta* 322, 95-100. (1998).

145. Lőrinczy, D. *The Nature of Biological Systems as Revealed by Thermal Methods* (ed. Lőrinczy, D.) (Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, 2004).
146. Lumry, R. & Eyring, H. Conformation changes of proteins. *J. Phys. Chem.* 58, 110-120 (1954).
147. Sanchez-Ruiz, J. M., Lopez-Lacomba, J. L., Cortijo, M. & Mateo, P. L. Differential scanning calorimetry of the irreversible thermal denaturation of thermolysin. *Biochemistry* 27, 1648-52 (1988).
148. Sanchez-Ruiz, J. M. et al. Analysis of the thermal unfolding of porcine procarboxypeptidase A and its functional pieces by differential scanning calorimetry. *Eur. J. Biochem.* 176, 225-30 (1988).
149. Bertazon, A., Tian, G. H., Lamblin, A. & Tsong, T. Y. Enthalpic and entropic contributions to actin stability: calorimetry, circular dichroism, and fluorescence study and effects of calcium. *Biochemistry* 29, 291-98. (1990).
150. Bugyi, B., Papp, G., Halasi, S. & Visegrády, B. The Effect of Toxins on the Thermal Stability of Actin Filaments by Differential Scanning Calorimetry. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 82, 275-279 (2005).
151. Conibear, P. B. & Geeves, M. A. Cooperativity between the two heads of rabbit skeletal muscle heavy meromyosin in binding to actin. *Biophys J* 75, 926-37 (1998).
152. Strzelecka-Golaszewska, H., Wozniak, A., Hult, T. & Lindberg, U. Effects of the type of divalent cation, Ca²⁺ or Mg²⁺, bound at the high-affinity site and of the ionic composition of the solution on the structure of F-actin. *Biochem. J.* 316 (Pt 3), 713-21 (1996).
153. Hild, G., Nyitrai, M. & Somogyi, B. Intermonomer flexibility of Ca- and Mg-actin filaments at different pH values. *Eur. J. Biochem.* 269, 842-9 (2002).
154. Orbán, J., Halasi, S., Papp, G., Barkó, Sz. & Bugyi, B. Thermodynamic characterization of different actin isoforms. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 82, 287-290 (2005).
155. Papp, G., Bugyi, B., Ujfalusi, Z., Halasi, S. & Orbán, J. The effect of pH on the thermal stability of α -actin isoforms. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 82, 281-285 (2005).
156. Orbán, J. et al. Thermal characterisation of actin filaments prepared from ADP-actin monomers. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 84, 619-623 (2006).
157. Orbán, J., Lőrinczy, D., Nyitrai, M. & Hild, G. Nucleotide dependent differences between the alpha-skeletal and alpha-cardiac actin isoforms. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 368, 696-702 (2008).
158. Orbán, J., Lőrinczy, D., Hild, G. & Nyitrai, M. Noncooperative stabilization effect of phalloidin on ADP.BeF_x- and ADP.AlF₄-actin filaments. *Biochemistry* 47, 4530-4 (2008).
159. Kardos, R. et al. The Effect of Jasplakinolide on the Thermodynamic Properties of ADP•BeF_x Bound Actin Filaments. *Thermochimica Acta* 463, 77-80 (2007).

XIII. ÁBRAJEGYZÉK

1. ábra: Az elektronmikroszkópos képek alapján kialakított kettős alfa-hélix szerkezet modellje.	7
2. ábra: A miozin molekula.	9
3. ábra: Az aktin és miozin kapcsolatának erősen kötő állapotaira vonatkozó egyensúlyi viszonyai.	11
4. ábra: A globuláris aktin monomer (jobb) és a filamentum (bal) térbeli szerkezete.	12
5. ábra: Az izom anatómiai- és élettani felépítése.	17
6. ábra: A vékony filamentum felépítése és szabályozó szerepe.	19
7. ábra: Aktin polimerizáció lépései.	19
8. ábra: Aktin monomer szalagdiagramja: ATP-vel a nukleotidkötő zsebben.	24
9. ábra: A falloidin szerkezeti képlete.	26
10. ábra: Jasplakinolid molekula szerkezeti képlete.	27
11. ábra: Aktin SDS-PAGE gélelektroforézis eredménye.	33
12. ábra: Pirén-jelölt G-aktin (G) és F-aktin (F) spektrumai.	35
13. ábra: A csatolt ATPáz aktivitás mérési módszer molekuláris folyamatábrája (enzimekkel).	36
14. ábra: 365 nm-es gerjesztéssel felvett, 5%-os pirén jelölésű aktin emissziós spektrumának (375-500 nm) a polimerizáció hatására bekövetkező időbeli változása.	37
15. ábra: Falloidint nem telítési koncentrációban tartalmazó BeF_x -F-aktin DSC görbéje ([aktin]: [falloidin] = 1:0,8).	43
16. ábra: Az aktivációs energia számításához szükséges Sanchez-Ruiz ábrázolás.	44
17. ábra: A toxinhatás kooperativitási modellje.	45
18. ábra: Kooperativitási modell.	46
19. ábra: Az aktin aktiválta S1 ATPáz aktivitás vizsgálat eredménye.	47
20. ábra: Az S1 ATP indukálta disszociációja az F aktinról.	48
21. ábra: Az S1 affinitása az ADP-hez aktin jelenlétében: K_{AD} meghatározása.	49
22. ábra: K_A meghatározása vázizom-S1 és eltérő eredetű F-aktinok esetén.	50
23. ábra: K_{DA} meghatározása vázizom-S1 és eltérő eredetű F-aktinok esetén.	51
24. ábra: Polimerizációs teszt különböző ionerősség hatására.	53
25. ábra: Mg^{2+} -iont kötő szívizom- α -aktin és vázizom- α -aktin denaturációs görbéi.	53
26. ábra: Ca^{2+} -iont kötő aktin izoformák DSC görbéi.	54

ÁBRAJEGYZÉK

27. ábra: Aktin izoformák DSC görbéje - pH hatás.	55
28. ábra: Nukleotidok hatása az aktin izoformák polimerizációjára.	55
29. ábra: Nukleotid hatás vázizom-F-aktin denaturációs görbéi alapján.	56
30. ábra: Aktivációs energia számolás Sanchez-Ruiz-féle ábrázolás segítségével.	59
31. ábra: BeF_x hatás vizsgálata titrálással.	60
32. ábra: BeF_x (foszfát-analóg) hatása F-aktinra.	61
33. ábra: Toxin-hatás telítési koncentráció esetén ([aktin] : [toxin] = 1:1).	62
34. ábra: Toxin (falloidin) és foszfát-analóg (BeF_x) hatás.	63
35. ábra: Toxin (falloidin) és foszfát-analóg (AlF_4) hatás.	63
36. ábra: Falloidin hatás nukleotid analógok jelenlétében.	64

József Orbán, Szulamit Halasi, Gábor Papp, Szilvia Barkó and Beáta Bugyi

THERMODYNAMIC CHARACTERIZATION OF DIFFERENT ACTIN ISOFORMS

Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, Vol. 82 (2005) pp. 287–290

THERMODYNAMIC CHARACTERIZATION OF DIFFERENT ACTIN ISOFORMS

J. Orbán, Sz. Halasi, G. Papp, Szilvia Barkó and Beáta Bugyi*

University of Pécs, Faculty of Medicine, Department of Biophysics, Pécs, Szigeti str. 12, 7624, Hungary

The thermodynamic properties of the cardiac and skeletal α -actin isoforms were studied to characterise the molecular bases of the functional differences between them with the method of differential scanning calorimetry (DSC). The thermal properties of the actin filaments were described in the presence of calcium and magnesium ions as well. Based on the calculated free energy changes the α -cardiac actin filaments appeared to be more stable in its physiologically more relevant, magnesium saturated form. The magnesium saturated form of the α -cardiac actin filaments seemed to be more stable compared to the calcium saturated form of it. The enthalpy and entropy changes could differentiate between the α -cardiac and α -skeletal actin isoforms and between the calcium and magnesium saturated cardiac actin isoforms as well.

Our results can demonstrate that the few differences between the amino acid sequences of the α -actin isoforms have an influence on the thermal properties and maybe on the function of these proteins as well.

Keywords: calorimetry, cardiac actin, divalent cation, skeletal actin, thermodynamics

Introduction

Actin is a highly conservative protein occurring in high abundance in all eukaryotes playing central role in the function of living systems. Apart from its essential role in the muscle contraction it can also be found as a part of the cytoskeleton, as it is the major component of the microfilament system. The cytoskeleton has central role in the life of the living cells as it is involved in the intracellular traffic [1], the endo- and exocytosis [2] and cell movements [3] as well.

The two forms of the actin within the cells are the monomer (globular or G-actin) and polymer (filamentous or F-actin) forms. Six isoforms of actin can be distinguished in the nature based on their isoelectric points (three α -isoforms: $pI=5.40$; one α -isoform: $pI=5.42$; two α -isoforms: $pI=5.44$) [4]. The β - and γ -isoforms can be found mainly in non-muscle cells [4]. The α -isoforms are found mainly in the muscle tissues and can differ only in a few of their amino acid residues. It is hypothesised that each of the muscle isoactin is specially adapted to the function of its respective tissue and the minor variations among them have developmental and/or physiological relevance [5]. The different isoforms of actin with different origins can differ in their thermodynamic stability [6, 7] and/or polymerisation properties as well [8–11].

In a special case of heart diseases the α -skeletal actin accumulated while the occurrence of the α -cardiac isoforms decreased subsequently [12]. This finding can indicate the importance of the tissue specific presence of the actin isoforms [13].

The actin can be sensitive to the physico-chemical properties of the environment [14, 15]. Its dynamic and structural properties can be influenced by the bound divalent cations [14–19], the pH of the surroundings [20], the shifting from monomer to its filamentous forms [21] and its binding of different ligands [22–26] as well.

The differential scanning calorimetry is a powerful biophysical tool to characterise the thermal properties of proteins [27–31]. It is widely used in the measurements of the calorimetric features of the muscle actin and its associates as well [32–34]. The measured thermal parameters can inform us about the thermodynamic properties of a protein [35–39]. One of the important information from the heat absorption curves is the temperature point where the change of enthalpy gets to its maximum (T_m). This temperature can be correlated to the thermal stability of the protein as higher T_m value can represent a more stable protein structure [25, 26]. The calculated values of free enthalpy changes can inform us about the stability of the protein (a higher value of the free enthalpy change can be correlated with a more stable protein structure).

Materials and methods

Actin preparation

Both the cardiac and skeletal actin was prepared from acetone-dried muscle powder prepared by the method of Feuer *et al.* [40]. The method of Spudich and Watt [41]

* Author for correspondence: beata.bugyi@aok.pte.hu

was followed to prepare the actin isoforms from bovine heart (cardiac α -isoform) and rabbit skeletal muscle (skeletal α -isoform). The samples were stored in a buffer containing 4 mM MOPS, 0.1 mM CaCl₂, 0.2 mM ATP, 0.5 mM 2-mercaptoethanol (MEA) and 0.005% NaN₃ at pH 8.0. The concentration of the actin was determined by using a Shimadzu UV-2100 type spectrophotometer. The absorption coefficient was 0.63 mg⁻¹ mL cm at 290 nm [42]. The relative molecular mass of 42.300 Da was used during the calculations [43].

The bound calcium was replaced with magnesium on the actin monomers before polymerization when it was necessary by the method of Strzelecka and colleagues [44]. The exchange was carried out by incubating the actin at 20°C for 5 min in the presence of 0.2 mM EGTA and 0.1 mM MgCl₂. The polymerization of G-actin was induced by adjusting the final concentrations to 2 mM MgCl₂ or CaCl₂ and 100 mM KCl in the sample solutions. All the samples were polymerized at room temperature for at least two hours before the measurements.

Differential scanning calorimetry

The thermal denaturation of the α -actin filaments was examined in a SETARAM Micro DSC-II calorimeter, between 0–100°C. The heating and cooling rate were set to 0.3 K min⁻¹. The actin concentration was 69 μ M (3 mg mL⁻¹) in the case of the α -cardiac isoform and 58 μ M (2.5 mg mL⁻¹) in the case of the α -skeletal actin isoform. The polymerization buffer solution was used as the reference with no protein content during the DSC measurements. The DSC curves were analyzed with the Microcal Origin 6.0 software.

The calorimetric enthalpy changes (ΔH) were calculated by integrating the different heat absorption curves. The transition entropy changes were calculated with the following formula:

$$\Delta S = \Delta H / T_m \quad (1)$$

where ΔS is the maximal entropy change, ΔH is the enthalpy change and the T_m is the peak transition temperature.

The free enthalpy change was calculated as

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (2)$$

where ΔG is the free enthalpy change at the applied temperature T . The free enthalpy changes were calculated at the temperature of 20°C during the analysis of the data.

Results and discussion

The thermal denaturation of magnesium and calcium saturated α -cardiac and α -skeletal actin filaments were measured at pH 8.0. The T_m values and the free enthalpy changes were correlated to the thermal stability of the protein matrix [25, 26]. The calorimetric enthalpy and the transition entropy changes were used to confirm the presence of the differences between the different forms of the actin isoforms.

The DSC curves of the calcium saturated form of the α -cardiac and α -skeletal actins showed that the melting temperature (T_m) was lower in the case of the α -actin prepared from the cardiac muscle tissue by 0.86°C (Fig. 1a). The enthalpy, entropy and free energy changes were shown to be higher in the case of the α -skeletal actin isoform (Table 1).

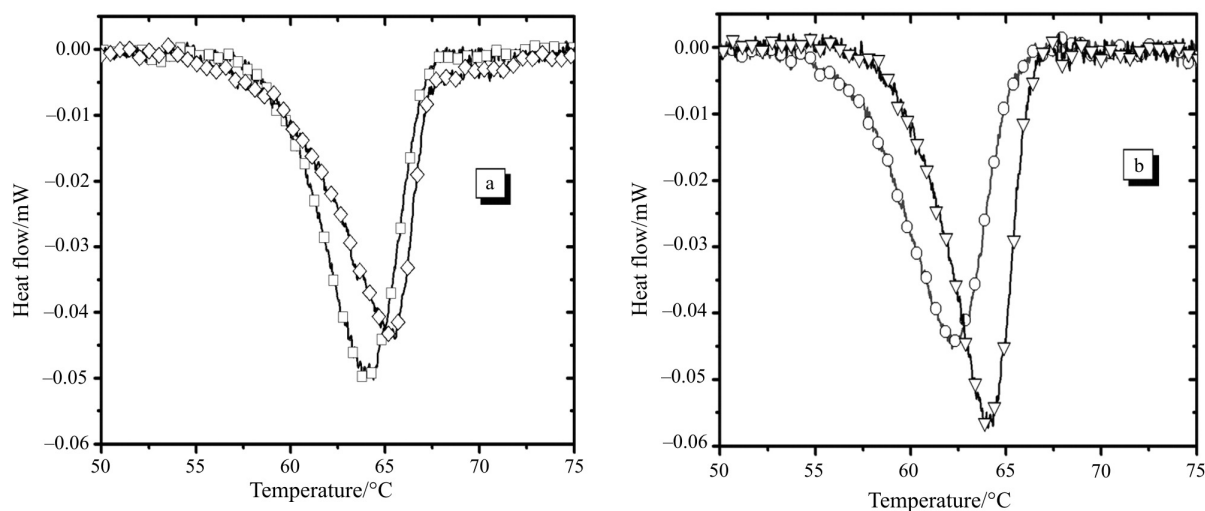


Fig. 1 The thermal denaturation curve of the α -cardiac and α -skeletal actin filaments in the presence of calcium and magnesium ions at pH 8.0. a – The α -cardiac Ca-actin is represented with (\square), the α -skeletal Ca-actin has a symbol of (\diamond); b – The α -cardiac Mg-actin is indicated with (\circ) and the α -skeletal Mg-actin has a symbol of (∇)

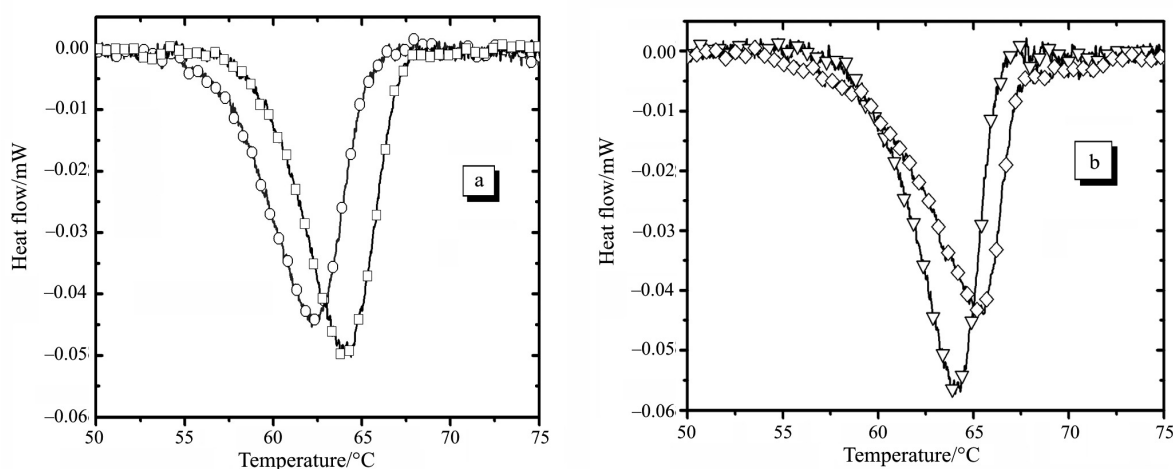


Fig. 2 The thermal denaturation curve of the calcium and magnesium bound α -actin isoforms with cardiac or skeletal origin, recorded at pH 8.0. a – The calcium bound α -cardiac actin is represented with (\square), the magnesium bound α -cardiac actin has a symbol of (\circ); b – The calcium saturated α -skeletal actin is indicated with (\diamond) and the magnesium bound α -skeletal actin has a symbol of (∇)

Table 1 The thermodynamic properties of the α -cardiac and α -skeletal actin filaments in the presence of calcium and magnesium ions at pH 8.0. The free energy change (ΔG) was calculated at 20°C

	α -cardiac actin		α -skeletal actin	
	Ca^{2+}	Mg^{2+}	Ca^{2+}	Mg^{2+}
$T_m/^\circ\text{C}$	64.39	62.17	65.25	64.05
$\Delta H/\text{kJ mole}^{-1}$	578.75	768.40	889.9	872
$\Delta S/\text{J K}^{-1}$	1715	2293	2631	2587
$\Delta G/\text{J mole}^{-1}$	76.26	96.55	119.02	114.00

In the case of the magnesium-actin filaments the T_m values proved to be also lower for the α -cardiac actin isoform compared to the results for α -skeletal actins (Fig. 1b). The difference between the melting points was 1.88°C. The calculated values of enthalpy, entropy and free energy changes were very similar in both cases of the isoforms (Table 1).

Although the variation in the T_m values are too small to interpret any differences of the free energy changes support the assumption that the α -cardiac isoform is probably less stable compared to the α -skeletal actin isoform. This difference between the isoforms was present more prominently when the actin was polymerized in the presence of calcium ions.

In the case of the α -cardiac actin isoform the T_m value was higher by 2.22°C when the protein was saturated with calcium (Fig. 2a). The thermodynamic parameters showed a higher value for the enthalpy and entropy changes in the case of the magnesium saturated α -cardiac isoform showing a difference between the effects of the divalent cations (Table 1). The determined value of the free energy change was higher in the magnesium bound actin filament indicating a more stable structure in the case of Mg-actin filament.

When the α -skeletal isoform was investigated, the difference between the melting points of the

Ca-actin and Mg-actin filaments was only 1.2°C (Fig. 2b). The thermodynamic parameters were nearly identical for the calcium and magnesium saturated form of the α -skeletal actin. Based on these data it appears that skeletal actin is not sensitive to the ionic composition of the applied buffer.

The larger difference between the value of the calculated free energy of the Ca-actin and Mg-actin filaments in the case of the α -cardiac actin can imply that the cardiac actin can react more dynamically to the different ionic conditions around the protein matrix.

Conclusions

We were able to find differences between the thermodynamic properties of α -cardiac and α -skeletal actin isoforms with the method of differential scanning calorimetry in the presence of calcium and magnesium ion as well. The shifts in the melting temperature of the different forms of actin saturated with different cations were too small to interpret. The α -cardiac actin filaments seemed to be thermodynamically less stable compared to the α -skeletal actin isoform based on the free energy changes of the isoforms mainly in the calcium saturated form of the protein. The

enthalpy and entropy changes could also reflect differences in the presence of calcium ions and this difference was smaller when the solution contained magnesium ion. Differences between the calcium and magnesium saturated forms of the protein was only detected in the case of α -cardiac actin where the filament seemed to be more stable when magnesium ions were present in the solution. The skeletal actin was not sensitive to the cationic composition of the surrounding solution.

These results can demonstrate that the few differences between the amino acid sequences of the different α -actin isoforms can modify the thermal stability of the actin isoforms. These differences may have functional consequences as the thermal properties can influence fundamentally the work of the proteins in a living system.

Acknowledgements

This work was supported by the Hungarian Academy of Sciences. The SETARAM Micro DSC-II used in the experiments was purchased with fund provided by the National Research Foundation Grant CO-272.

References

- H. Liu and A. Bretscher, *J. Cell. Biol.*, 118 (1992) 285.
- H. H. Chowdhury, M. R. Popoff and R. Zorec, *Pflugers Arch.*, 439 (2000) R148.
- F. Rivero, B. Koppel, B. Peracino, S. Bozzaro, F. Siegert, C. J. Weijer, M. Schleicher, R. Albrecht and A. A. Noegel, *J. Cell. Sci.*, 109 (1996) 2679.
- J. I. Garrels and W. Gibson, *Cell.*, 9 (1976) 793.
- K. Crawford, R. Flick, L. Close, D. Shelly, R. Paul, K. Bove, A. Kumar and J. Lessard, *Mol. Cell. Biol.*, 22 (2002) 5887.
- D. R. Drummond, E. S. Hennessey and J. C. Sparro, *Biochem. J.*, 274 (Pt 1) (1991) 301.
- H. Strzelecka-Golaszewska, S. Venyaminov, S. Zmorzynski and M. Mossakowska, *Eur. J. Biochem.*, 147 (1985) 331.
- A. M. Gordon, M. A. LaMadrid, Y. Chen, Z. Luo and P. B. Chase, *Biophys. J.*, 72 (1997) 1295.
- E. S. Hennessey, D. R. Drummond and J. C. Sparrow, *Eur. J. Biochem.*, 197 (1991) 345.
- S. Khaitlina, *FEBS Lett.*, 198 (1986) 221.
- H. Strzelecka-Golaszewska, S. Zmorzynski and M. Mossakowska, *Biochim. Biophys. Acta*, 828 (1985) 13.
- H. R. Bergen, K. Ajtai, T. P. Burghardt, A. I. Nepomuceno and D. C. Muddiman, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 17 (2003) 1467.
- K. M. McHugh, K. Crawford and J. L. Lessard, *Dev. Biol.*, 148 (1991) 442.
- A. Orlova and E. H. Egelman, *J. Mol. Biol.*, 245 (1995) 582.
- A. Orlova, E. Prochniewicz and E. H. Egelman, *J. Mol. Biol.*, 245 (1995) 598.
- G. Hild, M. Nyitrai, J. Belágyi and B. Somogyi, *Biophys. J.*, 75 (1998) 3015.
- M. Nyitrai, G. Hild, J. Belágyi and B. Somogyi, *Biophys. J.*, 73 (1997) 2023.
- M. Nyitrai, G. Hild, J. Belágyi and B. Somogyi, *J. Biol. Chem.*, 274 (1999) 12996.
- M. Nyitrai, G. Hild, Z. Lakos and B. Somogyi, *Biophys. J.*, 74 (1998) 2474.
- G. Hild, M. Nyitrai and B. Somogyi, *Eur. J. Biochem.*, 269 (2002) 842.
- G. Hild, M. Nyitrai, R. Gharavi, B. Somogyi and J. Belágyi, *J. Photochem. Photobiol. B*, 35 (1996) 175.
- M. Nyitrai, G. Hild, E. Bodis, A. Lukacs and B. Somogyi, *Eur. J. Biochem.*, 267 (2000) 4334.
- M. Nyitrai, G. Hild, N. Hartvig, J. Belágyi and B. Somogyi, *J. Biol. Chem.*, 275 (2000) 41143.
- M. Nyitrai, G. Hild, A. Lukács, E. Bodis and B. Somogyi, *J. Biol. Chem.*, 275 (2000) 2404.
- B. Visegrády, D. Lőrinczy, G. Hild, B. Somogyi and M. Nyitrai, *FEBS Lett.*, 565 (2004) 163.
- B. Visegrády, D. Lőrinczy, G. Hild, B. Somogyi and M. Nyitrai, *FEBS Lett.*, 579 (2005) 6.
- D. Lőrinczy and J. Belágyi, *Thermochim. Acta*, 259 (1995) 153.
- D. Lőrinczy and J. Belágyi, *Thermochim. Acta*, 296 (1997) 161.
- D. Lőrinczy, F. Könczöl, L. Farkas, J. Belágyi and C. Schick, *Thermochim. Acta*, 377 (2001) 205.
- T. Dergez, F. Konczol, N. Farkas, J. Belágyi and D. Lőrinczy, *J. Therm. Anal. Cal.*, 80 (2005) 445.
- M. Kiss, J. Belágyi and D. Lőrinczy, *J. Therm. Anal. Cal.*, 72 (2003) 573.
- D. Lőrinczy and J. Belágyi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 217 (1995) 592.
- D. Lőrinczy, F. Könczöl, B. Gaszner and J. Belágyi, *Thermochim. Acta*, 322 (1998) 95.
- D. Lőrinczy and J. Belágyi, *Thermochim. Acta*, 343 (2000) 27.
- D. Lőrinczy and J. Belágyi, *Eur. J. Biochem.*, 268 (2001) 5970.
- D. Lőrinczy, N. Hartvig and J. Belágyi, *J. Therm. Anal. Cal.*, 64 (2001) 651.
- D. Lőrinczy, N. Hartvig, N. Farkas and J. Belágyi, *J. Therm. Anal. Cal.*, 65 (2001) 351.
- M. Kiss, F. Könczöl, N. Farkas, D. Lőrinczy and J. Belágyi, *J. Therm. Anal. Cal.*, 65 (2001) 627.
- D. Lőrinczy, M. Kiss and J. Belágyi, *J. Therm. Anal. Cal.*, 72 (2003) 565.
- G. Feuer, F. Molnár, E. Pettko and F. B. Straub, *Hung. Acta Physiol.*, 1 (1948) 150.
- J. A. Spudich and S. Watt, *J. Biol. Chem.*, 246 (1971) 4866.
- T. W. Houk Jr. and K. Ue, *Anal. Biochem.*, 62 (1974) 66.
- M. Elzinga, J. H. Collins, W. M. Kuehl and R. S. Adelstein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70 (1973) 2687.
- H. Strzelecka-Golaszewska, J. Moraczewska, S. Y. Khaitlina and M. Mossakowska, *Eur. J. Biochem.*, 211 (1993) 731.

DOI: 10.1007/s10973-005-7108-7

Gábor Papp, Beáta Bugyi, Zoltán Ujfalusi, Szulamit Halasi and József Orbán

THE EFFECT OF pH ON THE THERMAL STABILITY OF α -ACTIN ISOFORMS

Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, Vol. 82 (2005) pp. 281–285

THE EFFECT OF pH ON THE THERMAL STABILITY OF α -ACTIN ISOFORMS

G. Papp², Beáta Bugyi², Z. Ujjfalusi¹, Sz. Halasi² and J. Orbán^{2*}

¹Research Group for Fluorescence Spectroscopy, Office for Academy Research Groups Attached to Universities

²University of Pécs, Faculty of Medicine, Department of Biophysics, Pécs, Szigeti str. 12, 7624, Hungary

The effect of pH was characterised on the thermal stability of magnesium saturated skeletal and cardiac α -actin isoforms with differential scanning calorimetry (DSC) at pH 7.0 and 8.0. The calorimetric curves were further analysed to calculate the enthalpy and transition entropy changes. The activation energy was also determined to describe the energy consumption of the initiation of the thermal denaturation process.

Although the difference in T_m values is too small to interpret the difference between the α -actin isoforms, the values of the activation energy indicated that the α -skeletal actin is probably more stable compared to the α -cardiac actin. The difference in the activation energies indicated that lowering the pH can produce a more stable protein matrix in both cases of the isoforms. The larger range of the difference in the values of the activation energies suggested that the α -cardiac actin is probably more sensitive to the change of the pH compared to the α -skeletal actin.

Keywords: actin isoform, activation energy, calorimetry, divalent cation, pH

Introduction

The 42.3 kDa actin was described first by Straub and his colleagues [1]. The atomic structure of this protein is available since 1990 in a 2.8 Å resolution [2]. The monomer (globular or G-actin) and the polymer form (filamentous or F-actin) of this protein can be identified within the cells of the eukaryotes. The globular form can be divided into two large domains with a cleft between them containing a bound nucleotide and a divalent cation. The large domains can be further divided into two subdomains [3].

The environment of the actin within the cells can affect the structural and dynamic properties of the actin filaments. One important feature is the flexibility of the protein that can be altered under different conditions [4–16]. The binding of different ligands to the actin filament can alter its properties as well [17, 18].

The cation dependence of the flexibility of actin filaments has been studied previously [4, 19–22]. It was found that the dynamics of the actin filaments can be affected by applying calcium or magnesium ions during the polymerization process [23, 24]. It was shown that the replacement of the bound calcium for magnesium decreased the flexibility of the carboxyl-terminal region (located in subdomain 1) of the actin monomer [22]. It has been demonstrated that both the intra-monomer and the inter-monomer flexibility of the actin filaments are larger in the calcium bound F-actin than in the magne-

sium bound form of the protein. The inter-monomer flexibility was proved to be larger than the intra-monomer in the case of the calcium-F-actin and the magnesium-F-actin as well [4].

According to previous studies another important factor that can affect the flexibility of actin filaments is the change of the concentration of the H^+ -ion around the actin filaments. The intracellular pH can change under physiological and pathological conditions as well. In muscle cells under physiological conditions the pH can decrease from 7.1 to 6.5 after intense exertion [25]. This kind of fall in the pH is considered to be caused by the continuous and increased ATP hydrolysis and the shift of the cellular energy production from the aerobic to the anaerobic way [26, 27]. According to the work of Hild and colleagues the inter-monomer flexibility of the skeletal actin filaments was larger at pH 7.4 than at pH 6.5 in the case of the magnesium F-actin while this difference was not detected in the case of the calcium bound actin filaments [19].

Actin isoforms exhibit different biophysical and biochemical properties *in vitro* under certain experimental conditions. The different actin isoforms are classified as α -, β -, γ -type based on the differences in their isoelectric points [28, 29]. In our experiments we examined two α -actin isoforms, the α -skeletal and the α -cardiac muscle actins. Although they are able to form copolymers with each other, there are subtle dif-

* Author for correspondence: jozsef.orban@aok.pte.hu

ferences in their own filamental structure and larger differences in their ability to bind actin binding proteins as well [30]. In a normal heart there is a specific skeletal/cardiac actin stoichiometry. Hewett and colleagues could demonstrate functional correlation between the skeletal α -actin isoform content and the contractile function of the heart. It was suggested that the α -skeletal actin may promote the increased contractile function in the heart compared to the α -cardiac actin isoform [31].

To better understand the relationship between the flexibility of different actin isoforms and the pH of the surroundings, we examined the thermal stability of the magnesium saturated cardiac and skeletal α -actin isoforms at pH 7.0 and 8.0 as well. The differential scanning calorimetric experiments could demonstrate that the thermal stability of actin filaments was greater at lower pH value in both cases of the actin isoforms. We could also present that the α -skeletal actin is more resistant to heat denaturation than the α -cardiac isoform independently from the applied pH value.

Materials and methods

Actin preparation

The skeletal and cardiac α -actins were prepared from acetone powder of rabbit skeletal and bovine heart muscle according to the method of Spudich and Watt [32].

Magnesium bound actin was prepared from calcium bound actin monomers by the method of Strzelecka *et al.* [11]. The calcium containing actin monomers were incubated with 100 μ M MgCl₂ and 200 μ M EGTA for 5 min at room temperature. The actin was polymerised in the presence of 2 mM MgCl₂ and 100 mM KCl for at least two hours at room temperature before the experiments.

The concentration of the actin monomers was determined spectrophotometrically by using a Shimadzu UV-2100 spectrophotometer. The absorption coefficient of 0.63 mL mg⁻¹ cm⁻¹ [33] and the molecular mass of 42.3 kDa [34] was used during the calculations.

Differential scanning calorimetry

The thermal denaturation of the two kinds of α -actin isoforms was investigated with a SETARAM Micro DSC-II calorimeter between 0 and 100°C. The heating and cooling rates were 0.3 K min⁻¹. Conventional Hastelloy batch vessels were used with 950 μ L sample volume. The concentration of the different actin isoforms was 69 μ M. The experimental buffer without the protein was used as a reference during the measurements. The sample and reference vessels were balanced

with a precision of ± 0.1 mg. The data were processed with the Microcal Origin 6.0 software.

The calorimetric enthalpy changes (ΔH_{cal}) were determined by calculating the area under the heat absorption curves. The transition entropy changes were calculated with the following formula:

$$\Delta S = \Delta H_{\text{cal}} / T_m \quad (1)$$

where ΔS is the entropy change, ΔH_{cal} is the calorimetric enthalpy change and the T_m is the peak transition temperature.

The activation energy of the thermal denaturation process can be calculated based on the theory of Sanchez-Ruiz *et al.* [35]. The theory assumed that the thermal transition of a protein could be interpreted as a kinetic process. The kinetic constant of this transition can be analysed by using the Arrhenius equation. Based on their work the following equation can be used to determine the activation energy of the calorimetric transition of a protein:

$$\ln \left(\ln \left(\frac{\Delta H_{\text{cal}}}{\Delta H_{\text{cal}} - \Delta H} \right) \right) = \frac{E_A}{R} \left(\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T} \right) \quad (2)$$

where ΔH is the enthalpy change corresponding to the T temperature [35, 36] and ΔH_{cal} is the same as in the Eq. (1). The activation energy can inform us about the energy needed to initiate the thermal denaturation of the protein. The larger energy need for the denaturation may suggest a protein matrix which is more resistant to heat denaturation.

Results and discussion

To characterize the effect of pH on the thermal stability of different type of magnesium saturated α -actin isoforms differential scanning calorimetry experiments were performed at two different pH values. The samples at pH 7.0 and pH 8.0 were heated from 0 to 100°C to define the melting temperature of the proteins. The heat absorption curves were further processed to calculate the calorimetric enthalpy and entropy changes. The activation energy was also calculated to characterize the energy requirement to initiate the thermal denaturation of the proteins.

The heat absorption curves of the α -cardiac and α -skeletal actins showed that the T_m value was higher for the α -skeletal actin than for the α -cardiac isoform at pH 7.0 and 8.0 as well (Figs 1a and b). The difference in the T_m values was 1.96°C at pH 7.0 and 1.88°C at pH 8.0. The enthalpy and entropy changes also reflected the differences between the different actin isoforms (Table 1). The calculated values of the activation energy were higher for the α -skeletal actin isoform at both pH values. The difference was

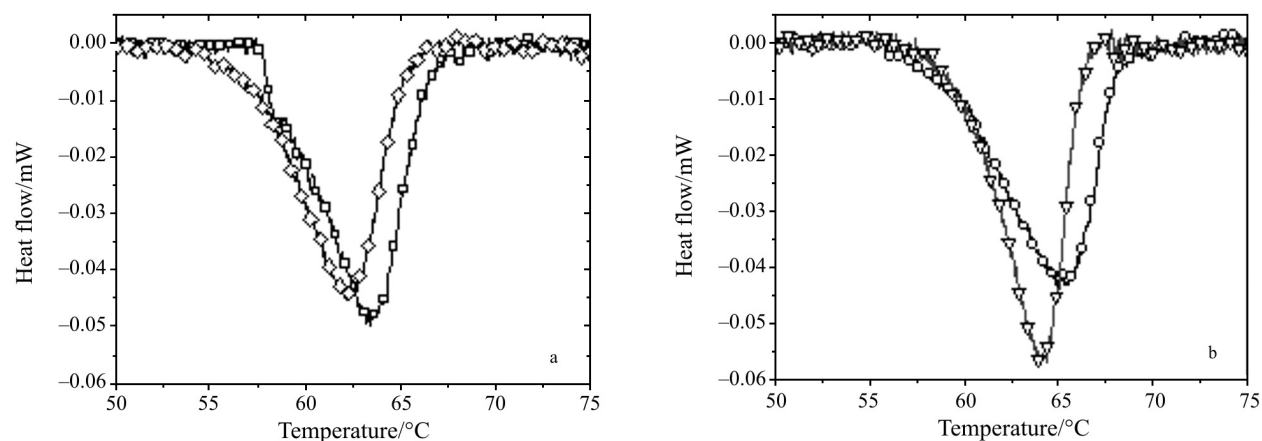


Fig. 1 The thermal denaturation curve of the different magnesium bound α -actin isoforms at pH 7.0 pH 8.0. a – The α -cardiac actin at pH 7.0 is represented with (\square), at pH 8.0 has a symbol (\diamond), b – The α -skeletal actin at pH 7.0 is indicated with (\circ) and at pH 8.0 the α -skeletal actin has a symbol (∇)

Table 1 The calculated values of the thermodynamic variables for the α -cardiac and α -skeletal actin filaments saturated with magnesium ions at pH 7.0 and 8.0

	α -cardiac actin		α -skeletal actin	
	pH 7.0	pH 8.0	pH 7.0	pH 8.0
$T_m/^\circ\text{C}$	63.38	62.17	65.34	64.05
$\Delta H_{\text{cal}}/\text{kJ mole}^{-1}$	806.4	768.4	932.5	872.0
$\Delta S/\text{J K}^{-1}$	2397	2296	2756	2587
$E_A/\text{kJ mole}^{-1}$	483.7	331.9	547.0	446.7

63 kJ mole^{-1} at pH 7.0 and 115 kJ mole^{-1} at pH 8.0. Although the difference in the T_m values was small the determined values of the activation energy could indicate that the α -skeletal actin was more resistant to heat induced denaturation than the α -cardiac isoform.

The calorimetric curves recorded at different pH values showed that at pH 7.0 the T_m value was higher

than at pH 8.0 in the case of both isoforms (Figs 2a and b). The pH induced difference in the value of T_m was 1.21 $^\circ\text{C}$ for the α -cardiac and 1.29 $^\circ\text{C}$ for the α -skeletal actin. The enthalpy and entropy changes also indicated the difference induced by the altered pH values (Table 1). The calculated values of the activation energy were higher at pH 7.0 for both of the

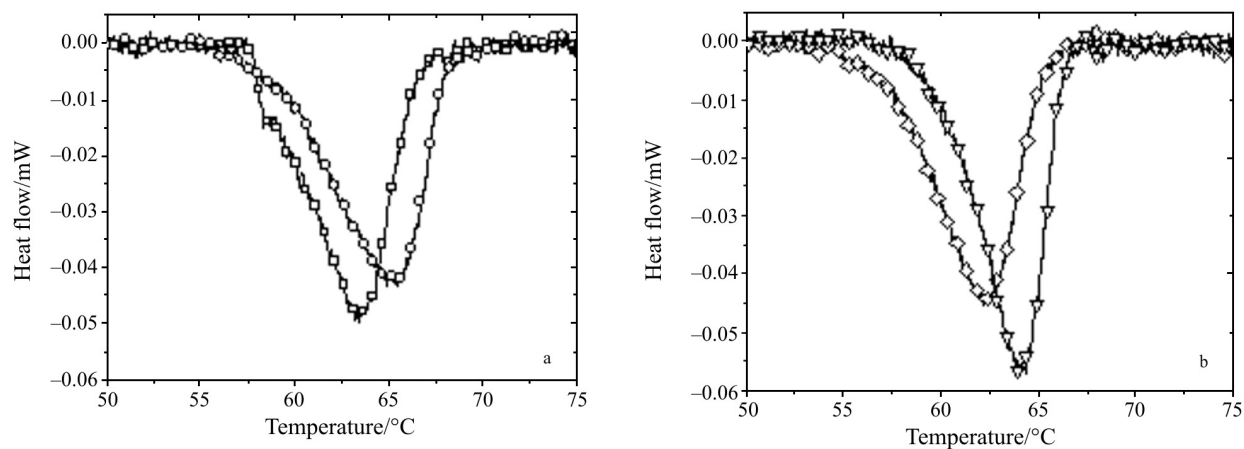


Fig. 2 The thermal denaturation curves recorded at pH 7.0 and 8.0 for the magnesium bound α -cardiac and α -skeletal actin isoforms; a – At pH 7.0 the magnesium bound α -cardiac actin is represented with (\square) and the α -skeletal actin has a symbol (\circ), b – At pH 8.0 the magnesium saturated α -cardiac actin is indicated with (\diamond) and the magnesium bound α -skeletal actin has a symbol (∇)

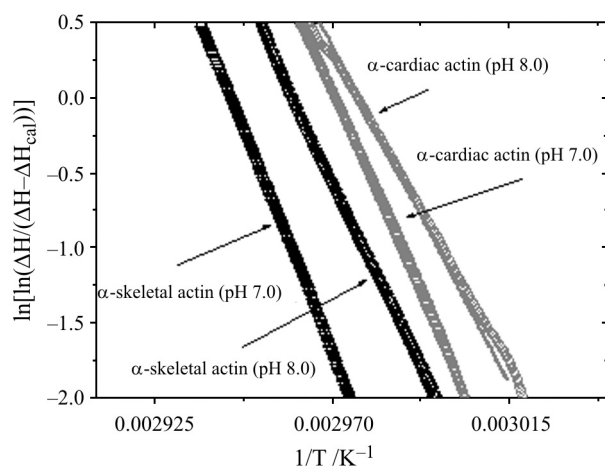


Fig. 3 The plot for the calculation of the activation energy based on the method of Sanchez-Ruiz [35] (α -cardiac actin at pH 7.0, α -cardiac actin at pH 8.0, α -skeletal actin at pH 7.0, α -skeletal actin at pH 8.0)

α -actin isoforms. The difference was 152 kJ mole^{-1} for the α -cardiac and 100 kJ mole^{-1} for the α -skeletal actin. These energy values could indicate that the structure of both of the actin filaments is more resistant against heat denaturation at pH 7.0 than at pH 8.0. This observation is in good agreement with a previous study which showed that the inter-monomer flexibility of the actin filaments decreased as a result of the decreased pH value around the protein matrix [19]. The comparison of the pH dependence of the activation energies for the two isoforms suggests that the α -cardiac actin was more sensitive to the pH changes compared to the α -skeletal isoform. A similar difference was reported previously for skeletal and cardiac myosin as well [37].

Conclusions

The differential scanning calorimetry measurements with the α -cardiac and α -skeletal actin filaments were performed at pH 7.0 and 8.0. The effect of the pH on the melting temperature of the denaturation curves was relatively small. Parallel to the T_m value changes the calculated enthalpy and entropy changes could show a clear difference between the cardiac and skeletal isoforms at different pH values. We also calculated the activation energies to further characterise the recovered differences. The calculated activation energies required for the heat denaturation of the proteins proved to be higher for the α -skeletal actin isoform than for the α -cardiac one. At lower pH values more energy was required to initiate the denaturation process in both cases of the isoforms. These observations suggest that the α -skeletal actin is more resistant to thermal denaturation than the α -cardiac

actin at both pH values. The stability of the two isoforms was greater at pH 7.0 than at pH 8.0.

Our results showed a difference in the thermal stability of the cardiac and skeletal actin isoforms. We have also shown that the heat denaturation process was pH dependent for both actin isoforms. These results can demonstrate that the effect of the small difference between the amino acid sequences of α -actin isoforms can be detected by using the method of differential scanning calorimetry. The results also showed that the pH dependences of the thermal stability of the α -cardiac and α -skeletal actin isoforms were similar, which can be interpreted considering their common muscle origin, i.e. their similar biological function.

Acknowledgements

This work was supported by the Hungarian Academy of Sciences. The SETARAM Micro DSC-II used in the experiments was purchased with fund provided by the National Research Foundation Grant CO-272.

References

- 1 F. B. Straub, Studies from the Institute of Medical Chemistry, Szeged, 2 (1942) 3:15.
- 2 W. Kabsch, H. G. Mannherz, D. Suck, E. F. Pai and K. C. Holmes, Nature, 347 (1990) 37.
- 3 P. Sheterline, J. Clayton and J. Sparrow, Protein Profile, 2 (1995) 1.
- 4 G. Hild, M. Nyitrai, J. Belágyi and B. Somogyi, Biophys. J., 75 (1998) 3015.
- 5 G. Hild, M. Nyitrai, R. Gharavi, B. Somogyi and J. Belágyi, J. Photochem. Photobiol. B, 35 (1996) 175.
- 6 M. Nyitrai, G. Hild, E. Bodis, A. Lukacs and B. Somogyi, Eur. J. Biochem., 267 (2000) 4334.
- 7 M. Nyitrai, G. Hild, N. Hartvig, J. Belágyi and B. Somogyi, J. Biol. Chem., 275 (2000) 41143.
- 8 M. Nyitrai, G. Hild, A. Lukacs, E. Bodis and B. Somogyi, J. Biol. Chem., 275 (2000) 2404.
- 9 A. Orlova, V. E. Galkin, M. S. VanLoock, E. Kim, A. Shvetsov, E. Reisler and E. H. Egelman, J. Mol. Biol., 312 (2001) 95.
- 10 A. Orlova, E. Prochniewicz and E. H. Egelman, J. Mol. Biol., 245 (1995) 598.
- 11 H. Strzelecka-Golaszewska, J. Moraczewska, S. Y. Khaitlina and M. Mossakowska, Eur. J. Biochem., 211 (1993) 731.
- 12 D. Lőrinczy and J. Belágyi, Biochem. Biophys. Res. Commun., 217 (1995) 592.
- 13 D. Lőrinczy and J. Belágyi, Thermochim. Acta, 259 (1995) 153.
- 14 D. Lőrinczy, F. Könczöl, B. Gaszner and J. Belágyi, Thermochim. Acta, 322 (1998) 95.
- 15 M. Kiss, J. Belágyi and D. Lőrinczy, J. Therm. Anal. Cal., 72 (2003) 565.

- 16 M. Kiss, F. Könczöl, N. Farkas, D. Lőrinczy and J. Belágyi, *J. Therm. Anal. Cal.*, 65 (2001) 627.
- 17 B. Visegrády, D. Lőrinczy, G. Hild, B. Somogyi and M. Nyitrai, *FEBS Lett.*, 565 (2004) 163.
- 18 B. Visegrády, D. Lőrinczy, G. Hild, B. Somogyi and M. Nyitrai, *FEBS Lett.*, 579 (2005) 6.
- 19 G. Hild, M. Nyitrai and B. Somogyi, *Eur. J. Biochem.*, 269 (2002) 842.
- 20 M. Nyitrai, G. Hild, J. Belágyi and B. Somogyi, *Biophys. J.*, 73 (1997) 2023.
- 21 M. Nyitrai, G. Hild, J. Belágyi and B. Somogyi, *J. Biol. Chem.*, 274 (1999) 12996.
- 22 M. Nyitrai, G. Hild, Z. Lakos and B. Somogyi, *Biophys. J.*, 74 (1998) 2474.
- 23 A. Orlova and E. H. Egelman, *J. Mol. Biol.*, 232 (1993) 334.
- 24 R. Yasuda, H. Miyata and K. Kinoshita, Jr., *J. Mol. Biol.*, 263 (1996) 227.
- 25 J. M. Renaud, Y. Allard and G. W. Mainwood, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 64 (1986) 764.
- 26 P. B. Garlick, G. K. Radda and P. J. Seeley, *Biochem. J.*, 184 (1979) 547.
- 27 C. L. Wolfe, H. F. Gilbert, K. M. Brindle and G. K. Radda, *Biochim. Biophys. Acta*, 971 (1988) 9.
- 28 J. I. Garrels and W. Gibson, *Cell*, 9 (1976) 793.
- 29 K. Zechel and K. Weber, *Eur. J. Biochemistry*, 89 (1978) 105.
- 30 E. De La Cruz and T. D. Pollard, *Biochemistry*, 33 (1994) 14387.
- 31 T. E. Hewett, I. L. Grupp, G. Grupp and J. Robbins, *Circ. Res.*, 74 (1994) 740.
- 32 J. A. Spudich and S. Watt, *J. Biol. Chem.*, 246 (1971) 4866.
- 33 T. W. Houk and K. Ue, Jr., *Anal. Biochemistry*, 62 (1974) 66.
- 34 M. Elzinga, J. H. Collins, W. M. Kuehl and R. S. Adelstein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70 (1973) 2687.
- 35 J. M. Sanchez-Ruiz, J. L. Lopez-Lacomba, M. Cortijo and P. L. Mateo, *Biochemistry*, 27 (1988) 1648.
- 36 T. Vogl, C. Jatzke, H. J. Hinz, J. Benz and R. Huber, *Biochem.*, 36 (1997) 1657.
- 37 D. Lőrinczy and J. Belágyi, *Thermochim. Acta*, 343 (2000) 27.

DOI: 10.1007/s10973-005-7109-6

József Orbán, Kinga Pozsonyi, Krisztina Szarka, Szilvia Barkó, Emőke Bódis and Dénes
Lőrinczy

THERMAL CHARACTERISATION OF ACTIN FILAMENTS PREPARED FROM ADP-ACTIN MONOMERS

Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, Vol. 84 (2006) 3, pp. 619-623

THERMAL CHARACTERISATION OF ACTIN FILAMENTS PREPARED FROM ADP-ACTIN MONOMERS

J. Orbán¹, Kinga Pozsonyi¹, Krisztina Szarka¹, Szilvia Barkó¹, Emőke Bódis² and D. Lőrinczy^{1*}

¹University of Pécs, Faculty of Medicine, Department of Biophysics, Pécs, Szigeti str. 12, 7624, Hungary

²Research Group for Fluorescence Spectroscopy, Office for Academy Research Groups Attached to Universities and other Institutions at University of Pécs

The thermodynamic properties of the ADP- and ATP-actin filaments were compared by the method of differential scanning calorimetry. The lower melting point for the ADP-F-actin filament (58.4 vs. 64.5°C for ATP-F-actin) indicated that compared to the ATP-actin filaments its structure was less resistant to heat denaturation. The detailed thermodynamic characterisation of the proteins was carried out by the analysis of the calorimetric enthalpy, the entropy and the free enthalpy changes. All of the determined parameters gave lower values to the ADP-actin filaments than to the ATP-actin filaments. The calculated values of the activation energy also demonstrated that compared to the ADP-F-actin the ATP-F-actin was thermodynamically more resistant to the denaturing effect of heat.

Based on all of this information we have concluded that the actin filament prepared from ADP containing magnesium saturated actin monomers at pH 8.0 is thermodynamically less stable than the ones obtained from ATP-actin monomers.

Keywords: actin, denaturation, DSC, nucleotides, thermodynamics

Introduction

Actin as one of the most important parts of the cytoskeletal protein network was first discovered by Straub in 1943 [1]. Naturally in cells it can be found as a monomer or filament in complex with a divalent cation and a nucleotide in its central cleft between its large and small domain [2]. Its importance is significantly underlined by its involvement in different cellular processes (intracellular traffic, endo- and exocytosis and cell movements) [3–5].

While in the beginning its complex with myosin (acto-myosin complex) was the most frequent target of investigations, recently its complex with the actin binding proteins has come into the forefront of scientific investigations [6–9].

DSC is a sensitive and informative method to investigate the basic physico-chemical properties of the proteins. It is frequently used to characterize the actin and its complexes with other proteins on the molecular and supramolecular level as well [10–24]. As the actin is very sensitive to the physico-chemical characteristics of the surroundings [25–28] it is very important to explore the details of its properties by modelling different cellular conditions (pH, ionic strength). Beside the importance of the bound divalent cation the attached nucleotide is another crucial factor that greatly affects the molecular properties of the actin. Its influence on the dynamic and/or structural properties of the actin

monomers and filaments was characterised by different laboratories [29–38].

The crystallographic structure of the ADP-actin monomer was determined in 2001 by Otterbein and colleagues in a 1.54 Å resolution [39]. The nucleotide exchange can induce a conformational change in the actin monomers, due to which compared to the ATP-actin monomers the affinity of the ADP-actin monomer for DNase I is lower [40]. Although this finding was explained by the internal movement of the subdomain 2, a more complex movement around more than one axis has also been implicated [41]. The affinity of the ADP-actin monomers for other actin binding proteins can also be different than that of ATP-actin monomers [2].

Under physiological conditions the steady-state critical concentration (C_c) for ATP containing actin monomers is around 0.07 μM while it is 1.1 μM for ADP-actin [42]. The association rate constants (k_+) of the polymerization at the barbed-end measured by Pollard in 1986 were 11.6 $\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ for the ATP-actin and 3.8 $\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ for the ADP-actin while the dissociation rate constants (k_-) were 1.4 and 7.2 s^{-1} , respectively. At the pointed end the determined association rate constants were 1.3 $\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ for the ATP-actin filament and 0.16 $\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ for ADP-actin. The dissociation rate constant was 0.8 s^{-1} for the ATP-actin and 0.27 s^{-1} for the ADP-actin [43]. These

* Author for correspondence: denes.lorinczy@aok.pte.hu

data suggest that the filaments containing ADP-actin monomers tend to depolymerise more easily, while in the case of ATP-actin containing monomers the elongation of the protein will dominate.

The ADP-actin monomers are natural components of the actin pool within the cells as they are produced normally during the thread-milling of the actin filaments along with the release of an inorganic phosphate (P_i) [44, 45]. As the actin filaments are getting older the ratio of the ADP-actin protomers to the total actin concentration is getting higher, which can alter the basic properties of the actin filaments [46].

In our work we characterised the effect of the nucleotide exchange on the thermal stability of the actin filaments. We described the difference in the thermodynamic state variables characteristic for the ADP- and ATP-actin filaments as well.

Experimental

Materials and methods

Chemicals

KCl, MgCl₂, CaCl₂, MOPS, hexokinase, glucose, and EGTA were obtained from Sigma (St. Louis, USA). ATP, ADP and β-mercaptoethanol were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). NaN₃ was purchased from Fluka (Switzerland).

Actin preparation

Skeletal actin was prepared from acetone powder [47, 48] obtained from the rabbit skeletal muscle as described by Spudich and Watt [48]. The actin was stored in a 2 mM MOPS buffer containing 0.2 mM ATP, 0.1 mM CaCl₂, 0.1 mM β-mercaptoethanol, and 0.005% NaN₃ at pH 8.0 at the end of the preparation (buffer A).

The preparation of the magnesium saturated ADP-actin filaments

- Ion exchange on actin monomers: the calcium ion bound to the actin monomers was changed for magnesium by adding EGTA and MgCl₂ to the sample to get the final concentrations of 0.2 and 0.1 mM, respectively. After a 10 min incubation at room temperature the actin monomers were polymerized by adjusting the final concentration of the MgCl₂ and KCl to 2 and 100 mM, respectively [49]. The concentration of the actin monomers were calculated from the absorption at 290 nm by using the extinction coefficient of 0.63 mg⁻¹ mL cm [50].
- Preparation of the ADP-F-actin: the actin monomer bound ATP was changed for ADP by the method of

Drewes and Faulstich [51]. During the nucleotide exchange the final concentration of the hexokinase, the glucose and the ADP were adjusted in the sample to 1.65, 0.5 mg mL⁻¹ and 1 mM, respectively. The samples were incubated for 1 h at 4°C. The polymerization of the ADP-actin monomers was initiated with the adjustment of the final concentration of MgCl₂ and KCl to 2 and 100 mM, respectively. In the case of the ADP-F-actin the length of the polymerization was 12 h at room temperature (22°C) as compared to the ATP-actin monomers the polymerization rate of the ADP-actin monomers is slower. In the case of the ATP-actin monomers the incubation time was 1 h at room temperature (22°C) [34].

DSC measurements

DSC measurements were carried out with a Setaram Micro DSC-II calorimeter. The applied temperature range was 0–100°C and the heating rate was 0.3 K min⁻¹. The polymerization buffer with no actin content was the reference solution during the DSC measurements. The actin concentration was 69 μM (3 mg mL⁻¹) during the experiments. All the DSC data were analyzed with the Microcal Origin software (version 6.0).

The calorimetric enthalpy change (ΔH_{cal}) was calculated by integrating the area under the heat denaturation curves.

The entropy change was calculated by using the following equation:

$$\Delta S = \Delta H_{\text{cal}} / T_m \quad (1)$$

where ΔS is the entropy change in kJ K⁻¹ mol⁻¹, ΔH_{cal} is the calorimetric enthalpy change in kJ mol⁻¹ and the T_m is the peak transition point in K.

The free enthalpy change was calculated by using the following formula:

$$\Delta G = \Delta H_{\text{cal}} - T\Delta S \quad (2)$$

where ΔG is the free enthalpy change measured in kJ K⁻¹ mol⁻¹ at room temperature (20°C) point T .

The calculation of the activation energy was done by the method of Sanchez-Ruiz *et al.* [52]. Based on their work the following equation was applied during the analysis of the DSC data:

$$\ln \left[\ln \left(\frac{\Delta H_{\text{cal}}}{\Delta H_{\text{cal}} - \Delta H} \right) \right] = \frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T} \right) \quad (3)$$

where ΔH_{cal} is the total calorimetric enthalpy change, ΔH is the actual enthalpy change at a temperature point of T , E_a is the activation energy, R is the universal gas constant and T_m is the peak transition point. The slope and the intercept value of the fitted line on the plot of $\ln[\ln(\Delta H_{\text{cal}}/(\Delta H_{\text{cal}} - \Delta H))]$ vs. $1/T$

can inform us about the activation energy that is needed to initiate the thermal denaturation of the investigated protein. A higher value of the activation energy may indicate a thermodynamically more stable protein matrix [53].

Results and discussion

The detailed investigation of the actin filaments created from ADP and ATP bound magnesium saturated actin monomers were investigated with the method of differential scanning calorimetry at pH 8.0.

The analysis of the heat absorption curves revealed that the melting point for ADP-F-actin was 58.4°C compared to the value of 64.5°C for the actin filaments polymerised from ATP-actin monomers (Fig. 1; Table 1). This 6.1°C difference indicates that compared to the ATP saturated actin filaments the ADP-F-actin is less resistant to the heat denaturation. A detailed investigation of the thermodynamic state variables was done so that this conclusion could be further supported.

The calorimetric enthalpy change was determined by integrating the area under the heat denaturation curves belonging to the actin filaments polymerised from monomers with different nucleotide bound. The results of these calculations were 540 kJ mol⁻¹ for the ADP-F-actin and 802 kJ mol⁻¹ for the ATP saturated actin filament (Table 1).

The calculated entropy change reflected the same tendency in the difference between the two proteins as its value was 1630 kJ K⁻¹ mol⁻¹ for ADP-F-actin and 2375 kJ K⁻¹ mol⁻¹ for the ATP-F-actin (Table 1).

The free enthalpy change was calculated at 293 K by using the data of calorimetric enthalpy

Table 1 The thermodynamic properties of the ADP- and ATP-F-actin at pH 8.0 in the presence of magnesium ions. The free enthalpy change (ΔG) was calculated at 293 K

	ADP-F-actin	ATP-F-actin
$T_m/^\circ\text{C}$	58.4	64.5
$\Delta H/\text{kJ mol}^{-1}$	540	802
$\Delta S/\text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$	1630	2375
$\Delta G/\text{kJ mol}^{-1}$	62	106
$E_a/\text{kJ mol}^{-1}$	311	338

change and the value of the entropy change in Eq. (2). The values were 62 kJ mol⁻¹ for the ADP-F-actin and 106 kJ mol⁻¹ for the ATP-F-actin (Table 1).

All these thermodynamic state variables showed the same qualitative difference as their value was consequently lower for the ADP-F-actin compared to the actin filaments formed from ATP-actin monomers.

The activation energy was also calculated with the Eq. (3) for the actin filaments by the method of Sanchez-Ruiz [52]. The calculated values were 311 kJ mol⁻¹ for ADP-actin and 338 kJ mol⁻¹ for ATP-actin (Fig. 2, Table 1). These values were in correlation with the data described above as their value was smaller for the ADP-F-actin than for ATP-F-actin. The difference in the activation energy suggested that compared to the ATP-F-actin the structure of the ADP-F-actin was less resistant to the denaturing effect of heat as the difference between the melting points has indicated previously.

All the measured and calculated thermodynamic state variables show that there is a significant difference between the ADP- and ATP-F-actin. Based on the values of the thermodynamic parameters determined

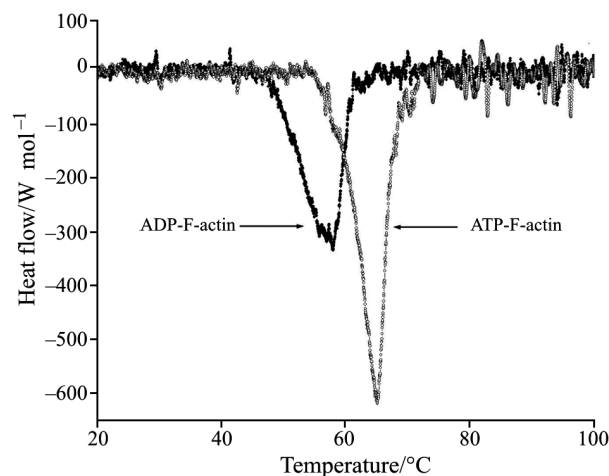


Fig. 1 The thermal denaturation curve of the filaments polymerised from magnesium bound ADP (dotted line with filled circles) or ATP (dotted line with empty circles) containing actin monomers at pH 8.0

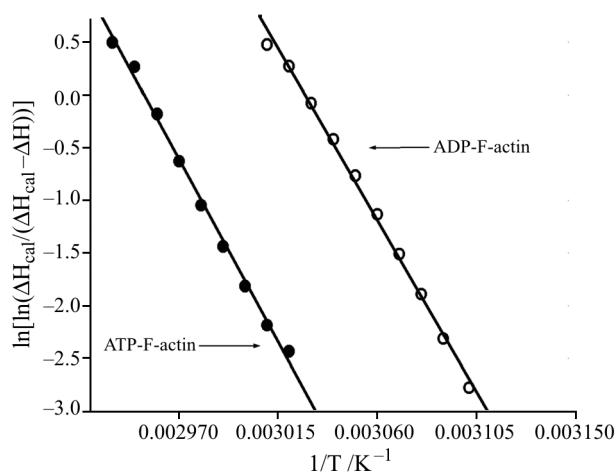


Fig. 2 The plots used for the calculation of the activation energy by the method of Sanchez-Ruiz [52] for the filaments polymerised from magnesium bound ATP (line with filled circles) or ADP (line with empty circles) bound actin monomers at pH 8.0

from the heat denaturation curves and the calculated values of the activation energies as well (Fig. 1; Table 1) this difference can be interpreted that compared to the ATP-F-actin the ADP-F-actin has a thermodynamically less stable structure.

Conclusions

The thermodynamic characterisation of the actin filaments prepared from ADP bound magnesium-actin monomers has revealed that these filaments are thermodynamically less stable than the ATP-actin filaments under the applied experimental conditions.

This finding is in good agreement with previous works where in the case of ADP-actin filaments an increased inter-monomer flexibility was described with a fluorescence spectroscopic method [34].

The actin filaments polymerised from either ADP- or ATP-actin monomers mainly consist of ADP-actin protomers. Our work – in agreement with previous studies – has provided further evidence that the actin filaments have conformational memory, i.e. the conformation of the filaments can reflect the previous structural states of the actin monomers they were generated from, and also the various environmental factors that affected the monomer state and the process of polymerisation.

The accumulated data could suggest that the stability of the actin filament may play a role in the function of the actin cytoskeleton. For example, the altered stability of the protein matrix in the case of the ADP-actin filaments, and thus their different conformation may explain their altered affinity to the actin binding proteins as well.

The faster depolymerisation of the filaments composed from ADP-actin monomers may be involved in the equilibrium between the actin monomers and polymers as well. Considering that the ATP-actin – ADP-actin monomer ratio can change when cells are aging the nucleotide dependence of the structure of actin filaments may serve as part of the general biological clock mechanism within cells.

Acknowledgements

This work was supported by the Hungarian Academy of Sciences. The Setaram Micro DSC-II used in the experiments was purchased with a grant (CO-272) provided by the National Research Foundation.

References

- 1 F. B. Straub, Studies from the Institute of Medical Chemistry, Szeged 2 (1942) 3:15.
- 2 P. Shterline, J. Clayton and J. Sparrow, Protein Profile, 2 (1995) 1.
- 3 H. H. Chowdhury, M. R. Popoff and R. Zorec, Pflugers Arch., 439 (2000) R148.
- 4 H. Liu and A. Bretscher, J. Cell. Biol., 118 (1992) 285.
- 5 F. Rivero, B. Koppel, B. Peracino, S. Bozzaro, F. Siegert, C. J. Weijer, M. Schleicher, R. Albrecht and A. A. Noegel, J. Cell. Sci., 109 (1996) 2679.
- 6 P. J. Ojala, V. Paavilainen and P. Lappalainen, Biochemistry, 40 (2001) 15562.
- 7 P. J. Ojala, V. O. Paavilainen, M. K. Vartiainen, R. Tuma, A. G. Weeds and P. Lappalainen, Mol. Biol. Cell., 13 (2002) 3811.
- 8 V. O. Paavilainen, E. Bertling, S. Falck and P. Lappalainen, Trends Cell. Biol., 14 (2004) 386.
- 9 S. Palmgren, M. Vartiainen and P. Lappalainen, J. Cell. Sci., 115 (2002) 881.
- 10 D. Lőrinczy, Hot topics in thermal analysis and calorimetry: The Nature of Biological Systems as Revealed by Thermal Methods, (2004).
- 11 D. Lőrinczy and J. Belágyi, Biochem. Biophys. Res. Commun., 217 (1995) 592.
- 12 D. Lőrinczy and J. Belágyi, Thermochim. Acta, 259 (1995) 153.
- 13 D. Lőrinczy and J. Belágyi, Thermochim. Acta, 296 (1997) 161.
- 14 D. Lőrinczy and J. Belágyi, Thermochim. Acta, 343 (2000) 27.
- 15 D. Lőrinczy and J. Belágyi, Eur. J. Biochem., 268 (2001) 5970.
- 16 D. Lőrinczy, N. Hartvig and J. Belágyi, J. Therm. Anal. Cal., 64 (2001) 651.
- 17 D. Lőrinczy, N. Hartvig and J. Belágyi, J. Biochem. Biophys. Methods, 53 (2002) 75.
- 18 D. Lőrinczy, N. Hartvig, N. Farkas and J. Belágyi, J. Therm. Anal. Cal., 65 (2001) 351.
- 19 D. Lőrinczy, M. Kiss and J. Belágyi, J. Therm. Anal. Cal., 72 (2003) 565.
- 20 D. Lőrinczy, F. Könczöl, L. Farkas, J. Belágyi and C. Schick, Thermochim. Acta, 377 (2001) 205.
- 21 D. Lőrinczy, F. Könczöl, B. Gaszner and J. Belágyi, Thermochim. Acta, 322 (1998) 95.
- 22 B. Visegrády, D. Lőrinczy, G. Hild, B. Somogyi and M. Nyitrai, FEBS Lett., 565 (2004) 163.
- 23 B. Visegrády, D. Lőrinczy, G. Hild, B. Somogyi and M. Nyitrai, FEBS Lett., 579 (2005) 6.
- 24 T. Dergez, F. Könczöl, N. Farkas, J. Belágyi and D. Lőrinczy, J. Therm. Anal. Cal., 80 (2005) 445.
- 25 G. Hild, M. Nyitrai and B. Somogyi, Eur. J. Biochem., 269 (2002) 842.
- 26 M. Nyitrai, G. Hild, Z. Lakos and B. Somogyi, Biophys. J., 74 (1998) 2474.
- 27 B. Bugyi, G. Papp, S. Halasi and B. Visegrády, J. Therm. Anal. Cal., 82 (2005) 275.
- 28 J. Orbán, S. Halasi, G. Papp, S. Barkó and B. Bugyi, J. Therm. Anal. Cal., 82 (2005) 287.
- 29 G. Hild, M. Nyitrai, J. Belágyi and B. Somogyi, Biophys. J., 75 (1998) 3015.

- 30 G. Hild, M. Nyitrai, R. Gharavi, B. Somogyi and J. Belágyi, *J. Photochem. Photobiol. B*, 35 (1996) 175.
- 31 M. Nyitrai, G. Hild, J. Belágyi and B. Somogyi, *Biophys. J.*, 73 (1997) 2023.
- 32 M. Nyitrai, G. Hild, J. Belágyi and B. Somogyi, *J. Biol. Chem.*, 274 (1999) 12996.
- 33 M. Nyitrai, G. Hild, E. Bódis, A. Lukács and B. Somogyi, *Eur. J. Biochem.*, 267 (2000) 4334.
- 34 M. Nyitrai, G. Hild, N. Hartvig, J. Belágyi and B. Somogyi, *J. Biol. Chem.*, 275 (2000) 41143.
- 35 M. Nyitrai, G. Hild, A. Lukács, E. Bódis and B. Somogyi, *J. Biol. Chem.*, 275 (2000) 2404.
- 36 A. Orlova and E. H. Egelman, *J. Mol. Biol.*, 232 (1993) 334.
- 37 A. Orlova and E. H. Egelman, *J. Mol. Biol.*, 245 (1995) 582.
- 38 A. Orlova, E. Prochniewicz and E. H. Egelman, *J. Mol. Biol.*, 245 (1995) 598.
- 39 L. R. Otterbein, P. Graceffa and R. Dominguez, *Science*, 293 (2001) 708.
- 40 H. Schuler, C. E. Schutt, U. Lindberg and R. Karlsson, *FEBS Lett.*, 476 (2000) 155.
- 41 H. Schuler, *Biochim. Biophys. Acta*, 1549 (2001) 137.
- 42 J. E. Rickard and P. Sheterline, *J. Mol. Biol.*, 191 (1986) 273.
- 43 T. D. Pollard, *J. Cell. Biol.*, 103 (1986) 2747.
- 44 H. Nakajima, Y. Kunioka, K. Nakano, K. Shimizu, M. Seto and T. Ando, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 234 (1997) 178.
- 45 J. M. Neuhaus, M. Wanger, T. Keiser and A. Wegner, *J. Muscle Res. Cell. Motil.*, 4 (1983) 507.
- 46 B. Gaszner, M. Nyitrai, N. Hartvig, T. Kőszegi, B. Somogyi and J. Belágyi, *Biochemistry*, 38 (1999) 12885.
- 47 G. Feuer, F. Molnar, E. Pettko and F. B. Straub, *Hung. Acta Physiol.*, 1 (1948) 150.
- 48 J. A. Spudich and S. Watt, *J. Biol. Chem.*, 246 (1971) 4866.
- 49 H. Strzelecka-Golaszewska, J. Moraczewska, S. Y. Khaitlina and M. Mossakowska, *Eur. J. Biochem.*, 211 (1993) 731.
- 50 T. W. Houk Jr. and K. Ue, *Anal. Biochem.*, 62 (1974) 66.
- 51 G. Drewes and H. Faulstich, *J. Biol. Chem.*, 266 (1991) 5508.
- 52 J. M. Sanchez-Ruiz, J. L. Lopez-Lacomba, M. Cortijo and P. L. Mateo, *Biochemistry*, 27 (1988) 1648.
- 53 G. Papp, B. Bugyi, Z. Újfalusi, S. Halasi and J. Orbán, *J. Therm. Anal. Cal.*, 82 (2005) 281.

Received: November 10, 2005

Accepted: December 19, 2005

OnlineFirst: March 20, 2006

DOI: 10.1007/s10973-005-7442-9

Roland Kardos, Andrea Vig, József Orbán, Gábor Hild, Miklós Nyitrai, Dénes Lőrinczy

THE EFFECT OF JASPLAKINOLIDE ON THE THERMODYNAMIC PROPERTIES OF ADP·BEF_x BOUND
ACTIN FILAMENTS

Thermochimica Acta, Vol. 463 (2007), pp. 77-80



The effect of *jasplakinolide* on the thermodynamic properties of ADP.BeF_x bound actin filaments

Roland Kardos, Andrea Vig, József Orbán, Gábor Hild,
 Miklós Nyitrai, Dénes Lőrinczy*

University of Pécs, Faculty of Medicine, Department of Biophysics, Szigeti str. 12, H-7624 Pécs, Hungary

Available online 6 August 2007

Abstract

The effect of BeF_x and a natural toxin (*jasplakinolide*) was examined on the thermal stability of actin filaments by using differential scanning calorimetry. The phosphate analogue beryllium fluoride shifted the melting temperature of actin filaments (67.4 °C) to 83.7 °C indicating that the filaments were thermodynamically more stable in their complex with ADP.BeF_x. A similar tendency was observed when the *jasplakinolide* was used in the absence of BeF_x. When both the ADP.BeF_x and the *jasplakinolide* bound to the actin filaments their collective effect was similar to that observed with ADP.BeF_x or *jasplakinolide* alone. These results suggested that ADP.BeF_x and *jasplakinolide* probably stabilize the actin filaments by similar molecular mechanisms.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: α -Skeletal actin; ADP.BeF_x; DSC; *Jasplakinolide*; Thermal stability; Thermodynamics

1. Introduction

The cytoskeleton is a three-dimensional network of proteins which is responsible for many functions in the organisation of the structure and dynamics of living cells [1–4]. The cytoskeleton is built up from three different filament systems, the microtubules, the intermediate filaments and the microfilaments. The microfilament system is assembled from the actin and actin-binding proteins. Actin is a 42 kDa globular protein that can be found in monomer (G-actin) or polymer (F-actin) form in cells. The actin monomer binds an ATP and a divalent magnesium ion in its central part under physiological conditions [5]. The ATP is hydrolyzed during the polymerization of the actin. The products of this hydrolyzation are ADP and inorganic phosphate (P_i). The phosphate dissociates from the actin filaments while the ADP remains bound to the protein. The intermediate states of the hydrolyzation process can be modelled with the help of different specific chemicals. Beryllium fluoride (BeF_x) is a widely used phosphate analogue and together with ADP is able to mimic the F-ADP.P_i intermediate state of the ATPase cycle. The BeF_x has a similar effect on the actin filaments as the P_i and can bind

to the actin filaments with relatively high affinity ($K_D = 2 \mu\text{M}$) [6–8]. The association and dissociation rate constants for BeF_x binding to and dissociating from ADP-actin are $4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ and $8 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$, respectively [9]. Based on these facts it was concluded that the beryllium fluoride could be a reliable probe to test the conformation of the ADP.P_i-actin filaments [9].

Jasplakinolide is a cyclic peptide isolated from a marine sponge (*Jaspis johnstoni*) that is able to bind and stabilize the filamentous actin *in vitro*. This actin-stabilizing toxin was effectively used previously to study the conformational and dynamic properties of actin filaments [10,11]. *Jasplakinolide* binds the actin filament with an affinity of approximately 15 nM and competes with phalloidin for the binding-sites on actin [12–14]. This toxin can decrease the amount of sequestered actin monomers by lowering the critical concentration of actin and enhances the polymerization of the filaments by accelerating the speed of the nucleation step [13]. Differential scanning calorimetry (DSC) studies revealed that *jasplakinolide* is able to stabilize actin filaments at sub-stoichiometric concentration as well [10,11].

Previous experiments showed that DSC is an effective method to study the thermal properties of actin [15–24]. The aim of our work was to investigate the effect of *jasplakinolide* on the thermodynamic properties of the ADP.BeF_x bound actin filaments with differential scanning calorimetry (DSC). The calorimetric results obtained for the thermal stability of actin filaments

* Corresponding author. Tel.: +36 72 536 260; fax: +36 72 536 261.
 E-mail address: denes.lorinczy@aok.pte.hu (D. Lőrinczy).

in the presence of ADP.BeF_x and/or *jasplakinolide* provided the opportunity to analyse the mechanisms through which these compounds affect the structure and dynamics of actin filaments.

We found that the melting temperature (T_m) of actin filaments has changed from 67.4 °C to 83.7 °C after the binding of BeF_x to the actin filaments (ADP.BeF_x state). A similar shift in the melting temperature of F-actin was previously observed by Nikolaeva et al. [25]. In agreement with previous results the presence of *jasplakinolide* has shifted the T_m to 87.3 °C [10]. We also found that when the *jasplakinolide* bound to the ADP.BeF_x saturated actin filaments the melting temperature shifted to 85.6 °C, i.e. to a value similar to what was observed with either ADP.BeF_x or *jasplakinolide* separately. From these results we concluded that the ADP.BeF_x and *jasplakinolide* probably stabilizes the actin filaments by similar molecular mechanisms.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

KCl, MgCl₂, CaCl₂, Mops and NaF were purchased from Sigma (St. Louis, USA). ATP and β-mercaptoethanol were obtained from MERCK (Darmstadt, Germany). NaN₃ and BeSO₄ were purchased from FLUKA (Switzerland). The *jasplakinolide* was purchased from Molecular probes (Invitrogen).

2.2. Sample preparation

Skeletal actin was prepared from acetone powder of rabbit psoas muscle [26,27]. The calcium saturated actin monomers were stored in a 2 mM Mops buffer (pH 8.0) containing 0.2 mM ATP, 0.1 mM CaCl₂, 0.1 mM β-mercaptoethanol and 0.005% NaN₃. The concentration of the actin monomers was calculated by using the extinction coefficient of 0.63 mg⁻¹ ml cm at 290 nm [28].

The actin bound calcium was changed for magnesium by incubating the samples for 5 min with 0.2 mM EGTA and 0.1 mM MgCl₂ at room temperature [5]. The actin monomers were polymerized by the addition of 2 mM MgCl₂ and 100 mM KCl.

ADP.BeF_x-actin filaments were prepared from the ADP containing actin filaments by the simultaneous addition of 10 mM NaF and 3 mM BeSO₄ to the actin solution. The samples were incubated for 2 h at room temperature followed by an overnight incubation at 4 °C. To create *jasplakinolide*-bound ADP.BeF_x-actin filaments *jasplakinolide* was added to the actin after the 2-h long incubation period at room temperature. To create *jasplakinolide*-bound actin filaments *jasplakinolide* was added to the actin at the same time as the MgCl₂ and KCl and the samples were incubated overnight at 4 °C [10,11]. These preparation strategies assured that the equilibrium between the actin filaments, the drug and the nucleotide analogues was established before the measurements.

2.3. DSC measurements and theoretical considerations

The calorimetric measurements were performed with a SETARAM Micro DSC-II Calorimeter. The actin concentra-

tion was 3 mg/ml (~69 μM) during the measurements. When applied, the *jasplakinolide* was added in a 1:1 *jasplakinolide*:actin protomer concentration ratio. The DSC measurements were done in the temperature range of 0–100 °C and the heating rate was 0.3 K/min.

3. Results and discussion

The calorimetric experiments were completed by using 69 μM F-actin. The critical concentration of actin is low under the applied experimental conditions (0.04–0.1 μM) [29] compared to the applied actin concentration so the contribution of the actin in its monomeric form to the heat denaturation curve was hardly detectable. During the DSC measurements the sample and the appropriate reference solution was heated in the range of 0–100 °C under isobaric conditions. The difference between the energy uptake of the sample and the reference cell was recorded and plotted as a function of temperature.

The thermodynamic curves for actin filaments showed an endothermic phase transition in all cases (Figs. 1–3). The transition curves can be characterized by determining the melting temperature (T_m) defined as the temperature where the curves reach their minimum value. Comparing the different T_m values it is possible to characterize the thermodynamic stability of proteins under different conditions [24,30]. A higher T_m value is typically correlated with a thermodynamically more stable protein structure [30,31]. The significant advantage of exploring the differences between the melting temperatures is that the determined position of them is largely unrelated to the applied thermodynamic model describing the denaturation process [32].

In the absence of BeF_x and *jasplakinolide* the T_m was 67.4 °C for the actin filaments (Fig. 1). When the sample was prepared in the presence of BeF_x or *jasplakinolide* the peak of the phase transition shifted to higher temperatures (Figs. 1 and 2).

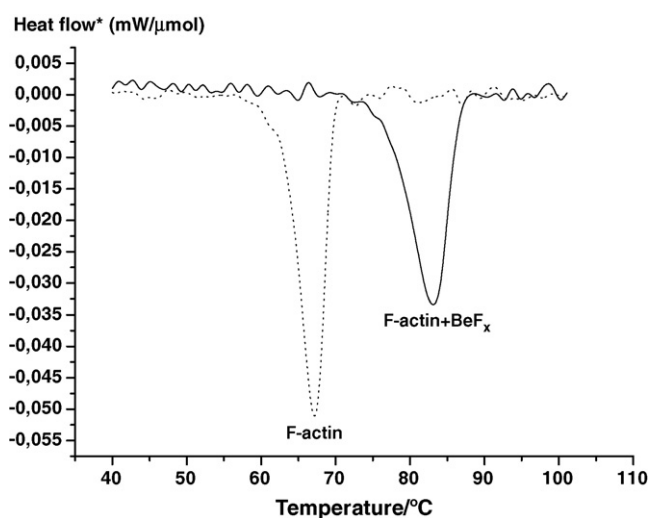


Fig. 1. The DSC curves were recorded in the presence (solid) and absence (dot) of BeF_x. The heat-flow* (mW/μmol) is the form of the heat-flow (mW) normalized with the amount of the applied protein (μmol).

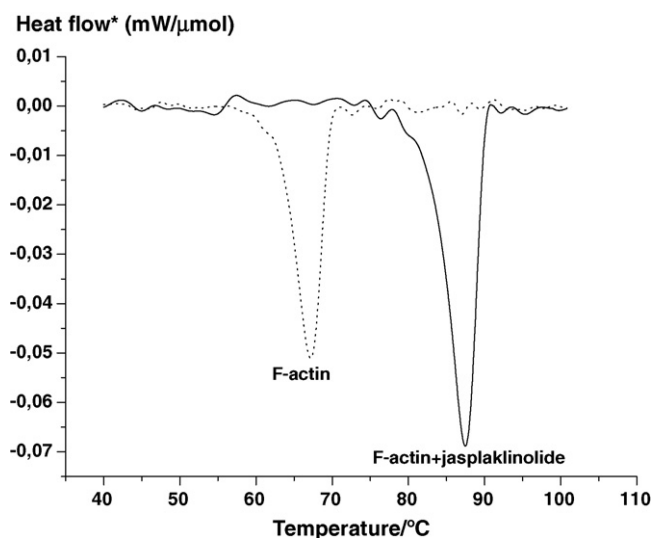


Fig. 2. The recorded DSC thermograms in the presence (solid) and absence (dot) of *jasplakinolide*. The heat-flow* (mW/μmol) is designated the normalized form of the heat-flow (mW) for the amount of the applied protein (μmol).

It was shown previously that BeF_x could replace the P_i of the ADP.P_i complex within the nucleotide-binding region of actin (Fig. 4). When the BeF_x was applied as a P_i analogue the melting temperature shifted from 67.4 °C to 83.7 °C (Fig. 1), in

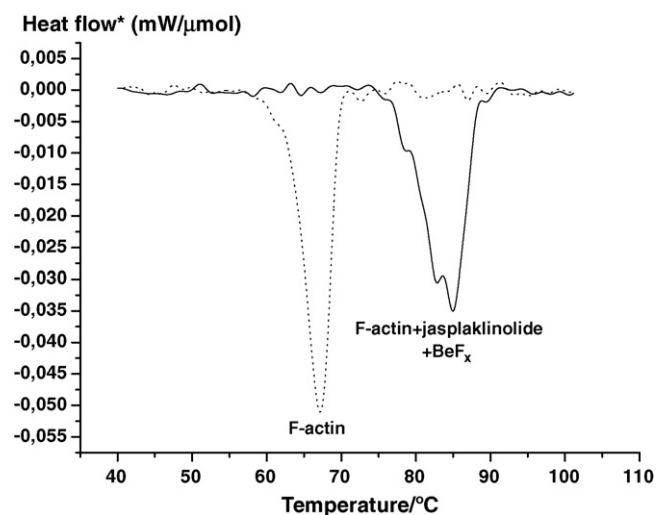


Fig. 3. The combined effect of *jasplakinolide* and BeF_x on the actin filament. The DSC curves were recorded in the presence (solid) and absence (dot) of *jasplakinolide* and BeF_x . The heat-flow* (mW/μmol) is representing the normalized form of the heat-flow (mW) for the amount of the applied protein (μmol).

agreement with earlier studies [25]. This result indicated that the beryllium fluoride was able to affect the conformation of the actin filaments by stabilizing the structure of the filaments.

As it was previously reported, *jasplakinolide* is able to bind to the actin filaments with high affinity ($K_D = 15$ nM) [12]. The time

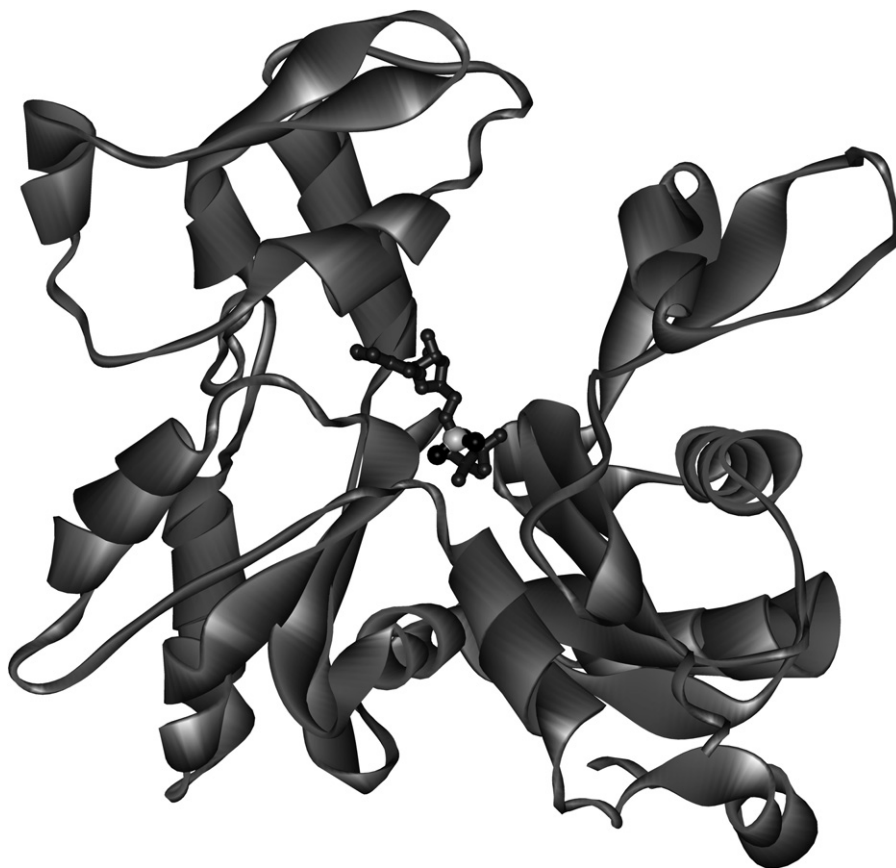


Fig. 4. Schematic picture of the actin monomer (Protein Data Bank: 1NWK) binding the P_i analogue ADP.BeF_x (Protein Data Bank: 4UKD) in the nucleotide-binding cleft.

required to achieve the *jasplakinolide* effect on the F-actin is not longer than the time required to mix the constituents of the sample [13]. Adding *jasplakinolide* to the actin filaments increased the T_m in our experiments to 87.3 °C. This observation was in agreement with our previous results [10,11] and indicated that the toxin could effectively stabilize the actin filaments (Fig. 2).

These results demonstrated that both compounds used during the DSC experiments possess the ability of stabilizing the actin filaments. The melting temperature of the F-actin increased approximately to the same extent when BeF_x and *jasplakinolide* was used separately (Figs. 1 and 2). These observations suggested that the beryllium fluoride and the *jasplakinolide* affected the heat stability of the actin filaments through similar molecular mechanisms.

If these two actin-binding compounds can stabilize the actin filaments by the same mechanism, then none of the two should be able to further stabilize the filaments once the other one has reached its maximal effect. To test this prediction the calorimetric experiments were repeated when both *jasplakinolide* and BeF_x were present in the sample (Fig. 3). The thermogram from these experiments showed that the melting temperature of the filaments in complex with $\text{ADP}\cdot\text{BeF}_x$ and *jasplakinolide* was 85.6 °C (Fig. 3), which is nearly identical with the values obtained in the presence of the beryllium fluoride or the toxin alone. This observation corroborated our previous conclusions that $\text{ADP}\cdot\text{BeF}_x$ and *jasplakinolide* probably altered the thermal stability of the F-actin through similar molecular mechanisms. One possible explanation behind the similar molecular background can be a competition between the BeF_x and the *jasplakinolide* for the same binding site as it was previously described in details for cofilin and BeF_x by Muhrad et al. [33].

4. Conclusion

Differential scanning calorimetry is a widely used method to study the phase transitions and conformational changes within biological macromolecules [34]. In our experiments we used beryllium fluoride as a phosphate analogue to simulate the $\text{ADP}\cdot\text{P}_i$ intermediate step of the ATPase cycle of actin. We applied *jasplakinolide* as well to examine its impact on the thermal stability on the actin filaments. The heat-flow diagrams were recorded from 0 °C to 100 °C in the presence of BeF_x and/or *jasplakinolide*. The melting temperatures were nearly identical when the heat denaturation curves were recorded by using the different compounds separately. These findings suggested that the beryllium fluoride and the toxin affected the stability of the actin filaments through similar molecular mechanisms. To test this assumption we measured the thermodynamic stability of the filamentous actin when both the phosphate analogue and the drug were present in the sample solution. The melting temperature in this case was approximately the same as it was with either $\text{ADP}\cdot\text{BeF}_x$ or *jasplakinolide*. This observation corroborated our presumption that the *jasplakinolide* affects the stability of the actin filaments through the same molecular mechanism as the beryllium fluoride.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the National Research Foundation (OTKA grant Nos. K60186 and K60968 (M. Ny.)). The SETARAM Micro DSC-II was purchased with a grant (CO-272 (D. L.)) from the National Research Foundation. M. Ny. holds a Wellcome Trust International Senior Research Fellowship in Biomedical Sciences.

References

- [1] H.H. Chowdhury, M.R. Popoff, R. Zorec, *Pflugers Arch.* 439 (2000) R148.
- [2] P. Cossart, *Curr. Opin. Cell Biol.* 7 (1995) 94.
- [3] C. Lamaze, L.M. Fujimoto, H.L. Yin, S.L. Schmid, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 20332.
- [4] R.J. Pelham, F. Chang, *Nature* 419 (2002) 82.
- [5] J.E. Estes, L.A. Selden, H.J. Kinosian, L.C. Gershman, *J. Muscle Res. Cell Motil.* 13 (1992) 272.
- [6] J. Lepault, J.L. Ranck, I. Erk, M.F. Carlier, *J. Struct. Biol.* 112 (1994) 79.
- [7] A. Muhrad, P. Cheung, B.C. Phan, C. Miller, E. Reisler, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 11852.
- [8] A. Orlova, E.H. Egelman, *J. Mol. Biol.* 227 (1992) 1043.
- [9] C. Combeau, M.F. Carlier, *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 17429.
- [10] B. Visegrády, D. Lőrinczy, G. Hild, B. Somogyi, M. Nyitrai, *FEBS Lett.* 565 (2004) 163.
- [11] B. Visegrády, D. Lőrinczy, G. Hild, B. Somogyi, M. Nyitrai, *FEBS Lett.* 579 (2005) 6.
- [12] M.R. Bubb, A.M. Senderowicz, E.A. Sausville, K.L. Duncan, E.D. Korn, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 14869.
- [13] M.R. Bubb, I. Spector, B.B. Beyer, K.M. Fosen, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 5163.
- [14] L.M. Coluccio, L.G. Tilney, *J. Cell Biol.* 99 (1984) 529.
- [15] N.L. Golitsina, A.A. Bobkov, I.V. Dedova, D.A. Pavlov, O.P. Nikolaeva, V.N. Orlov, D.I. Levitsky, *J. Muscle Res. Cell Motil.* 17 (1996) 475.
- [16] N.L. Golitsina, V.L. Shnyrov, D.I. Levitsky, *FEBS Lett.* 303 (1992) 255.
- [17] N. Hartvig, B. Gaszner, M. Kiss, D. Lőrinczy, J. Belágyi, *J. Biochem. Biophys. Methods* 53 (2002) 67.
- [18] M. Kiss, J. Belágyi, D. Lőrinczy, *J. Therm. Anal. Calorim.* 72 (2003) 573.
- [19] D.I. Levitsky, O.P. Nikolaeva, V.N. Orlov, D.A. Pavlov, M.A. Ponomarev, E.V. Rostkova, *Biochemistry (Mosc.)* 63 (1998) 322.
- [20] D.I. Levitsky, E.V. Rostkova, V.N. Orlov, O.P. Nikolaeva, L.N. Moiseeva, M.V. Teplova, N.B. Gusev, *Eur. J. Biochem.* 267 (2000) 1869.
- [21] D. Lőrinczy, J. Belágyi, *J. Therm. Anal. Calorim.* 65 (2000) 627.
- [22] D. Lőrinczy, J. Belágyi, *Thermochim. Acta* 296 (1997) 161.
- [23] D. Lőrinczy, J. Belágyi, *Thermochim. Acta* 259 (1995) 153.
- [24] D. Lőrinczy, F. Könczöl, B. Gaszner, J. Belágyi, *Thermochim. Acta* 322 (1998) 95.
- [25] O.P. Nikolaeva, I.V. Dedova, I.S. Khvorova, D.I. Levitsky, *FEBS Lett.* 351 (1994) 15.
- [26] G. Feuer, F. Molnár, E. Pettko, F.B. Straub, *Hung. Acta Physiol.* 1 (1948) 150.
- [27] J.A. Spudich, S. Watt, *J. Biol. Chem.* 246 (1971) 4866.
- [28] T.W. Houk Jr., K. Ue, *Anal. Biochem.* 62 (1974) 66.
- [29] T.D. Pollard, I. Goldberg, W.H. Schwarz, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 20339.
- [30] A. Cooper, M.A. Nutley, A. Wadood, Oxford University Press, 2001, p. 287.
- [31] J. Ladbury, M.L. Doyle, 2004.
- [32] C.N. Pace, J.M. Scholtz, IRL Press, 2002, p. 299.
- [33] A. Muhrad, I. Ringel, D. Pavlov, Y.M. Peyser, E. Reisler, *Biophys. J.* 91 (2006) 4490.
- [34] F.P. Schwarz, H.J. Hinz, *IUPAC* 73 (2001) 745.

József Orbán, Dénes Lőrinczy, Miklós Nyitrai, Gábor Hild

NUCLEOTIDE DEPENDENT DIFFERENCES BETWEEN THE α -SKELETAL AND α -CARDIAC ACTIN
ISOFORMS

BBRC, Vol. 368 (2008), pp. 696-702

Nucleotide dependent differences between the α -skeletal and α -cardiac actin isoforms

József Orbán, Dénes Lőrinczy, Miklós Nyitrai, Gábor Hild*

University of Pécs, Faculty of Medicine, Department of Biophysics, Pécs, Szigeti Str. 12, H-7624, Hungary

Received 23 January 2008

Available online 7 February 2008

Abstract

The thermodynamic properties of the actin filaments prepared from cardiomyocytes were investigated with differential scanning calorimetry. This method could distinguish between the α -cardiac and α -skeletal components of the actin filaments polymerised from ADP-actin monomers by their different melting temperatures (T_m). Similar separation was not possible with filaments polymerised from ATP-actin monomers. Further analyses revealed that the activation energy (E_{act}) was greater for filaments of α -skeletal actin than for α -cardiac actin monomers when the filaments were polymerised from ADP-actin monomers. These results showed that the α -cardiac actin filaments were thermodynamically less stable than the filaments of α -skeletal actin and their difference was nucleotide dependent. Based on these results and considering previous observations it was concluded that the existence of two actin isoforms and their nucleotide dependent conformational differences are part of the tuning regulatory mechanism by which the cardiac muscle cells can maintain their biological function under pathological conditions.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Calorimetry; Thermodynamics; Stability; Nucleotides; Actin filament; Protein conformation

Actin is an important intracellular protein with versatile cellular functions [1–4]. In the heart muscle cells both α -cardiac and α -skeletal isoforms of actin can be found [5,6]. The contribution of the skeletal actin isoform in the cardiac muscle is 16–24% of the total actin [5,6]. The actin binds an ATP in complex with a divalent magnesium ion under physiological circumstances [7]. The ATP is hydrolysed during the polymerisation of the actin monomers and the filaments contain mainly ADP in their matured form [8]. The role of the nucleotide in the mechano-chemical properties of the actin filament was emphasized by Janmey and colleagues when they suggested that the energy utilized during the breakdown of the ATP could be stored in the protein [9]. The characterisation of the ADP-actin revealed a change in the subdomain structure and the dynamics of the protein as well [10,11]. Increased inter-monomer flexi-

bility and decreased stiffness were observed when the actin filaments were polymerised from ADP-actin monomers [9,12].

The work of some actin-binding proteins (e.g. thymosin β_4 , ARP 2/3 and cofilin) in the cardiac muscle tissue is strongly influenced by the quality of the actin-bound nucleotide [13–15]. Based on the essential roles of the actin-binding proteins in the eukaryotic cells a detailed investigation of the different forms of their targeted actin isoforms is essential to understand the complex work of the cytoskeletal network. In the non-muscle cells the ATP concentration is influenced by several intracellular factors [16]. The cellular ATP depletion can be the consequence of hypoxia or mitochondrial dysfunction that can cause an increase in the concentration of the ADP-F-actin while the cells become more susceptible to apoptosis [16–18]. The ATP depletion inside the cardiac cells can be the consequence of ischemic cardiac diseases and other heart diseases as well [19].

* Corresponding author. Fax: +36 72 536 261.

E-mail address: gabor.hild@aok.pte.hu (G. Hild).

Differential scanning calorimetry (DSC) is able to determine directly the global thermodynamic properties of a protein and reveal differences on the sub-molecular level as well [20]. In this work the thermodynamic features of actin filaments polymerised from ADP containing actin monomers of heart muscle cells were characterised with the method of differential scanning calorimetry. The measured T_m values and the determined activation energies indicated that the filaments of ADP- α -cardiac actin monomers were thermodynamically less stable than the actin filaments prepared from ADP- α -skeletal actin monomers. The difference disappeared when the filaments were polymerised from ATP-actin monomers. For both the α -cardiac and the α -skeletal isoforms the filaments were more stable when polymerised from ATP-actin monomers than those from ADP-actin. The observed nucleotide and isoform dependent differences in the conformation of the actin filaments may play important roles in the function of muscle cells.

Materials and methods

Sample preparation. The cardiac actin was prepared from acetone powder of bovine heart muscle [21,22]. The calcium saturated actin monomers were stored in a 2 mM Mops buffer (pH 8.0) containing 0.2 mM ATP, 0.1 mM CaCl_2 , 0.1 mM β -mercaptoethanol and 0.005% NaN_3 . The concentration of the actin monomers was calculated by using the extinction coefficient of $0.63 \text{ mg}^{-1} \text{ ml cm}^{-1}$ at 290 nm [23]. The actin bound calcium was changed for magnesium by incubating the samples for 5 min in the presence of 0.2 mM EGTA and 0.1 mM MgCl_2 at room temperature [24]. The exchange of the actin monomer bound ATP for ADP was done by incubating the actin for 1 h at 4 °C in the presence of 1.65 mg/ml hexokinase, 0.5 mg/ml glucose and 1 mM ADP [25]. The ADP-actin was polymerised for 12 h in the presence of 2 mM MgCl_2 and 100 mM KCl. The polymerisation of actin was tested by using pyren-labelled actin in the ratio of 5% as described previously [26]. The excitation wavelength was 365 nm and the emission was monitored at 407 nm.

DSC measurements and theoretical considerations. The calorimetric measurements were performed with a SETARAM Micro DSC-II Calorimeter in the temperature range of 0–100 °C with a constant heating rate of 0.3 K/min. The actin concentration was 69 μM . To analyse the results we applied the method established by Sanchez-Ruiz and his colleagues [27]. Their analysis was based on a model that was created by Lumry and Eyring [28]. The Lumry–Eyring model was successfully applied previously to reveal the thermodynamic properties of actin in solution [29] and in muscle fibres as well [30]. They proposed that the irreversible protein denaturation can be interpreted with a two step kinetic model [28]. In this model a reversible denaturation step was followed by an irreversible one that could be described by a reaction scheme as:



where N is the natural, D is the reversibly denatured and I is the irreversibly denatured form of the protein. The forward and backward rate constants of the reversible step are denoted as k_{+1} and k_{-1} while k_2 appertain to the irreversible formation of the end product from the intermediate D form of the protein. Valuable thermodynamic information about the reversible unfolding can be obtained when the rate constant for the irreversible step (k_2) is much smaller compared to the reversible step, or when the irreversible process takes place above the T_m value where the main

thermodynamic conversion of the protein has occurred. The activation energy of the denaturation process can be related to the calorimetric enthalpy change:

$$\ln \left(\ln \left(\frac{\Delta H_{\text{cal}}}{\Delta H_{\text{cal}} - \Delta H} \right) \right) = \frac{E_A}{R} \left(\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T} \right) \quad (2)$$

where R is the universal gas constant ($8.314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), E_A is the activation energy and ΔH is the enthalpy change related to the T temperature [27,31]. The ΔH values were determined by calculating the under curve area until the temperature point of T . The activation energy can give information about the energy required to drive the protein through the thermal denaturation process.

Results

Sample characterisation

Actin filaments prepared from the actin monomers of cardiac muscle cells were investigated with the method of DSC. Before the polymerisation process the ATP was replaced with ADP in the binding-pocket of the actin monomers (Fig. 1). The critical concentration of the ADP-actin is $\sim 1 \mu\text{M}$ [32,33], therefore, the contribution of the ADP-actin monomers to the amount of the total actin was so small ($<1.5\%$) that their effect on the calorimetric results was negligible under the applied conditions. Polymerisation tests confirmed that the α -cardiac ADP-actin monomers were able to polymerise, and the polymerisation was completed within the applied time frame ($\sim 12 \text{ h}$) (Fig. 2). The SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) could not reveal any contaminating proteins in the samples (inset in Fig. 2).

DSC results on ADP-actin filaments

DSC experiments were carried out on actin filaments polymerised from ADP-actin monomers. The actin was prepared from cardiac muscle cells. The denaturation curve indicated an endothermic transition, and was composed of two distinct peaks (Fig. 3). The T_m values corresponding to the two peaks were $56 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ and $60 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. To analyse the results the measured heat transition curve was decomposed into two Gaussians (Fig. 3). Similar approach had been successfully applied previously for the analysis of complex heat absorption curves [34]. The Gaussian fit resolved the T_m values of $54.3 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ and $60.0 \pm 2.1 \text{ }^\circ\text{C}$, which were close to those obtained without the decomposition. Based on the areas under the fitted Gaussians the peaks with the lower and the higher T_m values contributed by $88 \pm 8\%$ and $12 \pm 8\%$ to the total area of the heat absorption curve, respectively.

We attempted to further analyse the DSC results by determining the activation energy (Eq. (2)) attributed to the denaturation process using a previously described method [27,28]. The peak with the higher T_m could not be analysed reliably because of its small size and the narrow temperature range it covered. The calculated activation energy for the first peak of the DSC curve

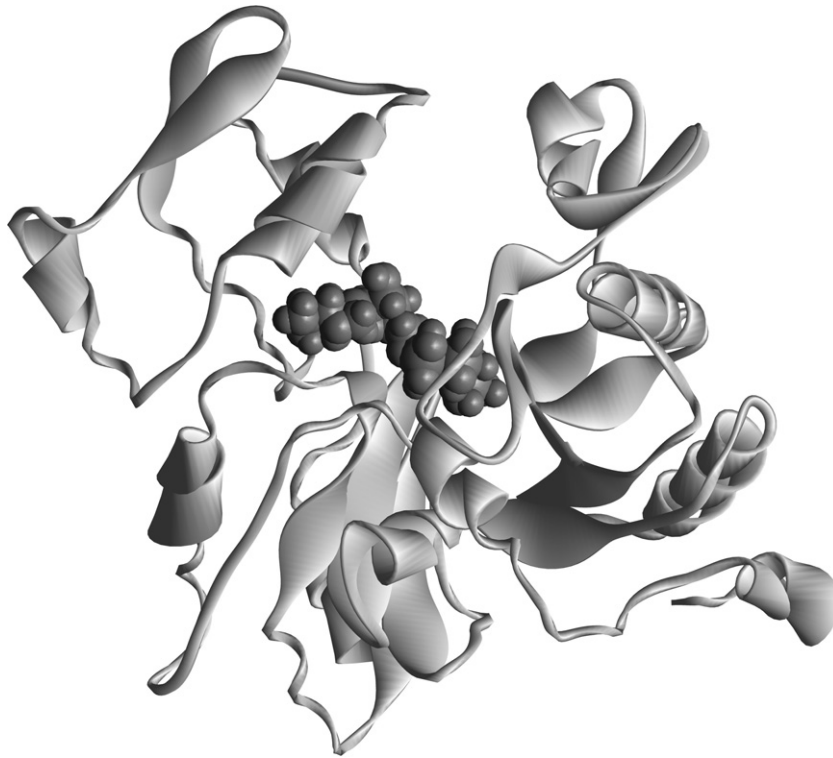


Fig. 1. The ribbon model of the α -skeletal actin monomer from rabbit skeletal muscle. ATP (represented with balls in the middle) in the nucleotide-binding cleft is shown (Protein Data Bank: 1NWK).

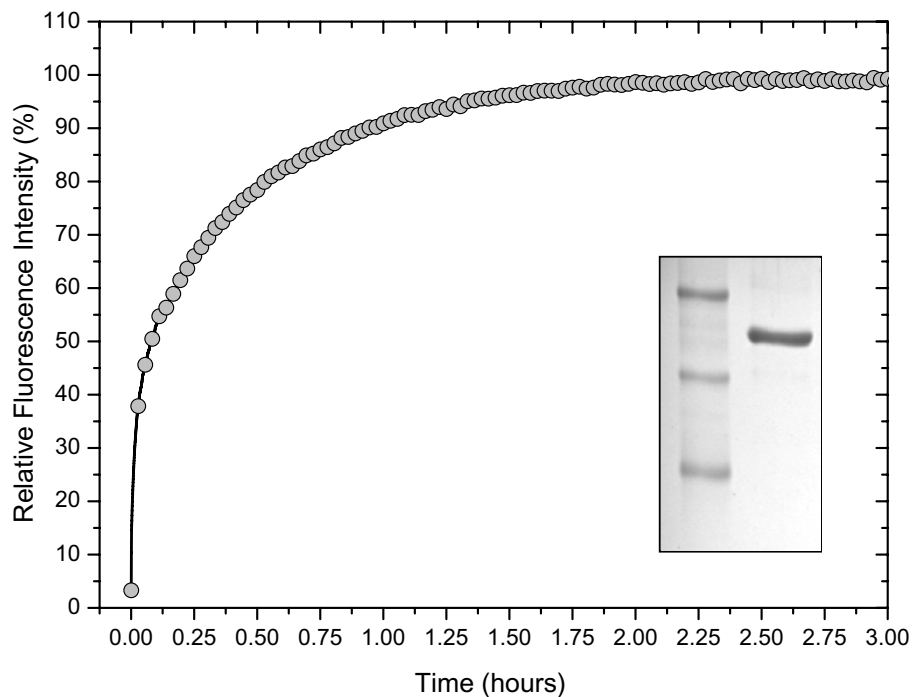


Fig. 2. The polymerisation curve of the ADP-actin from bovine cardiac tissue. The polymerisation was started by adjusting the MgCl_2 concentration to 2 mM and the KCl concentration to 100 mM in the solution containing 69 μM actin (5% pyrene labelled). The inset shows the SDS-PAGE analysis of the actin sample on right side of the reference.

was $254 \pm 11 \text{ kJ mol}^{-1}$ (Fig. 4). This value was smaller than the activation energy determined for the α -cardiac actin filaments from ATP-actin monomers

(332 kJ mol^{-1}) [35], or for α -skeletal actin filaments of ADP-actin (311 kJ mol^{-1} , the data are also presented in Fig. 4) [29].

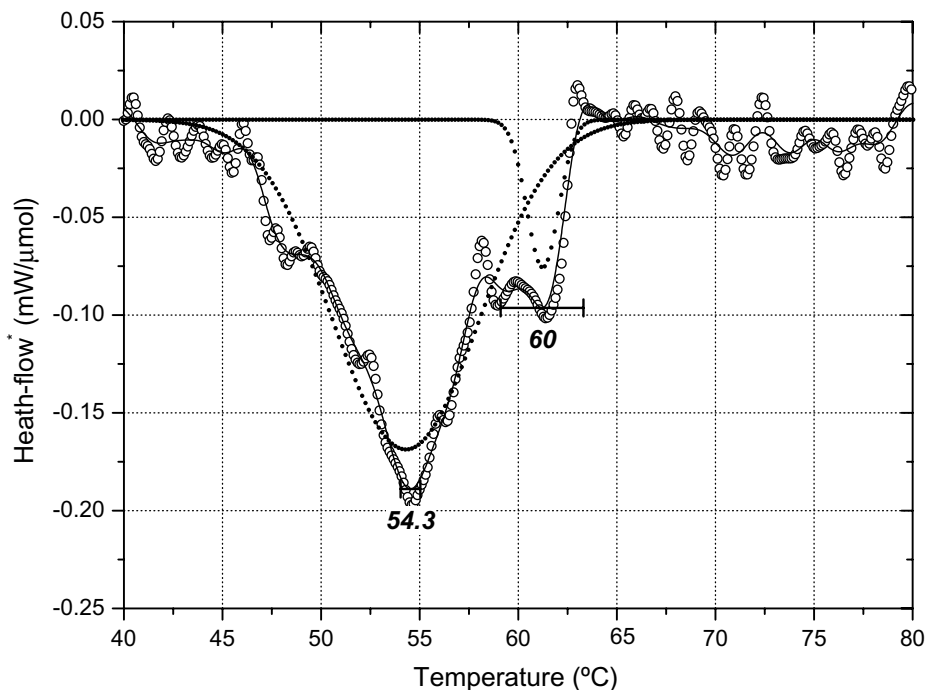


Fig. 3. DSC results on actin filaments. The DSC recording of α -actin filaments prepared from ADP containing actin monomers of the bovine cardiac tissue (\circ). The heat-flow* is representing the normalized version of the original heat-flow values (heat-flow* = heat-flow/ μ mol). The black line is the result of smoothing of the original curve while the dotted lines are indicating the fitted Gaussians. The T_m values with the error bars are shown on the figure as well.

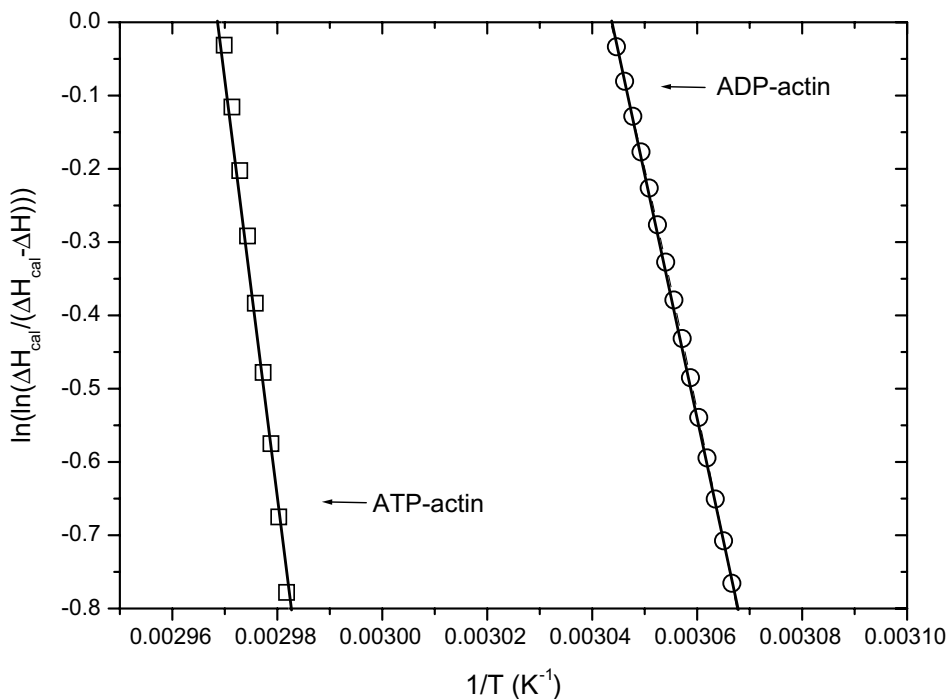


Fig. 4. Analysis of the DSC results. The calculation of the activation energy for actin filaments prepared from ATP (\square) or ADP (\circ) containing actin monomers of the bovine cardiac tissue based on the method of Sanchez-Ruiz.

Discussion

The comparison of the α -cardiac and α -skeletal actin isoforms

One of the characteristic features of the DSC results was the appearance of the two peaks in the heat absorption curve (Fig. 3). A possible explanation for this observation could be that the nucleotide exchange was not complete during the preparation of ADP-actin monomers, and the samples contained ATP-actin before the polymerisation. It is unlikely that the method fails to replace the bound ATP with ADP in the case of the α -cardiac actin isoform because the method of nucleotide exchange is well established, and was previously successfully used in many cases for skeletal actin [36].

An alternative explanation for the appearance of the two peaks is based on earlier observations that the actin from cardiac muscle contains α -skeletal actin (16–24%) as well [5,6]. The T_m value of 60 ± 2 °C we observed for the higher temperature peak is close to the value of 58.4 °C, which was obtained previously for the filaments polymerised from α -skeletal ADP-actin monomers [29]. The proximity of these values suggests that the higher temperature peak in Fig. 3 belongs to the α -skeletal part of the actin pool within the cardiac cells. To test this possibility we determined the contribution of the areas belonging to the two peaks of the recorded DSC curve. The contribution of the peak associated with the higher T_m value was similar to the α -skeletal actin content of the heart muscle cells ($12 \pm 8\%$ vs. 16–24%) [5,6], which corroborates the conclusion that the higher temperature peak is attributed to α -skeletal actin. The appearance of the two peaks can also be caused by the differences in the thermodynamic properties of the different α -actin isoforms. Considering the T_m values it is possible to compare the thermodynamic stability of the different forms of proteins as the higher T_m value can be attributed to a thermodynamically more stable protein conformation [37,38]. The advantage of exploring the differences between the melting temperatures is that their position is largely independent of the applied thermodynamic model describing the process of the denaturation [39]. When the filaments were polymerised from ADP-actin monomers the lower T_m observed for α -cardiac actin filaments indicated that the protein conformation was thermodynamically less stable compared to the α -skeletal actin filaments. Analyses that were carried out according to the approach of Sanchez-Ruiz and colleagues [27] showed that the activation energy (E_{act}) was $\sim 18\%$ smaller for the α -cardiac actin filaments (254 kJ mol^{-1} ; Fig. 4) than for the α -skeletal actin filaments (311 kJ mol^{-1}) [29], when both of them were prepared from ADP-actin monomers. The larger energy requirement could be related to the more heat resistant protein matrix, which supports the conclusion that the α -cardiac actin filaments are thermodynamically less stable than α -skeletal actin filaments, when both are prepared from ADP-actin monomers.

The effect of nucleotide exchange on actin monomers

When the actin filaments were prepared from cardiac ATP-actin monomers only one peak was previously found with a T_m value of 62.17 °C [40], so the two isoforms within the cardiac actin pool were indistinguishable. This result can indicate that the conformational differences between the filaments of α -cardiac actin and α -skeletal actin are nucleotide dependent, so they can only be observed when the filaments are polymerised from ADP-actin monomers.

It is well known that α -skeletal actin filaments can generate a more stable and rigid conformation when they are prepared from ATP-actin monomers compared to the filaments prepared from ADP-actin monomers [9–12]. There was previously no report about such nucleotide dependence in the case of the α -cardiac actin isoform. The observation that the T_m value was lower for the actin filaments polymerised from α -cardiac ADP-actin monomers (54.3 ± 0.5 °C) than from cardiac ATP-actin monomers (62.17 °C) (Fig. 3) showed a thermodynamically less stable protein matrix when the actin filaments were prepared from ADP containing cardiac actin monomers. The calculated activation energy for the α -cardiac actin filaments was $254 \pm 11 \text{ kJ mol}^{-1}$ (Fig. 4). This value is smaller than the activation energy determined previously for the α -cardiac ATP-actin filaments (332 kJ mol^{-1}) [35], and thus the difference between the calculated activation energy values gives an additional evidence (similarly to the case of α -skeletal actin) that the actin filaments prepared from α -cardiac ATP-actin monomers are thermodynamically more stable than the filaments prepared from α -cardiac ADP-actin monomers.

Conclusion

In this study the comparison of the α -actin isoforms revealed that the filaments of the α -skeletal actin were more resistant to heat denaturation than the α -cardiac filaments, when they were polymerised from ADP-actin monomers. This difference was not found in filaments polymerised from ATP-actin monomers, which indicates that the conformational differences between the isoforms were nucleotide dependent. The structure and the dynamics of proteins can be related to their biological functions [41–43]. The proper function of the cytoskeletal and sarcomeric proteins are essential for the normal work of the cardiomyocytes [44]. Previous observations revealed that the isoform content of cardiac muscle cells could vary under various circumstances [5]. In diseased heart increased α -skeletal/ α -cardiac actin ratio was observed, which indicates that the altered stoichiometry of the actin isoforms can be a response to the altered demands against the cardiac muscle [6,45].

Our present results can assist to understand the molecular details behind the organisation of the actin filament pool in the cardiac muscle cells. It is reasonable to assume that the properties of the actin pool are optimal under

physiological conditions. In this case the filaments are polymerised from ATP-actin monomers and their conformation seems to be isoform independent. The intracellular ATP depletion is a serious condition when the concentration of ADP-actin monomers is elevated. The filaments polymerised under these conditions from ADP-actin monomers are more flexible than those polymerised from ATP-actin monomers, so their conformation differs from their optimal physiological state. Although this fact is true for both α -skeletal and α -cardiac actin isoforms the change in the α -skeletal actin filaments is smaller due to the nucleotide dependent nature of the differences between the actin isoforms. The α -skeletal actin filaments remain more rigid, i.e. their conformation is more similar to the physiological state of them.

The elevated level of the α -skeletal actin isoform [6,45] can contribute to the tuning of the conformational properties of the total actin population. We can conclude that the existence of two actin isoforms and their nucleotide dependent conformational differences are part of the tuning regulatory mechanism by which the cardiac muscle cells can maintain their biological function under pathological conditions.

Acknowledgements

We are grateful to Professor Béla Somogyi for the support he produced during the preparation of this study. This work was supported by the Hungarian Academy of Sciences and by grants from the Hungarian Scientific Research Fund (OTKA Grant No. K60186 and K60968 (Miklós Nyitrai)). The SETARAM Micro DSC-II was purchased with a Grant (CO-272) from the Hungarian Scientific Research Fund (Dénes Lőrinczy). Miklós Nyitrai holds a Wellcome Trust International Senior Research Fellowship in Biomedical Sciences.

References

- [1] H.H. Chowdhury, M.R. Popoff, R. Zorec, Actin cytoskeleton and exocytosis in rat melanotrophs, *Pflugers Arch.* 439 (2000) R148–R149.
- [2] C. Lamaze, L.M. Fujimoto, H.L. Yin, S.L. Schmid, The actin cytoskeleton is required for receptor-mediated endocytosis in mammalian cells, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 20332–20335.
- [3] P. Cossart, Actin-based bacterial motility, *Curr. Opin. Cell Biol.* 7 (1995) 94–101.
- [4] R.J. Pelham, F. Chang, Actin dynamics in the contractile ring during cytokinesis in fission yeast, *Nature* 419 (2002) 82–86.
- [5] J. Vandekerckhove, G. Bugaisky, M. Buckingham, Simultaneous expression of skeletal muscle and heart actin proteins in various striated muscle tissues and cells. A quantitative determination of the two actin isoforms, *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 1838–1843.
- [6] H.R. Bergen 3rd, K. Ajtai, T.P. Burghardt, A.I. Nepomuceno, D.C. Muddiman, Mass spectral determination of skeletal/cardiac actin isoform ratios in cardiac muscle, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17 (2003) 1467–1471.
- [7] J.E. Estes, L.A. Selden, H.J. Kinosian, L.C. Gershman, Tightly-bound divalent cation of actin, *J. Muscle Res. Cell Motil.* 13 (1992) 272–284.
- [8] H. Isambert, P. Venier, A.C. Maggs, A. Fattoum, R. Kassab, D. Pantaloni, M.F. Carlier, Flexibility of actin filaments derived from thermal fluctuations. Effect of bound nucleotide, phalloidin, and muscle regulatory proteins, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 11437–11444.
- [9] P.A. Janmey, S. Hvidt, G.F. Oster, J. Lamb, T.P. Stossel, J.H. Hartwig, Effect of ATP on actin filament stiffness, *Nature* 347 (1990) 95–99.
- [10] L.R. Otterbein, P. Graceffa, R. Dominguez, The crystal structure of uncomplexed actin in the ADP state, *Science* 293 (2001) 708–711.
- [11] A. Orlova, E.H. Egelman, A conformational change in the actin subunit can change the flexibility of the actin filament, *J. Mol. Biol.* 232 (1993) 334–341.
- [12] M. Nyitrai, G. Hild, N. Hartwig, J. Belágyi, B. Somogyi, Conformational and dynamic differences between actin filaments polymerized from ATP- or ADP-actin monomers, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 41143–41149.
- [13] K. Mohri, H. Takano-Ohmuro, H. Nakashima, K. Hayakawa, T. Endo, K. Hanaoka, T. Obinata, Expression of cofilin isoforms during development of mouse striated muscles, *J. Muscle Res. Cell Motil.* 21 (2000) 49–57.
- [14] J.F. Rouayrenc, A. Fattoum, J. Gabrion, E. Audemard, R. Kassab, Muscle gelsolin: isolation from heart tissue and characterization as an integral myofibrillar protein, *FEBS Lett.* 167 (1984) 52–58.
- [15] A.G. Terasaki, K. Morikawa, H. Suzuki, K. Oshima, K. Ohashi, Characterization of Arp2/3 complex in chicken tissues, *Cell Struct. Funct.* 27 (2002) 383–391.
- [16] S.J. Atkinson, M.A. Hosford, B.A. Molitoris, Mechanism of actin polymerisation in cellular ATP depletion, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 5194–5199.
- [17] D. Urosev, Q. Ma, A.L. Tan, R.C. Robinson, L.D. Burtnick, The structure of gelsolin bound to ATP, *J. Mol. Biol.* 357 (2006) 765–772.
- [18] C.W. Gourlay, K.R. Ayscough, The actin cytoskeleton: a key regulator of apoptosis and ageing? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6 (2005) 583–589.
- [19] K. Carvajal, R. Moreno-Sanchez, Heart metabolic disturbances in cardiovascular diseases, *Arch. Med. Res.* 34 (2003) 89–99.
- [20] D.I. Levitsky, O.P. Nikolaeva, V.N. Orlov, D.A. Pavlov, M.A. Ponomarev, E.V. Rostkova, Differential scanning calorimetric studies on myosin and actin, *Biochemistry (Mosc)* 63 (1998) 322–333.
- [21] G. Feuer, F. Molnár, E. Pettko, F.B. Straub, Studies on the composition and polymerisation of actin, *Hung. Acta Physiol.* 1 (1948) 150–163.
- [22] J.A. Spudich, S. Watt, The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the troponin–troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin, *J. Biol. Chem.* 246 (1971) 4866–4871.
- [23] T.W. Houk Jr., K. Ue, The measurement of actin concentration in solution: a comparison of methods, *Anal. Biochem.* 62 (1974) 66–74.
- [24] H. Strzelecka-Golaszewska, J. Moraczewska, S.Y. Khaitlina, M. Mossakowska, Localization of the tightly bound divalent-cation-dependent and nucleotide-dependent conformation changes in G-actin using limited proteolytic digestion, *Eur. J. Biochem.* 211 (1993) 731–742.
- [25] G. Drewes, H. Faulstich, A reversible conformational transition in muscle actin is caused by nucleotide exchange and uncovers cysteine in position 10, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 5508–5513.
- [26] A.H. Criddle, M.A. Geeves, T. Jeffries, The use of actin labelled with *N*-(1-pyrenyl)iodoacetamide to study the interaction of actin with myosin subfragments and troponin/tropomyosin, *Biochem. J.* 232 (1985) 343–349.
- [27] J.M. Sanchez-Ruiz, J.L. Lopez-Lacomba, M. Cortijo, P.L. Mateo, Differential scanning calorimetry of the irreversible thermal denaturation of thermolysin, *Biochemistry* 27 (1988) 1648–1652.
- [28] R. Lumry, H. Eyring, Conformation changes of proteins, *J. Phys. Chem.* 58 (1954) 110–120.
- [29] J. Orbán, K. Pozsonyi, K. Szarka, S. Barkó, E. Bódis, D. Lőrinczy, Thermal characterisation of actin filaments prepared from ADP-actin monomers, *JTAC* 84 (2006) 619–623.

- [30] T. Dergez, F. Könczöl, N. Farkas, J. Belágyi, D. Lőrinczy, DSC study of glycerol-extracted muscle fibers in intermediate states of ATP hydrolysis, *J. Therm. Anal. Calorimetry* 80 (2005) 445–449.
- [31] T. Vogl, C. Jatzke, H.J. Hinz, J. Benz, R. Huber, Thermodynamic stability of annexin V E17G: equilibrium parameters from an irreversible unfolding reaction, *Biochemistry* 36 (1997) 1657–1668.
- [32] E.D. Korn, M.F. Carlier, D. Pantaloni, Actin polymerisation and ATP hydrolysis, *Science* 238 (1987) 638–644.
- [33] T.D. Pollard, I. Goldberg, W.H. Schwarz, Nucleotide exchange, structure, and mechanical properties of filaments assembled from ATP-actin and ADP-actin, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 20339–20345.
- [34] D. Lőrinczy, J. Belágyi, Nucleotide binding induces global and local structural changes of myosin head in muscle fibres, *Eur. J. Biochem.* 268 (2001) 5970–5976.
- [35] G. Papp, B. Bugyi, Z. Ujfalusi, S. Halasi, J. Orbán, The effect of pH on the thermal stability of α -cardiac actin isoforms, *JTAC* 82 (2005) 281–285.
- [36] B. Gaszner, M. Nyitrai, N. Hartvig, T. Koszegi, B. Somogyi, J. Belágyi, Replacement of ATP with ADP affects the dynamic and conformational properties of actin monomer, *Biochemistry* 38 (1999) 12885–12892.
- [37] J. Ladbury, M.L. Doyle, *Biocalorimetry 2: Applications of Calorimetry in the Biological Sciences*, John Wiley & Sons Ltd, (2004) 24–25.
- [38] A. Cooper, M.A. Nutley, A. Wadood, Differential scanning microcalorimetry, in: S.E. Harding, B.Z. Chowdhury (Eds.), *Protein–ligand interactions: hydrodynamics and calorimetry*, Oxford University Press, Oxford, 2001, pp. 287–318.
- [39] C.N. Pace, J.M. Scholtz, Measuring the conformational stability of a protein, in: T.E. Creighton (Ed.), *Protein Structure*, Springer, Oxford, 2002, pp. 299–323.
- [40] J. Orbán, S. Halasi, G. Papp, S. Barkó, B. Bugyi, Thermodynamic characterization of different actin isoforms, *JTAC* 82 (2005) 287–290.
- [41] S. Sukumaran, K. Hauser, E. Maier, R. Benz, W. Mantele, Structure–function correlation of outer membrane protein porin from *Paracoccus denitrificans*, *Biopolymers* 82 (2006) 344–348.
- [42] M. Sun, J.L. Oakes, S.K. Ananthanarayanan, K.H. Hawley, R.Y. Tsien, S.R. Adams, C.M. Yengo, Dynamics of the upper 50-kDa domain of myosin V examined with fluorescence resonance energy transfer, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 5711–5717.
- [43] C.M. Yengo, E.M. De La Cruz, L.R. Chrin, D.P. Gaffney 2nd, C.L. Berger, Actin-induced closure of the actin-binding cleft of smooth muscle myosin, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 24114–24119.
- [44] J.G. Seidman, C. Seidman, The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms, *Cell* 104 (2001) 557–567.
- [45] D.S. Lim, R. Roberts, A.J. Marian, Expression profiling of cardiac genes in human hypertrophic cardiomyopathy: insight into the pathogenesis of phenotypes, *J. Am. Coll. Cardiol.* 38 (2001) 1175–1180.

József Orbán, Dénes Lőrinczy, Gábor Hild and Miklós Nyitrai

NON-COOPERATIVE STABILIZATION EFFECT OF PHALLOIDIN ON ADP·BEF_x- AND ADP·ALF₄-
ACTIN FILAMENTS

Biochemistry, Vol. 47 (2008), pp. 4530-4534

Noncooperative Stabilization Effect of Phalloidin on ADP.BeF_x- and ADP.AIF₄-Actin Filaments[†]

József Orbán, Dénes Lőrinczy, Gábor Hild, and Miklós Nyitrai*

Department of Biophysics, Faculty of Medicine, University of Pécs, Pécs, Szigeti str. 12, H-7624 Hungary

Received January 13, 2008; Revised Manuscript Received February 18, 2008

ABSTRACT: Actin plays important roles in eukaryotic cell motility. During actin polymerization, the actin-bound ATP is hydrolyzed to ADP and P_i. We carried out differential scanning calorimetry experiments to characterize the cooperativity of the stabilizing effect of phalloidin on actin filaments in their ADP.P_i state. The ADP.P_i state was mimicked by using ADP.BeF_x or ADP.AIF₄. The results showed that the binding of the nucleotide analogues or phalloidin stabilized the actin filaments to a similar extent when added separately. Phalloidin binding to ADP.BeF_x- or ADP.AIF₄-actin filaments further stabilized them, indicating that the mechanism by which phalloidin and the nucleotide analogues affect the filament structure was different. The results also showed that the stabilization effect of phalloidin binding to ADP.BeF_x or ADP.AIF₄-bound actin filaments was not cooperative. Since the effect of phalloidin binding was cooperative in the absence of these nucleotide analogues, these results suggest that the binding of ADP.BeF_x or ADP.AIF₄ to the actin modified the protomer-protomer interactions along the actin filaments.

Actin is one of the main components of the cytoskeleton and plays important roles in the motility of eukaryotic cells (1–7). The actin monomer can bind a nucleotide in complex with a divalent cation in the cleft between the two main domains of the protein (Figure 1) (8). During polymerization, the ATP is hydrolyzed to ADP and P_i¹ (9–16). The ADP.P_i state is transient as the inorganic phosphate product is released from actin after polymerization. For the characterization of the short-lived ADP.P_i state, nucleotide analogues such as ADP.BeF_x or ADP.AIF₄ can be applied (17–19).

The effect of the binding of ligands to actin filaments is often cooperative; i.e., binding of the ligands induces allosteric conformational changes in the actin protomers distant from the bound protomer (20–24). In most of the cases, the biological function of the cooperative behavior of actin filaments is unclear. In a special case, it was proposed that cooperative interactions could play an important role in the regulation of muscle contraction (25). We suggested recently that the cooperative behavior of actin filaments could provide the structural bases for information channels in living cells, through which the different actin-binding effectors can

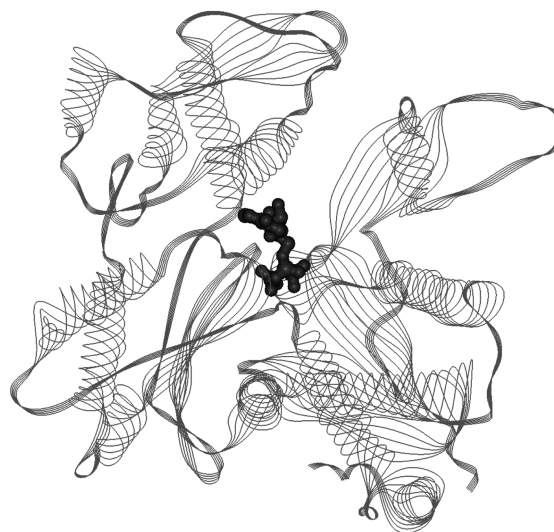


FIGURE 1: Ribbon model of the α -skeletal actin monomer from rabbit skeletal muscle. ATP (represented with spheres) in the nucleotide-binding cleft is shown (Protein Data Bank entry 1NWK).

express their full effect even under substoichiometric binding conditions (26).

Previous studies have shown that the binding of phalloidin stabilizes the structure of actin filaments (27–33) and one bound phalloidin can stabilize seven neighboring protomers (26). In this work, we characterize the effect of phalloidin on the thermal stability of actin filaments in complex with different nucleotide analogues (ADP.BeF_x or ADP.AIF₄) by using differential scanning calorimetry (DSC). The toxin was applied at various phalloidin:actin concentration ratios. The results show that the stabilizing effect of phalloidin binding on ADP.BeF_x- or ADP.AIF₄-bound actin filaments was not cooperative, indicating that the binding of ADP.BeF_x or

[†] This study was supported by grants from the Hungarian Scientific Research Fund [OTKA Grants K60186 and K60968 (M.Ny.)]. The SETARAM Micro DSC-II instrument was purchased with a grant (CO-272) from the Hungarian Scientific Research Fund (D.L.). M.N. holds a Wellcome Trust International Senior Research Fellowship in Biomedical Sciences.

* To whom correspondence should be addressed. Phone: +36-72-536357. Fax: +36-72-536261. E-mail: miklos.nyitrai@aok.pte.hu.

¹ Abbreviations: P_i, inorganic orthophosphate; ADP.P_i, adenosine 5'-diphosphate in complex with inorganic orthophosphate; BeF_x, collective nomination of ADP.BeF₂(OH)·H₂O and ADP.BeF₃·H₂O complexes; ADP.BeF_x or ADP.AIF₄, ADP in complex with Be or Al fluoride, respectively; MOPS, 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid, used as the pH buffer; EGTA, ethylene glycol tetraacetic acid; T_m, melting temperature.

ADP.AIF₄ to actin substantially modifies the interaction between neighboring protomers along the actin filaments.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. KCl, MgCl₂, CaCl₂, MOPS, EGTA, AlCl₃, and NaF were purchased from SIGMA-Aldrich (Budapest, Hungary). ATP, ADP, and β-mercaptoethanol were obtained from MERCK (Darmstadt, Germany). NaN₃ and BeSO₄ were purchased from Fluka (St. Gallen, Switzerland).

Protein Preparation. Skeletal actin was prepared from acetone powder obtained from rabbit muscle (12, 34). After purification, the calcium-bound actin monomers were stored in a 2 mM MOPS buffer (pH 7.3) with 0.2 mM ATP, 0.1 mM CaCl₂, 0.1 mM β-mercaptoethanol, and 0.005% NaN₃. The actin monomer concentration was determined by absorption photometry using 0.63 mg⁻¹ mL cm⁻¹ as the extinction coefficient at 290 nm (35). Actin-bound calcium was exchanged for magnesium by incubating the samples with 0.2 mM EGTA and 0.1 mM MgCl₂ for 5 min (36). Actin polymerization was initiated by the addition of 2 mM MgCl₂ and 100 mM KCl. ADP.BeF_x-actin filaments were prepared in a similar way as described by Levitsky and colleagues (37); BeSO₄ (0.03–3 mM) and NaF (0.1–10 mM) were added to the samples, and actin was polymerized at room temperature for 3 h. Note that since the presence of ADP, BeSO₄, and NaF in the solution leads to formation of either ADP.BeF₂(OH)⁻·H₂O or ADP.BeF₃⁻·H₂O, we refer to them collectively as ADP.BeF_x. ADP.AIF₄-actin filaments were prepared the same way as the ADP.BeF_x except for the addition of 3 mM AlCl₃ instead of BeSO₄. To prepare phalloidin-bound actin filaments, phalloidin at the desired concentrations was added to actin prior to polymerization and the samples were incubated for 12 h at 4 °C. The analogues were added at the same time as polymerization buffer 1 h before the toxin to prepare the actin filaments, and the samples were incubated overnight.

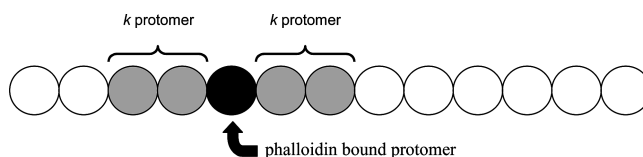
DSC Measurements. Calorimetric experiments were performed with a SETARAM Micro DSC-II calorimeter. The temperature range was 0–100 °C with a heating rate of 0.3 K/min, and the actin concentration was 69 μM (~3 mg/mL). Data were analyzed with MicroCal Origin. Experimental buffer with no protein content was used as a reference. In each case, the samples were heated twice. The second heating measurement indicated full irreversible denaturation of the actin during the first run.

We applied the model described recently (26) to analyze the phalloidin concentration dependence of the DSC data obtained with actin filaments and to define the degree of cooperativity along the filaments. The model assumes that phalloidin can stabilize the conformation of the protomer to which it is bound. In the case of cooperative binding effects, phalloidin can also stabilize adjacent actin protomers along the actin filament (Scheme 1). Using this model, the number of actin protomers stabilized by one phalloidin can be determined by fitting the following equation to the phalloidin concentration dependence of the relative contribution of actin populations unaffected by phalloidin (A):

$$A = (1 - p)^{2k+1} \quad (1)$$

where p is the probability that an actin protomer in the filament binds phalloidin and k is the cooperativity factor.

Scheme 1: Model for the Analysis of the DSC Data (eq 1)^a



^a Circles represent the actin protomers in a filament. The phalloidin is bound to the protomer shown as a black circle and stabilizes its conformation. Neighboring actin protomers (gray circles; k in both directions) could potentially be stabilized by the phalloidin provided that the conformational changes can propagate along the actin filament by allosteric protomer-protomer interactions. The protomers represented by white circles are not affected by the binding of phalloidin. Fit of eq 1 to the experimental data provides the value for k , and thus, the number of actin protomers stabilized by one phalloidin molecule can be calculated as $2k + 1$.

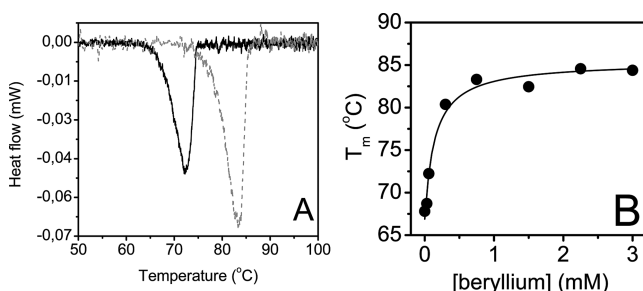


FIGURE 2: Effect of ADP.BeF_x on the thermal stability of actin filaments. Panel A shows the DSC curve obtained when the actin filaments were polymerized after the addition of 0.06 mM BeSO₄ and 0.2 mM NaF (black solid line) or 3 mM BeSO₄ and 10 mM NaF (gray dashed line). The actin concentration was 69 μM. The value of T_m was determined to be 72.2 or 84.8 °C, respectively. (B) The panel shows the T_m values as a function of the beryllium (added BeSO₄) concentration. Hyperbola fit (solid line) to the plot gave a half-saturation beryllium concentration of 0.14 ± 0.05 mM.

The value of A can be determined from the analysis of the DSC curves by determining the under-curve area of the transition characteristic of the actin not affected by phalloidin. In this study, we approximated the under-curve area by using Gaussian fits. The value of p can be calculated as the ratio of applied phalloidin concentration to actin concentration. Thus, $1 - p$ is the probability that an actin protomer does not bind phalloidin. The value of k can be determined by fitting eq 1 to the experimental data, and then the number of actin protomers affected by one phalloidin molecule is calculated to be $2k + 1$ (26).

RESULTS AND DISCUSSION

We carried out differential scanning calorimetry (DSC) experiments to characterize the cooperativity of the stabilizing effect of phalloidin on ADP.BeF_x- and ADP.AIF₄-actin filaments. To achieve this aim, we first characterized the effect of phalloidin and nucleotide analogues separately. Our experiments showed that the binding of ADP.BeF_x, ADP.AIF₄, or phalloidin stabilized the structure of actin filaments, in agreement with previous studies (37, 38). In the presence of 3 mM BeSO₄ and 10 mM NaF, the T_m was greater (84.8 °C) than in the absence of them (64.1 °C) (Figure 2A), in agreement with the results from the Levitsky group (37). In control experiments, T_m values were measured at different beryllium concentrations ($[\text{BeSO}_4]/[\text{NaF}] = 3/10$)

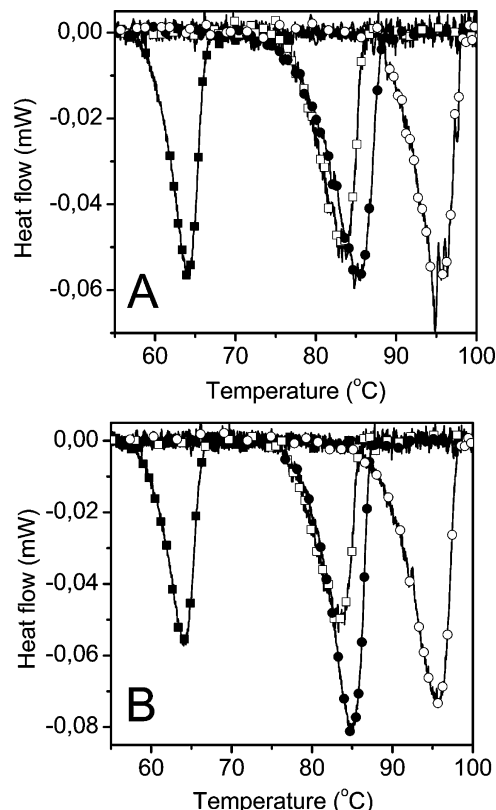


FIGURE 3: Effect of phalloidin on ADP.BeF_x-actin (A) and ADP.AIF₄-actin (B) filaments: calorimetric curves for (■) actin in the absence of nucleotide analogues and phalloidin, (●) actin in the presence of nucleotide analogues, (□) actin with bound phalloidin, and (○) actin in the presence of nucleotide analogues and phalloidin. The corresponding T_m values for actin, actin with phalloidin, actin with nucleotide analogue, and actin with nucleotide analogue and phalloidin were 64.1, 82.3, 84.8, and 95.5 °C, respectively, in panel A. For panel B, the corresponding values are 64.1, 82.3, 84.7, and 95.9 °C.

(Figure 2B). The half-value of the maximal effect was achieved at 0.14 mM BeSO₄, showing that the concentrations of 3 mM BeSO₄ and 10 mM NaF used in the subsequent experiments were sufficiently high to ensure appropriate conditions to reveal the effect of ADP.BeF_x on the actin filaments.

It has been shown previously that phalloidin can stabilize the structure of the actin filaments (27–33). In agreement with these observations, we found that the T_m value shifted to 82.3 °C when phalloidin was added to actin (69 μM) in a 1:1 concentration ratio (Figure 3). Note that due to the high affinity of phalloidin for actin [$K_D = 36$ nM (30)] and considering the applied actin concentration (69 μM) most of the added phalloidin (>99%) bound to actin in these experiments.

Effect of Phalloidin on ADP.BeF_x- and ADP.AIF₄-Actin Filaments. We measured the thermal stability of ADP.BeF_x-actin filaments after phalloidin binding. Previously, it was shown that the binding of phalloidin to ADP-actin filaments polymerized from ATP-actin monomers increased the value of T_m from 64.1 to 82.3 °C. In the case of ADP.BeF_x-actin filaments, the phalloidin, added in a 1:1 concentration ratio, could further stabilize the structure of ADP.BeF_x-actin filaments as in the presence of phalloidin the T_m was greater (95.5 °C) than in the absence of it (84.8 °C) (Figure 3A). When similar experiments were carried out with ADP.AIF₄-

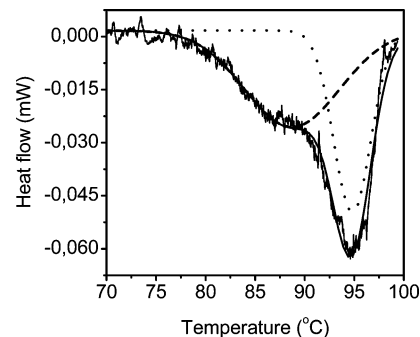


FIGURE 4: Analysis of the DSC curve obtained with ADP.BeF_x-actin filaments at a substoichiometric phalloidin concentration. The phalloidin:actin protomer concentration ratio was 0.8:1. This figure shows the experimental data (solid line) and the two Gaussian curves (dashed and dotted lines) obtained by the decomposition of the experimental curve. The sum of the two Gaussians is also indicated with a solid line. The first Gaussian curve gave an estimate for the T_m of 84.8 °C, while the second peak gave a value of 95.5 °C.

actin filaments, the DSC data showed that ADP.AIF₄ stabilized the actin filaments ($T_m = 84.7$ °C) and the binding of phalloidin could further increase the thermal stability of ADP.AIF₄-actin filaments ($T_m = 95.9$ °C) (Figure 3B).

To interpret these observations, we considered that if the nucleotide analogues and phalloidin use the same mechanism to stabilize the structure of actin filaments, then the addition of phalloidin could not further increase the thermal stability of nucleotide analogue-saturated actin. According to the calorimetric results, the binding of phalloidin resulted in further stabilization of the ADP.BeF_x- and ADP.AIF₄-actin filaments [~84 and ~95 °C, respectively (Figure 3)], indicating that the nucleotide analogues and the phalloidin stabilized the filaments via different molecular mechanisms.

Lack of Cooperativity in ADP.BeF_x- and ADP.AIF₄-Actin Filaments. Previous studies provided evidence that the effect of phalloidin on actin filaments was cooperative (e.g., ref (26)). In this case, cooperative binding meant that one phalloidin molecule could stabilize the conformation of more than one actin protomer; i.e., the stabilization effect of phalloidin propagated along the filaments by allosteric interactions to protomers distant from the phalloidin-bound protomer. In this work, we tested how the nucleotide analogues alter the protomer-protomer interactions along actin filaments by examining the effect of phalloidin on ADP.BeF_x- or ADP.AIF₄-actin filaments at different substoichiometric phalloidin concentrations, i.e., at various phalloidin:actin protomer concentration ratios.

At substoichiometric phalloidin concentrations, the DSC curves could be decomposed into two peaks (Figure 4). To approximate the contribution of these peaks to the heat absorption curves, we applied Gaussian fits. We applied a similar approach successfully in a previous study for the analysis of complex DSC curves (26). The contribution of the lower- and higher-temperature transitions in the DSC curves was quantified by determining the integral of the corresponding Gaussian curves (under-curve areas). The T_m values for the lower- and higher-temperature Gaussian peaks fell into the range of 83–85 and 94–96 °C, respectively (Figure 5), and were in the same range as those determined without the Gaussian fits. By comparing these values to those obtained with the nucleotide analogues in the absence of

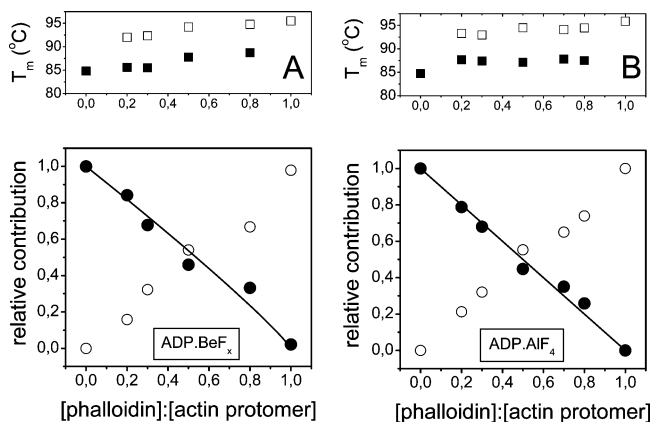


FIGURE 5: Phalloidin concentration dependence of the DSC transitions resolved from the analysis of the data for ADP.BeF_x-actin (A) and ADP.AIF₄-actin (B) filaments. The relative contributions of the actin unaffected by phalloidin (●) or stabilized by the binding of phalloidin (○) were determined by decomposing the DSC curves to two Gaussian curves (Figure 4) and calculating the under-curve areas. The lower-temperature transitions corresponded to the unaffected actin, while the higher-temperature Gaussian curve describes the phalloidin-stabilized actin. Fit of eq 1 to the data corresponding to the unaffected actin (solid lines) gave k values of 0.05 ± 0.1 and -0.01 ± 0.03 for ADP.BeF_x- and ADP.AIF₄-actin filaments, respectively. The top insets show the melting temperatures of actin filaments unaffected by phalloidin (■) or stabilized by the binding of phalloidin (□) at the given actin:phalloidin concentration ratios.

phalloidin (84.8 °C) and at saturating phalloidin concentrations (95.5 °C), we interpret the lower-temperature transitions as the contribution of actin unaffected by phalloidin, while the higher-temperature peaks are interpreted as being characteristic of actin protomers stabilized by the phalloidin. The relative contribution of the lower-temperature peak decreased linearly with an increase in phalloidin concentration in the case of either the ADP.BeF_x-actin (Figure 5A) or ADP.AIF₄-actin (Figure 5B) filaments. In correlation with this observation, the relative contribution of the higher-temperature peak followed a linear, increasing tendency (Figure 5).

We applied the method described previously (26) (eq 1) to analyze the phalloidin concentration dependence of the stabilization effect. The relative contributions of actin populations were determined at different actin:toxin concentration ratios. In a previous work, we studied the cooperative binding of phalloidin to actin filaments polymerized from ATP-actin monomers (26). Considering that the hydrolysis of ATP by the actin protomers and the subsequent phosphate release step is fast compared to the treadmilling of actin, the filaments polymerized from ATP-actin monomers contain mostly ADP-actin protomers. In the absence of nucleotide analogues, the results showed that the binding of one phalloidin molecule could stabilize seven protomers in the actin filaments [$k = 3$ (26)], indicating allosteric interactions between adjacent actin protomers. When the same equation (eq 1) was applied in this study in the case of the lower-temperature transition curves in Figure 5, the value of k was found to be zero within the limits of experimental error for both ADP.BeF_x- and ADP.AIF₄-actin filaments (0.05 ± 0.1 and -0.01 ± 0.03 , respectively). These results indicated that only one actin protomer ($2k + 1 = 1$) was stabilized by the phalloidin binding in these filaments, and thus, the effect of binding of phalloidin to these filaments was not cooperative. The

comparison of this finding to the observation made in the absence of BeF_x and AIF₄ suggests that the binding of the phosphate analogues to the filaments diminished the cooperative nature of the binding of phalloidin to the actin filaments.

CONCLUSIONS

In this study, we find that the effect of phalloidin and the nucleotide analogues on actin was superimposed, indicating that the mechanism by which phalloidin and the nucleotide analogues stabilized the filament structure was different. We also observed that the phalloidin-induced stabilization of the actin filaments, which is cooperative in ADP-actin filaments in the absence of nucleotide analogues, became noncooperative in the presence of ADP.BeF_x or ADP.AIF₄. It appears that there are allosteric interactions between the nucleotide-binding sites and phalloidin-binding sites in actin filaments, and these interactions are modified by the binding of ADP.BeF_x or ADP.AIF₄ to the nucleotide-binding pocket in the actin protomers. As a result, the effect of the binding of phalloidin on the stability of the actin filaments becomes different; the thermal stability increases, but the cooperativity disappears. The disappearance of the cooperative behavior in ADP.BeF_x- and ADP.AIF₄-actin filaments in the case of phalloidin binding indicates that care should be taken when the biological role of these long-range interactions is considered in the case of other actin-binding ligands or proteins. A complete understanding of the biological function of the long-range allosteric interactions along the actin filaments has not yet been achieved. The different nucleotide states of the actin filaments can represent the aging process of the filaments. The fact that the different nucleotide states are correlated with the conformational properties of the protein suggests the functional involvement of the ATP hydrolysis and these nucleotide states in the timing of the actin-related intracellular events, and thus in the regulation of the actin network in living cells.

ACKNOWLEDGMENT

We are grateful to the late Professor Béla Somogyi for the thoughtful discussions about the original ideas of this study.

REFERENCES

1. Cossart, P. (1995) Actin-based bacterial motility. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 94–101.
2. Steinmetz, M. O., Stoffler, D., Hoenger, A., Bremer, A., and Aebi, U. (1997) Actin: From cell biology to atomic detail. *J. Struct. Biol.* 119, 295–320.
3. Pollard, T. D., Blanchoin, L., and Mullins, R. D. (2000) Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29, 545–576.
4. Pollard, T. D., and Borisy, G. G. (2003) Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112, 453–465.
5. Carlier, M. F., Le Clainche, C., Wiesner, S., and Pantaloni, D. (2003) Actin-based motility: From molecules to movement. *BioEssays* 25, 336–345.
6. Pantaloni, D., Le Clainche, C., and Carlier, M. F. (2001) Mechanism of actin-based motility. *Science* 292, 1502–1506.
7. Hehny, H., and Stames, M. (2007) Regulating cytoskeleton-based vesicle motility. *FEBS Lett.* 581, 2112–2118.
8. Sheterline, P., Clayton, J., and Sparrow, J. (1995) Actin. *Protein Profile* 2, 1–103.

9. Carlier, M. F. (1988) Role of nucleotide hydrolysis in the polymerization of actin and tubulin. *Cell Biophys.* 12, 105–117.
10. Carlier, M. F., and Pantaloni, D. (1988) Binding of phosphate to F-ADP-actin and role of F-ADP-Pi-actin in ATP-actin polymerization. *J. Biol. Chem.* 263, 817–825.
11. Carlier, M. F., and Pantaloni, D. (1986) Direct Evidence for ADP-Pi-F-Actin as the Major Intermediate in ATP-Actin Polymerization. Rate of Dissociation of Pi from Actin Filaments. *Biochemistry* 25, 7789–7792.
12. Feuer, G., Molnár, F., Pettko, E., and Straub, F. B. (1948) Studies on the composition and polymerisation of actin. *Hung. Acta Physiol.* 1, 150–163.
13. Janmey, P. A., Hvidt, S., Oster, G. F., Lamb, J., Stossel, T. P., and Hartwig, J. H. (1990) Effect of ATP on actin filament stiffness. *Nature* 347, 95–99.
14. Korn, E. D., Carlier, M. F., and Pantaloni, D. (1987) Actin polymerization and ATP hydrolysis. *Science* 238, 638–644.
15. Pollard, T. D. (1986) Rate constants for the reactions of ATP- and ADP-actin with the ends of actin filaments. *J. Cell Biol.* 103, 2747–2754.
16. Pollard, T. D., Goldberg, I., and Schwarz, W. H. (1992) Nucleotide exchange, structure, and mechanical properties of filaments assembled from ATP-actin and ADP-actin. *J. Biol. Chem.* 267, 20339–20345.
17. Combeau, C., and Carlier, M. F. (1988) Probing the mechanism of ATP hydrolysis on F-actin using vanadate and the structural analogs of phosphate BeF₃ and AlF₄⁻. *J. Biol. Chem.* 263, 17429–17436.
18. Muhrad, A., Cheung, P., Phan, B. C., Miller, C., and Reisler, E. (1994) Dynamic properties of actin. Structural changes induced by beryllium fluoride. *J. Biol. Chem.* 269, 11852–11858.
19. Muhrad, A., Ringel, I., Pavlov, D., Peyser, Y. M., and Reisler, E. (2006) Antagonistic effects of cofilin, beryllium fluoride complex, and phalloidin on subdomain 2 and nucleotide-binding cleft in F-actin. *Biophys. J.* 91, 4490–4499.
20. Orlova, A., and Egelman, E. H. (1997) Cooperative rigor binding of myosin to actin is a function of F-actin structure. *J. Mol. Biol.* 265, 469–474.
21. Drewes, G., and Faulstich, H. (1993) Cooperative effects on filament stability in actin modified at the C-terminus by substitution or truncation. *Eur. J. Biochem.* 212, 247–253.
22. Orlova, A., Prochniewicz, E., and Egelman, E. H. (1995) Structural dynamics of F-actin: II. Cooperativity in structural transitions. *J. Mol. Biol.* 245, 598–607.
23. Moraczewska, J. (2002) Structural determinants of cooperativity in acto-myosin interactions. *Acta Biochim. Pol.* 49, 805–812.
24. Egelman, E. H. (2003) A tale of two polymers: New insights into helical filaments. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 621–630.
25. Butters, C. A., Willadsen, K. A., and Tobacman, L. S. (1993) Cooperative interactions between adjacent troponin-tropomyosin complexes may be transmitted through the actin filament. *J. Biol. Chem.* 268, 15565–15570.
26. Visegrády, B., Lőrinczy, D., Hild, G., Somogyi, B., and Nyitrai, M. (2005) A simple model for the cooperative stabilisation of actin filaments by phalloidin and jasplakinolide. *FEBS Lett.* 579, 6–10.
27. Löw, I., Dancker, P., and Wieland, T. (1975) Stabilization of F-actin by phalloidin. Reversal of the destabilizing effect of cytochalasin B. *FEBS Lett.* 54, 263–265.
28. Dancker, P., Low, I., Hasselbach, W., and Wieland, T. (1975) Interaction of actin with phalloidin: Polymerization and stabilization of F-actin. *Biochim. Biophys. Acta* 400, 407–414.
29. Löw, I., Dancker, P., and Wieland, T. (1976) Stabilization of actin polymer structure by phalloidin: ATPase activity of actin induced by phalloidin at low pH. *FEBS Lett.* 65, 358–360.
30. Faulstich, H., Schafer, A. J., and Weckauf, M. (1977) The dissociation of the phalloidin-actin complex. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* 358, 181–184.
31. Miyamoto, Y., Kuroda, M., Muekata, E., and Masaki, T. (1986) Stoichiometry of actin and phalloidin binding: One molecule of the toxin dominates two actin subunits. *J. Biochem.* 100, 1677–1680.
32. Le Bihan, T., and Gicquaud, C. (1991) Stabilization of actin by phalloidin: A differential scanning calorimetric study. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181, 542–547.
33. Visegrády, B., Lőrinczy, D., Hild, G., Somogyi, B., and Nyitrai, M. (2004) The effect of phalloidin and jasplakinolide on the flexibility and thermal stability of actin filaments. *FEBS Lett.* 565, 163–166.
34. Spudich, J. A., and Watt, S. (1971) The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin. *J. Biol. Chem.* 246, 4866–4871.
35. Houk, T. W., Jr., and Ue, K. (1974) The measurement of actin concentration in solution: A comparison of methods. *Anal. Biochem.* 62, 66–74.
36. Strzelecka-Golaszewska, H., Moraczewska, J., Khaitlina, S. Y., and Mossakowska, M. (1993) Localization of the tightly bound divalent-cation-dependent and nucleotide-dependent conformation changes in G-actin using limited proteolytic digestion. *Eur. J. Biochem.* 211, 731–742.
37. Nikolaeva, O. P., Dedova, I. V., Khvorova, I. S., and Levitsky, D. I. (1994) Interaction of F-actin with phosphate analogues studied by differential scanning calorimetry. *FEBS Lett.* 351, 15–18.
38. Isambert, H., Venier, P., Maggs, A. C., Fattoum, A., Kassab, R., Pantaloni, D., and Carlier, M. F. (1995) Flexibility of actin filaments derived from thermal fluctuations. Effect of bound nucleotide, phalloidin, and muscle regulatory proteins. *J. Biol. Chem.* 270, 11437–11444.

BI800068E

Szulamit Halasi, Gábor Papp, Beáta Bugyi, Szilvia Barkó, József Orbán, Zoltán Ujfalusi,
Balázs Visegrády

THE EFFECT OF PYRENE LABELLING ON THE THERMAL STABILITY OF ACTIN FILAMENTS

Thermochimica Acta, Vol. 445 (2006), 185-189

A disszertációban nem szereplő közlemény.

The effect of pyrene labelling on the thermal stability of actin filaments

Szulamit Halasi^a, Gábor Papp^a, Beáta Bugyi^a, Szilvia Barkó^a,
József Orbán^a, Zoltán Ujfalusi^{a,b}, Balázs Visegrády^{a,*}

^a Department of Biophysics, Faculty of Medicine, University of Pécs, Szigeti Str. 12, H-7624 Pécs, Hungary

^b Research Group for Fluorescence Spectroscopy, Office for Academy Research Groups Attached to Universities and Other Institutions, University of Pécs, Hungary

Available online 29 September 2005

Abstract

The ability of actin to form filaments is fundamental to its biological function and often characterised by various methods *in vitro*. One of the most frequently used methods capitalises on the observation that the fluorescence emission of a pyrene label on the Cys-374 residue of actin is enhanced by a factor of ~ 20 during polymerisation. This method inherently involves the chemical modification of actin monomers with pyrene. It was reported earlier that the pyrene labelling of actin monomers has only small effect on the polymerisation and depolymerisation rates of actin, indicating that the method is suitable to characterise the effect of actin-binding proteins or peptides on the polymerisation kinetics.

In our present work we tested the effect of the pyrene labelling on the thermal denaturation of actin filaments by using the method of differential scanning calorimetry (DSC). By recording the heat denaturation profiles of unlabelled and pyrene labelled actin filaments we observed that pyrene labelling shifted the melting point (T_m) of actin filaments from 66 to 68 °C. A similar effect was detected in the presence of equimolar concentration of phalloidin where the T_m shifted from 79 to 82 °C. We concluded that the observed pyrene labelling induced differences of the thermal denaturation of actin filaments were small. The DSC results, therefore, confirmed that the methods based on the measurements of pyrene intensity during actin polymerisation are suitable to characterise the polymerisation kinetics of actin under *in vitro* conditions.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Actin; Protein conformation; Pyrene; Phalloidin; DSC

1. Introduction

Actin is one of the most abundant proteins in eukaryotes and plays essential roles in many cellular processes. The actin cytoskeleton maintains the mechanical stability of cells by providing the framework for a number of cell functions including cell motility [1], endocytosis [2], phagocytosis [3], protrusion of lamellipodia [4], the formation and function of focal contacts [5], and the interaction of pathogens with the host cell [6]. The dynamic behaviour of the actin cytoskeleton is attributed *in vivo* to the ability of actin filaments to rapidly elongate or depolymerise in response to extrinsic or intrinsic cues [7]. The rapid changes of the actin cytoskeleton require regulatory cellular factors [8].

One of the approaches to understand the details of the mechanisms underlying the complex regulation of the actin cytoskeleton in cells is to design and describe *in vitro* model systems, which resembles the biological function of actin. Amongst the many *in vitro* techniques fluorescence spectroscopy proved to be a powerful tool to study the conformational and dynamic properties of proteins. Actin monomers and filaments were described by these methods in a number of studies. The effect of polymerisation [9], bivalent cations [10–13], nucleotides [14,15], myosin [16,17] and pH [18] was described by using spectroscopic methods. These fluorescence spectroscopic methods require the application of a fluorophore with appropriate spectral properties to provide the conditions for either selective excitation or emission, which enables one to analyse the spectroscopic signal selectively. The selectivity, in many cases, is difficult to achieve by using intrinsic flu-

* Corresponding author. Tel.: +36 72 536268; fax: +36 72 536261.
E-mail address: balazs.visegrady@aok.pte.hu (B. Visegrády).

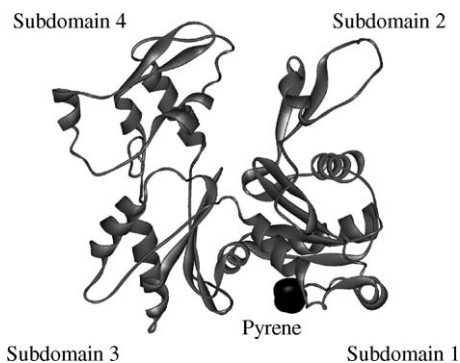


Fig. 1. The ribbon representation of the atomic model of actin monomer (Protein Data Bank file: 1ATN). The pyrene probe is attached to Cys-374 in actin. In the atomic model the position of the Cys-374 was not determined, therefore to indicate the approximate position of the attachment point of the probe the figure shows the neighbouring Arg-373 residue (with a black surface). For better orientation the four subdomains of the actin monomer are also labelled.

orophores, which makes the application of external labels inevitable.

The arsenal of external labels useful for studies with actin has become large in the last decades. One of these labels, the pyrene probe, deserved special attention. The derivative of pyrene (*N*-(1-pyrene)iodoacetamide) binds specifically to the Cys-374 residue of actin under appropriate labelling conditions (Fig. 1). The fluorescence emission of the actin filament bound pyrene proved to be an excellent signal to study the interaction of myosin and myosin fragments with actin [19–28]. It was also shown that the fluorescence intensity of pyrene increases during the polymerisation of actin by a factor of ~20. The advantages of the spectral sensitivity to these protein processes were applied in many previous studies [28–33].

In general, the application of external probes to label a protein can cause modifications in the conformation of the protein, which can result in an altered biological function and in alterations in its interaction with other proteins (e.g., [34]). In the case of pyrene labelling of actin it was shown by time dependent fluorescence spectroscopic experiments that the binding of pyrene to actin had very little effect on the kinetics of actin polymerisation [29] and on the kinetic steps involved in the interaction between actin and myosin fragments [19].

Apart from fluorescence spectroscopic assay many other methods can also detect the conformational changes of proteins. One of these methods is calorimetry which provides detailed information regarding the thermal denaturation of proteins. A number of previous studies showed that calorimetry is sensitive to the ligand induced changes in proteins [35–47]. It is expected, that substantial modification of the protein structure by the binding of fluorophores, would have influence on their thermal stability, and thus calorimetric methods could sense the modifications in the stability of actin caused by the attachment of external probes, such as pyrene. As the effect of pyrene labelling on the thermal stability of

actin filaments was not measured before, in the present work our aim was to test whether the covalently attached pyrene group modifies the thermal behaviour of actin filaments.

Differential scanning calorimetry (DSC) experiments were carried out to characterise the temperature dependence of heat absorption of unlabelled actin filaments and pyrene labelled actin filaments as well. In previous studies it was shown that toxic hexapeptides, such as phalloidin, could stabilise actin filaments [15,48,49]. To test whether the pyrene labelling modified the interaction between phalloidin and actin the DSC experiments were repeated in the presence of phalloidin concentrations suitable to saturate the binding sites on the actin filaments. The calorimetric data showed that although the application of pyrene labels slightly modified the thermal stability of actin filaments in either the presence or absence of toxin. Our observations corroborate the previous conclusions that pyrene labelling of actin does not modify the conformation of the protein substantially, and the methods based on the application of pyrene actin adequately reflects the biological properties of this abundant protein.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

KCl, MgCl₂, CaCl₂, Tris, EGTA, NaN₃, ATP, β-mercaptoethanol, phalloidin was obtained from Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO, USA). *N*-(1-pyrene)iodoacetamid was purchased from Molecular Probes (Eugene, OR, USA).

2.2. Actin preparation and labelling

Actin was prepared from rabbit skeletal muscle [50,51] and labelled with *N*-(1-pyrene)iodoacetamide on the Cys-374 as described previously [19]. Actin concentration and labelling ratios were determined by measuring the absorption spectra of samples with a Shimadzu UV-2100 spectrophotometer. In the calculations the extinction coefficient was taken as 1.11 ml cm⁻¹ mg⁻¹ at 280 nm [52] for monomer actin with a relative molecular mass of 42,300 Da. For the pyrene probe the coefficient of 2.2 × 10⁴ M⁻¹ cm⁻¹ was used at 344 nm. The absorption of the probe at 280 nm was taken into account in the calculation of the actin concentration. The labelling ratio was determined by calculating the ratio of pyrene concentration to the actin concentration. The labelling ratio was 0.95 ± 0.1 in the presented experiments.

The experiments were carried out with actin filaments in which the high affinity cation-binding site was saturated with magnesium. The preparation of the samples started with either unlabelled or pyrene labelled Ca-G-actin in buffer A. Buffer A was composed of 4 mM Tris/HCl, pH 8.0, 0.2 mM ATP, 0.005% NaN₃, and 0.5 mM 2-mercaptoethanol. The actin monomer bound calcium was replaced with magnesium by adding 100 μM MgCl₂ and 200 μM EGTA (final concentrations) to Ca-G-actin and incubating the solution for

10 min at room temperature. Mg–G–actin was polymerised by addition of 2 mM MgCl₂ and 100 mM KCl (final concentrations). When the experiments were designed to inform regarding the effect of actin bound phalloidin, the samples of magnesium actin filaments were incubated with phalloidin in a 1:1 molar ratio at 4 °C for 12 h.

2.3. Differential scanning calorimetry (DSC) experiments

Thermal unfolding of actin filaments after various treatments (i.e., pyrene labelling and/or incubation with phalloidin) was monitored by using a SETARAM Micro DSC-II calorimeter. All experiments were carried out between 0 and 100 °C in buffer A. The heating rate was 0.3 K/min in all cases. Conventional Hastelloy batch vessels were used during the denaturation experiments with 850 µl sample volume in average. Typical actin concentration for calorimetric experiments was 3 mg/ml (69 µM). Buffer A was used as reference. The sample and reference vessels were equilibrated with a precision of ±0.1 mg. There was no need to do any correction from the point of view of heat capacity between sample and reference vessels. After the first heating process from 0 to 100 °C the actin was denatured in the samples. The repeated scan of denatured sample was used as baseline reference, which was subtracted from the original DSC curves.

3. Results and discussion

In this study we carried out differential scanning calorimetry (DSC) experiments to characterise the effect of pyrene labelling of actin on the thermal stability of actin filaments. In the first set of measurements the DSC experiments were performed in the absence of toxin. To provide more information regarding the pyrene labelling induced conformational changes in actin the DSC experiments were repeated after the incubation of actin with phalloidin in a 1:1 toxin:actin protomer ratio. Note, that phalloidin binds actin filaments tightly with affinity of $K_D = 36$ nM [53]. The concentration of both the actin and the phalloidin was much greater (69 µM) than the K_D in our experiments, which ensured that more than 99% of the added toxin bound actin protomers.

3.1. The effect of pyrene labelling on actin filaments in the absence of phalloidin

Fig. 2 shows representative temperature dependent heat absorption curves from DSC experiments carried out in the absence of phalloidin. The analyses of the curves revealed that there was a well-defined increase in the heat absorption at temperatures between 60 and 70 °C. In our interpretation the increase of the heat flow was due to the heat denaturation of actin filaments. The temperature where the heat flow showed a maximum corresponds therefore to the melting point (T_m) of actin filaments. The T_m values determined in this work

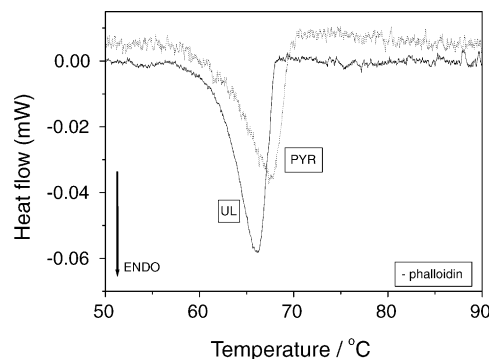


Fig. 2. The denaturation curves for unlabelled (UL) actin filaments (solid line) and pyrene labelled (PYR) actin filaments (dashed line) measured in the absence of phalloidin. The measurements were performed in buffer A. The heat absorption was recorded as a function of temperature between 0 and 100 °C with a heating rate of 0.3 K/min.

are summarised in Table 1. In the absence of phalloidin the melting point (T_m) for unlabelled actin filaments was 66 °C in a good agreement with an earlier results [54–56]. When the experiments were repeated with pyrene labelled actin filaments the melting point shifted to 68 °C (Fig. 2). Although this shift in the value of T_m was relatively small, repeated experiments ($n = 3$) under identical conditions reproduced the pyrene labelling induced change in the T_m . The slightly greater value for T_m observed after the labelling of actin with pyrene may indicate that the pyrene labelling made the actin filaments more resistant to heat denaturation, i.e. the thermal stability of pyrene labelled actin filaments was greater than that of unlabelled filaments. This effect was however small.

3.2. The effect of pyrene labelling on actin filaments in the presence of phalloidin

The binding of the toxic hexapeptide phalloidin to actin filaments was previously shown to increase the stability of actin filaments [48,49,57,58]. One would expect that if the pyrene labelling modifies the conformation of Mg²⁺–actin filaments then the interaction of the filaments with phalloidin could also be altered. To test this possibility we repeated the DSC experiments after treating unlabelled or pyrene labelled actin filaments with phalloidin in equimolar concentrations. Fig. 3 shows the heat absorption curves from these DSC experiments. The analyses of the curves provided a T_m value of

Table 1

The T_m values determined from differential scanning calorimetry experiments for unlabelled (UL) and pyrene labelled (PYR) Mg²⁺–actin filaments in the absence (– phalloidin) or presence (+ phalloidin) of equimolar phalloidin

	T_m (°C)	
	UL F-actin	PYR F-actin
– Phalloidin	66	68
+ Phalloidin	79	82

Errors (S.D.) attributed to the T_m values were 0.3 °C or less as calculated from the results of three independent experiments.

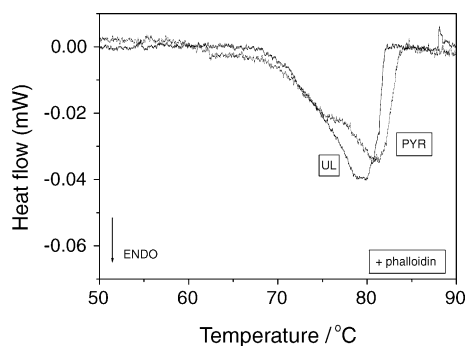


Fig. 3. The denaturation curves for unlabelled (UL) actin filaments (solid line) and pyrene labelled (PYR) actin filaments (dashed line) measured in the presence of phalloidin. Phalloidin was present in a 1:1 toxin:actin protomer ratio. The measurements were performed as described for Fig. 2.

79 °C for unlabelled actin filaments. The value of T_m was shifted to 82 °C when the experiments were carried out with pyrene labelled actin filaments in the presence of phalloidin. Again, the relatively small shift of the T_m was reproducible in repeated independent experiments ($n = 3$). These observations indicated that the thermal stability of pyrene labelled actin filaments was greater than that of unlabelled filaments in presence of phalloidin.

4. Conclusions

The DSC experiments showed that the labelling of actin with pyrene changed the thermal stability and thus the conformation of actin. Interestingly, in either the absence or presence of a toxic peptide, phalloidin, the thermal stability of Mg^{2+} -actin filaments was increased by the attachment of the pyrene label to Cys-374. The pyrene labelling induced changes of the T_m values were however relatively small (2–3 °C). Based on these observations we concluded that pyrene labelling of actin does not modify the conformation of the protein substantially, and the methods based on the application of pyrene-actin could adequately reflect the biological properties of this abundant protein.

Acknowledgements

This work was supported by the Hungarian Academy of Sciences. The SETARAM Micro DSC-II used in the experiments was purchased with fund provided by the National Research Foundation Grant CO-272.

References

- [1] J.A. Theriot, *Traffic* 1 (2000) 19.
- [2] R.L. Jeng, M.D. Welch, *Curr. Biol.* 11 (2001) 691.
- [3] F. Castellano, P. Chavier, E. Caron, *Seminars Immunol.* 13 (2001) 347.
- [4] J.S. Condeelis, J.B. Wyckoff, M. Bailly, R. Pestell, D. Lawrence, J. Backer, J.E. Segall, *Semin. Cancer Biol.* 11 (2001) 119.
- [5] B. Geiger, A. Bershadsky, *Curr. Opin. Cell Biol.* 13 (2001) 584.
- [6] F. Frischknecht, M. Way, *Trends Cell Biol.* 11 (2001) 30.
- [7] T.D. Pollard, L. Blanchoin, R.D. Mullins, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29 (2000) 545.
- [8] H.N. Higgs, T.D. Pollard, *Annu. Rev. Biochem.* 70 (2001) 649.
- [9] G. Hild, M. Nyitrai, R. Gharavi, B. Somogyi, J. Belágyi, *J. Photochem. Photobiol. B* 35 (1996) 175.
- [10] G. Hild, M. Nyitrai, J. Belágyi, B. Somogyi, *Biophys. J.* 75 (1998) 3015.
- [11] M. Nyitrai, G. Hild, J. Belágyi, B. Somogyi, *Biophys. J.* 73 (1997) 2023.
- [12] M. Nyitrai, G. Hild, J. Belágyi, B. Somogyi, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 12996.
- [13] M. Nyitrai, G. Hild, Z. Lakos, B. Somogyi, *Biophys. J.* 74 (1998) 2474.
- [14] B. Gaszner, M. Nyitrai, N. Hartvig, T. Koszegi, B. Somogyi, *J. Belagyi, Biochemistry* 38 (1999) 12885.
- [15] M. Nyitrai, G. Hild, N. Hartvig, J. Belágyi, B. Somogyi, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 41143.
- [16] M. Nyitrai, G. Hild, E. Bódis, A. Lukács, B. Somogyi, *Eur. J. Biochem.* 267 (2000) 4334.
- [17] M. Nyitrai, G. Hild, A. Lukács, E. Bódis, B. Somogyi, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 2404.
- [18] G. Hild, M. Nyitrai, B. Somogyi, *Eur. J. Biochem.* 269 (2002) 842.
- [19] A.H. Criddle, M.A. Geeves, T. Jeffries, *Biochem. J.* 232 (1985) 343.
- [20] M.A. Geeves, D.J. Halsall, *Proc. Roy. Soc. Lond. B: Biol. Sci.* 229 (1986) 85.
- [21] A.M. Duong, E. Reisler, *Biochemistry* 28 (1989) 3502.
- [22] M. Miyata, T. Arata, A. Inoue, *J. Biochem. (Tokyo)* 105 (1989) 103.
- [23] M.A. Geeves, *Biochemistry* 28 (1989) 5864.
- [24] E.W. Taylor, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 294.
- [25] T. Chen, E. Reisler, *Biochemistry* 30 (1991) 4546.
- [26] E. Ballweber, E. Hannappel, B. Niggemeyer, H.G. Mannherz, *Eur. J. Biochem.* 223 (1994) 419.
- [27] E.M. De La Cruz, E.M. Ostap, H.L. Sweeney, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 32373.
- [28] M. Nyitrai, A.G. Szent-Györgyi, M.A. Geeves, *Biochem. J.* 370 (2003) 839.
- [29] J.A. Cooper, S.B. Walker, T.D. Pollard, *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 4 (1983) 253.
- [30] K. Ohmi, S. Enosawa, Y. Nonomura, T. Tatsuno, Y. Ueno, *Toxicol* 39 (2001) 303.
- [31] M.O. Steinmetz, A. Hoenger, D. Stoffler, A.A. Noegel, U. Aebi, C.A. Schoenenberger, *J. Mol. Biol.* 303 (2000) 171.
- [32] Z. Li, E.S. Kim, E.L. Bearer, *Blood* 99 (2002) 4466.
- [33] A. Shimada, M. Nyitrai, I.R. Vetter, D. Kuhlmann, B. Bugyi, S. Narumiya, M.A. Geeves, A. Wittinghofer, *Mol. Cell.* 13 (2004) 511.
- [34] E. Bódis, K. Szarka, M. Nyitrai, B. Somogyi, *Eur. J. Biochem.* 270 (2003) 4835.
- [35] J.L. Fausnaugh, J.F. Blazyk, S.C. El-Saleh, P. Johnson, *Experientia* 40 (1984) 83.
- [36] N.L. Golitsina, V.L. Shnyrov, D.I. Levitsky, *FEBS Lett.* 303 (1992) 255.
- [37] D. Lőrinczy, J. Belágyi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 217 (1995) 592.
- [38] N.L. Golitsina, A.A. Bobkov, I.V. Dedova, D.A. Pavlov, O.P. Nikolaeva, V.N. Orlov, D.I. Levitsky, *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 17 (1996) 475.
- [39] D. Lőrinczy, J. Belágyi, *Thermochim. Acta* 296 (1997) 161.
- [40] D.A. Pavlov, A. Sobieszek, D.I. Levitsky, *Biochemistry (Mosc)* 63 (1998) 952.
- [41] D. Lőrinczy, J. Belágyi, *Thermochim. Acta* 343 (2000) 27.
- [42] D.I. Levitsky, O.P. Nikolaeva, V.N. Orlov, D.A. Pavlov, M.A. Ponomarev, E.V. Rostkova, *Biochemistry (Mosc)* 63 (1998) 322.

- [43] D. Lőrinczy, N. Hartvig, J. Belágyi, J. Therm. Anal. Calorim. 64 (2001) 651.
- [44] D. Lőrinczy, N. Hartvig, N. Farkas, J. Belágyi, J. Therm. Anal. Calorim. 65 (2001) 351.
- [45] D. Lőrinczy, F. Könczöl, L. Farkas, J. Belágyi, C. Schick, *Thermochim. Acta* 377 (2001) 205.
- [46] I.V. Dedova, O.P. Nikolaeva, V.V. Mikhailova, C.G. dos Remedios, D.I. Levitsky, *Biophys. Chem.* 110 (2004) 119.
- [47] M. Kiss, J. Belágyi, D. Lőrinczy, J. Therm. Anal. Calorim. 72 (2003) 565.
- [48] B. Visegrády, D. Lőrinczy, G. Hild, B. Somogyi, M. Nyitrai, *FEBS Lett.* 565 (2004) 163.
- [49] B. Visegrády, D. Lőrinczy, G. Hild, B. Somogyi, M. Nyitrai, *FEBS Lett.* 579 (2005) 6.
- [50] G. Feuer, F. Molnár, E. Pettkó, F.B. Straub, *Hung. Acta Physiol.* 1 (1948) 150.
- [51] J.A. Spudich, S. Watt, *J. Biol. Chem.* 246 (15) (1971) 4866.
- [52] T.W. Houk Jr., K. Ue, *Anal. Biochem.* 62 (1974) 66.
- [53] H. Faulstich, A.J. Schafer, M. Weckauf, *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* 358 (1977) 181.
- [54] M. Kiss, F. Könczöl, N. Farkas, D. Lőrinczy, J. Belágyi, J. Therm. Anal. Calorim. 65 (2001) 627.
- [55] D. Lőrinczy, J. Belágyi, *Thermochim. Acta* 259 (1995) 153.
- [56] D. Lőrinczy, F. Könczöl, B. Gaszner, J. Belágyi, *Thermochim. Acta* 322 (1998) 95.
- [57] G. Drewes, H. Faulstich, *Eur. J. Biochem.* 212 (1993) 247.
- [58] A. Orlova, E. Prochniewicz, E.H. Egelman, *J. Mol. Biol.* 245 (1995) 598.