

Ph.D. értekezés

Az aktin kölcsönhatása forminnal: EPR és DSC vizsgálatok

Horváth-Kupi Tünde



Témavezetők:

Dr. Nyitrai Miklós

Dr. Belágyi József †

Pécsi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Biofizikai Intézet

Pécs

2014.

Interdiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola D93

Iskolavezető: Dr. Sümegi Balázs

Program: B-130; Funkcionális fehérjedinamika vizsgálata biofizikai módszerekkel

Programvezető: Dr. Nyitrai Miklós

Témavezetők: Dr. Nyitrai Miklós

Dr. Belágyi József †

Köszönetnyilvánítás

Szeretettel emlékezem első témavezetőmre, néhai Prof. Dr. Belágyi József emeritus professzor úrra, aki rendkívüli türelemmel irányította kutatómunkámat, és akitől mind emberileg, mind szakmailag nagyon sokat tanultam. Nagy megtiszteltetés számomra, hogy a tanítványa lehettem.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Prof. Dr. Nyitrai Miklós professzor úrnak, aki lehetőséget biztosított számomra, hogy a Biofizikai Intézetben dolgozzak, és aki mindvégig támogatt, irányított, és segített a nehéz időszakokban.

Köszönetet mondok Dr. Gróf Pál professzor úrnak a munkám során nyújtott értékes segítségéért és tanácsaiért.

Szeretném megköszönni a Biofizikai Intézet minden munkatársának, hogy segítettek munkámat, és hogy baráti közeget nyújtottak számomra.

Köszönettel tartozom szüleimnek és családomnak, akik támogatást és háttérrel biztosítottak számomra a tanulmányaim során. Köszönöm férjemnek, Horváth Ervinnek a támogatását, türelmét és szüntelen biztatását.

Tartalomjegyzék

1	Irodalmi áttekintés	3
1.1	<i>Az aktin előfordulása és szerepe</i>	3
1.2	<i>Aktin nukleációs faktorok</i>	5
1.3	<i>A forminok</i>	5
1.4	<i>Az FH2 domén szerkezete</i>	7
1.5	<i>A forminok autoregulációja</i>	8
1.6	<i>A forminok további doménjei</i>	10
1.7	<i>A forminok hatása az aktin nukleációjára és polimerizációjára</i>	11
1.8	<i>Az mDia1 FH2 formin hatása az aktin filamentumok szerkezetére</i>	13
1.9	<i>A forminok szerepe az eukarióta sejtekben</i>	14
1.10	<i>Molekuláris biofizikai vizsgáló módszerek alkalmazása a citoskeletális rendszerek vizsgálatára</i>	15
2	Célkitűzések	17
3	Anyagok és módszerek	19
3.1	<i>Fehérje preparálás</i>	19
3.1.1	Aktin preparálás	19
3.1.2	Formin preparálás	20
3.2	<i>Aktin jelölések</i>	20
3.2.1	Maleimido-TEMPO jelölés	20
3.2.2	F-proxil jelölés	21
3.2.3	Cys-374 reakciója N-etilmaleinimiddel	21
3.2.4	Az aktin fluoreszcens jelölése	21
3.3	<i>A formin FH2 domén spin jelölése</i>	22
3.4	<i>Alkalmazott mérési módszerek</i>	22
3.4.1	EPR spektroszkópia	22
3.4.1.1	<i>Spinjelölés</i>	24
3.4.1.2	<i>Az EPR mérések technikai háttere</i>	24
3.4.1.3	<i>Az EPR mérések kivitelezése</i>	26
3.4.1.4	<i>Az EPR spektrumok kiértékelése</i>	27
3.4.1.5	<i>Az EPR spektrumok számítógépes szimulációs vizsgálata</i>	29
3.4.2	Differenciál pásztázó kalorimetria (DSC)	30

3.4.2.1	<i>A DSC mérések kivitelezése</i>	32
3.4.2.2	<i>Számítógépes értékelési módszerek</i>	32
3.4.3	Polimerizációs teszt	33
4	Eredmények	34
4.1	<i>EPR mérések</i>	34
4.1.1	Spinjelölt aktinon végzett EPR mérések	34
4.1.1.1	<i>A Cys-374-en jelölt aktin vizsgálata</i>	34
4.1.1.2	<i>Formin FH2 hatása az MSL-jelölt aktinra</i>	35
4.1.1.3	<i>Hőmérséklet hatása az MSL-aktinra és forminnal alkotott komplexére</i>	40
4.1.1.4	<i>FDNA- jelölt aktin vizsgálata</i>	42
4.1.1.5	<i>Formin hatása az FDNA-jelölt aktinra</i>	43
4.1.1.6	<i>Az FDNA-aktin hőmérsékletfüggő vizsgálata</i>	48
4.1.1.7	<i>mDial FH2 forminon végzett EPR mérések</i>	52
4.1.1.8	<i>MSL-forminon végzett hőmérsékletfüggő EPR mérések</i>	54
4.1.1.9	<i>A spinjelölés hatása a formin FH2 funkcióira</i>	60
4.1.2	DSC mérések	62
5	Következtetések	65
5.1	<i>Flexibilitás változás – polaritás változás</i>	65
5.2	<i>A konvencionális és ST–EPR összehasonlítása</i>	67
5.3	<i>Az aktin–formin kölcsönhatás</i>	68
6	Összefoglalás	70
7	Referenciák	72
8	Rövidítések jegyzéke	83
9	Ábrák jegyzéke	85
10	Táblázatok jegyzéke	88
11	Publikációk listája	89
11.1	<i>Az értekezés alapjául szolgáló közlemények</i>	89
11.2	<i>Az értekezésben nem szereplő közlemények</i>	89

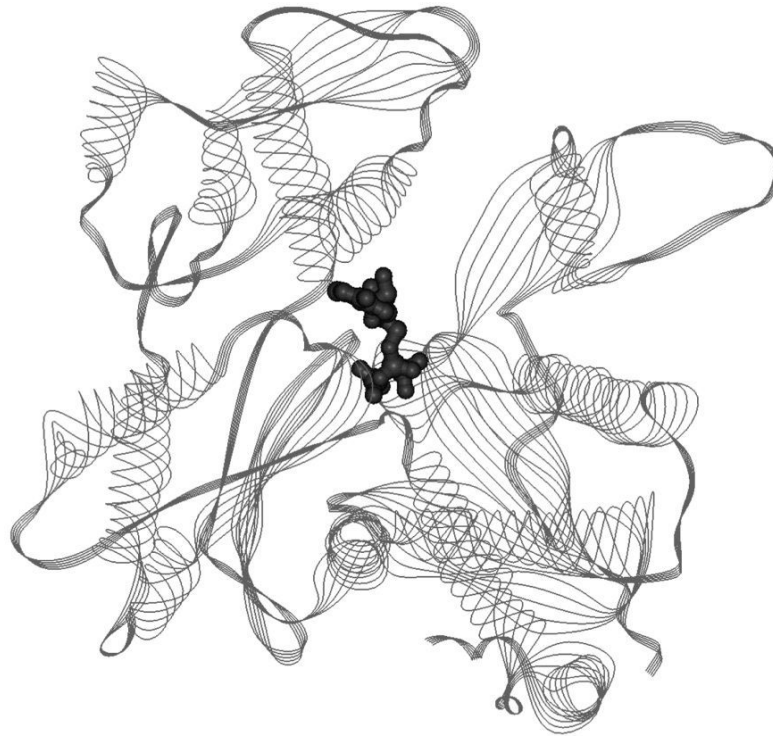
1 Irodalmi áttekintés

1.1 Az aktin előfordulása és szerepe

Az élő rendszerek alapvető tulajdonsága a mozgásra való képességük. A mozgást ezekben a rendszerekben többnyire fehérjék hozzák létre. A fehérjék közül sejtszinten meghatározó szerepet kapnak azok a filamentális és motor fehérjék, amelyek együttműködéséből származnak a különböző mozgásformák elemi lépései.

Az eukarióta citoszkeletont három filamentális rendszer alkotja: a mikrotubulusok, a mikrofilamentumok és az intermedier filamentumok. A citoszkeleton sokrétű működését olyan fehérje polimerek biztosítják, amelyek szerkezete dinamikusan képes alkalmazkodni az adott funkcióhoz, valamint számos más fehérjével kölcsönhatásba lépve jól szabályozott folyamatokban vesznek részt. A mikrofilamentum hálózat fő alkotóeleme az aktin, amely a sejtek alakjának és mozgásának biztosítása mellett szerepet játszik a sejten belüli transzport folyamatokban, a sejtosztódásban, endo- és exocitózisban, és számos további sejtfunkcióban (Pollard and Cooper 2009). Citoszkeletonális szerepe mellett az aktin a sejttagon belül is megtalálható, ahol a transzkripcióban és jelátviteli folyamatokban vesz részt (Castano et al. 2010; Grzanka et al. 2004). Az aktin α -izoformája legnagyobb mennyiségben a harántcsíktal izomszövetben fordul elő. Izomokban az aktin a szarkomer vékony filamentum rendszerét alkotja, mely a vastag filamentumot képező miozinnal kölcsönhatásba lépve hozza létre a szarkomereknek az izom összehúzódását eredményező rövidülését (Huxley and Niedergerke 1954; Huxley and Hanson 1954). Az aktin 1942-es felfedezése Straub Ferenc Brúnó nevéhez kötődik, akinek miozin preparátum tanulmányozása közben sikerült a miozin ATP-áz aktivitását serkentő aktint izolálnia (Straub 1942). Az aktin szerkezetéről az első röntgen-krisztallográfiai eredményeket 1990-ben Kabsch és mtsi. közzölték (Kabsch et al. 1990).

Az élő sejtekben az aktin globuláris monomerként (G-aktin), illetve filamentális polimerként (F-aktin) található meg. Az aktin monomer 42,3 kDa molekulatömegű, két doménből álló fehérje. A domének további két-két szubdoménre oszthatók (S1-4) (Wang et al. 2010). A két domén között található hasadék kationok (Mg^{2+} , Ca^{2+}) és nukleotidok (ATP, ADP, ADP-P_i) kötőhelyeként szolgál (Higashi and Oosawa 1965; Kinoshian et al. 1991), amelyek befolyásolják az aktin konformációját és funkcióját (1. ábra).



1. ábra: A globuláris aktin molekula szalagdiagramja. Középen a nukleotid-kötő zseb, a kötött ATP molekulával (gömb modell). PDB kód: (Chesarone and Goode 2009)1NWK. (Orban et al. 2008).

A globuláris (G) aktin molekulák polimerizálva jobbra csavarodó, dupla helikális szerkezetű filamentumokat képeznek. A filamentumok kialakulása egy lassú nukleációs fázissal kezdődik, amikor a G-aktin molekulák összekapcsolódva dimereket és trimereket (ún. nukleuszokat) alkotnak. Ez a lépés határozza meg a polimerizáció sebességét, mivel a nukleuszok közötti kapcsolódás instabil. Az aktin kritikus koncentrációját, amely fölött spontán lejártszódik a polimerizáció, számos tényező befolyásolja: a jelenlévő kationok koncentrációja, a kapcsolódó nukleotidok típusa, illetve az aktin-kötő fehérjék jelenléte (Chesarone and Goode 2009). A következő, úgynevezett elongációs fázis során a további aktin monomerek kapcsolódása már gyorsabb, ezáltal a filamentum hossza növekszik. Mivel az összekapcsolódó monomerek orientációja azonos, a filamentum poláris szerkezetű lesz (Kuhn and Pollard 2005). A dinamikus egyensúly beállta jelenti az utolsó fázist, amelynek során az úgynevezett taposómalom („treadmilling”) mechanizmus eredményeként a filamentumok hossza nem változik. Ilyenkor a filamentumok mindkét végén végbemegy a monomer asszociáció és disszociáció is, ám az úgynevezett szakállas végén („barbed

end”) az asszociáció, hegyes végen („pointed end”) pedig a disszociáció folyamata dominál (Moore et al. 1970).

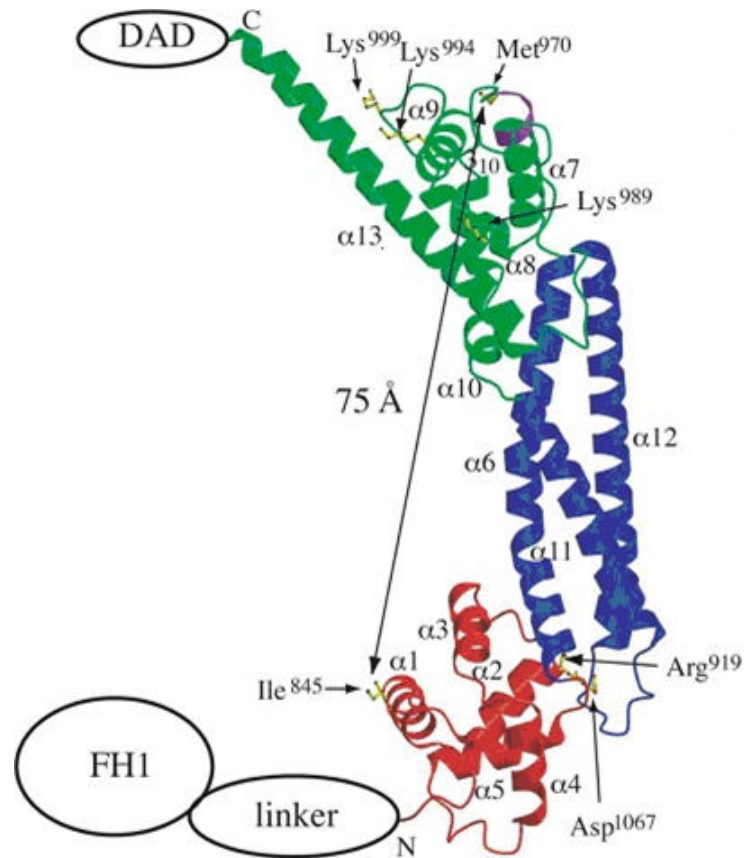
1.2 Aktin nukleációs faktorok

Az aktin fehérjék változatos szerkezetű filamentumokat képesek létrehozni, melyek alakjának és hossz-dinamikájának szabályozásában számos aktin-kötő fehérje játszik szerepet. A nukleáció folyamatát szabályozó nukleációs faktorokat három fehérjecsaládba sorolhatjuk. Az elsőként felfedezett nukleációs faktorok az ARP 2/3 („Actin-Related Proteins”) fehérjék voltak, melyeket a WASP („Wiskott-Aldrich Syndrome Protein”) fehérjék aktiválnak, és a már meglévő aktin filamentumon hoznak létre filamentális oldalágakat (Pollard 2007). A WH2-domént („Wiskott-Aldrich Homology 2”) tartalmazó fehérjék több aktin monomer megkötésével segítik a nukleuszok kialakulását. Ide sorolhatjuk a Spire, Cordon-bleu (Cobl), VopF/VopL és Leiomodin (Lmod) fehérje-családokat (Baum and Kunda 2005; Campellone and Welch 2010; Chereau et al. 2008; Jewett et al. 2006; Liverman et al. 2007; Qualmann and Kessels 2009; Winckler and Schafer 2007). Az így kialakuló aktin filamentumokon nem találhatóak elágazások. A nukleációs faktorok harmadik része a forminok családja, melyek szintén elágazásmentes filamentumokat hoznak létre.

1.3 A forminok

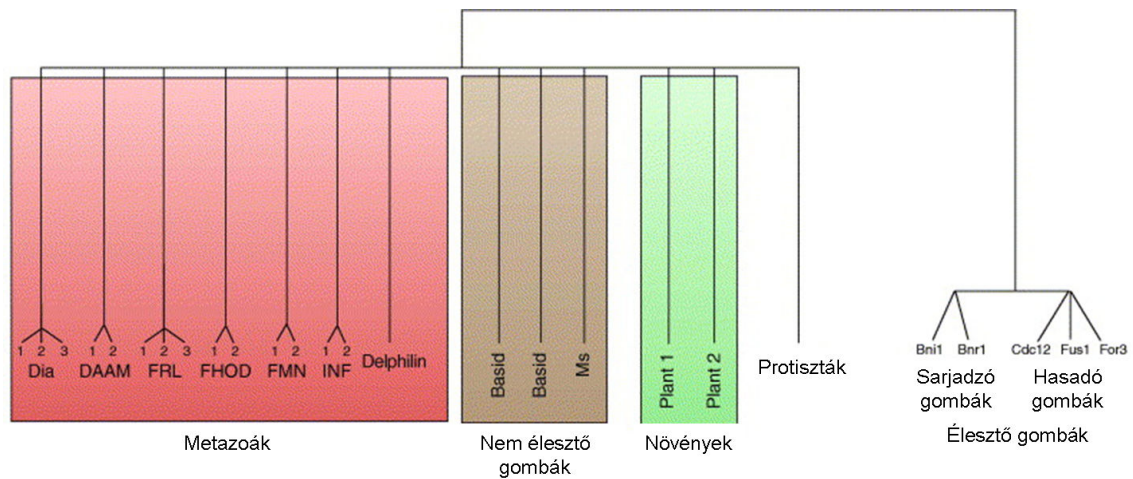
A forminok nagyméretű, ezernél több aminosavból felépülő fehérjék, melyek evolúciósan konzervált doménekből épülnek fel. A forminok az aktin mikrofilamentumokkal és a mikrotubulusokkal kölcsönhatásba lépve részt vesznek a sejtmozgásban, a sejt polaritásának kialakításában, a sejtosztódásban, és számos más folyamatban (Bartolini and Gundersen 2010; Goode and Eck 2007; Palazzo et al. 2001). A forminok felfedezése egy egérben végtag deformációt okozó mutációhoz kötődik, melynek génjét Woychik és munkatársai azonosították 1985-ben (Trumpp et al. 1992; Woychik et al. 1985). A génről expresszálandó fehérjét később ugyanez a munkacsoport nevezte el forminnak (Woychik et al. 1990). A fehérjecsalád közös szerkezeti jellemzői a formin homológia (FH) domének, melyeket először Castrillon és Wasserman írt le (Castrillon and Wasserman 1994). A prolinban gazdag FH1 domén a legtöbb, míg a leginkább konzervált FH2 minden forminban előfordul (Chalkia et al. 2008; Paul and Pollard 2009). Az első röntgenkristallográfias szerkezetet az emlős mDia1 formin FH2

doménjéről közölték 2004-ben (2. ábra) (Shimada et al. 2004). A teljes mDia1 fehérje elektronmikroszkópos szerkezetét 2012-ben írták le először (Maiti et al. 2012).



2. ábra: Az mDia1 formin FH2 doménjének röntgenkristallográfiás szerkezete (Shimada et al. 2004).

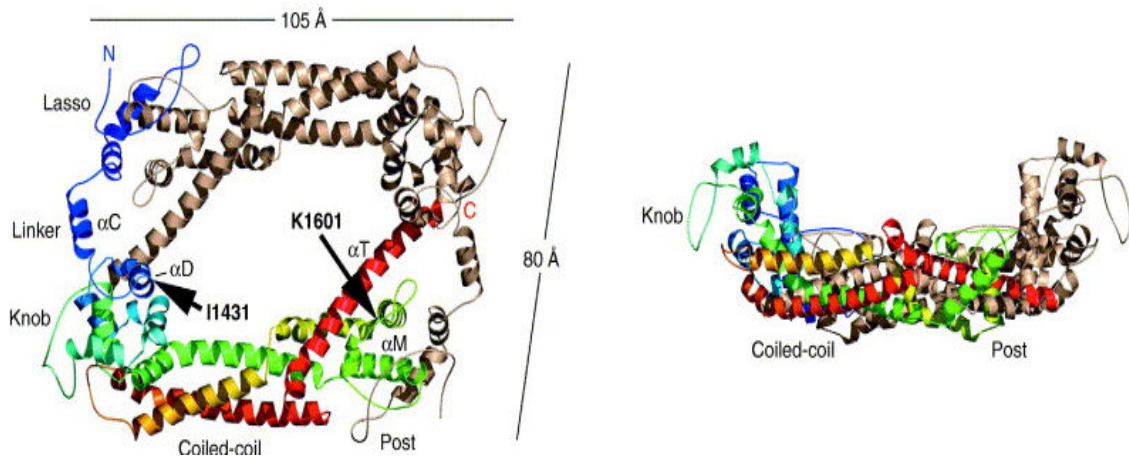
Az FH2 domén filogenetikai analízise szerint a szövetes állatokban („metazoa”) előforduló forminok hét alcsaládra oszthatók: Dia („diaphanous”), DAAM („dishevelled-associated activator of morphogenesis”), FRL („formin-related gene in leukocytes”), FHOD („formin homology domain containing protein”), INF („inverted formin”), FMN („formin”) és „delphilin” (Higgs and Peterson 2005). A növényekben, élesztőben, „Dictyostelium discoideumban” és egyéb egysejtű eukarióta csoportokban előforduló forminok FH2 doménjei filogenetikailag eltérnek a metazoákban található alcsaládoktól. Az élesztő formin FH2 doménje minden más eukarióta formintól különbözik; sárjadzó élesztőben két típus (Bni1 és Bnr1), a hasadó élesztőkben három típus (Cdc12, Fus1, For3) található (3. ábra).



3. ábra: Az FH2 domén filogenetikai rendszere (Higgs and Peterson 2005).

1.4 Az FH2 domén szerkezete

A forminok legtöbbet tanulmányozott része az FH2 domén, amely egy kb. 400 aminosavból álló szekvencia, és a forminok aktin kötéséért felelős. A kristályszerkezeti vizsgálatok szerint a sarjadzó élesztő Bni1 FH2 doménje dimer szerkezetű (Xu et al. 2004). A dimereket alkotó, félhold alakú monomerek antiparallel módon kapcsolódnak össze. Az emlős FRL1, mDia1 és mDia2 FH2 domének szintén dimer szerkezetűek, ám az FRL1 FH2 domén hajlamos a disszociációra (Harris et al. 2004; Li and Higgs 2005). Az mDia1 FH2 doménje sok hasonlóságot mutat a Bni1 megfelelő régióival. Sem a részleges mDia1, sem a Bni1 töredék mutánsai nem képesek gyorsítani az aktin polimerizációt, valószínűsíthető tehát, hogy csak a teljes dimer FH2 domén alkot funkcionális egységet. Az FH2 domén tartalmaz egy mozgékony „linker” régiót az N-terminális közelében, amely meghatározó szerepet játszik a dimerek kialakulásában (Xu et al. 2004). A flexibilis „linker” régió biztosítja a gyűrű alakú dimerek mozgékonyágát, ami kulcsfontosságú a forminok működésében (Moseley et al. 2004; Zigmond et al. 2003). Az FH2 domén N-terminálisán levő „lasso” és „linker” régiók mellett egy „knob”, egy „coiled-coil” és egy „post” régiót különböztetünk meg a C-terminális felé közeledve (4. ábra). Az élesztő FH2 doménjének az egyik sajátja az ún. „knob” régióban található nagy hurok, amely nem fordul elő semmilyen más eukarióta forminban (Higgs and Peterson 2005).



4. ábra: A *Bni1* FH2 domének alkotta dimer szerkezete és az FH2 monomer kitüntetett régiói (színes szalagmodell) (Higgs and Peterson 2005).

1.5 A forminok autoregulációja

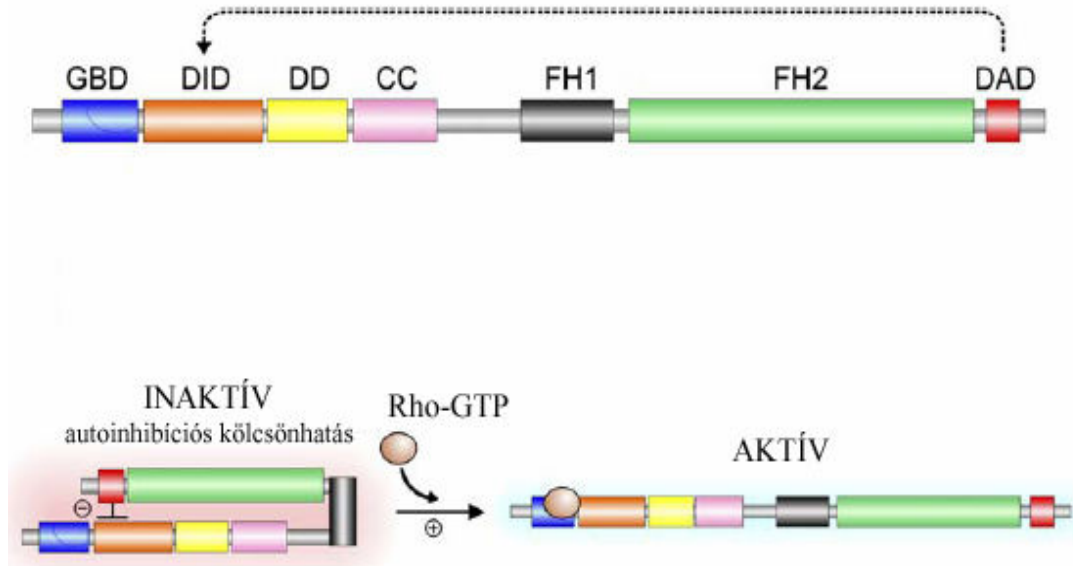
Az emlős forminok működésének szabályozása a „Diaphanous-related” forminok (DRF) körében a legismertebb. Ide tartoznak a Dia, FRL és DAAM alcsaládok, amelyeket intramolekuláris szabályozásmódjuk hasonlósága alapján rokonítottak (Alberts 2001; Watanabe et al. 1999). Mindhárom alcsaládban megtalálható egy Rho-GTPáz-kötő domén (RBD) az N-terminális régióban, mely részt vesz a formin fehérje aktiválásában.

N-terminális nélküli (ΔN) mDia1 vagy mDia2 forminokat expresszáló sejtekben az aktin filamentumok folyamatos képződése figyelhető meg, ami az auto-inhibíció hiányára utal. Ezek szerint az N-terminális régió gátolja az FH2 domén hatását az aktin filamentumok felépülésére. Ez az auto-inhibíciós régió az mDia1 forminban egy 241 aminosavból álló szakasz az RBD-ben, amelyet „diaphanous inhibitory domain” (DID) néven is említnek.

Az autoreguláció másik lényeges eleme a C-terminális DAD régió („diaphanous auto-regulatory domain”), amely képes kapcsolódni az N-terminális szakaszhoz (Alberts 2001; Li and Higgs 2005). A DAD nem egy önálló domén, hanem egy 20-30 aminosavból álló szakasz az FH2 domén mellett C-terminális irányban.

A jelenleg elfogadott modell szerint a DID és a DAD régió összekapcsolódása eredményezi a formin működésének a gátlását (5. ábra). A Rho-GTPáz megkötésekor a

DID–DAD kölcsönhatás felbomlik, és a formin fehérje aktiválódik. A DAD régió hiánya az inhibíciós képesség csökkenését eredményezi *in vitro*. Mindemellett a DAD nélküli fehérjékben is megfigyelhető az gátló mechanizmus, ami arra utal, hogy a DID–DAD kölcsönhatás csupán az inhibíció affinitásának növelését szolgálja, és lehetséges egy másik, DID–FH2 kölcsönhatás is.



5. ábra: Az *mDia1* autoregulációja (Bugyi 2006).

Más metazoa formin alcsaládokban kevésbé tisztázott az auto-inhibíció jelensége. Az FHOD alcsaládban megtalálható a DAD régió, de hiányzik a DID. A DAD-mentes (Δ DAD) FHOD1 formint expresszálo sejtekben sűrű aktinköteg képződés figyelhető meg, míg teljes FHOD1 jelenlétében nem, ami DAD-függő auto-inhibícióra utal (Gasteier et al. 2003). Az FHOD1 fehérje N-terminális régiója képes összekapcsolódni a DAD régiót tartalmazó szakaszával, ami a DID-hez hasonló autoregulációs szakasz jelenlétére utal.

Az FMN, INF és delphilin alcsaládokba tartozó forminokban sem DAD, sem DID régió nem található. Az FMN és INF forminok FH2 doménon kívüli szakaszai jelentősen különböznek. Az élesztő Bni1 forminban mind a DAD, mind pedig a DID régió megtalálható, ami az *mDia1* és *mDia2* forminokhoz hasonló önszabályozó mechanizmusra utal. Más élesztő forminokban csupán a DAD régió található meg, a DID csupán részlegesen (*Cdc12*), vagy egyáltalán nem (*Bnr1*) fordul elő (Higgs and Peterson 2005).

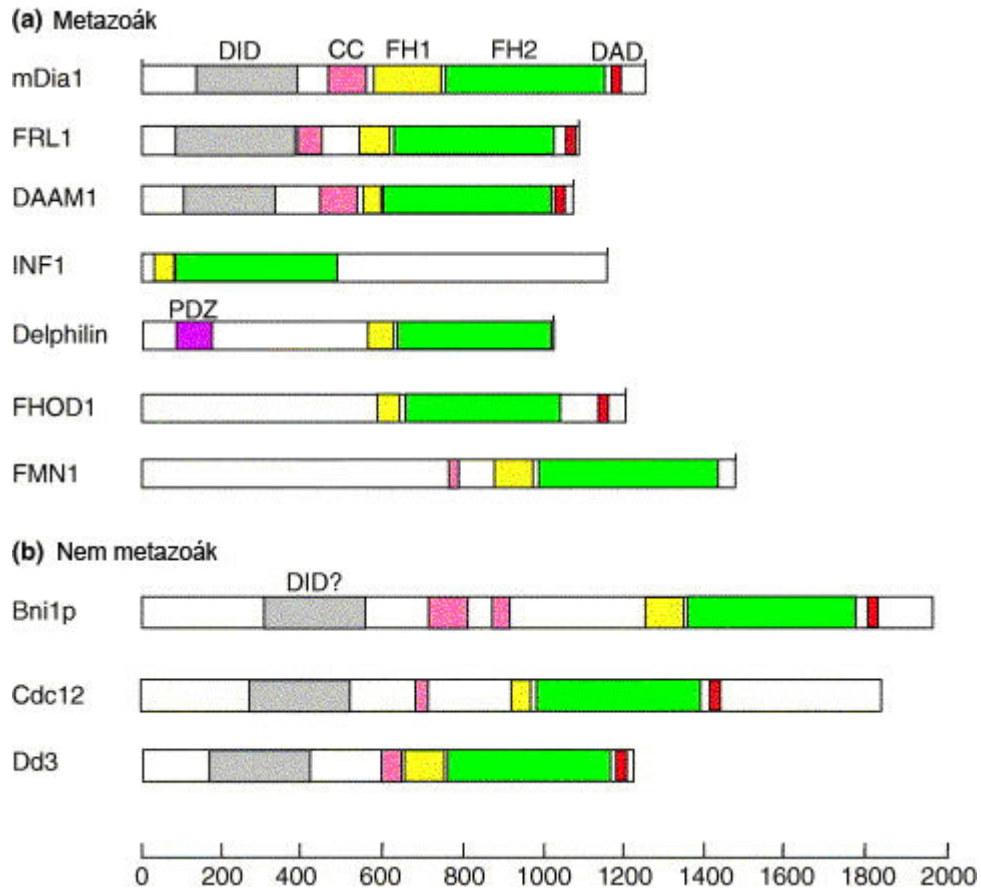
1.6 A forminok további doménjei

Majdnem minden forminban megtalálható a profilin-kötő FH1 domén az FH2 domén N-terminális szomszédságában. Az FH1 domén egyik legjellemzőbb szerkezeti sajátossága a magas prolin tartalom. Az FH1 domének hossza nagy változatosságot mutat (15-229 aminosav), prolin tartalmuk (35-100%) és profilin-kötő helyeik száma (0-16) is széles határok között mozog (Kursula et al. 2008; Tanaka and Shibata 1985).

A forminok FH1 és FH2 doméneken kívüli részei jelentősen különbözhetnek. Ilyen szempontból a legváltozatosabb alcsalád az INF („inverted formin”). Az INF forminokban az FH2 domén a fehérje N-terminális részén található, míg minden más alcsaládban a C-terminális felőli részen helyezkedik el (Higgs and Peterson 2005).

Számos forminban megtalálható az úgynevezett „coiled-coil” szekvencia az FH2 doméntől N-terminális irányban. Az mDia1 forminban ezt a „coiled-coil” szakaszt tartalmazó régió részt vesz a fehérje N-terminális részének dimerizációjában (Madrid et al. 2005). A „coiled-coil” szakasz fehérjék megkötésére képes, ezáltal a formin sejten belüli lokalizációját is szabályozza (Nakano et al. 1999; Watanabe et al. 1999).

A harmadik formin homológia domén (FH3) számos forminnál az FH1 domén mellett, N-terminális irányban található meg, de önálló doménként való szerepe még kérdéses. Az FH3 domén az élesztő Fus1 forminnál a sejten belüli elhelyezkedésért felelős, de ez a szakasz kevés hasonlóságot mutat más forminok analóg régiójával. Az mDia1 forminnál az FH3-nak megfelelő régió legalább két különálló domént tartalmaz: a DID és a dimerizációért felelős szakaszt (Li and Higgs 2005). A 6. ábra a különböző formin családok doménszerkezetét mutatja.



6. ábra: A formin családok doménszerkezete (Higgs and Peterson 2005).

1.7 A forminok hatása az aktin nukleációjára és polimerizációjára

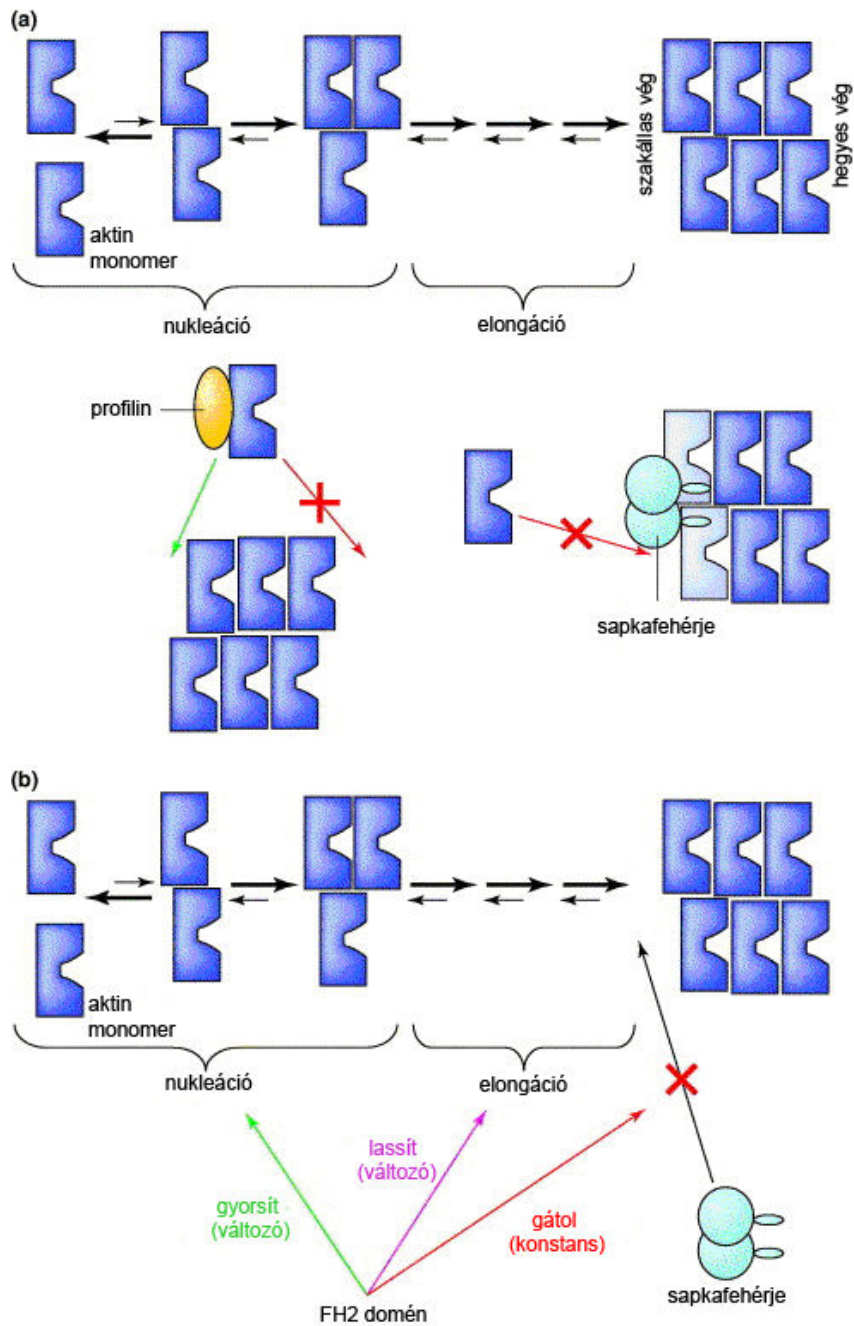
Az FH2 domének különböző mértékben gyorsítják a nukleáció folyamatát. Az emlős mDia1 és az mDia2 FH2 domének nagyon hatékony nukleátorok, míg az FRL1 és Bni1 forminok nukleációs hatékonysága kisebb (Harris and Higgs 2006; Harris et al. 2004). A forminok aktin nukleációt elősegítő hatása az instabil nukleációs köztes termékek stabilizálása révén valósul meg. Az FH2 domének hasonló módon kötik meg az aktin monomereket, mint ahogyan a filamentumok szöges végéhez kötődnek. A Bni1-mediálta aktin polimerizáció kinetikus modellje szerint az egyik lehetséges nukleációs mechanizmus az aktin dimerek stabilizációja, bár más mechanizmusok sem kizártak (Pring et al. 2003). Az egyes FH2 típusok nukleációt gyorsító hatása jelentős mértékben különbözik: az mDia1 és mDia2 már néhány nM-os koncentrációban képes a nukleáció elősegítésére, míg az FRL1 és a Bni1 több mint 100 nM-os koncentrációban képes hasonló hatást kiváltani (Harris and Higgs 2006).

A különböző FH2 domének eltérő mértékben lassítják az aktin filamentumok elongációját; a Cdc12 teljesen leállítja, az FRL1 és az mDia2 kb. 80%-kal lassítja, a

Bni1 25–50%-kal lassítja az elongációt, míg az mDial alig befolyásolja azt (Kovar 2006).

Az FH2 domén egyik legfontosabb tulajdonsága, hogy képes kötődni az aktin filamentumok gyorsan növekvő szöges végéhez (7. ábra). Ezt a kapcsolódást elsőként észlelték Bni1 FH2 doménon végzett elektronmikroszkópos vizsgálatok során fedezték fel (Pruyne et al. 2002). Aktin polimerizációs kinetikai vizsgálatok valamint fluoreszcencia mikroszkópos vizsgálatok többfajta FH2 domén esetében is alátámasztották a szöges véghez való kapcsolódást (Ingouff et al. 2005).

Az FH2 dimer másik fontos sajátossága, hogy képes processzív módon, folyamatosan együtt mozogni az aktin filamentum növekedő szöges végével. Az FH2 doménnek tehát nem kell leválnia és újra kapcsolódnia a szöges véghez minden egyes új aktin monomer kapcsolódásakor. Ezen jelenséggel kapcsolatos az FH2 domén sapkafehérjéket gátló funkciója. A sapkafehérjék megakadályozzák az aktin monomerek kapcsolódását a filamentum szöges végéhez, az FH2 domén antagonistá viselkedése tehát lehetővé teszi az aktin filamentum hosszabbodását sapka fehérjék jelenlétében is. Sem az FH2 domén, sem pedig a sapka fehérjék nem képesek gyorsan leválni a szöges végről, ezért a filamentum hosszabb ideig növekvő vagy nem növekvő fázisban marad. A filamentum állapota attól függ, melyik fehérje (formin vagy sapka) kapcsolódik hozzá elsőként (Romero et al. 2004).



7. ábra: Az FH2 domén hatása az aktin filamentumok dinamikai tulajdonságaira (Higgs 2005).

1.8 Az mDia1 FH2 formin hatása az aktin filamentumok szerkezetére

Az aktin nukleációs és polimerizációs tulajdonságai mellett a formin FH2 doménje hatással van az aktin filamentumok szerkezetére is. Fluoreszcenciás módszerek segítségével kimutatták, hogy az mDia1 formin FH2 doménje koncentrációfüggő módon képes befolyásolni az aktin filamentumok flexibilitását. Alacsony formin

koncentrációk mellett az aktin filamentumok szerkezete fellazult, és ez a hatás a formin kötőhelyeként szolgáló szakállas végtől akár 160 protomer távolságig is kiterjedhet (Bugyi et al. 2006; Papp et al. 2006; Ujfalusi et al. 2010). Magasabb formin koncentrációk mellett egy másik hatás is kimutatható, ekkor a protomerek egymáshoz viszonyított mozgékonyasága lecsökkent, a filamentum szerkezete merevebbé vált (Bugyi et al. 2006). Eme két különböző formin-hatás eltérő kapcsolódási mechanizmusokra utalt. Alacsony koncentrációknál a formin az aktin filamentumok szakállas végéhez kötődik, a filamentumok fellazulását egy nagy hatótávolságú allosztérikus kölcsönhatás idézi elő, mely végigterjed a filamentumon. A formin koncentrációjának növelésével ugyanakkor a filamentum végek mellett a formin a filamentumok oldalához is kapcsolódik, a szomszédos protomereket összekötve stabilizálja a filamentumok szerkezetét (Bugyi et al. 2006). Az mDia1 formin FH2 doménjének aktin filamentumokra gyakorolt hatását a mérések során alkalmazott pufferek ionerőssége is jelentősen befolyásolta (Papp et al. 2006; Ujfalusi et al. 2010).

A formin FH2 az aktin filamentumok termodinamikai tulajdonságait is befolyásolja. Kalorimetriás mérések szerint formin jelenlétében csökkent az aktin filamentumok termikus stabilitása (Bugyi et al. 2006).

1.9 A forminok szerepe az eukarióta sejtekben

A sejtekben a formin egyik legvalószínűbb funkciója az, hogy az aktin filamentum szöges végéhez kapcsolódva védelmet nyújt a sapkafehérjékkel szemben (Moseley et al. 2004). A sapkafehérjék mikromólos koncentrációban vannak jelen a sejtben, és már nanomólos koncentrációban kötődnek az aktin filamentumokhoz (Wear and Cooper 2004). Gátló faktorok hiányában az újonnan képződött filamentumokhoz kevesebb, mint egy másodperc alatt kapcsolódnak a sapkafehérjék, így a filamentumok hossza az 500 nm-t sem éri el. Formin jelenlétében az emlős sejtekben levő aktin filamentumok hossza meghaladhatja az egy mikrométert. A formin fehérjék legfőbb szerepe tehát eme hosszú aktin filamentumok kialakulásának elősegítése lehet (Kobielak et al. 2004).

A forminok nukleációt gyorsító hatásának sejtben belüli jelentősége még nem teljesen tisztázott. Néhány formin (mDia1, mDia2) jobban gyorsítja a nukleációt *in vitro*, mint más típusok (Bni1, FRL1) (Pring et al. 2003). A profilin számos formin nukleációs hatását gátolja, mivel megköti a citoplazmában levő szabad aktin

monomereket. Az aktin filamentumok nukleációja a sejtben függ a jelenlevő formin nukleációs képességétől, a profilin nukleációt gátló hatásának mértékétől, valamint a profilin-kötött és szabad aktin monomerek arányától (Romero et al. 2004).

1.10 Molekuláris biofizikai vizsgáló módszerek alkalmazása a citoskeletális rendszerek vizsgálatára

Az utóbbi évtizedek technikai és módszertani fejlődése lehetővé teszi, hogy ne csak egyszerű modellrendszerek vizsgálatára alkalmazzuk a mikroszkópos és – általános értelemben vett – spektroszkópiás módszereket, hanem komplex makromolekuláris rendszerek vizsgálatában is felhasználhatjuk azokat. Munkám során három különböző módszert alkalmaztam. Az EPR spektroszkópia elsősorban a molekuláris kölcsönhatásokra vonatkozóan szolgáltat információkat. Az EPR spektroszkópia elmélete alapján a molekulák egészének, vagy egy meghatározott doménjének rotációs tulajdonságait felhasználva jellemezhetjük a kölcsönhatásokat, azok változásait (Berliner 1976, 1979). A Biofizikai Intézetben is már az 1970-es évek óta folytattak kutatásokat az aktin és miozin rendszerek vizsgálatára EPR spektroszkópia segítségével (Belagyi 1973, 1975a, b; Belagyi and Damerau 1974; Belagyi et al. 1978). A korábbi konvencionális mérési módszer mellett, ami a 10^{-12} — 10^{-8} s időtartományban tette lehetővé a korrelációs idők meghatározását, a telítési EPR (szaturáció transzfer EPR) lehetővé teszi, hogy a molekulák rotációs diffúzióját a 100 ns-nál hosszabb időtartományban is vizsgáljuk. A speciális jelölési technikák („site directed labeling”), amik elsősorban az egyes célcsoportok eltérő reaktivitásán alapulnak, lehetővé teszik, hogy akár a jelölt csoport közvetlen környékének rotációs dinamikáját is tanulmányozzuk.

A fluoreszcenciás módszerek alkalmazása a molekuláris kölcsönhatások tanulmányozására szintén több évtizedre nyúlik vissza. A kifejlesztett módszerek mind dinamikai, mind konformációs paraméterek vizsgálatát lehetővé teszik, és az aktinkötő fehérjékre vonatkozóan a Biofizikai Intézetben is számos tanulmány született (Bugyi et al. 2006; Hild et al. 2014; Hild et al. 1996; Hild et al. 2002; Nyitrai et al. 1997; Ujfalusi-Pozsonyi et al. 2010; Ujfalusi et al. 2012). Munkám során fluoreszcenciás módszerrel vizsgáltam az aktin polimerizációs tulajdonságait (Bugyi et al. 2006).

A differenciál pásztázó kalorimetriás („differential scanning calorimetry”, DSC) módszerek a molekuláris kölcsönhatásokat azok termodinamikai paraméterei alapján

jellemzik. Így a két módszer, az EPR és a DSC hatékonyan egészítik ki egymást: a molekuláris mozgásokban tapasztalt dinamikai vagy statikus változásokat kiegészíthetjük a kölcsönhatások erősségét, az egyes biokémiai reakciók termodinamikáját figyelembe véve (Dergez et al. 2007; Farkas et al. 2004; Hartvig et al. 2002; Lorinczy et al. 2002).

2 Célkitűzések

Az eukarióta sejtekben az aktin hálózat szerkezeti és dinamikai jellemzőit számos aktin-kötő fehérje befolyásolja, amelyek aktinnal és egymással való kölcsönhatása évtizedek óta kutatott, és még számos feltáratlan részletet rejtő téma. Munkám az aktin citoszkeleton szabályozási mechanizmusainak megismerését célzó, szélesebb körű kutatások részét képezte a PTE ÁOK Biofizikai Intézetében.

Az aktin biofizikai vizsgálatának egyik limitáló tényezője a fehérjéhez kapcsolható jelölő molekulákkal szelektíven reagáló aminosavak korlátozott száma. Az aktin 1-es szubdoménjének EPR-es vizsgálata a Cys-374-es aminosavhoz kapcsolódó spinjelölő molekulák révén már korábban lehetővé vált. Munkám egyik célja az volt, hogy az aktin 2. alegységének vizsgálatához spin jelölésre alkalmas aminosavak kiválasztásával megfelelő jelölési módszert dolgozzak ki, s azt optimáljam. Az aktin két alegységének paramágneses jelölésével a következő kérdések mentén folytattuk vizsgálatainkat:

- Milyen rotációs dinamika jellemzi az aktin 1. és 2. alegységét a monomer és a filamentális aktin esetében?
- Hogyan változik a két alegység dinamikai tulajdonsága a hőmérséklet függvényében?
- Hogyan befolyásolja a formin FH2 domén kapcsolódása az aktin alegységek mobilitását?
- Hogyan változik az aktin dinamikájának hőmérsékletfüggése formin jelenlétében?

Munkám további részében az mDia1 formin FH2 doménjének EPR-es vizsgálatát kívántam elvégezni. A formin EPR-es vizsgálatára vonatkozó munkám megkezdéséig nem állt rendelkezésre megfelelő paramágneses jelölési módszer, ezért céljaim között szerepelt a formin spinnel való jelölésének kidolgozása, és ez által az aktin-formin kölcsönhatás új megközelítésből való vizsgálata.

A formin FH2 domén paramágneses jelölésével az alábbi kérdésekre kerestünk választ:

- Milyen az mDia1 formin FH2 doménjének rotációs dinamikája a jelölt aminosav környezetében?
- Hogyan változik a formin mobilitása aktin jelenlétében?

- Hogyan befolyásolja a hőmérséklet változtatása a formin dinamikai tulajdonságait?
- Milyen hatással van az aktin kötődése a formin hőmérsékletfüggő dinamikai változásaira?

A formin FH2 doménjének jellemzését differenciál pásztázó kaloriméteres mérésekkel egészítettük ki. A kalorimetriás méréseim célja volt:

- A formin FH2 domén konformációs változásainak termodinamikai jellemzése.
- A különböző koncentráció arányú aktin-formin komplexek termodinamikai paramétereinek leírása.
- Az EPR és a DSC mérések közös értelmezésén keresztül az aktin-formin fehérje komplexen belüli kölcsönhatások még részletesebb megismerése.

3 Anyagok és módszerek

3.1 Fehérje preparálás

3.1.1 Aktin preparálás

Az α -aktin fehérjét házi nyúl (*Oryctolagus cuniculus domestica*) hátizmából (*M. psoas*) nyertük. A preparálás első szakaszában Feuer és munkatársai módszere szerint acetone forgácsot készítettünk, amit további felhasználásig $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltunk (Feuer et al. 1948). A nyúl hátizom darabok ledarálását követően KCl-pufferben (150 mM KH_2PO_4 , 150 mM K_2HPO_4 , 100 mM KCl, pH 6,5; $4\text{ }^{\circ}\text{C}$), majd 0,05 M-os NaHCO_3 -oldatban ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) és 1 mM EDTA-oldatban való keverés során tisztítottuk; minden lépést gézen való szűrés követett. A tisztítás végén kétszer desztillált vizes mosást alkalmaztunk, majd ötszöri acetonos mosással fejeztük be az acetone forgács készítését. A kiszáritott acetone forgács több hónapig tárolható $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on.

Az aktin acetone forgácsból való kinyerése Spudich és Watt módszere szerint történt (Spudich and Watt 1971). Az acetone forgácsot A-pufferben (2 mM TRIS-HCl, 0,2 mM Na_2ATP , 0,5 mM DTT, 0,2 mM CaCl_2 , 0,005% NaN_3 , pH 8,0) jégen kevertettük, gézen átszűrtük, majd az előző eljárást megismételtük. Az így nyert szűrletet centrifugáltuk (100000g, 2 óra, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$), a felülúszót 2 órán keresztül szobahőmérsékleten, 100 mM KCl és 2 mM MgCl_2 hozzáadásával, polimerizáltuk. A polimerizált aktint 0,6 M szilárd KCl hozzáadásával kiséztük, ezáltal eltávolítottuk az aktin által kötött tropomiozint. Újabb centrifugálással (400000g, 45 perc, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) az aktin polimereket pelletáltuk, a felülúszó eltávolítása után az üledéket DTT-mentes A-pufferben homogenizálva vettük vissza, majd DTT-mentes A-pufferrel szemben 6 órán keresztül dializáltuk. Az így nyert G-aktint centrifugálással (400000g, 30 perc, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) tisztítottuk meg a megmaradt aktin filamentumoktól és egyéb szennyeződésektől.

A kinyert aktint A-pufferben (4 mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,2 mM ATP, 0,1 mM CaCl_2) $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk felhasználásig. A G-aktin koncentrációt Shimadzu UV-2100 spektrofotométer segítségével határoztuk meg 290 nm-es hullámhosszon, $0,63\text{ mg}^{-1}\cdot\text{ml}\cdot\text{cm}^{-1}$ abszorpciós koefficiens használva (Houk and Ue 1974). F-aktin előállításához 2 mM MgCl_2 -ot és 100 mM KCl-ot adtunk a tároló pufferhez, majd 2 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk a fehérjét.

3.1.2 Formin preparálás

Az emlős mDia1 formin FH2 doménjét korábban leírt módszerünk alapján preparáltuk (Shimada et al. 2004). Az mDia1 FH2 fehérjét kódoló génszakaszt pGEX-4-T3 plazmid vektor tartalmazta, melyet *E. coli* TOP10 sejtekben szaporítottunk fel. A kitisztított plazmidot *E. coli* BL21 (DE3)pLysS kompetens sejtekbe transzformáltuk, majd a sejteket ampicillint (100 mg/ml) tartalmazó LB táptalajon növesztettük 37 °C-on. A transzformáns sejteket ampicillin tartalmú LB tápoldatban növesztettük, majd az $OD_{600} = 0,75$ értéket elért sejt kultúrához izopropil- β -D-tiogalaktopiranozid-ot (IPTG) adtunk, így indukálva a fehérje expressziót. Az éjszakán át zajló expresszió után a sejteket centrifugálással ülepitettük (4000 rpm, 4 °C, 20 perc), majd további felhasználásig -20 °C-on tároltuk.

A fagyasztott sejteket feltáró pufferben (50 mM TRIS-HCl (pH 7,6), 5 mM DTE, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10% glicerin), proteáz inhibitor és fenil-metil-szulfonil-fluorid (1 mM) jelenlétében homogenizálással, majd szonikálással mechanikusan roncsoltuk. A feltárt sejteket centrifugáltuk (30000 rpm, 4 °C, 1 óra), majd DNázi –enzim jelenlétében affinitás kromatográfiával tisztítottuk tovább. A GST-mDia1 fehérjét trombin segítségével eluáltuk a GSH-agaróz oszlopról, majd a további tisztítását gélfiltrációs kromatográfiával, Sephacryl S-300 oszlopon végeztük. A tisztított mDia1 FH2 fragmentumokat folyékony nitrogénben fagyasztottuk, majd további felhasználásig -80 °C-on tároló T-pufferben (50 mM TRIS-HCl, 50 mM NaCl, 5 mM DTT, 5% glicerin, pH 7,6) tartottuk. A formin fehérje tisztaságát SDS-poliakrilamid gélelektroforézis segítségével ellenőriztük. A fehérje koncentrációt fotometriásan határoztuk meg 280 nm-en, $20580 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ extinkciós koefficiens segítségével (Bugyi et al. 2006).

3.2 Aktin jelölések

3.2.1 Maleimido-TEMPO jelölés

G- aktinhoz 2 mM MgCl_2 -ot és 100 mM KCl-ot adtunk, majd 2 órán át szobahőmérsékleten polimerizáltuk. Az aktin filamentumokat 1:1,2 arányban 12 órán keresztül 2 °C-on inkubáltuk N-(1-oxil-2,2,6,6-tetrametil-4-piperidiny)-maleinimid spin jelölővel (MSL). A jelölést ultracentrifugálással állítottuk le (400000g, 45 perc, 4 °C), majd a felülúszóban maradt nem kötődött jelölőt a felülúszóval együtt

eltávolítottuk. Az aktin pelletet G-pufferben (4 mM Tris-HCl, pH 7.6, 0,2 mM ATP, 0,2 mM CaCl₂) felszuszpendáltuk, homogenizáltuk és G-pufferrel szemben dializáltuk. A jelölt protein koncentrációját ismert koncentrációjú MSL-oldatok EPR-spektrumaival való összehasonlítás során határoztuk meg. Az MSL-aktin minták jelölési aránya tipikusan 70% volt.

3.2.2 F-proxil jelölés

Az aktint G-formában 1:1,2 molarányban inkubáluk 3-(5-fluoro-2,dinitroanilino)-(1-oxil-2,2,5,5-tetrametil-3-pirrolidin) (FDNA) spin jelölővel 24 órán keresztül 2 °C-on. A jelölési eljárás végén a szabad spinjelölőt az oldatból G-pufferrel szemben dializálva távolítottuk el. Az aktin polimerizációját F-pufferben (4 mM Tris-HCl, pH 7.6, 0,2 mM ATP, 2 mM MgCl₂) történő dialízissel értük el. Az aktin koncentrációja az EPR mérések során 50-100 µM közötti tartományban volt. Az FDNA-aktin minták jelölési aránya körülbelül 70% volt.

3.2.3 Cys-374 reakciója N-etilmaleinimiddel

Az aktin fehérje reaktív Cys-374 aminosavának blokkolása érdekében a fehérje mintákat N-ethylmaleinimide-del (NEM) jelöltük 1:1,5 molarányban 12 órán keresztül 2 °C-on. A NEM eltávolításához a mintákat ultracentrifugáltuk (400000g, 45 perc, 4 °C), majd az el nem reagált NEM-et a felülúszóval együtt eltávolítottuk. Az aktin pelletet A-pufferben felszuszpendáltuk, homogenizáltuk, majd A-pufferrel szemben dializáltuk.

3.2.4 Az aktin fluoreszcens jelölése

Az aktin Cys-374 aminosav oldalláncához N-(1-pirén)-jódacetamid jelölőt kapcsoltunk (Criddle et al. 1985). A jelölés első lépéseként a G-aktint (2 mg/ml) 100 mM KCl és 2 mM MgCl₂ hozzáadásával szobahőmérsékleten polimerizáltunk 2 órán keresztül. Ezt követően az F-aktin oldatot (1 mg/ml) 1,1-molarányú pirén jelölővel inkubáltuk szobahőmérsékleten, 18 órán keresztül. A jelölést követően a mintát 400000 g-n, 4 °C-on, 45 percen keresztül centrifugáltuk. Az üledéket A-pufferben duzzasztottuk, homogenizáltuk, majd éjszakán keresztül dializáltuk. A pirénnel megjelölt aktin koncentrációját fotometriásan határoztuk meg 344 nm-en 22000 M⁻¹cm⁻¹

extinkciós koefficienssel (Kouyama and Mihashi 1981). A jelölési arányt a fehérje és a fluoreszcens jelölő moláris koncentrációjának hányadosaként számoltuk ki.

3.3 A formin FH2 domén spin jelölése

Az mDia1-FH2 fehérjét jelölés előtt DTT-mentes T-pufferben (50 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,6) dializáltuk. A fehérje doméneket 1:2 molarányban jelöltük N-(1-oxil-2,2,6,6-tetrametil-4-piperidinil)-maleinimid spin jelölővel (MSL) 24 órán keresztül 2 °C-on (az aktin jelöléséhez hasonlóan, a formin esetén is, az MSL SH-reagensként szerepel). A nem kötődött jelölőt DTT-mentes T-pufferben való dialízissel távolítottuk el. A jelölési arányt a fehérje minta és ismert koncentrációjú MSL-oldatok EPR spektrumának összehasonlítása révén határoztuk meg. A mérések eredménye szerint az mDia1-FH2 doméneknek megközelítőleg az 50%-ához kapcsolódott MSL molekula. A jelölt fehérje denaturációját nem tapasztaltuk.

Néhány esetben a formin FH2 doméneket az MSL nitroxidszármazéknak kémiaiilag megfelelő N-etilmaleinimid-del (NEM) reagáltattuk. A reakció 24 órán keresztül 2 °C-on a DTT-t tartalmazó T-pufferben történt, majd a fehérjéhez nem kötődött SH-reagenst tároló pufferben történő dialízissel távolítottuk el.

3.4 Alkalmazott mérési módszerek

3.4.1 EPR spektroszkópia

Az elektron paramágneses (EPR) vagy elektron spin rezonancia spektroszkópia azon alapul, hogy a párosítatlan spinű elektronokat tartalmazó atomi vagy molekuláris rendszerekben az elektronspinhez kapcsolódó energiaállapotok mágneses térben energetikailag felhasadnak, azaz a spin állapottól függően különböző energiaállapotok különülnek el. Az eltérő energiaállapotok között ekkor megfelelő energiájú (frekvenciájú) elektromágneses sugárzással átmenetek generálhatók: abszorpció vagy az abszorpció után emisszió mérhető. Az elektronállapotok energiáját a paramágneses centrumnak a környezetével való kölcsönhatásai befolyásolják (Berliner 1976; Grell 1981).

Az EPR spektroszkópiában a paramágneses centrumok lehetnek *intrinsic* vagy *extrinsic* atomok, molekulák vagy akár ionok is. Mivel a párosítatlan elektront tartalmazó atomok atommagjai is befolyásolják a mágneses térben lévő elektronok energiaállapotait, ezért az energiaállapotok leírásakor mind az elektron saját spinjét,

mind az atommag (gyakran nem csak egyetlen atommag) spin állapotát is figyelembe kell venni. Az utóbbi kölcsönhatást írjuk le az ún. hiperfinom csatolási állandóval. A környezet polaritása megváltoztatja az elektroneloszlás szimmetriáját, ami a hiperfinom csatolási állandó nagyságának változásában is jelentkezik. Amennyiben a párosítatlan elektronok nem gömbszimmetrikus pályán vannak, akkor az alkalmazott, kitüntetett irányú mágneses térhez képest a hordozó atomok, molekulák térben különböző pozíciót felvéve, egymástól eltérő energiaállapotokkal rendelkeznek. Ez lehetővé teszi azt, hogy pl. a biológiai struktúrák makroszkópos rendezettségét vizsgáljuk. A molekuláris mozgások hatását, a mozgást leíró két paraméter segítségével jellemezhetjük: 1.) a molekulák rotációs diffúzióját (a forgási sebességét) a rotációs diffúziós tenzor, vagy az azzal ekvivalens korrelációs idők jellemzik; 2.) a molekuláris forgás térbeli behatároltságát egy irányító potenciállal (az ennek kb. megfelelő kúpszöggel) jellemezhetjük. Az előző két tulajdonság együttesen határozza meg az ún. mikroszkópos rendparamétert (Berliner 1976).

Három fontos határesetet különböztethetünk meg az előzőek alapján. Amennyiben az irányító potenciál nem teszi lehetővé a teljes térszögben való forgást, akkor az egyedi molekulák fő forgástengelye egy-egy adott térszög irányába mutathat. Ezeknek a forgástengelyeknek az eloszlása lehet izotróp, tehát makroszkóposan rendezetlen, vagy anizotróp, azaz makroszkóposan rendezett. Ebben az értelemben beszélhetünk makroszkóposan rendezetlen, mikroszkóposan rendezett, valamint makroszkóposan és mikroszkóposan rendezett rendszerekről. A harmadik határeset az, amikor nincs sem makroszkópos rendezettség, sem mikroszkópos rendezettség: ez oldatokban áll fenn, tehát ekkor a rendszer makroszkóposan és mikroszkóposan is rendezetlen. Ilyenkor a molekuláris mozgás bármely molekulára ugyanaz, de a molekula alakja miatt a rotációs diffúzió lehet anizotróp, azaz a molekula forgását rotációs diffúziós tenzorral lehet leírni. A makromolekuláris rendszerekben fellépő konformációváltozások érinthetik az előző tulajdonságokat; ezért is alkalmas az EPR spektroszkópia az ilyen jellegű rendszerek vizsgálatára.

A biológiai minták, így a fehérjék esetében *extrinsic* paramágneses szondák, vagy spinjelölők hozzákapcsolása szükséges a vizsgált molekulához, mivel a legtöbb biológiai (makro)molekula nem rendelkezik *intrinsic* paramágneses centrummal. Kivételt képeznek egyes fémionokat tartalmazó fehérjék, mint például a hemoglobin, mioglobin, ceruloplazmin, amelyek közvetlenül is vizsgálhatók EPR technikával.

Fehérjék vizsgálatakor a spin jelölőt célzottan hozzákapcsolhatjuk egy adott aminosavhoz, ezáltal részletes információt nyerhetünk az adott fehérje alegység szerkezetéről, a jelölt aminosav környezetéről (P. F. Knowles 1976). Amennyiben a jelölt molekularészlethez mereven kapcsolódik a jelölő, azaz a szegmenshez képest nincs relatív forgása, akkor a lehetséges szegmensmozgásokat tudjuk megfigyelni. Igen gyakran előfordul, hogy a paramágneses szondát hordozó szegmens mereven kapcsolódik a fehérje egészéhez, s ebben az esetben a fehérje egészének rotációs dinamikáját tanulmányozhatjuk. Munkám során a spinnel különböző módokon jelölt aktint vizsgálva mindkét esetet – a szegmensmozgást és az aktin egészének a mozgását is – megfigyeltük és leírtuk.

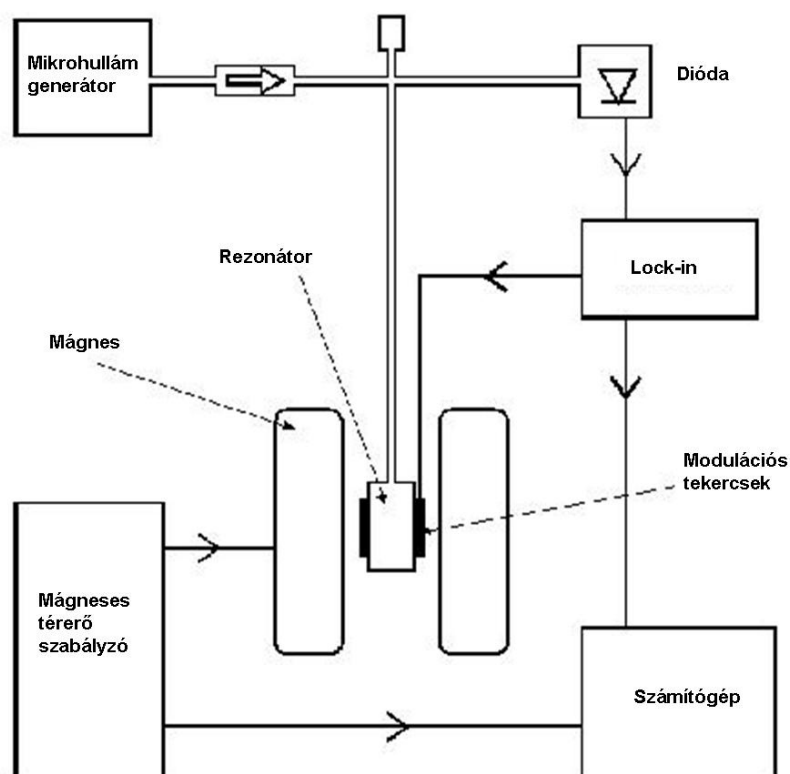
3.4.1.1 Spinjelölés

A spinjelölés technikája során leggyakrabban nitroxid szabadgyököt tartalmazó paramágneses szondákat használnak (pirrol, pirrolidin, piperidin, oxazolin), melyek kovalensen kötődnek a vizsgált molekulához. Az EPR mérés során a nitroxid spinjelölő aszimmetrikus térbeli eloszlású $2p\pi$ molekulapályája lép kapcsolatba a mágneses térrel. A felvett spektrum alakját, a karakterisztikus csúcsok elhelyezkedését alapvetően meghatározza a $2p\pi$ pályának a mágneses térhez képest felvett orientációja, forgási állapota. Amennyiben a paramágneses jelölő mereven kapcsolódik az adott aminosav oldallánchoz, akkor a felvett spektrum tükrözi a jelölt molekularész mozgását, rendezettségét és a külső mágneses térhez viszonyított orientációját. A vizsgált molekula konformáció változása nyomon követhető a spektrum alakjának, a karakterisztikus csúcsok helyzetének elemzésével (Belagyi and Grof 1983; Dergez 2006; Nyitrai et al. 1997). Munkám során maleinimid (MSL) és F-proxyl (FDNA) paramágneses szondákat használtam aktin, illetve formin fehérjék specifikus jelölésére (lásd 3.2.1;3.2.2;3.3 fejezet).

3.4.1.2 Az EPR mérések technikai háttere

A 3.4.1 pontban leírtak alapján az EPR spektrométerek három fő részegységből épülnek fel: az elektromágnesből, a rezonátorból, illetve az elektronikus detektáló-és vezérlőegységből. A homogén mágneses teret biztosító elektromágnesből, amiben a mintát tartalmazó rezonátor (mikrohullámú üreg) helyezkedik el. Az utóbbi biztosítja azt, hogy a mintát hatásosan besugározzuk a megfelelő frekvenciájú mikrohullámú

elektromágneses sugárzással. Tekintettel arra, hogy a mikrohullámú tartományban technikailag az állandó frekvenciájú besugárzás a megvalósítható, a spektrumok felvételéhez a mágneses térerősséget változtatjuk. A harmadik részegység egy speciális elektronika, ami a mérendő jel fázis- és frekvencia érzékeny detektálására, és a spektrométer vezérlésére szolgál (Wilmshurst 1967). Két fő spektrométer típust használnak: folytonos üzemmódú (CW, konvencionális mérési technika), illetve FT-EPR spektrométerek léteznek. A frekvencia-tartomány az 1 GHz – 250 GHz-et fogja át. A kisebb frekvenciákon nagyobb térfogatú minták is vizsgálhatók, de általánosan elmondható, hogy az érzékenység fordítottan arányos a frekvenciával. A legelterjedtebb az ún. X-sávú, ~9,5 GHz-es spektrométer, ami mind biológiai, mind más minták esetén alkalmazható. A spektrumok felvételekor a mágneses térerősség lassú változtatása mellett, egy sokkal kisebb amplitúdójú, nagy frekvenciájú (~10 – ~100 kHz) mágneses tér modulációt is alkalmaznak. A kimenő jel ekkor nem csak a mikrohullámú elektromágneses tér energiájának abszorpcióját tartalmazza, hanem a modulációs frekvenciához képest annak felharmonikusait, fázisban modulált jeleket is tartalmaz. Ennek két jelentősége van. Egyrészt a spektrum nem a megszokott abszorpció-jellegű, hanem annak deriváltja lesz. Másrészt, a nagyfrekvenciás, kis amplitúdójú moduláció egyben a jel/zaj arány növekedését is eredményezi. Ezen túlmenően, lehetőség van fázis- és frekvencia érzékeny detektálásra. Míg a konvencionális technikával a modulációs frekvenciával megegyező, fázisban levő jelet mérjük, a telítési EPR technikával a második harmonikus, 90° -os fáziseltolt jelet detektáljuk, ami az igen lassú forgási tartományban ($>10^{-7}$ s) történő korrelációs idők meghatározását teszi lehetővé (Thomas et al. 1976; Thomas et al. 1975a).



<http://www.physik.uni-augsburg.de/de/lehrestuehle/exp5/methods/magnetic/esr/esr.gif>

8. ábra: Az EPR készülék felépítése (<http://www.physik.uni-augsburg.de> alapján).

Az EPR spektrométer sematikus felépítése a 8. ábrán látható. A modern on-line spektrométerek digitális formában tárolják a mért spektrumokat, amiket a későbbiekben megfelelő feldolgozó programok segítségével, vagy adott esetben az elméleti levezetésekéből következő spektrális paraméterek leolvasásával értékeltünk ki (Berliner 1976, 1979; Budil et al. 1996).

3.4.1.3 Az EPR mérések kivitelezése

Elektron paramágneses rezonancia méréseinket ESP 300E (Bruker Biospin, Németország) spektrométeren végeztük. A konvencionális EPR spektrumokat általában 20 mW mikrohullámú teljesítménnyel, 100 kHz modulációs frekvencián rögzítettük, 0,1 – 0,2 mT modulációs amplitúdóval. Az ST-EPR spektrumok felvételéhez 63 mW teljesítményt és 50 kHz-es modulációs frekvenciát alkalmaztunk, 0,5 mT amplitúdóval. A regisztrált spektrum (az EPR terminológiában használatos elnevezés alapján) a

második harmonikus, 100 kHz-es jel volt, aminek a 90°-os fáziseltolt komponensét mértük.

A 63 mW mikrohullámú teljesítmény 0,025 mT átlagos amplitúdójú mikrohullámú mezőnek felel meg a mérőcella középső régiójában, az értékek meghatározását Fajer és Marsh, valamint Squier és Thomas módszere szerint végeztük (Feuer et al. 1948; Squier and Thomas 1986). Amennyiben szükséges volt, a spektrumokat a kétszeres integráljuk figyelembe vételével hasonlítottuk össze. Ennek az eljárásnak az alapján határoztuk meg a jelölési arányokat is. A jelölési arány meghatározásakor a fehérjék EPR spektrumait, azonos körülmények között (modulációs amplitúdó, mintatérfogó, erősítés, felvételi idő) mért, ismert koncentrációjú TEMPO oldatok EPR spektrumaival hasonlítottuk össze: a kétszeres integrálok értékei arányosak az adott mintatérfogóban lévő spinek, így a jelölt molekulák számával. A fehérjekoncentráció és a meghatározott spinjelölő koncentráció ismeretében a jelölési arány egyszerűen számítható. A jel/zaj arány további növelése érdekében a fehérje minták mérésekor egyszerre két kapillárist használtunk (Mettler ME-18552), amelyek mindegyike 15 µl mintát tartalmazott. A mintatartó kapillárisokat a TM110 mérőüreg központi részével és a homogén mágneses tér erővonalával párhuzamosan állítottuk be. Az egyik kapillárisba termoelemet helyeztünk, a hőmérsékletet diTC2007 típusú hőmérséklet variátorral szabályoztuk. Az EPR spektrumokat általában 23 ± 0,1 °C-on vettük fel. A hőmérsékletfüggő mérések esetében 0 °C és 60 °C között, 0,1 °C-os pontossággal vettük fel a spektrumokat.

3.4.1.4 Az EPR spektrumok kiértékelése

Az EPR mérések során felvett spektrum a paramágneses szondák energiaelnyeléséből adódó jel első deriváltja. A spektrum alakját meghatározza a spinjelölő környezetének szerkezete, molekuláris dinamikája, azaz a spinjelölt fehérjék esetében a jelölt alegység, vagy a fehérje egészének konformációja.

A spinjelölés technikája során leggyakrabban alkalmazott nitroxid szabad gyökök esetében az elektronnak a külső mágneses térrel való kölcsönhatását, valamint a párosítatlan elektron és a szomszédos nitrogén atommag csatolását leíró egyenletekben az egyes energiaszintek különbsége a következőképp írható le:

$$\Delta E = \beta g \bar{S} \underline{H} + \bar{I} \underline{S} \underline{A}$$

ahol β az elektron Bohr magnetonja, H a külső mágneses tér, S az elektronspin operátora, I a magspin operátora, g és A pedig az elektron Landé-faktora és a nitrogén atommag hiperfinom csatolását leíró tenzorai. Az anizotróp g és A tenzorok függenek a paramágneses elektron $2p\pi$ molekulapályája és a H külső mágneses tér irányai által bezárt szögtől, ezért a makroszkópos rendezettséggel is rendelkező biológiai minták vizsgálatakor, a felvett spektrum alakját a mintának a külső mágneses térhez viszonyított orientációja is befolyásolja. Munkám során fehérje oldatokkal foglalkoztam így a makroszkópos és mikroszkópos rendezettségtől eltekinthettünk. A fehérje molekulák sok esetben nem tekinthetők teljesen gömbszimmetrikus képződményeknek, így ezek forgása még homogén, izotróp közegben sem írható le teljes mértékben egyetlen rotációs diffúziós állandóval. A Freed-csoport korai spektrumszimulációs munkái nyomán olyan táblázatok, grafikonok váltak széles körben alkalmazottá, amik gömbszimmetrikus rotációs diffúzióra vonatkozóan tartalmaztak nomogramok segítségével könnyen leolvasható értékeket. Ezeknek a közelítő értékeknek a segítségével a vizsgált fehérjék kölcsönhatásaiban tapasztalt változásokat számszerűsíteni lehet: a fehérjék forgási állapotában bekövetkezett eltéréseket a korrelációs idő változásaként ki lehet fejezni, s a szükséges spektrális paraméterek egyszerűen meghatározhatóak. A leggyakrabban használt közelítő eljárás alapján a rotációs korrelációs idő a lassú forgású tartományban a Goldman közelítés segítségével számítható ki (Goldman et al. 1972):

$$\tau_2 = a \cdot \left(1 - 2A'_{zz} / 2A''_{zz}\right)^b$$

ahol $a = 5,4 \cdot 10^{-10}$ s, $b = -1,36$, $2A'_{zz}$ a minta két szélső csúcsa közötti térerősség különbsége, $2A''_{zz}$ pedig a végtelen viszkozitású rendszerre vonatkoztatott ún. rigid limit.

A rigid limit meghatározható, ha a vizsgált minta oldatának viszkozitását növeljük. Fehérjék esetében a pufferoldathoz növekvő koncentrációban (5-50 w/w%) adagolunk cukrot (szukróz), így növelve a viszkozitást. Az EPR spektrumról leolvasott maximális felhasadás, közelítőleg egyenlő az A-tenzor A_{zz} komponensének kétszeresével, s ez jó közelítéssel arányos a rotációs korrelációs idő $2/3$ -dik hatványával. A különböző viszkozitású minták maximális felhasadását a $(T/\eta)^{2/3}$ függvényében ábrázolva, extrapolációs módszerrel kiszámítható a végtelen viszkozitású rendszer hiperfinom csatolási állandója, azaz a rigid limit ($2A''_{zz}$) is.

A másik fontos határeset az, amikor a spinjelölt molekulák oldatokban vannak, és a forgás korrelációs ideje a gyors forgású tartományba esik. Ilyenkor a spektrumot

három keskeny csúcs alkotja. A rotációs korrelációs idő a következőképpen számítható ki, amennyiben a hiperfinom csatolási állandó tenzor értékei és a g-tenzor értékei megfelelőek (Kivelson 1960; Schreier et al. 1978):

$$\tau_2 = 6.65 \cdot 10^{-10} \Delta H_{+1} \left(\sqrt{\frac{I_{+1}}{I_{-1}}} - 1 \right)$$

ahol τ_2 a rotációs korrelációs idő, ΔH_{+1} az alacsony télerősségű csúcs szélessége, I_{+1} az alacsonyterű csúcs amplitúdója, I_{-1} pedig a magas terű csúcs intenzitása.

A konvencionális EPR mérésektől eltérő módon detektálható az igen lassú mozgású spinszondák EPR jele. Ez a módszer a szaturáció transzfer (ST) EPR, melynek segítségével a $10^{-6} - 10^{-3}$ s közötti rotációs korrelációs idejű minták vizsgálhatók. Az ST-EPR mérések során a spinrendszer részleges telítődéséig (félszaturáció) kell a mikrohullámú teljesítményt változtatni. A detektálás során a második harmonikus 90° -os fázissal eltolt spektrumát kapjuk meg. A vizsgált minta rotációs korrelációs idejét az ST-EPR görbék karakterisztikus csúcsainak arányából (L''/L , C''/C , H''/H) számíthatjuk ki. A spektrumok kiértékelését spinnel jelölt hemoglobinról felvett referencia görbék segítségével végeztük. A gömbszimmetrikus hemoglobin ST-EPR jelének csúcsarányaiból számolt rotációs korrelációs időket kalibrációs diagramok tartalmazzák. A vizsgált spektrum csúcsainak arányát a kalibrációs diagramok értékeivel összevetve számítható ki az adott mintára vonatkozó rotációs korrelációs idő (Dergez 2006; Thomas et al. 1975a).

3.4.1.5 Az EPR spektrumok számítógépes szimulációs vizsgálata

Az EPR spektrumok lassú mozgású régiójának szimulációjához a Freed csoport által ismertett nemlineáris legkisebb négyzetek programot (NLSL) használtuk (Budil et al. 1996; Meirovitch et al. 1984). Az NLSL szoftver lehetővé teszi a Brown-féle rotációs diffúzió szimulálását anizotróp diffúziós tenzonnal, figyelembe véve a g-faktor és a rotációs diffúziós tenzor által bezárt hajlásszöget, maximálisan háromkomponensű molekuláris környezet, vagy mozgás esetén. Az FDNA jelölő hiperfinom csatolási állandójának és g-faktorának meghatározásakor az izotróp hiperfinom csatolás értéke $a_0 = 1,589$ mT volt, és $g_0 = 2,00553$ volt 60°C -on DPPH-val kalibrálva. A teljes hőmérsékleti tartományban történt előzetes szimulációk alapján az EPR spektrumok legjobb illesztése adta a továbbiakban használt hiperfinom- és g-tenzor értékeket:

1. komponens: $A_{xx} = 0,59$; $A_{yy} = 0,60$ és $A_{zz} = 3,48$ mT

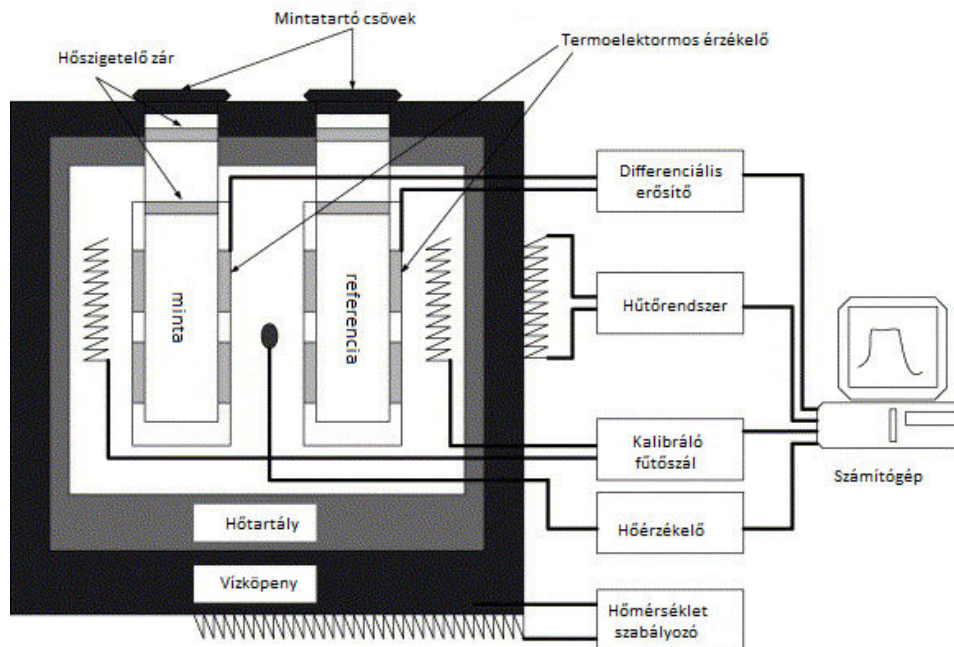
2. komponens: $A_{xx} = 0,63$; $A_{yy} = 0,63$ és $A_{zz} = 3,43$ mT

g-tenzor: 2,00820; 2,00608 és 2,00230 a lassú és a gyors mozgású komponens esetében. A g- és a diffúziós tenzorok közötti hajlásszög különböző volt a két lassú mozgású komponensnél, és a hőmérséklet függvényében változott.

3.4.2 Differenciál pásztázó kalorimetria (DSC)

Termodinamikai vizsgálati módszerek segítségével a természetben előforduló biológiai rendszerek rendezettsége és energiaállapota tanulmányozható. A differenciál pásztázó kalorimetria (Differential Scanning Calorimetry, DSC) nagy érzékenységű módszer a fehérjék, fehérje komplexek termodinamikai állapotátározóinak vizsgálatára, melyek segítségével azok térszerkezeti stabilitása, konformációs változásai is leírhatóak. A DSC módszer képes a vizsgált rendszer melegítése, illetve lehűtése során végbemenő molekuláris folyamatok energetikai hátterének kimutatására (Lőrinczy 2004; Lumry 1954).

A DSC készülék sematikus felépítését a 9. ábra mutatja.



9. ábra: A DSC készülék felépítése (Zhang et al. 2005).

A műszer hőelnyelő blokkjában egymástól és a környezettől elszigetelt minta és referencia cella egyidejű, egyenletes sebességű felfűtése történik. A két cella hőkapacitása egyenlő, így a mérés során hőmérsékletük is azonos marad mindaddig, amíg valamelyik cellában endoterm vagy exoterm folyamat nem történik. A cellák között kialakuló hőmérsékletkülönbség előjelétől és nagyságától függően eltérő teljesítményt igényel a minta és referencia cella fűtése. A műszer a termikus egyensúly fenntartása érdekében betáplált energiát (hőáram, ΔI) méri az idő, vagy a hőmérséklet függvényében. A hőteljesítmény (1 Watt = 1 J/s) leírható az alábbi egyenlettel:

$$Q/t = R \cdot I^2$$

ahol Q a hőmennyiség, t az idő, R az egyetemes gázállandó és I a hőáram. Mivel a folyamat állandó nyomáson zajlik, elegendő a fűtőáramot (ΔI) detektálni. A van't Hoff egyenlet segítségével értékelhetőek a DSC mérés eredményei:

$$\left(\frac{\delta \ln K}{\delta T} \right)_p = \frac{\Delta H_{vH}}{RT^2}$$

ahol K a folyamat egyensúlyi állandója, T az abszolút hőmérséklet, ΔH_{vH} pedig a van't Hoff entalpia. Korábbi munkák (Lorinczy and Belagy 1995; Lorinczy et al. 2002; Konczol et al. 1998) kimutatták, hogy az aktin hődenaturációja, hasonlóan néhány más fehérjéhez (Conejero-Lara et al. 1991a; Conejero-Lara et al. 1991b; Freire et al. 1992; Galisteo et al. 1991; Sanchez-Ruiz 1992; Sanchez-Ruiz et al. 1991; Sanchez-Ruiz et al. 1988), leírható egy irreverzibilis kétállapotú átmenettel: a natív állapotú fehérje irreverzibilisen átalakul a denaturált állapotú fehérjévé (N→I). Ekkor a van't Hoff entalpia megegyezik a kalorimetrikus entalpiával:

$$\frac{\Delta H_{cal}}{\Delta H_{vH}} = \frac{mQ_1}{4RT^2 \Delta C_T} \approx 1$$

ahol ΔH_{cal} a kalorimetrikus entalpia, m a tömeg, ΔC_T a járulékos fajhő értéke a termikus átmenet T_m hőmérsékleténél. A fázisátmenet maximuma az úgynevezett olvadáspont (T_m), mely megadja a termikus stabilitás mértékét.

A denaturáció entrópiaváltozását (ΔS) kiszámíthatjuk az alábbi képlettel:

$$\Delta S = \Delta H / T_m$$

A Gibbs-féle szabadentalpia-változást szobahőmérsékletre ($T = 22\text{ °C}$) a következő képlettel határozhatjuk meg:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

A DSC mérések során végbemenő termikus folyamatokról a DSC görbe idő szerinti integrálja nyújt közvetlen információt, mivel ez megadja a kalorimetrikus entalpiát:

$$\frac{dH}{dT} = mC_p \frac{dT}{dt}$$

ahol dH a kalorimetrikus entalpia, m a minta tömege, C_p a hőkapacitás, dT/dt pedig a fűtési, illetve hűtési sebesség. Az egyenlet segítségével kiszámítható a hőkapacitás is.

3.4.2.1 A DSC mérések kivitelezése

A formin, aktin, illetve aktin-formin minták hődenaturációját SETARAM Micro DSC-III kaloriméter segítségével vizsgáltuk. Minden mérést 20 °C és 100 °C között végeztünk $0,3\text{ K/perces}$ felfűtési sebességgel. A kísérletek során Hastelloy mérőcellákat használtunk, mérésenként átlagosan $800\text{ }\mu\text{l}$ mintával. Referenciaként a vizsgált fehérje puffer oldatát használtunk. A minta és referencia cellákat $\pm 0,1\text{ mg}$ pontossággal egyensúlyoztuk ki. A denaturált minta második felfűtési eredményét használtuk alapvonalként, az eredeti DSC görbét ezzel korrigáltuk.

3.4.2.2 Számítógépes értékelési módszerek

A DSC görbék dekonvolúciójához a Jandel Scientific PeakFit 4.0 programját használtuk. A két egyenes metszéspontjának meghatározásához Jones és Molitoris statisztikai módszerét alkalmaztuk (Jones and Molitoris 1984). A módszer segítségével meghatározható, hogy a két egyenessel való illesztés pontosabb-e mint egy egyenes, és megadja az illesztés átlagos négyzetes hibáját.

A Jandel Scientific PeakFit 4.0 programja segítségével a DSC görbe többlet hőkapacitása ($C_{p,ex}$) jól illeszthető egy exponenciálisan módosított Gauss-görbével (EMG függvény). A denaturációs folyamatok DSC görbéi szükségszerűen aszimmetrikusak, mert a felfűtés során a natív/denaturált arány a denaturációs folyamat kinetikai állandójától, ezáltal a denaturáció aktiválási energiájától függően, időben

változik. Amennyiben a felfűtési sebesség nem kielégítően alacsony, úgy a rendszer időbeli változása termodinamikailag nem-egyensúlyi állapotokon keresztül zajlik le; az adott fehérjére jellemző hőáram-görbe maximuma értelemszerűen a magasabb hőmérsékletek felé tolódik el.

3.4.3 Polimerizációs teszt

A spinjelölés hatását a formin FH2 nukleációs képességére fluoreszcens polimerizációs teszttel vizsgáltuk. Az időfüggő pirén-esszét Perkin Elmer LS50B lumineszcens spektrométerrel végeztük. A mérések során a 365 nm gerjesztési és 407 nm emissziós hullámhosszt alkalmaztunk, a gerjesztési és emissziós réseket 5 nm-re állítottuk, a hőmérsékletet termosztálható küvettatartóban 25 °C-on tartottuk.

A mérések során N-(1-pirén)-jódacetamiddal jelölt aktin monomerek (pirén-aktin) fluoreszcencia intenzitásának változását detektáltuk, jelöletlen és spinnel jelölt formin FH2 fragmentumok jelenlétében. A polimerizáció során a pirén-aktin fluoreszcencia intenzitása növekszik, miközben a pirénjelölt aktin monomerek beépültek a képződő filamentumba (Kouyama and Mihashi 1981). Az aktin koncentrációt minden esetben 5 μM -ra állítottuk, amelynek 5%-a pirénnel jelölt aktin volt. A jelöletlen és jelölt formin koncentrációja 1 μM volt. Az aktin által kötött kalcium magnéziumra való cseréje 200 μM EGTA és 50 μM MgCl_2 hozzáadásával 5 perces inkubációval történt. A magnézium-aktin polimerizációját 1 mM MgCl_2 és 50 mM KCl hozzáadásával indítottuk meg.

4 Eredmények

4.1 EPR mérések

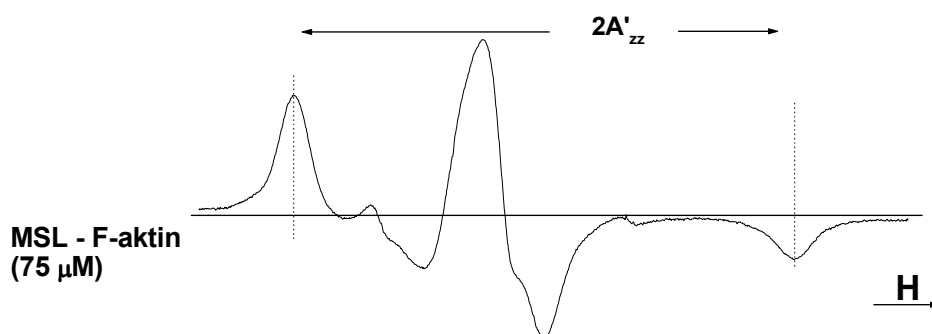
EPR spektroszkópiás méréseket mind aktin, mind formin fehérjén végeztünk. Aktin esetében a fehérje két különböző alegységén lévő aminosav oldalláncok paramágneses jelölésével lehetővé vált a két alegység rotációs dinamikájának jellemzése. A formin fehérje paramágneses jelölésére nem álltak rendelkezésre irodalmi adatok, ezért kidolgoztam a jelölés módszerét, melynek segítségével a formin FH2 domén EPR vizsgálata lehetővé vált.

4.1.1 Spinjelölt aktinon végzett EPR mérések

4.1.1.1 A Cys-374-en jelölt aktin vizsgálata

Az aktin maleinimid spin szondával (MSL) történt jelölését követően konvencionális EPR mérésekkel ellenőriztük a jelölés hatékonyságát és specifikusságát. Eredményeink szerint a maleinimid jelölők több, mint 70%-a az aktin Cys-374-es aminosavához kapcsolódik.

Az aktin filamentumokon mért konvencionális EPR spektrumok hiperfinom csatolási állandója szobahőmérsékleten $2A'_{zz}$ $6,803 \pm 0,010$ mT volt ($n = 22$ mérés átlagából) (10. ábra). Az ebből az értékből számított rotációs korrelációs idő $\tau_2 \sim 50$ ns volt, ami a jelölt aktin domén mozgását tükrözi.

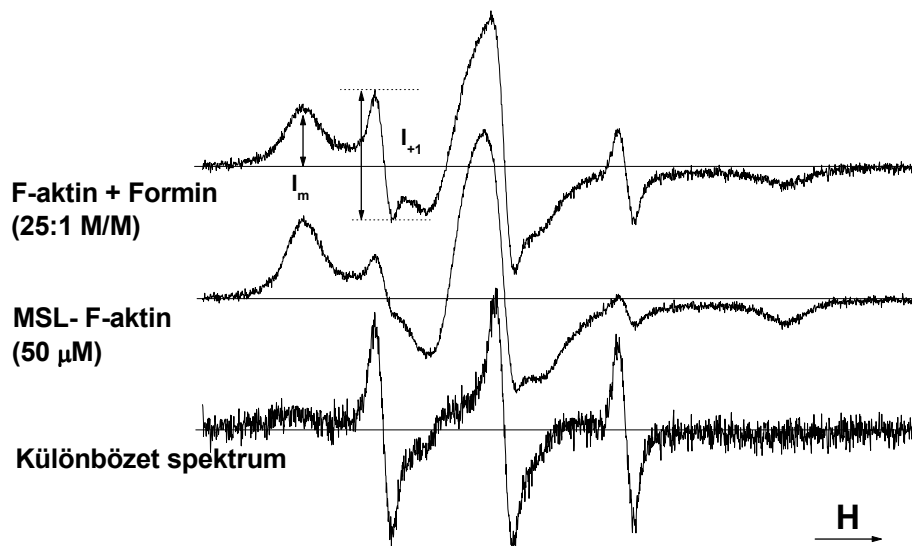


10. ábra. Az MSL-jelölt F-aktin ($75 \mu M$) konvencionális EPR spektruma

A szaturáció transzfer EPR spektrumok L'/L értéke F-aktin esetében $0,91 \pm 0,05$ ($n = 12$) volt, ami körülbelül 100-120 μs -os rotációs korrelációs időnek felel meg. Az ST-EPR mérések C'/C diagnosztikus paramétere $0,09 \pm 0,12$ ($n = 12$) volt (12. ábra). Az ST-spektrumok paraméterei az aktin filamentum több szomszédos alegységének együttes, torziós mozgását jellemzik.

4.1.1.2 Formin FH2 hatása az MSL-jelölt aktinra

Kísérleteink további részében mDia1 FH2 formin MSL-jelölt aktinra gyakorolt hatását vizsgáltuk. A minták összeállítása során különböző arányban adtunk FH2 formint az aktin filamentumokhoz. A konvencionális EPR méréseket 1 : 50, 1 : 25, 1 : 10 és 1 : 5 formin : aktin molarányú mintákon végeztük. A forminnak az MSL-aktinhoz való kapcsolódása a hiperfinom csatolási állandó ($2A'_{zz}$) csökkenését eredményezte (11. ábra). A formin F-aktinhoz való kötődése után a Cys-374 környezetében levő jelölő rotációs korrelációs ideje 50 ns-ről 30 ns-ra csökkent 25 : 1-es aktin : formin arány esetében. A többi aktin–formin aránynál is hasonlóan rövidebb rotációs korrelációs időket számoltunk.



11. ábra. Az MSL-jelölt F-aktin ($50 \mu\text{M}$), és forminnal alkotott komplexének konvencionális EPR spektruma, és az I_m és I_{+1} paraméterek definíciója. A különbségi spektrum megadja az aktin-formin komplex esetében megjelenő gyors mozgású komponens jelét.

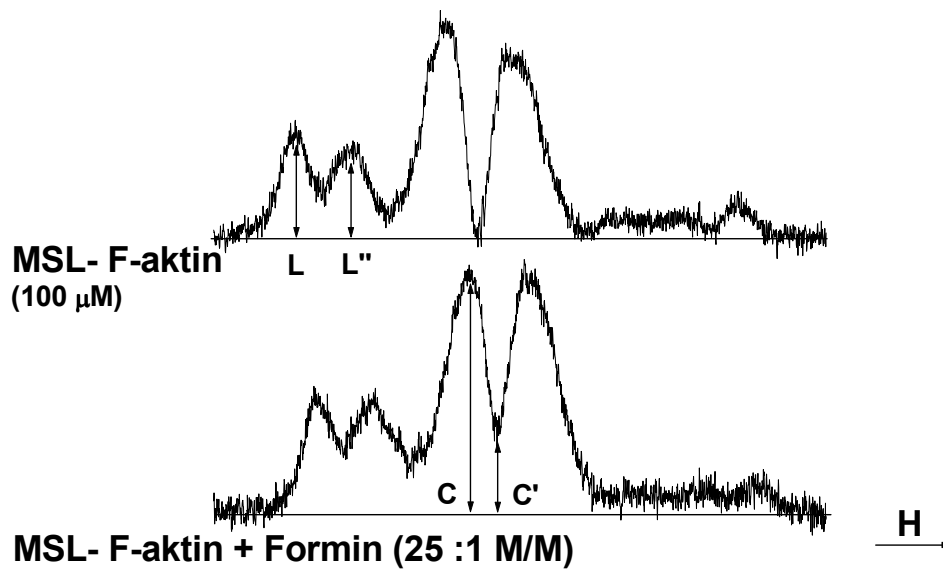
1. Táblázat: Az MSL-aktin esetében mért konvencionális és ST-EPR paraméterek átlagértékei formin nélkül és különböző mennyiségű formin jelenlétében

F-aktin:formin koncentráció arány (mol/mol)					
	Formin nélkül	50:1	25:1	10:1	5:1
Konvencionális EPR					
Mintaszám (db)	22	14	15	13	3
$2A_{\max}$ (mT)	6.803 ± 0.008	6.764 ± 0.011	6.758 ± 0.009	6.749 ± 0.011	6.737 ± 0.030
Szaturáció transzfer EPR					
Mintaszám (db)	12	10	8	10	3
L'/L	0.916 ± 0.05	1.120 ± 0.06	1.038 ± 0.06	1.057 ± 0.06	1.179 ± 0.08
C'/C	0.12 ± 0.09	0.321 ± 0.08	0.339 ± 0.06	0.335 ± 0.06	0.276 ± 0.11
I_{+1}/I_m arány					
Mintaszám (db)	8	6	5	5	2
I_{+1}/I_m	0.89 ± 0.06	1.68 ± 0.16	1.82 ± 0.21	2.06 ± 0.17	1.61 ± 0.5

Az aktin filamentumokhoz hozzáadva a formin FH2-t a konvencionális EPR spektrumokon a gyors forgású tartományra jellemző spektrumvonalak amplitúdóinak növekedését tapasztaltuk (11. ábra). Feltételezésünk szerint az aktin-formin spektrumok változása azt mutatja, hogy az aktin filamentumok egy részében, azok a szegmensek, amihez az MSL jelölő kapcsolódik fellazultak, és az aktin filamentumok egészéhez képest gyorsabb forgást végeznek. A spektrumok tehát két részből tevődnek össze: 1.) olyan aktin filamentumok spektrumából, ami az aktin filamentum egészének a változását tükrözi; 2.) a fellazult szegmenseknek tulajdonítható spektrális járuléka. Az első komponensre vonatkozó változás jelenik meg a csatolási állandó, $2A_{\max}$, változásában (1. táblázat). A második komponens járulékát a különbségi spektrumok alapján határozhatjuk meg. Méréseink alapján a mobilizáló hatás a 40 μM -nál alacsonyabb koncentrációjú aktin minták esetében jobban megfigyelhető, ezekben a mobilis komponens relatív járuléka nagyobb. A konvencionális EPR spektrum első két csúcsának amplitúdója (I_{+1} és I_m) segítségével ugyancsak jellemezhető a két spin populáció aránya a mintában. I_m a lassabban forgó spin jelöltől eredő, alacsony

térerőnél mért csúcs amplitúdója, I_{+1} pedig a formin hozzáadására létrejött spektrális amplitúdó, ami a gyors forgású szegmensek járulékával arányos. A különböző formin-aktin molarányú minták esetében mért I_{+1}/I_m arányok értékét az 1. táblázat mutatja. A mobilisabb spin populációtól származó jelnek a szuperponált spektrumból történt kivonása azt mutatta, hogy az újonnan megjelent spektrumkomponens kétszeres integrálja a teljes EPR abszorpció körülbelül 10%-át adja. A mobilis komponensre kiszámolt rotációs korrelációs idő $\sim 0,3$ ns volt. Ebben az esetben a mobilis komponens forgását izotrópnak feltételeztük, és számításokhoz szükséges g- és A-tenzorok értékeit a 3.4.1.5 fejezetben megadott 2. komponens értékeivel közelítettük.

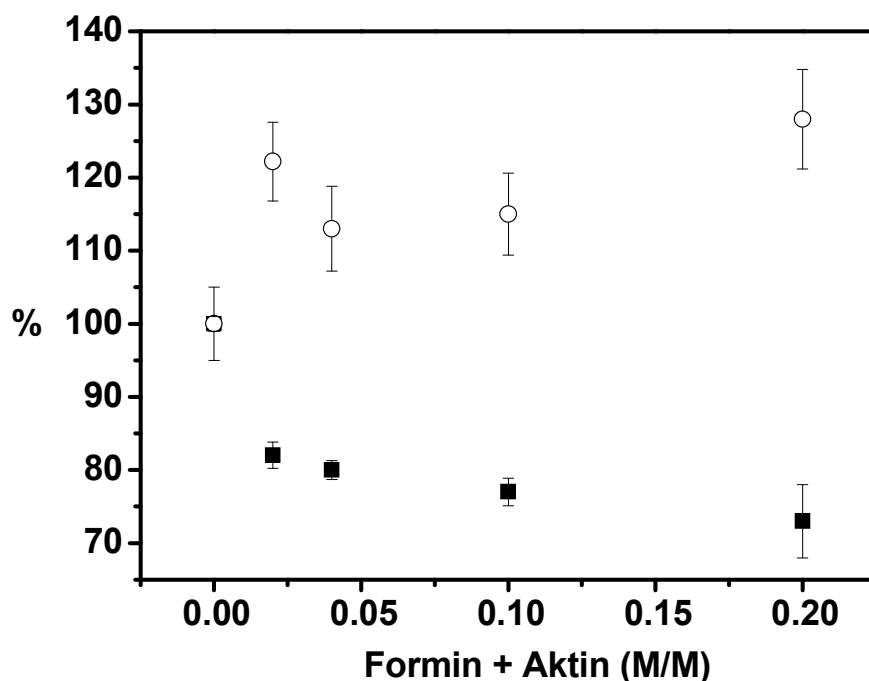
A kontroll mérések során az F-aktin mintához a forminnal megegyező térfogatú puffert adtunk, hogy elkerüljük a minta kihígulásából származó eltéréseket. A fehérjék egymással való kölcsönhatása megváltoztathatja az oldatok viszkozitását, és így a rotációs korrelációs idő változása nem csak a fehérjék konformációs változásából, speciális kölcsönhatásaikból eredő változásból fakadhat. Ennek vizsgálatára az aktin mintákhoz olyan semleges fehérjét adtunk (szarvasmarha szérum albumin, BSA), ami csak a viszkozitást változtatja meg, de az aktinnal nem lép kölcsönhatásba. A BSA koncentrációi megegyeztek a megfelelő formin koncentrációkkal. A felvett spektrumok azt mutatták, hogy ebben az esetben az MSL-aktin minták EPR paramétereiben semmilyen változás nem lépett fel, azaz a csatolási állandókban meghatározott változások nem a viszkozitás változásának a következménye volt, hanem az aktin-formin kölcsönhatásból fakadt. A formin F-aktinhoz való kapcsolódásának további hatásait szaturáció transzfer EPR módszerrel vizsgáltuk. Az MSL-F-aktin és az F-aktin-formin komplex esetében mért ST-EPR spektrum a 12. ábrán látható.



12. ábra. MSL-F-aktin és az F-aktin-formin komplex ST–EPR spektruma, és a spektrumok karakterisztikus L és C paraméterei.

Mind az L''/L és a C'/C diagnosztikus EPR paraméter a jelölő megnövekedett immobilizációját mutatta a formin F-aktinhoz történő hozzáadása után (1. táblázat). Ugyanakkor a formin : aktin koncentráció arány növelésekor az ST–EPR paraméterek csak kis mértékben változtak (13. ábra).

Az F-aktin rotációs mozgásának változását a Thomas és munkatársai által publikált módszer segítségével határoztuk meg (Thomas et al. 1976). Az alacsony térérejtű L''/L paraméterek alapján az aktin filamentum rotációs korrelációs ideje 100 μ s-ról 150 μ s-ra nőtt a formin kötése után. Ugyanakkor a C'/C paraméter felhasználásával számított rotációs korrelációs érték 7 μ s-ról 40 μ s-ra nőtt.



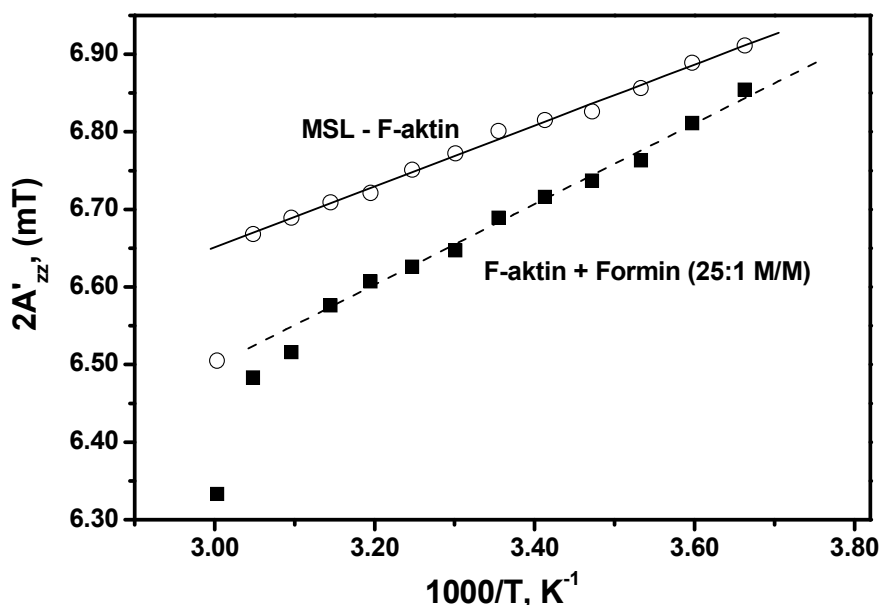
13. ábra. Az MSL-F-aktin és az F-aktin-formin komplex diagnosztikus EPR paramétereinek százalékos változása a formin-aktin molarány függvényében: (○) az ST-EPR L''/L értékeit, (■) a konvencionális EPR csatolási állandó ($2A'_{zz}$) értékeit mutatja.

A konvencionális EPR mérések során detektált nanoszekundumos mozgások befolyásolhatják az ST-EPR spektrumot is. A gyengén kötődő jelölőktől származó hibák mértékét az ST-EPR spektrumok értékelése során az integrált intenzitás paraméterek használata hatékonyan csökkenti. Thomas és munkatársai módszerét (Squier and Thomas 1986) követve kiszámoltuk a konvencionális EPR spektrumok integrálját azonos preparálásból származó F-aktin és F-aktin-formin komplex párok esetében. Ezen spektrumok integrálját elosztottuk a megfelelő konvencionális EPR spektrum kétszeres integráljával és a mérőüreg mikrohullámú intenzitásával. Az intenzitás értékeket az F-aktin rigid limit értékével normáltuk (F-aktin + 40% w/w cukor $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on). A számolt intenzitás érték F-aktin esetében $0,107 \pm 0,012$ ($n = 5$), F-aktin-formin esetében pedig $0,158 \pm 0,029$ ($n = 9$). A formin-aktin arányt nem vettük figyelembe eme számítási folyamat során. Az intenzitásérték növekedése a hosszabb rotációs korrelációs időt jelzi. Ezért ezek az eredmények megfelelnek az L''/L és C'/C amplitúdó paraméterekből történt számításoknak, miszerint formin F-aktinhoz történő

hozzáadása a mikroszekundumos rotációs mozgások lassulását eredményezte az aktin filamentumokban. Az előzőek alapján látszólagos ellentmondást tapasztaltunk a konvencionális EPR módszer alapján meghatározott $2A_{\max}$ értékek változása illetve az ST–EPR eredmények között. A konvencionális technika eredményei rövidebb korrelációs időket, azaz az aktin filamentumok egészére vonatkozóan gyorsabb forgást jósolnának az F-aktin–formin kölcsönhatás eredményeként. Ezzel szemben az ST–EPR eredmények a kölcsönhatás következtében fellépő lassabb forgásra utalnak. Ezt a látszólagos ellentmondást a diszkusszió fejezetében részletesen tárgyalom.

4.1.1.3 Hőmérséklet hatása az MSL-aktinra és forminnal alkotott komplexére

Az EPR technika lehetővé teszi a spinjelölt fehérjék különböző hőmérsékleten való vizsgálatát is. A Cys-374-en jelölt aktint és formin FH2-vel alkotott komplexét 0 és 60 °C közötti tartományban vizsgáltuk. A 14. ábra az F-aktin és F-aktin-formin komplex (25 : 1 mol/mol) $2A'_{zz}$ értékének hőmérsékleti függését mutatja a vizsgált tartományban.



14. ábra. Az MSL-F-aktin és F-aktin-formin komplex (25 : 1 mol/mol) csatolási állandó értékének ($2A'_{zz}$) hőmérsékleti függése.

A hiperfinom csatolási állandó értékek $1000/T$ függvénye minden esetben lineárisnak bizonyult, ám a regressziós együttható (b) kissé különbözött az eltérő aktin-formin arányoknál. 1 : 25 formin-aktin mólarányánál a regressziós együttható $b = 0,392 \pm 0,008$ és $b = 0,519 \pm 0,014$ volt F-aktin és F-aktin-formin komplex esetében, míg 1 : 5 arányánál a $b = 0,402 \pm 0,018$ és $b = 0,540 \pm 0,022$ értéket számoltunk F-aktin és F-aktin-forminra vonatkozóan. Az aktin-formin komplex hiperfinom csatolási állandója az egész vizsgált hőmérsékleti tartományban kisebb volt, mint az F-aktiné. Az F-aktin és F-aktin-formin komplex regressziós együtthatója szignifikánsan különbözött a $P = 0,05$ szignifikancia szinten. Ezzel szemben a különböző koncentráció arányú aktin-formin komplexek regressziós együtthatójának eltérése nem volt szignifikáns a $P = 0,05$ valószínűségi szinten. A hőmérsékletfüggő EPR mérések során a maximális felhasadás egyenesen arányos az abszolút hőmérséklet reciprokával minden MSL-jelölt mintánál. A lineáris összefüggés magyarázatához feltételeztük, hogy a $2A'_{zz}$ (0°C) nagyjából megegyezik a hiperfinom csatolási állandó rigid limitjével ($2A^r_{zz}$). A kötött spinjelölő rotációs korrelációs idejét a Goldman egyenlet segítségével számíthatjuk ki (Goldman et al. 1972):

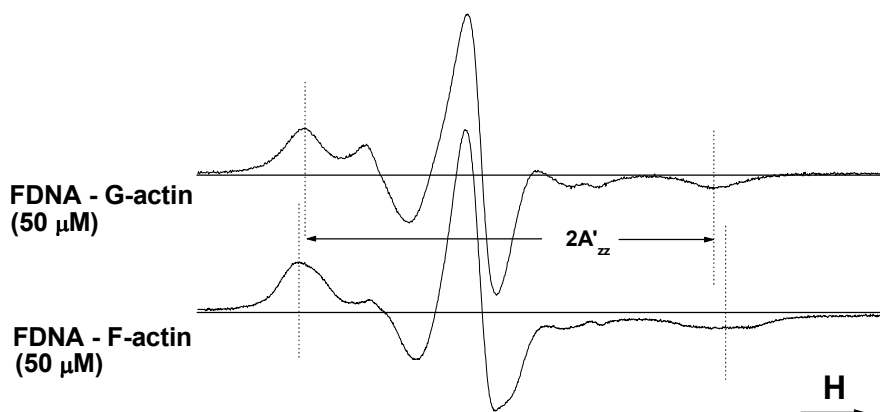
$$\tau_2 = a (1 - 2A'_{zz} / 2A^r_{zz})^b$$

ahol $a = 5,4 \times 10^{-10}$ s és $b = -1,36$. A diffúzióra vonatkozó általános elméleti megfontolások azt mutatják, hogy a molekulák rotációs diffúziójának hőmérsékletfüggésére is alkalmazható a diffúziós együttható és a diffúzió aktiválási energiája közötti Arrheniusi összefüggés. Ennek feltétele az, hogy a vizsgált hőmérséklet tartományban ne lépjen fel konformáció változás, mert ez a molekula sugarának változása miatt a korrelációs időben is változást eredményezne. A korrelációs együttható és a diffúziós állandó közötti összefüggést felhasználva kimutatható, hogy az általunk mért hőmérséklet tartományban a spektrumok maximális felhasadása – vagy az azzal egyenértékű rotációs korrelációs idő – és a reciprok hőmérséklet között egyenes arányosság van, amennyiben az aktiválási energia nem változik. A 14. ábra azt mutatja, hogy a vizsgált hőmérséklet tartományban sem az F-aktin sem az aktin-formin komplex esetén az aktin rotációs mozgása nem utal konformáció változásra (kivéve a 65°C -on mért értékeket, amikor a hőmérséklet már megközelítette az F-aktin denaturációs hőmérsékletét).

Az EPR spektrumok maximális felhasadását meghatározva a kiszámított rotációs korrelációs idők és az Arrhenius-féle összefüggés alapján meghatároztuk a rotációs diffúzióra vonatkozó aktiválási energiákat. F-aktin esetében a számításaink $E_a = 18$ kJ/mol illetve $E_a = 15$ kJ/mol értékeket adtak F-aktin-formin komplex esetében. Rigid limitként $2A'_{zz} = 7,055$ mT-t használtunk. Ezt a rigid limit értéket F-aktin mintán határoztuk meg 40%-os cukoroldatban, -18 °C hőmérsékleten.

4.1.1.4 FDNA- jelölt aktin vizsgálata

Az aktin 9 kDa-os 2. alegységének EPR vizsgálatához az FDNA paramágneses jelölőt alkalmaztuk, mely a Lys-61 aminosavhoz képes szelektív módon kapcsolódni. A jelölt G-aktin polimerizációjával az aktin filamentumok vizsgálata is lehetővé vált. A 15. ábra a FDNA-G-aktin és FDNA-F-aktin szobahőmérsékleten felvett konvencionális EPR spektrumát mutatja.



15. ábra. FDNA-G-aktin és FDNA-F-aktin konvencionális EPR spektruma.

Az F-aktinhez kapcsolódó FDNA jelölő EPR spektrumán mért maximális felhasadási érték szignifikánsan kisebb ($2A'_{zz} = 6.121 \pm 0.021$ mT, ($n = 21$)), mint az MSL-F-aktiné. Az FDNA-jelölt F-aktin konvencionális EPR spektrumán a magas térerejű spektrumkomponens kiszélesedése, egyes esetekben kettős csúcs, tapasztalható. Ez a jelenség arra utal, hogy a Lys-61-hez kapcsolódó spinjelölőnek két különböző rotációs dinamikájú konformációja van, vagy arra, hogy néhány jelölő másik aminosavhoz kötődik, pl. a Lys-113-hoz. Ezzel ellentétben az FDNA G-aktin spektrumából csupán egy hiperfinom érték származtatható, melynek átlagértéke

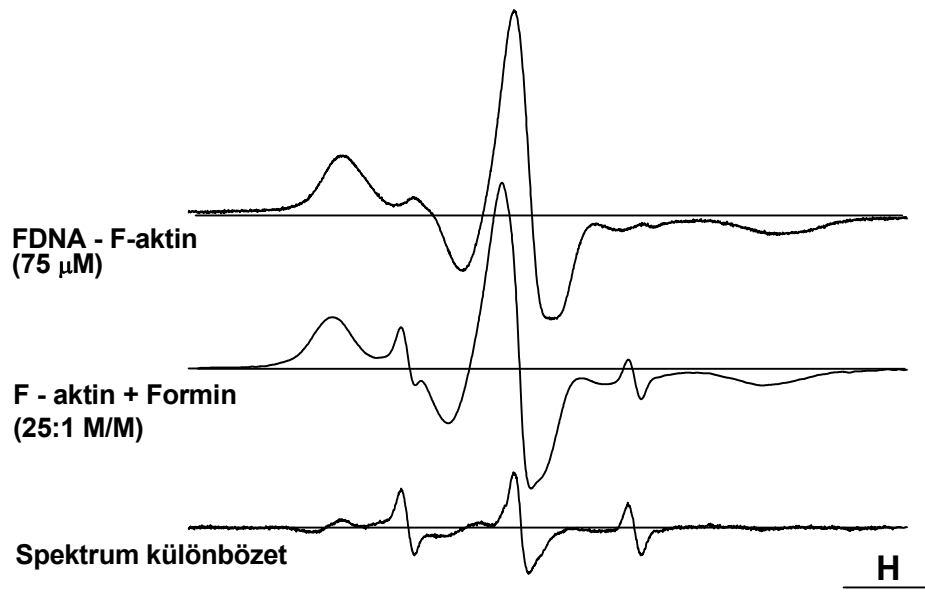
$2A'_{zz} = 5,912 \pm 0,05$ mT ($n = 7$). Ez arra utal, hogy a jelölő az F-aktin esetén is csak egy Lys-hez kapcsolódott, mert az F-aktint a jelölt G-aktin minta polimerizációjával kaptuk.

Annak érdekében, hogy bizonyítsuk az FDNA Lys-61-hez való kapcsolódását, G-aktint jelöltünk fluoreszcein izotiocianáttal (FITC). A G-aktin FITC-el való reakciója a fluoreszcens jelölő Lys-61-hez való kapcsolódását eredményezte az aktin 2. szubdoménjén. G-pufferben végzett alapos dializálás után megkíséreltük megjelölni a FITC-G-aktint SL-FDNA-val. A kétszeresen jelölt minta teljes aktin-kötő spin-koncentrációja a FITC-jelölés nélküli érték 20%-ára csökkent, $2A'_{zz}$ értéke kb. 1,5 G-al kisebb volt, I_{+1}/I_m aránya (9,25) kb. 30-szor nagyobb volt, mint az FDNA-aktiné. Ezek a kísérleti eredmények alátámasztják azt a korábbi megállapítást, hogy az FDNA-aktin EPR jelének meghatározó része a Lys-61-en levő jelölőtől származik.

A szimulációval nyert hiperfinom csatolási állandó rigid limitjének (6,915 mT) felhasználásával a G-aktinon levő FDNA-jelölő rotációs korrelációs ideje $\tau_2 \sim 8-9$ ns-nak bizonyult. Ez az érték rövidebb, mint az egész monomer molekula rotációs korrelációs ideje (~ 18 ns), ami arra utal, hogy a Lys-61-et tartalmazó szegmens a teljes monomerhez képest is mozgást végez.

4.1.1.5 Formin hatása az FDNA-jelölt aktinra

Formin hozzáadása után az FDNA-jelölt F-aktin konvencionális EPR spektruma a mobilitás növekedést mutatott, amit a csatolási állandó csökkenésén túl egy új spektrumkomponens megjelenése is jelzett (16. ábra).



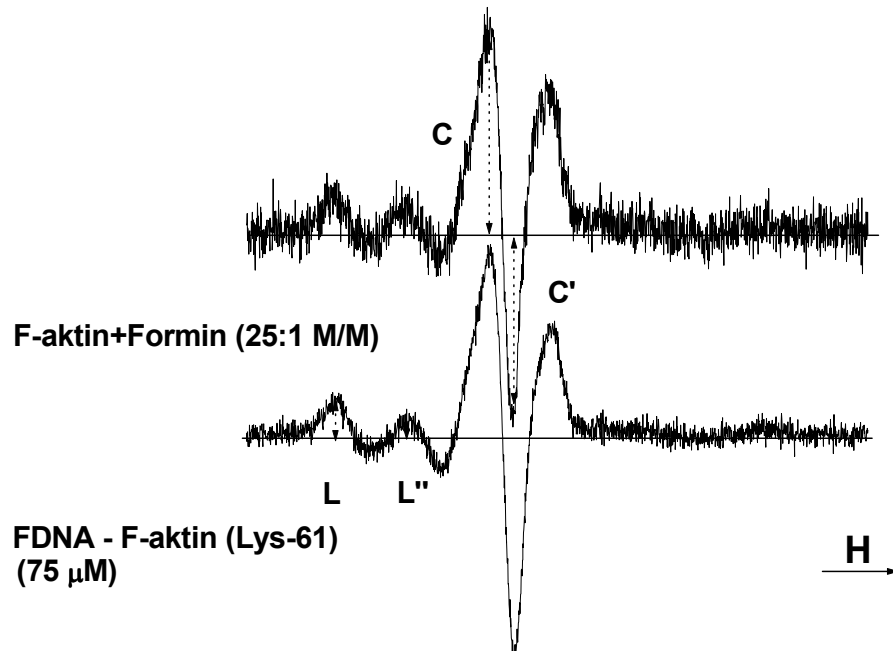
16. ábra. Az FDNA-F-aktin konvencionális EPR spektruma formin nélkül és formint kötve. A két spektrum különbözete megadja az új, mobilisabb spektrumkomponens jelét.

A spektrum mobilis részének megjelenése szinte teljesen független volt a formin : aktin aránytól 1 : 10 alatt, és ennek a frakciónak a kétszeres integrálja mindig kisebb volt a teljes aktin koncentráció 5%-ánál. Az F-aktin és az F-aktin-formin komplex hiperfinom csatolási állandója között is tapasztaltunk különbséget (2. táblázat). A nem-paraméteres előjel tesztet alkalmaztuk a különbségek értékelésére [$2A'_{zz}$ (F-aktin + formin) – $2A'_{zz}$ (F-aktin)], minden kísérleti értéket az aktin-formin aránytól függetlennek tekintve, így a hiperfinom csatolási állandó kismértékű csökkenése szignifikáns volt a $P = 0,05$ valószínűségi szinten. Ez arra utal, hogy a forminnak az aktinhoz való kötődése által indukált konformációs változás mobilitás növekedést eredményez a 2. szubdoménon levő Lys-hez kapcsolt paramágneses jelölő környezetében.

2. Táblázat: Az FDNA-aktin esetében mért konvencionális és ST-EPR paraméterek átlagértékei formin nélkül és különböző mennyiségű formin jelenlétében

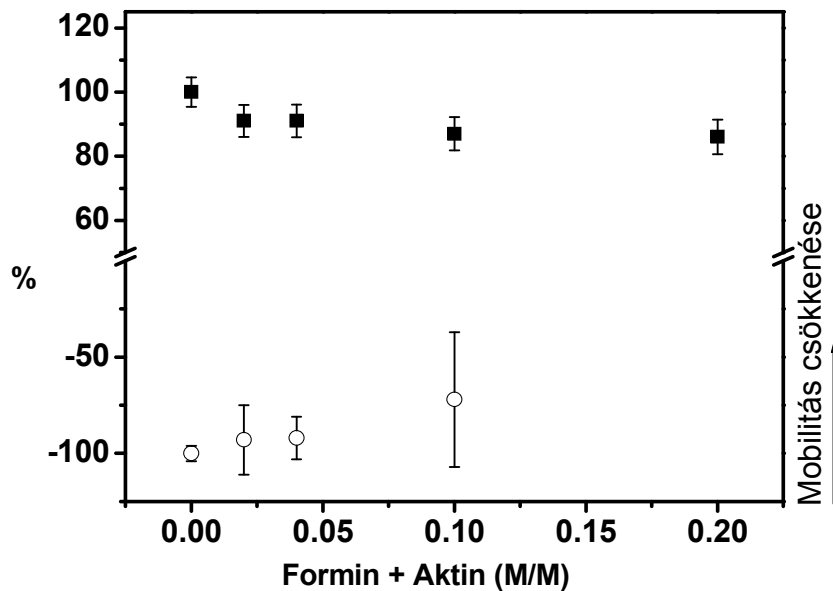
	F-aktin:formin arány (mol/mol)				
	Formin nélkül	50:1	25:1	10:1	5:1
Konvencionális EPR					
Mintaszám (db)	15	12	7	8	3
$2A_{\max}$ (mT)	6.121 ± 0.021	6.070 ± 0.011	6.071 ± 0.019	6.055 ± 0.016	6.037 ± 0.030
Szaturáció transzfer EPR					
Mintaszám (db)	7	3	3	4	-
L''/L	0.415 ± 0.05	0.463 ± 0.13	0.638 ± 0.17	0.762 ± 0.40	zajos spektrum
C'/C	-1.172 ± 0.05	-1.088 ± 0.20	-1.056 ± 0.12	-0.838 ± 0.30	zajos spektrum

Ezzel ellentétben a 120-150 μM -os koncentrációjú FDNA-jelölt aktinon és aktin-formin komplexen végzett ST-EPR mérések az L''/L és a C'/C paraméterek növekedését mutatták (2. táblázat), ami az aktin filamentum mobilitásának csökkenését jelzi (17. ábra).



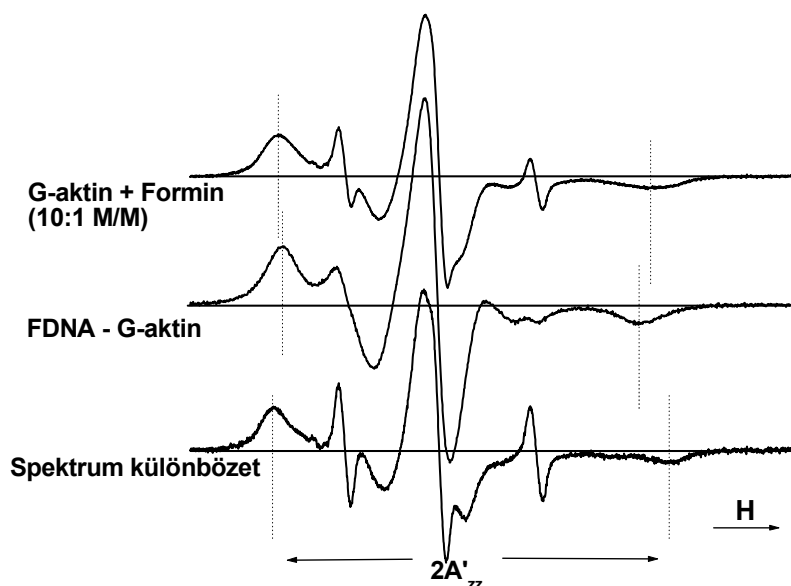
17. ábra. FDNA-jelölt aktin és aktin-formin komplexek ST-EPR spektruma.

A 18. ábra az FDNA-jelölt aktin rotációs korrelációs idejének százalékos változását összegzi a formin-aktin mólarány függvényében. Az ST-EPR paraméterek gyenge kapcsolatot mutatnak a jelölő rotációs mozgása és a formin-aktin arány között.



18. ábra. Az FDNA-aktin rotációs korrelációs idejének százalékos változása a formin-aktin mólarány függvényében: (○) az ST-EPR C'/C értékeit, (■) a konvencionális EPR csatolási állandó ($2A'_{zz}$) értékeit mutatja.

Kísérleteink egy sorozatában az FDNA-jelölt G-aktint különböző mennyiségű forminnal reagáltattuk annak érdekében, hogy lássuk, hogy a G-aktin Lys-61-en történő jelölése hogyan befolyásolja az aktin formin indukálta polimerizálhatóságát, és a formin kölcsönhatását az újonnan létrejövő F-aktinnal. Az eredményeket a 3. táblázatban összegeztük. 16 órányi, 4 °C-on történt inkubáció után végeztünk EPR méréseket és meghatároztuk a minta spin-koncentrációját. Az EPR mérések után a mintákat 45 percen keresztül centrifugáltuk 400000g-n, majd a felülúszót újból megvizsgáltuk. A spin-koncentráció számított értéke és a felülúszóban maradó G-aktin mennyiségének a függését a formin-aktin koncentráció aránytól a 3. táblázat mutatja. A G-aktin spektrumának a fehérje komplex spektrumából való kivonásával meghatározható volt a nagyobb hiperfinom csatolási állandó (19. ábra).



19. ábra. Az FDNA-G-aktin és G-aktin-formin komplex konvencionális EPR spektruma. A különbségi spektrumból meghatározható az összetett spektrum nagyobb hiperfinom csatolási állandója.

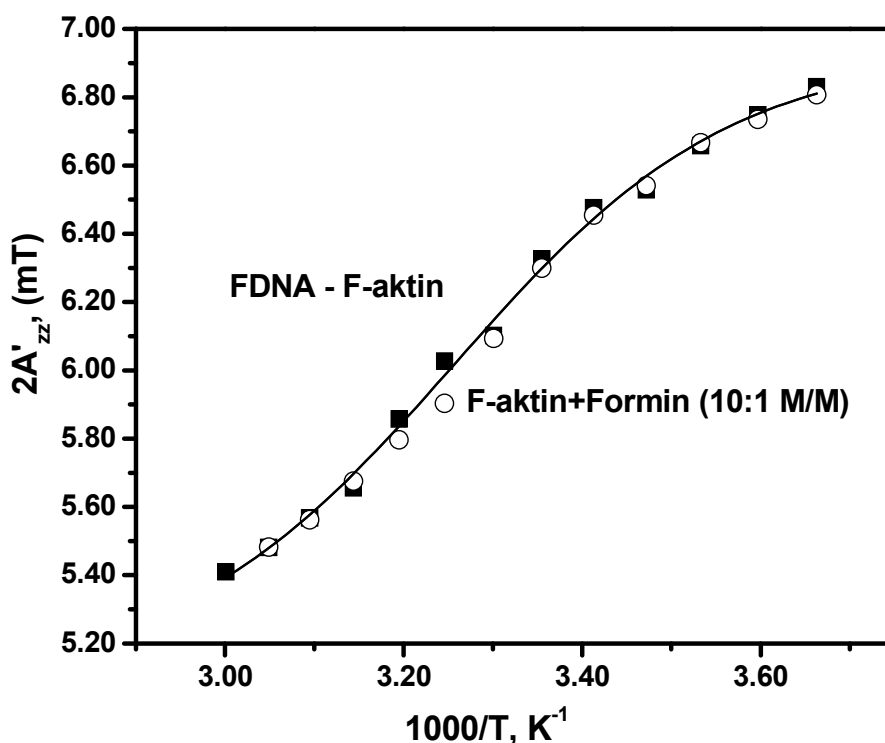
3. Táblázat: Az FDNA-jelölt aktin EPR paramétereit formin nélkül és formin jelenlétében. Zárójelben a vizsgált minták mennyisége.

	G-aktin:formin arány (mol/mol)					F-aktin
	Formin nélkül	50:1	25:1	10:1	5:1	
$2A'_{zz}$ (mT) ^a	5.906 ± 0.006 (8)	5.981 ± 0.016 (7)	6.052 ± 0.015 (11)	6.059 ± 0.016 (9)	6.125 ± 0.012 (4)	6.083 ± 0.031 (9)
$2A'_{zz}$ (mT) ^b	—	6.518 ± 0.08 (5)	6.562 ± 0.042 (5)	6.548 ± 0.02 (4)	6.528 ± 0.06 (4)	6.504 ± 0.04 (4)
R ^c	—	0.146	0.280	0.514	0.549	0.563
I_{+1}/I_m ^d	0.841	2.040	2.028	2.047	2.129	0.579
G-aktin a felülúszóban (%) ^d	96	80	46	14	4	3

^a: Az összetett spektrum kisebb hiperfinom csatolási állandójának becsült értéke; ^b: A különbségi spektrum hiperfinom csatolási állandója; ^c: A spektrum F-aktin jellegű komponensének a teljes spin koncentrációhoz viszonyított aránya; ^d: 3 minta átlaga.

4.1.1.6 Az FDNA-aktin hőmérsékletfüggő vizsgálata

Az FDNA-jelölt aktin és aktin-formin mintákon is végeztünk hőmérsékletfüggő EPR méréseket. A csatolási állandó és a reciprok abszolút hőmérséklet között szigmoid összefüggést találtunk mind aktin, mind aktin-formin komplex esetében (20. ábra). Mindemellett nem állapítottunk meg különbséget az aktin és az aktin-formin komplex spektrumának hőmérsékletfüggésében.



20. ábra. A csatolási állandó és a reciprok abszolút hőmérséklet közötti összefüggés FDNA-F-aktin (■), és aktin-formin komplex (○) esetében.

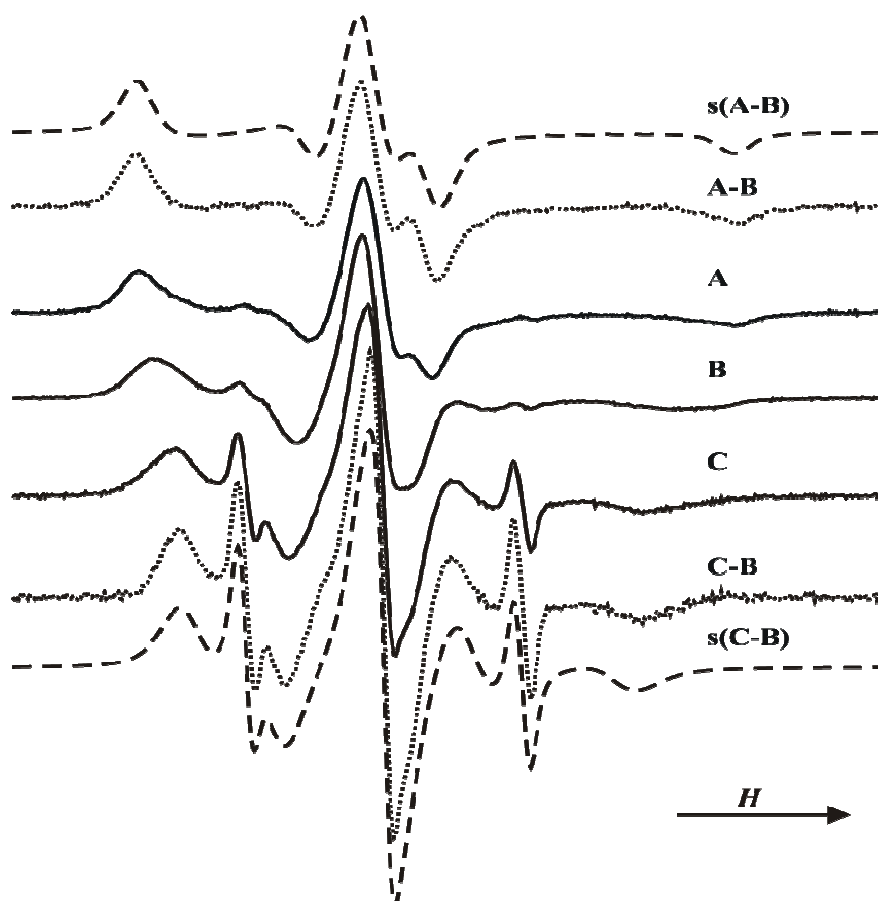
A 0 és 60 °C-on mért konvencionális spektrumok vizsgálata azt mutatta, hogy bár mindkét esetben két, összeadódó spektrumkomponens van, csak az egyikük határozza meg a mért hiperfinom csatolási állandót. Ezt a feltételezést a későbbiekben bemutatott spektrum szimuláció eredményei is alátámasztják. A rotációs diffúzió hőmérséklet-függésére vonatkozó értelmezés alapján (lásd 4.1.1.3) a kísérleti eredmények azt sejtetik, hogy a Lys-61 csoportot tartalmazó szegmens mozgása, a szegmens konformációja, nem éles fázisátalakulási folyamatként változik; azaz nincs egyetlen határozott fázisátalakulási hőmérséklet, ahol az aktiválási energia ugrásszerűen változna. Ezért, a külső csúcsok hőmérsékleti függését egy szigmoid Boltzmann-függvénnyel kíséreltük meg illeszteni:

$$2A'_{zz}(z) = [(2A'_{zz,\min} - 2A'_{zz,\max}) / (1 + \exp(z - z_0/\delta z))] + 2A'_{zz,\max}$$

ahol z_0 az inflexiós pont és δz a növekedési sebesség. $2A'_{zz,\min}$ és $2A'_{zz,\max}$ a mérés során nyert legkisebb és legnagyobb hiperfinom csatolási állandók. A legjobb illeszkedést a

$z = 1000/T$; $z_0 = 3,256$ ($34\text{ }^\circ\text{C}$); $\delta z = 0,155$ paramétereknél, $2A'_{zz,\min} = 5,10\text{ mT}$ és $2A'_{zz,\max} = 6,94\text{ mT}$ értékeknél találtuk. Az aktin és aktin-formin komplex esetében a szigmoid összefüggés szinte teljesen egyforma volt, bizonyítva, hogy a formin bekötése nem befolyásolta jelentősen a két konformációhoz tartozó populációkat.

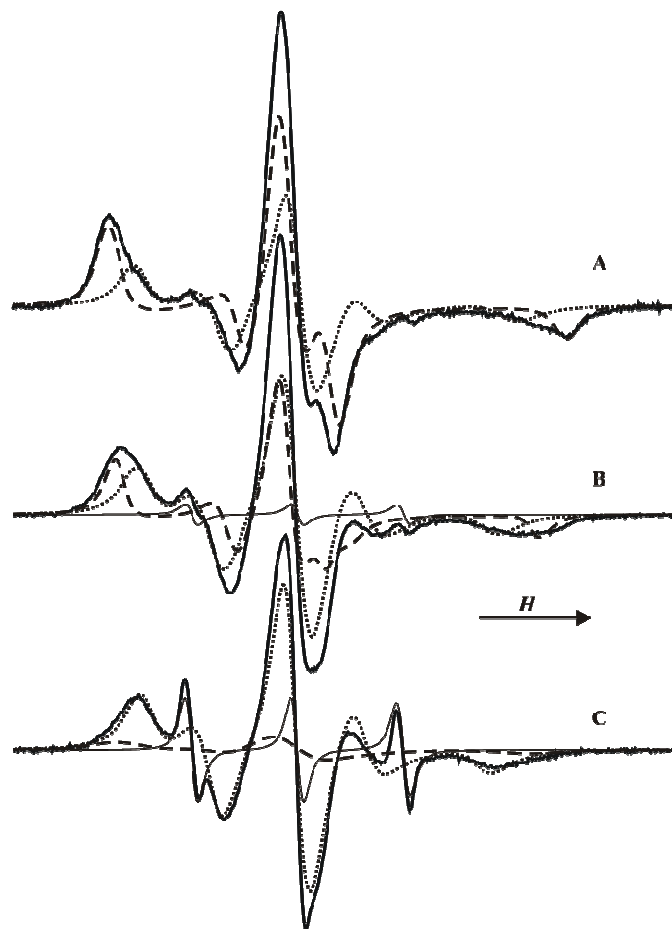
Az alacsony terű jel aszimmetrikus alakja (ld. a $0\text{ }^\circ\text{C}$ -on mért EPR spektrumot, 21. ábra, A görbe) és különösen a $30\text{ }^\circ\text{C}$ -on mért, kiszélesedett magas terű jel (21. ábra, B görbe) arra utal, hogy legalább két populációt kell számításba venni ahhoz, hogy értelmezhesük a hőmérsékletfüggő $2A'_{zz}$ értékeket. Az EPR spektrumok egy olyan jelet tartalmaznak, amely az aktin molekulák egy nagyon lassan mozgó szubpopulációjától származik (21. ábra, A-B görbe). A $30\text{ }^\circ\text{C}$ -on mért spektrum kivonása a $60\text{ }^\circ\text{C}$ -on mért görbéből megadja az aktin molekulák másik részét, melyek a legrövidebb rotációs korrelációs idővel rendelkeznek (21. ábra, C-B görbe). Ezek a szimulációk majdnem szimmetrikus alacsony és magas terű szélsőértékekkel rendelkező spektrumot eredményeztek, amelyeket egy korrelációs idővel jellemezhettünk.



21. ábra. A Lys-61-en jelölt aktin (A) 0 °C-on, (B) 30 °C-on és (C) 60 °C-on rögzített EPR spektruma. A-B: A és B spektrum különözete; C-B: C és B spektrum különözete; s(A-B) és s(C-B): az (A-B) és (C-B) szimulált spektrumok legjobb illesztése.

A különböző hőmérsékleten mért EPR spektrumok szimulációja azt mutatta, hogy egyik spektrum sem írható le egyetlen lassú mozgású komponenssel, amennyiben a mobilis komponens minden kísérleti spektrumon látható volt, de kb. 30 °C alatt elhanyagolhatóvá vált. A gyors forgású tartományba eső EPR spektrum mellett, minden esetben két eltérő, lassabb korrelációs idejű járulék volt szükséges a kísérleti spektrumok szimulációjához: egyetlen, izotróp Brown rotációs diffúzióval nem lehetett leírni a Lys-61-en jelölt F-aktin forgását. Annak érdekében, hogy minimalizáljuk a spektrális szimulációban használt paramétereket, axiális szimmetriát használtunk a diffúziós tenzorhoz, amit a megfelelő merőleges (τ_{prp}) és párhuzamos (τ_{pll}) rotációs korrelációs időkkel jellemezhetünk. Szimulációink azt mutatták, hogy egybevágó g- és diffúziós tenzorok nem képesek helyesen illeszteni a kísérleti spektrumokat. A két lassú mozgású komponens különböző szférikus hajlásszögekkel (α , β) rendelkezik a tenzorok között, nagyobb α - értékekkel a lassabb, és kisebbekkel (β) a gyorsabb

komponenseknél. Az α -hajlásszögeknél talált különbség szignifikáns, mivel mindkét komponensre azonos értékek használatával nem lehetséges a tapasztalati spektrumok megfelelő illesztése. Ellenben, a gyorsabb komponens β -értékei azonosnak vehetők, mivel csak kis javulást találtunk az illesztés jóságát jellemző χ^2 értékekben. A 22. ábrán három kísérleti és szimulált spektrum látható, amelyek a három különböző komponens járulékát mutatja be 0, 30 és 60 °C-on. A gyors forgású tartományba eső járulék 0 °C-on kisebb, mint 1%, 30 °C-on 1%, 60 °C-on pedig 6%.

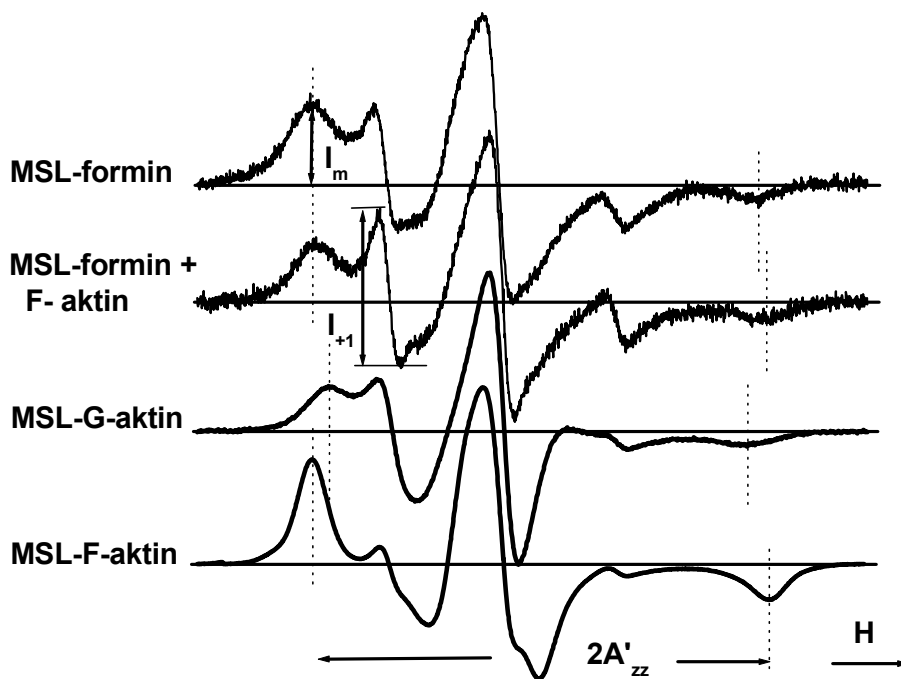


22. ábra. Az FDNA-jelölt aktin konvencionális EPR spektuma: (A) 0 °C-on, (B) 30 °C-on és (C) 60 °C-on. A vastag, egyenes vonal a kísérleti spektrum, a vékony vonal a mobilis komponens. A szaggatott vonal a lassú mozgású, a pontozott vonal a mobilisabb komponensek részesedése a teljes spektrumból.

4.1.1.7 mDia1 FH2 forminon végzett EPR mérések

A maleinimiddel jelölt G- és F-aktinnal ellentétben a formin EPR spektuma a jelölők inhomogén eloszlását mutatta; mind gyengén, mind erősen immobilizálódott MSL molekulák jele detektálható volt. A különböző hőmérsékleten mért,

kétkomponensű EPR spektrumok számítógépes elemzése során sikerült szétválasztani a két populáció elemeit. A szobahőmérsékleten felvett spektrumok szerint a jelölő molekulák kb. 60%-a erősen immobilizálódott állapotban volt. Az MSL-formin, MSL-formin-aktin komplex, valamint monomer és filamentális MSL-aktin konvencionális EPR spektrumát a 23. ábra mutatja.



23. ábra. Az MSL-formin, MSL-formin-aktin komplex, valamint monomer és filamentális MSL-aktin konvencionális EPR spektruma.

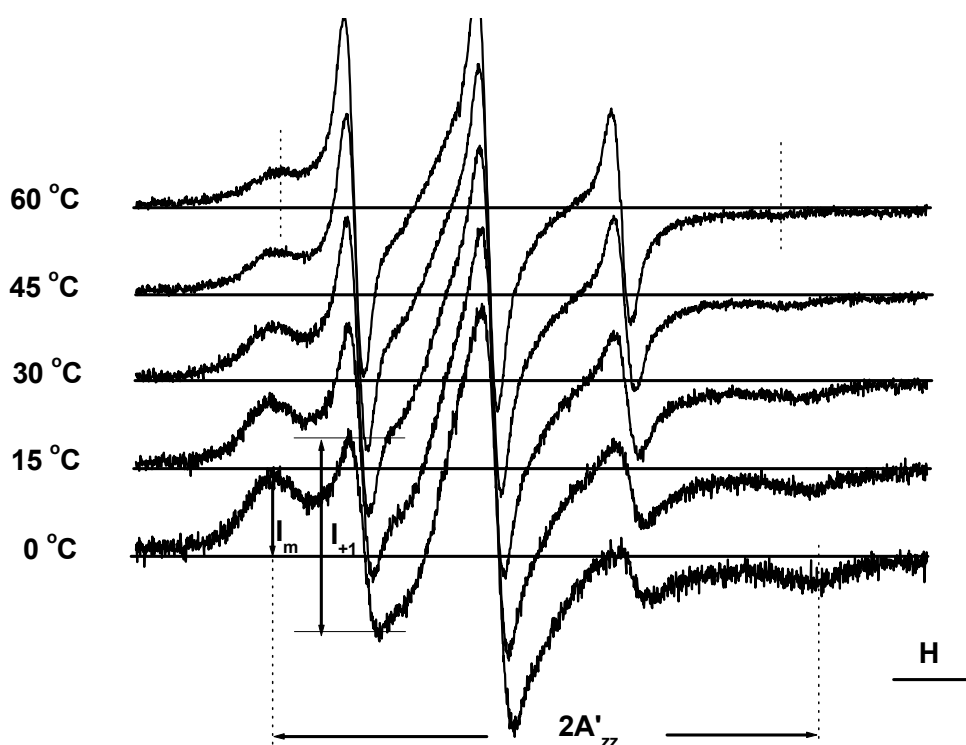
Az MSL-formin G-aktinhoz történő hozzáadása kb. 16 óras, jégen történt inkubáció során aktin filamentumok kialakulását eredményezte. Az MSL-formin hiperfinom csatolási állandója $2A'_{zz} = 6,538 \pm 0,044$ mT ($n = 4$) volt szobahőmérsékleten. A forminon erősen immobilizálódott jelölő rotációs korrelációs ideje 25 ns volt, míg a gyengén immobilizálódott jelölő esetében 3,5 ns értéket számoltunk. A számítások során Brown-féle rotációs diffúziót feltételeztünk, a hiperfinom csatolási állandó rigid limit értékét pedig az MSL-F aktin esetében mért 6,835 mT adta.

F-aktin MSL-forminhoz való hozzáadása a hiperfinom csatolási állandó növekedését eredményezte: ez az érték 6,538 mT-ról 6,727 mT-ra nőtt amint az aktin:formin molarányát nulláról 1 : 1-re növeltük, míg $6,640 \pm 0,032$ mT ($n = 7$) értéket mértünk 5 : 1 aktin-formin molarány esetében. A formin aktinhoz való kötődésének

hatása a fehérjék molarányától függetlennek tűnt a jelölt formin szegmens környezetében.

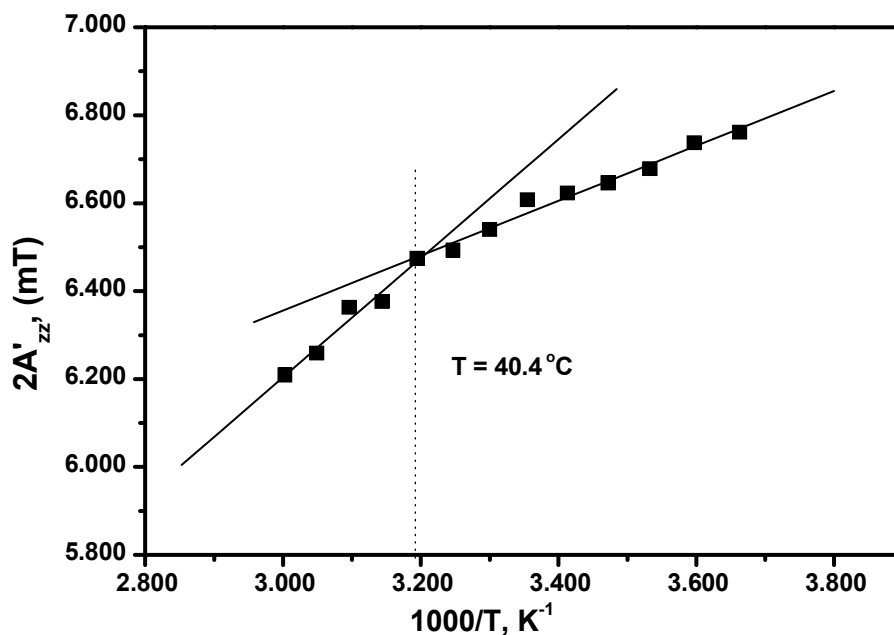
4.1.1.8 MSL-forminon végzett hőmérsékletfüggő EPR mérések

A spinjelölt formin konformációját különböző hőmérsékleten végzett EPR mérésekkel is vizsgáltuk a 0 és 60 °C közötti tartományban, 5 °C-os lépésekben. A hőmérséklet emelkedésével a mobilis EPR jelhez tartozó populáció aránya nőtt (ezt az I_{+1} csúcs relatív amplitúdója jelzi), ezzel egyidejűleg az immobilis populáció $2A'_{zz}$ hiperfinom csatolási állandója csökkent (24. ábra).



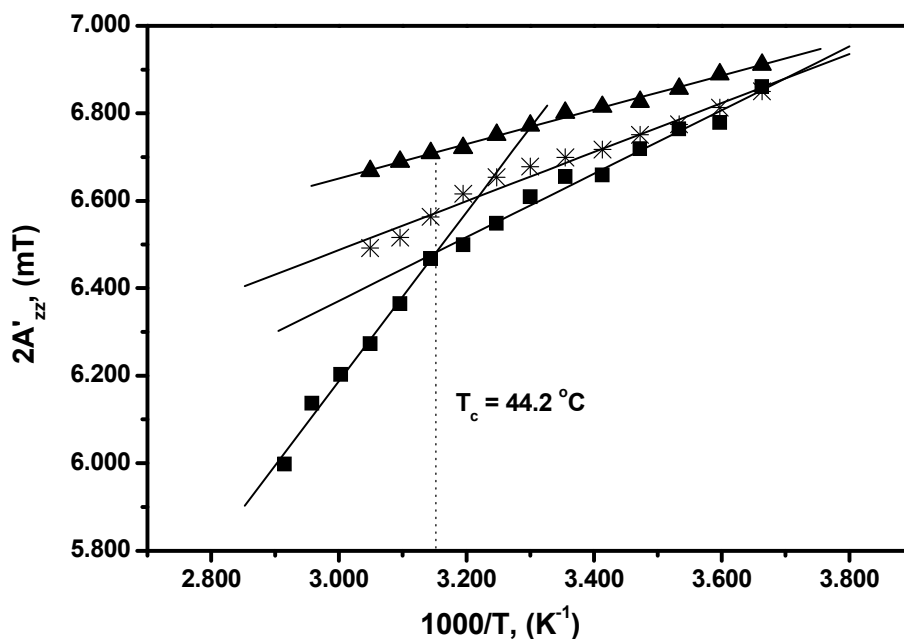
24. ábra. Az MSL-formin különböző hőmérsékleten mért konvencionális EPR spektruma. A hőmérséklet növelésével a ($2A'_{zz}$) csatolási állandó csökkent, a mobilis komponens aránya (I_{+1}/I_m) nőtt.

A csatolási állandó reciprok hőmérséklet függvényében való ábrázolásakor 40 °C körül egy töréspont figyelhető meg, ami a fehérjében bekövetkezett konformációs változásra utal (25. ábra).



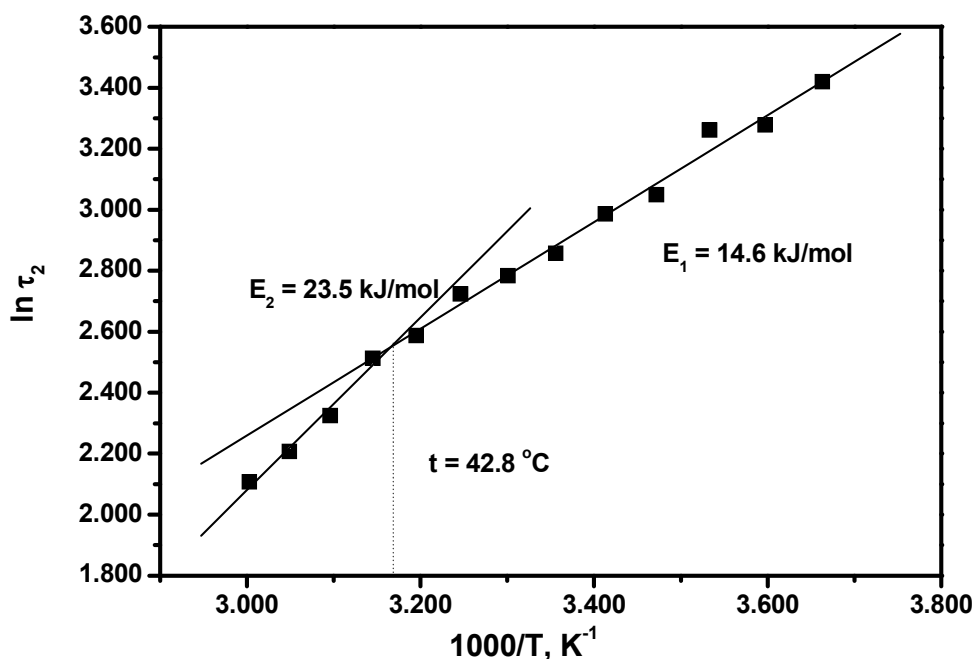
25. ábra. Az MSL-formin csatolási állandó változása a reciprok hőmérséklet függvényében. A függvényben egy töréspont figyelhető meg 40,4 °C-nál.

Az elvégzett t-teszt szerint a függvényre illesztett két egyenes meredeksége közötti különbség szignifikáns volt $P = 0,05$ valószínűségi szinten. Az F-teszt szerint szignifikánsan jobb illesztés érhető el két egyenessel, mint egyszerű lineáris illesztéssel. Az MSL-formin-aktin komplex esetében hasonló összefüggés áll fenn, és a töréspont kismértékű eltolódása figyelhető meg a magasabb hőmérsékleti tartományba (26. ábra).



26. ábra. A csatolási állandó változása a reciprok hőmérséklet függvényében MSL-formin-aktin (■) (1:5 M/M), MSL-F-aktin-formin komplex (*) (5:1 M/M) és MSL-F-aktin (▲) esetében.

Freed és munkatársai két módszert dolgoztak ki a fehérjékhez kapcsolódó nitroxid jelölők rotációs korrelációs idejének kiszámítására a lassú forgású időtartományban (Goldman et al. 1972; Mason 1974). Az egyik módszer a külső hiperfinom értékek szétválasztásán és a hozzájuk tartozó rigid limit meghatározásán alapul. A rotációs diffúzió korrelációs ideje a forgás aktiválási energiáján keresztül exponenciálisan függ a hőmérséklet reciprokától. A 27. ábra az MSL-formin-aktin komplex rotációs korrelációs idő eredményeit mutatja fél-logaritmikus ábrázolásban a reciprok hőmérséklet függvényében.

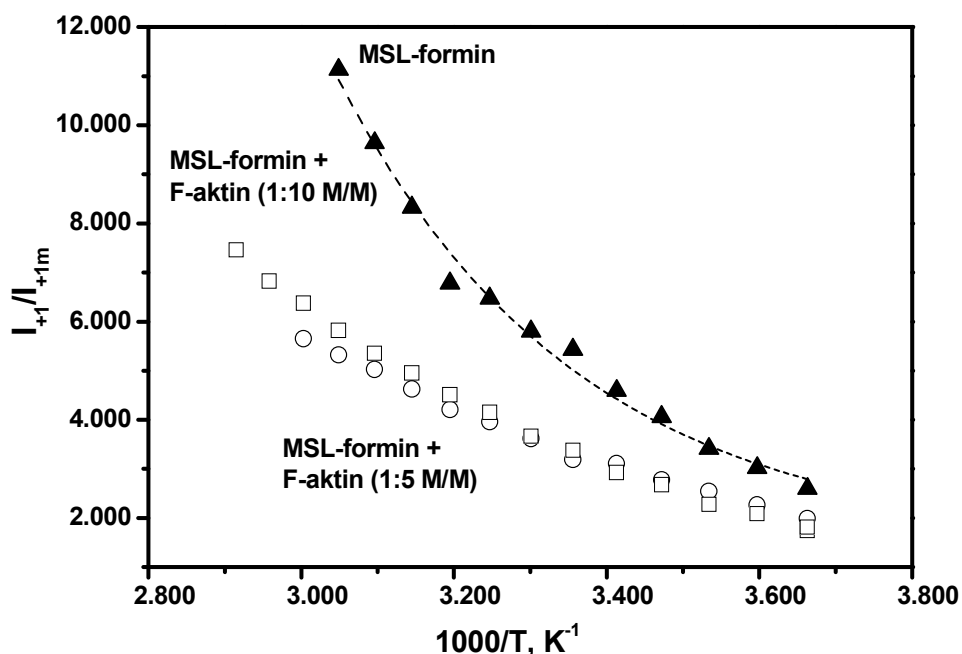


27. ábra. Az MSL-formin-aktin komplex rotációs korrelációs idő eredményei a reciprok hőmérséklet függvényében.

A rotációs korrelációs időt a Goldman, Bruno és Freed (Goldman et al. 1972) által javasolt összefüggés alapján határoztuk meg, $2A_{zz}^r = 7,104$ mT rigid limit értéket használva. Ezt az értéket MSL-F-aktin-formin komplexen mértük 40% w/w cukor oldatban -20 °C-on. A hőmérsékletfüggő mérések eredményei alapján egy töréspont azonosítható $42,8$ °C körül. Az aktiválási energiák ezek szerint a töréspont előtt, illetve után különböztek egymástól; a számított aktivációs energia $23,5$ kJ/mol, illetve $14,6$ kJ/mol volt (27. ábra). A konformációs változás átmeneti hőmérséklete függetlennek bizonyult attól, hogy a mérést önmagában a forminon, vagy aktinnal alkotott komplexén végeztük. Ez a megfigyelés arra utal, hogy a paramágneses jelölő környezetében nem lép fel jelentős konformációváltozás az aktinnal való kölcsönhatás eredményeként. Ez azonban nem zárja ki azt a lehetőséget, hogy a formin–aktin kölcsönhatás során olyan konformációváltozás lép fel, ami a forminnak csak kisebb-nagyobb szegmensére terjed ki. Erre utalt a spinjelölt formin EPR spektrumainak hőmérsékletfüggése az aktinnal való kölcsönhatásában.

Az előző probléma vizsgálatára a következő kísérletekben az MSL-jelölt formin és aktinnal alkotott komplexe EPR spektrumának további kiértékelését végeztük el.

Ennek során meghatároztuk az I_{+1}/I_m hányadost, ahol I_m az alacsony térerőhöz tartozó csúcs magassága, I_{+1} pedig a gyengén immobilizálódott jelölőtől származó jel csúcs-csúcs magassága (24. ábra). A 28. ábra a I_{+1}/I_m arány hőmérsékleti függvényét mutatja.



28. ábra. Az I_{+1}/I_m arány hőmérsékleti függvénye MSL-formin (▲) és 1:10 (□), illetve 1:5 (○) arányú MSL-formin-aktin komplexek esetében.

Az I_{+1}/I_m arányt ábrázolva a reciprok abszolút hőmérséklet függvényében közel exponenciális összefüggést kaptunk. Ellentétben a molekula egészének mozgását tükröző maximális felhasadás hőmérséklet lefutásával, ezek a görbék nem mutattak töréspontot. Ugyanakkor aktin jelenlétében az exponenciális függvény lecsengési állandója szignifikánsan kisebb, azaz a formin aktin kölcsönhatás befolyásolja a mobilis/immobilis populációk arányát. További kísérleteink azt mutatták, hogy a lecsengési állandó értéke kismértékben függ az aktin-formin aránytól.

A mért EPR spektrumok alapján az MSL-formin és aktinnal alkotott komplexének spektrumi mobilis és immobilis komponensekből állnak. A komponensek relatív aránya függ a hőmérséklettől. Számítástechnikai módszerek segítségével kiszámítható a két komponens kétszeres integráljának aránya, azaz a komponensek relatív járuléka az $m = +1$ EPR átmenetnél, a hőmérséklet függvényében. A_{im} jelöli az erősen immobilizálódott jelölőhöz tartozó alacsony térejeű spektrumrész

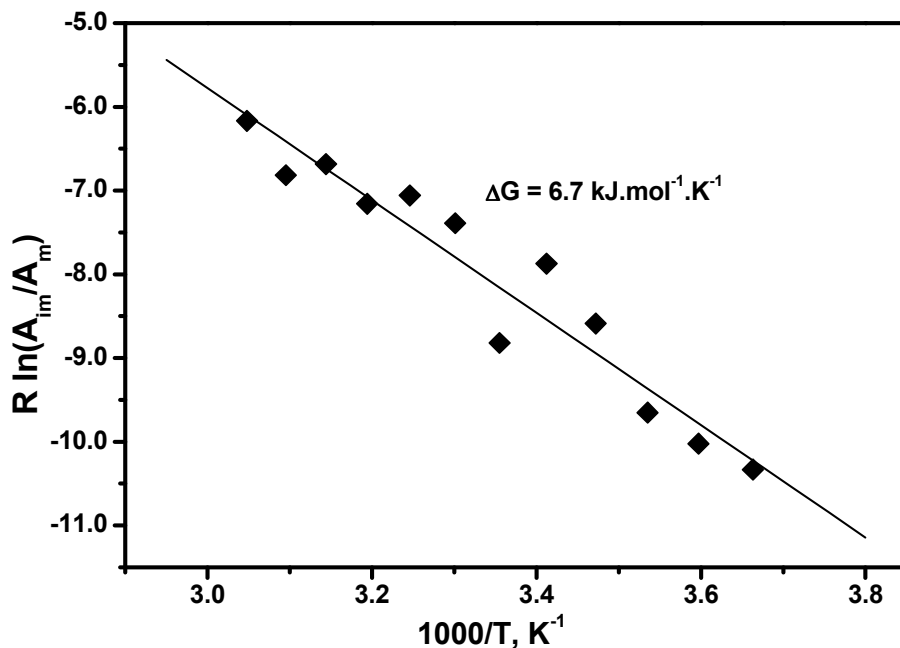
kétszeres integrálját, míg A_m a gyengén immobilizálódott jelölőktől származó jel első komponensének kétszeres integrálja. A teljes spektrum kétszeres integrálja állandó volt a kísérletes hiba határain belül a minta felfűtése során. Az A_{im}/A_m arány – ami megegyezik az adott hőmérsékleten meghatározható egyensúlyi állandóval (K) – exponenciális összefüggést mutat az abszolút hőmérséklet reciprokának függvényében. Az alapvető termodinamikai összefüggések alapján a szabadentalpia változása (ΔG) arányos az egyensúlyi állandó (K) logaritmusával:

$$\Delta G = -RT \ln K$$

vagy az egyenlet átrendezésével látható, hogy az

$$R \ln K = -\frac{\Delta G}{T}$$

összefüggés alapján az abszolút hőmérséklet reciprokában ábrázolt egyensúlyi állandók (van't Hoff ábrázolás) segítségével a reakció szabadentalpiája egyenlő az egyenes meredekségével (29. ábra).

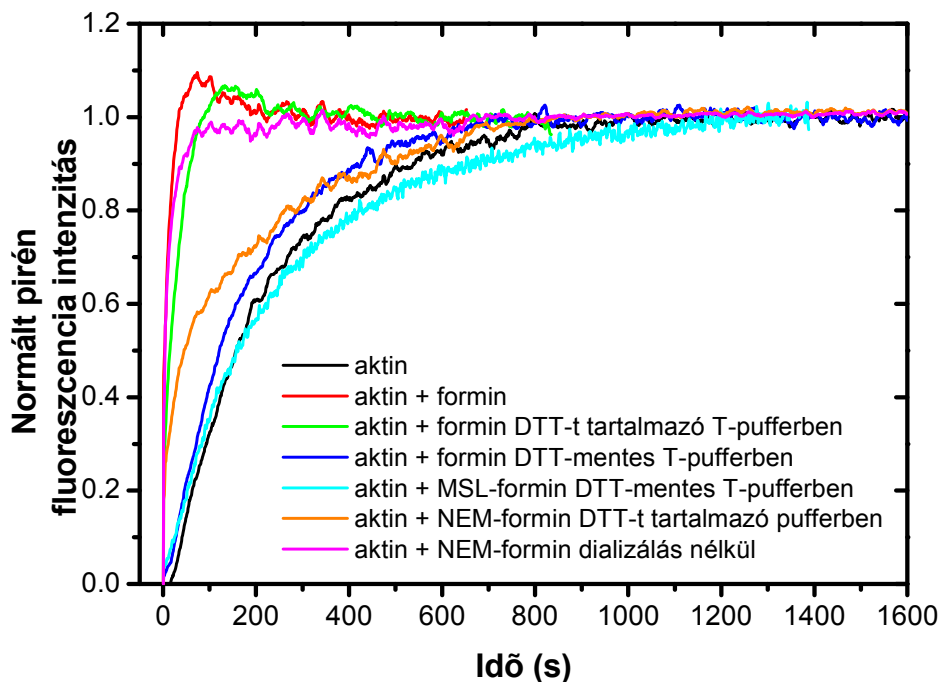


29. ábra: Az A_{im}/A_m arány van't Hoff ábrázolása az abszolút hőmérséklet reciprokának függvényében. Az egyenes meredeksége megadja a szabadenergia változást: $\Delta G = 6,7 \text{ kJ/mol}$.

Az egyenes meredekségéből meghatározott szabadenergia változás (ΔG) esetünkben 6,7 kJ/mol volt $T_m = 20$ °C-on. A $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ összefüggést használva kiszámítható az entalpia és az entrópia változása is; $\Delta H = 55$ kJ/mol és $\Delta S = 0,16$ kJ/mol·K, a T_m -nek megfelelő hőmérsékleten. A van't Hoff ábrázolás alapján, ebben a hőmérséklet tartományban a reakció szabadentalpia változása állandónak tekinthető, ami az aktinnak és a forminnak a kölcsönhatási folyamatában az immobilis↔mobilis átalakulását jellemzi.

4.1.1.9 A spinjelölés hatása a formin FH2 funkcióira

Spinjelölés előtt az FH2 formin fehérjét DTT-mentes T-pufferben dializáltuk, mivel a DTT redukálta volna a spinjelölőt, ezáltal lehetetlenné téve a jelölt fehérje EPR-es vizsgálatát. A jelölési folyamat hatását a formin FH2 nukleációs képességére fluoreszcencia spektroszkópia segítségével időfüggő polimerizációs teszttel vizsgáltuk. A teszt során az aktin polimerizációt 5 μ M, 5%-ban pirénjelölt aktin jelenlétében követtük nyomon, spinjelölt vagy nem spinjelölt formin FH2 domén jelenlétében. A fluoreszcenciásan (pirén) jelölt és a jelöletlen aktin monomerek polimerizációs kinetikája egyforma, a pirén fluoreszcencia emissziója pedig növekszik a polimerizáció során (Lin and Dowben 1982; Tobacman and Korn 1983). Az időfüggő fluoreszcencia spektroszkópiás mérések szerint (30. ábra) a spinjelölt formin nem volt képes szignifikánsan gyorsítani az aktin polimerizáció mértékét, míg a nem spinjelölt formin jelenlétében a polimerizáció sebessége nőtt (30. ábra). A nem jelölt, de DTT-mentes pufferben dializált formin jelenlétében sem nőtt az aktin polimerizáció mértéke, ugyanakkor a DTT-t tartalmazó pufferben való dializálás nem befolyásolta a formin nukleációs képességét.



30. ábra. Az aktin polimerizációja formin FH2 jelenlétében: jelöletlen és MSL-formin, dializált formin különböző pufferekben.

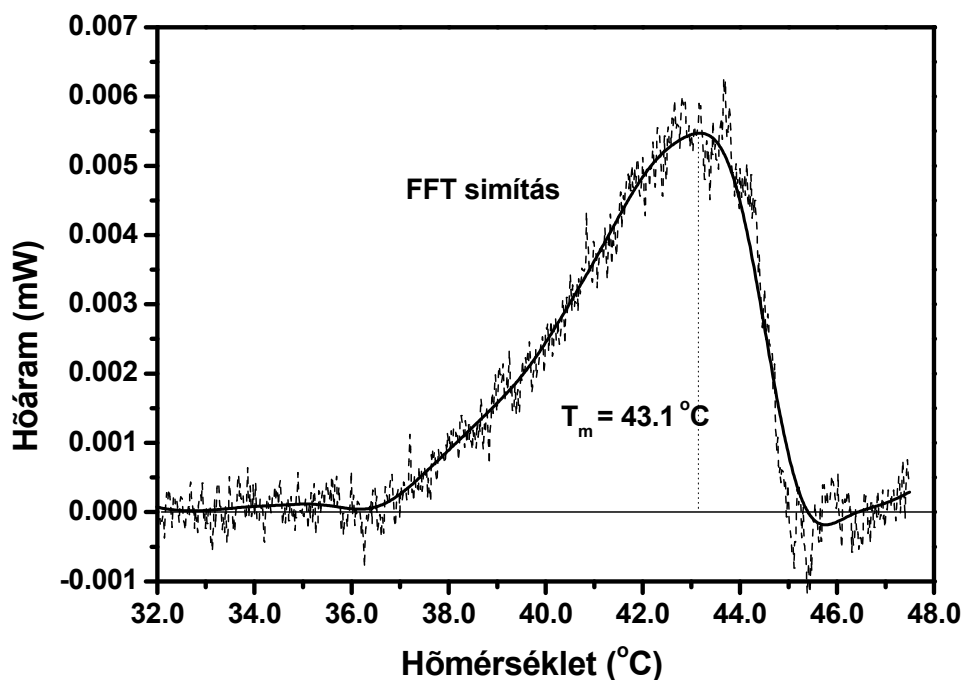
Kontroll kísérletként ellenőriztük a dializálás jelölt forminra gyakorolt hatását, különböző összetételű pufferek jelenlétében. MSL jelölő helyett N-etilmaleinimidet (NEM), az MSL nem paramágneses analógját használtuk annak érdekében, hogy ellenőrizzük az FH2 formin nukleációs képességét DTT-mentes és DTT-t tartalmazó környezetben. Az NEM az MSL-lel azonos módon, azonos Cys oldalláncokhoz képes kapcsolódni az FH2 forminon. A DTT-t tartalmazó pufferben dializált, NEM-mel reagáltatott formin képes az aktin polimerizáció gyorsítására, hasonlóan a jelöletlen, illetve a DTT mellett dializált forminhoz. Ezen eredmények alátámasztják azt, hogy az FH2 domén reakciója SH-csoporthoz kapcsolódó, kisméretű jelölő molekulákkal nem gátolja a formin aktinra gyakorolt nukleációs képességét. A DTT-mentes dialízis a jelölési folyamat során nem befolyásolja a spinjelölő kapcsolódását az FH2 doménhez, de jelentősen csökkenti a fehérje nukleációs aktivitását aktinon. A DTT-mentes pufferben történt dializálás után a formin denaturációja nem volt megfigyelhető.

A következő kontroll vizsgálat során G-aktin SH-csoportját blokkoltuk NEM-mel, majd hozzáadtuk a formin DTT-t nem tartalmazó jelölő pufferéhez, melyben a

szabad MSL-molekulák feleslegben voltak, ezután pedig 400000g-n lecentrifugáltuk. A pellet és a felülúszó EPR-es vizsgálata során a szabad MSL jelölő kis hányadát lehetett kimutatni a felülúszóban, míg a jelölt formin immobilizálódva, az időközben polimerizálódott aktinnal együtt, a pelletben volt kimutatható. Ezen eredmények szerint a paramágneses jelölés alkalmas módszer a formin dinamikájának és a formin-aktin kölcsönhatásnak a vizsgálatára, azzal a megkötéssel, hogy a DTT-mentes közegben történő jelölés csökkenti az FH2 domén aktin nukleációs képességét, de az aktin polimerizációját nem gátolja meg.

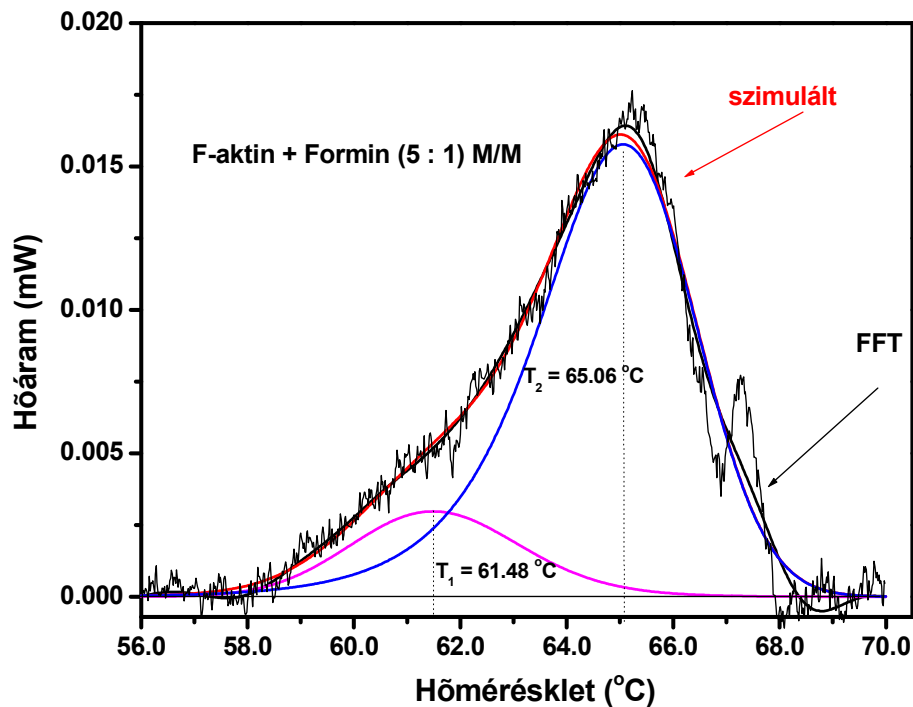
4.1.2 DSC mérések

A formin (FH2) és a formin-aktin komplexek DSC átmenete kalorimetrikusan irreverzibilis volt. A 31. ábra a formin (96 μM) DSC átmenetét mutatja. Az olvadási hőmérséklet $T_m = 43,1\text{ }^\circ\text{C}$ volt. Az átmenet termodinamikai paraméterei a következők voltak: a kalorimetrikus entalpiaváltozás: $\Delta H = 104\text{ kJ/mol}$, az entrópia változás: $\Delta S = 0,33\text{ kJ/molK}$ a T_m -nek megfelelő hőmérsékleten, és a Gibbs-féle szabadenergia változás: $\Delta G = 7,7\text{ kJ/mol}$; $t = 20\text{ }^\circ\text{C}$ -on. A PeakFit 4.0 program (Jandel Scientific) segítségével a termikus átmenet többlet hőkapacitása ($C_{p,ex}$) jól illeszthető volt egy exponenciálisan módosított Gauss-görbével (EMG függvény). A függvény maximuma $T_m = 43,19\text{ }^\circ\text{C}$ -nál volt, félérték szélessége pedig $dW = 4,95\text{ }^\circ\text{C}$ -nek adódott. A DSC mérés során felvett termogramokat a Conejero-Lara és munkatársai által kidolgozott módszer szerint összehasonlítottuk a szimulált görbékkel, a számított többlet hőkapacitás alapján (Conejero-Lara et al. 1991a). A szimulált hőmérsékleti görbék megfelelő paraméterei – olvadási hőmérséklet, félértékszélesség – jól közelítették a mért átmeneteket, figyelembe véve a kísérleteinkben elérhető jel/zaj arány mértékét.



31. ábra. A formin FH2 kalorimetrikus átmenete: a tapasztalati és a Fourier-transzformált (FFT) görbe. A formin olvadási hőmérséklete $T_m = 43,1\text{ °C}$ volt.

A formin FH2 domén F-aktinhoz való hozzáadása befolyásolta a fehérje komplex átmeneti hőmérsékletét (32. ábra). Összehasonlítva a formint tartalmazó és a formint nem tartalmazó F-aktin minták DSC görbéit, méréseink azt mutatják, hogy formin-aktin komplexen mért átmeneti hőmérséklet csökkenése $1,5\text{--}2\text{ °C}$ volt a formin-mentes aktin mintákhoz képest. Ezek az eredményeink megfeleltek a korábbi megfigyeléseknek (Bugyi et al. 2006), melyek szerint a formin aktin filamentumokhoz való kapcsolódása csökkenti az aktin termodinamikai stabilitását. A görbe félértékszélessége változatlan maradt, $dW \sim 3,2\text{ °C}$. A formin-F-aktin mólarány változtatásával a komplex átmeneti hőmérséklete változott. Amennyiben az aktin:formin mólarány $3 : 1$ volt, a mért $T_m = 66,5\text{ °C}$; $5 : 1$ arányánál $T_m = 65,1\text{ °C}$; $10 : 1$ arányánál pedig az érték megközelítette a formin mentes F-aktin átmeneti hőmérsékletét, $T_m = 68,2\text{ °C}$ -ot. Az aktin-formin komplex DSC görbéjének alakja arra utal, hogy az átmenet nem egy egyszerű kétállapotú folyamat, valószínűleg több kölcsönható domén egymást követő és/vagy összehangolt kitekeredését foglalja magába.



32. ábra. A formin-aktin komplex (5:1 M/M) hőátmeneti görbe dekompozíciója. A fekete vonal a Fourier-transzformált görbe, a piros a teljes átmenet szimulációja, a kék és bíbor a görbét alkotó két komponens részesedése a teljes átmenetből.

Az átmeneti görbék aszimmetriája kvázi-független egységek összegződéséből adódhat, ami a szerkezeti domének közötti szétcsatolódás eredménye, amit a több doménből álló fehérjében lezajló, hőmérséklet indukálta konformációs változás, vagy a fehérje komplex alegységei közötti megváltozott kölcsönhatás okoz (Bobkov et al. 2006; Brandts et al. 1989; Levitsky et al. 1992). A két átmenetről a mi esetünkben reális feltevésnek tűnik, hogy az alacsonyabb hőmérsékletnél lezajló átmenet a formin dimereknek tulajdonítható, melyeket az aktin kötés stabilizált, míg a magasabb hőmérsékletű átmenet az aktin-formin komplexnek tulajdonítható, amelyet destabilizált a formin kapcsolódása a szekunder, nem specifikus részeken.

5 Következtetések

5.1 Flexibilitás változás – polaritás változás

Munkám során elektron paramágneses rezonancia spektroszkópia és differenciál pásztázó kalorimetria alkalmazásával vizsgáltam az aktin és az mDia1 formin FH2 domén kölcsönhatását. A konvencionális és szaturáció transzfer EPR segítségével nyomon követtük az aktinnak a formin kötésekor bekövetkező lokális és globális konformációs változásokat mind az aktin, mind a formin molekulákban. Az aktin Lys-61-es aminosavának paramágneses jelölésével (FDNA-aktin) lehetővé vált a C-terminális tartomány és a 2. aktin alegység konformációjának összehasonlítása, továbbá a formin indukálta változások vizsgálata is.

Az FDNA-aktintól származó konvencionális spektrum csatolási állandója kisebb volt az MSL-aktin csatolási állandójánál, ami a 2. alegység lazább konformációjára utal. A forminnak az F-aktinhoz történő hozzáadása mindkét jelölő esetében a konvencionális spektrumokon mérhető csatolási állandó csökkenését eredményezte. A formin indukálta rotációs mobilitás növekedés 10 ns-os nagyságrendű volt mindkét jelölő alkalmazásakor, ám az MSL-aktin esetében kifejezettebb változást tapasztaltunk. Ennek oka az MSL-jelölő környezetének eleve merevebb szerkezete lehet, amelyben az aktin protomerben bekövetkező mobilitás növekedés nagyobb relatív változást hozhatott létre, mint az eleve lazább szerkezetű 2. alegységben. A rotációs korrelációs idő csökkenése mindkét jelölés esetében függött, de csak kis mértékben a formin-aktin koncentráció aránytól.

Csupán az EPR spektrumok maximális felhasadásának ($2A'_{zz}$) csökkenése alapján elvileg nem lenne kizárható, hogy az a jelölő környezetének polaritás változása miatt lép fel, amit a formin kötődése által indukált konformáció változás okoz. Ez a lehetőség azonban a gyakorlatban kevésbé valószínű, mivel a kísérleteket alacsony formin-aktin koncentráció-arányok mellett végeztük. Az 1 : 10 formin : aktin koncentráció arány mellett az EPR szondáknak csupán töredékére lehet közvetlen hatással a forminok kapcsolódása. A spektrumcsúcsok változása alapján történt értékelés szerint a formin növekvő koncentrációja a rotációs korrelációs idő csökkenését eredményezte, ami a polaritás-változás hipotézisét fenntartva éppen ellentétesen hatna. Mindezek alátámasztják azt a következtetést, hogy a forminnak az aktinhoz való

kötődése olyan konformációváltozást jelez a jelölő molekulák környezetében, ami a fehérje mátrix flexibilitás-változásából eredő mobilitás növekedését tükrözi.

A mDia1-FH2 képes kötődni az aktin filamentumok oldalához is, ám ennek a kötődésnek az affinitása gyenge ($\sim 3 \mu\text{M}$ (Bugyi et al. 2006)). Az aktin szöges végéhez jóval nagyobb affinitással kötődnek a forminok (20–50 nM, (Li and Higgs 2003; Romero et al. 2004)). A szöges végek koncentrációja a kísérletekben néhány nM volt, ami megfelelő feltételeket jelent eme kötőhelyek telítetéséhez. Figyelembe véve az alacsony formin-aktin koncentráció arányt, továbbá a mobilizáló hatás formin koncentráció függését, kizárhatjuk, hogy a formin a filamentumok oldalához kötődve idézte elő a megfigyelt hatást. Arra a következtetésre jutottunk tehát, hogy a formin az aktin filamentumok szöges végéhez kötődve allosztérikus konformáció változásokon keresztül módosította a filamentumon belül levő protomerek konformációját.

Az EPR spektrumokból kiszámítottuk, hogy a rövidebb rotációs korrelációs időt tipikusan az aktin protomereknek csak körülbelül 4–5, de maximum 10%-a adta. Amennyiben feltételezzük, hogy a jelölt protomerek a filamentumon belül egyenletes eloszlást mutatnak, és megközelítőleg 2000 protomerből épül fel egy, átlagosan 4,2–5 μm hosszú aktin filamentum, akkor 80–100 protomert érint a formin szöges véghez való kötődésekor fellépő konformációs változás. Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy a formin kapcsolódása az aktin szöges végéhez a filamentumban nagyobb távolságra kiterjedő változásokat idéz elő, ami a protomerek közötti allosztérikus kölcsönhatás jelenlétére utal. Eredményeink jó egyezést mutatnak a korábban közölt fluoreszcenciás mérésekkel, amelyek a formin hatására az aktin protomerek flexibilitásának növekedését mutatták (Bugyi et al. 2006; Papp et al. 2006).

A hőmérsékletfüggő EPR mérések szerint az MSL-aktin és F-aktin-formin komplex hiperfinom csatolási állandója lineáris összefüggést mutatott a reciprok abszolút hőmérséklettel. Az összefüggést jellemző egyenesek regressziós együtthatója szignifikánsan különbözött $P = 0,05$ szignifikancia szinten, ami az aktin C-terminálisán létrejövő, formin indukálta konformációs változásra utal. Az aktin-formin komplex hiperfinom csatolási állandója a teljes 0–60 °C-os tartományban kisebb volt az F-aktinnál mért értékeknél, továbbá a komplex aktivációs energiája is alacsonyabb volt, mint az MSL-aktiné. Ezek az eredmények alátámasztják a már korábban közölt kalorimetriás megfigyeléseket, melyek szerint a formin hatására csökken az aktin filamentumok denaturációs hőmérséklete (Bugyi et al. 2006).

5.2 A konvencionális és ST–EPR összehasonlítása

Az irodalmi hivatkozásokban mind a konvencionális, mind az ST–EPR spektrumok kiértékelésekor abból a feltevésből indulnak ki, hogy a vizsgált molekula izotróp rotációs diffúziót végez. A lassú forgás tartományára érvényes, a konvencionális méréstechnikának megfelelő nomogramok is csak ezt az esetet ábrázolják. Ezek speciális feltételeket tartalmaznak, amik a legtöbb nem filamentális fehérjére jó közelítéssel alkalmazhatók. Az általunk végzett spektrum szimulációk ugyanakkor arra engednek következtetni, hogy ez a közelítés még a G-aktin esetén sem teljességgel helytálló. A rotációs diffúzió leírására még ebben az esetben is legalább a molekula tengelyével párhuzamos, illetve arra merőlegesen végzett forgás diffúziós értéke szükséges. Munkám során csak a Lys-61-en spinjelölt aktin esetén végeztem részletes spektrum-szimulációkat, annak értelmezésére, hogy a tapasztalt két, kevésbé mobilis spektrális komponens milyen járulékokkal részesül a teljes spektrumban. Így a konvencionális EPR spektrumok kiértékelésekor azt az állítást fogadtuk el, hogy a tapasztalt változások az aktin-formin kölcsönhatást bizonyítják, és elképzelhető, hogy azok az aktin protomerek, vagy azok szegmentjeinek forgásában a korrelációs idő csökkenéséhez vezetnek. Hasonló problémák merülnek fel az ST–EPR spektrumok kiértékelésekor. Az elméleti levezetések, illetve a kísérleti eredmények jelentős része globuláris, szferikus fehérjékre vonatkoznak. Az irodalomban elérhető nomogramok spinjelölt hemoglobinnal molekulákra vonatkozó mérési eredményeken alapszik (Esmann et al. 1992; Horváth et al. 1993; Thomas et al. 1976; Thomas et al. 1975a; Thomas et al. 1975b), és az anizotróp molekuláris forgásokat csak, mint ekvivalens gömbi forgásként kezelik. A két eltérő időskálán detektált mozgások ugyanakkor különböző eredetűek lehetnek (Esmann et al. 1992). A konvencionális spektrumok (azok időskálája) érzékenyebbek a helyi, szegmentális mozgásokra, míg az igen lassú tartományban mért ST–EPR spektrumok a filamentumok egészére vonatkozó mikroszekundumos mozgásokra érzékenyebbek, amelyek a filamentumok torziós és billegő mozgását tükrözik. Az anizotróp rotációs diffúzióra utal az is, hogy az aktin filamentumokon mért ST–EPR spektrális (L és C) paraméterek alapján meghatározható rotációs korrelációs idők, szükségszerűen eltérnek egymástól, az ekvivalens gömbi közelítés miatt. A konvencionális illetve az ST–EPR technikákkal kapott eredmények a fentiek alapján különböző eredetű mozgásformákat tükröznek, amivel a látszólagos ellentmondás feloldható.

5.3 Az aktin–formin kölcsönhatás

További munkánk során a formin FH2 domén paramágneses jelölésével lehetőség nyílt az aktin-formin kölcsönhatás forminra gyakorolt hatásának vizsgálatára. Az MSL-formintól származó, szobahőmérsékleten mért, összetett konvencionális EPR spektrumból két hiperfinom csatolási állandó értéket tudtunk meghatározni, amelyekből 25,0 ns-os és 3,5 ns-os rotációs korrelációs időket számoltunk. Az erősen immobilizálódott jelölő populáció aránya körülbelül 60% volt. Az FH2 formin molekulatömegét és a monomer félhold alakját figyelembe véve arra következtettünk, hogy a hosszabb korrelációs idő a formin FH2 monomer mozgását jellemzi. Ez a megfigyelés a monomerek közötti mozgékony, flexibilis összeköttetésre utal, ami fontos szerepet játszhat a formin-aktin kölcsönhatásban. A formin dimerek processzív módon képesek együtt mozogni az aktin filamentumok növekvő pozitív végével (Moseley et al. 2004; Zigmond 2004). Ez a mechanizmus a forminnak a filamentumhoz való folyamatos kapcsolódását, és az újabb aktin monomerek filamentumba való beépülését is lehetővé teszi. Ennek megfelelően a formin monomerek közötti flexibilis kapcsolat kulcsfontosságú lehet a formin processzív sapkaféhérjeként való működésében (Xu et al. 2005).

A forminon végzett hőmérsékletfüggő EPR mérések szerint a hiperfinom csatolási állandó csökkent, a mobilis komponens aránya nőtt a hőmérséklet növelésével. A csatolási állandók hőmérsékletfüggése egy konformációs változásra utal 41 °C körül. A 41 °C alatt és fölött mért csatolási állandók közötti különbség kicsi volt, azaz a jelölők rotációs mobilitása ezen a hőmérsékleten csak kis mértékben változott. Ennek magyarázata a jelölő környezetének eleve flexibilis szerkezete. Így a forminnak a hőmérséklet által kiváltott denaturációja kevésbé befolyásolta a jelölő mobilitását. A formin szerkezetének fellazulása az átmeneti hőmérséklet fölötti tartomány aktivációs energia csökkenésében is megmutatkozott.

F-aktin MSL-forminhoz való hozzáadása a csatolási állandó növekedését eredményezte a teljes hőmérsékleti tartományban, ami a formin szerkezetének rigidebbé válására utal. A csatolási állandó hőmérsékleti függvénye az MSL-formin-aktin komplex esetében 44,2 °C-nál mutatott hődenaturációra utaló töréspontot, ami az aktin forminra gyakorolt stabilizáló hatását támasztja alá.

A formin FH2 doménnek és aktinnal alkotott komplexének termodinamikai jellemzését kalorimetriás vizsgálatokkal egészítettük ki. A formin FH2 domén átmeneti

hőmérséklete 43,1 °C volt. Az aktin-formin komplex átmeneti hőmérséklete megközelítette az F-aktinra jellemző értéket, de annál körülbelül 2,0 °C-al alacsonyabb volt, ami a korábban közölt DSC eredményekkel jó egyezést mutatott (Bugyi et al. 2006). A különböző aktin-formin koncentráció arányú minták esetében a forminra jellemző denaturációs átmenet nem volt kimutatható. Ennek oka egyrészt a formin alacsony koncentrációja lehetett a vizsgált mintákban, másrészt az aktin forminra gyakorolt stabilizáló hatása is előidézhette az átmeneti hőmérséklet eltolódását 60 °C fölé. A DSC eredményekből számított termodinamikai paraméterek kis mértékben eltérnek a hőmérsékletfüggő EPR eredményektől. Ennek oka a két módszer érzékenységének különbsége abban a tekintetben, hogy a konvencionális EPR a spinjelölt aminosav környezetének szegmentális mozgását tükrözi, míg a DSC átmenetek a teljes fehérje, vagy fehérje komplex termodinamikai változásait jellemzik. A két módszer alkalmazásával tehát mind a forminon belüli lokális, mind a teljes aktin-formin komplex globális szerkezeti és dinamikai tulajdonságai vizsgálhatók.

Mindezen megfigyeléseink rávilágítottak arra, hogy a forminokon belül a különböző környezeti faktorok és partner molekulák hatására számos konformációs állapotváltozás jelentkezik. Ezek egy összetett rendszert alkotnak. Ezen konformációs átmeneteket csak egyes esetekben tudjuk közvetlenül kapcsolni a funkcióbeli módosulásokhoz, szükségletekhez, és számos további szerkezeti módosulás szerepe még tisztázásra vár.

6 Összefoglalás

Munkám során az aktin és formin FH2 fehérjék, valamint egymással alkotott komplexük konformációs és dinamikai tulajdonságait vizsgáltam EPR spektroszkópia és DSC módszerek segítségével. Az aktin paramágneses jelölését elvégeztük a fehérje 1. és 2. alegységén, így lehetővé vált az alegységek sajátos dinamikai tulajdonságának vizsgálata. A konvencionális és ST-EPR módszerek segítségével mind az aktin filamentum, mind a monomer aktin konformációs változásait megvizsgáltuk, valamint a formin aktinhoz való kapcsolódásának hatását is leírtuk. A hőmérsékletfüggő EPR mérések segítségével részletesebb képet nyerhettünk a fehérjék kölcsönhatásáról, valamint termodinamikai sajátságairól.

Vizsgálataink során a következő megfigyeléseket tettük:

- Az aktin Lys-61-es aminosavhoz kapcsolt FDNA spin jelölő rotációs korrelációs ideje jóval hosszabb a Cys-374-es aminosavhoz kötődő MSL jelölőénél, ami arra utal, hogy a Lys-61-et tartalmazó 2-es alegység mobilisabb, mint a Cys-374 aminosav környezete.
- Az FDNA-jelölt aktin filamentumok konvencionális EPR spektrumán a magas térerejű csúcs kiszélesedése két spektrumkomponens jelenlétére utal, amelyek a jelölő két különböző konformációjú populációjától származhatnak. Ezen következtetésünket a hőmérsékletfüggő EPR mérések is alátámasztották.
- A formin FH2 domén kapcsolódásának hatására mindkét jelölő környezetében mobilitás növekedést mutattunk ki, amit a konvencionális spektrumok hiperfinom csatolási állandójának csökkenése jelzett. Az MSL-aktin esetében a mobilitás növekedés kifejezettebb volt, mint az FDNA-jelölt aktinnál. A mobilitás változás a formin-aktin aránytól kis mértékben függött.
- A szaturáció-transzfer EPR mérések szerint a formin kapcsolódásának hatására az aktin filamentumok szegmentális mozgása lassult mindkét jelölő alkalmazása esetén. Az ST-EPR paraméterek gyenge kapcsolatot mutatnak a jelölő rotációs mozgása és a formin-aktin arány között.
- Az MSL-aktinon végzett hőmérsékletfüggő EPR mérések azt mutatták, hogy a formin aktinhoz való kötődése konformációs változást idéz elő az aktin C-terminálisa közelében az 1-es alegységben, továbbá, hogy a formin által indukált hatás nem függ szorosan az aktin-formin aránytól.
- Az EPR spektrum hőmérsékletfüggése szerint a Lys-61-hez kapcsolt paramágneses molekulának két konformációja van. A két komponens eloszlása függ a hőmérséklettől.

- A konvencionális EPR eredmények a formin FH2 doménhez kapcsolt MSL jelölő gyengén és erősen immobilizálódott populációjának jelenlétére utaltak. A hőmérséklet emelkedésével a mobilisabb jelölő populáció aránya nőtt. Aktin jelenlétében a két komponens aránya kisebb mértékben változott a hőmérséklet növelésekor.
- F-aktin jelenlétében az MSL-forminon mobilitás csökkenést tapasztaltunk. Ez a hatás a fehérjék arányától függetlenül bizonyult a jelölt formin szegmens környezetében.
- A csatolási állandó hőmérsékletfüggése szerint 41 °C körül egy konformációs változás zajlott le a fehérjében. Az MSL-formin- aktin komplex esetében hasonló összefüggést tapasztaltunk, a töréspont magasabb hőmérsékleti tartományba való kismértékű eltolódása mellett.
- A spinjelölés folyamata befolyásolta a formin aktin nukleációs képességét. A jelölés során alkalmazott DTT-mentes környezet a fehérje funkcióvesztését eredményezte, miközben denaturáció nem volt megfigyelhető. A jelölt formin FH2 nem volt képes gyorsítani az aktin polimerizációját. Ugyanakkor az MSL-formin képes volt kapcsolódni az aktin filamentumokhoz.
- A DSC mérések szerint a formin termikus átmeneti hőmérséklete 43 °C-nál volt, ami jó egyezést mutat az EPR mérések során kimutatott konformációs változás hőmérsékletével.
- A különböző arányú aktin-formin komplexek átmeneti hőmérséklete 65 °C fölötti értékeket mutatott, a forminra jellemző különálló átmenetet nem lehetett kimutatni aktin jelenlétében.

7 Referenciák

- [1] Alberts AS (2001) Identification of a carboxyl-terminal diaphanous-related formin homology protein autoregulatory domain. *J Biol Chem* 276:2824-2830
- [2] Bartolini F, Gundersen GG (2010) Formins and microtubules. *Biochim Biophys Acta* 1803:164-173
- [3] Baum B, Kunda P (2005) Actin nucleation: spire - actin nucleator in a class of its own. *Curr Biol* 15:R305-308
- [4] Belagyi J (1973) Effect of denaturation on muscle proteins as studied by Epr. *Acta biochimica et biophysica; Academiae Scientiarum Hungaricae* 8:275-280
- [5] Belagyi J (1975a) Orientation dependence in the Epr spectra of spin labels in glycerinated muscle fibres. *Acta biochimica et biophysica; Academiae Scientiarum Hungaricae* 10:233-242
- [6] Belagyi J (1975b) Water structure in striated muscle by spin labelling technique. *Acta biochimica et biophysica; Academiae Scientiarum Hungaricae* 10:63-70
- [7] Belagyi J, Damerau W (1974) Effect of heat denaturation on glycerinated muscle fibers as studied by spin label Epr. *Acta biochimica et biophysica; Academiae Scientiarum Hungaricae* 9:367-370
- [8] Belagyi J, Damerau W, Pallai G (1978) Thermal stability of F-actin as studied by spin labelling. *Acta biochimica et biophysica; Academiae Scientiarum Hungaricae* 13:85-90
- [9] Belagyi J, Grof P (1983) Rotational motion of actin monomer at low and high salt concentration. *Eur J Biochem* 130:353-358
- [10] Berliner LJ (1976) Spin labeling : theory and applications. Academic Press, New York
- [11] Berliner LJ (1979) Spin labeling II : theory and applications. Academic Press, New York
- [12] Bobkov AA, Muhrad A, Pavlov DA, Kokabi K, Yilmaz A, Reisler E (2006) Cooperative effects of cofilin (ADF) on actin structure suggest allosteric mechanism of cofilin function. *J Mol Biol* 356:325-334

- [13] Brandts JF, Hu CQ, Lin LN, Mos MT (1989) A simple model for proteins with interacting domains. Applications to scanning calorimetry data. *Biochemistry* 28:8588-8596
- [14] Budil DE, Lee S, Saxena S, Freed JH (1996) Nonlinear-least-squares analysis of slow-motion EPR spectra in one and two dimensions using modified Levenberg-Marquard algorithm. *J Magn Res* 120:139-284.
- [15] Bugyi B (2006) A forminok hatása az aktin filamentumok polimerizációs tulajdonságaira és dinamikai jellemzőire Általános Orvostudományi Kar, vol PhD. Pécsi Tudományegyetem, Pécs
- [16] Bugyi B, Papp G, Hild G, Lorinczy D, Nevalainen EM, Lappalainen P, Somogyi B, Nyitrai M (2006) Formins regulate actin filament flexibility through long range allosteric interactions. *J Biol Chem* 281:10727-10736
- [17] Campellone KG, Welch MD (2010) A nucleator arms race: cellular control of actin assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:237-251
- [18] Castano E, Philimonenko VV, Kahle M, Fukalova J, Kalendova A, Yildirim S, Dzijak R, Dingova-Krasna H, Hozak P (2010) Actin complexes in the cell nucleus: new stones in an old field. *Histochem Cell Biol* 133:607-626
- [19] Castrillon DH, Wasserman SA (1994) Diaphanous is required for cytokinesis in *Drosophila* and shares domains of similarity with the products of the limb deformity gene. *Development* 120:3367-3377
- [20] Chalkia D, Nikolaidis N, Makalowski W, Klein J, Nei M (2008) Origins and evolution of the formin multigene family that is involved in the formation of actin filaments. *Mol Biol Evol* 25:2717-2733
- [21] Chereau D, Boczkowska M, Skwarek-Maruszewska A, Fujiwara I, Hayes DB, Rebowski G, Lappalainen P, Pollard TD, Dominguez R (2008) Leiomodin is an actin filament nucleator in muscle cells. *Science* 320:239-243
- [22] Chesarone MA, Goode BL (2009) Actin nucleation and elongation factors: mechanisms and interplay. *Curr Opin Cell Biol* 21:28-37
- [23] Conejero-Lara F, Mateo PL, Aviles FX, Sanchez-Ruiz JM (1991a) Effect of Zn²⁺ on the thermal denaturation of carboxypeptidase B. *Biochemistry* 30:2067-2072

- [24] Conejero-Lara F, Sanchez-Ruiz JM, Mateo PL, Burgos FJ, Vendrell J, Aviles FX (1991b) Differential scanning calorimetric study of carboxypeptidase B, procarboxypeptidase B and its globular activation domain. *Eur J Biochem* 200:663-670
- [25] Criddle AH, Geeves MA, Jeffries T (1985) The use of actin labelled with N-(1-pyrenyl)iodoacetamide to study the interaction of actin with myosin subfragments and troponin/tropomyosin. *Biochem J* 232:343-349
- [26] Dergez T (2006) Glicerinezett izomrostok vizsgálata ATP hidrolízis köztes állapotokban EPR és DSC technikával Kémiai Doktori Iskola, vol PhD. Pécsi Tudományegyetem, Pécs
- [27] Dergez T, Lorinczy D, Konczol F, Farkas N, Belagyí J (2007) Differential scanning calorimetry study of glycerinated rabbit psoas muscle fibres in intermediate state of ATP hydrolysis. *BMC structural biology* 7:41
- [28] Esmann M, Hideg K, Marsh D (1992) Conventional and saturation transfer EPR spectroscopy of Na⁺/K⁺-ATPase modified with different maleimide-nitroxide derivatives. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1159:51-59
- [29] Farkas N, Lorinczy D, Dergez T, Kilar F, Belagyí J (2004) Effect of polycyclic aromatic hydrocarbons on erythrocyte membranes by DSC and EPR. *Environmental toxicology and pharmacology* 16:163-168
- [30] Feuer G, Molnár F, Pettkó E, Straub FB (1948) Studies on the composition and polymerisation of actin. *Hung Acta Physiol* 1:150-163
- [31] Freire E, Murphy KP, Sanchez-Ruiz JM, Galisteo ML, Privalov PL (1992) The molecular basis of cooperativity in protein folding. Thermodynamic dissection of interdomain interactions in phosphoglycerate kinase. *Biochemistry* 31:250-256
- [32] Galisteo ML, Mateo PL, Sanchez-Ruiz JM (1991) Kinetic study on the irreversible thermal denaturation of yeast phosphoglycerate kinase. *Biochemistry* 30:2061-2066
- [33] Gasteier JE, Madrid R, Krautkramer E, Schroder S, Muranyi W, Benichou S, Fackler OT (2003) Activation of the Rac-binding partner FHOD1 induces actin stress fibers via a ROCK-dependent mechanism. *J Biol Chem* 278:38902-38912

- [34] Goldman AA, Bruno GV, Freed JH (1972) Estimating slow-motional rotational correlation times for nitroxides by electron spin resonance. *J Phys Chem* 76:1858-1960
- [35] Goode BL, Eck MJ (2007) Mechanism and function of formins in the control of actin assembly. *Annu Rev Biochem* 76:593-627
- [36] Grell E (1981) *Membrane spectroscopy*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York
- [37] Grzanka A, Grzanka D, Orlikowska M (2004) Fluorescence and ultrastructural localization of actin distribution patterns in the nucleus of HL-60 and K-562 cell lines treated with cytostatic drugs. *Oncol Rep* 11:765-770
- [38] Harris ES, Higgs HN (2006) Biochemical analysis of mammalian formin effects on actin dynamics. *Methods Enzymol* 406:190-214
- [39] Harris ES, Li F, Higgs HN (2004) The mouse formin, FRLalpha, slows actin filament barbed end elongation, competes with capping protein, accelerates polymerization from monomers, and severs filaments. *J Biol Chem* 279:20076-20087
- [40] Hartvig N, Lorinczy D, Farkas N, Belagyi J (2002) Effect of adenosine 5'-[beta,gamma-imido]triphosphate on myosin head domain movements. *Eur J Biochem* 269:2168-2177
- [41] Higashi S, Oosawa F (1965) Conformational changes associated with polymerization and nucleotide binding in actin molecules. *J Mol Biol* 12:843-865
- [42] Higgs HN (2005) Formin proteins: a domain-based approach. *Trends Biochem Sci* 30:342-353
- [43] Higgs HN, Peterson KJ (2005) Phylogenetic analysis of the formin homology 2 domain. *Mol Biol Cell* 16:1-13
- [44] Hild G, Kalmar L, Kardos R, Nyitrai M, Bugyi B (2014) The other side of the coin: Functional and structural versatility of ADF/cofilins. *European journal of cell biology*
- [45] Hild G, Nyitrai M, Gharavi R, Somogyi B, Belagyi J (1996) Fluorescence quenching of the tryptophan emission from the F- and G-forms of actin. *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology* 35:175-179

- [46] Hild G, Nyitrai M, Somogyi B (2002) Intermonomer flexibility of Ca- and Mg-actin filaments at different pH values. *Eur J Biochem* 269:842-849
- [47] Horváth L, Brophy PJ, Marsh D (1993) Spin label saturation transfer EPR determinations of the stoichiometry and selectivity of lipid—protein interactions in the gel phase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1147:277-280
- [48] Houk TW, Jr., Ue K (1974) The measurement of actin concentration in solution: a comparison of methods. *Anal Biochem* 62:66-74
- [49] Huxley AF, Niedergerke R (1954) Structural changes in muscle during contraction; interference microscopy of living muscle fibres. *Nature* 173:971-973
- [50] Huxley H, Hanson J (1954) Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. *Nature* 173:973-976
- [51] Ingouff M, Fitz Gerald JN, Guerin C, Robert H, Sorensen MB, Van Damme D, Geelen D, Blanchoin L, Berger F (2005) Plant formin AtFH5 is an evolutionarily conserved actin nucleator involved in cytokinesis. *Nat Cell Biol* 7:374-380
- [52] Jewett TJ, Fischer ER, Mead DJ, Hackstadt T (2006) Chlamydial TARP is a bacterial nucleator of actin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:15599-15604
- [53] Jones RH, Molitoris BA (1984) A statistical method for determining the breakpoint of two lines. *Anal Biochem* 141:287-290
- [54] Kabsch W, Mannherz HG, Suck D, Pai EF, Holmes KC (1990) Atomic structure of the actin:DNase I complex. *Nature* 347:37-44
- [55] Kinosian HJ, Selden LA, Estes JE, Gershman LC (1991) Thermodynamics of actin polymerization; influence of the tightly bound divalent cation and nucleotide. *Biochim Biophys Acta* 1077:151-158
- [56] Kivelson D (1960) Theory of ESR Linewidths of Free Radicals. *The Journal of chemical physics* 33:1094
- [57] Kobiela A, Pasolli HA, Fuchs E (2004) Mammalian formin-1 participates in adherens junctions and polymerization of linear actin cables. *Nat Cell Biol* 6:21-30

- [58] Konczol F, Lorinczy D, Belagyi J (1998) Effect of oxygen free radicals on myosin in muscle fibres. *FEBS Lett* 427:341-344
- [59] Kouyama T, Mihashi K (1981) 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* 114:33-38
- [60] Kovar DR (2006) Molecular details of formin-mediated actin assembly. *Curr Opin Cell Biol* 18:11-17
- [61] Kuhn JR, Pollard TD (2005) Real-time measurements of actin filament polymerization by total internal reflection fluorescence microscopy. *Biophys J* 88:1387-1402
- [62] Kursula P, Kursula I, Massimi M, Song YH, Downer J, Stanley WA, Witke W, Wilmanns M (2008) High-resolution structural analysis of mammalian profilin 2a complex formation with two physiological ligands: the formin homology 1 domain of mDia1 and the proline-rich domain of VASP. *J Mol Biol* 375:270-290
- [63] Levitsky DI, Shnyrov VL, Khvorov NV, Bukatina AE, Vedenkina NS, Permyakov EA, Nikolaeva OP, Poglazov BF (1992) Effects of nucleotide binding on thermal transitions and domain structure of myosin subfragment 1. *Eur J Biochem* 209:829-835
- [64] Li F, Higgs HN (2003) The mouse Formin mDia1 is a potent actin nucleation factor regulated by autoinhibition. *Curr Biol* 13:1335-1340
- [65] Li F, Higgs HN (2005) Dissecting requirements for auto-inhibition of actin nucleation by the formin, mDia1. *J Biol Chem* 280:6986-6992
- [66] Lin TI, Dowben RM (1982) Fluorescence spectroscopic studies of pyrene-actin adducts. *Biophysical Chemistry* 15:289-298
- [67] Liverman AD, Cheng HC, Trosky JE, Leung DW, Yarbrough ML, Burdette DL, Rosen MK, Orth K (2007) Arp2/3-independent assembly of actin by *Vibrio* type III effector VopL. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:17117-17122
- [68] Lorinczy D, Belagyi J (1995) Effects of nucleotide on skeletal muscle myosin unfolding in myofibrils by DSC. *Biochemical and biophysical research communications* 217:592-598

- [69] Lorinczy D, Hartvig N, Belagyi J (2002) Analysis of nucleotide myosin complexes in skeletal muscle fibres by DSC and EPR. *Journal of biochemical and biophysical methods* 53:75-87
- [70] Lőrinczy D (2004) *The Nature of Biological Systems as Revealed by Thermal Methods*. Kluwer Academic Publishers, Dordbrecht/Boston/London
- [71] Lumry RaE, H. (1954) Conformation changes of proteins. *J Phys Chem* 58:110–120
- [72] Madrid R, Gasteier JE, Bouchet J, Schroder S, Geyer M, Benichou S, Fackler OT (2005) Oligomerization of the diaphanous-related formin FHOD1 requires a coiled-coil motif critical for its cytoskeletal and transcriptional activities. *FEBS Lett* 579:441-448
- [73] Maiti S, Michelot A, Gould C, Blanchoin L, Sokolova O, Goode BL (2012) Structure and activity of full-length formin mDia1. *Cytoskeleton (Hoboken)* 69:393-405
- [74] Mason RP, Freed, J. H. (1974) Estimating microsecond rotational correlation times from lifetime broadening of nitroxide electron spin resonance spectra near the rigid limit. *J Phys Chem* 78:1321-1323
- [75] Meirovitch E, Nayeem A, Freed JH (1984) Analysis of protein-lipid interaction based on model simulation of electron spin resonance spectra. *J Phys Chem* 88:3454-3465.
- [76] Moore PB, Huxley HE, DeRosier DJ (1970) Three-dimensional reconstruction of F-actin, thin filaments and decorated thin filaments. *J Mol Biol* 50:279-295
- [77] Moseley JB, Sagot I, Manning AL, Xu Y, Eck MJ, Pellman D, Goode BL (2004) A conserved mechanism for Bni1- and mDia1-induced actin assembly and dual regulation of Bni1 by Bud6 and profilin. *Mol Biol Cell* 15:896-907
- [78] Nakano K, Takaishi K, Kodama A, Mammoto A, Shiozaki H, Monden M, Takai Y (1999) Distinct actions and cooperative roles of ROCK and mDia in Rho small G protein-induced reorganization of the actin cytoskeleton in Madin-Darby canine kidney cells. *Mol Biol Cell* 10:2481-2491

- [79] Nyitrai M, Hild G, Belagyi J, Somogyi B (1997) Spectroscopic study of conformational changes in subdomain 1 of G-actin: influence of divalent cations. *Biophys J* 73:2023-2032
- [80] Orban J, Lorinczy D, Nyitrai M, Hild G (2008) Nucleotide dependent differences between the alpha-skeletal and alpha-cardiac actin isoforms. *Biochemical and biophysical research communications* 368:696-702
- [81] P. F. Knowles DM, H. W. E. Rattle (1976) *Magnetic resonance of biomolecules*. Wiley Interscience
- [82] Palazzo AF, Cook TA, Alberts AS, Gundersen GG (2001) mDia mediates Rho-regulated formation and orientation of stable microtubules. *Nat Cell Biol* 3:723-729
- [83] Papp G, Bugyi B, Ujfalusi Z, Barko S, Hild G, Somogyi B, Nyitrai M (2006) Conformational changes in actin filaments induced by formin binding to the barbed end. *Biophys J* 91:2564-2572
- [84] Paul AS, Pollard TD (2009) Review of the mechanism of processive actin filament elongation by formins. *Cell Motil Cytoskeleton* 66:606-617
- [85] Pollard TD (2007) Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 36:451-477
- [86] Pollard TD, Cooper JA (2009) Actin, a central player in cell shape and movement. *Science* 326:1208-1212
- [87] Pring M, Evangelista M, Boone C, Yang C, Zigmond SH (2003) Mechanism of formin-induced nucleation of actin filaments. *Biochemistry* 42:486-496
- [88] Pruyne D, Evangelista M, Yang C, Bi E, Zigmond S, Bretscher A, Boone C (2002) Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association. *Science* 297:612-615
- [89] Qualmann B, Kessels MM (2009) New players in actin polymerization--WH2-domain-containing actin nucleators. *Trends Cell Biol* 19:276-285
- [90] Romero S, Le Clainche C, Didry D, Egile C, Pantaloni D, Carlier MF (2004) Formin is a processive motor that requires profilin to accelerate actin assembly and associated ATP hydrolysis. *Cell* 119:419-429

- [91] Sanchez-Ruiz JM (1992) Theoretical analysis of Lumry-Eyring models in differential scanning calorimetry. *Biophys J* 61:921-935
- [92] Sanchez-Ruiz JM, Iriarte A, Martinez-Carrion M (1991) The ionization states of the 5'-phosphate group in the various coenzyme forms bound to mitochondrial aspartate aminotransferase. *Archives of biochemistry and biophysics* 286:38-45
- [93] Sanchez-Ruiz JM, Lopez-Lacomba JL, Mateo PL, Vilanova M, Serra MA, Aviles FX (1988) Analysis of the thermal unfolding of porcine procarboxypeptidase A and its functional pieces by differential scanning calorimetry. *European Journal of Biochemistry* 176:225-230
- [94] Schreier S, Polnaszek CF, Smith IC (1978) Spin labels in membranes. Problems in practice. *Biochim Biophys Acta* 515:395-436
- [95] Shimada A, Nyitrai M, Vetter IR, Kuhlmann D, Bugyi B, Narumiya S, Geeves MA, Wittinghofer A (2004) The core FH2 domain of diaphanous-related formins is an elongated actin binding protein that inhibits polymerization. *Molecular cell* 13:511-522
- [96] Spudich JA, 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
- [97] Squier TC, Thomas DD (1986) Methodology for increased precision in saturation transfer electron paramagnetic resonance studies of rotational dynamics. *Biophys J* 49:921-935
- [98] Straub FB (1942) Actin. *Studies from the Institute of Medical Chemistry*:3-15
- [99] Tanaka M, Shibata H (1985) Poly(L-proline)-binding proteins from chick embryos are a profilin and a profilactin. *Eur J Biochem* 151:291-297
- [100] Thomas DD, Dalton LR, S. HJ (1976) Rotational diffusion studied by passage saturation transfer electron paramagnetic resonance. *J Chem Phys* 65:3006-3023.
- [101] Thomas DD, Seidel JC, Gergely J, Hyde JS (1975a) The quantitative measurement of rotational motion of the subfragment-1 region of myosin by saturation transfer epr spectroscopy. *J Supramol Struct* 3:376-390

- [102] Thomas DD, Seidel JC, Hyde JS, Gergely J (1975b) Motion of subfragment-1 in myosin and its supramolecular complexes: saturation transfer electron paramagnetic resonance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72:1729-1733
- [103] Tobacman LS, Korn ED (1983) The kinetics of actin nucleation and polymerization. *J Biol Chem* 258:3207-3214
- [104] Trumpp A, Blundell PA, de la Pompa JL, Zeller R (1992) The chicken limb deformity gene encodes nuclear proteins expressed in specific cell types during morphogenesis. *Genes Dev* 6:14-28
- [105] Ujfalusi-Pozsonyi K, Hild G, Grof P, Gutay-Toth Z, Bacso Z, Nyitrai M (2010) The effects of detergents on the polymerization properties of actin. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* 77:447-456
- [106] Ujfalusi Z, Barko S, Hild G, Nyitrai M (2010) The effects of formins on the conformation of subdomain 1 in actin filaments. *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology* 98:7-11
- [107] Ujfalusi Z, Kovacs M, Nagy NT, Barko S, Hild G, Lukacs A, Nyitrai M, Bugyi B (2012) Myosin and tropomyosin stabilize the conformation of formin-nucleated actin filaments. *J Biol Chem* 287:31894-31904
- [108] Wang H, Robinson RC, Burtnick LD (2010) The structure of native G-actin. *Cytoskeleton (Hoboken)* 67:456-465
- [109] Watanabe N, Kato T, Fujita A, Ishizaki T, Narumiya S (1999) Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization. *Nat Cell Biol* 1:136-143
- [110] Wear MA, Cooper JA (2004) Capping protein: new insights into mechanism and regulation. *Trends Biochem Sci* 29:418-428
- [111] Wilmshurst TH (1967) *Electron Spin Resonance Spectrometers*. Hilger, London
- [112] Winckler B, Schafer DA (2007) Cordon-bleu: a new taste in actin nucleation. *Cell* 131:236-238

- [113] Woychik RP, Maas RL, Zeller R, Vogt TF, Leder P (1990) 'Formins': proteins deduced from the alternative transcripts of the limb deformity gene. *Nature* 346:850-853
- [114] Woychik RP, Stewart TA, Davis LG, D'Eustachio P, Leder P (1985) An inherited limb deformity created by insertional mutagenesis in a transgenic mouse. *Nature* 318:36-40
- [115] Xu Y, Moseley JB, Sagot I, Poy F, Pellman D, Goode BL, Eck MJ (2004) Crystal structures of a Formin Homology-2 domain reveal a tethered dimer architecture. *Cell* 116:711-723
- [116] Xu Y, Moseley JB, Sagot I, Poy F, Pellman D, Goode BL, Eck MJ (2005) Crystal structures of a formin homology-2 domain reveal a tethered dimer architecture. *Cell* 116:711-723.
- [117] Zhang R, Yan W, Wang X, Lin R (2005) Molar excess enthalpies of ethyl acetate+alkanols at T= 298 K and p=10 MPa. *Thermochimica Acta* 429:155-161
- [118] Zigmond SH (2004) Formin-induced nucleation of actin filaments. *Curr Opin Cell Biol* 16:99-105
- [119] Zigmond SH, Evangelista M, Boone C, Yang C, Dar AC, Sicheri F, Forkey J, Pring M (2003) Formin leaky cap allows elongation in the presence of tight capping proteins. *Curr Biol* 13:1820-1823

8 Rövidítések jegyzéke

$2A'_{zz}$: hiperfinom csatolási állandó

ADP: adenzin difoszfát

ATP: adenzin-5'-trifoszfát

CaCl_2 : kalcium klorid

CC: Coiled-coil szegmens

Cys: cisztein aminosav

DAD: Diaphanous Autoregulatory Domain

DD: Dimerization Domain

DID: Diaphanous Inhibitory Domain

DSC: differenciál pásztázó kalorimetria

DTT: 1,4-ditio-D-treitol

DTT: DL-Dithiothreitol

EGTA: etilén-glikol-tetraecetsav

EPR: elektron paramágneses rezonancia spektroszkópia

F-actin: filamentális aktin polimer

FDNA: 3-(5-fluoro-2,dinitroanilino)-(1-oxil-2,2,5,5-tetrametil-3-pirrolidin)

FH1: Formin Homology Domain 1

FH2: Formin Homology Domain 2

FH3: Formin Homology Domain 1

G-actin: globuláris aktin monomer

GSH: glutathione

GST: glutation S-transzferáz

IPTG: Izopropil- β -D-tiogalactopiranozid

KCl: kálium klorid

kDa: kilodalton, atomi tömegyegység

mDia1: Diaphanous-related formin-1

MEA: β -merkaptóetanol

MgCl_2 : magnézium klorid

MSL: maleimid spin jelölő

NaN_3 : nátrium azid

NEM: N-etilmaleinimid

PDB: Protein Data Bank (Fehérje adatbázis): <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>

P_i: szervetlen foszfát

pirén: N-(1-pirén)-jódacetamid, fluorofór jelölő

pirén-aktin: pirén fluorofórral jelölt aktin

RBD: Rho-GTPáz-kötő domén

SDS: nátrium-dodecilszulfát

T_m: olvadási hőmérséklet

WH2: Wiskott-Aldrich szindróma fehérje homológia 2

τ₂: rotációs korrelációs idő

9 Ábrák jegyzéke

1. ábra: A globuláris aktin molekula szalagdiagramja. Középen a nukleotid-kötő zseb, a kötött ATP molekulával (gömb modell). PDB kód: (Chesarone and Goode 2009)1NWK. (Orban et al. 2008).	4
2. ábra: Az mDia1 formin FH2 doménjének röntgenkristallográfiás szerkezete (Shimada et al. 2004).	6
3. ábra: Az FH2 domén filogenetikai rendszere (Higgs and Peterson 2005).	7
4. ábra: A Bni1 FH2 domének alkotta dimer szerkezete és az FH2 monomer kitüntetett régiói (színes szalagmodell) (Higgs and Peterson 2005).	8
5. ábra: Az mDia1 autoregulációja (Bugyi 2006).	9
6. ábra: A formin családok doménszerkezete (Higgs and Peterson 2005).	11
7. ábra: Az FH2 domén hatása az aktin filamentumok dinamikai tulajdonságaira (Higgs 2005).	13
8. ábra: Az EPR készülék felépítése (http://www.physik.uni-augsburg.de alapján).	26
9. ábra: A DSC készülék felépítése (Zhang et al. 2005).	30
10. ábra. Az MSL-jelölt F-aktin (75 μ M) konvencionális EPR spektruma.....	34
11. ábra. Az MSL-jelölt F-aktin (50 μ M), és forminnal alkotott komplexének konvencionális EPR spektruma, és az I_m és I_{+1} paraméterek definíciója. A különbségi spektrum megadja az aktin-formin komplex esetében megjelenő gyors mozgású komponens jelét.	35
12. ábra. MSL-F-aktin és az F-aktin-formin komplex ST–EPR spektruma, és a spektrumok karakterisztikus L és C paraméterei.	38
13. ábra. Az MSL-F-aktin és az F-aktin-formin komplex diagnosztikus EPR paramétereinek százalékos változása a formin-aktin molarány függvényében: (○) az ST–EPR L'/L értékeit, (■) a konvencionális EPR csatolási állandó ($2A'_{zz}$) értékeit mutatja.	39
14. ábra. Az MSL-F-aktin és F-aktin-formin komplex (25 : 1 mol/mol) csatolási állandó értékének ($2A'_{zz}$) hőmérsékleti függése.	40
15. ábra. FDNA-G–aktin és FDNA-F-aktin konvencionális EPR spektruma.	42
16. ábra. Az FDNA-F-aktin konvencionális EPR spektruma formin nélkül és formint kötve. A két spektrum különözete megadja az új, mobilisabb spektrumkomponens jelét.	44
17. ábra. FDNA-jelölt aktin és aktin-formin komplexek ST–EPR spektruma.	46

18. ábra. Az FDNA-aktin rotációs korrelációs idejének százalékos változása a formin-aktin molarány függvényében: (○) az ST-EPR C'/C értékeit, (■) a konvencionális EPR csatolási állandó ($2A'_{zz}$) értékeit mutatja.	46
19. ábra. Az FDNA-G-aktin és G-aktin-formin komplex konvencionális EPR spektruma. A különbségi spektrumból meghatározható az összetett spektrum nagyobb hiperfinom csatolási állandója.	47
20. ábra. A csatolási állandó és a reciprok abszolút hőmérséklet közötti összefüggés FDNA-F-aktin (■), és aktin-formin komplex (○) esetében.	49
21. ábra. A Lys-61-en jelölt aktin (A) 0 °C-on, (B) 30 °C-on és (C) 60 °C-on rögzített EPR spektruma. A-B: A és B spektrum különbözete; C-B: C és B spektrum különbözete; s(A-B) és s(C-B): az (A-B) és (C-B) szimulált spektrumok legjobb illesztése.	51
22. ábra. Az FDNA-jelölt aktin konvencionális EPR spektuma: (A) 0 °C-on, (B) 30 °C-on és (C) 60 °C-on. A vastag, egyenes vonal a kísérleti spektrum, a vékony vonal a mobilis komponens. A szaggatott vonal a lassú mozgású, a pontozott vonal a mobilisabb komponensek részesedése a teljes spektrumból.	52
23. ábra. Az MSL-formin, MSL-formin-aktin komplex, valamint monomer és filamentális MSL-aktin konvencionális EPR spektruma.	53
24. ábra. Az MSL-formin különböző hőmérsékleten mért konvencionális EPR spektruma. A hőmérséklet növelésével a ($2A'_{zz}$) csatolási állandó csökkent, a mobilis komponens aránya (I_{+1}/I_m) nőtt.	54
25. ábra. Az MSL-formin csatolási állandó változása a reciprok hőmérséklet függvényében. A függvényben egy töréspont figyelhető meg 40,4 °C-nál.	55
26. ábra. A csatolási állandó változása a reciprok hőmérséklet függvényében MSL-formin-aktin (■) (1:5 M/M), MSL-F-aktin-formin komplex (*) (5:1 M/M) és MSL-F-aktin (▲) esetében.	56
27. ábra. Az MSL-formin-aktin komplex rotációs korrelációs idő eredményei a reciprok hőmérséklet függvényében.	57
28. ábra. Az I_{+1}/I_m arány hőmérsékleti függvénye MSL-formin (▲) és 1:10 (□), illetve 1:5 (○) arányú MSL-formin-aktin komplexek esetében.	58
29. ábra: Az A_{im}/A_m arány van't Hoff ábrázolása az abszolút hőmérséklet reciprokának függvényében. Az egyenes meredeksége megadja a szabadenergia változást: $\Delta G = 6,7$ kJ/mol.	59

30. ábra. Az aktin polimerizációja formin FH2 jelenlétében: jelöletlen és MSL- formin, dializált formin különböző pufferekben.....	61
31. ábra. A formin FH2 kalorimetrikus átmenete: a tapasztalati és a Fourier- transzformált (FFT) görbe. A formin olvadási hőmérséklete $T_m = 43,1$ °C volt.....	63
32. ábra. A formin-aktin komplex (5:1 M/M) hőátmeneti görbe dekompozíciója. A fekete vonal a Fourier-transzformált görbe, a piros a teljes átmenet szimulációja, a kék és bíbor a görbét alkotó két komponens részesedése a teljes átmenetből.....	64

10 Táblázatok jegyzéke

1. Táblázat: Az MSL-aktin esetében mért konvencionális és ST–EPR paraméterek
átlagértékei formin nélkül és különböző mennyiségű formin jelenlétében36
2. Táblázat: Az FDNA-aktin esetében mért konvencionális és ST–EPR
paraméterek átlagértékei formin nélkül és különböző mennyiségű formin
jelenlétében45
3. Táblázat: Az FDNA-jelölt aktin EPR paraméterei formin nélkül és formin
jelenlétében. Zárójelben a vizsgált minták mennyisége.48

11 Publikációk listája

11.1 Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Tünde Kupi, Pál Gróf, Miklós Nyitrai and József Belágyi: The uncoupling of the effects of formins on the local and global dynamics of actin filaments. *Biophys J.* Vol. 96 (2009), 2901-2911

Tünde Kupi, Pál Gróf, Miklós Nyitrai and József Belágyi: Interaction of formin FH2 with skeletal muscle actin. EPR and DSC studies. *Eur Biophys J.* Vol. 42 (2013), 757-765

11.2 Az értekezésben nem szereplő közlemények

Réka Dudás, Tünde Kupi, Andrea Vig, József Orbán and Dénes Lőrinczy: Effect of Phalloidin on the Skeletal Muscle ADP-actin Filaments. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, Vol. 95 (2009) 3, 709 – 712.

Andrea Vig, Réka Dudás, Tünde Kupi, József Orbán, Gábor Hild, Dénes Lőrinczy and Miklós Nyitrai: Effect of Phalloidin on Filaments Polymerized from Heart Muscle ADP-actin Monomers. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, Vol. 95 (2009) 3, 721 – 725.

Tamás Deák, Tünde Kupi, Róbert Oláh, Lóránt Lakatos, Lajos Kemény, György D. Bisztray, Ernő Szegedi: Candidate plant gene homologues in grapevine involved in *Agrobacterium* transformation. *Cent. Eur. J. Biol.* 8(10), (2013), 1001-1009

Tünde Kupi, Tamás Deák, Ernő Szegedi: Detection of self-complementary inverted repeats by a single forward primer driven PCR. *Acta Biologica Szegediensis*, Vol. 58. (2014)