

Ph.D. értekezés

# **A nukleotidok és az aktinkötő fehérjék szerepe az aktin funkcionális konformációváltozásaiban**

**Türmer Katalin Erzsébet**



Témavezetők:

Prof. Dr. Nyitrai Miklós

Prof. Dr. Belágyi József†

Pécsi Tudományegyetem  
Általános Orvostudományi Kar  
Biofizikai Intézet

**Pécs**

**2018.**

Interdiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola D93

Iskolavezető: Dr. Sümegi Balázs

Program: B-130; Funkcionális fehérjedinamika vizsgálata biofizikai módszerekkel

Programvezető: Prof. Dr. Nyitrai Miklós

Témavezetők: Prof. Dr. Nyitrai Miklós

Prof. Dr. Belágyi József†

## **Köszönetnyilvánítás**

Elsőként szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Prof. Dr. Nyitrai Miklós professzor úrnak, aki elindított a kutatói pályán, és nagy bizalommal és türelemmel irányította munkámat.

Hálával tartozom egykori témavezetőmnek, néhai Prof. Dr. Belágyi József emeritus professzor úrnak, akitől rendkívül sokat tanultam, és akire nagy szeretettel emlékezem. Nagy megtiszteltetés számomra, hogy az utolsó tanítványai egyike lehettem.

Köszönetet mondok Dr. Gróf Pálnak, aki hasznos tanácsaival és magyarázataival segített a dolgozat véglegesítésében.

Köszönöm Prof. Dr. Lőrinczy Dénes professzor úrnak a dolgozat megírása közben nyújtott értékes és nélkülözhetetlen tanácsaiért.

Szeretném megköszönni a Biofizikai Intézet minden munkatársának, hogy segítették munkámat.

Köszönettel tartozom családomnak, akik támogattak és szerető családi háttérrel biztosítottak számomra. Külön köszönöm Édesanyámnak, Férjemnek és Kislányaimnak végtelen türelmükért.

# Tartalomjegyzék

<b>1.</b>	<b>Irodalmi áttekintés</b>	<b>6</b>
1.1	Az aktin fehérje előfordulása és szerepe	6
1.2	Nukleotid analógok	8
1.3	Aktinkötésgelő fehérjék	9
<b>2.</b>	<b>Célkitűzések</b>	<b>13</b>
<b>3.</b>	<b>Anyagok és módszerek</b>	<b>15</b>
3.1	Az aktin preparálása	15
3.2	Kötésgelő fehérjék (alfa-aktinin és fascin) preparálása	16
3.2.1	Az alfa-aktinin preparálása	16
3.2.2	A fascin preparálása	16
3.3	Az aktin jelölése EPR vizsgálatokhoz	17
3.4	A kétértékű ionok cseréje, az ADP-F-aktin preparálása	18
3.5	Nukleotidmentes aktin preparálása	18
3.6	AMP.PNP kötése az aktinhoz	19
3.7	Mérési módszerek	19
3.7.1	Az alkalmazott dinamikus és statikus biofizikai vizsgáló módszerek	19
3.7.2	EPR spektroszkópia	20
3.7.2.1	Spinjelölés	21
3.7.2.2	Az EPR méréseink technikai háttere és kivitelezése	23
3.7.2.3	Az EPR spektrumok kiértékelés: a rotációs korrelációs idő kiszámítása	24
3.7.2.4	Az EPR spektrumok számítógépes szimulációs vizsgálata	25
3.7.3	Differenciál pásztázó kalorimetriai mérések	26
3.7.3.1	A DSC mérések kivitelezése	30
3.8	Az adatok kiértékelése	31
<b>4.</b>	<b>Eredmények</b>	<b>33</b>
4.1	A kötött nukleotidok hatásának vizsgálata	33
4.1.1	EPR mérések	33
4.1.2	DSC mérések	35
4.2	Kötésgelő fehérjék hatásának vizsgálata	41
4.2.1	A konvencionális EPR mérések	41
4.2.2	Szaturáció transzfer EPR mérések	44
<b>5.</b>	<b>Következtetések</b>	<b>48</b>
5.1	Nukleotidok hatása	48

5.2	Kötegelő fehérjék hatása	50
<b>6.</b>	<b>Összefoglalás</b>	<b>53</b>
<b>7.</b>	<b>Irodalomjegyzék</b>	<b>55</b>
<b>8.</b>	<b>Ábrajegyzék</b>	<b>62</b>
<b>9.</b>	<b>Táblázatok jegyzéke</b>	<b>64</b>
<b>10.</b>	<b>Rövidítések jegyzéke</b>	<b>65</b>
<b>11.</b>	<b>Közlemények</b>	<b>66</b>
11.1	Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:	66
11.2	Az értekezésben nem szereplő közlemények:	66

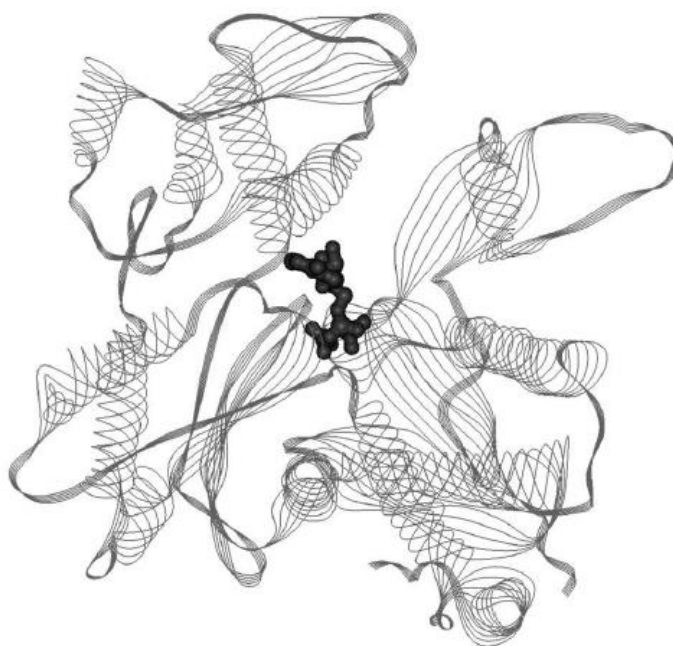
# 1. Irodalmi áttekintés

## 1.1 Az aktin fehérje előfordulása és szerepe

A mozgás képességét minden eukarióta szervezetben fehérjék biztosítják. A sejtszintű mozgásokban meghatározó szerepet kapnak a filamentális és a motor fehérjék, amelyek a különböző mozgások elemi lépéseit létrehozzák (Pollard, 1990). A citoskeleton összehangolt működését dinamikusan változó szerkezetű fehérjék asszociációja biztosítja (Kabsch és Vandekerckhove, 1992). Három filamentális rendszer építi fel az eukarióta szervezetek citoskeletonját: a mikrofilamentumok, az intermedier filamentumok és a mikrotubulusok. Ezen fehérjék szerkezete képes alkalmazkodni az éppen szükséges funkció betöltéséhez és más fehérjékkel kölcsönhatva megfelelően szabályozott folyamatok résztvevői (Kabsch és Vandekerckhove, 1992).

Az eukarióta citoskeleton mikrofilamentum hálózatának fő alkotóeleme az aktin. Straub Ferenc Brúnó fedezte fel az aktin fehérjét 1942-ben (Straub 1942). Straub a miozin ATP-áz aktivitását serkentő aktint, egy miozin preparátum vizsgálata közben fedezte fel. Az aktin számos biológiai rendszer alkotóeleme és különböző biológiai folyamatban játszik meghatározó szerepet (Kabsch és Vandekerckhove, 1992). Ilyen folyamatok közé soroljuk a sejtmozgást vagy a sejtek alakjának megváltozását. Szerepet játszik még a sejten belüli transzport folyamatokban, az endo- és exocitózisban, a sejtszétválásban is (Pollard és Cooper, 2009; Golitsina és mtsai., 1992). A sejtmagon belül is megtalálhatjuk az aktint, itt a transzkripcióban és jelátviteli folyamatokban van szerepe (Grzanka és mtsai., 2004; Castano és mtsai., 2010;).  $\alpha$ -izoformája a harántcsíkolt izomszövetben fordul elő a legnagyobb mennyiségben. Az aktin a szarkomer vékony filamentum rendszerét alkotja, és a vastag filamentumokat képező miozinnal közösen a szarkomerek rövidülését, ami az izom összehúzódását eredményezi (Huxley és Niedergerke, 1954; Huxley és Hanson, 1954). Az első röntgen-krisztallográfias felvételeket az aktin szerkezetéről 1990-ben közölték Kabsch és munkatársai (Kabsch és mtsai., 1990).

Az aktin monomer egy 42,3 kDa molekulatömegű globuláris fehérje, amely két doménből áll (Levitsky és mtsai., 1998a). A két domén mindegyike két szubdoménből épül fel (Wang és mtsai., 2010). A kisebb aktindomén az I. és II. szubdoménekből, a nagyobb aktindomén pedig a III. és IV. szubdoménekből áll. A két fő domén között helyezkedik el a kation- és nukleotidkötő árok (1. ábra), amelyben ATP vagy ADP és kétértékű kation kötődhet az aktinhoz (Higashi és Oosawa, 1965; Kinoshian és mtsai., 1991). Ez a kation fiziológias körülmények között  $\text{Ca}^{2+}$  vagy  $\text{Mg}^{2+}$  lehet (Kasai és mtsai., 1965).



1. ábra A monomer aktin szalagdiagramja. Az ATP-t kötő nukleotid-kötő árok a molekula közepén látható. (Kabsch és mtsai., 1990)

Az aktin monomer formáját G-aktinnak, a filamentális formáját pedig F-aktinnak is hívják. A G-aktin molekulák jobbra csavarodó, dupla helikális szerkezetű filamentumokat képeznek a polimerizálódásuk után (Levitsky és mtsai., 1998a). Kezdeti lépésként a G-aktin molekulák egymással összekapcsolódnak, dimereket és trimereket képeznek. Ezzel a lassú nukleációs fázissal kezdődik a filamentumok kialakulása, ez határozza meg a polimerizáció sebességét is, mivel ez a kapcsolódás instabil (Kabsch és Vandekerckhove, 1992).

Az aktinnak létezik egy kritikus koncentrációja, e fölött a polimerizáció spontán lejártszódik. Ezt a kapcsolódó nukleotidok típusa, a kötött kationok koncentrációja, valamint az aktinkötő fehérjék jelenléte is befolyásolja (Chesarone és Goode, 2009).

A következő szakasz alatt további aktin monomerek kapcsolódnak a filamentumhoz, így a filamentum hossza tovább növekszik. Ez az úgynevezett elongáció, amely már egy gyorsabb folyamat (Kabsch és Vandekerckhove, 1992). Az egymáshoz épülő monomerek orientációja azonos, ezért a filamentum szerkezete poláris lesz (Kuhn és Pollard, 2005). A polimerizáció utolsó fázisa az, amikor beáll a dinamikus egyensúly (Frischknecht és Way, 2001). Az ekkor létrejövő úgynevezett taposómalom mechanizmus azt eredményezi, hogy a filamentum hossza változatlan marad. Bár ilyenkor a filamentum mindkét végén lejártszódik a monomerek asszociációja és disszociációja is, azonban a „szakállas” végén az asszociáció, a „hegyes” végén a disszociáció folyamata dominál (Moore és mtsai., 1970), és a két hatás egyensúlyban van.

## 1.2 Nukleotid analógok

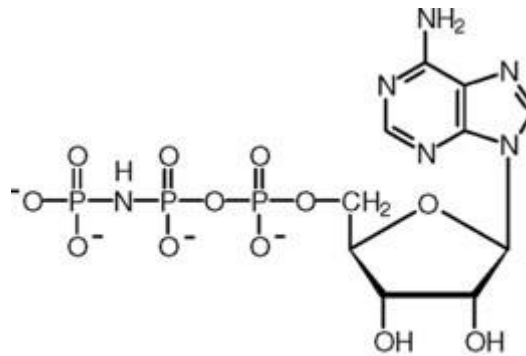
A G- és az F-aktin különböző szerkezeti és funkcionális tulajdonságokat mutat, ha ATP, ADP-P<sub>i</sub>, vagy ADP kötődik hozzájuk, vagy egyáltalán nem kötődik hozzájuk nukleotid. (Az aktuálisan kötött nukleotidtól függően a következőkben pl. az ATP-aktin, ADP-aktin és hasonló rövidítéseket is használni fogom.) Az aktin képes hidrolizálni az ATP-t. Az aktin alapú mozgásokhoz ATP szükséges. A globuláris aktin monomerek ATP-t kötnek és az ATP – miközben a G-aktin filamentális aktinná polimerizálódik – ADP-vé és szervetlen foszfáttá hidrolizálódik (De La Cruz és Pollard, 1995).

Több tanulmány azt feltételezi, hogy a nukleotidkötő árok két állapotot vehet fel, nyitott és zárt állapotot (Hild és mtsai., 2010; Schuler, 2001). A két állapot közötti átmenetet az aktuális puffer körülmények, és az aktinhoz kapcsolódó ligandumok is szabályozzák. A G-aktinban a nukleotidcsere miatt bekövetkező változások is a két átmenet egyensúlyának az eltolódásához vezetnek (Dalhaimer és mtsai., 2008; Zheng és mtsai., 2007). Az eltérő nukleotidot kötő állapotok kiemelkedően fontosak a filamentális aktin struktúrájának kialakításában, illetve befolyásolják a kialakult aktin filamentum fizikai tulajdonságait is (Orlova és mtsai., 1995). Abban az esetben, ha a polimerizáció kiindulási állapotának tekintett aktin monomerek ADP-t kötnek, egy kevésbé merev F-aktin szerkezet jön létre, mint akkor, ha a monomerek eredetileg ATP-t kötnek (Strzelecka-Golaszewska és mtsai., 1993). Ugyancsak speciális konformációjú aktin filamentum állapot alakul ki olyan esetekben, amikor a kötött nukleotid nem hidrolizálható ATP analóg, vagy ADP-P<sub>i</sub> (Otterbein és mtsai., 2001).

A természetes bázisokkal, nukleotidokkal nagyfokú szerkezeti hasonlóságot mutató vegyületek tartoznak a nukleotid analógok csoportjába. Jelentőségük, hogy a hasonlóság miatt — az élő szervezetben, a sejtekben — részben helyettesíthetik a természetes nukleotidokat. Ez a helyettesítés azonban nem tökéletes, emiatt gyakran gátolják a nukleotid anyagcserét vagy a polinukleotidok szintézisét.

Az AMP-PNP (adenilil-imidodifoszfát) egy nem-hidrolizálódó ATP analóg (2. ábra). Az ATP nukleotid analógjának tekinthető, amennyiben az AMP.PNP használatakor az aktin filamentum az ATP-aktin állapothoz tartozó szerkezeti tulajdonságokat mutat.





2. ábra Az AMP-PNP

### 1.3 Aktinkötegelő fehérjék

Az aktin-hálózatokban egymást keresztező mikrofilamentumok szövevényét általában nagyméretű, flexibilis keresztkötő fehérjék stabilizálják. Ezek a fehérje polimerek oldalához kötődve elősegítik azok magasabb rendű polimer hálózatokba, kötegekbe való szerveződését. A kötegekben párhuzamos szálak vannak keresztkötve a keresztkötő fehérjék által. Számos aktin filamentumhoz kötődő aktinkötegelő fehérje létezik, amelyek közvetítenek különböző, a sejtekben lejátszódó folyamatokban, mint a sejtmembrán kitüremkedések képzése vagy a sejt adhéziós folyamatok és a stressz szálak képzésén alapuló mozgások. A sokféle keresztkötő közül az alfa-aktinin és a fascin a legismertebb. Az aktinnal alkotott kölcsönhatásuk különböző módon alakul ki, és alkalmassá teszi őket arra, hogy a specifikus biológiai funkcióikat elláthassák (Tseng és mtsai., 2001). A fascin és az alfa-aktinin jelen vannak kortikális és citoskeletális aktin struktúrákban, mint például mikrovillusokban, sztereocíliumokban és filopodiumokban, valamint részt vesznek sejt-mátrix adhéziós folyamatokban, sejt-mozgásban, a sejtek közötti interakciókban. Az izom kontrakciójában, valamint a citoskeleton szerveződésének koordinálásában játszanak kulcsszerepet (Jayo és Parsons, 2010).

A *fascin* egy 55 kDa molekulatömegű (~ 5 nm átmérőjű) globuláris fehérje, amely négylevelű lóheréhez hasonló térszerkezetű, 4 doménből épül fel. Három izoformája ismert emlősökben: a fascin-1, 2 és 3, amelyek különböző szövet típusokban expresszálódnak (Edwards és Bryan, 1995; Saishin és mtsai., 1997; Kureishy és mtsai., 2002; Tubb és mtsai., 2002). Míg sok esetben a foszforiláció aktiválja a fehérjéket és számos jelátviteli utat, addig a fascin az egyik olyan aktinkötő fehérje, amelyet a foszforiláció negatívan szabályoz (Li és mtsai., 2010). A fascin két aktinkötő hellyel rendelkezik. Az egyik a fehérje C-terminális részén ( $\beta$  trefoil-3) található, a Ser39 foszforilációs hely mellett, amelynek kulcsszerepe van az aktinhoz való kötődésében, a másik pedig az N-terminális végen ( $\beta$  trefoil-1) (Ono és mtsai., 1997; Hashimoto és mtsai., 2005; Jansen és mtsai., 2011). Ezek a kötőhelyek részt vesznek a

stabil és viszonylag merev aktinkötegek kialakításában. A segítségükkel létrejövő aktinkötegek útvonalat szolgáltatnak a vezikulák transzportja számára a sejttesttől a folyamatosan fejlődő sejtkitüremkedés elülső éle felé. A fascin a filopódiumokban, mikrotüskékben és aktin-alapú kitüremkedésekben lokalizálódik a plazma membrán alatt, valamint közreműködik az egymással párhuzamos F-aktin szerkezet összeállításában és fenntartásában a mozgó sejtek filopódiumainak csúcsi részében (Edwards és Bryan, 1995). Expressziója fontos az aktinkötegek stabilitásához az invadopódiumokban (Machesky és Li, 2010). A legtöbb normál felnőtt epitél sejten vagy egyáltalán nem, vagy nagyon kis mennyiségben expresszálódik, azonban a legtöbb humán karcinómában nagyobb mennyiségben íródik át (Hashimoto és mtsai., 2005), így a tumorok összes típusában a fascin szintje megnövekszik, mind fehérje, mind gén szinten. Ezáltal a fascin egy ígéretes és egyszerű tumor marker létrehozására ad alapot (Chen és mtsai., 2007).

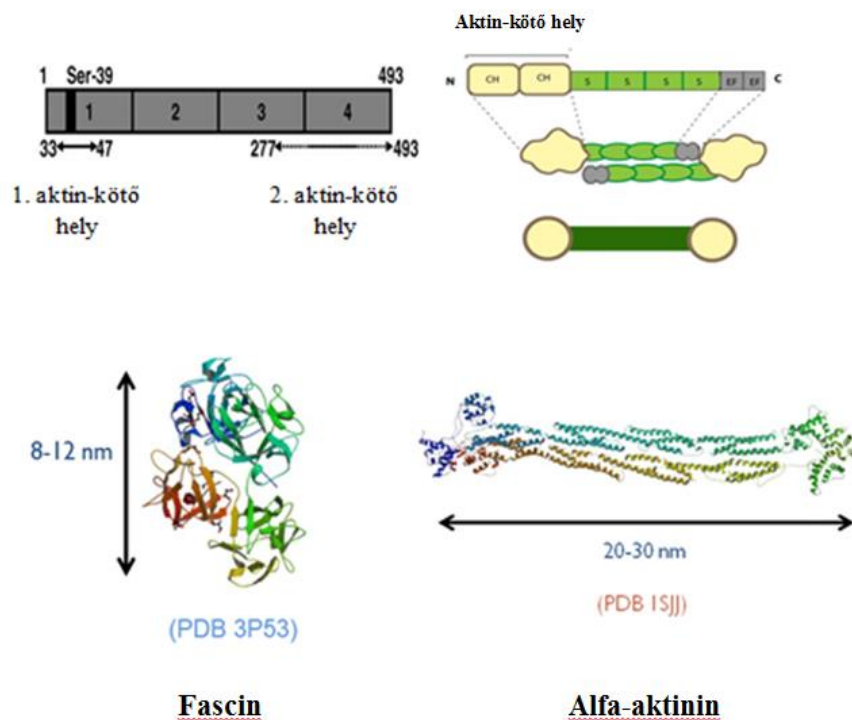
A fascin intracelluláris mennyiségének jelentős csökkenése vagy a funkciójának a gátlása a filopódiumok által mozgatott sejtek csökkent mértékű vándorlását eredményezi a kitüremkedések és filopódiumok számának csökkenése által (Jansen és mtsai., 2011). Nemrégiben kimutatták, hogy a fascin képes módosítani az aktin filamentumok szerkezetét és dinamikai tulajdonságait. Mansson munkacsoportjának eredményei alapján a fascin által keresztkötött aktin filamentumok flexibilitása csökken, a fascin kötődésének hatására a filamentumok perzisztenciahossza mintegy 15-ször hosszabb lesz, mint azoké a filamentumoké, amelyek nem kötnek fascint (Takatsuki és mtsai., 2014).

Az *alfa-aktinin* egy 200 kDa-os fehérje, amelyben két pálca alakú monomer alkot egy homodimert (a hossza 20-30 nm), antiparallel elrendezésben. Mindkét monomer tartalmaz az N-terminális végén egy-egy aktinkötő helyet, amelyeket 4 spektrinszerű hármis helikális tandem rendeződő struktúra követ (Blanchard és mtsai., 1989). A spektrin struktúrák felelősek a nem-kovalens dimerek kialakulásáért és a dimerizációs domének specifikus jellegzetességei határozzák meg a homodimerek hosszát. Az aktinkötő fejek orientációja nagyon fontos az aktin kötés és az azt követő kölcsönhatások létrejöttéhez (Klein és mtsai., 2004).

Az alfa-aktinin a sejten belül különböző részeken fordul elő, mint a harántcsíkolt izom Z-lemezeiben, illetve a nem-izom eredetű sejt adhéziós plakkokban (Kureishy és mtsai., 2002; Sjoblom és mtsai., 2008). Az alfa-aktinin különböző izoformái az aktin filamentumokat vagy poláris, vagy bipoláris aktinkötegekké kötegelhetik és ennek következtében a létrehozott aktin hálózat polaritása a fehérjéktől függ.

Hasonló alapvető funkciójuk (keresztkötés és kötegelés) ellenére az alfa-aktinin és a fascin által kötegelt aktin filamentumok különböző mechanikai sajátságokat mutatnak (Tseng

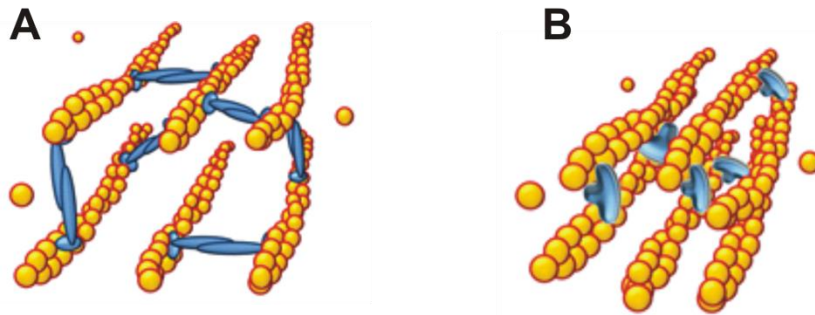
és mtsai., 2001; Ishikawa és mtsai., 2003). Különbségek vannak a kötegek összeépülésének gyorsaságában, illetve a rugalmasságukban is, attól függően, hogy a kötegelő milyen koncentrációban van jelen (Lieleg és mtsai., 2007). A legnyilvánvalóbb különbség a két fehérje hatása között mégis az, hogy attól függően, hogy melyik kötegelő molekula vett részt a kötegek kialakításában, a kötegekben az aktin filamentumok közötti távolság különböző (Jansen és mtsai., 2011; Flood és mtsai., 1995; Winkler és mtsai., 1997). Ennek oka vélhetően leginkább a kötegelő molekulák közötti méretbeli különbség (3. ábra).



3. ábra A fascin és az alfa-aktinin felépítése, szerkezeti diagramok. A fascin szekvenciálisan négy, az alfa-aktinin hat egységre osztható. Az utóbbi az ismétlődő spectrin-szerű régiókkal kapcsolódik össze három-négy egység átfedésével, valamint az aktinkötő régiót tartalmazza (Turner és mtsai., 2015a).

A fascin tömörebb aktin köteget hoz létre, mint az alfa-aktinin. Azonban az összefüggés a jellemző geometriai tulajdonságaik és a funkcionális viselkedésük között nem ilyen egyszerű (4. ábra). Nagy és munkatársai (Nagy és mtsai., 2008) felfedezték, hogy a miozin-X hatékonyabban hat kölcsön a fascin által kötegelt aktinnal, mint az egyedi aktin filamentumokkal. Az előbbieken részletezett kötődés következtében a kötegek filopódiális belső részében a miozin-X képes hosszirányban közlekedni és felhalmozódik a filopódiumok disztális csúcaiban. Ricca és Rock (Ricca és Rock, 2010) kimutatta, hogy a miozin-X

folyamatosan képes lépkedni, azaz processzív tulajdonságokat mutat a fascin-aktin kötegek mentén. Az a tény, hogy a kötegekkel ez a miozin hatékonyabban hat kölcsön, mint egyedi aktin szálakkal arra utal, hogy a miozin-X nem egyedi motorként, hanem nagyobb klaszterekben szerveződve fejt ki biológiai hatását.



4. ábra Az alfa-aktinin (A) (Flood és mtsai., 1995 nyomán) és a fascin (B) (Jansen és mtsai., 2011; Winkler és mtsai., 1997) kötegelési mechanizmusának vázlatja. Az aktin protomereket és monomereket narancssárga körökkel és a megfelelő kötegelő fehérjéket kézzel jelöltük (Turner és mtsai., 2015a).

## 2. Célkitűzések

A PTE ÁOK Biofizikai Intézetében végzett vizsgálataink az aktin, illetve az aktinkötő fehérjék által létrehozott hálózat szabályozásának és dinamikájának megismerésére irányultak. Munkám első részében a három eltérő nukleotidnak — az ATP, az ADP és egy nem hidrolizálódó ATP analóg, az AMP.PNP — által az aktin szerkezetében kiváltott dinamikai és konformációs változásokat vizsgáltuk EPR technika segítségével. Úgy gondoltuk, hogy ha kicseréljük a monomerekhez kötődő nukleotidot, akkor az ATP-aktin monomerek és az ADP-aktin monomerek szerkezetében lévő különbség miatt (Gaszner és mtsai., 1999; Otterbein és mtsai., 2001; Graceffa és Dominguez, 2003), megváltozhat az F-aktin belső dinamikája is. Ezen gondolatot követve a feltételezésünk az volt, hogy a monomereknek ADP-t kell kötniük az F-aktinban ahhoz, hogy a működéséhez szükséges optimális flexibilitás létrejöjjön. Hipotézisünk szerint bár mindkét esetben ADP-aktin protomerek alkotják a filamentumokat, ha eredetileg ATP-t kötő monomerekből épül fel a filamentum, akkor megváltozik a filamentum rugalmassága (hajlékonysága), összehasonlítva az eredeti, ADP-t kötő szerkezetű F-aktinnal.

Mindezen gondolatokkal kapcsolatban a következő kérdéseket tettük fel:

- (1) Hogyan változik meg a különböző nukleotidokat kötő globuláris és filamentális aktin hőmérsékleti stabilitása?
- (2) Megváltozik-e az F-aktin rotációs dinamikája, ha benne a monomerek ATP-t kötnek, és nem ADP-t; és ha igen, akkor hogyan?

Munkám második részében két aktinkötegelő fehérje – a fascin és az alfa-aktinin – által létrehozott filamentális aktinkötegek mechanikai tulajdonságainak néhány vonatkozását vizsgáltuk. A fascinak vagy az alfa-aktininnek az aktin filamentumokhoz való kötődése által okozott flexibilitás változások kimutatásához az EPR alkalmazásán alapuló módszereket alkalmaztunk.

Az aktint keresztkötő fehérjékkal kapcsolatos korábbi megfigyelések azt sugallják, hogy nem a létrehozott aktinkötegek alakja és mérete az egyetlen sajátosság, amely meghatározza az aktin fehérje által betöltött biológiai funkciókat és aktivitásokat. Kézenfekvőnek tűnt az a feltételezés, miszerint a kötegekben levő aktin filamentumok dinamikai tulajdonságai központi szerepet játszanak a kötegek funkcióinak a szabályozásában. A fehérje alkotórészek mozgásai is nagyon fontosak a jellegzetes térbeli szerkezet kialakításához.

Az előző bekezdéshez kapcsolódóan az alábbi kérdéseket kívántuk vizsgálni:

- (1) Milyen rotációs dinamikai különbségek jellemzik a fascin illetve az alfa-aktinin által kötegelt aktinkötegeket?

- (2) Milyen hatása van az aktinhoz kötött kötegelő fehérjéknek az aktin protomerek szerkezetére?
- (3) Milyen hatása van a filamentumok közötti kapcsolódások kialakulásának az aktin filamentum egészének a mozgásaira?

### 3. Anyagok és módszerek

#### 3.1 Az aktin preparálása

Az aktin fehérjét házi nyúl (*Oryctolagus cuniculus domestica*) hátizmából preparáltuk. Ennek első részében Feuer és munkatársai módszere (Feuer és mtsai., 1948) szerint aceton forgácsot készítettünk, amit felhasználásáig  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltunk. Ledaráltuk a nyúl hátizmából kinyert részeket, majd  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, KCl-pufferben (150 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 100 mM KCl; pH 6,5), ezután 0,05 M  $\text{NaHCO}_3$  és 1 mM EDTA oldatban kevertetve tisztítottuk tovább. Az egyes lépések során négyrétegű steril gézen szűrtük át a félig kész forgácsot. Végül kétszer desztillált vízzel, ötször pedig acetonnal mostuk át a forgácsot. Az így készült és kiszárított aceton forgács  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on több hónapig minőségromlás nélkül felhasználható volt.

Az aktin kinyerését az aceton forgácsból a Spudich és Watt által leírt módszer alapján végeztük (Spudich és Watt, 1971). A forgácsunkat A-pufferben (4 mM Tris-HCl vagy MOPS; 0,5 mM MEA, 0,2 mM ATP, 0,1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,005 %  $\text{NaN}_3$ ; pH 8,0), jégen kevertettük, négyrétegű steril gézlapon átszűrtük, majd ezeket a műveleteket még egyszer megismételtük. A szűrletet centrifugáltuk (100000g, 2 óra,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on), a felülúszóhoz 2 mM  $\text{MgCl}_2$ -ot és 50 mM KCl-ot adtunk a polimerizáció érdekében. Az így polimerizált fehérjekomplexben 0,8 M KCl hozzáadásával disszociáltattuk az aktint a tropomiozintól. A polimerizált aktint centrifugáltuk (400000g, 45 perc,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on), majd a felülúszót leöntöttük. Az üledékben levő aktint MEA mentes A-pufferben (4 mM Tris-HCl vagy MOPS, 0,2 mM ATP, 0,1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,005 %  $\text{NaN}_3$ ; pH 8,0) homogenizáltam és 12 órán keresztül dializáltam. Az így előállított G-aktin preparátumot, a még esetlegesen megmaradt aktin filamentumoktól és a szennyeződésektől centrifugálással (400000g, 30 perc,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on) tisztítottam meg (Kupi és mtsai., 2009).

A preparálás végén az aktint A-pufferben  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk, és néhány napon belül felhasználtuk. A G-aktin koncentrációt Shimadzu UV-2100 spektrofotométer használatával határoztuk meg az abszorpciót 290 nm-en mérve,  $0,63\text{ mg}^{-1}\text{ ml cm}^{-1}$  abszorpciós koefficiens alkalmazva a számoláshoz (Houk és Ue, 1974).

Az aktin filamentumok létrehozásához (polimerizálás) az aktin monomerekhez 2 mM  $\text{MgCl}_2$ -ot és 100 mM KCl-ot adtunk (végkoncentrációk), és az oldatot két órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk (Kupi és mtsai., 2009).

## **3.2 Kötegelő fehérjék (alfa-aktinin és fascin) preparálása**

### **3.2.1 Az alfa-aktinin preparálása**

Az alfa-aktinint rekombináns technika alkalmazásával preparáltuk. Első lépésben pEGFP-N1 plazmidot (AddGene) *E. coli* BL21 kompetens sejtekbe transzformáltuk, majd LB táptalajon (10 g/l tripton, 5 g/l élesztő kivonat, 10 g/l NaCl és 15 g/l agar) növesztettük 37 °C-on. A nedves sejtömeghez feltárási puffert (grammonként 5 ml PBS, proteáz-inhibitor koktél és 1 mg/ml lizozim) adtunk a sejtekhez, majd feltártuk a sejteket kézi Bandelin Sonopuls Ultrasonic homogenizátor és szonikátor segítségével (5x 1 perces impulzusok, 80% amplitúdó). A sejtuszpenzióhoz DNáz I enzimet (1ml/15 g) adtunk, majd 1 órán át 0 °C-on kevertettük. A felesleges sejtörmelékelt ultracentrifugálással (Sorvall Ultra Pro 80, 200000g 4 °C, 30 perc) választottuk el mintától.

A GST-fúziós rekombináns alfa-aktinint affinitás kromatográfiával (Pharmacia FPLC) tisztítottuk, ami során a GST-alfa-aktinin fehérje a Glutathion-sepharose 4B (GSH) oszlop gyöngyeihez kötődött. Az aspecifikusan kötődő fehérjék eltávolítására 20-szoros oszloptérfogatú mosó puffert (50 mM TRIS/HCl, 300 mM NaCl, 3 mM DTT, 1 mM EDTA; pH 7,5) használtunk. A fehérjét FactorXa hasítás (0 °C, 16 óra) után eluáltuk 10 mM TRIS/HCl, 150 mM NaCl, 3 mM DTT, 1 mM EDTA; pH 7,5 összetételű eluáló pufferrel. A mintánkat koncentráltuk: Janetzki K26 centrifugában (400000g, 4 °C, Amicon ULTRA 10 MWCO centrifugacsövekben). A szennyező fehérjéket gélfiltrálással (Superdex G-75 oszlopon: 16 mm, 3-70 kDa tömegű rekombináns fehérjék tisztítására ideális) távolítottuk el. A csúcsokhoz tartozó frakciókból mintát vettünk, majd megfuttattuk SDS-akrilamid gélen (Nátrium Dodecil Szulfát- Poliakrilamid Gél, 10 % akrilamidot tartalmaz). Az alfa-aktinin fehérjét tartalmazó frakciókat összegyűjtöttük és a már korábban leírt módon koncentráltuk. Tárolás előtt a fehérjét 4 mM TRIS-HCl, 4 mM NaCl, 20 µM EDTA; pH 7,6 pufferben dializáltuk, majd az előző összetételű pufferben folyékony nitrogénben lefagyasztottuk. Az alfa-aktinint felhasználásig – 80 °C-on tároltuk.

### **3.2.2 A fascin preparálása**

A fascin fehérje preparálása hasonló módon történt, mint az alfa-aktininé. Az FSCN-1 plazmidot (AddGene) *E. coli* BL21 kompetens sejtekbe transzformáltuk, majd LB táptalajon (10 g/l tripton, 5 g/l élesztő kivonat, 10 g/l NaCl és 15 g/l agar) növesztettük 37 °C-on. A nedves sejtömeghez feltárási puffert (50 mM TRIS-HCl, 150 mM NaCl, 10 % glicerol, 5 mM DTT, EDTA-mentes proteáz-inhibitor koktél és 1 mg/ml lizozim és 10 µg/ml DNáz I. enzim; pH8,0)



adtunk, majd feltártuk a sejteket kézi Bandelin Sonopuls Ultrasonic homogenizátor és szonikátor segítségével. A felesleges sejttörmeléket ultracentrifugálással (Sorvall Ultra Pro 80, 200000g 4 °C, 30 perc) távolítottuk el a mintából.

A fascin fehérjét Pharmacia FPLC (affinitás kromatográfia) segítségével tisztítottuk tovább. Az aspecifikusan kötődő fehérjék eltávolítására 20-szoros oszloptérfogatú mosó puffert (50 mM TRIS/HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 % glicerol, 5mM DTT; pH 7,5) használtunk. A fehérjét Precision Protease hasítás (0 °C, 16 óra) után eluáltuk 20 mM imidazol, 20 mM NaCl, 5 mM DTT; pH 7,4 összetételű eluáló pufferrel, majd koncentráltuk: Janetzki K26 centrifugában (400000g, 4 °C, Amicon ULTRA 10 MWCO centrifugacsövekben). A szennyező fehérjéket ioncserélő Q-Sepharose oszlopon (100 mm, 6 % agaróz, erős anioncserélő) sógrádienssel (0-1 M NaCl) távolítottuk el. A csúcsokhoz tartozó frakciókból mintát vettünk, majd megfuttattuk SDS-akrilamid gélen (Nátrium Dodecil Szulfát-Poliakrilamid Gél, 10 % akrilamidot tartalmaz). A fehérjét tartalmazó frakciókat összegyűjtöttük és a már korábban leírt módon koncentráltuk. Tárolás előtt a fehérjét 20 mM imidazol, 150 mM KCl, 10 % glicerol és 5 mM DTT; pH 7,4 pufferben dializáltuk, majd az előző összetételű pufferben folyékony nitrogénben lefagyasztottuk; felhasználásáig –80 °C-on tároltuk.

### 3.3 Az aktin jelölése EPR vizsgálatokhoz

Az aktint az EPR alkalmazások érdekében paramágneses vegyülettel (EPR szondával) reagáltattuk; ezt nevezzük a későbbiekben spinjelölésnek. A spinjelölés előtt a G-aktint polimerizáltuk: 2 mM MgCl<sub>2</sub> és 100 mM KCl jelenlétében, 2 órán keresztül szobahőmérsékleten. Ezek után az aktint N-(1-oxil-2,2,6,6,-tetrametil-4-piperidinil)-maleimid spinjelölővel (MSL) inkubáltam 1 : 1,5 (aktin : jelölő) moláris arányban, 12 órán keresztül 4 °C-on. A felesleges jelölőt ultracentrifugálással (300000g, 40 perc, 4 °C) választottam el a filamentumoktól: az oldatban maradt, nem kötött jelölőt a felülúszóval együtt távolítottam el. A pelletet 1 ml MEA-mentes A-puffer hozzáadásával duzzasztottam, homogenizáltam és MEA-mentes A-pufferben dializáltam 4 °C-on kevertetve minimum 12 órán át. A jelölési arányt a jelölőt növekvő koncentrációban tartalmazó puffer sorozat (10<sup>-3</sup>-10<sup>-6</sup> M) felhasználásával állapítottam meg. Ehhez, az azonos spektrométer beállítások mellett, a koncentráció sorozatra mért spektrumokat összevettem az előzőleg az aktin-mintákon mért spektrumokkal. Az összehasonlításához (1) a spektrumok kettős integráljából kiszámoltam a spinjelölő koncentrációját az adott mintában; (2) az aktint tartalmazó mintákban meghatároztam az aktin összkoncentrációját (lásd az aktin preparálása szakaszban). Ezek alapján kiszámítható a kötött-

jelölő/aktin arány. A jelölési arány tipikusan 80 % volt (Kupi és mtsai., 2009; Turner és mtsai., 2012).

### 3.4 A kétértékű ionok cseréje, az ADP-F-aktin preparálása

Annak érdekében, hogy az aktint speciális körülmények között tudjuk vizsgálni, annak környezetét meg kellett változtatnunk. Az aktin a preparálás végső fázisában az A-puffer összetétele miatt monomer formában van jelen. A monomer aktin ATP-t és  $\text{Ca}^{2+}$ -ot kötve fordul elő az oldatban, azonban néhány vizsgálathoz a  $\text{Mg}^{2+}$ -ot kötő formát szeretnénk volna használni. (A minták nagyobb részében az aktin  $\text{Mg}^{2+}$ -t kötő formáját használtuk, mivel fiziológiásan is így fordul elő.) Ehhez a G-aktin polimerizálása előtt kation cserélő ún. *M-puffer* (4 mM TRIS-HCl; 0,3 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 2 mM EGTA) segítségével a  $\text{Ca}^{2+}$ -t  $\text{Mg}^{2+}$ -ra cseréltük. Ennek lényege, hogy az M-pufferben található EGTA  $pK_a$  értékei a  $\text{Ca}^{2+}$ -ra, illetve a  $\text{Mg}^{2+}$ -ra vonatkozóan jelentősen különbözik: sokkal nagyobb a  $\text{Ca}^{2+}$ -ra vonatkozó affinitása ( $pK_a^{\text{Ca}^{2+}} \gg pK_a^{\text{Mg}^{2+}}$ ). Az aktin számára szükséges a kétértékű kation, így az EGTA-val komplexált  $\text{Ca}^{2+}$ -ionok helyett, a szintén a pufferben található  $\text{Mg}^{2+}$ -t köti meg. Az aktint 4 °C-on kevertetve 12 órán át dializáltuk az M-pufferrel szemben.

A nukleotid ADP-re való cseréjéhez Drewes és Faulstich módszerét alkalmaztam (Drewes és Faulstich, 1991). A G-aktin oldatot ATP-mentes A-pufferrel szemben 6 órán keresztül dializáltam. Az aktin oldathoz 1,65 mg/ml hexokinázt, 0,5 mg/ml glükózt és 1 mM ADP-t adtunk, majd 1 óráig, 4 °C-on inkubáltuk. Ezután a mintát 12 órán keresztül jégen polimerizáltuk 100 mM KCl és 2 mM  $\text{MgCl}_2$  hozzáadásával. Ez az idő elégségesnek tekinthető ahhoz, hogy az oldatban maradt és az aktinhoz kötött ATP molekulák is ADP-vé hidrolizáljanak (Pollard, 1984). Ekkor az aktinról disszociáló ADP helyére csakis egy másik ADP molekula köthet be. Az ATP hasítását a hexokináz enzim végzi, a lehasított  $\text{P}_i$ -t a szubsztrátjához köti, és így glükóz-6-foszfát is keletkezik az ADP mellett.

### 3.5 Nukleotidmentes aktin preparálása

A nukleotidmentes aktin preparálását Dowex-1 gyanta és aktin összekeverésével kezdtem (1 ml 50  $\mu\text{M}$  koncentrációjú G-aktin nukleotid-mentesítéséhez 150  $\mu\text{l}$  50 %-os Dowex 1-et használtam) (Perelroizen és mtsai., 1995), majd a mintát 5 percig inkubáltam szobahőmérsékleten. Ezek után a Dowex-1-et centrifugálással (4 °C-on 13 000g, 3 perc) elválasztottam az aktintól, majd az egész műveletet megismételtem, hogy a még kötött ATP-t eltávolítsam. Ezen módszer segítségével a kötött nukleotidnak minimum 80-90 %-a eltávolítható volt (Perelroizen és mtsai., 1995; De La Cruz és Pollard, 1995).

### 3.6 AMP.PNP kötése az aktinhoz

Az AMP.PNP-t tartalmazó minták vizsgálatához Miki eljárását (Miki, 1990) követtem. A javasolt eljárásnak megfelelően, a kötött ATP eltávolítása után 1 mg AMP.PNP-t adtam 1 ml 50  $\mu$ M koncentrációjú G-aktinhoz, majd szobahőmérsékleten 5 percig hagytam inkubálódni. Az AMP.PNP-F-aktin preparálásához a G-aktint először, 50 mM KCl és 1 mM  $MgCl_2$  hozzáadásával, polimerizáltam majd az F-aktinhoz az AMP.PNP-t a G-aktinra megadott eljárás szerint adtam hozzá.

### 3.7 Mérési módszerek

#### 3.7.1 Az alkalmazott dinamikus és statikus biofizikai vizsgáló módszerek

A citoskeletális fehérjék vizsgálatára két biofizikai módszert alkalmaztunk, amelyek kiválóan alkalmasak nem csak az egyszerű modellrendszerek, hanem az összetett makromolekuláris rendszerek vizsgálatára is. Az egyik az elektron paramágneses rezonancia (EPR) spektroszkópia, a másik a differenciál pásztázó kalorimetria (DSC) volt (Turner és mtsai., 2012).

Számos spektroszkópai módszer érzékeny a különböző időskálákon lejátszó molekuláris mozgások detektálására. A fluoreszcens emissziós polarizáció és a konvencionális EPR technikák érzékenyek a nanoszekundumos illetve a néhány tíz nanoszekundumos korrelációs időket átfogó tartományban a rotációs molekuláris mozgásokra. A lassabb forgások, azaz hosszabb korrelációs idők detektálására egyrészt a tranziens foszforeszcencia mérések, másrészt a szaturáció transzfer EPR módszer alkalmas: ezek a korrelációs idők már a milli- vagy a mikroszekundumos időtartományba esnek (Turner és mtsai., 2015a).

Az EPR spektroszkópia alkalmas a molekuláris kölcsönhatások további vetületeinek a vizsgálatára is, amennyiben: a módszer alkalmazása során (1) az egész molekulának, vagy (2) egy meghatározott doménjének rotációs tulajdonságait használjuk fel a kölcsönhatások, illetve azok változásainak (Berliner, 1976; Berliner, 1979) vizsgálatára, majd annak jellemzésére.

A differenciál pásztázó kalorimetriás módszerek a molekuláris kölcsönhatásokat termodinamikai paramétereik alapján írják le. A két módszer együttes alkalmazásával az egyes biokémiai reakciók termodinamikáját kiegészíthetjük a molekuláris mozgásokban bekövetkező dinamikai vagy statikus változásokkal (Dergez és mtsai., 2007; Farkas és mtsai., 2004; Hartvig és mtsai., 2002a; Hartvig és mtsai., 2002b; Lőrinczy és mtsai., 2002).

### 3.7.2 EPR spektroszkópia

Már az 1970-es évek óta kutatták az aktin és miozin rendszereket EPR spektroszkópia alkalmazásával a PTE ÁOK Biofizikai Intézet munkatársai (Belagyi, 1973; Belagyi, 1975a; Belagyi, 1975b; Belagyi és Damerau, 1974; Belagyi és mtsai., 1978). A konvencionális mérési módszer a  $10^{-12}$  -  $10^{-8}$  s időtartományban teszi lehetővé a rotációs korrelációs idők meghatározását. Emellett a szaturáció transzfer EPR módszere segítségével a 100 ns-nál hosszabb időtartományban is vizsgálhatjuk a molekuláink rotációs diffúziós tulajdonságait (Turner és mtsai., 2015a). A speciális jelölési technikák — pl. „site directed labeling”, segítségével az általunk jelölt csoport közvetlen környékének rotációs dinamikáját is tanulmányozhatjuk. Ez függ attól, hogy a spinjelölt molekulárszegmens (szegmens) a molekula egészétől függetlenül mozog-e, vagy sem. Amennyiben a spinjelölővel megjelölt szegmens rigiden<sup>1</sup> kapcsolódik a molekula egészéhez, úgy a teljes molekula forgását jellemezhetjük. Ebben az esetben például azt detektálhatjuk, hogy a kölcsönhatások következtében a molekula egészének változott-e a forgásállapota (rotációs korrelációs ideje). Hasonlóan hasznos információkat kaphatunk, amennyiben a jelölt szegmens nem mereven kapcsolódik a molekula egészéhez, vagy a molekula valamilyen kölcsönhatása következtében megváltozik a megjelölt szegmens forgása (mozgási szabadsága). Ebben az esetben a rendszer forgásának a leírásához mind a molekula egészének, mind pedig a szegmens saját forgásának a figyelembe vétele szükséges (Mossakowska és mtsai., 1988).

Munkám egyik jelentős részében EPR spektroszkópiát alkalmaztunk kísérletek során a molekuláris kölcsönhatások vizsgálatára. A módszer alapja, hogy azokban az atomi vagy molekuláris rendszerekben, amelyek párosítatlan spinű elektronokat tartalmaznak, mágneses térben az elektron spinhez tartozó energiaállapotok energetikailag felhasadnak, azaz energetikailag különböznek egymástól (Mossakowska és mtsai., 1988). Ezek között az eltérő energiaállapotok között átmenetek hozhatóak létre megfelelő energiájú (általában a mikrohullámú tartományt alkalmaznak) külső elektromágneses sugárzással, és az átmenetekhez kapcsolódóan abszorpció vagy az abszorpció utáni emisszió mérhető. A paramágneses centrumnak a környezetével való kölcsönhatásai befolyásolják az elektronállapotok energiáját (Berliner, 1976). Az energiaállapotok leírásakor az elektron saját spinjét, valamint az atommag spinállapotát is figyelembe kell vennünk, mivel az atommagok spinállapota is befolyásolja a

---

<sup>1</sup> A spinjelölt molekula kapcsolódását egy másik csoporthoz/molekulához „*rigidnek*” nevezi az angol szakirodalom, amikor a spinjelölt és a vizsgált molekula egymáshoz képest nem rendelkezik relatív mozgással. A magyar nyelvű irodalomban ezt ritkán „*merev*”-nek is szokták nevezni. A következőkben inkább a „*rigid*” kifejezést használom a relatív mozgás hiányának leírására.

mágneses térben lévő elektronok energiaállapotait (Berliner, 1976; Marsh, 1981). Ezt a kölcsönhatást írja le a hiperfinom csatolási állandó. Ha megváltozik a környezet polaritása, az kihat az elektroneloszlás térbeli eloszlására, ami a hiperfinom csatolási állandó nagyságának változásához is vezet (Thomas és mtsai., 1979).

Abban az esetben, ha a párosítatlan elektronok nem gömbszimmetrikus pályán mozognak, és a hordozó atomok vagy molekulák térben különböző pozíciókat vehetnek fel az alkalmazott, meghatározott irányú mágneses térhez képest. Ekkor egymástól eltérő energiaállapotok keletkeznek. Ezáltal lehetővé válik, hogy különböző biológiai struktúrák makroszkopikus rendezettségét vizsgáljuk. A molekuláris mozgásokat, az azokat leíró két paraméterrel jellemezhetjük: (1) a molekulák forgási sebességét (avagy rotációs diffúzióját) a rotációs diffúziós tenzor, vagy az azzal egyenértékű korrelációs idők jellemzik; (2) a molekuláris forgás térbeli behatároltságát pedig egy irányító potenciállal (amit, mint a forgást határoló kúpszöveget leíró paramétert foghatunk fel) írhatjuk le. Ezek segítségével tudjuk meghatározni a mikroszkopikus rendparamétert (Berliner, 1976).

A rendezettség szempontjából három lényeges határesetet különböztethetünk meg. (1) Léteznek mikroszkóposan és makroszkóposan rendezetlen, (2) mikroszkóposan rendezett és makroszkóposan rendezetlen és (3) mikroszkóposan és makroszkóposan rendezett rendszereket. Ha az irányító potenciál nem engedi meg a teljes térszögben való forgást, ez esetben az egyes molekulák fő forgástengelye egy-egy adott térszög irányába mutathat. Ezeknek a tengelyeknek az eloszlása lehet izotrop (makroszkóposan rendezetlen), vagy anizotrop (makroszkóposan rendezett). Amennyiben nincs sem makroszkópos, sem mikroszkópos rendezettség (oldatokban, közel gömbszerű molekulánál fordul elő), akkor a rendszer makroszkóposan és mikroszkóposan is rendezetlen. Azokban az esetekben, amikor a molekula nem gömbszerű, a rotációs diffúzió lehet anizotrop; ekkor a molekula forgását a rotációs diffúziós tenzonnal lehet jellemezni. Mivel a makroszkópos illetve mikroszkópos rendezettséget a makromolekuláris rendszerekben lejátszódó konformáció-, illetve kölcsönhatás változások befolyásolhatják, így az EPR spektroszkópia alkalmas lehet ezeknek a változásoknak a vizsgálatára (Thomas és mtsai., 1979).

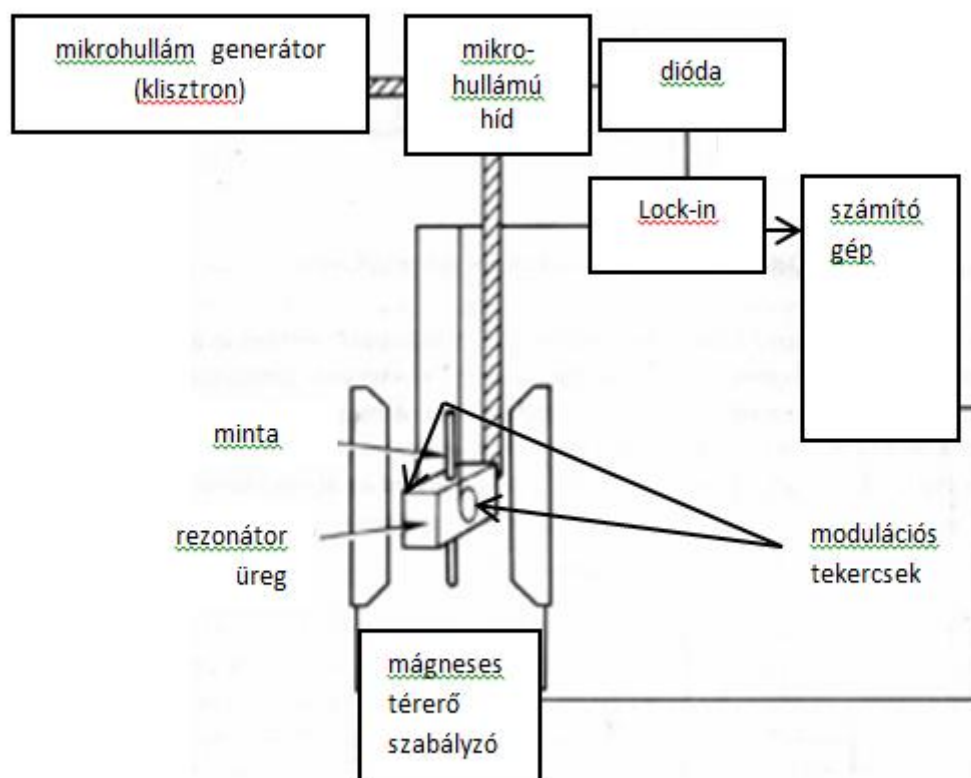
### 3.7.2.1 *Spinjelölés*

Megkülönböztetünk *intrinsic* és *extrinsic* paramágneses centrumokat. Ezek lehetnek atomok, molekulák vagy ionok. Fehérjék esetében a vizsgált molekulánkhoz *extrinsic* paramágneses szondát, vagy más néven spinjelölőt kell kötnünk, mivel a legtöbb makromolekula nem rendelkezik *intrinsic* paramágneses centrummal. Ebben az esetben a

használni kívánt spinjelölőt hozzákapcsolhatjuk egy adott aminosavhoz, és így információt kaphatunk a fehérje alegység konformációjáról, az aminosav környezetéről (Knowles és mtsai., 1976).

A szerkezet megváltozására a spektrum alakjának megváltozásából, az úgynevezett karakterisztikus csúcsok alakjából, helyzetéből következtethetünk. Abban az esetben, ha a jelölő mereven kapcsolódik a fehérjeszegmenshez, azaz ahhoz viszonyítva nincs relatív forgása, akkor megfigyelhetjük a szegmens mozgását. Amennyiben a megjelölt szegmens mereven kapcsolódik a fehérje egészéhez, akkor a fehérje egészének rotációs dinamikáját figyelhetjük meg (Knowles és mtsai., 1976). Átmeneti esetekben a mérések során mind a szonda, mind a fehérje vagy annak egy szegmensének a mozgását, amihez a jelölő kapcsolódik figyelembe kell venni. A biológiai objektumok vizsgálatakor, leggyakrabban nitroxid szabadgyököt tartalmazó paramágneses szondákat használnak. Ezek sok esetben kovalensen, más esetekben nem kovalensen (pl. bizonyos enzimekkel való specifikus reakcióban) kötődnek a vizsgált molekulához. A méréseink során alkalmazott MSL nitroxid spinjelölőnek az aszimmetrikus térbeli eloszlású  $2\pi$  molekulapályája adja a paramágneses centrumot. A  $2\pi$  pálya a mágneses térhez képest felvett orientációja (és forgási sebessége) meghatározza a felvett spektrumban a karakterisztikus csúcsok elhelyezkedését, szélességét, tehát a spektrum alakját. Abban az esetben, ha a jelölő molekula mereven kapcsolódik az adott aminosav oldalláncához, akkor az általunk detektált spektrum tükrözi a jelölt molekularészlet mozgását, illetve orientációját a külső mágneses téréhez viszonyítva (Knowles és mtsai., 1976). Korábbi munkáinkban már tapasztaltuk, hogy a spektrum karakterisztikus csúcsainak helyzetét és alakját elemezve nyomon követhető a vizsgált fehérjénk konformációjának változása (Belágyi és Gróf, 1983; Nyitrai és mtsai., 1997; Dergez, 2006). Ismert, hogy a spinjelölt maleinimid származék a legtöbb esetben "rigiden" kapcsolódik a jelölt molekulákhoz. Ez a kapcsolódás nagymértékben egyszerűsíti a spektrumok interpretálását (Thomas és mtsai., 1979). Ezt mérlegelve, jelen munkámban spinjelölt maleinimidet (MSL; paramágneses szondát) használtam az aktin jelölésére.

### 3.7.2.2 Az EPR méréseink technikai háttére és kivitelezése



5.ábra: Az EPR spektrométer sematikus felépítése (átdolgozott ábra;  
forrás:<http://www.physik.uni-augsburg.de>).

EPR méréseinket ESP 300E (Bruker Biospin, Németország) spektrométerrel végeztük. A konvencionális EPR spektrumokat 20 mW mikrohullámú teljesítménnyel, 100 kHz modulációs frekvencián vettük fel. 0,1 - 0,2 mT modulációs amplitúdót alkalmaztunk. Konvencionális EPR méréseinkhez összesen 20  $\mu\text{L}$  mintamennyiségeket használtunk, amelyeket egyszerre két kapillárisban (Mettler ME-18552) mértünk. Ezzel a módszerrel értük el jel/zaj arány növelését, valamint így kaptuk meg a spektrumaink felvételéhez szükséges optimális mintamennyiséget. Az aktin mintáink koncentrációja 30  $\mu\text{M}$  és 120  $\mu\text{M}$  között változott. Méréskor az előzőekben már leírt összetételű A-puffert használtuk (Kupi és mtsai., 2009).

A szaturáció transzfer EPR (továbbiakban ST-EPR) módszer azoknak a mintáknak a mérésére alkalmas, amelyeknél a rotációs korrelációs idő értéke  $10^{-6}$ - $10^{-3}$ sec közötti. A spektrumok detektálása és kiértékelése eltér a fent leírtaktól. Az ilyen minták mérése során a mikrohullámú teljesítményt úgy kell megválasztani, hogy létrejöjjön a spinrendszer részleges telítődése (félszaturációs érték). Ilyen körülmények között a második harmonikus,  $90^\circ$ -al fázisban eltolt abszorpciós spektrumot detektáljuk. A rotációs korrelációs idő

meghatározásához a spektrumban megjelenő diagnosztikus csúcsok arányait ( $L''/L$ ,  $C''/C$  és  $H''/H$ ) hasonlítjuk össze a spinjelölt hemoglobin rendszer ST-EPR spektrumainak segítségével készített kalibrációs diagramok értékeivel (Kupi és mtsai., 2009).

A szaturáció transzfer EPR spektrumok felvételéhez 63 mW teljesítményt és 50 kHz-es modulációs frekvenciát alkalmaztunk, 0,5 mT amplitúdóval (Kupi és mtsai., 2009). Az EPR spektrumokat általában  $23 \pm 0,1$  °C-on vettük fel, az ettől való eltérést dolgozatomban jelzem. A 63 mW mikrohullámú teljesítmény 0,025 mT átlagos amplitúdójú mikrohullámú térerőnek felel meg a mérőcella középső részén, az értékek meghatározását Fajer, Marsh, valamint Squier és Thomas módszere alapján végeztük el (Marsh, 1980; Squier és Thomas, 1986a; Squier és Thomas, 1986b; Fajer és mtsai., 1992). A spektrumok összehasonlítását kétszeres integráljuk alapján is elvégeztük, a kétféle kiértékelési mód a mintáink esetén nem adott különbséget. A jelölési arányok meghatározásához is a kétszeres integrálokat számoltuk. Ekkor a fehérjék EPR spektrumait azonos körülmények (pl. minta térfogata, felvételi idő, erősítés, modulációs amplitúdó) mért, ismert koncentrációjú TEMPO (tetrametil-piperidin-N-oxyl spinjelölő) oldatok EPR spektrumaival vetettük össze. A spektrumok kétszeres integráljainak értékei arányosak az adott mintatérfogatban jelen levő paramágneses centrumok, és így a jelölt molekulák számával is. A jelölési arány, a spinjelölő és a fehérje koncentrációk ismeretében, a két érték hányadosaként számítható (Kupi és mtsai., 2009).

A minták hőmérsékletét egy diTC2007 típusú hőmérséklet variátor segítségével szabályoztuk, ezért az egyik mintatartó kapillárisunk kisméretű termoelemet is tartalmazott. Spektrumainkat  $22 \pm 0,1$  °C-on rögzítettük (Kupi és mtsai., 2009).

### **3.7.2.3 *Az EPR spektrumok kiértékelés: a rotációs korrelációs idő kiszámítása***

A konvencionális EPR spektrumok felvételekor a mért jel az abszorbeált energia első deriváltja. A spektrumok alapján, többek között, a fehérjék forgási állapotát jellemző korrelációs idő meghatározható. Ezekhez a mérésekhez, az általam vizsgált fehérjék esetén, szükség van a paramágneses szondák alkalmazására. A spektrum alakját befolyásolja a spinjelölő környezete, annak molekuláris dinamikája, szerkezete is (Knowles és mtsai., 1976).

A biológiai rendszerek EPR spektroszkópiájában a legelterjedtebb spinjelölők a nitroxid szabadgyökök. A párosítatlan elektron külső mágneses térrel való kölcsönhatását, illetve az elektron és a mellette elhelyezkedő nitrogén atommag kölcsönhatását leíró összefüggésekben az egyes energiaszintek különbsége leírható az alábbi összefüggés segítségével:

$$\Delta E = \beta \underline{gSH} + \underline{ISA} \quad (1)$$



ahol  $\beta$  az elektron Bohr-magnetonja,  $\underline{H}$  a külső mágneses tér,  $\underline{S}$  az elektronspin operátora,  $\underline{I}$  a magspin operátora,  $g$  illetve  $\underline{A}$  az elektron Landé-, vagy röviden  $g$ -faktora illetve a nitrogén atommagjának hiperfinom csatolását leíró tenzora. A Freed-csoport által meghatározott közelítő eljárás alapján az általam vizsgált fehérjék rotációs korrelációs ideje a lassú forgás tartományában a Goldman-közelítés segítségével adható meg (Goldman és mtsai., 1972):

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

ahol  $a = 5,4 \cdot 10^{-10}$  s,  $b = -1,36$ ,  $2A'_{zz}$  a minta két szélső diagnosztikus csúcsa közötti térerősség különbsége,  $2A^r_{zz}$  az úgynevezett "*rigid limit*", amelynél a rendszer viszkozitása a végtelenhez közelít. A képlet arra is rávilágít, hogy minél közelebb van a mért hiperfinom felhasadáshoz tartozó érték a "*rigid limit*"-hez, annál lassúbb a forgás, annál hosszabb a rotációs korrelációs idő (Thomas és mtsai., 1975a).

Munkám során szaturáció transzfer EPR méréseket is végeztem. Ennek a mérési módszernek a segítségével a  $10^{-6}$ - $10^{-3}$  s közötti rotációs korrelációs idejű forgások vizsgálhatóak (Thomas és mtsai., 1975a). A spektrumok kiértékelése a spinjelölt hemoglobinról, különböző viszkozitású cukoroldatban felvett, az irodalomban közölt referencia görbék segítségével elvégezhető. A közel gömbszimmetrikus hemoglobin ST-EPR jelének csúcsarányaiból számolt rotációs korrelációs időket, kalibrációs diagramok tartalmazzák. A felvett spektrumok csúcsainak arányát összehasonlítva a kalibrációs diagramok értékeivel kiszámítható az adott mintára vonatkozó rotációs korrelációs idő (Dergez, 2006; Thomas és mtsai., 1975a; Thomas és mtsai., 1975b;).

#### 3.7.2.4 *Az EPR spektrumok számítógépes szimulációs vizsgálata*

A Freed csoport által leírt nemlineáris legkisebb négyzetek programot (NLSL) használtuk fel az általunk felvett EPR spektrumok lassú mozgású régiójának tanulmányozására (Meirovitch és Freed, 1984; Budil és mtsai., 1996). Ennek a szoftvernek a segítségével a Brown-féle rotációs diffúzió szimulálható anizotrop diffúziós tenzonnal, figyelembe véve a  $g$ -faktor és a rotációs diffúziós tenzor által bezárt hajlásszöget. A szimulációk alapján az EPR spektrumok legjobb illesztése szolgáltatta a továbbiakban használt hiperfinom- és  $g$ -tenzor értékeket:

1. komponens:  $A_{xx} = 0,590$ ;  $A_{yy} = 0,600$  és  $A_{zz} = 3,480$  mT

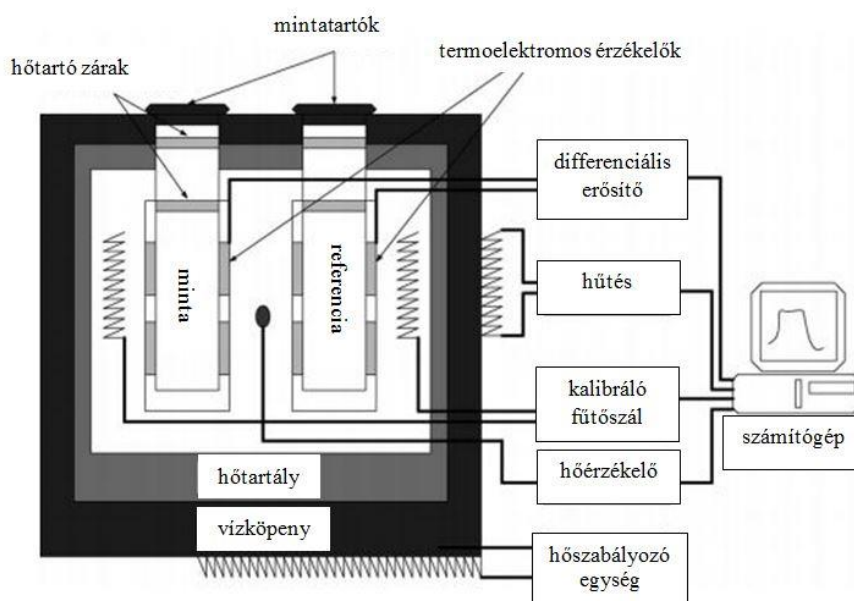
2. komponens:  $A_{xx} = 0,630$ ;  $A_{yy} = 0,630$  és  $A_{zz} = 3,430$  mT

A  $g$ -tenzor értéke: 2,00820; 2,00608 és 2,00230 a lassú és a gyors mozgású komponens esetében. A  $g$ - és a diffúziós tenzorok közötti hajlásszögeket a legjobb illeszkedéshez

változtatni kellett: különböző volt a két lassú mozgású komponensnél, valamint a hőmérséklet függvényében is változott (Kupi és mtsai., 2009).

### 3.7.3 Differenciál pásztázó kalorimetriai mérések

A kalorimetriai módszerek ideális eszközök a különböző anyagokban lejátszódó hőeffektussal járó folyamatok gyors vizsgálatára. Ezen módszerek a biológiai rendszerekre jellemző globális változások jellemzésére is kiválóan alkalmasak. A differenciál pásztázó kalorimetria („differential scanning calorimetry”, DSC) segítségével a fehérjék konformációs változásai, valamint térszerkezeti stabilitása egyaránt feltérképezhetőek. A módszer alkalmas a vizsgálandó rendszer felmelegítése, illetve lehűtése során lejátszódó molekuláris folyamatok energetikai hátterének leírására (Lumry és Eyring, 1954; Lőrinczy, 2004). A DSC érzékenysége lehetővé teszi fehérjék termodinamikai állapotátározóinak hatékony vizsgálatát. Az állapotátározók segítségével térszerkezeti stabilitásuk, biológiai és biokémiai folyamataikban végbemenő konformációs változásai is jellemezhetőek. Ezáltal pl. (1) a fehérjék termodinamikai, valamint térszerkezeti stabilitása között fennálló kapcsolat kalorimetrikus módszerekkel feltérképezhető (Levitsky és mtsai., 1998a; Levitsky és mtsai., 1998b); (2) A DSC technika alkalmazása hatékony módszer arra, hogy képet kapjunk arról, milyen változásokat okozott a nukleotidcsere az aktin szerkezetében illetve arról, hogyan változott meg az aktin hőstabilitása a nukleotidcsere hatására (Orbán és mtsai., 2008a; Orbán és mtsai., 2008b).



6. ábra A DSC készülék felépítése (Zhang és mtsai., 2005).

A mérés során a két egymástól és a környezetüktől elszigetelt mintatartóban elhelyezett mérendő, illetve referenciamintát tartalmazó cella egyidejű, egyenletes sebességű felfűtése, majd lehűtése történik. A két minta hőmérséklete lineárisan növekszik az idő függvényében. A két cella hőmérséklete közötti különbség (amely lényegében a mérés során a kimenő jelet eredményezi) a felfűtés során mindaddig zérus, amíg a mintában nem történik szerkezeti változás. Ugyanis a cellák betöltése során a tömegük azonos (max.  $\pm 0,1$  mg eltéréssel), és a referenciának használt rendszer hőkapacitása a mintáéval közel azonos. A felfűtés kezdeti hőmérsékletét olyan alacsonyra választva, amikor a mérendő mintában még nincs szerkezeti változás, a minta és a referencia hőmérséklete közel azonos módon változik ( $\Delta T=0$ ). Ekkor, a minta moláris hőkapacitásában nincs ugrásszerű változás<sup>2</sup>. A vizsgált rendszerre jellemző hőmérsékleten/hőmérsékleteken olyan változások léphetnek fel a mintára jellemző molekuláris kölcsönhatásokban (pl. kötések szakadnak fel, fázisátalakulás lép fel), amik a folyamat lezajlása után a hőkapacitás ugrásszerű megváltozását eredményezik<sup>3</sup>. Ebben az állapotban a vizsgálandó minta hőmérséklete nem követi a referencia hőmérsékletét, mert a referenciában nem következnek be a vizsgált mintáéhoz hasonló változások. A cellák között fellépő hőmérséklet különbséget egy szabályozó rendszer igyekszik kiegyenlíteni, ezért a mérőcellában lezajló (endoterm vagy exoterm) folyamat jellegétől függően többlet energiát táplál be a szabályozó rendszer (a mérés során ezt mérjük vagy az idő, vagy a hőmérséklet függvényében) a megfelelő cellába a felfűtési hőmérséklet követésére, azaz a cellák közötti  $\Delta T=0$  fenntartására. A betáplált energiának megfelelő hőáram különbségét a minta és a referencia hőkapacitásának eltérését (esetleg annak a hőmérséklettől függő változása), kívánatosan csak a mintában lezajló változások okozzák (Fukada és mtsai., 1987).

A műszer — a fűtési/hűtési program során a cellák közti termikus egyensúly fenntartása érdekében — egy adott hőmérsékleten betáplált hőenergiát az idő vagy a referenciacella hőmérsékletének a függvényében méri. Az elektromos fűtő/hűtő-kör hőtéljesítménye, avagy a hőáram ( $dQ/dt$ ) leírható a jól ismert összefüggéssel:

$$\frac{dQ(t)}{dt} = R \cdot I^2(t) \quad (3)$$

ahol  $Q$  az elektromos fűtőkör által betáplált hőmennyiség,  $t$  az idő,  $R$  a megfelelő elektromos ellenállás és  $I$  a fűtőáram. A DSC-mérésekben közel izobár körülményeket alkalmaznak a

<sup>2</sup> A referenciaként használt anyagokat/oldatokat úgy szokás megválasztani, hogy annak a moláris hőkapacitása a legkevésbé függjön a hőmérséklettől.

<sup>3</sup> Az előző "ugrásszerű változás" azt jelenti, hogy a hőkapacitás változási sebessége jóval nagyobb, mint az előző hőmérsékleteken. A változás lezajlása után ismét kisebb lesz a hőkapacitás változásának a sebessége.

mintát/referenciát tartalmazó egységekre, így a betáplált hő a kalorimetrikus entalpiának felel meg. Azaz a (3.) egyenlet az entalpia időbeli változásával (a hőáram áramerősségével) azonos<sup>4</sup>:

$$\frac{dH(T(t))}{dt} = R \cdot I^2(T(t)) \quad (4)$$

Az entalpiaváltozásra felírt előbbi egyenletben az entalpiaváltozás a hőmérséklettől és ezáltal a közölt hőmennyiségtől függ. Ezt az egyenletet az ismert matematikai összefüggések alapján átírhatjuk:

$$\frac{dH(T(t))}{dt} = \frac{dH(T)}{dT} \cdot \frac{dT(t)}{dt} \quad (5)$$

ahol az egyenlet jobb oldalán lévő első tag az adott hőmérsékleten, állandó nyomáson mért fajhővel,  $C_p(T)$ , egyenlő. A második tag pedig a fűtési illetve hűtési,  $v$ , sebesség.

$$\frac{dH(T(t))}{dt} = C_p(T) \cdot v \quad (6)$$

Az előző két egyenlet alapján látható, hogy a kalorimetrikus entalpia, két időpont között, kiszámítható a DSC görbe idő szerinti integrálásával. Így azt mondhatjuk, hogy a DSC mérések során végbemenő termikus folyamatokról a DSC görbe idő szerinti integrálása nyújt közvetlen információt<sup>5</sup>. A cellában lezajló folyamat kinetikájának ismeretében a van't Hoff egyenlet —  $\left(\frac{\partial \ln K}{\partial T}\right)_p = \frac{\Delta H_{vH}}{RT^2}$  ahol  $K$  a folyamat egyensúlyi állandója,  $T$  az abszolút hőmérséklet,  $\Delta H_{vH}$  pedig a van't Hoff entalpia — alapján további fontos termodinamikai tulajdonságok is meghatározhatóak. A makromolekuláris struktúrák, amilyenek a fehérjék is, stabilitását jellemezhetjük a képességgel, amely fenntartja a molekula natív szerkezetét és normál funkcióját a rá jellemző fizikai és kémiai változók bizonyos tartományában és bizonyos időintervallumban. A DSC korábbi munkákban részletesen elemzett elmélete alapján (Lőrinczy és Belágyi, 1995a; Lőrinczy és mtsai., 2002; Konczol és mtsai., 1998) azt is kimutatták, hogy az aktin hődenaturációja, (más fehérjékhez hasonlóan) (Conejero-Lara és mtsai., 1991a; Conejero-Lara és mtsai., 1991b; Freire és Murphy, 1991; Freire és mtsai., 1992; Galisteo és mtsai., 1991; Sanchez-Ruiz, 1992; Sanchez-Ruiz és mtsai., 1991; Sanchez-Ruiz és mtsai., 1988a), egy irreverzibilis kétállapotú átmenettel írhatóak le. Ebben az átmenetben a natív

<sup>4</sup> Az egyenlet ezen alakja azt mutatja, hogy a betáplált hőmennyiség függ az aktuális hőmérséklettől és ezen keresztül a fűtési/hűtési időtől.

<sup>5</sup> Amennyiben a mérőeszköz csak az elektromos áramerősség állandó értéken tartásával állítaná be az állandó fűtési/hűtési sebességet, akkor a referencia moláris hőkapacitásának a hőmérséklettől függetlennek kellene lennie. Ha ez nem biztosítható, úgy az állandó áramerősség biztosítása mellett, a referencia hőmérsékletét is mérni kell, s az áramerősséget a lineáristól eltérő hőmérséklet-változás esetén korrigálni kell. Ez egyben a kaloriméter referencia-cellájának az időállandóját jellemzi.

állapotú fehérje egy köztes állapoton keresztül irreverzibilisen átalakul a denaturált állapotú fehérjévé. Ekkor a van't Hoff entalpia megegyezik a kalorimetrikus entalpiával:

$$\frac{\Delta H_{cal}}{\Delta H_{vH}} = \frac{1}{4} \cdot \frac{mQ_t}{RT^2\Delta C_T} \approx 1 \quad (7)$$

ahol  $\Delta H_{cal}$  a kalorimetrikus entalpia,  $m$  a tömeg,  $\Delta C_T$  a járulékos fajhő értéke („excess specific heat”) a termikus átmenet,  $T_m$ , hőmérsékleténél, a  $Q_t$  pedig a fehérjék denaturációjára jellemző átmenet teljes hőmennyisége a  $T_1$ - $T_2$  hőmérséklet tartományban. A *járulékos fajhő* ( $\Delta C_T$ ) azt a fajhő mennyiséget mutatja meg, amellyel a vizsgált anyagot tartalmazó cella fajhője meghaladja az alapvonalhoz tartozó fajhőt.

$$Q_t = \int_{T_1}^{T_2} \Delta C_T(T) dT \quad (8)$$

A DSC-görbéken a denaturációnak megfelelő fázisátmenet maximális hőmérséklete az úgynevezett olvadáspont ( $T_m$ , ahol  $\Delta G=0$ ), ami a termikus stabilitás mértékét jellemzi. A denaturáció entrópia változását ( $\Delta S$ ) az olvadáspont ( $T_m$ ) hőmérsékletén kiszámíthatjuk a Gibbs-féle szabadentalpia változásra, állandó nyomáson vonatkozó összefüggésből:

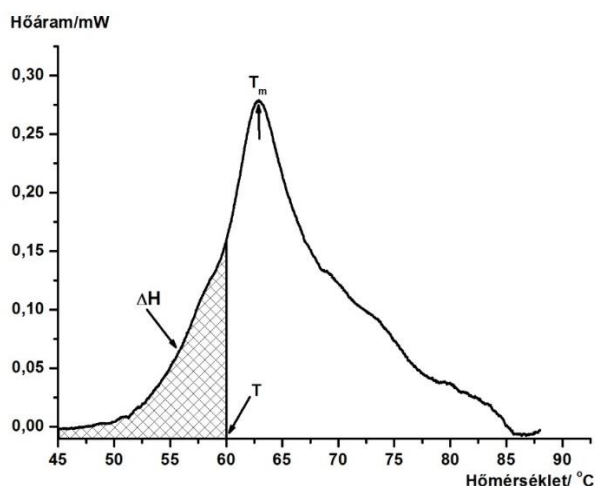
$$\Delta S = \frac{\Delta H}{T_m} \quad (9)$$

A 7. és a 8. egyenlet alapján a hőáramot két tetszőleges időpont között integrálva a görbe alatti terület szolgáltatja a kalorimetriás entalpiát. Az is megállapítható ezekből az egyenletekből, hogy a hőáramot osztva a felfűtési sebességgel, a hőkapacitás adott hőmérséklethez tartozó értéke kiszámítható.

Mélyebb termodinamikai összefüggések alapján kimutatták, hogy a vizsgált fehérje esetleg termodinamikailag különböző szerkezeti doméneket tartalmaz. A DSC-görbék kiértékelése lehetőséget ad arra, hogy ezeknek a doméneknek a járulékait meghatározzuk. Ezeknek a termodinamikailag esetleg különböző szerkezeti domének járulékait a DSC-görbékéből dekompozíciós eljárással határozhatóak meg. Az egyes szerkezeti domének átalakításához szükséges aktivációs energiák Sanchez-Ruiz és Conejero-Lara által leírt módszer (Sanchez-Ruiz és mtsai., 1988a; Conejero-Lara és mtsai., 1991a) alapján számolhatóak ki az alábbiak szerint:

$$k = vC_p / (H_t - H) \quad (10)$$

ahol  $k$  a folyamat sebességi állandója,  $v$  ( $^{\circ}\text{K}/\text{perc}$ ) a fűtési sebesség,  $C_p$  a többlet („excess”) hőkapacitás,  $H_t$  a folyamat teljes,  $H$  a kérdéses  $T$  hőmérsékletig lezajló kalorimetriás entalpiaváltozás (a 7. ábrán a sáírozott rész).



7. ábra: Sebességi állandó számolásához való szemléltetés (Sanchez-Ruiz és mtsai., 1988a).

A  $k$  sebességi állandóra vonatkozó Arrhenius-egyenlet alapján:

$$k = A e^{-\frac{E}{RT}} \quad (11)$$

ahol  $A$  konstans,  $E$  az aktivációs energia,  $R$  univerzális gázállandó és  $T$  a hőmérséklet (K). Kinetikus modelljük alapján a hőáram maximumához tartozó megfelelő termikus átmenet hőmérsékletének ( $T_m$ ) változása a következő módon függ a felfűtési sebességtől ( $v$ ):

$$\frac{v}{T_m^2} = \frac{AR}{E} e^{-E/RT_m} \quad (12)$$

továbbá a kalorimetriás entalpiát a hőmérséklet függvényében a következő egyenlet írja le:

$$\ln\left(\ln \frac{H_t}{H_t - H}\right) = \frac{E}{R} \left(\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T}\right) \quad (13)$$

Ábrázolva tehát az egyenlet bal oldalát  $1/T$  függvényében az egyenes iránytangense  $-E/R$ -t adja, amiből az aktivációs energia megkapható.

### 3.7.3.1 A DSC mérések kivitelezése

Az aktin minták hődenaturációját SETARAM Micro DSC-II és III kaloriméterek segítségével vizsgáltuk. Minden esetben  $0^{\circ}\text{C}$  -tól  $100^{\circ}\text{C}$ -ig növeltük a hőmérsékletet,  $0,3\text{K}/\text{min}$  fűtési, illetve hűtési sebességgel. A kísérleteinkhez Hastelloy mérőcellákat használtunk, egy-egy méréshez átlagosan  $850\text{-}900 \mu\text{L}$  mintát mértünk be. Az aktin

koncentrációja 3 mg/ml volt. Referenciaként MOPS-os A-puffert használtunk, ami a minták tároló puffere volt. A minta és referencia cellákat  $\pm 0,1$  mg pontossággal egyensúlyoztuk ki. A denaturálódott minta ismételt felfűtésének eredményét használtuk alapvonal-referenciaként úgy, hogy kivontuk az eredeti görbéből. Az endoterm folyamatok kalorimetriás entalpia változását ( $\Delta H$ ) a hőabszorpció görbe alatti területéből számoltuk ki, felhasználva a SETARAM csúcs integráció 2-pontos illesztő programot. Az átalakulás entalpia változását ( $\Delta S$ ) a 9. egyenlet segítségével számoltuk ki, amelyhez először az átalakulási hőmérsékletet ( $T_m$ ) határoztuk meg a görbe alapján. A Gibbs-féle szabadentalpia változást a 9. egyenlet segítségével számoltuk ki. (Kupi és mtsai., 2009)

### 3.8 Az adatok kiértékelése

A DSC görbék dekompozícióját a Jandel Scientific PeakFit 4.0 program segítségével végeztük. Jones és Molitoris statisztikai módszerét alkalmaztuk a két egyenes metszéspontjának meghatározásához (Jones és Molitoris, 1984). A módszer alkalmazásával meg tudtuk határozni azt, hogy a két egyenessel való illesztés pontosabb-e mint egy egyenes, és megadható az illesztés átlagos négyzetes hibája is. A fenti programja segítségével a DSC-görbe többlet fajlagos hőkapacitása ( $C_{p,ex}$ , ami az állandó nyomáson mért többlet fajhő, másnéven fajlagos hőkapacitás, a legtöbb esetben nem teszi ki tetemes részét az állandó nyomáson mért fajlagos hőkapacitásnak, de nem elhanyagolható) jól illeszthető egy exponenciálisan módosított Gauss-görbével.

A DSC a biológiai makromolekulák denaturációjára vonatkozó elmélete alapján a denaturációs folyamatok DSC-görbéi aszimmetrikusak, mivel a felfűtés során a natív : denaturált fehérje koncentráció arány a denaturációs folyamat kinetikai állandójától, ezáltal a denaturáció aktiválási energiájától függően, időben változik. A denaturációhoz kapcsolódó további jellemző a felfűtési sebességgel van összefüggésben. Amennyiben a felfűtési sebesség nagyobb, mint a rendszerben lezajló szerkezetváltozás kinetikájának a sebessége, akkor a szerkezet időbeli változása termodinamikailag nem-egyensúlyi állapotokon keresztül, mintegy "késleltetve" zajlik le. Ennek az a következménye, hogy az adott fehérjére jellemző hőáram-görbe maximuma magasabb hőmérsékletek felé tolódik el. Amikor a polimer eléri az olvadáspontot, több energiára van szüksége, hogy a teljes szerkezet megolvadjon, megjelenik egy endoterm csúcs a termogramon. A csúcs alatti terület energia mértékegységben megegyezik az olvadáshővel. A fehérje „olvadása” egy véges szélességű csúcsot ad, mivel a minta teljes átolvadásához időre van szükség, nem egy időpillanatban játszódik le, ez magyarázhatja a késleltetve illetve a magasabb hőmérsékletek felé eltolódva megjelenő

olvadáspontot. A csúcs felfutó része jó közelítéssel egyenes, majd az olvadás befejeződésével a mért jel hirtelen nullára esik vissza. Az olvadáspont nyilván ott kell legyen, ahol a csúcs elkezdődik. Ennek pontos meghatározása azonban nem lehetséges, így a csúcs felfutó részének állandó meredekségű szakaszára illesztett egyenesnek az alapvonallal való metszetét szokás olvadáspontnak tekinteni. Az olvadáshő a  $w(t)$  görbe idő szerint integrálja a minta tömegével normálva. A mért termogramokat összehasonlítottuk a szimulációval létrehozottakkal, felhasználva a számolt hőkapacitás értékeket a Sanchez-Ruiz és Conejero-Lara által leírt módszer alapján (Conejero-Lara és mtsai., 1991b; Sanchez-Ruiz, 1992; Kupi és mtsai., 2009). A szimulációval létrehozott hő átalakulási görbék körülbelül megfelelnek a mérési adatok alapján szerkesztett görbék adataival. A termogramokból nyert adatokat a Microcal Origin Program segítségével dolgoztuk fel.



## 4. Eredmények

### 4.1 A kötött nukleotidok hatásának vizsgálata

#### 4.1.1 EPR mérések

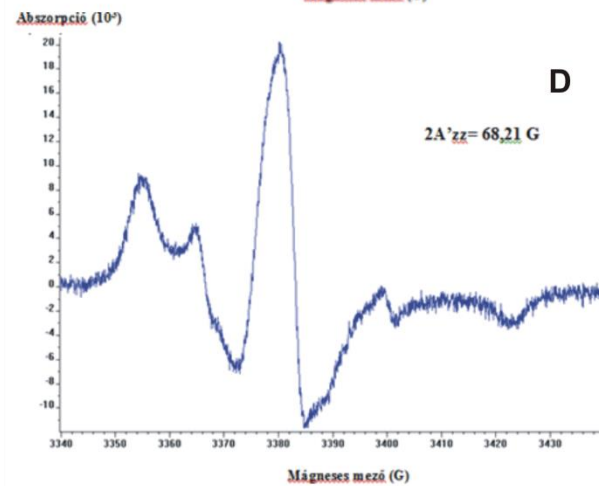
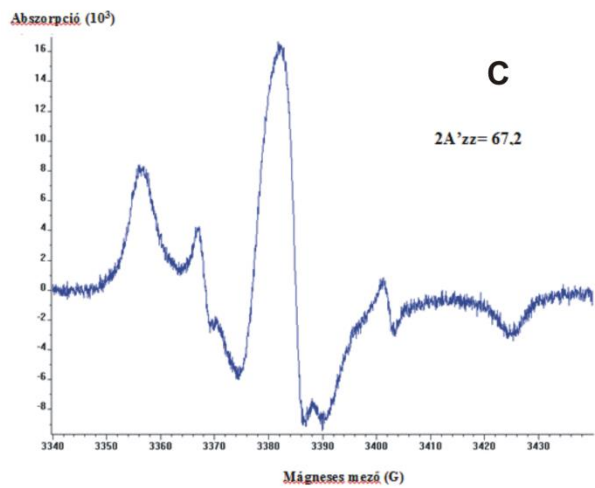
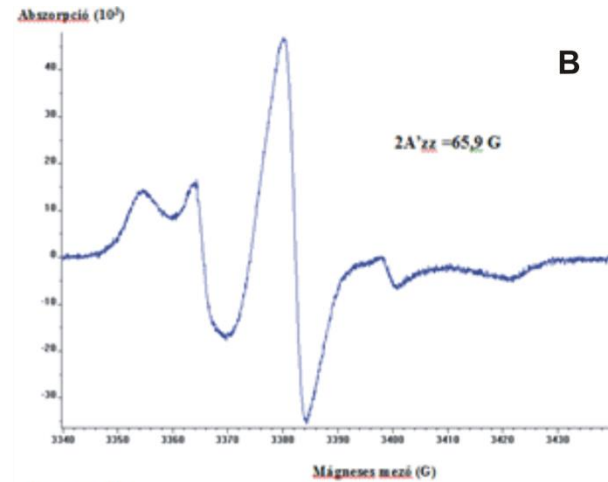
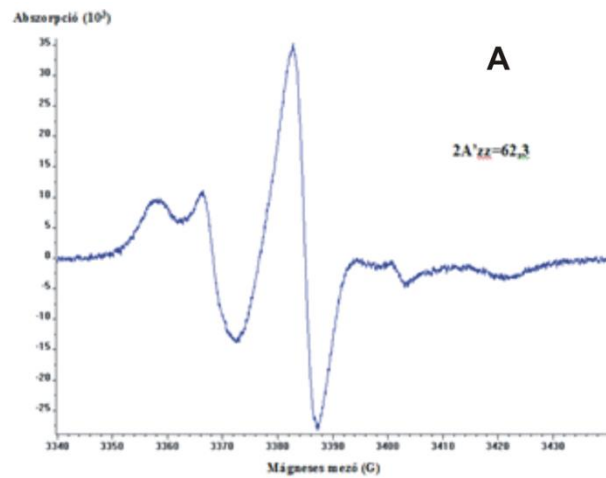
A nukleotidcsere hatására bekövetkező konformációs és dinamikai változásokat figyeltem meg a monomer és a filamentális aktin szerkezetében EPR technika alkalmazásával. Korábbi eredmények alapján az MSL spinjelölő mereven kötődik az aktin Cys-374-es aminosavához (Thomas és mtsai., 1979), ezért a spektrumokat maleinimid spinjelölőt használva vettük fel. Az EPR spektrumok az abszorpciós spektrumok első deriváltjai, ami a mérés technikai megvalósításra vezethető vissza. Ezek egyszerű kiértékelésekor, más spektroszkópiákhoz hasonlóan, az extremumok közötti távolságokat, vagy a vonalszélességeket szokás meghatározni. A vonalak közötti távolságok alapján meghatározható az úgynevezett hiperfinom csatolás (hiperfinom felhasadás) értéke<sup>6</sup>. A meghatározott hiperfinom felhasadásoknak megfelelő értékeket, vagy az azok alapján számolt rotációs korrelációs időt használhatjuk fel a vizsgált fehérje kölcsönhatásainak és forgási tulajdonságainak jellemzésére. (A "fehérje" kifejezés azonban *csak* egy meghatározott szegmenst is jelenthet.) Amennyiben a spinjelölő és a vizsgált fehérje közötti kapcsolat "*rigidnek*" vehető, úgy a hiperfinom felhasadások értékeiből számolhatjuk a fehérjére jellemző rotációs korrelációs időt. A kötött nukleotidok vizsgálatára vonatkozó általam mért, reprezentatív spektrumokat állítottam össze a 8. ábrán. A mérési eredményeknek megfelelő hiperfinom felhasadás értékeket illetve a megfelelő rotációs korrelációs időket az 1. táblázatban foglaltam össze.

Az ATP-t tartalmazó monomer G-aktinon mért konvencionális EPR spektrumok hiperfinom csatolási értéke szobahőmérsékleten 62,3 G-nak adódott<sup>7</sup>. Az ebből az értékből Goldman és mtsai. alapján (Goldman és mtsai., 1972) kiszámított rotációs korrelációs idő  $1,45 \cdot 10^{-8}$  sec. Az AMP.PNP-G-aktin hiperfinom csatolási állandója szobahőmérsékleten  $2A'_{zz} = 65,9$  G, míg az ATP-G-aktin hiperfinom csatolási állandója  $2A'_{zz} = 62,3$  G.

---

<sup>6</sup> A hiperfinom felhasadás értékeket a mágneses indukció egységeiben (mTesla-, vagy Gauss) is kifejezhető. Néhány irodalmi hivatkozásban a frekvencia-egységeket is használják.

<sup>7</sup> A Goldman-közelítésre adott összefüggés rámutatott, hogy minél közelebb van a mért hiperfinom felhasadás értéke a "rigid limit"-hez, annál lassabb a molekula forgása.



8. ábra A.: Az ATP-G-aktin EPR spektruma; B.: Az AMP.PNP-G-aktin EPR spektruma; C.: Az ADP-F-aktin EPR spektruma; D.: Az AMP.PNP-F-aktin EPR spektruma (Turner és mtsai., 2012)

Az aktinhoz kötődő ATP cseréje AMP.PNP-re tehát a hiperfinom csatolási állandó növekedését eredményezte mind G-aktin, mind F-aktin esetén. G-aktint vizsgálva a nukleotid csere a Cys374 környezetében levő jelölő rotációs korrelációs idejét is  $1,45 \cdot 10^{-8}$ sec-ról  $4,94 \cdot 10^{-8}$ sec-re növelte. Ez a mintegy 3,6 G, illetve  $3,49 \cdot 10^{-8}$ sec különbség a nukleotid csere által a monomer aktinban bekövetkezett jelentős mértékű változásra utalhat. A G-aktinhoz képest kisebb, de — az EPR-spektrumok hiperfinom csatolási értékei leolvasási pontosságával ( $\sim 0,3$  G) összevetve — jellemző különbséget találtunk az ADP-F-aktin ( $2A'_{zz} = 67,20$  G és  $1,39 \cdot 10^{-7}$  sec) és az AMP.PNP-F-aktin ( $2A'_{zz} = 68,21$  G és  $2,53 \cdot 10^{-6}$ sec) rotációs dinamikája között. Ezek szerint az ADP AMP.PNP-re való cseréje által okozott változás megfigyelhető a filamentális aktin belső rigiditásában is, de ez kisebb mértékű, mint a G-aktin esetén. (A 8. ábrán bemutatott spektrumokon az előzőekben említett hiperfinom csatolási értékek a legszélső extrémumok között mérhetőek.) A tapasztalt eltérő mértékű változásokat a megbeszélés fejezetben tovább elemzem.

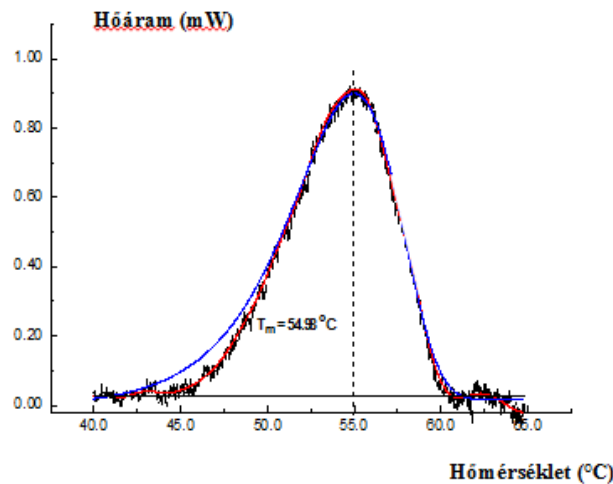
1. táblázat EPR méréseink eredményeinek összefoglalása

<b>kötött nukleotid-aktin</b>	<b>Hiperfinom csatolási állandó</b>	<b>Rotációs korrelációs idő</b>
<b>ATP-G-aktin</b>	62,3 G	$1,45 \cdot 10^{-8}$ sec
<b>AMP.PNP-G-aktin</b>	65,9 G	$4,94 \cdot 10^{-8}$ sec
<b>ADP-F-aktin</b>	67,2 G	$1,39 \cdot 10^{-7}$ sec
<b>AMP.PNP-F-aktin</b>	68,2 G	$2,53 \cdot 10^{-6}$ sec

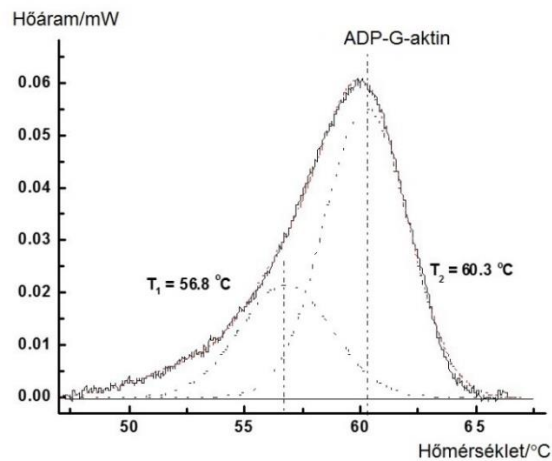
#### 4.1.2 DSC mérések

A korábban az ATP-G-aktin denaturációjára vonatkozó mérések  $T_m$ -jéhez képest (9. ábra, Lőrinczy és Belágyi, 1995b; Lőrinczy és mtsai., 1998) az ADP-G-aktin közel  $60^\circ\text{C}$ -on "unfoldingot" mutat (10. ábra), amely arra utal, hogy a nukleotidkötő zseb környéke termikusan stabilabb konformációt vesz fel ebben az esetben<sup>8</sup>.

<sup>8</sup> Ebben a fejezetben bemutatott ábrák a mért és alapvonal-korrigált termogramokon kívül a dekompozícióval illesztett görbéket is tartalmazzák. Az illesztett eredő görbék a folytonos vonalak, a szaggatott vonalak pedig az egyes komponenseket jelenítik meg.



9. ábra Az ATP-G-aktin DSC görbéje (Turner és mtsai., 2012)

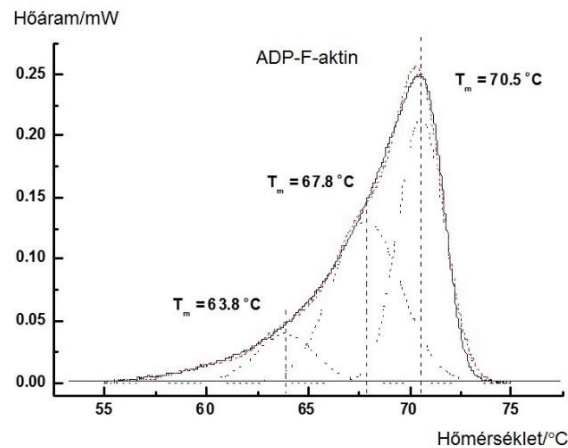


10. ábra: Az ADP-G-aktin denaturációja. (Lőrinczy és Belágyi, 1995b; az ábra a szerzők hozzájárulásával reprodukálva)

ADP-F-aktin denaturációjára felvett DSC-görbe (11. ábra) azt mutatja, hogy a polimerizációt követően az ADP-F-aktin szerkezete a G-aktinhoz képest jobban ellenáll a hődenaturációnak: szerkezete stabilabb, azaz a denaturációs hőmérséklete magasabb hőmérsékleten van. Vizsgálataink szerint az ADP-F-aktin a magasabb denaturációs hőmérséklet mellett nagyobb szerkezeti kooperativitást is mutat. A DSC-görbék analízisére vonatkozó irodalmi ismeretek szerint ez a denaturációs hőmérséklettartomány kisebb félértékszélességével<sup>9</sup>,  $T_{1/2}$ , jellemezhető. Minél kisebb a hődenaturációs átmenet DSC-

<sup>9</sup> A félértékszélességet a hőáramgörbe maximum értékének felénél, a maximumhoz képest annak két oldalán levő hőmérsékleti metszéspontok között mérjük. A két hőmérséklet különbségének fele egyenlő a félértékszélességgel.

görbéjének a félértékszélessége, annál nagyobb a szerkezeti kooperativitás. Ezt a jelenséget mutatja a 11. ábra, a 10. ábrával összehasonlítva.

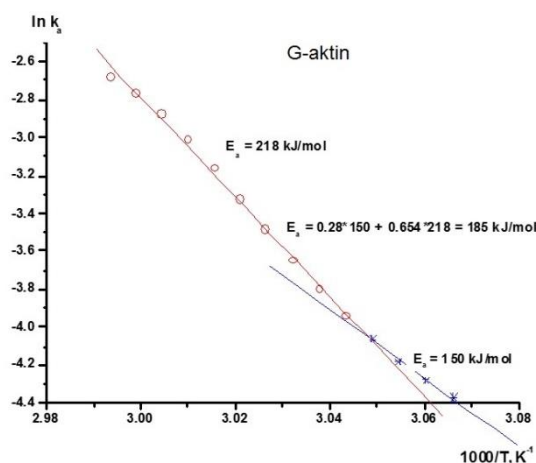


11. ábra: Az ADP-F-aktin termikus denaturációja. (Lőrinczy és Belágyi, 1995b; az ábra a szerzők hozzájárulásával reprodukálva)

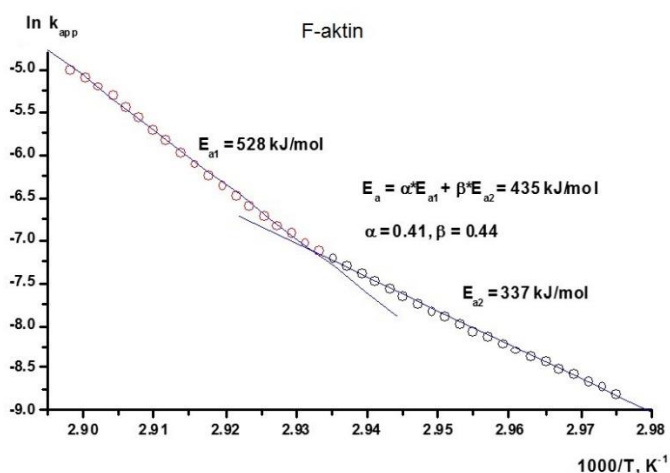
A 9-11. ábrákból látható, hogy a G- és az F-aktin termikus denaturációja komplex folyamat, több elkülöníthető termikus doménnel, különböző termikus paraméterekkel.

Eredményeink szerint a lehetséges termikus domének — figyelembe véve a különböző szerkezet és fehérje dinamikai szimulációkat (Lőrinczy és Belágyi, 1995a; Lőrinczy és mtsai., 1998) — ADP-G-aktin esetében az első dekonvolúciós járulékok (10. ábra,  $T_m = 56,8$  °C) a szubdomén 2 és 4-től, míg a  $60,3$  °C átmenet a szubdomén 1 és 3-at reprezentálja. Az utóbbi szerkezeti egységek hasonló módon épülnek fel: egy központi ötszálú  $\beta$ -lapot három  $\alpha$ -hélix vesz körül, valószínűleg a gén-duplikáció és fúzió eredményeként (Kabsch és Holmes, 1995).

ADP-F-aktin esetében a dekompozíció három termikus domént eredményez, nagyobb össz-kalorimetriás entalpiával (11. ábra). A keskenyebb denaturációs hőmérséklet tartomány ( $\sim 20$  °C a G- és  $15$  °C az F-aktin esetében) az erősebb intermonomer kölcsönhatás eredménye, amely a  $70,5$  °C-os átmenetben jelenik meg dominánsan. A középső átmenet ( $67,8$  °C) az 1 és 3 szubdomének termikus denaturációját reprezentálja, és érdekes, hogy a fő átmenet kalorimetriás entalpiája igen jól egyezik az EPR adatokból számolt van't Hoff entalpiával (Lőrinczy és mtsai., 1998.). Az intermonomer erők hasonló hatása és a lehetséges termikus domének az aktivációs energiákból ( $E_a$ ) is láthatóak, amelyeket Sanchez-Ruiz módszere szerint (Sanchez-Ruiz és mtsai., 1988b) számoltunk (lásd 12. és 13. ábra):



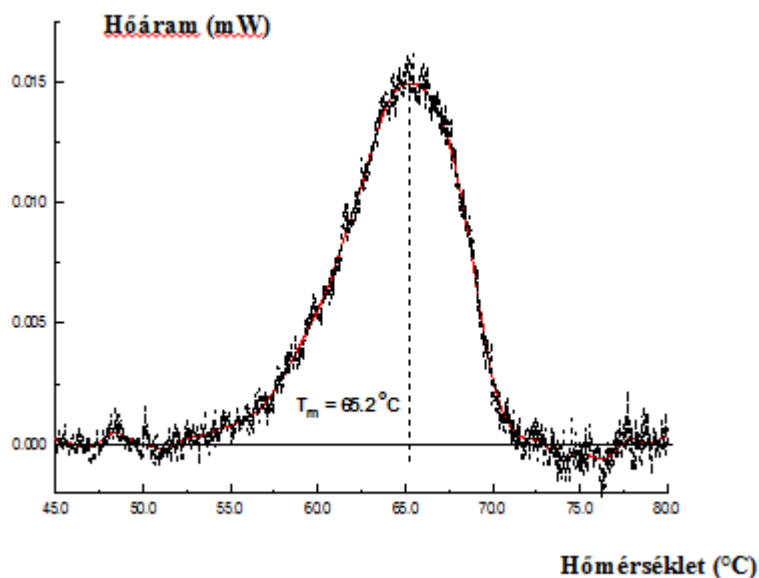
12. ábra: ADP-G-aktin termikus doménjei aktivációs energiája. (Lőrinczy és Belágyi, 1995b; az ábra a szerzők hozzájárulásával reprodukálva)



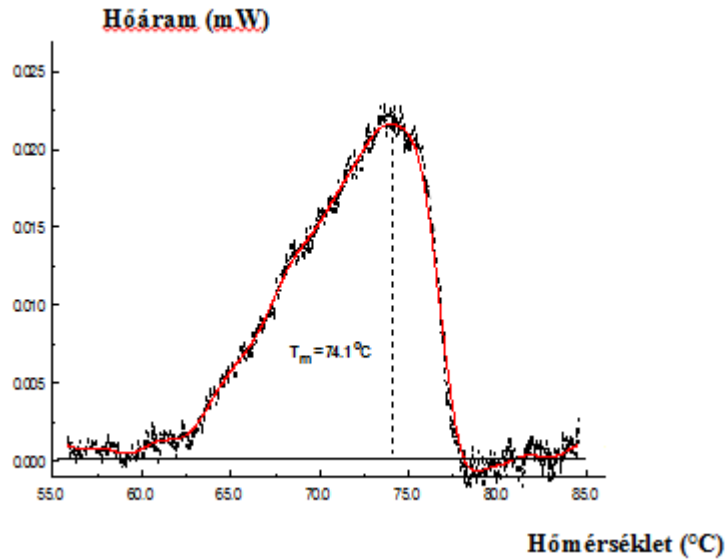
13. ábra: ADP-F-aktin alegységeinek aktivációs energiája. (Lőrinczy és Belágyi, 1995b; az ábra a szerzők hozzájárulásával reprodukálva)

Az AMP.PNP-t kötő globuláris, illetve filamentális aktin denaturációs hőmérséklete szignifikánsan nagyobb (AMP.PNP-G-aktin esetében:  $T_m = 65,2 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $c = 70 \text{ } \mu\text{M}$ ; AMP.PNP F-aktin esetében  $T_m = 74,1 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $c = 100 \text{ } \mu\text{M}$ ), mint az ATP-G-aktiné ( $T_m = 55 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $c = 100 \text{ } \mu\text{M}$ ) illetve az ADP-F-aktiné ( $T_m = 67,8 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $c = 120 \text{ } \mu\text{M}$ ), a nukleotidcserét tehát feltehetően a kötőzseb és környezetében szerkezeti átalakulás kíséri. A biológiai minták szerkezeti egységeinek termikus stabilitását (vagyis hőenergia közléssel történő megváltoztatását) az ún. „melting” (olvadási vagy denaturációs hőmérséklet  $T_m$ ) egyértelműen jellemzi. Kimutatható,

hogy a  $T_m$ -nek megfelelő hőmérsékleten a minta 50%-a, az ún. natív konformációból, denaturált állapotba alakul át. Ezért a magasabb denaturációs hőmérséklet AMP.PNP-G-aktin esetében (14. ábra) az ATP-G- és ADP-G-aktinhoz (9. és 10. ábrák) képest termodinamikailag stabilabb állapotot jelent. A stabilabb állapot létrejöttét az AMP.PNP-nek a nukleotidkötő zsebbe történő beépülésének tulajdoníthatjuk. Ugyanakkor, nem zárható ki, hogy ezt a különbséget az AMP.PNP-G-aktin esetében részleges polimerizáció is okozhatja. A kísérleti eredmények alapján a kezeletlen G-aktin denaturációja 45 °C-nál, míg az AMP.PNP-vel kezelt esetben ez ~55 °C-nál kezdődik, a denaturáció befejeződése pedig ~60 °C helyett 70 °C. Az AMP.PNP-G-aktin esetén (14. ábra) a  $T_m$  értéke (65,2 °C) nőtt, félértékszélessége (~5 °C) pedig csökkent a natív G-aktinhoz képest.



14. ábra Az AMP.PNP-G-aktin DSC görbéje (Turner és mtsai., 2012)



15. ábra Az AMP.PNP-F-aktin DSC görbéje (Turner és mtsai., 2012)

Az F-aktin AMP.PNP-vel történő kezelése (15. ábra) szintén  $T_m$  emelkedést (67,5-ről 74,1 °C-ra), kismértékben megnövekedett denaturációs hőmérséklet tartományt (10-ről 12,5 °C-ra) eredményezett, amely jelen esetben az AMP.PNP globális szerkezet erősítő hatására utal.

DSC méréseink eredményeit a 2. táblázatban ismertetem. Az adataink azt mutatják, hogy az aktin hőmérsékleti stabilitása szoros összefüggésben áll az általa kötött nukleotid típusával:

2. táblázat DSC méréseink eredményeinek összefoglalása.

<i>kötött nukleotid-aktin</i>	<i>Olvadási hőmérséklet (°C)</i>	<i>Koncentráció (μM)</i>
<b>ATP-G-aktin</b>	55,0	100
<b>AMP.PNP-G-aktin</b>	65,2	70
<b>ADP-F-aktin</b>	67,8	120
<b>AMP.PNP-F-aktin</b>	74,1	100

A megnövekedett olvadási hőmérsékletek az AMP.PNP-t kötő aktinok esetében a lokális belső mozgások és konformációs változások lejátszódására – amelyeket már az EPR mérésekkel kimutattunk – engednek következtetni. Ezek a megváltozott szerkezeti tulajdonságok együtt jártak a globális mozgásokban, illetve a fázisátmenetekben bekövetkezett változásokkal is. DSC méréseink és EPR méréseink eredményei korrelálnak egymással. Kalorimetriás méréseink eredményei is azt tükrözik, hogy az F-aktin esetében kisebb mértékű változás ment végbe a nukleotidcsere hatására, mint a G-aktin esetén.



## 4.2 Kötegelő fehérjék hatásának vizsgálata

EPR technika segítségével megvizsgáltuk a kötegelő fehérjék és az aktin kölcsönhatását is. Konvencionális, és szaturáció transzfer EPR technikát egyaránt alkalmaztunk. A globuláris és a filamentális aktin különböző rotációs diffúziós és flexibilitási sajátságokkal rendelkeznek. A konvencionális EPR spektrumokból információt kaphatunk a gyors, nanoszekundumos időskálán lejátszódó mozgásokról, míg a szaturáció transzfer mérések a jóval lassabb, mikroszekundumos időskálán zajló mozgásokat jellemzik. Az aktin monomer rotációs korrelációs ideje mérete miatt hozzávetőlegesen 15-20 nanoszekundum. A domének mozgása a monomereken belül valamivel gyorsabb, néhány nanoszekundumos skálán mozog. A protomerek korlátozott mozgása a polimerizáció után sokkal összetettebb, de általában elég gyors, szintén néhány tíz nanoszekundum. A filamentumok néhány aktin protomerekből felépülő nagyobb egységeinek mozgása a néhány száz nanoszekundumos skálán mozog.

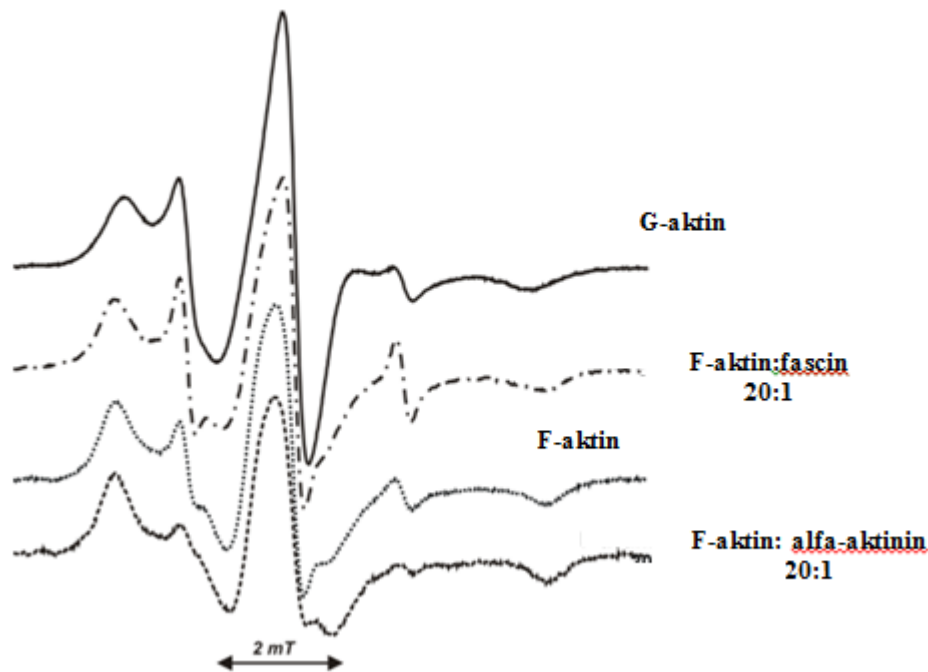
A filamentum képes csavarodó és görbülő mozgásokra is az aktuális konformációjától és környezetétől függően. Ezek a mozgások jóval lassabbak, mint amiket már korábban említettem, és a rájuk jellemző rotációs korrelációs idő általában a mikro-, vagy akár a milliszekundumos tartományba esik.

A konvencionális EPR spektrumok az aktin filamentumokon belül lezajló gyors, nanoszekundumos skálán zajló molekuláris mozgásokról, míg a szaturáció transzfer mérések az aktin filamentumok szerkezetében a fascin és az alfa-aktinin kötődése által okozott változásokról nyújtanak információt számunkra, amelyek jóval hosszabb, mikroszekundumos időtartományba esnek. A két módszer párhuzamos alkalmazása által különbséget tehetünk a kötött kötegelő fehérjék az aktin protomerek szerkezetére gyakorolt hatása és a filamentumok közötti kapcsolódások kialakulásának az egész aktin filamentum lassabb mozgásaira való hatása között.

### 4.2.1 A konvencionális EPR mérések

A konvencionális EPR spektrumok felvétele az aktinkötegelő fehérjék hiányában vagy jelenlétében történt. A 16. ábrán láthatóak méréseink eredményei az aktin monomerek, aktin filamentumok, valamint a fascin és alfa-aktinin által kötegelt aktin filamentumok (aktin: kötegelő fehérjék aránya 20:1) esetében. A kötegelő fehérjék hiányában a hiperfinom csatolási állandó ( $2A_{max} \pm SEM$ ) értéke  $6,400 \pm 0,006$  mT ( $n = 12$ ) az aktin monomer esetében és  $6,800 \pm 0,027$  mT ( $n = 15$ ) a filamentum esetében. Mindkét érték jól egyezik a korábban mért adatokkal és megmutatja, hogy a spinjelölt aktin monomerek egyesültek filamentummá a polimerizáció alatt. Amikor alfa-aktinint adtunk a filamentumokhoz 20 : 1 aktin: alfa-aktinin

koncentrációs arányban, a hiperfinom csatolási állandó megnövekedett mintegy  $\sim 0,05$  mT (0,5 G)-val. A fascin esetében (20 : 1) ez a paraméter mintegy  $\sim 0,06$  mT (0,6 G)-val csökkent. Az ellentétes hatás az alfa-aktinin és a fascin esetében jelzi, hogy ezek a kötegelő fehérjék megváltoztatják az aktin szerkezetét, de két különböző úton.



16. ábra: Az MSL-jelölt aktin illetve annak a kötegelő fehérjékkel képzett komplexeinek EPR spektrumai. A G-és F-aktin koncentrációja  $50 \mu\text{M}$ , míg a képzett komplexekben a végső aktin koncentráció  $40 \mu\text{M}$  volt. A fehérjék moláris arányait az ábrán jelöltük (Turner és mtsai., 2015a).

A hiperfinom csatolási állandó érzékeny a fehérje flexibilitásának, a spinjelölő környezetének, illetve a fehérjedomének (amely felfogható egy együtt rotáló egységként) effektív sugarának megváltozására. Az MSL spinjelölő mereven köt az aktin Cys-374-es aminosavához, ezért a mi esetünkben a változások a  $2A_{max}$  értékekben az effektív sugár vagy a flexibilitás megváltozásának tulajdoníthatóak, amelyeket a kötegelő fehérje kötődése váltott ki.

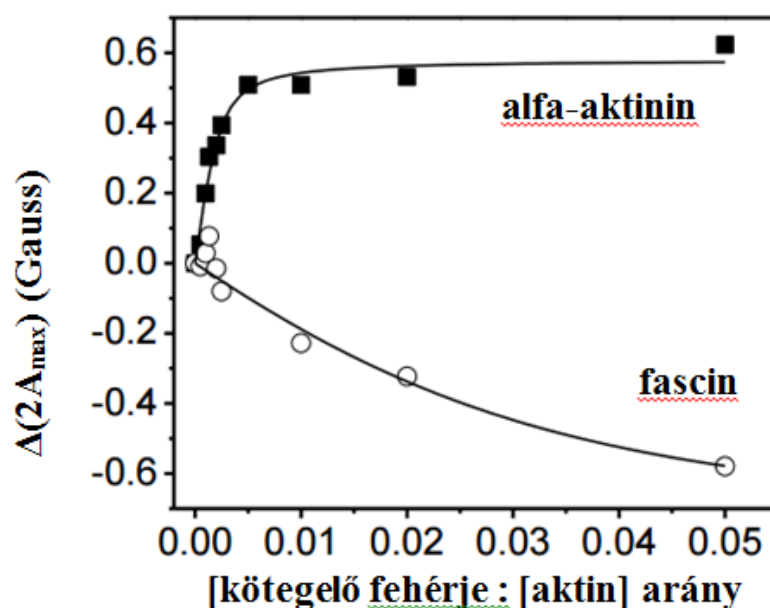
Habár az effektív rotáló sugár megváltozása a megnövekedett moláris tömeg következménye is lehet, mi úgy gondoljuk, hogy a megnövekedett tömeg hatása nem indokolja az általunk megfigyelt változásokat a hiperfinom csatolásban. A kötegelő fehérjék viszonylag kis koncentrációban voltak jelen a mintákban (20 : 1) és ezért az egyes aktin filamentumok tömegének növekedése a kötegelő fehérjék kötődése után túl csekély ahhoz, hogy megfigyeléseinket indokolja. Másrészt a hiperfinom csatolási állandó csökkent a fascin kötődése után, ez éppen az ellenkezője annak, amit az össztömeg növekedése esetén

figyelhetnénk meg.

Az eredmények értelmezése azt mutatja, hogy az aktinkötő fehérjék megváltoztatták az aktin protomerek szerkezetét a filamentumokban. Ez a megváltozott konformáció eredményezhette a filamentum flexibilitásában és a polaritásában bekövetkezett változásokat.

A nagyobb hiperfinom csatolási állandók az aktin-alfa-aktinin komplex esetében jelzik, hogy az aktinon belüli intramolekuláris mozgások lassabbá váltak tükrözve a sokkal rigidebb aktin szerkezet létrejöttét vagy a polaritás csökkenését a spinjelölő molekula környezetében. A kisebb hiperfinom csatolási állandók az aktin-fascin komplexek esetében jelzik az ellentétes hatást: sokkal flexibilisebb fehérje mátrix jelenlétét az aktinban a spinjelölő környezetében vagy a spinjelölő molekula környezetében a polaritás csökkenését.

Hogy tovább vizsgálhassuk az aktinkötő fehérjéknek a filamentumokra gyakorolt hatását, megismételtük a konvencionális EPR méréseket különböző fascin és alfa-aktinin koncentrációk mellett. Az ezekből a kísérletekből kapott hiperfinom csatolási állandók a 17. ábrán láthatóak. A  $2A_{max}$  különbségeinek hangsúlyozása miatt a kötegelő fehérje hiányában meghatározott értéket kivontuk a kötegelő fehérje jelenlétében mért értékből. Abban az esetben, ha alfa-aktinint adtunk az aktin filamentumokhoz, a hiperfinom csatolási állandó értéke telítődött a már viszonylag alacsony alfa-aktinin koncentrációk esetében, azaz már körülbelül a 200 : 1-hez aktin: alfa-aktinin arány esetében. Fascinnal végzett méréseink során a hiperfinom csatolási állandó koncentráció függése sokkal kevésbé meredek és nem ért telítésbe a legmagasabb vizsgált fascin koncentrációnál (5  $\mu\text{M}$ ) sem, ahol az aktin: fascin arány 20 : 1 volt. Erre a jól látható eltérésre valószínűleg a két kötegelő fehérje által létrehozott filamentum-kötegek szerkezetében levő különbségek adhatnak magyarázatot.



17. ábra A hiperfinom csatolási állandó függése a kötegelő fehérjék koncentrációjától (Turner és mtsai., 2015a).

A  $2A_{max}$  különbségeit úgy számoltuk ki, hogy a mért  $2A_{max}$  és a kötegelő fehérje nélkül mért  $2A_{max,0}$  értékeket kivontuk egymásból az adott F-aktin minták esetében. Az  $x$  tengely mutatja a kötegelő fehérjék (fascin esetében üres körök és alfa-aktinin esetében sötét négyzetek) koncentrációjának és az aktin monomerek koncentrációjának arányát. Az alfa-aktinin minták esetében az aktin koncentráció  $50 \mu\text{M}$ , míg a fascin minták esetében  $40 \mu\text{M}$  volt.

#### 4.2.2 Szaturáció transzfer EPR mérések

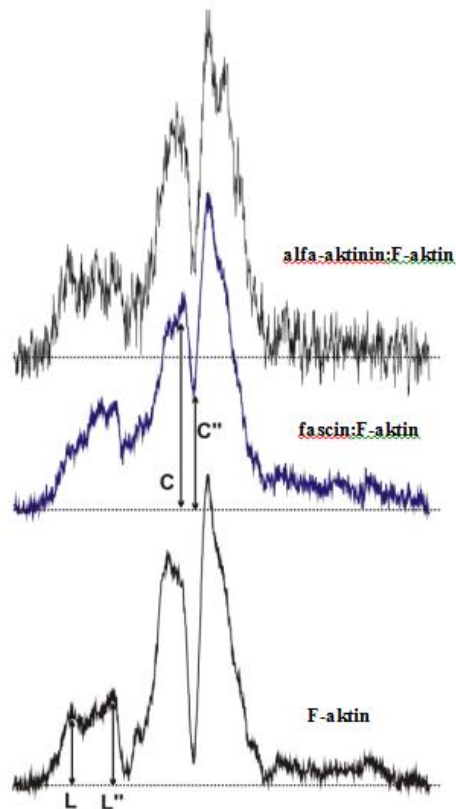
Az eddigiekben ismertetett konvencionális EPR méréseink azt mutatták, hogy mind az alfa-aktinin, mind a fascin megváltoztatja a gyorsabb molekuláris mozgásokat a nanoszekundumos időskálán, és a hatásuk ellentétes. Munkatársaink korábbi munkái alapján, amit a formin-aktin komplexekkel végeztek (Kupi és mtsai., 2009), azt tapasztalták, hogy a lokális konformáció változások elkülöníthetőek a globális változásoktól az aktin filamentumon belül. Annak érdekében, hogy további információhoz jussunk, és hogy ellenőrizzük, hogy a kötegelő fehérjék által indukált változásoknak van-e hasonló hatása az egész aktin filamentumra, elvégeztünk szaturáció transzfer EPR méréseket is. Összehasonlítva a konvencionális EPR módszerrel, az ST-EPR képes tükrözni a molekuláris mozgásokat a jóval hosszabb (mikroszekundumos) időskálán, és segítségével képesek vagyunk meghatározni a rotációs időket jellemezve a torziós csavarodó vagy tekeredő mozgásokat az aktin filamentum

egészében. Az ST-EPR spektrumok kiértékelése szférikus (gömb alakú) rigid rotátorok forgó mozgásán alapszik, amelyben elméleti számolások segítik elő a közel pontos korrelációs idők meghatározását. Aszimmetrikus rotátorok esetében (mint az aktin filamentumok), a molekuláris mozgások korrelációs idő segítségével történő jellemzése csak megközelítőleg lehetséges. A gélfázisú fehérje rendszerek magasan anizotrop rotációs diffúziójának kísérletes vizsgálata és elméleti megközelítése is arra enged következtetni, hogy az  $L''/L$  és a  $C''/C$  diagnosztikus paraméterek különböző szenzitivitást mutatnak a rotációs diffúzió megváltozásával szemben a mikroszekundumos időskálán. Megállapították, hogy a  $C''/C$  diagnosztikus paraméter sokkal érzékenyebb indikátor a rotációs mozgások változására a fent említett rendszerekben. Ráadásul gél fázisban a láncban végbemenő torziós oszcilláció is hozzájárul a detektált ST-EPR jelhez. Ezért egyetértésben a mi és mások korábbi munkáival (Kupi és mtsai., 2009) az  $L''/L$  és a  $C''/C$  diagnosztikus spektrális paramétereket használtuk, hogy következtetéseket vonjunk le arról, hogy az aktin filamentum torziós mozgására milyen hatással van a kötegelő fehérjék kötődése (18. ábra). Amennyiben a kötegelő fehérjék hatására egy rigidebb belső struktúra alakult ki, az jól látható a rotációs mozgások lassulásából, azaz a fenti diagnosztikus paraméterek növekedéséből. Ezen paraméterek magasabb értékei ezen felül hosszabb (lassabb) korrelációs időket tükröznek. Az adatokat, amelyeket fent említett méréseinkből kaptunk, a 3. táblázatban foglaltuk össze

Az aktin filamentumok esetében, kötegelő fehérje hiányában hasonló  $L''/L$  és  $C''/C$  ( $1,2 \pm 0,013$  és  $0,12 \pm 0,024$ ) értékeket mértünk, mint a korábbi tanulmányok (Kupi et al., 2009). Amennyiben fascin kötött az aktin filamentumokhoz, az  $L''/L$  és  $C''/C$  értékei  $1,6 \pm 0,015$  és  $0,6 \pm 0,017$  voltak, amelyek a csökkent aktin filamentum flexibilitására utalnak. Az alfa-aktinin kötődése esetében a  $C''/C$  paraméter hasonló csökkenést ( $C''/C=0,419 \pm 0,013$ ) mutatott a rotációs mozgásban, mint a fascin esetében. Sok kísérleti eredmény ellenére, az aktin filamentumokhoz kötött alfa-aktinin esetében az  $L''/L$  ( $1,2 \pm 0,013$ -ról  $1,6 \pm 0,015$ -re) változása nem mutat kétségtelen változást a molekuláris mozgásokban.

Összehasonlítva az effektív korrelációs időket, amelyeket vagy az  $L''/L$  vagy a  $C''/C$  paraméterekből kiszámíthatunk, világos, hogy szignifikáns különbségeket mutatnak, ahogy azt vártuk az aktin filamentum aszimmetrikus molekuláris komplexe esetében. Hasonló mintázatot fedeztek fel munkatársaink korábban az aktinhez kötött formin esetében mért korrelációs időknél (Kupi és mtsai., 2009), ahol az  $L''/L$   $0,916 \pm 0,05$ -ről  $1,179 \pm 0,08$ -ra növekedett a formin kötődésének következményeként. A  $C''/C$  paraméterekből számított korrelációs időkben megmutatkozik a filamentum aszimmetrikus torziós mozgása, amely megnövekedett a fascin-aktin komplex miatt, az alfa-aktinin-aktin komplex esetében azonos változásokat fedeztünk fel

a  $C''/C$  diagnosztikus paraméterből nyert korrelációs idők segítségével (3. táblázat).



18. ábra A spin jelölt F-aktin ST-EPR spektrumai a kötegelő fehérjék hiányában illetve jelenlétében. Az  $L''/L$  és a  $C''/C$  arányokat a spektrumokon jelölt részek segítségével határoztuk meg (Turner és mtsai., 2015a).

3. táblázat Az ST EPR spektrumokból kinyert paraméterek.

<i>ST paraméterek</i>	<i>Aktin filamentum</i>	<i>Alfa-aktinin:aktin (1:20)</i>	<i>Fascin:aktin (1:20)</i>
$L''/L$	$1,214 \pm 0,013$	$0,846 \pm 0,045$	$1,582 \pm 0,015$
$\tau_{L''/L} [\mu S]$	$255 \pm 15$	$77 \pm 15$	$920 \pm 80$
$C''/C$	$0,120 \pm 0,024$	$0,419 \pm 0,013$	$0,606 \pm 0,017$
$\tau_{C''/C} [\mu S]$	$8 \pm 1$	$24 \pm 2$	$59 \pm 5$
$2A_{max}$ (mT)	$6,796 \pm 0,0265$	$+0,05$	$-0,06$

A  $L''/L$  vagy  $C''/C$  kapott értékek növekedtek a fascin illetve az alfa-aktinin kötődése után, jelezve, hogy a mikroszekundumos időskálán a molekuláris mozgások lassabbak voltak az aktin filamentumban a kötegelő fehérjék kötődése után. A filamentum lassabb mozgásának oka az lehet, hogy az aktin filamentum merevebbé vált. Ugyanakkor lehet a következménye a kötegekben a filamentumok közötti kapcsolatok kialakulásának is.

Annak érdekében, hogy összehasonlítsuk a hatásokat, amelyeket megfigyeltünk a konvencionális és az ST EPR technika segítségével, feltételezzük két kapcsolt és párhuzamos

esemény lejátszódását, amely követi a kötegelő fehérjék kötődését az aktinhoz. Az egyik – amelyet a konvencionális EPR technika segítségével detektáltunk – módosítja az aktin protomerek sorozatának szerkezetét az aktin filamentumon belül. A másik – amelyeket az ST EPR technika segítségével figyeltük meg- filamentum szinten vagy akár szupramolekuláris szinten hat. A második hatás eredményezi az aktin filamentum torziós csavarodását illetve tekeredését. Továbbá az aktin filamentum kötegek kialakulása visszahathat a filamentumok közötti kapcsolatokra, változásokat előidézve a vizsgált protomerek mennyiségében.

A fascin-aktin komplexek perzisztencia hosszának mérésekor az aktin filamentum kötegek hajlító merevsége sokkal nagyobb volt, mint az egyes aktin filamentumoké (Takatsuki és mtsai., 2014). Ez a megfigyelés a megnövekedett számú párhuzamos filamentumnak és ezen filamentumok (magasabb fascin-aktin arányok esetében) megnövekedett számú kapcsolódásainak tulajdonítható. A torziós (csavarodási) szilárdságot úgy határozták meg, mint a Brown-féle torziós mozgás direkt megjelenítése. Munkánk alapján úgy véljük, hogy a hajlító szilárdság és a torziós szilárdság függetlenek egymástól, legalábbis abban az esetben, amikor ezeket a paramétereket az aktinban lejátszódó kation-függő változások értelmezésére használjuk. A szaturáció transzfer EPR technika segítségével megfigyeltük a mikroszekundumos időskálán lejátszódó lassabb molekuláris mozgásokat, a fascin vagy az alfa-aktinin kötődése után. A korrelációs idő csökkenése, amelyet a megfigyelt anizotrop rotációs diffúzió diagnosztikus paraméterei fejeznek ki, párhuzamban áll a megnövekedett hajlító vagy a megnövekedett torziós rigiditással.

Az általunk javasolt modell feltételezi hosszú együttműködő egységek létezését, amelyek hasonló konformációs változásokon mennek át az egyes aktin protomerekben egyidejűleg. További méréseink során azt szeretnénk vizsgálni, hogy ezek a konformációs változások csak egy aktin filamentum mentén terjednek ki vagy a filamentumok között is tovább terjednek a köztük levő kapcsolatokon át.

## 5. Következtetések

### 5.1 Nukleotidok hatása

Munkám első részében elektron paramágneses rezonancia és differenciál pásztázó kalorimetria módszerek segítségével vizsgáltam a különböző nukleotidokat kötő aktin fehérje dinamikai és konformációs változásait. Az aktin Cys-374-es aminosavát jelöltem meg MSL spinjelölővel, így a Cys 374-es aminosav környezetében lévő jelölő rotációs dinamikáját tudtam tanulmányozni. Ez alapján pedig össze tudtam hasonlítani az ATP-t, ADP-t, illetve AMP.PNP-t kötő aktinok szerkezetét, illetve dinamikájukat.

Korábban közölt munkák alapján feltételeztük, hogy az MSL spinjelölő rigiden kötött az aktin fehérje cisztein-374-es aminosav oldalláncához, ennek megfelelően a merev kapcsolódásnak köszönhetően információt nyerhettem a rotációs korrelációs idő segítségével a teljes monomer dinamikai tulajdonságairól a nukleotidcserét követően (Thomas és mtsai., 1979; Mossakowska és mtsai., 1988).

Számos faktor felelős a filamentumokból felépülő aktin hálózat szabályozásáért. Ilyen faktorok a nukleotidok és kétértékű kationok, amelyeket az aktin monomer köt és befolyásolják annak polimerizációs készségét és ezáltal a monomer-polimer egyensúlyt is a sejtben (Carlier és mtsai., 1986; Kinosian és mtsai., 1991; Nyitrai és mtsai., 1997; Rickard és Sheterline, 1986). A polimerizáció során az ATP-t kötő aktin monomerek nukleotidja hidrolizál. A monomerben az ATP nukleotid jelenléte nem nélkülözhetetlen a polimerizációhoz, ugyanis az ADP-t kötő monomerek is polimerizálnak. A különböző nukleotidokat (ADP vagy AMP.PNP) tartalmazó aktin monomerekből polimerizált filamentumokban vizsgáltam a flexibilitásban bekövetkező különbségeket. Az AMP.PNP nem hidrolizáló ATP analóg felhasználásával mimikáltam az ATP-t kötő filamentum állapotát illetve intermonomer flexibilitását. Feltételezésünk szerint a nukleotidcsere hatására egy rigidebb filamentális aktin struktúra jön létre.

Az AMP.PNP-G-aktin rotációs dinamikai tulajdonságai megváltoztak az ATP-G-aktinéhoz képest. A rotációs korrelációs idő, amely a spektrum hiperfinom csatolási állandója alapján határozható meg, szignifikánsan megnövekedett. Ez egy lassabb mozgásra és kötöttebb konformáció létrejöttére utal, amely azt feltételezi, hogy az AMP.PNP kötődése egy jóval rigidebb aktin struktúra létrejöttét eredményezte már monomer szinten is. Az AMP.PNP kötődésével a spinjelölők segítségével detektált rotációs mobilitása megnőtt, ez egyértelműen a nukleotidcsere hatására végbemenő lokális konformációváltozásra utal (Turner és mtsai., 2012).

Az aktin polimerizáció szabályozásában a nukleotidok szerepének megértését hivatott



segíteni az általam vizsgált modell. Annak érdekében, hogy értékelhető adatokat kapjak, az aktin nagy részének filamentális formában kellett lennie a mérések alatt. Ennek elérése érdekében 12 órás polimerizációt alkalmaztam jégen. Ez megfelelő időt szolgáltatott a számunkra szükséges monomer és filamentum egyensúly létrejöttéhez (Pollard és mtsai., 1984).

Az ADP-F-aktin esetében is jelentős különbségek mutatkoztak meg annak rotációs dinamikájában és belső rigiditásában is az ATP állapot modellezésére használt AMP.PNP-t kötő F-aktinhoz képest. A monomerek szerkezetében létrejövő változás a kötött nukleotid cseréjének hatására a filamentumon belüli intermonomer kapcsolatok megváltozásához vezetett. A két különböző nukleotidot kötő filamentum flexibilitásában eltérést tapasztaltunk. Ez összhangban áll eredeti feltételezésünkkel, miszerint ha az ATP állapotot modellező AMP.PNP ATP analógot kötő monomerekből épül fel a filamentum, akkor megváltozik a filamentum rugalmassága, az eredeti, ADP-t kötő szerkezetű F-aktinéval összehasonlítva. A nukleotidcsere által egy jóval rigidebb aktin filamentum jött létre (Turner és mtsai., 2012).

A két különböző nukleotidot tartalmazó monomerekből polimerizált aktin filamentumok flexibilitásbeli különbsége megmutatkozhat az F-aktinban spontán módon létrejövő makroszkópikus rendezettségben, ezt további vizsgálatokkal igazolható és a továbbiakban vizsgálható lehet.

DSC méréseink hasonló eredményt mutatnak az AMP.PNP-G-aktin és az AMP.PNP-F-aktin esetében, nevezetesen, hogy az átmeneti hőmérsékletük ( $T_m$ ) megnövekedett az ATP-G-aktinhoz és az ADP-F-aktinhoz viszonyítva.

Az AMP.PNP-G-aktin esetében kifejezettebb változást tapasztaltunk, a mért magasabb denaturációs hőmérséklet egy termodinamikailag stabilabb állapotot jelent az ATP-G-aktin szerkezetéhez viszonyítva. Ennek a stabilabb szerkezetnek a létrejöttét az okozta, hogy az ATP állapot közelítéséhez használt AMP.PNP beépült a monomer nukleotid kötő zsebébe. A nukleotid kötő zseb illetve környezetének szerkezeti átalakulása kísérte a nukleotidok cseréjét.

Az ADP-F-aktin, illetve AMP.PNP-F-aktin esetében hasonló, azonban jóval kisebb mértékű denaturációs hőmérséklet növekedést tapasztaltam. Az AMP.PNP-F-aktin megnövekedett  $T_m$ -je (az a hőmérséklet, amikor a fehérje natív konformációból denaturált állapotba alakul át) az AMP.PNP szerkezet erősítő hatására utal globális szinten. Elmondhatjuk, hogy az aktin hőmérsékleti stabilitását nagymértékben befolyásolja az általa kötött nukleotid típusa (Turner és mtsai., 2012).

Mindezekből arra következtetünk, hogy a nukleotidcsere nem csak lokális, hanem globális változást is okozott a filamentális aktin struktúrájában (Turner és mtsai., 2012).

## 5.2 Kötegelő fehérjék hatása

Munkám második részében EPR és DSC technikák alkalmazásával elemeztem a két kötegelő fehérje – a fascin és az alfa-aktinin – kötődésének hatását a filamentális aktin szerkezetére és dinamikájára. Az F-aktin és a keresztkötő fehérjék kölcsönhatását konvencionális és szaturáció transzfer EPR mérésekkel egyaránt nyomon követtem. A keresztkötő fehérjék vizsgálatához szintén MSL paramágneses szondával jelöltem meg az aktin Cys-374-es aminosavát. Ezáltal lehetővé vált a különböző kötegelő fehérjék által keresztkötött aktin filamentumok rotációs dinamikájának összehasonlítása.

EPR kísérleteink a fascin és az alfa-aktinin kötődése által az aktin filamentumban előidézett molekuláris változásokról nyújtanak információt két teljesen eltérő, a nanoszekundumos és a mikroszekundumos időskálán.

A gyorsabb mozgások az aktin filamentumon belül a szubdomének, protomerek vagy rövid szegmensek mozgásának tulajdoníthatóak. A hosszabb időskálán lejátszódó mozgások sokkal inkább karakterisztikusak az egész aktin filamentum összefüggő mozgásaira, beleértve a görbülési és a torziós csavarodás formáit is (Turmer és mtsai., 2015b).

A mi konvencionális EPR méréseink eredményei azt mutatják, hogy a fascin és az alfa-aktinin mikroszekundumos időskálán betöltött hasonló hatása ellenére, hatásuk a gyorsabb mozgási időskálákon ellentétes volt. A hiperfinom csatolási állandó megnövekedett a fascin, és csökkent az alfa-aktinin kötődése után. A két protein hatása viszonylag hosszú aktin filamentum szakaszra kiterjedt, az alfa-aktinin és a fascin mintegy 200 protomer szerkezetét módosította. Habár adataink alapján nem tudtuk meghatározni sem a fehérje mátrix flexibilitását, sem pedig azt, hogy a polaritás megváltozása volt-e felelős az általunk megfigyelt változásokért, az világos számunkra, hogy a két keresztkötő fehérje különböző molekuláris átalakulásokat és változásokat indukált az aktin filamentum szerkezetében (Turmer és mtsai., 2015b).

A szaturáció transzfer EPR mérések azt mutatják, hogy az aktin filamentumra jellemző nagyobb arányú görbülő és torziós flexibilitás a fascin illetve az alfa-aktinin kötődése után csökkenő tendenciát mutatott, ezért arra a következtetésre jutottunk, hogy az egész filamentum csavarodó és görbülő mozgásai lassabbá váltak. Az aktin filamentumok belső szerkezete stabilizálódott biztosítva egy sokkal rigidebb szerkezeti vázat a biológiai működések számára. Hasonló tendenciát figyeltek meg a két keresztkötő fehérje esetében, a stabilizáció egyszerűen a kötegek kialakulásának hatása lehet, amelyben az aktin filamentumok mozgása behatárolt a szomszédos aktin filamentumok által (Claessens és mtsai., 2008).

Az aktin filamentumok valószínűleg számos biológiai funkciójukat a szerkezetük szabályozásán keresztül képesek teljesíteni, amelyet az aktinkötegelő fehérjék biztosítanak, vagyis a filamentum szerkezetének alkalmazkodása az aktuális működéshez megköveteli a kötegelő fehérjék kötődése által létrehozott változást és szabályozást. Ez az általános tendencia szükséges a keresztkötő fehérjék munkájához is (Egelman, 2003; Reisler és Egelman, 2007; Popp és Robinson, 2011; Popp és Robinson, 2012).

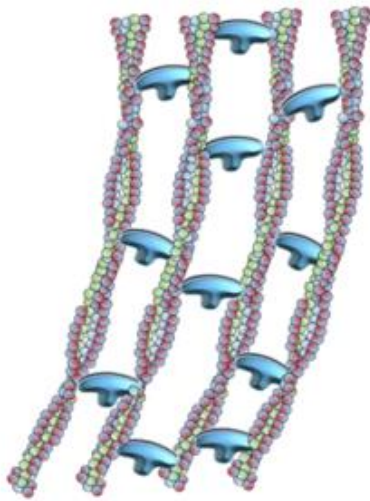
Az általunk nyert EPR eredmények felvetik, hogy a kisebb szerkezeti alkotóelemek az aktin filamentumok perifériáján különböző úton módosultak a fascin és az alfa-aktinin révén, mialatt az egész aktin filamentum mozgása lassabb lett mindkét aktin keresztkötő fehérje kötődése után. A legegyszerűbb magyarázat az utóbbi megfigyelésekre az, hogy az aktin filamentumok belső szerkezetét nem változtatta meg a keresztkötő fehérjék kötődése, valamint a filamentumok közötti kapcsolódások létrejötte szerkezeti korlátokat nyújt és ennek következtében lelassítja a filamentális mozgásokat. Ezeket a szerkezeti változásokat ábrázoltuk egy egyszerű rajz segítségével a 19. ábrán.


Az általunk leírtakat figyelembe véve, valamint megfontolva, hogy a fascin és az alfa-aktinin közreműködik többféle különböző sejtfolyamatban (Edwards és Bryan, 1995; Machesky és Li, 2010; Sjoblom és mtsai., 2008), megfigyeléseink feltételezik, hogy kötődésük adhatja a megfelelő beállítást és szabályozást az aktin szerkezetének és ezzel megalapozza a megfelelő szerkezetet más aktinkötő fehérjék kapcsolódásához, amelyek szerepet játszanak az aktuális biológiai funkcióban.


**aktin + fascin**


**aktin**

**aktin +  $\alpha$ -aktinin**




 aktin protomerek

 fascin által módosított aktin protomerek

 alfa-aktinin által módosított aktin protomerek

 fascin

 alfa-aktinin

19. ábra Az aktin—fascin illetve az aktin—alfa-aktinin lehetséges kölcsönjátásának sémája

(Turner és mtsai., 2015a).

## 6. Összefoglalás

Munkám első részében az aktin fehérje szerkezetében az eltérő nukleotidok (ATP, ADP és AMP.PNP) kötődése által előidézett konformációs és dinamikai változásokat vizsgáltam EPR spektroszkópia és DSC módszerek segítségével. Feltételezésünk szerint az F-aktinban a monomerek ADP-t kötnek, ezzel biztosítva a működéséhez szükséges optimális flexibilitást. Habár mindkét esetben ADP-aktin protomerek alkotják a filamentumokat, abban az esetben, ha ATP-t kötő monomerekből épül fel a filamentum, akkor megváltozik a filamentum rugalmassága (dinamikája), az eredeti, ADP-t kötő szerkezetű F-aktinével összehasonlítva.

A következő megfigyeléseket tettük, amelyekkel igyekeztük megválaszolni a korábban feltett kérdéseinket:

- (1) Az AMP.PNP-t kötő globuláris és filamentális aktin termodinamikailag stabilabb szerkezettel rendelkezik, mint az ADP kötő forma. Ennek a stabilabb állapotnak a kialakulását az AMP.PNP nukleotidkötő zsebbe történő beépülésének tulajdonítjuk.
- (2) Az ADP-F-aktin és az AMP.PNP-F-aktin rotációs dinamikája között az ATP-G-aktin és az AMP.PNP-G-aktin-hoz képest jóval kisebb, de kimutatható különbséget figyelhettünk meg A filamentális aktin belső rigiditására is hatással volt a nukleotidcsere, ugyanis egy rigidebb, stabilabb szerkezet jött létre általa, ez az AMP.PNP globális szerkezet erősítő hatását mutatja. Elmondhatjuk, hogy az aktin hőmérsékleti stabilitása szoros összefüggésben áll az általa kötött nukleotid típusával.

Munkám második részében elvégzett méréseim az aktinkötő fehérjék által létrehozott hálózat szabályozásának és dinamikájának megismerésére irányultak. A kötegelő fehérjék kötődésének hatására az aktin filamentumok szerkezetében bekövetkező változásokat EPR technika segítségével vizsgáltam.

Hipotézisünk szerint a fascin és az alfa-aktinin által létrehozott kötegekben levő aktin filamentumok dinamikai tulajdonságai meghatározóak a kötegek funkcióinak szabályozásában.

A korábbiakban feltett kérdéseinkre adott válaszaink:

- (1) A fascin és az alfa-aktinin kötődésének ellentétes hatása van a filamentumok rotációs dinamikájára. Mindkét kötegelő fehérje megváltoztatja az aktin filamentumok szerkezetét, de két, egymással ellentétes mechanizmussal.
- (2) Az aktinkötegelő fehérjék megváltoztatták az aktin protomerek szerkezetét a filamentumokban. A protomerek megváltozott konformációja okozhatta a

filamentum flexibilitásában bekövetkezett változásokat. Azonban míg az aktin-alfa-aktinin komplexen belül az intramolekuláris mozgások lassabbá váltak egy jóval rigidebb aktin szerkezet létrejöttét jelezve, addig az aktin-fascin komplexek esetében a gyorsabb intramolekuláris mozgások egy jóval flexibilisebb fehérje mátrix kialakulására engednek következtetni. A két fehérje kötődésének hatása ellentétes.

- (3) Szaturáció transzfer EPR méréseink eredményei megmutatták, hogy mind a fascin, mind az alfa-aktinin kötődése után a filamentumokban a molekuláris mozgások lassabbak voltak a mikroszekundumos időskálán. Ennek a lassabb mozgásnak az oka egy merevebb filamentális aktin szerkezet létrejötte lehet, amelyet a kereszt kötött szerkezet kialakulása okozhatott a filamentumok között.

## 7. Irodalomjegyzék

- 1 Pollard, T.D., (1990). *Actin*, Current opinion in cell biology. **2**: 33-40.
- 2 Kabsch, W. and Vandekerckhove, J., (1992). *Structure and function of actin*, Annual review of biophysics and biomolecular structure. **21**: 49-76.
- 3 Pollard, T.D. and Cooper, J.A., (2009). *Actin, a central player in cell shape and movement*, Science. **326**: 1208-12.
- 4 Golitsina, N.L., Shnyrov, V.L. and Levitsky, D.I., (1992). *Thermal denaturation of the alkali light chain-20 kDa fragment complex obtained from myosin subfragment 1*, FEBS letters. **303**: 255-7.
- 5 Grzanka, A., Grzanka, D. and 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**: 765-70.
- 6 Castano, E., Philimonenko, V.V., Kahle, M., Fukalova, J., Kalendova, A., Yildirim, S., Dzijak, R., Dingova-Krasna, H. and Hozak, P., (2010). *Actin complexes in the cell nucleus: new stones in an old field*, Histochem Cell Biol. **133**: 607-26.
- 7 Huxley, A.F. and Niedergerke, R., (1954). *Structural changes in muscle during contraction; interference microscopy of living muscle fibres*, Nature. **173**: 971-3.
- 8 Huxley, H. and Hanson, J., (1954). *Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation*, Nature. **173**: 973-6.
- 9 Kabsch, W., Mannherz, H.G., Suck, D., Pai, E.F. and Holmes, K.C., (1990). *Atomic structure of the actin:DNase I complex*, Nature. **347**: 37-44.
- 10 Levitsky, D.I., Nikolaeva, O.P., Orlov, V.N., Pavlov, D.A., Ponomarev, M.A. and Rostkova, E.V., (1998a). *Differential scanning calorimetric studies on myosin and actin*, Biochemistry. Biokhimiia. **63**: 322-33.
- 11 Wang, H., Robinson, R.C. and Burtnick, L.D., (2010). *The structure of native G-actin*, Cytoskeleton (Hoboken). **67**: 456-65.
- 12 Higashi, S. and Oosawa, F., (1965). *Conformational changes associated with polymerization and nucleotide binding in actin molecules*, J Mol Biol. **12**: 843-65.
- 13 Kinoshita, H.J., Selden, L.A., Estes, J.E. and Gershman, L.C., (1991). *Thermodynamics of actin polymerization; influence of the tightly bound divalent cation and nucleotide*, Biochimica et biophysica acta. **1077**: 151-8.
- 14 Kasai, M., Nakano, E. and Oosawa, F., (1965). *Polymerization of Actin Free from Nucleotides and Divalent Cations*, Biochim Biophys Acta. **94**: 494-503.
- 15 Chesarone, M.A. and Goode, B.L., (2009). *Actin nucleation and elongation factors: mechanisms and interplay*, Curr Opin Cell Biol. **21**: 28-37.
- 16 Kuhn, J.R. and Pollard, T.D., (2005). *Real-time measurements of actin filament polymerization by total internal reflection fluorescence microscopy*, Biophys J. **88**: 1387-402.
- 17 Frischknecht, F. and Way, M., (2001). *Surfing pathogens and the lessons learned for actin polymerization*, Trends in cell biology. **11**: 30-38.
- 18 Moore, P.B., Huxley, H.E. and DeRosier, D.J., (1970). *Three-dimensional reconstruction of F-actin, thin filaments and decorated thin filaments*, J Mol Biol. **50**: 279-95.
- 19 De La Cruz, E.M. and Pollard, T.D., (1995). *Nucleotide-free actin: stabilization by sucrose and nucleotide binding kinetics*, Biochemistry. **34**: 5452-61.
- 20 Hild, G., Bugyi, B. and Nyitrai, M., (2010). *Conformational dynamics of actin: effectors and implications for biological function*, Cytoskeleton. **67**: 609-29.

- 21 Schuler, H., (2001). *ATPase activity and conformational changes in the regulation of actin*, Biochim Biophys Acta. **1549**: 137-47.
- 22 Dalhaimer, P., Pollard, T.D. and Nolen, B.J., (2008). *Nucleotide-mediated conformational changes of monomeric actin and Arp3 studied by molecular dynamics simulations*, J Mol Biol. **376**: 166-83.
- 23 Zheng, X., Diraviyam, K. and Sept, D., (2007). *Nucleotide effects on the structure and dynamics of actin*, Biophys J. **93**: 1277-83.
- 24 Orlova, A., Prochniewicz, E. and Egelman, E.H., (1995). *Structural dynamics of F-actin: II. Cooperativity in structural transitions*, Journal of molecular biology. **245**: 598-607.
- 25 Strzelecka-Golaszewska, H., Moraczewska, J., Khaitlina, S.Y. and Mossakowska, M., (1993). *Localization of the tightly bound divalent-cation-dependent and nucleotide-dependent conformation changes in G-actin using limited proteolytic digestion*, European journal of biochemistry / FEBS. **211**: 731-42.
- 26 Otterbein, L.R., Graceffa, P. and Dominguez, R., (2001). *The crystal structure of uncomplexed actin in the ADP state*, Science. **293**: 708-11.
- 27 Tseng, Y., Fedorov, E., McCaffery, J.M., Almo, S.C. and Wirtz, D., (2001). *Micromechanics and ultrastructure of actin filament networks crosslinked by human fascin: a comparison with alpha-actinin*, J Mol Biol. **310**: 351-66.
- 28 Jayo, A. and Parsons, M., (2010). *Fascin: a key regulator of cytoskeletal dynamics*, Int J Biochem Cell Biol. **42**: 1614-7.
- 29 Edwards, R.A. and Bryan, J., (1995). *Fascins, a family of actin bundling proteins*, Cell motility and the cytoskeleton. **32**: 1-9.
- 30 Saishin, Y., Shimada, S., Morimura, H., Sato, K., Ishimoto, I., Tano, Y. and Tohyama, M., (1997). *Isolation of a cDNA encoding a photoreceptor cell-specific actin-bundling protein: retinal fascin*, FEBS letters. **414**: 381-6.
- 31 Kureishy, N., Sapountzi, V., Prag, S., Anilkumar, N. and Adams, J.C., (2002). *Fascins, and their roles in cell structure and function*, BioEssays. **24**: 350-61.
- 32 Tubb, B., Mulholland, D.J., Vogl, W., Lan, Z.-J., Niederberger, C., Cooney, A. and Bryan, J., (2002). *Testis Fascin (FSCN3): A Novel Paralog of the Actin-Bundling Protein Fascin Expressed Specifically in the Elongate Spermatid Head*, Experimental Cell Research. **275**: 92-109.
- 33 Li, A., Dawson, J.C., Forero-Vargas, M., Spence, H.J., Yu, X., Konig, I., Anderson, K. and Machesky, L.M., (2010). *The actin-bundling protein fascin stabilizes actin in invadopodia and potentiates protrusive invasion*, Current biology : CB. **20**: 339-45.
- 34 Ono, S., Yamakita, Y., Yamashiro, S., Matsudaira, P.T., Gnarr, J.R., Obinata, T. and Matsumura, F., (1997). *Identification of an actin binding region and a protein kinase C phosphorylation site on human fascin*, J Biol Chem. **272**: 2527-33.
- 35 Hashimoto, Y., Skacel, M. and Adams, J.C., (2005). *Roles of fascin in human carcinoma motility and signaling: Prospects for a novel biomarker?*, The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. **37**: 1787-804.
- 36 Jansen, S., Collins, A., Yang, C., Rebowski, G., Svitkina, T. and Dominguez, R., (2011). *Mechanism of actin filament bundling by fascin*, J Biol Chem. **286**: 30087-96.
- 37 Machesky, L.M. and Li, A., (2010). *Fascin: Invasive filopodia promoting metastasis*, Communicative & integrative biology. **3**: 263-70.
- 38 Chen, S.F., Yang, S.F., Li, J.W., Nieh, P.C., Lin, S.Y., Fu, E., Bai, C.Y., Jin, J.S., Lin, C.Y. and Nieh, S., (2007). *Expression of fascin in oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas has prognostic significance - a tissue microarray study of 129 cases*, Histopathology. **51**: 173-83.
- 39 Takatsuki, H., Bengtsson, E. and Mansson, A., (2014). *Persistence length of fascin-*



- cross-linked actin filament bundles in solution and the in vitro motility assay*, *Biochimica et biophysica acta*. **1840**: 1933-42.
- 40 Blanchard, A., Ohanian, V. and Critchley, D., (1989). *The structure and function of alpha-actinin*, *Journal of muscle research and cell motility*. **10**: 280-9.
- 41 Klein, M.G., Shi, W., Ramagopal, U., Tseng, Y., Wirtz, D., Kovar, D.R., Staiger, C.J. and Almo, S.C., (2004). *Structure of the actin crosslinking core of fimbrin*, *Structure* (London, England : 1993). **12**: 999-1013.
- 42 Sjoblom, B., Salmazo, A. and Djinovic-Carugo, K., (2008). *Alpha-actinin structure and regulation*, *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. **65**: 2688-701.
- 43 Ishikawa, R., Sakamoto, T., Ando, T., Higashi-Fujime, S. and Kohama, K., (2003). *Polarized actin bundles formed by human fascin-1: their sliding and disassembly on myosin II and myosin V in vitro*, *Journal of Neurochemistry*. **87**: 676-85.
- 44 Lieleg, O., Claessens, M.M., Heussinger, C., Frey, E. and Bausch, A.R., (2007). *Mechanics of bundled semiflexible polymer networks*, *Phys Rev Lett*. **99**: 088102.
- 45 Flood, G., Kahana, E., Gilmore, A.P., Rowe, A.J., Gratzer, W.B. and Critchley, D.R., (1995). *Association of structural repeats in the alpha-actinin rod domain. Alignment of inter-subunit interactions*, *J Mol Biol*. **252**: 227-34.
- 46 Winkler, J., Lunsdorf, H. and Jockusch, B.M., (1997). *Flexibility and fine structure of smooth-muscle alpha-actinin*, *European journal of biochemistry / FEBS*. **248**: 193-9.
- 47 Turner, K., Orban, J., Grof, P. and Nyitrai, M., (2015a). *FASCIN and alpha-actinin can regulate the conformation of actin filaments*, *Biochimica et biophysica acta*. **1850**: 1855-61.
- 48 Nagy, S., Ricca, B.L., Norstrom, M.F., Courson, D.S., Brawley, C.M., Smithback, P.A. and Rock, R.S., (2008). *A myosin motor that selects bundled actin for motility*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **105**: 9616-20.
- 49 Ricca, B.L. and Rock, R.S., (2010). *The Stepping Pattern of Myosin X Is Adapted for Processive Motility on Bundled Actin*, *Biophysical Journal*. **99**: 1818-26.
- 50 Gaszner, B., Nyitrai, M., Hartvig, N., Koszegi, T., Somogyi, B. and Belagyi, J., (1999). *Replacement of ATP with ADP affects the dynamic and conformational properties of actin monomer*, *Biochemistry*. **38**: 12885-92.
- 51 Graceffa, P. and Dominguez, R., (2003). *Crystal structure of monomeric actin in the ATP state. Structural basis of nucleotide-dependent actin dynamics*, *J Biol Chem*. **278**: 34172-80.
- 52 Feuer, G., Molnar, F. and et al., (1948). *Studies on the composition and polymerization of actin*, *Hung Acta Physiol*. **1**: 150-63.
- 53 Spudich, J.A. and Watt, S., (1971). *The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin*, *The Journal of biological chemistry*. **246**: 4866-71.
- 54 Kupi, T., Grof, P., Nyitrai, M. and Belagyi, J., (2009). *The uncoupling of the effects of formins on the local and global dynamics of actin filaments*, *Biophysical journal*. **96**: 2901-11.
- 55 Houk, T.W., Jr. and Ue, K., (1974). *The measurement of actin concentration in solution: a comparison of methods*, *Anal Biochem*. **62**: 66-74.
- 56 Turner, K., Konczol, F., Lorinczy, D. and Belagyi, J., (2012). *AMP.PNP affects the dynamical properties of monomer and polymerized actin*, *Journal of thermal analysis and calorimetry*. **108**: 95-100.
- 57 Drewes, G. and Faulstich, H., (1991). *A reversible conformational transition in muscle actin is caused by nucleotide exchange and uncovers cysteine in position 10*, *J Biol*

- Chem. **266**: 5508-13.
- 58 Pollard, T.D., (1984). *Purification of a high molecular weight actin filament gelation protein from Acanthamoeba that shares antigenic determinants with vertebrate spectrins*, The Journal of cell biology. **99**: 1970-80.
- 59 Perelroizen, I., Carlier, M.-F. and Pantaloni, D., (1995). *Binding of Divalent Cation and Nucleotide to G-actin in the Presence of Profilin*, Journal of Biological Chemistry. **270**: 1501-08.
- 60 Miki, M., (1990). *Interaction of F-actin-AMPPNP with myosin subfragment-1 and troponin-tropomyosin: influence of an extra phosphate at the nucleotide binding site in F-actin on its function*, J Biochem. **108**: 457-61.
- 61 Berliner, L.J., Spin labeling : theory and applications, Academic Press, (New York), 1976.
- 62 Berliner, L.J., Spin labeling II : theory and applications, Academic Press, (New York), 1979.
- 63 Dergez, T., Lorinczy, D., Konczol, F., Farkas, N. and Belagyi, J., (2007). *Differential scanning calorimetry study of glycerinated rabbit psoas muscle fibres in intermediate state of ATP hydrolysis*, BMC structural biology. **7**: 41.
- 64 Farkas, N., Lorinczy, D., Dergez, T., Kilar, F. and Belagyi, J., (2004). *Effect of polycyclic aromatic hydrocarbons on erythrocyte membranes by DSC and EPR*, Environ Toxicol Pharmacol. **16**: 163-8.
- 65 Hartvig, N., Gaszner, B., Kiss, M., Lorinczy, D. and Belagyi, J., (2002a). *Effect of nucleotides and their analogues on essential light chains in myosin head*, J Biochem Biophys Methods. **53**: 67-74.
- 66 Hartvig, N., Lorinczy, D., Farkas, N. and Belagyi, J., (2002b). *Effect of adenosine 5'-[beta,gamma-imido]triphosphate on myosin head domain movements*, European journal of biochemistry / FEBS. **269**: 2168-77.
- 67 Lőrinczy, D., Hartvig, N. and Belágyi, J., (2002). *Analysis of nucleotide myosin complexes in skeletal muscle fibres by DSC and EPR*, J Biochem Biophys Methods. **53**: 75-87.
- 68 Belagyi, J., (1973). *Effect of denaturation on muscle proteins as studied by Epr*, Acta Biochim Biophys Acad Sci Hung. **8**: 275-80.
- 69 Belagyi, J., (1975a). *Orientation dependence in the Epr spectra of spin labels in glycerinated muscle fibres*, Acta Biochim Biophys Acad Sci Hung. **10**: 233-42.
- 70 Belagyi, J., (1975b). *Water structure in striated muscle by spin labelling technique*, Acta Biochim Biophys Acad Sci Hung. **10**: 63-70.
- 71 Belagyi, J. and Damerau, W., (1974). *Effect of heat denaturation on glycerinated muscle fibers as studied by spin label Epr*, Acta Biochim Biophys Acad Sci Hung. **9**: 367-70.
- 72 Belagyi, J., Damerau, W. and Pallai, G., (1978). *Thermal stability of F-actin as studied by spin labelling*, Acta biochimica et biophysica; Academiae Scientiarum Hungaricae. **13**: 85-90.
- 73 Mossakowska, M., Belagyi, J. and Strzelecka-Golaszewska, H., (1988). *An EPR study of the rotational dynamics of actins from striated and smooth muscle and their complexes with heavy meromyosin*, European journal of biochemistry. **175**: 557-64.
- 74 Marsh, D., Electron Spin Resonance: Spin Labels, In: Grell, E. (szerk.), Membrane spectroscopy, Springer-Verlag, (Berlin; New York), 1981, 51-142.
- 75 Thomas, D.D., Seidel, J.C. and Gergely, J., (1979). *Rotational dynamics of spin-labeled F-actin in the sub-millisecond time range*, Journal of molecular biology. **132**: 257-73.
- 76 Knowles, P.F., Marsh, D. and Rattle, H.W.E., Magnetic resonance of biomolecules : an introduction to the theory and practice of NMR and ESR in biological systems, Wiley, (London; New York), 1976.

- 77 Belágyi, J. and Gróf, P., (1983). *Rotational Motion of Actin Monomer at Low and High Salt Concentration*, Eur J Biochem. **130**: 353-58.
- 78 Nyitrai, M., Hild, G., Belagyi, J. and Somogyi, B., (1997). *Spectroscopic study of conformational changes in subdomain 1 of G-actin: influence of divalent cations*, Biophysical journal. **73**: 2023-32.
- 79 Dergez, T., 2006. Glicerinezett izomrostok vizsgálata ATP hidrolízis köztes állapotában EPR és DSC technikával, Kémiai Doktori Iskola, Pécsi Tudományegyetem, Pécs, PhD Tézis.
- 80 Marsh, D., (1980). *Molecular motion in phospholipid bilayers in the gel phase: long axis rotation*, Biochemistry. **19**: 1632-7.
- 81 Squier, T.C. and Thomas, D.D., (1986a). *Applications of new saturation transfer electron paramagnetic resonance methodology to the rotational dynamics of the Ca-ATPase in sarcoplasmic reticulum membranes*, Biophys J. **49**: 937-42.
- 82 Squier, T.C. and Thomas, D.D., (1986b). *Methodology for increased precision in saturation transfer electron paramagnetic resonance studies of rotational dynamics*, Biophys J. **49**: 921-35.
- 83 Fajer, P., Watts, A. and Marsh, D., (1992). *Saturation transfer, continuous wave saturation, and saturation recovery electron spin resonance studies of chain-spin labeled phosphatidylcholines in the low temperature phases of dipalmitoyl phosphatidylcholine bilayers. Effects of rotational dynamics and spin-spin interactions*, Biophysical Journal. **61**: 879-91.
- 84 Goldman, S.A., Bruno, G.V. and Freed, J.H., (1972). *Estimating slow-motional rotational correlation times for nitroxides by electron spin resonance*, The Journal of Physical Chemistry. **76**: 1858-60.
- 85 Thomas, D.D., Seidel, J.C., Gergely, J. and Hyde, J.S., (1975a). *The quantitative measurement of rotational motion of the subfragment-1 region of myosin by saturation transfer epr spectroscopy*, Journal of supramolecular structure. **3**: 376-90.
- 86 Thomas, D.D., Seidel, J.C., Hyde, J.S. and Gergely, J., (1975b). *Motion of subfragment-1 in myosin and its supramolecular complexes: saturation transfer electron paramagnetic resonance*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. **72**: 1729-33.
- 87 Meirovitch, E. and Freed, J.H., (1984). *Analysis of Slow-Motional Electron-Spin Resonance-Spectra in Smectic Phases in Terms of Molecular-Configuration, Intermolecular Interactions, and Dynamics*, J Phys Chem-Us. **88**: 4995-5004.
- 88 Budil, D.E., Lee, S., Saxena, S. and Freed, J.H., (1996). *Nonlinear-Least-Squares Analysis of Slow-Motion EPR Spectra in One and Two Dimensions Using a Modified Levenberg-Marquardt Algorithm*, Journal of Magnetic Resonance, Series A. **120**: 155-89.
- 89 Lumry, R. and Eyring, H., (1954). *Conformation Changes of Proteins*, The Journal of Physical Chemistry. **58**: 110-20.
- 90 Lőrinczy, D., (2004). *The nature of biological systems as revealed by thermal methods*.
- 91 Levitsky, D.I., Ponomarev, M.A., Geeves, M.A., Shnyrov, V.L. and Manstein, D.J., (1998b). *Differential scanning calorimetric study of the thermal unfolding of the motor domain fragments of Dictyostelium discoideum myosin II*, European journal of biochemistry. **251**: 275-80.
- 92 Orbán, J., Lőrinczy, D., Hild, G. and Nyitrai, M., (2008a). *Noncooperative stabilization effect of phalloidin on ADP.BeFx- and ADP.AIF4-actin filaments*, Biochemistry. **47**: 4530-4.
- 93 Orbán, J., Lőrinczy, D., Nyitrai, M. and Hild, G., (2008b). *Nucleotide dependent differences between the alpha-skeletal and alpha-cardiac actin isoforms*, Biochem

- Biophys Res Commun. **368**: 696-702.
- 94 Zhang, R., Yan, W., Wang, X. and Lin, R., (2005). *Molar excess enthalpies of ethyl acetate+alkanols at T=298.15K, p=10.0MPa*, *Thermochimica Acta*. **429**: 155-61.
- 95 Fukada, H., Takahashi, K. and Sturtevant, J.M., (1987). *Differential scanning calorimetric study of the thermal unfolding of Taka-amylase A from Aspergillus oryzae*, *Biochemistry*. **26**: 4063-8.
- 96 Lőrinczy, D. and Belágyi, J., (1995a). *Effects of nucleotide on skeletal muscle myosin unfolding in myofibrils by DSC*, *Biochem Biophys Res Commun*. **217**: 592-8.
- 97 Konczol, F., Lorinczy, D. and Belagyi, J., (1998). *Effect of oxygen free radicals on myosin in muscle fibres*, *FEBS letters*. **427**: 341-4.
- 98 Conejero-Lara, F., Mateo, P.L., Aviles, F.X. and Sanchez-Ruiz, J.M., (1991a). *Effect of Zn<sup>2+</sup> on the thermal denaturation of carboxypeptidase B*, *Biochemistry*. **30**: 2067-72.
- 99 Conejero-Lara, F., Sanchez-Ruiz, J.M., Mateo, P.L., Burgos, F.J., Vendrell, J. and Aviles, F.X., (1991b). *Differential scanning calorimetric study of carboxypeptidase B, procarboxypeptidase B and its globular activation domain*, *European journal of biochemistry / FEBS*. **200**: 663-70.
- 100 Freire, E. and Murphy, K.P., (1991). *Molecular basis of co-operativity in protein folding*, *J Mol Biol*. **222**: 687-98.
- 101 Freire, E., Murphy, K.P., Sanchez-Ruiz, J.M., Galisteo, M.L. and Privalov, P.L., (1992). *The molecular basis of cooperativity in protein folding. Thermodynamic dissection of interdomain interactions in phosphoglycerate kinase*, *Biochemistry*. **31**: 250-6.
- 102 Galisteo, M.L., Mateo, P.L. and Sanchez-Ruiz, J.M., (1991). *Kinetic study on the irreversible thermal denaturation of yeast phosphoglycerate kinase*, *Biochemistry*. **30**: 2061-6.
- 103 Sanchez-Ruiz, J.M., (1992). *Theoretical analysis of Lumry-Eyring models in differential scanning calorimetry*, *Biophys J*. **61**: 921-35.
- 104 Sanchez-Ruiz, J.M., Iriarte, A. and Martinez-Carrion, M., (1991). *The ionization states of the 5'-phosphate group in the various coenzyme forms bound to mitochondrial aspartate aminotransferase*, *Arch Biochem Biophys*. **286**: 38-45.
- 105 Sanchez-Ruiz, J.M., Lopez-Lacomba, J.L., Mateo, P.L., Vilanova, M., Serra, M.A. and Aviles, F.X., (1988a). *Analysis of the thermal unfolding of porcine procarboxypeptidase A and its functional pieces by differential scanning calorimetry*, *European journal of biochemistry / FEBS*. **176**: 225-30.
- 106 Jones, R.H. and Molitoris, B.A., (1984). *A statistical method for determining the breakpoint of two lines*, *Analytical Biochemistry*. **141**: 287-90.
- 107 Lőrinczy, D. and Belágyi, J., (1995b). *Scanning calorimetric and EPR studies on the thermal stability of actin*, *Thermochimica Acta*. **259**: 153-64.
- 108 Lőrinczy, D., Könczöl, F., Gaszner, B. and Belágyi, J., (1998). *Structural stability of actin filaments as studied by DSC and EPR*, *Thermochimica Acta*. **322**: 95-100.
- 109 Kabsch, W. and Holmes, K.C., (1995). *The actin fold*, *FASEB J*. **9**: 167-74.
- 110 Sanchez-Ruiz, J.M., Lopez-Lacomba, J.L., Cortijo, M. and Mateo, P.L., (1988b). *Differential scanning calorimetry of the irreversible thermal denaturation of thermolysin*, *Biochemistry*. **27**: 1648-52.
- 111 Carlier, M.F., Pantaloni, D. and Korn, E.D., (1986). *The effects of Mg<sup>2+</sup> at the high-affinity and low-affinity sites on the polymerization of actin and associated ATP hydrolysis*, *The Journal of biological chemistry*. **261**: 10785-92.
- 112 Rickard, J.E. and Sheterline, P., (1986). *Cytoplasmic concentrations of inorganic phosphate affect the critical concentration for assembly of actin in the presence of cytochalasin D or ADP*, *Journal of molecular biology*. **191**: 273-80.
- 113 Pollard, T.D., Selden, S.C. and Maupin, P., (1984). *Interaction of actin filaments with*

- microtubules*, The Journal of cell biology. **99**: 33s-37s.
- 114 Turner, K., Urban, J., Grof, P. and Nyitrai, M., (2015b). *FASCIN and alpha-actinin can regulate the conformation of actin filaments*, Bba-Gen Subjects. **1850**: 1855-61.
- 115 Claessens, M.M.A.E., Semmrich, C., Ramos, L. and Bausch, A.R., (2008). *Helical twist controls the thickness of F-actin bundles*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. **105**: 8819-22.
- 116 Egelman, E.H., (2003). *A tale of two polymers: New insights into helical filaments*, Nat Rev Mol Cell Bio. **4**: 621-30.
- 117 Reisler, E. and Egelman, E.H., (2007). *Actin structure and function: What we still do not understand*, Journal of Biological Chemistry. **282**: 36133-37.
- 118 Popp, D. and Robinson, R.C., (2011). *Many ways to build an actin filament*, Mol Microbiol. **80**: 300-08.
- 119 Popp, D. and Robinson, R.C., (2012). *Supramolecular cellular filament systems: How and why do they form?*, Cytoskeleton. **69**: 71-87.

## 8. Ábrajegyzék

1. ábra A monomer aktin szalagdiagramja. Az ATP-t kötő nukleotid-kötő árok a molekula közepén látható. (Kabsch és mtsai., 1990) .....	7
2. ábra Az AMP-PNP .....	9
3. ábra A fascin és az alfa-aktinin felépítése, szerkezeti diagramok. A fascin szekvenciálisan négy, az alfa-aktinin hat egységre osztható. Az utóbbi az ismétlődő spectrin-szerű régiókkal kapcsolódik össze három-négy egység átfedésével, valamint az aktinkötő régiót tartalmazza (Turner és mtsai., 2015a). .....	11
4. ábra Az alfa-aktinin (A) (Flood és mtsai., 1995 nyomán) és a fascin (B) (Jansen és mtsai., 2011; Winkler és mtsai., 1997) kötegelési mechanizmusának vázlata. Az aktin protomereket és monomereket narancssárga körökkel és a megfelelő kötegelő fehérjéket kékekkel jelöltük (Turner és mtsai., 2015a). .....	12
5. ábra: Az EPR spektrométer sematikus felépítése <i>(átdolgozott ábra; forrás: <a href="http://www.physik.uni-augsburg.de">http://www.physik.uni-augsburg.de</a>)</i> . .....	23
6. ábra A DSC készülék felépítése (Zhang és mtsai., 2005). .....	26
7. ábra: Sebességi állandó számolásához való szemléltetés (Sanchez-Ruiz és mtsai., 1988a). .....	30
8. ábra A.: Az ATP-G-aktin EPR spektruma; B.: Az AMP.PNP-G-aktin EPR spektruma; C.: Az ADP-F-aktin EPR spektruma; D.: Az AMP.PNP-F-aktin EPR spektruma (Turner és mtsai., 2012). .....	34
9. ábra Az ATP-G-aktin DSC görbéje (Turner és mtsai., 2012) .....	36
10. ábra: Az ADP-G-aktin denaturációja. (Lőrinczy és Belágyi, 1995b; az ábra a szerzők hozzájárulásával reprodukálva) .....	36
11. ábra: Az ADP-F-aktin termikus denaturációja. (Lőrinczy és Belágyi, 1995b; az ábra a szerzők hozzájárulásával reprodukálva) .....	37
12. ábra: ADP-G-aktin termikus doménjei aktivációs energiája. (Lőrinczy és Belágyi, 1995b; az ábra a szerzők hozzájárulásával reprodukálva) .....	38
13. ábra: ADP-F-aktin alegységeinek aktivációs energiája. (Lőrinczy és Belágyi, 1995b; az ábra a szerzők hozzájárulásával reprodukálva) .....	38
14. ábra Az AMP.PNP-G-aktin DSC görbéje (Turner és mtsai., 2012) .....	39
15. ábra Az AMP.PNP-F-aktin DSC görbéje (Turner és mtsai., 2012) .....	40
16. ábra: Az MSL-jelölt aktin illetve annak a kötegelő fehérjékkel képzett komplexeinek	

EPR spektrumai. A G-és F-aktin koncentrációja 50 $\mu\text{M}$ , míg a képzett komplexekben a végső aktin koncentráció 40 $\mu\text{M}$ volt. A fehérjék moláris arányait az ábrán jelöltük (Turmer és mtsai., 2015a).....	42
17. ábra A hiperfinom csatolási állandó függése a kötegelő fehérjék koncentrációjától (Turmer és mtsai., 2015a). .....	44
18. ábra A spin jelölt F-aktin ST-EPR spektrumai a kötegelő fehérjék hiányában illetve jelenlétében. Az $L''/L$ és a $C''/C$ arányokat a spektrumokon jelölt részek segítségével határoztuk meg (Turmer és mtsai., 2015a).....	46
19. ábra Az aktin—fascin illetve az aktin—alfa-aktinin lehetséges kölcsönjátásának sémája (Turmer és mtsai., 2015a). .....	52

## **9. Táblázatok jegyzéke**

1. táblázat EPR méréseink eredményeinek összefoglalása .....	35
2. táblázat DSC méréseink eredményeinek összefoglalása .....	40
3. táblázat Az ST EPR spektrumokból kinyert paraméterek .....	46



## 10. Rövidítések jegyzéke

2A' zz: hiperfinom csatolási állandó

ADP: adenzin-5'- difoszfát

AMP.PNP: adenzin-5'- $\beta$ - $\gamma$ imidotrifoszfát

ATP: adenzin-5'-trifoszfát

CaCl<sub>2</sub>: kalcium-klorid

Cys: cisztein aminosav

DSC: differenciál pásztázó kalorimetria

DTT: 1,4-ditio-D-treitol

EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav

EGTA: etilén-glikol-tetraecetsav

EPR: elektron paramágneses rezonancia spektroszkópia

F-aktin: filamentális aktin polimer

FPLC: folyadékkromatográfiás készülék (Fast Protein Liquid Chromatography)

GST: glutation-S-transzferáz

G-aktin: globuláris aktin monomer

KCl: kálium-klorid

kDa: kilodalton, atomi tömegegység

LB-táptalaj: Luria-Bertani táptalaj

MEA: 2-merkaptoetanol

MgCl<sub>2</sub>: magnezium klorid

MOPS: 4-morfolin-propán-szulfonsav

MSL: maleimid spin jelölő (N-(1-oxil-2,2,6,6-tetrametil-4-piperidinil)maleimid spin label)

NaCl: nátrium-klorid

NaN<sub>3</sub>: nátrium-azid

PBS: foszfát-pufferes sóoldat

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

Pi: szervesen foszfát

SDS: nátrium-dodecilsulfát

ST: szaturáció transzfer

*T<sub>m</sub>*: olvadási hőmérséklet

Tris-HCl: 2-amino-2-hidroxi-metil-1,3-propándiol-hidroklorid

$\tau_2$ : rotációs korrelációs idő

## 11. Közlemények

### 11.1 Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

**Katalin Türmer**, Franciska Könczöl, Denes Lőrinczy and Jozsef Belagyi: AMP.PNP affects the dynamical properties of monomer and polymerized actin: A DSC and an EPR study; Journal of Thermal Analysis and Calorimetry Vol. 108 95-100.

**Katalin Türmer**, József Orbán, Pál Gróf, Miklós Nyitrai: Fascin and alfa-actinin can regulate the conformation of actin filaments. 2015 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 1850, (9), 1855-1861.

### 11.2 Az értekezésben nem szereplő közlemények:

Zoltan Gazdag, Gabor Mate, Milan Certik, **Katalin Türmer**, Eszter Virag, Istvan Pocsi, Miklos Pesti: tert-Butyl hydroperoxide-induced differing plasma membrane and oxidative stress processes in yeast strains BY4741 and erg5 Delta. Journal of Basics Microbiology Vol. 54 (2014) 50-62

Szilvia Barkó, Dávid Szatmári, Emőke Bódis, **Katalin Türmer**, Zoltán Ujfalusi, David Popp, Robert C Robinson, Miklós Nyitrai: Large-scale purification and in vitro characterization of the assembly of MreB from Leptospira interrogans. Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects 1860:(9) (2016) pp. 1942-1952.