

A nukleotidok és az aktinkötő fehérjék szerepe az aktin funkcionális konformációváltásaiban

Türmer Katalin Erzsébet



Témavezetők: Prof. Dr. Nyitrai Miklós, Prof. Dr. Belágyi József†

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar
Biofizikai Intézet

Pécs, 2018.

Irodalmi áttekintés

Az eukarióta citoskeleton mikrofilamentum hálózatának fő alkotóeleme az aktin. Straub Ferenc Brúnó fedezte fel az aktin fehérjét 1942-ben. 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. Ilyen folyamatok közé soroljuk a sejtmozgást vagy a sejtek alakjának megváltozását. Szerepet játszik még a sejten belüli transzport folyamatokban, az endo- és exocitózisban, a sejtosztódásban is. A sejtmagon belül is megtalálhatjuk az aktint, itt a transzkripcióban és jelátviteli folyamatokban van szerepe. α -izoformája a harántcsíkt 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. Az első röntgen-krisztallográfiás felvételeket az aktin szerkezetéről 1990-ben közzétették Kabsch és munkatársai.

Az aktin monomer egy 42,3 kDa molekulatömegű globuláris fehérje, amely két doménből áll. A két domén mindegyike két szubdoménből épül fel. 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, amelyben ATP vagy ADP és kétértékű kation kötődhet az aktinhoz. Ez a kation fiziológiai körülmények között Ca^{2+} vagy Mg^{2+} lehet.

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. 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.

Az aktinnak létezik egy kritikus koncentrációja, e fölött a polimerizáció spontán lejátszódik. Ezt a kapcsolódó nukleotidok típusa, a kötött kationok koncentrációja, valamint az aktinkötő fehérjék jelenléte is befolyásolja.

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. Az egymáshoz épülő monomerek orientációja azonos,

ezért a filamentum szerkezete poláris lesz. A polimerizáció utolsó fázisa az, amikor beáll a dinamikus egyensúly. Az ekkor létrejövő úgynevezett taposómalom mechanizmus azt eredményezi, hogy a filamentum hossza változatlan marad. Bár ilyenkor a filamentum mindkét végén lejátszódik a monomerek asszociációja és disszociációja is, azonban a „szakállas” végen az asszociáció, a „hegyes” végen a disszociáció folyamata dominál, és a két hatás egyensúlyban van.

Nukleotid analógok

A G- és az F-aktin különböző szerkezeti és funkcionális tulajdonságokat mutat, ha ATP, ADP- P_i , vagy ADP kötődik hozzájuk, vagy egyáltalán nem kötődik hozzájuk nukleotid. 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.

Több tanulmány azt feltételezi, hogy a nukleotidkötő árok két állapotot vehet fel, nyitott és zárt állapotot. A két állapot közötti átmenetet az aktuális puffer körülmények, és az aktinhoz kapcsolódó ligandumok is szabályozzák. A G-aktinban a nukleotidcseré miatt bekövetkező változások is a két átmenet egyensúlyának az eltolódásához vezetnek. Az eltérő nukleotidot kötő állapotok kiemelkedően fontosak a filamentális aktin struktúrájának kialakításában, illetve befolyásolják a kialakult aktin filamentum fizikai tulajdonságait is. 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. Ugyancsak speciális konformációjú aktin filamentum állapot alakul ki olyan esetekben, amikor a kötött nukleotid nem hidrolizálható ATP analóg, vagy ADP- P_i .

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. Az ATP nukleotid analógjának tekinthető, amennyiben az AMP.PNP használatakor az aktin filamentum az ATP-aktin állapothoz tartozó szerkezeti tulajdonságokat mutat.

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. A fascin és az alfa-aktinin jelen vannak kortikális és citoszkeletális aktin struktúrákban, mint például mikrovillusokban, sztereocíliumokban és filopódiumokban, valamint részt vesznek sejt-mátrix adhéziós folyamatokban, sejt-mozgásban, a sejtek közötti interakciókban.

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. Míg sok esetben a foszforiláció aktiválja a fehérjét és számos jelátviteli utat, addig a fascin az egyik olyan aktinkötő fehérje, amelyet a foszforiláció negatívan szabályoz. A fascin két aktinkötő hellyel rendelkezik. Az egyik a fehérje C-terminális részén (β trefoil-3) található, a Ser39 foszforilációs hely mellett, amelynek kulcsszerepe van az aktinhoz való kötődésében, a másik pedig az N-terminális végen (β trefoil-1). Ezek a kötőhelyek részt vesznek a stabil és viszonylag merev aktinkötegek kialakításában. A segítségükkel létrejövő aktinkötegek útvonalat szolgáltatnak a vezikulák transzportja számára a sejtesttől a folyamatosan fejlődő sejt kitüremkedés 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. Expressziója fontos az aktinkötegek stabilitásához az invadopódiumokban. A legtöbb normál felnőtt epitél sejtben vagy egyáltalán nem, vagy nagyon kis mennyiségben expresszálódik, azonban a legtöbb humán karcinómában nagyobb mennyiségben íródik át, 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 .

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. 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.

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 hármas helikális tandem rendeződő struktúra követ. 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 .

Az alfa-aktinin a sejten belül különböző részeken fordul elő, mint a harántcsíktolt izom Z-lemezeiben, illetve a nem-izom eredetű sejt adhéziós plakkokban. Az alfa-aktinin különböző izoformái az aktin filamentumokat vagy poláris, vagy bipoláris aktinkötegekké kötegelhetik és ennek következtében a létrehozott aktin hálózat polaritása a fehérjétől függ.

Hasonló alapvető funkciójuk (keresztkötés és kötegelés) ellenére az alfa-aktinin és a fascin által kötegelt aktin filamentumok különböző mechanikai sajátságokat mutatnak. Különbségek vannak a kötegek összeépülésének gyorsaságában, illetve a rugalmasságukban is, attól függően, hogy a kötegelő milyen koncentrációban van jelen. 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. Ennek oka vélhetően leginkább a kötegelő molekulák közötti méretbeli különbség.

A fascin tömörebb aktin kötegeket hoz létre, mint az alfa-aktinin. Azonban az összefüggés a jellemző geometriai tulajdonságaik és a funkcionális viselkedésük között

nem ilyen egyszerű. Nagy és munkatársai 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 csúcsaiban. Ricca és Rock 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.

Célkitűzések

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.

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 fascinnak vagy az alfa-aktininnek az aktin filamentumokhoz való kötődése által okozott flexibilitás változások kimutatásához az EPR alkalmazásán alapuló módszereket alkalmaztunk.

Ehhez 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?

Anyagok és módszerek

Az aktin preparálása

Az aktin fehérjét házi nyúl (*Oryctolagus cuniculus domestica*) hátizmából preparáltuk. Ennek első részében Feuer és munkatársai módszere szerint aceton forgácsot készítettünk, amit felhasználásáig – 20 °C-on tároltunk. Ledaráltuk a nyúl hátizmából kinyert részeket, majd 4 °C-on, KCl-pufferben (150 mM K₂HPO₄, 100 mM KCl; pH 6,5), ezután 0,05 M NaHCO₃ 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 °C-on több hónapig minőségromlás nélkül felhasználható volt.

Az aktin kinyerését az aceton forgácsból a Spudich és Watt által leírt módszer alapján végeztük. A forgácsunkat A-pufferben (4 mM Tris-HCl vagy MOPS; 0,5 mM MEA, 0,2 mM ATP, 0,1 mM CaCl₂, 0,005 % NaN₃; pH 8,0), jégen kevertettük, négyrétegű steril gézlapon átszűrtük, majd ezeket a műveleteket még egyszer megismételtük. A szűrletet centrifugáltuk (100000g, 2 óra, 4 °C-on), a felülúszóhoz 2 mM MgCl₂-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 °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 CaCl₂, 0,005 % NaN₃; 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 °C-on) tisztítottam meg.

A preparálás végén az aktint A-pufferben 4 °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 mg⁻¹ ml cm⁻¹ abszorpciós koefficiens alkalmazva a számoláshoz.

Az aktin filamentumok létrehozásához (polimerizálás) az aktin monomerekhez 2 mM MgCl₂-ot és 100 mM KCl-ot adtunk (végkoncentrációk), és az oldatot két órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk.

Kötegelő fehérjék (alfa-aktinin és fascin) preparálása

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 feltáró 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 sejtuszuspenzióhoz DNáz I enzimet (1ml/15 g) adtunk, majd 1 órán át 0 °C-on kevertettük. A felesleges sejtörmeléket 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 Glutation-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.

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 feltáró 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.

Az aktin jelölése EPR vizsgálatokhoz

Az aktint az EPR alkalmazások érdekében paramágneses vegyülettel (EPR szondával) reagáltattuk; ezt nevezzük a későbbiekben spinjelölésnek.

Az alkalmazott mérési módszerek

EPR spektroszkópia

Már az 1970-es évek óta kutatták az aktin és miozin rendszereket EPR spektroszkópia alkalmazásával a PTE ÁOK Biofizikai Intézet munkatársai. 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. A speciális jelölési technikák — pl. „site directed labeling”, segítségével az általunk jelölt csoport közvetlen környezetének rotációs

dinamikáját is tanulmányozhatjuk. Ez függ attól, hogy a spinjelölt molekularészlet (szegmens) a molekula egészétől függetlenül mozog-e, vagy sem. Amennyiben a spinjelölővel megjelölt szegmens rigidén 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

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. 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. Az energiaállapotok leírásakor az elektron saját spinjét, valamint az atommag spinállapotát is figyelembe kell vennünk, mivel az atommagok spinállapota is befolyásolja a mágneses térben lévő elektronok energiaállapotait. 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.

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. 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. a fehérjék termodinamikai, valamint térszerkezeti stabilitása között fennálló kapcsolat kalorimetrikus módszerekkel feltérképezhető. 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.

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 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. 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. 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 csak a mintában lezajló változások okozzák.

Eredmények

Munkám első részében az aktin fehérje szerkezetében az eltérő nukleotidok (ATP, ADP és AMP.PNP) kötődése által előidézett konformációs és dinamikai változásokat vizsgáltam. Feltételezésünk szerint az F-aktinban a monomerek ADP-t kötnek, ezzel biztosítva a működéséhez szükséges optimális flexibilitást.

Megfigyeléseink:

- (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.

Munkám második részében elvégzett méréseim az aktinkötő fehérjék által létrehozott hálózat szabályozásának és dinamikájának megismerésére irányultak.

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.
- (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 keresztkötött szerkezet kialakulása okozhatott a filamentumok között.

Közlemények

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

Katalin Túrmer, Franciska Könczöl, Denes Lőrinczy and Jozsef Belagyi: AMP.PNP affects the dynamical properties of monomer and polymerized actin: A DSC and an EPR study 2011; Journal of Thermal Analysis and Calorimetry Vol. 108 95-100.

IF: 2,09

Katalin Túrmer, 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.

IF: 3,66

Az értekezésben nem szereplő közlemények:

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

IF: 2,17

Szilvia Barkó, Dávid Szatmári, Emőke Bódis, **Katalin Túrmer**, 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.

IF: 4,702

Összesített IF: 12,622