

PhD értekezés

---

IZOMFEHÉRJÉK FUNKCIONÁLIS DINAMIKÁJÁNAK  
VIZSGÁLATA FLUORESCENCIA SPEKTROSKÓPIÁS  
MÓDSZEREKKEL

NYITRAI MIKLÓS

Pécsi Orvostudományi Egyetem  
Biofizikai Intézet

1997

A program megnevezése: Biokémia és molekuláris biológia  
Programvezető: Dr. Sümegi Balázs, egyetemi tanár  
Az alprogram megnevezése: Funkcionális fehérjedinamika vizsgálata  
biofizikai módszerekkel  
Alprogramvezető: Dr. Somogyi Béla, egyetemi tanár

## *Köszönetnyilvánítás*

*Köszönetet mondok témavezetőmnek, Dr. Somogyi Béla egyetemi tanárnak, a POTE Biofizikai Intézet igazgatójának a szakmai irányításért, a munkám során nyújtott támogatásáért, értékes tanácsaiért.*

*Köszönöm Dr. Belágyi József egyetemi tanárnak, hogy meghatározó módon hozzájárult az izomműködéssel kapcsolatos ismereteim elmélyítéséhez, és a vizsgálatok eredményes kivitelezéséhez.*

*Köszönöm Dr. Hild Gábornak a mindennapi munka során nyújtott pótolhatatlan baráti segítségét.*

*Köszönettel tartozom a POTE Biofizikai Intézet valamennyi dolgozójának, akik hasznos észrevételeikkel elősegítették értekezésem elkészítését.*

*Köszönöm szüleimnek és feleségemnek, Katicának, a megértő támogatást, amely mindig mindig harmónikus háttérrel biztosított munkám végzéséhez.*

## TARTALOMJEGYZÉK

I. Irodalmi áttekintés.....	7
I.1 Az izomkutatók rövid története.....	7
I.2 Az aktin polimerizációja és szerepe az izomkontrakcióban.....	12
I.3 Szabályozás a haránt-csikolt izomban; a troponin C.....	13
I.4 A triptofán fluoreszcencia paramétereinek összefüggései a környezeti paraméterekkel.....	16
II. Célkitűzések.....	19
III. Anyagok és módszerek.....	20
III.1 Alkalmazott anyagok.....	20
III.2 Fehérje-preparálás, alkalmazott pufferek.....	20
III.2.1 Az aktin preparálása.....	20
III.2.2 A troponin C vizsgálata során alkalmazott pufferek és eljárások.....	21
III.2.3 A fehérje-koncentráció meghatározása a "coomassie assay" segítségével.....	22
III.2.4 Az aktin fluoreszcens jelölése.....	22
III.3 Peptidek jellemző adatai, a vizsgálatuk során alkalmazott pufferek.....	23
III.4 Alkalmazott módszerek.....	25
III.4.1 Spektrofotometria.....	25
III.4.2 Steady-state fluoreszcencia.....	25
III.4.3 Fluoreszcencia élettartam és anizotropia lecsengés mérések.....	26
III.4.4 Fényszórás.....	29
III.4.5 Fluoreszcencia kioltás.....	30

III.4.6 Förster-típusú energia transzfer (FRET) .....	31
III.4.7 A fluoreszcencia élettartam hőmérséklet-függése .....	33
III.4.8 A steady-state fluoreszcencia anizotrópia hőmérsékletfüggése .....	33
IV. Eredmények és következtetések .....	35
IV.1 Az aktin .....	35
IV.1.1 Az aktin monomer és a filamentumba beépült protomer összehasonlítása .....	35
IV.1.2 A C-terminális alegység összehasonlítása Ca-G-, és Mg-G-aktinban .....	38
IV.1.3 Az aktin alegységei közötti flexibilitás .....	45
IV.2 A kationok (Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> ) hatása a troponin C C-terminális alegységének szerkezetére és dinamikájára .....	52
IV.3 A környezeti paraméterek hatása a triptofán fluoreszcencia paramétereire peptidekben .....	62
V. Az értekezés témakörébe tartozó saját közlemények .....	71
VI. A hivatkozott irodalom .....	72

## I. Irodalmi áttekintés

### *I.1 Az izomkutatások rövid története*

A mozgás legismertebb megnyilvánulása a magasabb rendű biológiai rendszerekben az izmok összehúzódása. Az izom lehet sima- vagy harántcsikolt, ill. az ezek közötti átmenetnek tekinthető szívizom. Az elnevezések a mikroszkópos vizsgálatok során látható mintázatra, ill. ennek hiányára utalnak. A simaizom alkotja a gerincesek nem akaratlagos beidegzésű zsigeri izomzatát, míg a harántcsikolt izom az akaratlagos mozgások létrejöttét segíti elő. Biológiai funkciójuk mellett ezen csoportok természetesen mind szerkezetükben, mind mechanikai tulajdonságaikban különböznek. A kutatások többsége a harántcsikolt izom vizsgálatával foglalkozik, köszönhetően elsősorban annak, hogy a harántcsikolt izom a kísérletek számára nagyobb mennyiségben hozzáférhető.

Az izommal foglalkozó kutatásokban áttörést hoztak a XX. sz. technikai vívmányai. A modern izomkutatásban a hangsúly a makroszkópikus, fenomenológikus tulajdonságokról a molekuláris, ill. intramolekuláris szerkezet és funkció vizsgálata felé tolódott el [Huxley, 1992]. Engelhardt munkatársaival 1939-ben izomból izolált egy fehérjét, melyet miozinnek neveztek el. Néhány évvel később Szentgyörgyi Albert és munkatársa Straub F. Brúnó megállapították, hogy az Engelhardték által miozinnek nevezett kivonat valójában két fehérjének, a valódi miozinnek és egy másik ún. motorikus fehérjének a komplexe. A "másik" fehérjét aktinnak nevezték el. Straub 1942-ben leírja az aktin izolálásának a módszerét ún. acetone-forgácsból [Straub, 1942]. Vizsgálatai során megfigyelte, hogy egyes kationok hatására az aktin oldat viszkozitása megnő [Straub, 1942]. Ez tekinthető az első olyan tudományos munkának, mely kifejezetten az aktin tulajdonságainak megismerését tűzte ki célul.

Straub cikke nyomán számos laboratórium kezdte vizsgálni az aktin tulajdonságait. A kationok hatása mellett fény derült az aktinnak arra az alapvető tulajdonságára, hogy polimerizálható (ezt tapasztalta Straub a viszkozitás mérésekor). Az aktin tehát alapvetően két formában fordul elő: monomer vagy globuláris (G) aktinként, vagy a monomerek összekapcsolódása után filamentáris (F) aktinként. Több olyan fehérjét találtak, mely

megfelelő körülmények között képes kötődni az aktinhoz. Kiderült az is, hogy az izomműködésben a miozin mellett az aktinnak meghatározó, az akkori elképzelések szerint elsősorban strukturális szerepe van. Több elmélet született az izom-összehúzódásban betöltött szerepét illetően.

A vizsgálatok első szakaszában az izom-összehúzódásra vonatkozó elképzelések az akto-miozin komplexet polimerek kapcsolatainak tételezték fel. Eszerint az izom-összehúzódás során, az ATP elhasításából származó energiát felhasználva, a két fehérje egymáshoz képest folytonosan elmozdulva hozza létre az izom hosszcsökkenését. Az izom morfológikus tulajdonságaival foglalkozó kutatók, mint A.F. Huxley, Niedergcker, H.E. Huxley, vagy Hanson, eredményei nyomán azonban módosult ez az elképzelés.

Hanson és Lowy közölték először a monomerek filamentummá kapcsolódásának modelljét [Hanson, J. és Lowy, J., 1963]. A modellben a monomereket gömbök helyettesítették, melyek spirálba rendeződve kapcsolódnak össze F-aktinná. Ezt követően az elektron-mikroszkópia eredményeinek felhasználásával a modell tovább finomodott [Moore és mtsai., 1970; Spudich és mtsai., 1972; Wakabayashi és mtsai., 1975]. Ezek a megközelítések már egy olyan aktin monomerről beszéltek, mely egy kisebb és egy nagyobb alegységből épül fel. Abban azonban nem volt meg az egyetértés, hogy a két alegység közül melyik helyezkedik el közelebb a filamentum tengelyéhez. A kutatások ezen pontján a szerkezet pontosabb megismerése érdekében a röntgen-diffrakciós (vagy röntgen krisztallográfiás) módszer eredményeit kellett segítségül hívni. Alapvető probléma volt azonban az aktin kristályosítása, melyről később még lesz szó.

Az elmélettel kapcsolatos problémák ellenére 1972-ben a "Cold Spring Harbor Symposium on Contractile Proteins" elnevezésű nemzetközi konferencián a területtel foglalkozó kutatók jelentős része egyetértett abban, hogy az izom-összehúzódás molekuláris mechanizmusa megoldott problémának tekinthető. Ennek a kijelentésnek a megszületésében valószínűleg szerepet játszott az is, hogy az először 1969-ben ismertetett ún. "sliding hypothesis" [Huxley, 1969] megfelelő magyarázatnak tűnt az izom-összehúzódás mechanizmusára vonatkozólag.

A "sliding hypothesis" szerint az izom-összehúzódás valóban az aktin és a miozin kölcsönhatására épül, ahogyan azt a korábban felállított modellek is feltételezték. A miozin két nehéz és két könnyű láncból áll, ahol a nehéz láncok párhuzamosan, helikális szerkezetbe felcsavarodva futnak és két globuláris részben, az ún. miozin fejekben végződnek. A miozin

feji része a nehéz láncok végződése mellett két könnyű láncot is tartalmaz. A miozin fejen belül található a fehérje ATP-kötő helye. Ezek a globuláris részek (fejek) az ún. vastag filamentum külső feületén szabályos elrendeződésben (helikális szerkezetben) helyezkednek el. Két szomszédos miozin molekula egymáshoz képest 14.3 nm távolságra van eltolódva a filamentum hossztengelelinek irányában, és 120°-os szöggel egymáshoz képest el vannak csavarodva. A hélix menetemelkedése 42.9 nm. Egy-egy ilyen vastag filamentumban 200-300 miozin molekula található. Az izom-összehúzódás során a feji részek periodikus mozgásának köszönhetően a miozin és az aktin egymáshoz képest elmozdulva hozza létre a kontrakció elemi lépését. ATP hiányában a feji részek az aktinhoz kapcsolódnak, ún. "cross-bridge"-eket alkotva. Ekkor a "cross-bridge"-ek megközelítőleg 45°-os szöveget zárnak be az aktin filamentum tengelyével. Ha ATP van jelen, de hiányzik a  $Ca^{2+}$  a rendszerből a "cross-bridge"-ek leválnak az aktinról, és a hossztengelellyel 90°-os szöveget zárnak be. Az ATP és a  $Ca^{2+}$  kötésével létrejön az aktin-miozin kapcsolat, és az ATP-ADP átalakulás során felszabaduló energia felhasználásával megy végbe a miozin fejek elfordulása. Bár a későbbi kutatások eredményeként a fent említett alaplépésekből álló folyamat további részfolyamatokra bomlott, a jelenleg elfogadott modell lényege napjainkban is megegyezik a H. E. Huxley által leírtakkal. A modell cáfolta a korábban említett, a kontrakciót polimerek folytonos elmozdulásának feltételező modelleket.

Az elmélet lezártnak tekintésével azonban már 1972-ben sem értett egyet mindenki. A kétkedő tudósok táborába tartozott pl. A. Huxley is. 1974-ben a "J. Physiology" c. nemzetközi folyóiratban sorolta fel a megválaszolásra váró további fontos kérdéseket [Huxley, 1974]. Az itt felsorolt kérdések közül többre a mai napig sincs megfelelő válasz.

A további kutatások során világossá vált az is, hogy bár a modell szerint az izom-összehúzódásban közvetlenül az aktin filamentális formája vesz részt, a monomer formában lévő aktinnak is fontos biológiai szerepe van. A monomer biológiai funkciójának jelentőségét támasztotta alá pl. az ún. "traed-milling" mechanizmushnak a megismerése. Az elnevezés azt a jelenséget takarja, melynek során az F-aktin egyik végén a filamentumot alkotó monomerek folyamatosan disszociálnak, míg a másik végén újabb monomerek kapcsolódnak a polimerhez. A filamentum előbbi vége az ún. "pointed end", míg a másik a "barbed end" nevet kapta. A folyamat során az F-aktin megfelelő végeit jellemző disszociációs és asszociációs állandók által meghatározott módon kialakul egy dinamikus egyensúly. A mechanizmus bizonyítottan létezik *in vivo* körülmények között is [Wegner,

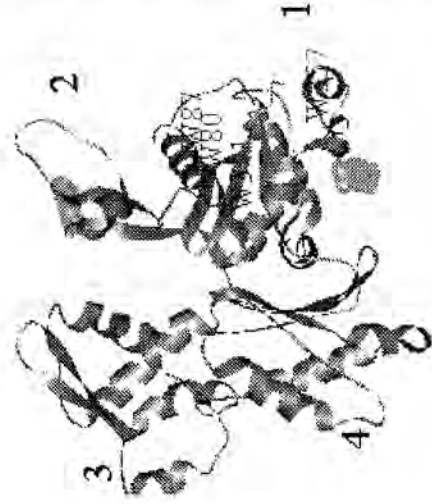


1976.] A folyamat létezése egy olyan G-aktin állományt feltételez, amely a dinamikus egyensúly kialakulásához a szabad monomereket biztosítja. Ennek a dinamikus egyensúlynak a kialakulása teszi lehetővé a filamentumok hosszának állandóságát, illetve esetenként szabályozott megváltozását. Mindezek a megfigyelések valószínűsítik, hogy az aktin biológiai funkciójának megismeréséhez mind a filamentális, mind a monomer forma szerkezetének és az izom-összehúzódásban betöltött szerepének a tisztázása szükséges.

A kutatások során a funkcióval kapcsolatos kérdések megválaszolása általában a fehérje szerkezetének pontosabb megismeréséhez kapcsolódott. Az aktin kristályosításával kapcsolatban felvetődő problémákról már esett szó: nem sikerült az aktin monomert a vizsgálatokhoz szükséges mértékben kristályosítani. A megoldást végül olyan komplexek kristályosítása hozta meg, melyekben az aktin monomerhez más fehérjéket kapcsoltak. Először 1981-ben sikerült ilyen röntgen-diffrakciós vizsgálatokra alkalmas kristályokat növesztetni aktinból [Suck és mtsai., 1981]. Ezek a vizsgálatok 6 Å-ös felbontásban voltak képesek visszaadni az aktin monomer térszerkezetét. A kristályosítás során DNase I-t kapcsoltak az aktin monomerhez. Ezen mérések alátámasztották a korábbiakban már megkülönböztetett két alegység létezését, és a monomer méretének paramétereit  $67 \times 40 \times 37$  Å-ben adták meg. Két év múlva egy nagyai kutatócsoport [Sakabe és mtsai., 1983], majd újabb két év elteltével egy heidelbergi laboratórium [Kabsch és mtsai., 1985] ugyancsak közölte az aktin térszerkezetének krisztallográfias rekonstrukcióját.

A Huxley-féle elmélettel indult korszakot a '90-es években váltotta fel egy újabb periódus. A választó 1990-ben a röntgen-diffrakciós vizsgálatok eredményeképpen az aktin háromdimenziós szerkezetének 2.8 Å-ös felbontásban történő megismerése volt (1. ábra) [Kabsch és mtsai., 1990].

Azóta napjainkig további eredmények is napvilágot láttak az aktin monomer térszerkezetét illetően [McLaughlin és mtsai., 1993; Schutt és mtsai., 1993]. A monomer kristályosításával kapcsolatban felvetődő problémákat minden esetben egy fehérje (DNase I, gelsolin segment 1, profilin) aktinhoz való kapcsolásával oldották meg. Ennek megfelelően az eredmények értékelése során figyelembe kell venni az ezen kapcsolódásokkal esetlegesen fellépő szerkezeti torzulásokat is.



1. ábra: Nyíl vízizomból preparált aktin monomer szerkezetének szalagmodellje [Kabsch és mtsai., 1990]. Az 1-4 számok az ún. "subdomén"-eket jelölik. A fluoreszcencia kioltási kísérleteinkben vizsgált négy triptofánt a subdomén 1-en belül ugyancsak feltüntetjük.

Nem sokkal az aktin szerkezetéről megjelent első cikk után Rayment, ill. Schröder kutatócsoportja közzétette a akto-miozin rendszer háromdimenziós szerkezetét is [Rayment és mtsai., 1993a,b; Schröder és mtsai., 1993]. Az ebből a szerkezetből levont funkcionális következtetések összhangban vannak a "sliding-hypothesis" által feltételezett kontrakciós mechanizmussal. További előrelépés volt, hogy ismertté vált az aktin polimerizált formájának, az F-aktinnak a szerkezete is [Holmes és mtsai. 1990; Milligan és mtsai., 1990].

A röntgen-krisztallográfias vizsgálatok eredményei vitathatatlanul az egyik legfontosabb forrását jelentik az aktin szerkezetével kapcsolatos ismereteinknek. Ugyanakkor ezen kísérletek csak bizonyos mértékig képesek leírni az aktin monomer, ill. filamentum belső mozgásait, dinamikáját. A már meglévő szerkezeti ismeretekre támaszkodva ezen mozgások sebességére, kiterjedtségére vonatkozóan szimulációs, ún. normál módusú analízis módszert alkalmazva nyerhetünk további információt. Az ezen tanulmányok során kapott eredmények már rendelkezésünkre állnak [Tirion és ben-Avraham, 1993; Tirion és mtsai., 1995]. További ismeretek megszerzése válik lehetővé a spektroszkópia eljárásainak (így pl. az általunk is használt fluoreszcencia spektroszkópiának) az alkalmazásával.

A háromdimenziós szerkezeti leírások megismerése révén 1990-től lehetőség nyílt újabb problémák megfogalmazására és megválaszolására. Világossá vált, hogy az 1972-es konferencián lezártak nyilvánított kérdéskör még igen sok és fontos megválaszolatlan kérdést tartalmaz.

## I.2 Az aktin polimerizációja és szerepe az izomkontrakcióban

Az már a korai kutatások során ismertté vált, hogy az aktin képes mind monovalens, mind bivalens kationok megkötésére [összefoglaló pl. Estes és mtsai., 1992]. Napjainkban sem teljesen tisztázott azonban a kationok biológia szerepe az izomműködés során, és a mechanizmus, melynek segítségével hatásukat kifejtik. Megállapítást nyert, hogy egyetlen nagy affinitású kötőhely mellett létezik legalább három olyan régió az aktin monomeren belül, mely ugyancsak képes ionok megkötésére, bár kisebb affinitással. A legnagyobb affinitású kötőhely különböző affinitást mutat a különböző (kétértékű) ionokra ( $\text{Ca}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Sr}^{2+}$  sorrendben) [Strzeleczka-Golaszewska, 1973; Strzeleczka-Golaszewska és Drabowski, 1968; Strzeleczka-Golaszewska és mtsai., 1978; Loscalzo és Reed, 1976], míg az alacsonyabb affinitású helyek gyakorlatilag egyformán kötik ezeket az ionokat [Carlier és mtsai., 1986]. Leggyakrabban a  $\text{Mg}^{2+}$  és a  $\text{Ca}^{2+}$  hatását vizsgálják a kutatások során. A  $\text{Ca}^{2+}$  stabilizálja a monomer szerkezetét, és az izolálás során általában ezen kation jelenlétében állítják elő izomból az aktint. Ugyanakkor a nyugalmi sejten belüli ionkoncentrációkat figyelembe véve [Kushmerick és mtsai., 1986; Tsien és mtsai., 1982; Kopp és mtsai., 1990] az aktin *in vivo* körülmények között magnéziummal van telítve.

Már az első vizsgálatok során világossá vált, hogy az aktin monomerek filamentummá képesek összekapcsolódni. Ennek ellenére ma sem pontosan ismert jelenség az aktin polimerizációja, ill. az azt befolyásoló környezeti paraméterek szerepe. Az aktin polimerizálódási képessége jellemezhető pl. az ún. kritikus koncentrációval. Ezen koncentráció alatt a definíciónak megfelelően nem alakulnak ki filamentumok, míg ha a monomerek koncentrációja meghaladja ezt az értéket, filamentumok jönnek létre. Ha az aktin  $\text{Ca}^{2+}$ -al van telítve, kritikus koncentrációja megközelítően 10-szer nagyobb, mint  $\text{Mg}^{2+}$ -al telített állapotában [Martonosi és mtsai., 1964; Carlier és mtsai., 1986; Kinoshia és mtsai., 1991]. A polimerizáció folyamata két jól elkülönülő folyamatra bontható. Időben először az ún. "nukleáció" (vagy magképződés) történik meg, melynek során néhány (1-3) monomer a környezeti paraméterek megváltozásának hatására komplexet alkot. Ezt követően az ún. "elongáció" során kapcsolódnak a komplexhez további monomerek, és

alakul ki a filamentális szerkezet. A  $\text{Ca}^{2+}$  és a  $\text{Mg}^{2+}$  a polimerizáció két szakaszára különböző hatással van. A Mg-aktin nukleációja nagyságrendekkel gyorsabb, mint a Ca-aktiné [Tobacman és Korn, 1983], míg az elongáció sebessége megközelítőleg azonos a két kationnal telített aktinra vonatkozóan [Gershman és mtsai., 1989].

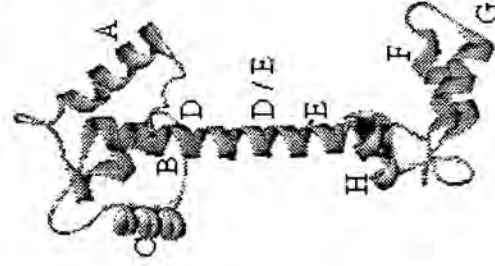
A polimerizáció folyamatát elindíthatja pl. az ionerősség megnövekedése. A sejtekben bizonyítottan van monomer formában lévő aktin. Felmerült a kérdés, hogy az *in vivo* körülmények között  $\text{Mg}^{2+}$ -al telített aktin miért nem polimerizál a sejten található viszonylag magas ionerősség mellett. A kérdésre a jelenleg leginkább elfogadott elmélet alapján olyan fehérjék (ún. "cap-protein"-ek) aktinhoz kapcsolódása adja meg a választ, melyek gátolják a nukleáció folyamatát. A polimerizáció folyamata termikusan is szabályozott. Magasabb hőmérsékleten a kritikus koncentráció ugyan változatlan, de a polimerizáció folyamata (ha létrejön) gyorsabb. A puffer pH-ja ugyancsak hatással van a filamentumok képződésére. A polimerizációt az enyhén savas pH (pH 5-6) elősegíti. Az ATP jelenléte (az ADP jelenlétével szemben) ugyancsak kedvezően hat a polimerizáció folyamatára. Ezek a paraméterek szorosan csatoltak a biológiai rendszerekben, az egyes jellemzők megváltozása hatással lehet más állapotjelzők alakulására is. A csatolás létezésére példa, hogy a  $\text{Mg}^{2+}$  kötődésével az ATP hidrolízise felgyorsul [Carlier és mtsai., 1987]. Mivel a filamentumok képződésekor a hidrolízis ugyancsak végbemegy, sebességének módosulása hatással van magára a polimerizációra is.

Mindezek az eredmények érzékeltetik az izomműködés további tanulmányozásának jelentőségét. Ugyanakkor jól példázzák azt is, hogy a fizika és kémia eredményei a biofizikában, és általában a biológiai kutatások területén, még új lehetőségeket rejtenek, fontos és értékes információk megszerzését teszik lehetővé.

### 1.3 Szabályozás a haránt-csíkkolt izomban; a troponin C

Az élő rendszerekben a mozgást közvetlenül létrehozó fehérjék (ún. motor-fehérjék, mint pl. az aktin és a miozin) működésüket szabályozó fehérjék irányítása alatt végzik. Haránt-csíkkolt izomban ezt az irányító szerepet a troponin komplex tölti be [El-Saleh és mtsai., 1986; Zot és Potter, 1987; Grabarek és mtsai., 1992; Farah és Reinach, 1995]. A troponin komplex négy, egymástól mind funkcióját, mind szerkezetét tekintve jól elkülönülő

alegységből áll: a troponin I-ből, troponin T-ből, troponin C-ből és a tropomiozinzinből. Ezen alegységek közül a jelenleg leginkább elfogadott ún. "térkizárásos" model szerint a troponin T strukturális szerepet tölt be, míg a troponin I és a tropomiozin  $Ca^{2+}$  hiányában olyan konformációt vesz fel, mellyel elzárja a miozin és aktin kapcsolat kialakulására alkalmas területeket, és ezzel lehetetlenné teszi az izomkontrakció létrejöttét. A komplexben a troponin C képes megkötni a  $Ca^{2+}$ -ot, ez az az alegység, mely a  $Ca^{2+}$ -koncentráció megnövekedését érzékelve elindítja az izom-összehúzódáshoz vezető folyamatot.



2. ábra: a csirke vázizomból preparált troponin C szerkezetének szalagmodellje [Sunaralingam és mtsai., 1985]. Az A-H betűk az  $\alpha$ -hélixeket jelölik.

mtsai., 1987; Kobayashi és mtsai., 1989a,b,c; Parmacek és Leiden, 1989; Feller és Gerday, 1989; Gahlmann és Kedes, 1990]. Ilyen szerkezeti modellek 1985-ben láttak napvilágot a csirke troponin C-ről (2. ábra) [Sunaralingam és mtsai., 1985], valamint a pulyka troponin C-ről [Herzberg and James, 1985]. A két különböző fajból izolált troponin C térszerkezete igen hasonlónak bizonyult. Ezen eredmények szerint a troponin C egy megközelítőleg súlyzó alakú molekula (2. ábra). A súlyzó két gömjének a fehérje két terminális (N-, ill. C) alegysége felel meg. Ezek az alegységek egy nyolc aminosavból álló láncsal vannak összekötve. A molekula nyolc hélixet tartalmaz, melyeket az aminosav sorrendnek megfelelően A-H betűkkel jelölnek (2. ábra). A fehérjén belül négy kationkötő hely van, melyekből a két alegységen (C-, és N-terminális alegységek) két-két kötőhely helyezkedik el. Minden kationkötő hely az ún. "EF-hand" fehérjéknél általános "helix-loop-helix" struktúrával rendelkezik [Kawasaki és Kretsinger, 1994]. A négy kötőhely a

Több különböző fajból származó troponin C térszerkezete áll rendelkezésünkre a röntgen-krisztallográfiai vizsgálatok eredményeinek köszönhetően [Demaille és mtsai., 1974; Malencik és mtsai., 1975; Romero-Herrera és mtsai., 1976; van Eerd és Takahashi, 1976; Wilkinson, 1976, 1980; Collins és mtsai., 1977, 1991; van Eerd és mtsai., 1978; McCubbin és mtsai., 1982; Lorkin és Lehrmann, 1983; Takagi és Konishi, 1983; Gerday és mtsai., 1984; Roher és mtsai., 1986; Maisonpierre és mtsai., 1987; Putkey és mtsai., 1987; Zot és

kationkötő képesség szempontjából két csoportra bontható [Grabarek és mtsai., 1992; Li és mtsai., 1995]. Az N-terminális alegységben a két kationkötő hely, az ún. alacsony affinitású kötőhelyek, specifikusan  $\text{Ca}^{2+}$ -ot kötnék [Potter and Gergely, 1975], a másik alegység kötőhelyeihez képest kb. 100-szor kisebb affinitással. A két kationkötő hely a C-terminális alegységben képes mind a  $\text{Ca}^{2+}$ , mind a  $\text{Mg}^{2+}$  megkötésére.

A troponin C röntgen-kristallográfiával meghatározott térszerkezete alapján a molekulán belül a két alegységet összekötő, nyolc aminosavból álló hid gyakorlatilag egyenes, modellje egyetlen, a hossz tengellyel egybeeső szimmetriatengely köré szerveződik (2. ábra). A további kutatások eredményeként azonban kiderült, hogy oldatban nem ez a fehérje egyetlen lehetséges konformációja. Fiziológias körülmények között a fehérje ezen vizsgálatok szerint egy a fent említett nyitott térszerkezetnél zártabb állapotban van [Heidorn és Trewihella, 1988; Hubbard és mtsai., 1988; Wang és mtsai., 1989; Cheung és mtsai., 1991]. Az alegységeket összekötő hid középső szakaszán van egy pont, az ún. "hinge-point", mely körül a hid két fele elfordulhat egymáshoz képest. Jelen ismereteink szerint az elfordulás után a két fél egymással bezárt szöge oldatban megközelítőleg  $120^\circ$ . Természetesen ez az érték mint egy statisztikus átlag kezelhető, hiszen a fehérjének egyidejűleg több konformációs állapota létezhet, amelyeknek általában ezt a statisztikus átlagát mérhetjük ki a különböző kísérleti módszerekkel.

A két kationkötő hely az N-terminális alegységen (I és II kötőhelyek) kulcsszerepet játszik a szabályozásban [Johnson és mtsai., 1979; El-Salah és mtsai., 1986; Allen és mtsai., 1992; Grabarek és mtsai., 1992; Farah és Reinach, 1995]. Ugyanakkor a C-terminális alegységen belül a másik két kötőhely (III és IV kötőhelyek) szerepe nem teljesen tisztázott. Korábbi tanulmányok valószínűsítik, hogy ezek a kötőhelyek csupán strukturális funkciót töltenek be a troponin komplex stabilizálásával [Potter és Gergely, 1975; Zot és Potter, 1982]. Ugyanakkor Negele és munkatársai eredményei alapján bebizonyosodott, hogy szívizomból származó troponin C esetében a szabályozás létrejöttéhez legalább egynek ezen kötőhelyek közül kötnie kell  $\text{Ca}^{2+}$ -ot [Negele és mtsai., 1992].

A  $\text{Ca}^{2+}$  kötődésének eredményeként a fehérjében az  $\alpha$ -hélixek aránya megközelítőleg 50%-al megnő [Murray és Kay, 1972; van Eerd és Kawasaki, 1972]. Ez a jelentős növekedés gyakorlatilag teljes egészében a C-terminális szerkezetében beállt változásoknak tulajdonítható [Johnson és Potter, 1978; Leavis és mtsai., 1978; Li és mtsai., 1994].

Ugyancsak a  $\text{Ca}^{2+}$  kötődésének hatására a fehérje szerkezete merevebbé válik, és a szerkezeti fluktuációk amplitúdója lecsökken [Kareva és mtsai., 1986].

A  $\text{Ca}^{2+}$  tehát a mérések tanúsága szerint jelentős változásokat okoz a troponin C szerkezetében. A konformáció megváltozásában a másodlagos szerkezeti elemek átrendeződése kulcsszerepet játszik [Liou és Fuchs, 1993]. Ezen változások leírására Herzberg munkatársaival felállított egy modellt [Herzberg és mtsai., 1986]. A modell általánosított továbbfejlesztése 1988-ban jelent meg [Richardson és Richardson, 1988].

A modell szerint a szabályozás folyamatában a troponin C és troponin I közötti kapcsolat kulcsfontosságú. A  $\text{Ca}^{2+}$  alacsony affinitású helyekre történő kötődésével a B és C hélixek eltávolodnak az A és D hélixektől (2. ábra), így a troponin I számára hozzáférhetővé válik a kapcsolódási pontként szolgáló hidrofób terület [Herzberg és mtsai., 1986; Olah és Trewthella, 1994]. Hasonló, a kötést lehetővé tevő hidrofób "zseb" jön létre a C-terminális alegység hélixének átrendeződésével. Ebben a tartományban az UV spektrofotometriás vizsgálatok eredményei szerint az F és G hélixek megörik szerkezetüket, míg az E és H hélixek coil-hélix transzformáción mennek keresztül, ha a  $\text{Ca}^{2+}$  a III-as és IV-es kötőhelyhez kapcsolódik [Nagy és Gergely, 1979]. A szabályozás folyamatában mind a C-, mind az N-terminális alegység kölcsönhatásban áll a troponin I inhibitor szegmensével. A szabályozás létrejöttéhez ezen kölcsönhatások mindegyikére szükség van. A C-terminális stabilizálja a komplexet, míg az N-terminális közvetlenül részt vesz az aktin-miozin kapcsolat létrejöttében fontos területek elzárásában, ill. szabaddá tételében [Grabarek és mtsai., 1992].

Megállapítható tehát, hogy a troponin C-ben a  $\text{Ca}^{2+}$  hatására létrejövő konformációs változások meghatározó szerepet töltenek be a haránt-csíkolt izom működésének szabályozásában. Ezen változások mibenléte és funkciója azonban még nem pontosan ismert.

#### *1.4 A triptofán fluoreszcencia paramétereinek összefüggései a környezeti paraméterekkel*

A fluoreszcencia vizsgálatán alapuló módszerek felhasználásakor adódnak olyan problémák mind a technikával, mind a vizsgált rendszer fluoreszcencia tulajdonságaival kapcsolatban, melyek megoldásával a mérések megbízhatóbbak lesznek, vagy az eredmények interpretációja pontosabb lehet. Ezeket a problémákat két nagy csoportba

sorolhatjuk. Az elsőbe tartoznak azok, melyek a mérés során felhasznált berendezések tökéletesítésére, ill. az elemzés során felhasznált matematikai módszerek alkalmasabbá tételére irányulnak. A másik nagy csoportba ezen besorolás szerint a fluorofórok és környezetük fiziko-kémiai tulajdonságainak, és a mérés eredményeként kapott fluoreszcencia tulajdonságoknak az összefüggéseit vizsgáló kérdések tartoznak. Az ezen paraméterekkel kapcsolatban felmerülő bizonytalanság általában megnehezíti a kísérleti eredmények kiértékelését [Creed, 1984; Beechem és Brand, 1985].

A fluorofórok közül az egyik leggyakrabban vizsgált és így az egyik legfontosabb a triptofán. Ennek oka elsősorban az, hogy a fehérjékben gyakran előfordul, mint azok természetes alkotója, ún. "intrinsic" fluorofór. A fluorofór egyes fehérjékben vagy peptidekben mért paramétereiből a környezet (és itt környezetet értjük a fehérje-mátrixot is) és a fluorofór ismert kölcsönhatásai alapján információt nyerhetünk a vizsgálni kívánt rendszer állapotáról, ill. annak változásairól. Ezen kölcsönhatások ismerete tehát lényeges a mérés eredményeinek kiértékelése szempontjából.

A fent említett kölcsönhatások megismerésének ideális módja lenne, ha egyetlen környezeti paraméter változtatásának a fluoreszcencia tulajdonságokra gyakorolt hatását mérnénk. Ilyen ideális rendszer azonban nincs, mivel ezek a paraméterek mindig csatoltak, egymásra is hatással vannak. Megoldást jelenthet, ha a kísérletes munka során kiválasztunk egy jól szabályozható paramétert, melynek változtatásával végezzük el a mérést. A paraméterek csatolt voltát a mérés eredményeinek kiértékelésekor vehetjük figyelembe.

A triptofán fluoreszcencia élettartam értéke, valamint az emissziós maximum hullámhossza függ az oldat pH értékétől. A fluorofór fluoreszcencia intenzitásának időfüggése vizes pufferben semleges pH-n két exponenciális komponens összegével írható le [Beechem és Brand, 1985]. Ezt a tulajdonságát a fehérjék túlnyomó többségében is megőrzi, bár a fluoreszcencia élettartam-komponensek értéke és amplitúdója igen széles tartományon belül változik a különböző fehérjékben [White, 1959; Szabo és Rayner, 1980; Hutnik és Szabo, 1989; Gudgin és mtsai., 1981; Gudgin és mtsai., 1983; Boens és mtsai., 1989]. Egyetlen exponenciális komponenssel jól leírható fluoreszcencia lecsengést csak az RNase-T<sub>1</sub>-ben és az azurin kationmentes formájában, speciális környezeti paraméterek mellett mértek. A komplex fluoreszcencia lecsengés magyarázatára számos modell született [Stryer, 1966; Kirby és Steiner, 1970; Ricci, 1970; Lehrer, 1970; Donzel és mtsai., 1974; Robbins és mtsai., 1980; Saito és mtsai., 1984; Shizuka és mtsai., 1988ab; James és Ware, 1985;



Wagner és mtsai., 1987; Fraunfelder és mtsai., 1988; Alcalá és mtsai., 1987; Bajzer és Prendergast, 1993; Colucci és mtsai., 1990; Tilstra és mtsai., 1990; Yu és mtsai., 1992]. Ezek közül a jelenleg leginkább elfogadott az ún. "rotamer modell" [Szabo és Rayner, 1980; Donzel és mtsai., 1974; Petrich és mtsai., 1983; Engh és mtsai., 1986; Chang és mtsai., 1983]. A modell szerint a triptofánnak három különböző konformációs állapota létezik, mely három állapot a  $C^\alpha$ - $C^\beta$  kötés körüli elfordulással egymásba átalakulhat. Ezek között a környezet és a fluorofór által szabályozott dinamikus egyensúly áll fenn. A különböző konformációs állapotokban a triptofán fluoreszcencia élettartama és kvantumhatásfoka eltérő.

A triptofán különböző fehérjékben (ill. peptidekben) mért fluoreszcencia élettartama eltérésének magyarázata nem pontosan ismert. A fluorofór a gerjesztés után több olyan módon is leadhatja környezetének a gerjesztés során felvett energiát, melyek során nem jön létre elektromágneses emisszió (fotonbocsátás). Ezen ún. "nem-radiatív" lecsengési utak különbözősége magyarázhatja a fluoreszcencia paraméterek különbözőségét. A nem-radiatív utak közül az oldat molekuláinak kioltó hatása, gerjesztett állapotban létrejövő proton-, vagy elektronsere, az első gerjesztett állapotból a triplet állapotba történő átmenet, vagy az ún. "foto-ionizáció" tekinthető a legfontosabbaknak [Colucci és mtsai., 1990; Tilstra és mtsai., 1990; McMahon és mtsai., 1992]. Ezen folyamatok kísérletes módszerekkel elkülöníthetőek lehetnek, de mivel hatásuk általában egyszerre és ugyanazon paramétereken jelentkezik, gyakran csak az egyes folyamatok jelenlétének ténye, vagy hatásuk nagyságrendje állapítható meg.

Kísérleteink során a triptofánnak és környezetének kölcsönhatását vizsgáltuk. Egyetlen triptofánt tartalmazó peptideket tanulmányoztunk különböző pH / pD-jű pufferekben, és a hőmérsékletnek, ill. a peptideken belül található funkcionális csoportoknak a triptofán fluoreszcencia paramétereire gyakorolt hatását mértük.

## II. Célkitűzések

Mint azt az irodalmi áttekintés során megállapíthattuk, az izom-összehúzódásról, és általában az izomműködésről rendelkezésünkre álló ismeretek még nem elégségesek a mechanizmus pontos megértéséhez. Ugyanakkor az alkalmazott módszerekkel kapcsolatban felvetődnek olyan elméleti és technikai vonatkozású problémák, melyek megválaszolásával a kísérleti eredmények pontosabbak lesznek, a mérhető értékek tartománya kibővíül, vagy a mérési eredmények interpretációja során újabb következtetések levonása válik lehetővé.

Fluoreszcenciás módszerek alkalmazásával lehetőségünk van vizsgálni az adott fehérje dinamikai, szerkezeti tulajdonságait, ill. ezek megváltozását a környezeti paraméterek megváltozásának hatására. Ezen spektroszkópiás eljárások segítségével kívántuk tanulmányozni az aktin monomer és filamentális állapota közötti különbségeket, valamint a kationok hatását az aktin monomer, ill. a szabályozásban meghatározó szerepet betöltő troponin C tulajdonságaira. Terveink között szerepelt a környezeti paramétereknek a triptofán fluoreszcencia paramétereire gyakorolt hatását pontosabban megismerni és leírni. Ennek érdekében egyetlen triptofánt tartalmazó rövid peptideket tanulmányoztunk.

### III. Anyagok és módszerek

#### III.1 Alkalmazott anyagok

A kísérletek során felhasznált anyagokat a következő forrásokból szereztük be: Kálium-klorid (KCl), magnézium-klorid ( $MgCl_2$ ), kalcium-klorid ( $CaCl_2$ ), tris-(hidroximetil)amino-metán (Tris), borax, *N*-(iodoacetyl)-*N*'-(5-szulfo-1-naftil)-etiléndiamin (IAEDANS), ciklohexilamino-hidroxipropán szulfonsav (CAPSO), nátrium acetát, tripszin, és etilénlikol-*bis*-( $\beta$ -aminoetil-éter)*N,N,N'',N''*-tetraecetsav (EGTA); SIGMA. Adenozin-5''-trifoszfát (ATP) és  $\alpha$ -merkaptotetanol (MEA); MERCK. Nátrium-azid ( $NaN_3$ ), 2-hidroxietyl piperazine-*N*-etán szulfonsav (HEPES), 3-(*N*-morfolin)propán szulfonsav (MOPS); FLUKA. A peptideket a Peninsula Laboratories-tól vásároltuk. 2-(*N*-morfolin)etán szulfonsav (MES); SERVA. 3-(*N*-tris-(hidroximetil)metilamino)-propán szulfon sav (TAPS); Research Organics Inc. Citromsav, nátrium-foszfát, kálium-foszfát, sukcinilsav; Aldrich. Coomassie assay reagens; Bio-Rad.

#### III.2 Fehérje-preparálás, alkalmazott pufferek

##### III.2.1 Az aktin preparálása

Az aktin preparálása két részre tagolható. Az első lépésben az ún. aceton-forgácsot készítjük el [Feuer és mtsai., 1948]. Ebből az aktin izolálása [Spudich és Watt, 1971] minden esetben közvetlenül a kísérletek előtt történt. A fehérjét (az esetleges további preparálási lépések, ill. fluoreszcens jelölések után) mindig frissen, a preparálás befejezését követő két napon belül vizsgáltuk. Az izolálás után az aktin puffer A-ban volt feloldva (puffer A: 2 mM Tris-HCl, (pH 8.0), 0.2 mM ATP, 0.1 mM  $CaCl_2$ , 0.1 mM MEA és 0.02%  $NaN_3$ )

Az aktin polimerizálása: az aktin izolálása után monomer formában van. A polimerizáció létrejöttéhez megnöveltük az ionerősséget KCl hozzáadásával (a hozzáadás

után a pufferben a KCl koncentrációja 100 mM volt). Ugyanakkor alkalanként  $\text{CaCl}_2$ -ot vagy  $\text{MgCl}_2$ -ot is adtunk a mintához beállítva a 2 mM-os koncentrációt.

Ioncsere az aktin monomerben: a  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$  csere során puffer A-ban (melynek  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációja a szokásos 100  $\mu\text{M}$  helyett csak 50  $\mu\text{M}$  volt) lévő Ca-G-aktinból indultunk ki. Ehhez az oldathoz EGTA-t és  $\text{MgCl}_2$ -ot adva (végkoncentrációk: 0.2 mM és 0.1 mM) a kationok kicserélődése 10 percen belül végbemegy szobahőmérsékleten [Strzelecka-Golaszewska és mtsai., 1993].

### III.2.2 A troponin C vizsgálata során alkalmazott pufferek és eljárások

A mutáns troponin C, melyben a 154. fenilalanin triptofánra volt cserélve, Dr. James D. Potter (Miami Egyetem, FL, USA) ajándéka volt, és további tisztítási eljárások alkalmazása nélkül használtuk. A liofilizált fehérjét  $-20^\circ\text{C}$ -on tároltuk, és a mérések előtt oldottuk fel a megfelelő pufferben (100 mM MOPS, 90 mM KCl (pH 7.0)). A fluoreszcencia élettartam és anizotrópia lecsengés mérések esetében 30  $\mu\text{M}$ , míg a steady-state vizsgálatok során 3  $\mu\text{M}$  volt a mintában a fehérje koncentrációja. Ezen koncentrációk mellett pH 7.0-n a dimerek kialakulása kizárható [Wang és mtsai., 1989; Blechner és mtsai., 1992]. Amennyiben méréseinket kationmentes, vagy  $\text{Mg}^{2+}$ -al telített mintán terveztük kivitelezni, az oldás után a fehérjét dializáltuk 100 mM MOPS, 90 mM KCl, 2 mM EGTA (pH 7.0) pufferrel szemben. Ezzel a liofilizált fehérjében jelenlévő  $\text{Ca}^{2+}$ -ot eltávolítottuk, amit a fluoreszcencia emissziós spektrum ( $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$ ) megvizsgálásával támasztottunk alá [Id. Chandra és mtsai., 1994]. A kationmentes fehérjén végzett vizsgálatok során ugyanazt a puffert alkalmaztuk, amit a dializáláshoz is használtunk. Amennyiben a  $\text{Mg}^{2+}$ -os forma tanulmányozása volt célunk, a dializálás után a mintához  $\text{MgCl}_2$ -t adtunk (beállítva a 3 mM-os koncentrációt a pufferben). A Ca-troponin C-n történt mérésekben nem használtunk EGTA-t, és a fehérje oldathoz az oldás után  $\text{CaCl}_2$ -ot adtunk (kialakítva a pufferben az 1 mM-os  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációt).

### III.2.3 A fehérje-koncentráció meghatározása a "coomassie assay" segítségével

Esetenként a fehérje-koncentrációt a "coomassie assay" (vagy "Bradford assay") segítségével határoztuk meg. A kalibráció során fluorofórral nem jelölt monomer aktin oldatot használtunk, és a gyártó által ismertetett módon jártunk el. A koncentráció meghatározására a minta abszorbcóját mértük 595 nm-en, és a kalibrációs egyenes segítségével határoztuk meg a fehérje-koncentráció aktuális értékét.

### III.2.4 Az aktin fluoreszcens jelölése

**IAEDANS-jelölés:** F-aktint (2 mg/ml) 1 órán keresztül inkubáltunk 10-szeres moláris túlsúlyban lévő IAEDANS-el szobahőmérsékleten [Miki és mtsai., 1987]. A jelölés MEA mentes puffer A-ban, folytonos keverés mellett történt, fénytől védve. A reakciót 1 mM MEA hozzáadásával állítottuk le, majd a mintát centrifugáltuk 100.000 x g-n, 2 órán keresztül, 4 °C-on. A pelletet duzzasztás után homogenizáltuk, majd éjszakán át dializáltuk puffer A-val szemben. Amennyiben a kísérletek érdekében a jelölés után ioncserét hajtottunk végre az aktinon, úgy ez az utolsó dializáló lépés 50  $\mu$ M CaCl<sub>2</sub>-ot tartalmazó puffer A-val szemben történt.

**FITC-jelölés:** Az aktint a Burtnick által kidolgozott [Burtnick, 1984], és Miki által módosított [Miki és mtsai., 1987] módszer segítségével jelöltük FITC-el. Borax pufferben jelöltünk (2 mM borax (pH 8.5), 0.5 mM ATP, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub> és 1 mM MEA). A FITC-et 0.1 M-os NaOH-ban oldottuk fel (az oldáshoz szükséges minimális térfogatot használva), és adtuk hozzá az aktin monomer (2 mg / ml) oldathoz, létrehozva a megközelítőleg 1 : 20 monomer-FITC moláris koncentráció-arányt. A jelölési elegyet folyamatosan kevertük 3 órán keresztül szobahőmérsékleten úgy, hogy időközben a pH 8.5 értéket megfelelő mennyiségű 0.1 M-os HCl hozzáadásával megtartottuk. Ezt követően az ionerősséget 100 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub> és 20 mM Tris / HCl (pH 7.6) hozzáadásával (a koncentráció értékek a pufferben beállított végkoncentrációkat jelölik) megnöveltük. Mivel a FITC-el jelölt aktin monomer polimerizációra ezen pufferparaméterek mellett nem képes [Burtnick,

1984], ugyanakkor a FITC-el nem reagált monomerek filamentumot alkotnak, ezzel a lépéssel lehetőségünk nyílt izolálni a jelölt fehérje-molekulákat. Két óra folyamatos keverés után a jelölési elegyet 100.000 g-n centrifugáltuk (2 órán keresztül, 4 °C-on), amivel a filamentumot alkotó nem jelölt aktint eltávolítottuk. A felülúszót oszlop-kromatográfiával tisztítottuk tovább (Sephadex G-25, 100 mM KCl, 0.2 mM ATP és 20 mM Tris/HCl (pH 7.6)), így az aktinhoz nem kapcsolódó FITC molekulákat távolítottuk el. Az aktint ezután dializáltuk puffer A + 100 mM KCl-al, majd puffer A-val szemben. Az utolsó dializáló lépésben (ha a későbbi ioncsere szükségessé tette) a puffer A csak 50  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$ -ot tartalmazott.

*Koncentráció meghatározás, jelölési arányok:* ha az aktin nem volt FITC-el jelölve az aktin koncentrációt spektro-fotometriával határoztuk meg. A meghatározás során az aktin monomer abszorpciós koefficiensét 290 nm-en 0.63  $\text{mg ml}^{-1} \text{cm}^{-1}$ -nek tekintettük [Houk és Ue, 1974]. Amennyiben az aktin IAEDANS-el volt jelölve, a fluorofór járulékát a mért abszorpció értékeihez korrekcióba vettük (IAEDANS-re:  $A^{290 \text{ nm}} = 0.21 \times A^{336 \text{ nm}}$ ). Az aktin molekuláris tömegét a számolások során 42.300-nak vettük [Elzinga és mtsai., 1973]. Esetenként a "coomassie assay" segítségével is meghatároztuk az aktin koncentrációját a mintában. Az így kapott adatok hibahátáron belül megegyeztek a fotometriás eljárás során nyert eredményekkel. A jelölési arányt a fehérje és a fluoreszcens jelölő koncentrációjának meghatározásából számoltuk. Az IAEDANS koncentrációját a 6100  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  abszorpciós koefficiens alkalmazásával határoztuk meg a 336 nm-en mért abszorpció értékéből [Hudson and Weber, 1973]. Így a jelölési arány 0.83-0.87-nek adódott.

A FITC-el jelölt aktin esetében a fehérje koncentrációját a "coomassie assay" segítségével határoztuk meg. A FITC koncentráció meghatározásakor a 74.500  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  abszorpciós koefficienset használtuk (493 nm) [Bernhardt és mtsai., 1983]. Ezen mintákban a monomer-FITC arány 0.96-1.04-nek adódott.

### III.3 Peptidek jellemző adatai, a vizsgálatuk során alkalmazott pufferek

A triptofán fluoreszcencia paramétereinek a környezeti paraméterekkel való kölcsönhatásának vizsgálata során a következő peptideket tanulmányoztuk: Nectofibrin Hexapeptide (Trp-Thr-Val-Pro-Thr-Ala); Dynorphin A (Lys-Trp-Asp-Asn-Gln);

Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>); Bombesin (pGlu-Gln-Arg-Leu-Gly-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH<sub>2</sub>); Somatostatin (Ala-Gly-Cys-Lys-Asn-Phe-Thr-Lys-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys)(gyűrű alakú peptid, melyben a két cisztein között diszulfid kötés létesít kapcsolatot); Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor (GAPDH) (Pro-Ala-Asn-Ile-Lys-Trp-Gly-Asp); Adrenocorticotrophic Hormone 4-10 (ACTH) (Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly); Endothelin-C-Terminal Hexapeptide (ECTH) (His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp).

A peptideket további tisztítási eljárások alkalmazása nélkül tanulmányoztuk. Az ACTH kivételével minden peptidet vízben oldottunk fel. Az ACTH esetében az oldást dimetil-szulfoxid (DMSO) segítségével végeztük. Az oldás után a törzsolatok koncentrációja 1 mM volt. A fluoreszcencia mérések előtt ezen törzsolatot 30-100 szorosára hígítottuk a megfelelő pufferben.

A következő puffereket alkalmaztuk (mind H<sub>2</sub>O, mind D<sub>2</sub>O esetében):

0.05M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	(pH(pD) 10-11)
20mM CAPSO és 0.15M NaCl	(pH(pD) 9.4)
20mM borax	(pH(pD) 9.4 teszt)
20mM TAPS és 0.15M NaCl	(pH(pD) 8.2)
20mM HEPES és 0.15M NaCl	(pH(pD) 7.6)
0.03M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> és 0.0087M KH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	(pH(pD) 7.45)
0.025M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> és KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	(pH(pD) 7.45 teszt)
10mM MOPS és 0.15M NaCl	(pH(pD) 7.0)
20mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	(pH(pD) 7.0 teszt)
10mM MES és 0.15M NaCl	(pH(pD) 6.0)
10mM ecetsav és 0.15M NaCl	(pH(pD) 5.0)
20mM szukcinilsav	(pH(pD) 1.9; 2.0; 2.55; 3.0; 3.9; 4.0)
20mM citromsav	(pH(pD) 3.0 teszt).

Az oldat pD értékét a  $pD = pH + 0.4$  formula segítségével határoztuk meg [Lumry és mtsai, 1951], ahol  $pH$  a pH-mérő által mért érték. A H<sub>2</sub>O alapú pufferekben a pH értékek beállításához NaOH-ot vagy HCl-t használtunk, míg a D<sub>2</sub>O alapú pufferek esetében a beállítást NaOD vagy DCl felhasználásával végeztük.

A különböző pufferek esetleges nem kívánatos hatásának tesztelése érdekében egyes pH / pD értékeken (pH / pD 9.4; pH / pD 7.45; pH / pD 7.0; pH / pD 3.0) két különböző puffer anyagot is alkalmaztunk (ezek "teszt" jelöléssel vannak ellátva a pufferek

felsorolásában). Ezen mérések tanúsága szerint ilyen nem kívánatos mellékhatás a kísérletek során nem lépett fel.

### III.4 Alkalmazott módszerek

#### III.4.1 Spektrofotometria

A vizsgált fehérjék, ill. fluoreszcens jelölők abszorpcióját Shimadzu UV-2100 típusú spektrofotométerrel mértük. A mintatartó általában 1 x 1 cm-es kvarc küvette volt. Ez alól csak a "coomassie assay" során alkalmazott műanyag küvettek használata jelentett kivételt. A minta abszorpciójának meghatározása során referenciaként minden esetben a vizsgálni kívánt anyagot (fehérjét vagy fluorofórt) nem tartalmazó puffert használtuk.

#### III.4.2 Steady-state fluoreszcencia

A steady-state fluoreszcencia vizsgálatokat Perkin-Elmer LS50B típusú spektrofotométerrel végeztük. Folyamatos gerjesztés mellett mértük a fluoreszcencia emissziót (esetenként a hullámhossz függvényében). A minta abszorpciója a mért hullámhosszon minden esetben 0.05 alatt volt mind a gerjesztési, mind az emissziós hullámhosszon. A hullámhosszakat monokromátorokkal állítottuk a kívánt értékre. A hőmérsékletet termosztáttal állítottuk be, és a mintatartóban mértük.

A spektrumok korrekcióját a kinin-szulfát perklórsavban mutatott emissziós spektrumát mérve a gyártó által rendelkezésünkre bocsátott korrigált spektrum segítségével végeztük el. A korrigált fluoreszcencia emissziós spektrum görbe alatti területe arányos a vizsgált fluorofór kvantumhatásfokával. Ezt kihasználva megfelelő, ismert kvantumhatásfokú, referencia alkalmazásával meghatározható a tanulmányozott minta fluorofórjának kvantumhatásfoka. Az abszorpciós adatok, valamint a görbe alatti területek ismeretében a következő összfüggéssel számolhatunk:



$$\phi_m = (\phi_r \times OD_r \times T_m) / (OD_m \times T_r) \quad (1)$$

ahol  $\phi_m$  és  $\phi_r$  a minta, ill. a referencia kvantumhatásfoka,  $OD_m$  és  $OD_r$  a minta, ill. a referencia abszorpciója a gerjesztési hullámhosszon, és  $T_m$  valamint  $T_r$  a számolt görbe alatti területek a minta, ill. a referencia esetében. A kvantumhatásfok és a fluoreszcencia élettartam ismeretében számolható a radiatív sebességi állandó:

$$k_r = \phi / \tau \quad (2)$$

ahol  $k_r$  a radiatív sebességi állandó, és  $\tau$  a fluoreszcencia élettartam értéke. Ezen paraméter ( $k_r$ ) elsődlegesen a fluorofór jellemzője, és nagy számú kísérletes eredmény figyelembevételével megállapítható, hogy az esetek túlnyomó többségében csak elhanyagolható mértékben függ a kísérleti paraméterektől.

### III.4.3 Fluoreszcencia élettartam és anizotrópia lecsengés mérések

A fluoreszcencia élettartam és anizotrópia lecsengés vizsgálatokat az ISS K2 multifrekvenciás fázis-fluoriméterrel (ISS Fluorescence Instrumentation, Champaign, Illinois, USA) végeztük, az ún. "cross-correlation" módszer felhasználásával. A gerjesztési fény szinuszosan modulált volt, melynek hatására a fluoreszcencia emisszió intenzitása is szinuszosan moduláltrá vált. Az emisszió fáziskésését és demodulációját mértük ismert élettartalmú referencia segítségével. Referenciaként glikogén oldatot (0 ns) vagy etanolban oldott *p*-terfenilt (1.05 ns) alkalmaztunk. Ezekből az adatokból a vizsgált minta fluoreszcencia paramétereit illesztéssel határoztuk meg (ISS187 Decay Analysis Software).

Fényforrásként az aktinon történt vizsgálatok esetében 300 W-os xenon-lámpát használtunk, melynek fényét Pockel-cella közbeiktatásával moduláltuk. A troponin C, ill. a peptidok vizsgálata során munkánkat a rochesteri Mayo Klinika Biokémiai Intézetével együttműködve végeztük. Ezen esetekben a gerjesztéshez Coherent A76 Nd : YAG lézer alkalmaztunk. A Nd : YAG lézer segítségével pumpáltuk a Coherent 700 típusú szinktrónt, mely 590 nm-es hullámhosszú fényt bocsátott ki. A gerjesztési fényt "cavity

dumper" segítségével moduláltuk. Ezt a fényt frekvencia-duplázó kristály közbeiktatásával tovább módosítottuk, így nyerve a triptofán gerjesztéséhez használt 295 nm hullámhosszúságú gerjesztő nyalábot. Ezekben a mérésekben a polarizációs mellékhatások kiküszöbölése érdekében a gerjesztéshez alkalmazott fényt átvezettük egy 35°-os pozíciójú (ez az ún. mágikus szög) Glenn-Thompson polarizátoron.

A modulációs frekvenciát élettartammérésekben általában 2 és 120 MHz között, míg anizotropia lecsengés mérése során 2 és 150 MHz között változtattuk. Tíz különböző frekvencia értéken mértünk, melyek logaritmikus skálán egyenletesen oszlottak el.

Az illesztés jóságát az ún. "redukált  $\chi^2$ " értékek segítségével jellemeztük:

$$\chi^2 = \frac{\sum [(P_c - P_m) / \sigma^P]^2 + [(M_c - M_m) / \sigma^M]^2}{2n - f - 1} \quad (3)$$

ahol az összegzést az "n" számú modulációs frekvencia szerint hajtottuk végre. A képletben "f" a szabad paraméterek száma, "P" a fázis eltolódás, míg "M" a demoduláció értéke. Az indexekben "c" a számolt, míg "m" a mért értékeket jelzi. " $\sigma^P$ " és " $\sigma^M$ ", az egyes fázis és moduláció mérések hibája (standard deviation). A mérés (és analízis) során  $\sigma^P = 0.200^\circ$ ,  $\sigma^M = 0.004$  értékeket használtuk.

A jósági paraméter alkalmazása során élettartam mérések esetében a különböző függvények feltételezésével kapott illesztéseket hasonlíthatjuk össze. Általában ha az egyik ilyen függvény alkalmazásával a  $\chi^2$  értéke jelentősen kisebb, mint a más függvényekkel kapott értékek, akkor az illesztéshez ezt a függvényt használjuk. Amennyiben több olyan függvény létezik, amely megfelelőnek tűnik (a  $\chi^2$  vizsgálata alapján) az illesztés elvégzéséhez, úgy további megfontolások szükségesek a vizsgált rendszer tulajdonságait illetően az alkalmazandó függvény kiválasztásához. Az anizotropia lecsengés adatainak vizsgálatakor hasonló eljárást követhetünk, de ez esetben nem a függvények között kell választanunk (minden esetben exponenciálisok összegét feltételezzük), hanem az exponenciális komponensek számát szükséges meghatározni.

A fluoreszcencia élettartam adatok esetében az alkalmazható függvényeket két nagy csoportba soroljuk: diszkrét vagy folytonos függvények. A diszkrét függvények alatt gyakorlatilag minden esetben az egy vagy több exponenciális komponens feltételezését

értjük. Ez esetben a jósági paraméter értéke információt ad az optimális komponensszám kiválasztását illetően (hasonlóan az anizotrópia lecsengés analízise során említettekhez). A gyakorlatban azt az analízist fogadjuk el "hitelesnek", mellyel a  $\chi^2$  értéke már megfelelő (1-hez közeli), és a komponensek számának további növelésével ezen paraméter értéke nem javul számottevően.

Összességében tehát megállapítható, hogy a fluoreszcencia intenzitás, ill. az anizotrópia időfüggését leíró paraméterek meghatározása során a mérési adatok illesztése többféleképpen is elvégezhető. A megfelelő illesztést mindig a jósági paraméter vizsgálatával, valamint a tanulmányozott rendszer jellemző tulajdonságainak ismeretében válsztjuk ki.

A diszkrét függvény felhasználásával kapott élettartam paraméterek segítségével számolható az átlagos fluoreszcencia élettartam [Lakowitz, 1983a]:

$$\tau_{\text{át}} = (\sum \tau_i^2 \alpha_i) / (\sum \tau_i \alpha_i) \quad (4)$$

ahol  $\tau_i$  a fluoreszcencia élettartam komponenseket, míg  $\alpha_i$  ezen komponensek amplitúdóját jelöli.

Az anizotrópia lecsengés tanulmányozásának eredményeként rendelkezésünkre állnak a rendszer forgását jellemző rotációs korrelációs idők, valamint az ezekhez rendelhető relatív amplitúdó értékek. Az amplitúdók összege az általunk alkalmazott kiértékelés után megegyezik a határanizotrópia ( $\tau_0$ ) értékével. Ezen paraméterek felhasználásával további információt kaphatunk a fluorofór környezetének dinamikai állapotáról. A számolás során alkalmazott modell ("wobble-in-cone") használata során feltételezzük, hogy: 1.) a fluorofór henger-szimmetrikus; 2.) a fluorofór abszorpciós vagy emissziós vektora párhuzamos a (henger-)szimmetria tengellyel; 3.) a fluorofór egy kúpon belül szabadon mozoghat, azon kívül a megtalálási valószínűsége nulla; 4.) a fehérje gömb alakú és (diffúzió kontrollált) izotróp forgást végez a pufferben, vagy amennyiben a fehérje nem modellezhető gömbbel, úgy a fluorofór (henger-)szimmetria tengelye egybeesik a fehérje forgástengelyével; 5.) a fehérje forgását tükrözi a hosszabb rotációs korrelációs idő értéke; 6.) a hosszú komponens amplitúdója nagyobb és korrelációs ideje hosszabb a rövid komponens hasonló

paramétereinél, így a  $r_\infty = r_1$  közelítés használható. Ezen feltételek teljesülését egyes esetekben kísérletileg is ellenőrizhetjük.

Vizsgálataink során mind az aktin monomer, mind a troponin C esetében alkalmaztuk a modellt. A fenti feltevésekkel élve az anizotrópia lecsengés során megállapított amplitúdó értékekből a fluorofor mozgását korlátozó kúp félszögét ( $\Theta$ ) számolhattuk a következő egyenlet alkalmazásával [Kinoshita és mtsai., 1977]:

$$(r_1 / (r_1 + r_2)) = (\cos^2 \Theta (1 + \cos \Theta)^2) / 4 \quad (5)$$

ahol  $r_1$  a hosszabb, míg  $r_2$  a rövidebb rotációs korrelációs idő amplitúdója. Az így számolható félszög értéke szoros összefüggésben áll a fluorofor környezetének flexibilitásával, így alkalmas a fehérje fluorofor körüli szegmensének jellemzésére.

#### III.4.4 Fényszórás

Mivel az aktin kationok jelenlétében esetlegesen polimerizálódhat (ez a folyamat függ a kation minőségétől, koncentrációjától, az ionerősségtől, valamint az alkalmazott aktin-koncentrációtól), így egyes kísérleteinkben szükséges volt az általunk használt kation-koncentrációk mellett megvizsgálni az aktin minták oligomerizációs állapotát. Mivel az asszociáció mértékének növekedésével monoton nő a minta fényszóró képessége, ezen vizsgálatokban a 90°-os fényszórás időfüggését vizsgáltuk. A kísérleteket a Perkin-Elmer LS50B spektro-fluoriméterrel végeztük. Mind a gerjesztési, mind az emissziós hullámhossz 600 nm volt, a réseket 4 nm-re állítottuk. A méréseket 25 °C-on végeztük.

A cézium esetleges polimerizáló hatását vizsgálva referenciaként a monomer aktin szolgált (1. minta), míg a módszer érzékenységét polimerizáló oldatban lévő aktinon teszteltük (2. minta). A cézium koncentrációja a mintában 0.7 M volt (3. minta).

A  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$  csere hatásának vizsgálatokor a Ca-G-aktin szórt intenzitása szolgált összehasonlítási alapként (1. minta). A  $\text{Mg}^{2+}$  koncentrációja ugyanaz volt, mint amit a fluoreszcencia élettartam, ill. anizotrópia lecsengés mérése során alkalmaztunk (2. minta) (ioncsere ld. III.2.1).

### III.4.5 Fluoreszcencia kioltás

Általános esetben a gerjesztés után a fluorofór a felvett energiát több különböző mechanizmus útján adhatja le. Ezeket első közelítésben csoportosíthatjuk mint radiatív, azaz elektromágneses hullám (foton) kibocsátásával járó folyamatok, és nem-radiatív, azaz elektromágneses hullám kibocsátása nélkül végbemenő lecsengési folyamatok. Ezeket sematikusan jellemezhetjük a következőképpen:



(6)

ahol  $A^*$  és  $A$  a gerjesztett, ill. alapállapotban lévő fluorofór molekula.

A radiatív lecsengési utakat, vagy más néven lumineszcencia folyamatokat tovább bonthatjuk fluoreszcenciára és foszforeszcenciára attól függően, hogy milyen energia-állapottól kiindulva jön létre az elektromágneses hullámok kibocsátása. A fenti séma bővíthető természetesen további folyamatokkal is. Ilyen pl. az az eset, mikor a rendszerben speciális, ún. kioltó molekulák is jelen vannak (Q). Ezek a molekulák kapcsolatba kerülve a fluorofórral annak fluoreszcencia emisszióját kioltják. Erre az esetre:



(7)

A fluoreszcencia kioltási kísérletek során külső kioltók jelenlétében vizsgáltuk a fluorofórok élettartamának függését a kioltó koncentrációjától. Az így nyert eredmények információt szolgáltat(hat)nak a fluorofór környezetének szerkezetéről, dinamikájáról, vagy ezen környezet töltésviszonyainak alakulásáról. A kioltó molekula hatása nyomon követhető mind a steady-state intenzitások, mind a fluoreszcencia élettartamok mérésével. A fluoreszcencia élettartam mérésekor esetenként előnyt jelent, hogy így a bimolekuláris kioltási állandó értéke csak a dinamikus kioltási folyamatoktól függ. A kioltás hatékonysága jellemezhető a klasszikus Stern-Vomer egyenlet alkalmazásával [Lakowitz, 1983b]:

$$\tau_0 / \tau = 1 + K_{SV} [Q] \quad (8)$$

ahol  $K_{SV}$  a Stern-Volmer kioltási állandó,  $\tau_0$  a fluorofór élettartama a kioltó nélkül, míg  $\tau$  az élettartam  $[Q]$  koncentrációjú kioltó jelenlétében. Továbbá:

$$K_{SV} = k_+ \tau_0 \quad (9)$$

ahol  $k_+$  a bimolekuláris kioltási állandó, mely jellemzi a fluorofór és a kioltó molekula relatív transzportját. A  $k_+$  értéke információt szolgáltat a fluorofór oldat felé mutatott hozzáférhetőségről, valamint esetenként a fluorofór környezetében az elektrostatikus terek tulajdonságairól.

#### III.4.6 Förster-típusú energia transzfer (FRET)

A Förster-típusú energia transzfer (FRET) megfelelően alkalmas fluorofór párok között jöhet létre. A kölcsönhatás során az egyik fluorofór (donor molekula) gerjesztett állapotban energiát ad át (foton emissziója nélkül) a másikkal (akceptor molekula). Az energiaátmenet ún. "singlet" állapotok között jön létre. A folyamat során hő nem keletkezik, és nem jön létre ütközéssel kölcsönhatás a két molekula között.

A transzfer kialakulásának feltétele, hogy 1.) a donor molekula emissziós spektruma, valamint az akceptor molekula abszorpciós spektruma átfedésben legyen; 2.) a donor kvantumhatásfoka megfelelően nagy legyen; 3.) a donor emissziós vektora az akceptor molekula abszorpciós vektorával kedvező szöget zárjon be; 4.) a donor és akceptor molekulák távolsága az 1-10 nm tartományba essen.

A FRET hatásfoka (E) meghatározható pl. a donor fluoreszcencia intenzitását mérve az akceptor nélküli, ill. akceptort tartalmazó rendszerben:

$$E = 1 - F_{DA} / F_D \quad (10)$$

ahol  $F_D$  a donor intenzitása az akceptor nélkül, míg  $F_{DA}$  a donor intenzitása az akceptor jelenlétében. A FRET spektroszkópia alkalmazásával lehetőségünk van meghatározni a donor és akceptor molekulák távolságát. A módszert először Förster írta le [Förster, 1948]. A távolság számolása során az átfedési integrált ( $J$ ) a következő egyenletből határozhatjuk meg:

$$J = \left( \int F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda / \int F_D(\lambda) d\lambda \right) M^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ nm}^4 \quad (11)$$

ahol  $F_D(\lambda)$  a donor fluoreszcencia emissziós spektruma és  $\varepsilon_A(\lambda)$  az akceptor abszorpciós spektruma. Definíció szerint  $R_0$  az a donor-akceptor távolság, melynél az energia transzfer hatásfoka 50%. A donor és akceptor molekulák spektrális paramétereinek ismeretében számolható adott fluorofór pár esetében az  $R_0$  értéke:

$$R_0^6 = (8.79 \times 10^{-11}) n^{-4} \kappa^2 \phi_D J \text{ nm}^6 \quad (12)$$

ahol  $n$  a közeg törésmutatója,  $\kappa^2$  a donor és akceptor molekula relatív helyzetét jellemző orientációs faktor, míg  $\phi_D$  a donor fluoreszcencia kvantumhatásfoka. Az  $R_0$ , valamint a transzferhatásfok ismeretében meghatározható a donor és akceptor molekula távolsága ( $R$ ) a következő egyenlet alkalmazásával:

$$E = R_0^6 / (R_0^6 + R^6) \quad (13)$$

A fenti paraméterekből származtatható továbbá egy újabb FRET paraméter, az  $f$  [Somogyi et al., 1984]:

$$f = E / \phi_{DA} \quad (14)$$

vagy az esetenként kényelmesebben meghatározható  $f'$ :

$$f' = E / F_{DA} \quad (15)$$

ahol  $\phi_{DA}$  és  $F_{DA}$  a donor kvantumhatásfoka, ill. fluoreszcencia intenzitása az akceptor jelenlétében. Az  $f$  és  $f'$  paraméterek értéke egymással egyenesen arányos. Ezen FRET paraméterek információt adnak a donor és akceptor molekula közötti fehérje-mátrix dinamikáját illetően.

### III.4.7 A fluoreszcencia élettartam hőmérsékletfüggése

A fluoreszcencia élettartam hőmérséklet-függésének mérésével a fluorofór emisszióját kioltó folyamatokról, és így a környezet tulajdonságairól további információkat kaphatunk. Ezen analízis során a hőmérséklet hatását a következő egyenlettel (Arrhenius-egyenlet) írjuk le:

$$\tau^{-1} = k_0 + A \exp ( E^* / k_B T ) \quad (16)$$

ahol  $k_0$  a hőmérséklettől független tag, az ún. hőmérséklet független sebességi állandó,  $A$  a frekvencia faktor,  $E^*$  az aktivációs energia,  $k_B$  a Boltzmann állandó és  $T$  az abszolút hőmérséklet. Ezen paraméterek a kioltó folyamatok összességét jellemzik, ami esetenként megnehezítheti értelmezésüket. Ábrázolva az  $(\ln(\tau^{-1} - k_0))$  függvényt a  $T^{-1}$  függvényében, az egyenlet teljesülése esetén egyenest kapunk. A  $k_0$  a függvény illesztése során szabad paraméter. Ezen egyenes meredekségéből az aktivációs energia ( $E^*$ ), tengelymetszetéből a frekvencia faktor ( $A$ ) határozható meg.

### III.4.8 A steady-state fluoreszcencia anizotrópia hőmérséklet-függése

A steady-state fluoreszcencia anizotrópia értékek hőmérsékletfüggésének analízise során a Perrin-egyenlet alkalmazásával lehetőségünk van információt nyerni a fluorofór környezetéről, valamint esetleg a molekula méretéről is. Ha egy gömbbel modellezhető fluoreszkáló molekula térfogata  $V$ , és diffúzió által kontrollált mozgást végez az  $\eta$  viszkozitású és  $T$  hőmérsékletű folyadékban, a Perrin-egyenlet írja le az összefüggést az anizotrópia és a rotációs diffúzió között:



$$r^{-1} = r_0^{-1} ( 1 + ( \tau k_B T / V \eta ) ) \quad (17)$$

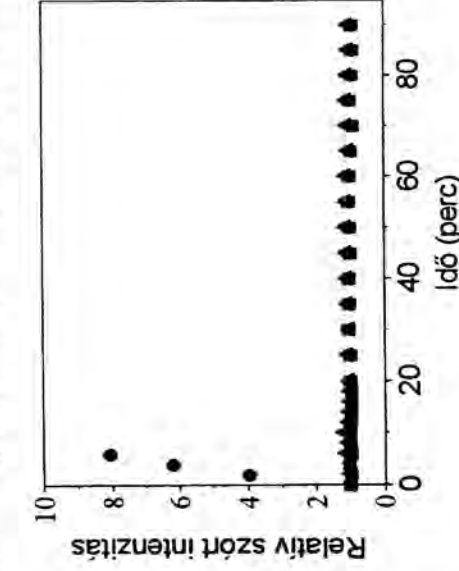
ahol  $k_B$  a Boltzmann állandó,  $r_0$  a határanizotrópia és  $\tau$  a fluoreszcencia élettartam. A Perrin-egyenlet lehetővé teszi pl. a molekula hidrodinamikai térfogatának, vagy a határanizotrópiának a meghatározását, ha a reciprok anizotrópia értékét ábrázoljuk a  $T / \eta$  függvényében. Az így kapott egyenes meredeksége a hidrodinamikai térfogat ( $V$ ), míg tengelymetszete a határanizotrópia ( $r_0$ ) meghatározását teszi lehetővé.

## IV. Eredmények és következtetések

### IV.1 Az aktin

#### IV.1.1 Az aktin monomer és a filamentumba beépült protomer összehasonlítása

Az aktin monomer és filamentális állapota közötti különbségeket vizsgáltuk. Méréseink során az aktin négy triptofánjának (1. ábra) fluoreszcencia emisszióját figyeltük különböző koncentrációjú kioltók jelenlétében. Kioltóként akrilamidot, mint semleges töltésű, valamint cézium-iont, mint pozitív töltésű kioltót alkalmaztunk. A vizsgálatunk tárgyát képező négy triptofán a monomer ún. subdomén 1 alegységében foglal helyet (1. ábra), így ezen mérések segítségével ennek a régióknak a változását volt lehetőségünk



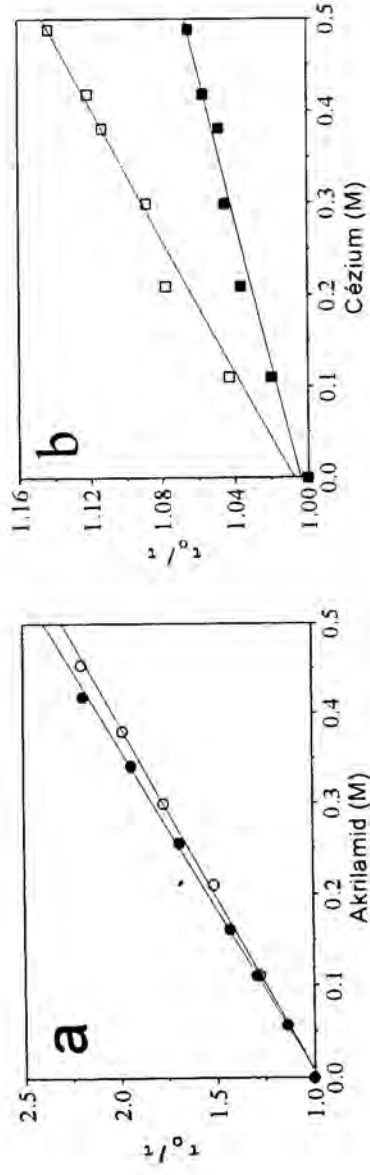
3. ábra: A relatív szórt intenzitás időfüggése monomer aktinon puffer A-ban (■), polimerizáló pufferben (●), ill. puffer A-ban 0.7 M cézium-klorid mellett (▲). A mérést 4 nm-es résekkel, 600 nm-es gerjesztési és emissziós hullámhosszon, szobahőmérsékleten végeztük.

nyomonkövetni. A subdomén 1 résztvesz mind a filamentumon belüli monomer-monomer kapcsolatok kialakításában, mind az izom-összehúzódás során a miozin-aktin kapcsolódás létrejöttében, így ezen alegység vizsgálata lényeges az aktin biológiai funkcióját illetően.

A mérés során figyelembe kellett venniük, hogy az aktin kationok jelenlétében esetlegesen polimerizálódhat. A céziummal való kioltási kísérletekben meg kellett tehát vizsgálnunk, hogy az alkalmazott ion-koncentráció tartományban megmarad-e az aktin a vizsgálni kívánt monomer formájában. Ennek érdekében fényszórási kísérleteket végeztünk (3. ábra), melyek eredményeit figyelembe véve megállapítható, hogy az aktin nem polimerizálódott a kioltási kísérletek időtartama alatt, amennyiben a titrálást puffer A-ban végeztük.

A kioltó hatását a fluoreszcencia élettartam változását követve mértük. Az élettartam adatok analízise során az illesztés jóságát a redukált  $\chi^2$  értékek segítségével becsültük (ld. III.4.3). A mért adatok kiértékelésekor az analízis vagy két exponenciális komponens, vagy egykomponensű Gauss-eloszlás feltételezésével eredményezte a legjobb illesztést. A két különböző feltételzéstől kiindulva a fluoreszcencia élettartamok értéke (a középérték Gauss analízis, valamint az átlagélettartam diszkrét analízis esetén) a mérés hibahatárán belül megegyeztek.

A fluoreszcencia intenzitás időfüggése méréseink kiértékelése során jól leírhatóan bizonyult két exponenciális (diszkrét) komponens feltételezésével. Ez alátámasztja azt az



4. ábra: Az akrilamid (a), ill. cézium (b) jelenlétében mért fluoreszcencia élettartam adatok Stern–Volmer ábrázolása G– (●, ■) és F–aktin (○, □) esetében. Az adatok illesztését Gauss-eloszlás feltételezésével végeztük. A gerjesztési hullámhossz 290 nm volt (4 nm-es rés alkalmazásával), a fluoreszcencia emissziót 335 nm-es felületreerősítő optikai szűrő alkalmazásával mértük. A méréseket 25 °C-on végeztük.

általánosan elfogadott nézetet, mely szerint a triptofán fluoreszcencia emissziója fehérjékben (és peptidekben) gyakorlatilag minden esetben komplex (a kivételekről volt szó az Irodalmi áttekintés c. fejezetben), egy exponenciális komponenssel nem írható le [White, 1959; Szabó és Rayner, 1980; Gugdin és mtsai., 1981; Gugdin és mtsai., 1983; Creed, 1984; Beechem és Brand, 1985; Hutnik és Szabó, 1989; Boens és mtsai., 1989]. Ugyanakkor az a tény, hogy a mért adatok két komponens feltételezésével jól illeszthetők, nem feltétlenül jelenti azt, hogy az intenzitás tényleges fizikai időfüggése két exponenciális szuperpozíciója lenne. Két diszkrét komponens eredményezhet analízisünk abban az esetben is, ha a valóságban a fluoreszcencia élettartamok eloszlása folytonos eloszlást követ [Demmer és mtsai., 1987] (ld. IV.1.2).

A kioltási kísérletekben mért élettartamok Stern-Volmer ábrázolásban (ld. III.4.5) egyenest eredményeztek (4. a,b ábra). Ezen egyenesek meredekségéből ( $K_{SV}$ ) számolható a kioltást jellemző bimolekuláris állandó ( $k_+$ ) (I. táblázat). Az egyenesek tengelymetszetének elméleti értéke 1. Méréseink kiértékelése során az akrilamid esetében  $0.98 \pm 0.02$ , ill.  $0.98 \pm 0.02$ , a cézium esetében  $1.006 \pm 0.007$ , ill.  $1.004 \pm 0.005$  adódott a monomer, ill. filamentális formára vonatkozólag. Ezen paraméterek eltérése az elméleti értéktől a mérés hibahatárán belül esik.

I. táblázat: A kioltási kísérletek eredményéből számolt bimolekuláris kioltási állandók.

	G-aktin		F-aktin	
	$^a k_+ \times 10^9$ [M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	$^b k_+ \times 10^9$ [M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	$^a k_+ \times 10^9$ [M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	$^b k_+ \times 10^9$ [M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]
Akrilamid	$0.78 \pm 0.030$	$0.72 \pm 0.020$	$0.73 \pm 0.020$	$0.64 \pm 0.020$
Cézium	$0.03 \pm 0.003$	$0.04 \pm 0.003$	$0.08 \pm 0.006$	$0.09 \pm 0.006$

<sup>a</sup>Az élettartam adatok Gauss-analízise, ill. <sup>b</sup>a két komponensű diszkrét analízis eredményeinek felhasználásával számolt bimolekuláris kioltási állandók.

Az akrilamid alkalmazásával mért bimolekuláris kioltási állandó gyakorlatilag változatlan maradt az aktin polimerizációja során (I. táblázat). Ezzel szemben a cézium-ion jelenlétében mért bimolekuláris kioltási állandók vizsgálata során különbséget mutattunk ki az aktin két formája között. Ez a paraméter az aktin filamentális formáját vizsgálva megközelítőleg kétszer nagyobbnak bizonyult (I. táblázat).

Eredményeink azt mutatják, hogy a triptofánok környezetének, (és így valószínűleg a subdomén 1-nek) a szerkezete a térkitöltés tekintetében nem különbözik a monomer és filamentális forma összehasonlításában. Ugyanakkor ezen környezet töltése, vagy polarizációs viszonyai legalább az egyik triptofán körül megváltoznak a polimerizáció hatására. A filamentumok kialakulása során a monomer szerkezete tehát nem marad változatlan. Ez alátámasztja azt az elképzelést, miszerint a filamentumba beépülő monomer, az ún. protomer, nem tekinthető csupán strukturális szerepet betöltő részegységnek. A monomerek aktív alkotói lehetnek az izom-összehúzódásra képes fehérjerendszerek, és így a közöttük kialakuló kapcsolatok minősége és kiterjedtsége befolyással lehet az izomkontrakció folyamatára.

#### IV.1.2 A C-terminális alegység összehasonlítása Ca-G-, és Mg-G-aktinban

A  $\text{Ca}^{2+}$ -al, ill.  $\text{Mg}^{2+}$ -al telített aktin tulajdonságai mind a szerkezeti, mind a dinamikai paraméterek tekintetében különbözőek (részletesebben ld. I.2). Frieden és munkatársai mutatták ki a Cys-374-es aminosavhoz kovalensen kapcsolt fluorofór, az IAEDANS, fluoreszcencia emissziójában a kation kicserélésének hatására beálló változásokat [Frieden és mtsai., 1980]. Eszerint a  $\text{Ca}^{2+}$ -nak  $\text{Mg}^{2+}$ -ra való lecserélésével az emissziós spektrum maximumán mérhető intenzitás mintegy 10 %-al megnő. Ezen megfigyelés tekinthető a monomer két formája között meglévő szerkezeti különbségek egyik bizonyítékának. Ugyanakkor a különbség mibenlétéről sem Friedenék ezen eredményei, sem más ismert mérések nem szolgálnak teljes leírással. Vizsgálataink során a bizonyítottan létező eltérések pontosítása volt célunk.

A fent említett fluoreszcens jelölő, az IAEDANS fluoreszcencia paramétereit mértük. A fluoreszcencia élettartam, ill. anizotrópia lecsengés hőmérsékletfüggését vizsgáltuk az 5 °C és 35 °C közötti hőmérséklet-tartományban. Az élettartammérések analízise során az adatok jól illeszthetőek voltak mind két exponenciális komponens, mind folytonos élettartam eloszlás (Gauss-eloszlás) feltételezésével.

A két exponenciális komponens feltételezésével kapott komponenseknek, valamint a hozzájuk tartozó amplitúdóértékeknek a jelentése nem egyértelmű, meghatározásához a fizikai rendszer ismeretében további megfontolások szükségesek. A két komponens létezése magyarázható lenne például azzal, hogy a fluorofórnak két populációja van jelen az oldatban, melyek jellemző élettartam paraméterei különbözőek. A fluorofórok túlnyomó többségének esetében két exponenciális komponenssel lehet jól leírni a fehéjékben mérhető fluoreszcencia intenzitás időfüggését. Ez a fenti modell szerint arra utal, hogy bármely fluorofórt vizsgálva annak két élettartamában különböző populációja van jelen a vizsgált mintákban, ami nem valószínű. Az analízis során kapott komponensek létezése következménye lehet a kiértékeléshez használt program hibájának is. Elméleti munkák igazolják, hogy ideálisan folytonos élettartam eloszlással rendelkező fluorofórok mérései

II. táblázat: Az IAEDANS fluoreszcencia élettartamának hőmérsékletfüggése Ca-, ill. Mg-G-aktinban.

		Ca-G-actin						Mg-G-actin					
t	$t_1$	$\alpha_1$	$t_2$	$t_{all}$	C	W	$t_1$	$\alpha_1$	$t_2$	$t_{all}$	C	W	
[°C]	[ns]		[ns]	[ns]	[ns]	[ns]	[ns]		[ns]	[ns]	[ns]	[ns]	
5.8	22.6	0.94	8.0	22.3	22.2	5.4	23.1	0.92	11.6	22.7	22.4	4.2	
	(0.3)		(0.9)	(0.2)	(0.1)	(0.1)	(0.5)		(2.4)	(0.6)	(0.1)	(0.2)	
9.6	22.2	0.93	8.28	21.9	21.7	5.5	22.1	0.97	6.6	22.0	22.0	4.6	
	(0.3)		(0.9)	(0.3)	(0.1)	(0.1)	(0.2)		(1.1)	(0.2)	(0.1)	(0.2)	
15.1	21.8	0.90	8.8	21.3	20.9	5.5	22.2	0.93	9.2	21.8	21.6	5.0	
	(0.3)		(0.8)	(0.3)	(0.1)	(0.1)	(0.3)		(1.2)	(0.3)	(0.1)	(0.1)	
22.7	20.0	0.93	6.5	19.6	19.5	5.5	20.8	0.94	6.9	20.5	20.0	5.1	
	(0.1)		(0.5)	(0.1)	(0.1)	(0.1)	(0.2)		(1.0)	(0.2)	(0.1)	(0.1)	
29.1	18.5	0.93	5.7	18.2	18.1	5.2	19.0	0.95	5.6	18.8	18.8	5.2	
	(0.2)		(0.4)	(0.2)	(0.1)	(0.1)	(0.2)		(0.5)	(0.2)	(0.1)	(0.1)	
33.7	17.7	0.93	5.4	17.4	17.3	5.1	19.1	0.89	7.4	18.5	18.1	5.2	
	(0.2)		(0.4)	(0.2)	(0.1)	(0.1)	(0.5)		(0.5)	(0.2)	(0.1)	(0.1)	

$t_1$  és  $\alpha_1$  jelenti a fluoreszcencia élettartam komponenseket és azok amplitúdóját a két exponenciális felületelvezéssel történő analízis esetén, ahol  $\alpha_1 + \alpha_2 = 1$ .  $t_{all}$  az átlagos fluoreszcencia élettartam (számolása ld. III.4.3). C és W a Gauss eloszlás felületelvezéssel számolt fluoreszcencia élettartam, ill. az eloszlás felületelvezéssége. Az adatok hibái (standard error), melyeket az analízis során felhasznált program megad, zárójelben vannak feltüntetve.

adatainak elemzése során is adhat jó  $\chi^2$  értékét a diszkrét függvény feltételezésével elvégzett illesztés [Demmer és mtsai., 1987].

Míndezekek arra utalnak, hogy a diszkrét élettartam komponensek értelmezése nem egyértelmű, és leginkább csak az ezen paraméterek felhasználásával számolt átlagos élettartam bír jól értelmezhető fizikai jelentéssel. Az intenzitás időfüggését két exponenciális összegeként feltételező analízis élettartam komponenseinek és amplitúdóinak ismeretében lehetőségünk van számolni ezt az átlagélettartamot (ld. III.4.3).

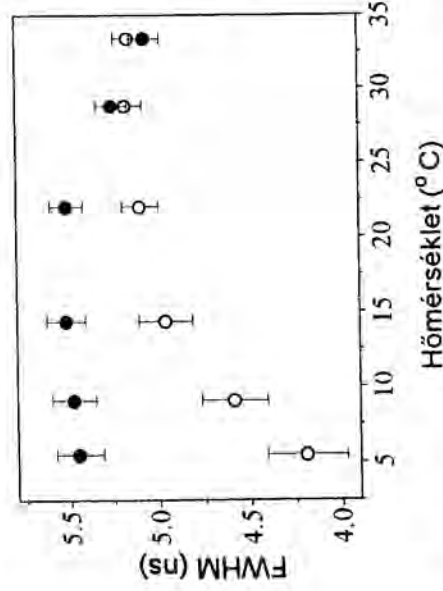
A folytonos eloszlások közül az élettartam adatok kiértékelése során leggyakrabban a Gauss-, Lorentz-, és egyenletes-eloszlásokat alkalmazzák. Ezen folytonos eloszlások bevezetésekor a fluorofór heterogenitásának jellemzése volt az elsődleges cél. Alkalmazásukkal a diszkrét analízis során kapható paramétereken túlmenően lehetőségünk van egy további paraméter, a félerértékszélesség meghatározására. Mivel az élettartam eloszlás félerértékszélessége szoros összefüggésben áll a fluorofór populáció heterogenitásával (homogenitásával), ezen illesztések alkalmával a vizsgált rendszer pontosabban jellemezhető. Természetesen a folytonos analízis alkalmazásának feltétele, hogy az így nyert illesztések jósága megfelelő legyen.

Esetünkben a két exponenciális függvény alkalmazásával elvégzett analízis eredményeként kapott komponensek és amplitúdók segítségével meghatározott átlagos fluoreszcencia élettartam értékek hibahatáron belül megegyeztek az egykomponensű Gauss-eloszlás feltételezésével kapott fluoreszcencia élettartamokkal (II. táblázat). Míndezekek figyelembevételével következtetéseinket a folytonos élettartam-eloszlás feltételezésével kapott eredményekre alapoztuk.

Az egykomponensű Gauss-eloszlás várható értéke (az átlagos fluoreszcencia élettartam) rövidebb a Ca-G-aktinban, mint a Mg-G-aktinban (II. táblázat), ami megfelel a Frieden és munkatársai által a steady-state intenzitásokban mért különbségnek [Frieden és mtsai., 1980]. Az élettartam eloszlás félerértékszélessége  $30^\circ\text{C}$  alatt a Mg-G-aktinban kisebb mint a Ca-G-aktinban (5. ábra). Ezen hőmérséklet felett a különbség eltűnik. Az eloszlás kiszélesedése Ca-G-aktinban arra utal, hogy a fluorofór a fehérje ezen formájában a környezetében lévő funkciós csoportok közül többel képes kölcsönhatásba lépni, több különböző állapotba létezik mint Mg-G-aktinban. Az állapotok számának megnövekedése a fluorofór mikrokozmoszójának a fellazulása utal(hat). Következésképpen, az általunk

mért változások a félértékszélesség értékében azt mutatják, hogy a  $Mg^{2+}$ -al telített monomerben ezen mikro környezet merevebb, mint a  $Ca^{2+}$ -al telített formában.

A  $Ca^{2+}$ -al telített monomerben az IAEDANS fluoreszcencia élettartamának félértékszélessége  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  alatt jó közelítéssel állandó, míg  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  felett ezen paraméter értékében enyhe csökkenés tapasztalható (5. ábra). Ez a tendencia megfelel a félértékszélesség hőmérsékletfüggésével kapcsolatban általában megfigyeltnek [Alcala és mtsai., 1987a; Bismuto és mtsai., 1988; Ferreira, 1989; Mei és mtsai., 1992]. Ugyanakkor a Mg-G-aktinban az IAEDANS élettartam-eloszlásának félértékszélessége a hőmérséklet növelésével



5. ábra: Az IAEDANS fluoreszcencia élettartamának félértékszélessége (FWHM) a hőmérséklet függvényében Ca- (●), ill. Mg-G-aktinban (○). A gerjesztési hullámhossz  $350\text{ nm}$  volt ( $4\text{ nm}$ -es rés alkalmazásával), míg a fluoreszcencia emissziót a  $KV370$ -es felületérezető szűrő alkalmazásával mértük.

nő (5. ábra). Az általánosan elfogadott modell szerint az eloszlás félértékszélességét alapvetően két paraméter határozza meg, a fluorofór által betöltött állapotok száma, ill. a közöttük való átmenetet leíró (átmeneti) sebességi állandók értéke. Az állapotok számának a megnövekedése az élettartam eloszlás kiszélesedését okozhatja. Ugyanakkor az átmeneti sebességi állandók növekedése (ami pl. a hőmérséklet emelkedésével következhet be), amennyiben domináns effektus, a félértékszélesség csökkenésében nyilvánul meg. Ennek megfelelően a méréseink során a félértékszélességben magasabb hőmérsékleteken tapasztalt növekedés Mg-G-aktinban a fluorofór által betöltött állapotok számának növekedésével magyarázható. Az állapotok számának növekedése hozzájárulhat a Ca-G-aktinban lévő IAEDANS fluoreszcencia élettartam-eloszlásának mérése során kapott tendencia kialakulásához is. A monomer ezen formájában az állapotok száma már alacsony hőmérsékleten is viszonylag magas. Az állapotok között a hőmérséklet hatására felgyorsul az átmenet, ami az állapotok számának növekedését, ill. ennek hatását ellensúlyozza.

A kationoknak a monomer szerkezetére gyakorolt hatását ( $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ) megvizsgáltuk a fluoreszcencia anizotrópia lecsengés hőmérsékletfüggésének mérésével is, ugyancsak az IAEDANS-t használva fluoreszcens próbanak. Az anizotrópia lecsengése általában leírható



exponenciális komponensek összegeként [Belford és mtsai., 1972]. Az analízis során 12 független mérés eredményeit vizsgálva (Ca-, ill. Mg-G-aktinban különböző hőmérsékleteken) az illesztést jóságát leíró paraméter ( $\chi^2$ ) értéke  $37.1 \pm 6.9$  volt egy komponens,  $2.3 \pm 0.2$  két komponens, és  $2.12 \pm 0.3$  három komponens feltételezésével.

III. táblázat: Az IAEDANS anizotrópia lecsengését jellemző paraméterek a hőmérséklet függvényében Ca- és Mg-G-aktinban.

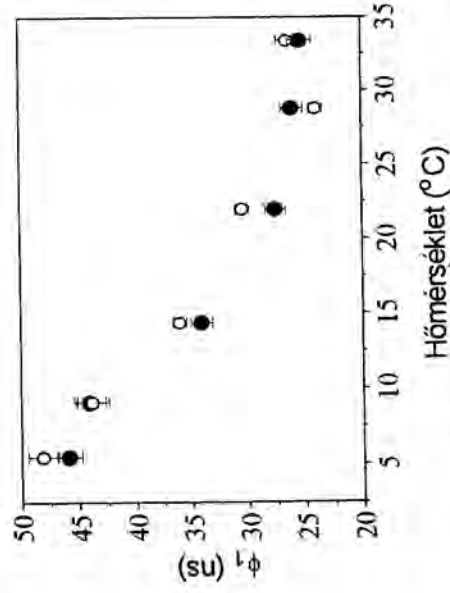
t [°C]	Ca-G-actin				Mg-G-actin			
	$\varphi_1$ [ns]	$r_1$	$\varphi_2$ [ns]	$r_2$	$\varphi_1$ [ns]	$r_1$	$\varphi_2$ [ns]	$r_2$
5.8	45.84 (1.06)	0.259 (0.002)	1.16 (0.20)	0.033 (0.002)	48.11 (1.28)	0.273 (0.002)	2.22 (0.51)	0.020 (0.002)
9.6	44.01 (1.35)	0.236 (0.003)	2.14 (0.25)	0.041 (0.003)	43.79 (1.39)	0.263 (0.003)	2.94 (0.63)	0.024 (0.003)
15.1	34.08 (0.97)	0.229 (0.002)	0.46 (0.18)	0.061 (0.002)	36.03 (0.62)	0.260 (0.002)	1.58 (0.17)	0.044 (0.016)
22.7	27.53 (0.90)	0.213 (0.002)	0.98 (0.16)	0.073 (0.003)	30.43 (0.60)	0.232 (0.003)	1.84 (0.15)	0.054 (0.002)
29.1	26.05 (0.95)	0.180 (0.003)	1.82 (0.14)	0.076 (0.003)	23.98 (0.59)	0.208 (0.002)	1.06 (0.11)	0.068 (0.003)
33.7	25.33 (1.00)	0.161 (0.003)	1.68 (0.10)	0.096 (0.002)	26.43 (0.92)	0.175 (0.003)	1.56 (0.11)	0.084 (0.002)

$\varphi_1$  a rotációs korrelációs idő és  $r_1$  a hozzá tartozó amplitúdó. Zárójelben a mérések hibája (standard error) van megadva.

Ezen adatok szerint tehát a két komponens feltételezésével elvégzett illesztés jelentősen jobb eredményeket szolgáltatott az egy komponens alkalmazásával végzett analízisnél, míg tovább növelve a feltételezett komponensek számát (három komponens) az illesztés jósága nem változott. Ennek megfelelően az anizotrópia lecsengés analízise során az illesztést két exponenciális komponens feltételkezelésével végeztük (III. táblázat).

A hosszú rotációs korrelációs idő mind Ca-, mind Mg-G-aktinban csökkent a hőmérséklet emelkedésével (6. ábra). Ez a paraméter valószínűleg a monomer egészének mozgását írja le, és a hőmérséklet növekedésének hatására bekövetkező csökkenése a fehérje mozgásának felgyorsulását tükrözi. Az általunk mért adatok összhangban vannak az Ikkai és munkatársai által megfigyelttel, akik ugyanezen fluorofórt vizsgálva 45 ns-ot mértek az aktin monomerre vonatkozólag 3.5 °C-on [Ikkai és mtsai., 1979]. Ugyanakkor

eredményeink megfelelnek az elméletileg nyerhető értékeknek is. A Tao által bevezetett formalizmust [Tao, 1969] alkalmazva a monomer forgását leíró rotációs korrelációs idő szobahőmérsékleten 18.3 ns-nak adódik, ami jó közelítésben megfelel az általunk mért értékeknek.



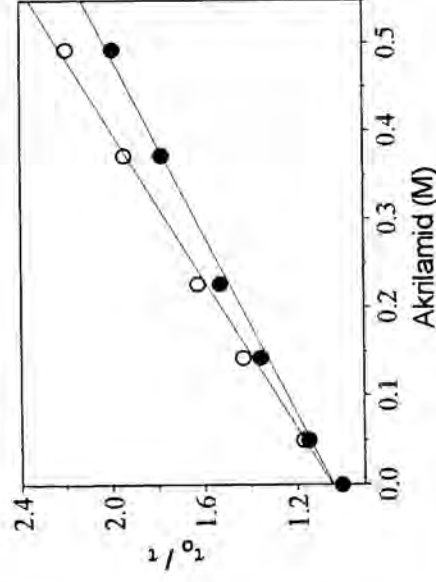
6. ábra: A hosszú rotációs korrelációs idő ( $\tau_c$ ) hőmérsékletfüggése Ca- (●), ill. Mg-G-aktinban (○). A gerjesztési hullámhossz 350 nm volt (4 nm-es rés alkalmazásával), a fluoreszcencia emissziót a KV370-es felületeresztő optikai szűrő alkalmazásával mértük.

A fluorofór mozgása a fehérjén belül modellezhető olyan mozgással, melynek során egy kúpon belül diffúzió kontrollált mozgást végez. Az anizotrópia lecsengés mérése során kapott amplitúdó értékek segítségével megfelelő modellt alkalmazva (ld. III.4.3) ennek a félszögnek (Θ) a számolására lehetőségünk nyílik. Ezen kúpnak a félszöge információt hordoz a fluorofór mikrokozonyzatát illetően. A fluorofór mozgását (modellünk szerint) korlátozó kúp félszöge kisebb Mg-G-aktinban, mint Ca-G-aktinban (7. ábra).

A szerkezet pontosabb megismerése érdekében vizsgáltuk az akrilamid, mint külső, semleges töltésű kioltó hatását is a monomer különböző kationnal telített állapotaiban (8. ábra). A kioltást jellemző bimolekuláris kioltási állandó, ( $k_+$ ), a Mg-G-aktinban ( $1.2 \pm 0.02$ )  $M^{-1}s^{-1}$ , míg Ca-G-aktinban ( $1.0 \pm 0.02$ )  $M^{-1}s^{-1}$  (számolása ld. III.4.5). Ezen paraméter tehát mintegy 20 %-al nagyobb a Mg-G-aktinban mint Ca-G-aktinban, ami első közelítésben arra utal, hogy a  $Mg^{2+}$ -al telített monomerben a fluorofór hozzáférhetősége az oldat számára nagyobb.

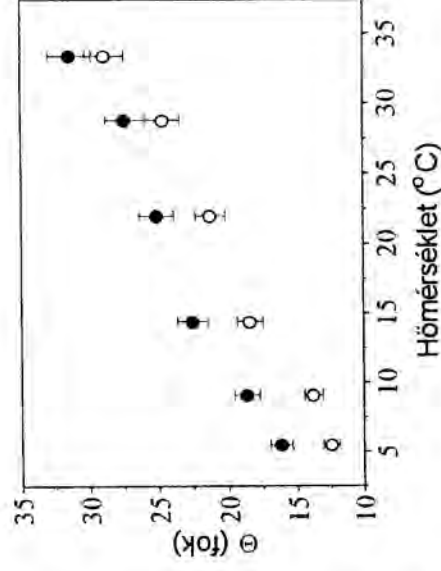
Mindezek alapján a méréseink kiértékelése során kapott hosszú forgási idők a monomer forgását írják le. Mivel ez a paraméter tendenciáját tekintve megegyezik Ca-, ill. Mg-G-aktinra vonatkozólag (6. ábra), további igazolást nyert a Strzelecka-Golaszewska és munkatársai által levont következtetés, miszerint az oligomerizáció nem lép fel a kationcserét követő első 50 percen belül [Strzelecka-Golaszewska és mtsai., 1993]. Ezt támasztják alá a szórási kísérleteink eredményei is (ld. III.4.4, az adatok nincsenek feltüntetve).

Ugyanakkor az akrilamid alkalmazásával végzett kioltási kísérletek értelmezése nem egyértelmű. A kioltás folyamatában részt vehetnek ugyanis azok a kioltó molekulák is, melyek a fehérjefázisban vannak, és a gerjesztés pillanatában megfelelően közel helyezkednek el a fluorofórhoz [Somogyi és mtsai., 1994]. Másrészt az akrilamid képes kötődni a fehérjékhez [Punyiczki és mtsai., 1993; Matkó és mtsai., 1980], ami az eredmények kiértékelését ugyancsak megnehezíti.



8. ábra: Az IAEDANS akrilamid jelenlétében mért élettartamának Stern-Volmer ábrázolása Ca- (●), ill. Mg-G-aktinban (○). A fluoreszcencia élettartam mérése során a gerjesztési hullámhossz 350 nm volt (4 nm-es rés alkalmazásával), a fluoreszcencia emissziót a KV370-es felülatéresztő optikai szűrő alkalmazásával végeztük. A méréseket 25 °C-on végeztük.

ható, hogy a subdomén 1 szerkezete, vagy legalább is a Cys-374 aminosav környezete ezen alegységen belül merevebbé válik a  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$  csere hatására. A fluorofór mozgását (modellünk szerint) korlátozó kúp felszöge kisebb Mg-G-aktinban, mint Ca-G-aktinban, ami



7. ábra: A felszög (Θ) hőmérséklet-függése Ca- (●), ill. Mg-G-aktinban (○). ( $\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$  (4 nm-es rés alkalmazásával), a fluoreszcencia emissziót a KV370-es felülatéresztő optikai szűrő alkalmazásával mértük.)

Esetünkben a bimolekuláris kioltási állandó értéke több mint egy nagyságrenddel kisebb, mint az oldat felé teljes (vagy jelentős) hozzáférhetőséget mutató fluorofórok esetében [Eftink és Ghiron, 1976]. Ennek megfelelően annak értelmezéséhez, hogy a Mg-G-aktinban a bimolekuláris kioltási állandó nagyobb mint Ca-G-aktinban további kísérletek szükségesek.

Méréseink során igazolódott, hogy az aktin monomer kationtartalmában bekövetkező változás konformációváltást okoz a C-terminális alegységen belül. Eredményeink alapján megállapít

arra utal, hogy a  $Mg^{2+}$ -al telített monomerben a C-terminális Cys-374 aminosavja kevésbé hozzáférhető az oldat számára, mint a Ca-G-aktinban.

A subdomén 1 egyike a feltételezett monomer-monomer kapcsolódási pontoknak az aktin filamentumon belül. A  $Mg^{2+}$ -al telített aktin nukleációja a polimerizálódás során nagyságrendekkel gyorsabb, mint az a  $Ca^{2+}$  jelenlétében [Tobacmann és Korn, 1983]. A jelenség magyarázatául az irodalomban fellelhető adatok szerint az szolgál, hogy az ATP hidrolízise gyorsabb a Mg-G-aktinban [Carlier, 1990; Selden és mtsai., 1990]. Ugyanakkor az is elképzelhető, hogy a vizsgálataink során a monomer két formája között kimutatott szerkezeti különbségek ugyancsak hozzájárulnak a nukleáció folyamatának eltérő voltához. Figyelembe véve a Mg-G-aktin merevebb, ugyanakkor zártabb konformációját lehetséges, hogy az aktin monomer ezen formájában a más monomerekhez való kapcsolódás valószínűsége megnő, így az összekapcsolódás folyamata felgyorsul.

#### IV.1.3 Az aktin alegységei közötti flexibilitás

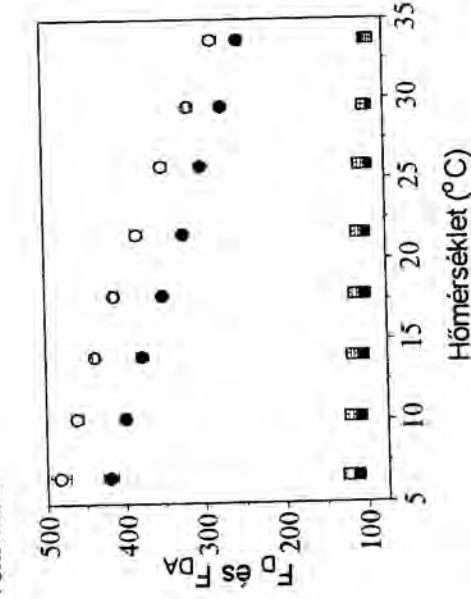
Az izom-összehúzódás során az aktin flexibilitásának megváltozása meghatározó szerepet tölthet be az aktin-miozin kölcsönhatásban [Asakura és mtsai., 1963]. Az aktin filamentumok rugalmassága függ mind a monomerek közötti kötések minőségétől, mind a protomer (a filamentumba beépült monomer) aktuális konformációs állapotától [Oosawa, 1980; Yanagida és mtsai., 1984; Orlova és Egelman, 1992; Orlova és Egelman, 1993]. Mivel a monomer szerkezetét és dinamikai paramétereit a fehérje által kötött kationok minősége is befolyásolja, így a kationok hatásának megértésével közelebb kerülhetünk az aktinon belüli konformációs változások, és így közvetve az izom-összehúzódás leírásához.

Az előző fejezetben a Ca-G-aktin és Mg-G-aktin C-terminális alegysége közötti konformációs különbségeket vizsgáltuk. A fehérje ezen két formája közötti eltéréseket a monomer subdomén 1 és subdomén 2 alegységét magába foglaló kisebb domén ("small domain") (ld. 1. ábra) flexibilitását tanulmányozva is módunkban áll jellemezni.

Méréseink során a fehérjéhez kovalens módon kapcsolódó fluorofórok, az IAEDANS és a FITC, közötti Förster-típusú energia transzfer (FRET) határfokát mértük. Az IAEDANS a Cys-374, míg a FITC a Lys-61 aminosavhoz kapcsolódik. Miki és munkatársai 1987-ben ismertették a két fluorofór között az aktin monomerben kialakuló energia

transzfer néhány jellemző paraméterét [Miki és mtsai., 1987]. Munkánk során a FRET hatásfokának hőmérsékletfüggését mértük. A mért adatok segítségével számoltuk egy további FRET paraméter, az  $f'$  értékét [Somogyi és mtsai., 1984] (ld. III.4.6).

Az  $f'$ , ill. az értékében bekövetkező változások a donor és akceptor molekula közötti fehérje-mátrix dinamikai paramétereiről szolgáltatnak információt. Az  $f'$  értékének alakulásában két effektus játszik meghatározó szerepet. Általában a fehérje-mátrix flexibilitásában bekövetkező változás a domináns. A flexibilitás megváltozása maga után vonja a helyi fluktuációk módosulását. Ez a módosulás lehet akár a fluktuáció amplitúdójának, akár a frekvenciájának a megváltozása. Ez esetben a donor-akceptor távolságot leíró eloszlás várható értéke ugyanaz marad, míg az eloszlás félértékszélessége megváltozik. Amennyiben az  $f'$  értéke ezen effektus hatása miatt változik meg, úgy a mért változás az  $f'$ -ben a fehérje dinamikai paramétereinek megváltozását tükrözi. Ugyanakkor az olyan konformációs változások is befolyásolják az  $f'$  értékét, melyek során a donor és akceptor molekula közötti távolság megváltozik. Amennyiben a fehérje dinamikai állapotát akarjuk kísérleteink során jellemezni, az ilyen szerkezeti változások hatását figyelembe kell vennünk.



9. ábra: Az IAEDANS fluoreszcencia intenzitása a FITC nélkül (O; ●) és a FITC jelenlétében (■; □) Ca- (●; ■), ill. Mg-G-aktinban (O; □). A gerjesztési hullámhossz 350 nm volt (4 nm-es rés alkalmazásával), a fluoreszcencia emissziót 375 nm-en (4 nm-es résen keresztül) mértük. Az aktin koncentrációja 2  $\mu\text{M}$  volt.

Az IAEDANS fluoreszcencia intenzitása (az akceptort nem tartalmazó rendszerben) minden hőmérsékleten nagyobb a Mg-G-aktinban, mint a Ca-G-aktinban (9. ábra). Ez összhangban van a Frieden és munkatársai által mért adatokkal [Frieden és mtsai., 1980]. A fluoreszcencia intenzitás a monomer mindkét formájában függ a hőmérséklettől (9. ábra). Az akceptor jelenlétében a donor intenzitása lecsökken, ami a FRET mechanizmus jelenlétére utal. Mind a FITC nélkül, mind a FITC jelenlétében kisebb fluoreszcencia intenzitásokat mértünk magasabb

hőmérsékleteken. Az akceptor nélküli rendszerben a donor intenzitásának magasabb

hőmérsékleteken történő csökkenése valószínűleg a hőmérsékletfüggő (általában diffúzió által meghatározott) kioltási folyamatok hatékonyságának a megnövekedésével magyarázható. Amennyiben a donor molekula az akceptor által gyakorolt FRET hatása alatt is állt, a fluoreszcencia intenzitás alakulásában a fent említett folyamat mellett szerepet játszott a FRET hatékonyságának hőmérsékletfüggése is. A rendszer magasabb hőmérsékleteken nagyobb termikus energiával rendelkezik. Ez a megnövekedett energia a fehérje mozgásának a megváltozását okozza. Az egyes szegmensek fluktuációjának amplitúdója megnő. Ennek eredményeként a FRET mért határfoka ugyancsak megnő, ami hozzájárul a donor intenzitásának a hőmérsékletfüggéséhez.

*IV. táblázat: Az IAEDANS-FITC pár esetében mért és számított FRET paraméterek a hőmérséklet függvényében.*

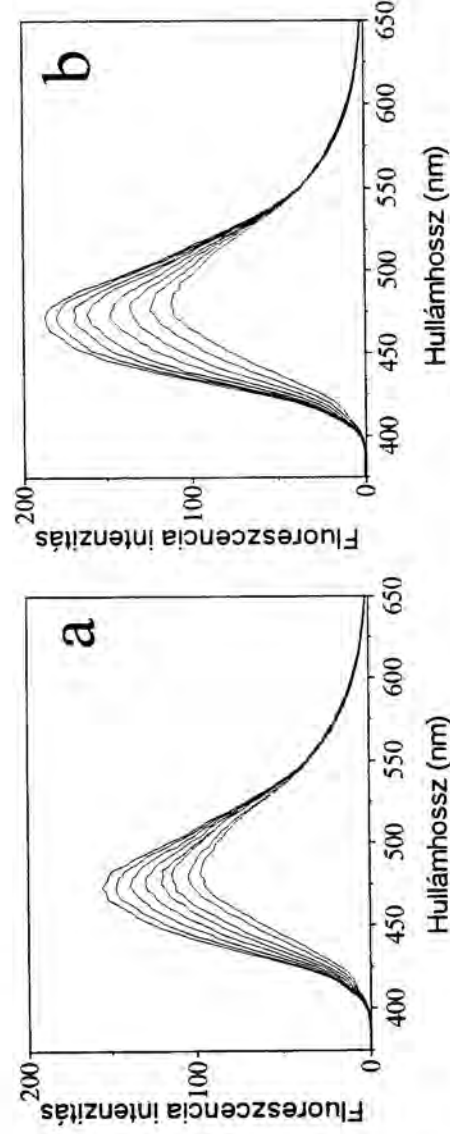
t [°C]	$J \times 10^{-14}$ [M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> nm <sup>4</sup> ]		$\phi_D$		$R_0$ [nm]		$E^*$ [%]		$R^*$ [nm]	
	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>
6.6	21.65	21.28	0.59	0.67	5.19	5.28	69.39	70.53	4.53	4.56
10.2	20.98	20.78	0.57	0.64	5.13	5.23	68.85	69.90	4.50	4.54
14.0	20.63	20.38	0.54	0.62	5.06	5.17	67.78	68.96	4.49	4.53
17.8	20.25	19.83	0.52	0.59	5.02	5.11	66.54	68.21	4.48	4.50
21.5	19.94	19.31	0.49	0.56	4.96	5.04	64.94	67.14	4.48	4.47
25.8	19.42	19.12	0.46	0.52	4.90	4.98	63.44	65.69	4.47	4.46
29.5	19.19	18.72	0.44	0.49	4.84	4.90	61.08	64.31	4.49	4.45
33.7	19.05	18.59	0.41	0.45	4.78	4.84	58.71	62.56	4.51	4.44

*A FRET paraméterek meghatározása során az IAEDANS fluoreszcencia intenzitásának FITC nélkül, ill. FITC jelenlétében mért értékeit használtuk (ld. III.4.6). A fluorofórt 360 nm-en gerjesztettük, és 475 nm-en mértük az emissziót (mind a gerjesztési, mind az emissziós rést 4 nm-re állítottuk).*

A FRET határfokának meghatározására szolgáló IAEDANS intenzitásokat a számolás előtt korrigáltuk a donor molekula aktuális koncentrációjával a különböző mintákban. Ennek érdekében a fehérje oldatot 0.4 mg / ml tripsin és 2 mM ATP (a megadott koncentrációk a pufferben a hozzáadás után kialakuló koncentrációkat jelölik) mellett puffer A-ban inkubáltuk [Miki és mtsai., 1987]. Az emésztés során a donor és

akceptor molekulák közötti energia transzfer megszűnt. Ezután a donor fluoreszcencia intenzitása arányos volt a minta donor koncentrációjával, ami lehetővé tette a korrekció elvégzését.

A számolt FRET hatásfok ( $E$ ) minden hőmérsékleten nagyobb a Mg-G-aktinban, mint a  $\text{Ca}^{2+}$ -al telített fehérjében (IV. táblázat). Ezen paraméter értéke a hőmérséklet emelkedésével csökken a fehérje mindkét formájában. A donor-akceptor távolságokat a III.4.6 fejezetben ismertetett módon számoltuk. A minta törésmutatóját ( $n$ ) 1.4-nek tekintettük. Feltételeztük, hogy a donor és akceptor molekulák relatív mozgása gyors, és ennek megfelelően az orientációs faktor ( $\kappa^2$ ) értékét 2/3-nak vettük. Ezen feltételezésünket alátámasztja, hogy az aktin monomer röntgen-kristallográfiás rekonstrukciója alapján az akceptor molekula egy nagy mértékben flexibilis fehérjeszegmenssen, ún. "loop"-on helyezkedik el, és ennek megfelelően oldatban igen gyors mozgást végez.



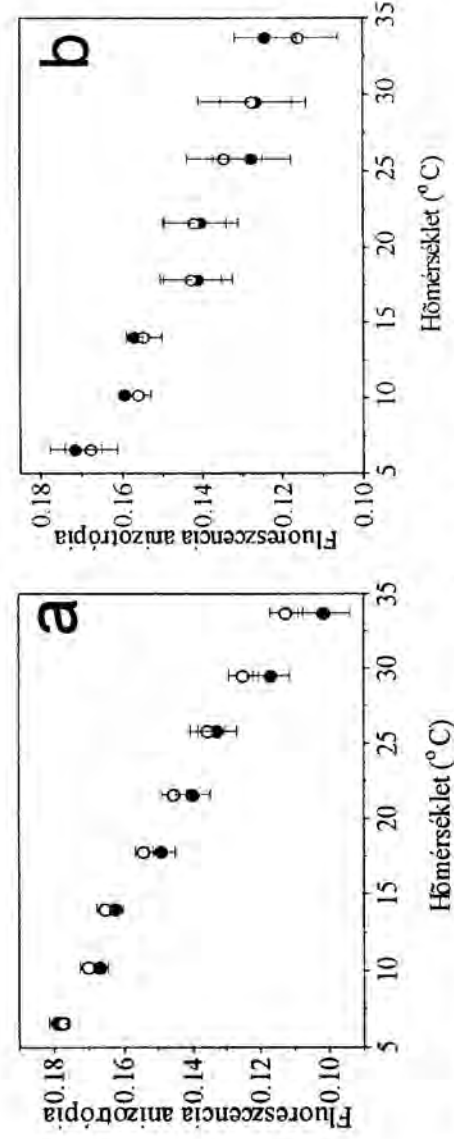
10. ábra: Az IAEDANS korrigált emissziós spektruma a hőmérséklet függvényében (5-35 °C) Ca-G-aktinban (a) és Mg-G-aktinban (b). Az intenzitások relatív egységekben vannak megadva, és a magasabb intenzitással rendelkező spektrumok az alacsonyabb hőmérsékletre tartoznak az egyes ábrákon. A gerjesztési hullámhossz 350 nm volt (4 nm-es rés alkalmazásával). Az aktin koncentrációja 2  $\mu\text{M}$  volt.

Az IAEDANS fluoreszcencia emissziós spektrumának alakja, és maximális intenzitása változik a hőmérséklet és a kation tartalom változásával (10. ábra). Ugyanakkor a FITC anszorbciós spektruma is hőmérsékletfüggő. Ennek megfelelően a FRET paramétereket mind a hőmérséklet, mind a kation tartalom függvényében meghatároztuk (IV. táblázat).





aktinban, mint a Mg-G-aktinban 26 °C alatt. Az  $f'$  értékében mutatkozó tendenciák értelmezése érdekében megvizsgáltuk, hogy a Ca-G-aktin és Mg-G-aktin közötti különbséget mely paraméterek megváltozása okozhatja. Mértük a donor és az akceptor molekula fluoreszcencia anizotrópiáját. Ezek a paraméterek függenek a hőmérséklet aktuális értékétől, de függetlenek az aktin monomer kationtartalmától (13. ábra). Az anizotrópia adatok Perrin ábrázolásával meghatározhatóvá vált a látszólagos hataranizotrópia ( $r_0$ ) értéke a monomer két formájában mind a donor, mind az akceptor molekulára vonatkozóan. Az IAEDANS esetében a hataranizotrópia  $0.31 \pm 0.02$  és  $0.29 \pm 0.02$  Ca-G-aktinban, ill. Mg-G-aktinban, míg a FITC esetében  $0.25 \pm 0.02$  és  $0.25 \pm 0.02$  értékeket mértünk a monomer két formájában. Ennek megfelelően a kísérleti adatok tanúsága szerint ezen paraméter értéke sem kationfüggő. Ezen eredmények arra utalnak, hogy az orientációs faktor értéke nem függ a monomer kationtartalmától, azaz az  $f'$  vizsgálatokor talált esetleges kationfüggés nem tulajdonítható az orientációs faktorban meglévő különbségeknek. Következtetésünk akkor is igaz ha a donor és akceptor molekula gyors forgására vonatkozó kezdeti feltételezésünk ( $\kappa^2 = 2/3$ ) nem helytálló.



13. ábra: Az aktin monomer  $\text{Ca}^{2+}$ -al (●) és  $\text{Mg}^{2+}$ -al (○) telített állapotában mért fluoreszcencia anizotrópia a hőmérséklet függvényében. Panel a: IAEDANS; Panel b: FITC. A donor molekulát 350 nm-en, az akceptort 493 nm gerjesztettük. A donor emisszióját 475 nm-en, míg az akceptorét 520 nm-en mértük. A rések az IAEDANS esetében 4 nm-re, a FITC esetében 2.5 nm-re voltak beállítva mind a gerjesztési, mind az emissziós fényűtben.

Az átfedési integrál értékek különbözősége általános esetben ugyancsak eredményezheti az  $f'$  megváltozását. A Ca- és Mg-G-aktinban mért átfedési integrálok

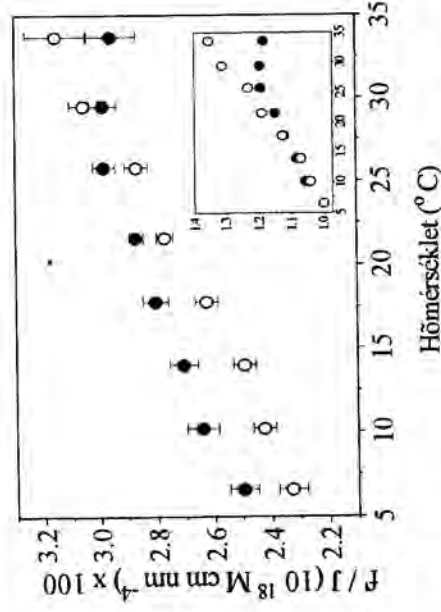
eltérése megközelítőleg 2 % (IV. táblázat). Ez a viszonylag kis különbség nem okozhatja az  $f'$ -ben mért eltéréseket. Állításunk alátámasztása érdekében ábrázoltuk az  $f'$  és az átfedési integrál hányadosát a hőmérséklet függvényében (14. ábra). Mint az az ábrán is látszik, az így kapott tendencia megfelel az  $f'$  ábrázolása során tapasztaltaknak, azaz a két görbe meredekségében továbbra sem mutatható ki eltérés 26 °C alatt (ld. betétábra).

Az  $f'$  hőmérsékletfüggését leíró görbék meredeksége tehát 26 °C alatt megegyezik a Ca-G-aktinban és Mg-G-aktinban, ami arra utal, hogy a fehérje-mátrix flexibilitása ezen hőmérséklet-tartományban megegyezik a Lys-61 és Cys-374 aminosavak között a fehérje két formájában.

A fehérje konformációjának megváltozását kizárva az  $f'$  értéke a hőmérséklettel minden esetben növekvő tendenciát kell hogy mutasson. A Ca-G-aktinban 26 °C felett az  $f'$  értéke csökken növekvő hőmérséklet mellett. Ez arra utal, hogy a  $\text{Ca}^{2+}$ -al telített monomerben ezen hőmérséklet felett konformációváltozás jön létre.

Az általunk vizsgált kisebb domén a monomernek olyan része, mely részt vesz mind a filamentum belül, mind az aktin-miozin kapcsolódás során a kapcsolódások kialakításában. Ennek megfelelően ezen alegység vizsgálata fontos lehet az aktin biológiai funkciójának megértéséhez. Eredményeinket összegezve megállapítható, hogy az aktin monomer vizsgált két pontja között a fehérje-mátrix a Mg-G-aktinban ugyanolyan flexibilitást mutat, mint Ca-G-aktinban. Ugyanakkor a Ca-G-aktinban szobahőmérséklet felett létrejön egy konformációs állapotváltozás, melynek bekövetkezése Mg-G-aktinban nem mutatható ki.

A Cys-374 mikrokozonyzata a Mg-G-aktinban merevebb, mint Ca-G-aktinban, amint azt az előző fejezetben láttuk. Az itt leírt eredmények alapján valószínű, hogy ezen flexibilitásbeli különbség térbeli kiterjedtsége kisebb annál, semhogy befolyásolná a teljes kisebb domén flexibilitását. Ugyanakkor az sem zárható ki (de nem is valószínű), hogy a



14. ábra: Az  $f'$  és az átfedési integrál (J) hányadosa a hőmérséklet függvényében Ca- (●), ill. Mg-G-aktinban (○). A betétábra a hányados relatív megváltozásának hőmérséklet-függését mutatja.

donor merevebb környezetének hatását Mg-G-aktinban ellensúlyozza a kisebb domén egészének lazább szerkezete. Eredményeink alapján továbbá megállapítható, hogy ha létezik is különbség a subdomén 2 orientációjában a Ca-G-aktin és Mg-G-aktin összehasonlításában, ez a különbség nem befolyásolja a fehérje-matrix flexibilitását a kisebb doménon belül.

Ezen eredményeink, valamint az előző fejezetben ismertett megfigyelések alapján valószerűnek tűnik, hogy az aktin különböző kationnal telített filamentumai között Orlova és Egelman által kimutatott [Orlova és Egelman, 1993] dinamikai különbségek nem magyarázhatóak az aktin protomer szerkezetének különbözőségével. Következésképpen, a filamentumok eltérő flexibilitásának az oka a protomerek kapcsolódásának kationfüggése. Ezen következtetésünk alátámasztására további kísérletek elvégzését tervezzük.

#### IV.2 A kationok ( $Ca^{2+}$ , $Mg^{2+}$ ) hatása a troponin C C-terminális alegységének szerkezetére és dinamikájára.

Vizsgálataink során a rochesteri (MN, USA) Mayo Klinika Biokémiai csoportjával együttműködve tanulmányoztuk a kationtartalom megváltozásának hatására kialakuló szerkezeti és dinamikai változásokat a troponin C-ben. Az eredmények ismeretében kapcsolatot kerestünk a fehérje szerkezete és biológiai funkciója között. Csirke troponin C mutánsal dolgoztunk, melyben a 154. aminosav (fenilalanin) triptofánra volt cserélve (2. ábra). Kihasználva, hogy ezzel a mutációval a fehérjében egyetlen fluorofór van, a triptofán fluoreszcencia paraméterei, és a fehérje belső dinamikája között kerestünk összefüggéseket.

A troponin C röntgen-kristallográfiás térszerkezetében a 154. aminosav a IV. kötőhely mellett a HI-hélixben található (2. ábra), és az oldat számára kicsi a hozzáférhetősége. Elhelyezkedéséből fakadóan érzékeny a kation bekötődésére, így vizsgálataink céljainak megfelel. A térszerkezeti modell szerint ez a szegmense a fehérjének igen közel van a feltételezett troponin I kötőhelyhez, vagy esetlegesen része annak, ami lehetőséget biztosít számunkra a két fehérje kapcsolatának, ill. ezen kapcsolaton belül a troponin C szerkezeti, dinamikai változásainak a pontosabb megismerésére.

Az általunk vizsgált mutáns troponin C preparálását és egyes spektroszkópiai tulajdonságait 1994-ben ismertették először [Chandra és mtsai., 1994]. A vizsgált funkcionális paraméterek megfeleltek a nyúl vázizomból [Johnson és Potter; 1978; McCubbin és mtsai., 1982], ill. a csirke vázizomból [Golosinska és mtsai., 1991] preparált troponin C hasonló tulajdonságainak. Az egyetlen lényeges eltérést az összehasonlítás során a nagy affinitású kötőhelyek  $Ca^{2+}$ -kötő képességében mutatták ki, amennyiben a mutáns affinitása erre a kationra vonatkozólag megközelítőleg a felére csökkent. Ez azt mutatja, hogy a 154. aminosav pozícióban végrehajtott fenilalanin-triptofán csere kevésbé befolyásolta a fehérje szerkezeti és funkcionális tulajdonságait.

A korábbi vizsgálatokból ismert, hogy a kationnal telített troponin C-ben a 154. aminosav helyen lévő triptofán fluoreszcencia emissziós spektruma különbözik a kationmentes fehérjében mértől [Chandra és mtsai., 1994]. A  $Ca^{2+}$  bekötődésének hatására az emissziós spektrum maximuma eltolódik 345 nm-ről 320 nm-re.

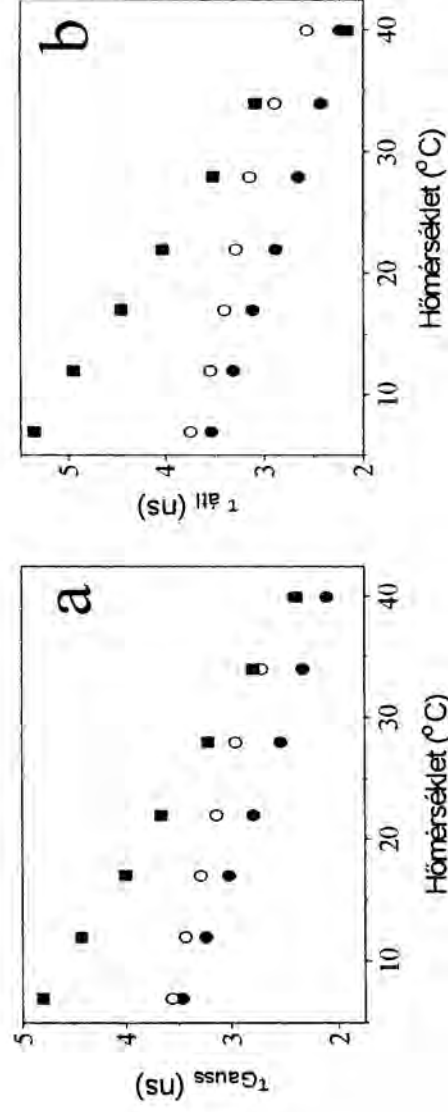
Az ebből származó esetleges mellékhatások kiküszöbölésének érdekében mind a fluoreszcencia élettartamok, mind az anizotrópia lecsengés vizsgálatokor méréseinket két különböző emissziós hullámhosszon végeztük (320 nm és 340 nm). Ezen összehasonlítások tapasztalata szerint bár a triptofán fluoreszcenciás viselkedését a különböző emissziós hullámhosszakon más-más paraméterekkel írhatjuk le, az ezen fluoreszcencia paraméterekben a környezet változásának hatására beálló módosulások tendenciájukat tekintve a két hullámhosszon megegyeznek, és a belőlük levont következtetések bármely hullámhosszon mért eredményeket alapul véve hasonlóak. Ezért a táblázatokban és az ábrákon csak a 340 nm-en kapott eredményeket tüntetjük fel.

A triptofán fluoreszcencia élettartamát és anizotrópia lecsengését mértük különböző kationok ( $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ) jelenlétében, ill. a fehérje kationmentes állapotában a 7-40 °C hőmérséklet-tartományon. Az élettartam mérések során kapott adatok elemzése két exponenciális (diszkrét) komponens, vagy folytonos élettartam eloszlás feltételezésével adta a legjobb  $\chi^2$  értéket (V. táblázat). (A folytonos eloszlások közül a Gauss eloszlás alkalmazásával nyert illesztési paraméterekkel hasonlítjuk össze a V. táblázatban a diszkrét analízis eredményeit.) A két exponenciális komponens feltételező illesztést alkalmazva az adatok értelmezése során elsősorban az átlagos fluoreszcencia élettartam értékek figyelembe vételével vontuk le következtetéseinket (számolását ld. III.4.3).

V. táblázat: A triptofan fluoreszcencia élettartamának hőmérsékletfüggése tropinin C-ben.

	Ca <sup>2+</sup> -tropinin C						Mg <sup>2+</sup> -tropinin C						Kationmentes tropinin C								
	Exponenciális			Gauss			Exponenciális			Gauss			Exponenciális			Gauss					
t	t <sub>1</sub>	t <sub>2</sub>	χ <sup>2</sup>	C*	W*	χ <sup>2</sup>	t	t <sub>1</sub>	t <sub>2</sub>	χ <sup>2</sup>	C*	W*	χ <sup>2</sup>	t	t <sub>1</sub>	t <sub>2</sub>	χ <sup>2</sup>	C*	W*	χ <sup>2</sup>	
[°C]	[ns]	[ns]		[ns]	[ns]	[ns]	[ns]	[ns]	[ns]		[ns]	[ns]	[ns]	[ns]	[ns]	[ns]	[ns]	[ns]	[ns]	[ns]	[ns]
7.1	3.60	1.25	0.92	0.7	3.46	0.89	1.9	3.95	1.71	0.81	0.3	3.56	1.07	0.6	5.28	1.46	0.84	1.0	4.80	1.99	1.8
12.0	3.37	1.06	0.92	0.6	3.24	0.88	2.1	3.63	1.13	0.89	0.6	3.43	1.09	2.0	4.87	1.29	0.85	0.5	4.42	1.87	3.5
17.2	3.19	1.12	0.90	1.2	3.02	0.85	2.2	3.48	1.07	0.89	0.8	3.28	1.04	2.3	4.39	1.14	0.85	1.7	4.00	1.66	5.4
22.6	2.95	1.01	0.90	0.6	2.79	0.79	1.5	3.39	1.17	0.86	0.6	3.13	1.01	1.5	4.05	1.12	0.84	0.7	3.66	1.52	2.7
28.3	2.76	1.16	0.84	0.6	2.53	0.72	1.0	3.27	1.13	0.83	1.0	2.95	1.04	2.0	3.58	1.04	0.83	0.8	3.21	1.33	2.3
34.1	2.49	0.79	0.88	0.9	2.32	0.70	2.0	3.00	0.97	0.84	0.6	2.71	0.95	1.7	3.19	0.99	0.80	0.6	2.79	1.15	1.9
40.1	2.37	1.02	0.79	1.6	2.10	0.64	1.9	2.65	0.71	0.85	0.9	2.40	0.92	2.4	2.77	0.89	0.78	0.9	2.38	0.99	1.3

\*C az élettartam-eloszlás középértéke, míg W az eloszlás félértékessége, t<sub>1</sub> a diszkrét analízisből származó fluoreszcencia élettartam komponenseket, míg α<sub>1</sub> a hozzájuk tartozó amplitúdókat jelöli, ahol α<sub>1</sub> + α<sub>2</sub> = 1. χ<sup>2</sup> a jóssági paraméter.



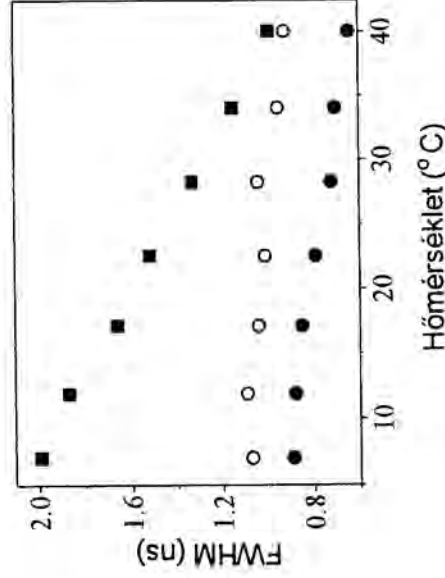
15. ábra: A triptofán fluoreszcencia élettartama (a.; a Gauss analízis centrum értéke, ill. b.; a diszkrét analízis alkalmazásával kapott értékekből számolt átlagélettartam) a hőmérséklet függvényében Ca-troponin C-ben (■), Mg-troponin C-ben (●), ill. kationmentes troponin C-ben (○). A triptofánt 295 nm-en gerjesztettük, míg a fluoreszcencia emissziót 340 nm-es interferencia szűrő alkalmazásával mértük.

A triptofán fluoreszcencia élettartama függ mind a hőmérséklettől, mind a troponin C IV. kötőhelyének kationtartalmától (V. táblázat). A kalciummal telített fehérjében a fluorofór élettartama rövidebb a kationmentes állapotban mért értékénél minden vizsgált hőmérsékleten (15. ábra). A  $Mg^{2+}$  hatása erre a paraméterre hasonló a  $Ca^{2+}$ -éhoz, de annál gyengébb, azaz a  $Mg^{2+}$  kötődésével bekövetkező élettartam-változás kisebb. Két exponenciális komponenst feltételezve az analízis során a fluoreszcencia élettartam ezen két komponense közül a rövidebb nem, vagy csak viszonylag kis mértékben változik a hőmérséklet, ill. a kationtartalom változásának hatására. Az amplitúdók ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ) ugyanezen környezeti paraméterek hatására gyakorlatilag változatlanok maradnak. Ugyanakkor mind a hőmérséklet, mind a kation tartalom megváltozásának hatása nyomonkövethető a hosszú élettartam komponens, és ebből következően az átlagos fluoreszcencia élettartam megváltozásában (V. táblázat).

A mért fluoreszcencia lecsengést folytonos eloszlást feltételezve is elemeztük. Az analízis során a folytonos eloszlást egy komponensből álló Gauss-eloszlásnak feltételeztük (V. táblázat). Az ilyen illesztés során két primer paramétert kaphatunk az intenzitás időfüggésének jellemzésére; a lecsengést leíró eloszlás maximumhelyét (C), amit szokás centrumértéknek is nevezni, és megfeleltethető az átlagos fluoreszcencia élettartamnak, ill. az eloszlás féltértékességét (W).

A Gauss-eloszlást feltételező analízissel kapott élettartam értékek a két exponenciálíst feltételező analízis során nyert átlagos fluoreszcencia élettartamhoz hasonlóan változnak a különböző környezeti paraméterek változásának hatására (15. a, b ábra). A két analízis által

kapható élettartam értékek a mérés hibahatárán (amit fluoreszcenciáról lévén szó 5%-ra becsülhetünk) belül megegyeznek. Az eloszlás félérték-szélessége minden esetben csökkent a hőmérséklet növekedésével, de a relatív megváltozása jelentősen nagyobb, ha a troponin C kötőhelyei nem voltak kationnal telítve (16. ábra). A magasabb hőmérsékleteken mérhető kisebb félérték-szélesség valószínűleg a fluorofór-állapotai közötti átmenetek felgyorsulásának a következménye. A félérték-szélesség a fehérje kationnal telített állapotában kisebb, mint a kationmentes állapotban. Ez arra utal, hogy mind  $\text{Ca}^{2+}$ ,

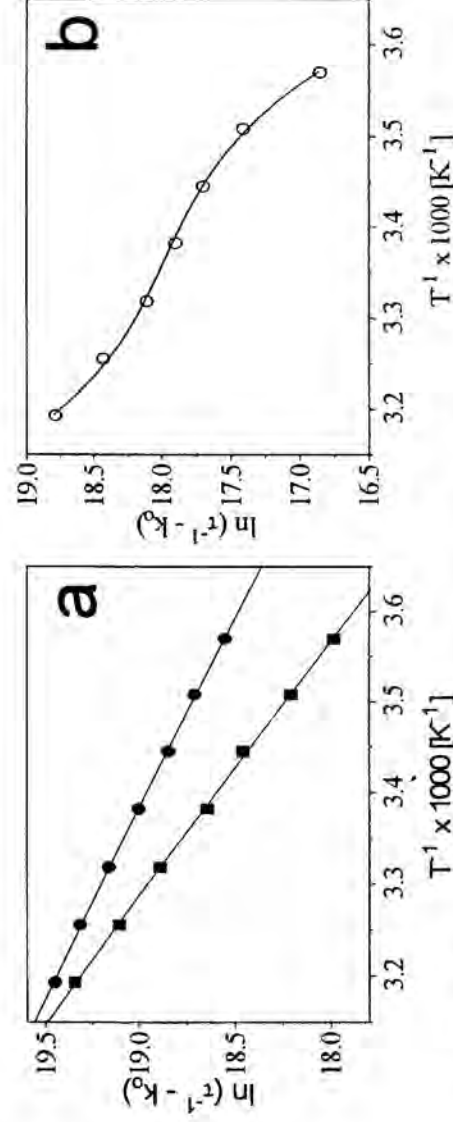


16. ábra: A triptofán élettartam-eloszlása félérték-szélességének (FWHM) hőmérsékletfüggése Ca-troponin C-ben (■), Mg-troponin C-ben (○), ill. kationmentes troponin C-ben (○). A fluoreszcencia élettartam mérése során a triptofánt 295 nm-en gerjesztettük, míg a fluoreszcencia emissziót 340 nm-es interferencia szűrő alkalmazásával mértük.

mind  $\text{Mg}^{2+}$  kötődésének hatására a triptofán környezetében a fehérje-mátrix merevebbé válik, és így a triptofán mozgása kisebb térrészbe korlátozódik. Ennek eredményeként a környezetében elhelyezkedő funkciós csoportok közül kevesebb lehet kölcsönhatásba, így a triptofán populáció heterogenitása lecsökken.

A triptofán foto-fizikájával kapcsolatban korábban említett nem-radiatív lecsengési utak jellemzése érdekében a fluoreszcencia élettartam hőmérsékletfüggését elemeztük az ún. Arrhenius-ábrázolás segítségével is (ld. III.4.7). Feltételeztük, hogy ez a hőmérsékletfüggés jól leírható egyetlen exponenciális komponensből álló Arrhenius-egyenlettel. A mért értékek Arrhenius-ábrázolása a kationmentes, ill. a  $\text{Ca}^{2+}$ -al telített fehérje esetében egyenest eredményezett (17. a ábra). Ezzel szemben a  $\text{Mg}^{2+}$ -al telített troponin C-re vonatkozó ábrázolás eltér az egyenestől (17. b ábra), ami valószínűleg a hőmérséklet hatására bekövetkező konformáció-változás hatásának tudható be. A két esetben, amikor az

ábrázolás egyenest eredményezett, az egyenesek meredekségének, ill. tengelymetszetének ismeretében számolhatóvá vált az aktivációs energia ( $E^*$ ), a frekvencia faktor ( $A$ ), valamint az ún. hőmérséklet független sebességi állandó ( $k_0$ ). Ezen paraméterek jellemzik a fluoreszcencia élettartam csökkentésében résztvevő folyamatok együttes hatását.



17. ábra: A triptofán fluoreszcencia élettartam adatainak Arrhenius-ábrázolása a.; Ca- (●) és kationmentes troponin C-ben (■), ill. b.; Mg-troponin C-ben (○). A fluoreszcencia élettartam mérése során a triptofánt 295 nm-en gerjesztettük, míg a fluoreszcencia emissziót 340 nm-es interferencia szűrő alkalmazásával mértük. Az Arrhenius ábrázolás leírását ld. III.4.7 fejezetben.

Az aktivációs energia a  $Ca^{2+}$ -al telített fehérjében 4.8 kcal/mol, míg a frekvencia faktor  $5.9 \times 10^{11} s^{-1}$ . Ugyanezen paramétereket a kationt nem tartalmazó rendszerben 7.1 kcal/mol-nak, ill.  $223.0 \times 10^{11} s^{-1}$ -nak számoltuk (VI. táblázat). A  $Ca^{2+}$  kötődésével a

VI. táblázat: A triptofán fluoreszcencia élettartam adataiból számolt Arrhenius paraméterek.

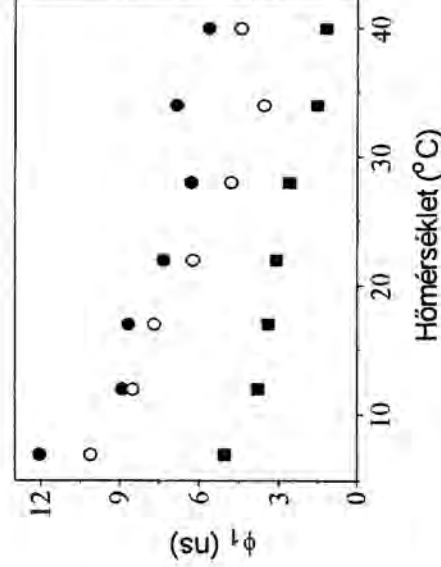
	Frekvencia faktor (A) ( $10^{11} s^{-1}$ )	Aktivációs energia ( $E^*$ ) (kcal/mol)	Hőmérséklet fgtl. seb. áll. ( $k_0$ ) ( $10^9 s^{-1}$ )
$Ca^{2+}$ -troponin C	$5.9 \pm 2.9$	$4.8 \pm 0.3$	$0.17 \pm 0.012$
Kationmentes troponin C	$223.0 \pm 171.0$	$7.1 \pm 0.5$	$0.13 \pm 0.008$

hőmérséklet független sebességi állandó értéke kissé megnő (VI. táblázat). Látható, hogy a kation kötődésével elsősorban a frekvencia faktor értékében következik be jelentős változás. A frekvencia faktor a fehérje  $Ca^{2+}$ -ot kötő állapotában egy nagyságrenddel kisebb, mint a



kationmentes állapotban, míg az aktivációs energiák és a hőmérséklet független kioltási folyamatok jellemzésére szolgáló állandók értéke ugyanabba a nagyságrendbe esik.

A frekvencia faktor  $Ca^{2+}$  hatására történő lecsökkenése arra utal, hogy a triptofán környezetében található, a fluoreszcencia paraméterekre hatással bíró funkciós csoportok közül a fluorofór kevesebbet lép kapcsolatba a fluoreszcencia élettartam alatt. Ez alátámasztja a fluoreszcencia élettartam eloszlások féltértszélességének vizsgálata során levont következtetésünket, mely szerint a kationnal telített troponin C-ben a triptofán körüli fehérje-mátrix merevebbé válik. A troponin C-ben a C-terminális alegység dinamikáját, és a szerkezetében a kationok hatására beálló változásokat a fluoreszcencia anizotrópia lecsengésének mérésével is vizsgáltuk. A troponin C mutáns triptofánjának anizotrópia lecsengését az élettartam mérésekhez hasonlóan a 7 és 40 °C közé eső hőmérséklettartományon mértük.



18. ábra: A triptofán hosszabb rotációs korrelációs ideje ( $\phi_1$ ) Ca- (●), Mg- (○), ill. kationmentes troponin C-ben (■). Az anizotrópia lecsengés mérése során a triptofánt 295 nm-en gerjesztettük, míg a fluoreszcencia emissziót 340 nm-es interferencia szűrőn keresztül mértük. Mind a gerjesztési, mind az emissziós fényűtban Glenn-Thompson típusú polarizátort alkalmaztunk.

Az analízis során a lecsengés jól leírható két exponenciális komponens összegeként (VII. táblázat). (Két komponensre az analízis jó  $\chi^2$  értéket eredményezett, míg egyetlen exponenciális komponens feltételezve az analízis jósága csak a 30 °C feletti tartományon volt elfogadható. Amennyiben további komponenseket tételeztünk fel (pl. három komponens összegeként írjuk le az anizotrópia lecsengést), az illesztés nem javult tovább.) Az anizotrópia mérések során a hosszú rotációs korrelációs idő csökkenő tendenciát követ a hőmérséklet emelkedésével, függetlenül a troponin C kötőhelyeinek kationtartalmától, ami a fehérje diffúzió kontrollált forgómozgásának magasabb hőmérsékleteken bekövetkező felgyorsulására utal (18. ábra). Ugyanakkor a lecsengést leíró paraméterek értékei a kationok kötődésének hatására megváltoznak. A  $Ca^{2+}$ -al való telítés eredményeként megkö-

VII. táblázat: A troponin C vtipofánjának anizotrópia lecsengését jellemző paraméterek.

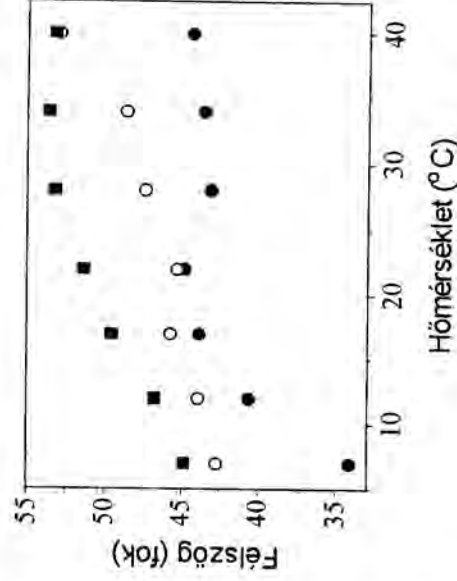
		Ca-troponin C						Mg-troponin C						Kationmentes troponin C		
t	$\varphi_1$	$\varphi_2$	$r_1$	$r_2$	$\chi^2$	$\varphi_1$	$\varphi_2$	$r_1$	$r_2$	$\chi^2$	$\varphi_1$	$\varphi_2$	$r_1$	$r_2$	$\chi^2$	
[°C]	[ns]	[ns]				[ns]	[ns]				[ns]	[ns]				
7.1	11.6	0.24	0.09	0.07	3.2	9.48	0.07	0.14	0.21	5.4	4.01	0.10	0.10	0.12	0.20	7.7
12.0	7.15	0.14	0.09	0.11	6.6	6.78	0.07	0.13	0.22	8.0	3.44	0.12	0.10	0.22	4.4	4.4
17.2	8.71	0.09	0.09	0.15	6.6	6.55	0.07	0.12	0.23	2.1	2.85	0.12	0.09	0.23	5.2	5.2
22.6	7.29	0.13	0.08	0.11	3.2	5.18	0.08	0.11	0.21	9.5	2.39	0.31	0.08	0.10	4.3	4.3
28.3	5.97	0.05	0.10	0.22	4.8	4.39	0.13	0.10	0.15	2.1	1.69	0.11	0.08	0.21	6.6	6.6
34.1	6.32	0.41	0.07	0.07	3.0	2.96	0.08	0.09	0.23	7.2	1.52	0.10	0.07	0.25	12.2	12.2
40.1	4.95	0.41	0.06	0.07	3.1	3.88	0.12	0.06	0.26	5.7	1.37	0.14	0.05	0.21	16.0	16.0

A mérési eredményeket két exponenciális komponens feltételezésével illesztettük.  $\varphi_1$  és  $r_1$  az anizotrópia lecsengés eredményeinek analízise során számolt rotációs korrelációs idők, ill. ezek relatív amplitúdóját jelöli, míg  $\chi^2$  az illesztés jóságát jellemző paraméter.

zélítőleg kétszeresére nő a hosszú rotációs korrelációs idő értéke a kationmentes fehérjében mérthez képest (18. ábra). A  $Mg^{2+}$  hatása ez esetben is hasonló a  $Ca^{2+}$  hatásához, de a hosszú rotációs korrelációs idő relatív megváltozása kisebb a fehérje  $Mg^{2+}$ -ot kötő formájában (18. ábra). A triptofán mozgását a rövidebb rotációs korrelációs idő írja le. Ez a mozgás sokkal gyorsabb, mint a teljes fehérje mozgása (VII. táblázat). Feltételezve, hogy a triptofán egy kúpon belül mozoghat, a III.4.3 fejezetben ismertetett módon számolható az ezen kúp jellemzésére szolgáló félszög ( $\Theta$ ) értéke. Ez a félszög a kationok kötődésének hatására lecsökken (19. ábra), ami arra utal, hogy a fehérje ezen állapotában a triptofán számára a környezet kisebb mozgásteret biztosít. Ez összhangban van a troponin C ezen szegmensének konformációs állapotát illetően fentebb levont következtetésekkel.

Összegezve eredményeinket megállapítható, hogy mind a  $Ca^{2+}$ , mind a  $Mg^{2+}$  bekötődésének hatására a troponin C H-hélixében elhelyezkedő triptofán környezete merevebbé válik a kationmentes fehérjéhez képest, és ezzel egyidejűleg a fluorofór rendelkezésére álló tértartomány leszűkül. Ugyanakkor a  $Ca^{2+}$ -troponin C-ben ezen fehérjetartomány merevebb, mint a  $Mg^{2+}$ -troponin C-ben. Ezen eredmények összefüggésbe hozhatók a troponin C biológiai funkciójával.

A nyugalmában lévő sejtben a troponin C N-terminális alegységében lévő  $Ca^{2+}$ -specifikus kationkötő helyek ( I, II ) nem kötnek kationt, ugyanakkor a C-terminális kation kötő helyei ( III, IV )  $Mg^{2+}$ -al vannak telítve. A  $Ca^{2+}$  szint megnövekedését a troponin komplexen belül a troponin C érzékeli. A  $Mg^{2+}$  jelenlétében üres N-terminális kötőhelyek ekkor  $Ca^{2+}$ -ot kötnek, és ezzel egyidőben a  $Mg^{2+}$  a C-terminális kötőhelyeken is



19. ábra: A triptofán mozgását jellemző kúp félszöge ( $\Theta$ ) a hőmérséklet függvényében Ca- (●), Mg- (○), ill. kationmentes (■) troponin C-ben. Az anizotrópia lecsengés mérése során a triptofánt 295 nm-en gerjesztettük, míg a fluoreszcencia emissziót 340 nm-es interferencia szűrőn keresztül mértük. Mind a gerjesztési, mind az emissziós fényűben Glenn-Thompson típusú polarizátort alkalmaztunk.

lecserélődhet  $Ca^{2+}$ -ra. A troponin C szerkezetében beálló változások tehát kapcsolhatók akár a C, akár az N terminális által kötött kation minőségének a megváltozásához. A méréseink során alkalmazott ionkoncentrációk mellett mind a kettő létrejött. Eredményeink alapján megállapítható, hogy ezek együttes hatására a troponin C C-terminális alegységének a szerkezete merevebbé válik a  $Mg^{2+}$ - $Ca^{2+}$  csere hatására.

A troponin C és troponin I kapcsolat meghatározó szerepet tölt be a  $Ca^{2+}$  szignál továbbításában [Cheung és mtsai., 1987]. Korábbi tanulmányok során bizonyossá vált, hogy a troponin I (szintetizált) inhibitor szegmense (residue 104-115) képes kölcsönhatásba lépni mind a troponin C-vel [Cachia és mtsai., 1983], mind a tropomiozin-aktin komplexszel [Talbot és Hodges, 1981]. Kimutatták azt is, hogy a Cys-98, mely a troponin C-n belül a C-terminális közelében helyezkedik el közvetlen kölcsönhatást létesít a troponin I inhibitor régiójával [Leszyk és mtsai., 1987], azaz a troponin C-troponin I kapcsolat kialakulásában a troponin C C-terminális alegysége részt vesz. A tropomiozin-aktin komplex és a troponin C versenyez a troponin I inhibitor szegmenséért. A troponin I inhibitor peptide  $Mg^{2+}$  jelenlétében mind az aktin-tropomiozin komplexhez, mind a troponin C-hez kötődik, de a két kapcsolat közül ekkor  $(Mg^{2+}$  jelenlétében) a tropomiozin-aktin kapcsolat dominál, szemben a troponin C-hez való kapcsolódással. Ennek megfelelően az aktin-tropomiozin-troponin I komplexben a térbeli elrendeződés olyan, hogy a miozin nem fér hozzá az aktinon lévő kapcsolódási helyeihez, azaz az izom-összehúzódás nem jöhet létre. A  $Ca^{2+}$  szint megnövekedésével a troponin I-troponin C kapcsolat válik meghatározóvá. A troponin I-troponin C kapcsolat stabilizálódása a  $Ca^{2+}$  kötődésével a két fehérje konformációjának megváltozásával hozható összefüggésbe. A  $Ca^{2+}$  által történő izom-aktiválódás folyamata ennek megfelelően kapcsolható a troponin C dinamikájának a megváltozásához, és ez a változás valószínűleg szükséges a troponin C-troponin I kapcsolat stabilizálása szempontjából, és így fontos szerepet játszik a  $Ca^{2+}$  szignál terjedésében.

Az általunk a C-terminális alegység dinamikai tulajdonságaiban kimutatott különbség a troponin C  $Ca^{2+}$ -al, ill.  $Mg^{2+}$ -al telített formája között tehát ennek a dinamikai változásnak a tükröződése lehet. A  $Ca^{2+}$  jelenlétében merevebb szerkezet a C-terminális alegységen belül hozzáférhető a troponin I inhibitor szegmensének erősebb kötéséhez, ami a fentiek alapján meghatározó jelentőségű a troponin komplexen belül létrejövő konformációs módosulások kialakulásában. A  $Ca^{2+}$  jelenlétében megfigyelhető stabilabb troponin I-troponin C kötődéssel az aktin-tropomiozin komplex kötődése a troponin I inhibitor szegmenséhez

elveszti dominanciáját. Ennek megfelelően az aktin-tropomiozin rendszeren belül is létrejön egy konformációs változás, melynek hatására a miozin kapcsolódási helyei az aktin filamentumon hozzáférhetővé válnak a miozin számára, kialakulhat az aktin-miozin kölcsönhatás, és így létrejöhet az izom-összehúzódás folyamata.

#### *IV.3 A környezeti paraméterek hatása a triptofán fluoreszcencia paramétereire peptidekben*

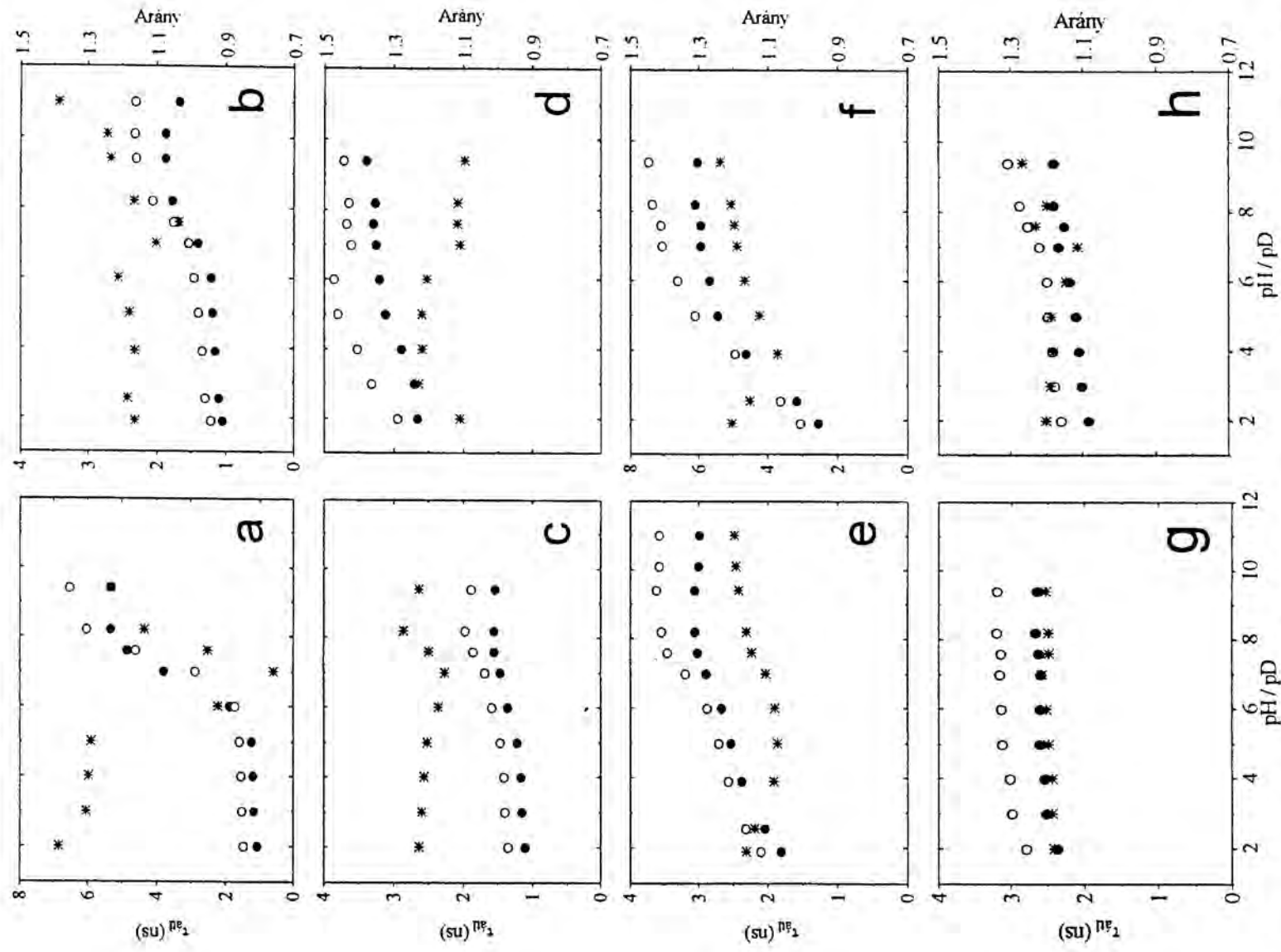
Vizsgálataink során az oldat proton(deuteron)-koncentrációjának, ill. a fluoroför környezetében lévő funkcionális csoportoknak a triptofán fluoreszcencia tulajdonságainak megváltozásában betöltött szerepét tanulmányoztuk. A triptofán fluoreszcencia élettartamát és kvantumhatásfokát mértük különböző pH-jú vizes, ill. különböző pD-jű deuteron pufferekben, alkalmanként a hőmérséklet változtatásával. Minden esetben egyetlen triptofánt tartalmazó peptideket vizsgáltunk. A peptidek kiválasztásánál a következő szempontot tartottuk szemelőtt: viszonylag rövid (5-15 aminosav) peptideket vizsgáltunk, hogy a másodlagos szerkezet kialakulásának valószínűségét a minimumra csökkentjük. Ilyen peptidekben a triptofán és a feltételezeten fluoreszcencia kioltást okozó oldalláncok (pl. szulfidok) ütközéses kioltást eredményező kölcsönhatásának valószínűsége minimális. Ennek megfelelően a dinamikus kioltás valószínűleg vagy a peptiden belüli kötéseken keresztül, vagy az oldat molekuláinak a részéről jön létre. A peptidek felhasználásával kihasználtuk a fehérjéknél jóval egyszerűbb, de azokat sok szempontból jól modellező szerkezet előnyeit. A triptofán az egyes peptidekben a terminálisoktól különböző távolságban helyezkedett el, így lehetőségünk volt következtetéseket levonni ezen funkciós csoportok hatását illetően is.

A triptofán fluoreszcenciájának időfüggése minden peptid esetében jól leírható volt két, ill. három exponenciális komponens feltételezve. Egy exponenciális komponens feltételezése minden esetben nagyobb redukált  $\chi^2$  értékeket eredményezett. Azokban az esetekben, ahol a mért adatokra három komponens felhasználásával is pontosan tudunk illeszteni, a harmadik élettartam komponens értéke 0 ns volt. Ez arra utal, hogy a harmadik komponensnek a megjelenése magyarázható fényszórással. Ugyanakkor ugyanazon mérést

analizálva két, ill. három komponens feltételezésével, az így kapott átlagos fluoreszcencia élettartamokban talált különbség nem volt nagyobb 2%-nál.

A triptofán vizsgált fluoreszcencia paraméterei érzékenyek voltak a puffer izotóp tartalmára (proton vagy deuteron), a pH / pD változásaira, a hőmérsékletre és a funkcionális csoportoktól mért távolságra. Hosszabb fluoreszcencia élettartamokat mértünk a deuteron-pufferben, mint vizes oldatokban (20. ábra). Ezeket a megfigyeléseket a kvantumhatásfok vizsgálata során kapott eredmények is alátámasztják, amennyiben ezen paraméter az átlagos fluoreszcencia élettartammal párhuzamosan változott (az adatok nincsenek feltüntetve). A fluoreszcencia élettartam és kvantumhatásfok hányadosaként számolható ún. radiatív sebességi állandó,  $k_r$ , (ld. III.4.3) független volt az oldat izotóp tartalmától és a pH / pD aktuális értékétől. Tendenciáját tekintve az átlagos fluoreszcencia élettartam a magasabb pH / pD tartományokban hosszabb. A Nectophibrin Hexapeptide, Dynorphin A és LHRH esetében, ahol a triptofán az N-terminális mellett, attól egy, ill. két kötés távolságban helyezkedett el (ld. III.3), az átlagos fluoreszcencia élettartam domináns megváltozása a pH / pD 6.0-8.0 értékek közé esett (20.a,b,c, ábra). Hasonló változás az ECTH és ACTH esetében (mely peptidok a triptofánt a C- terminálison, ill. attól egy kötés távolságban tartalmazzák) a pH / pD 4.0-5.0 értékek között jelentkezett (20.e,f.ábra). A GAPDH esetében, ahol a triptofán három kötésre található a C-terminálistól, csak viszonylag kis változás mutatkozott a fluoreszcencia paraméterekben (pH 5.0 alatt) az oldat pH / pD értékének változása hatására (20.d ábra). Az eltérések az N-, ill. C-terminális közelében triptofánt tartalmazó peptidok között magyarázhatók a különböző terminálisok ún. "pK" értékében meglévő különbségekkel. Míg az N-terminális pK-ja általában a 6.5-9.5 tartományba esik, addig a C-terminálisra vonatkozóan ezek az értékek a pH skála savas tartományában, a 2.0 és 5.0 értékek között találhatóak [Chang és mtsai., 1983; McMahon és mtsai., 1992]. Mivel a triptofán fluoreszcencia paraméterei függenek a környezetében lévő funkcionális csoportok protontartalmától (ld. később), a pK értékek és így az adott pH / pD-n a protonáltság eltérései megmutatkoznak mind a fluoreszcencia élettartam, mind a kvantumhatásfok értékeiben.

A fluoreszcencia élettartam és a kvantumhatásfok vizsgálata azt mutatja, hogy a pH / pD skála a vizsgált tartományokon belül két egymástól jól elkülönülő részre bontható. A két részt a domináns funkcionális csoport pK értéke választja el. A következőkben a két



20. ábra: A triptofán átlagos fluoreszcencia élettartama (baloldali tengelyek)  $H_2O$  (●), ill.  $D_2O$  (○) alapú pufferekben a pH / pD függvényében. A fluoreszcencia élettartamok hányadosát (\*) ugyancsak feltüntetjük az ábrákon (jobboldali tengelyek). A vizsgált peptidek: a.) neotofibrin hexapeptid; b.) dynorphin A; c.) LH-RH; d.) GAPDH; e.) ACTH 4-10; f.) ECTH; g.) somatostatin; h.) bombesin.

rész közül az alacsonyabb pH / pD értékekkel jellemezhető tartományt mint "alsó", míg a másik tartomány mint "felső" tartományt fogjuk említeni. Az alsó tartományban minden peptid esetében azt tapasztaltuk, hogy a triptofán fluoreszcencia élettartamát csökkentő kioltó mechanizmus(ok) hatása erősebb, amennyiben a mért fluoreszcencia élettartamok rövidebbek. Ezen fluoreszcencia paraméterek relatív változása nagyobb, ha a domináns funkcionális csoport az N-terminális, mint ha ez a csoport a C-terminális (20. ábra). Még azon triptofán molekula fluoreszcencia paraméterein is mérhető az N-terminális csoport hatása, mely a C-terminális közvetlen közelében helyezkedik el, vagy maga a triptofán ez a C-terminális csoport. Ez arra utal, hogy az N-terminális által gyakorolt intramolekuláris kioltás hatásosabb.

A fluorofór élettartama akkor a leghosszabb a funkcionális csoporttól való távolságfüggést vizsgálva, ha a triptofán a terminális csoport (20. a, f ábra). Ebben az esetben a funkcionális csoport (amino terminális) által gyakorolt "védő" hatás a kioltási folyamatokkal szemben a legerősebb. A protonált amino terminális feltehetőleg a proton / deuteron asszociált (ld. később) elektroncsere, mint az egyik fő kioltási mechanizmus, sebességi állandóját csökkenti.

Itt meg kell említenünk, hogy a peptid-peptid kölcsönhatások során esetlegesen kialakulható ütközékes fluoreszcencia kioltás szerepe két ok miatt elhanyagolható: 1., a peptid koncentráció alacsony ( $10 \mu\text{M}$ ), 2., a triptofán fluoreszcencia élettartama nincs korrelációban sem a peptid méretével, sem annak töltéseloszlásával.

Az izotóp-effektusnak, azaz a proton-deuteron csere hatásának a mérésére általánosan elfogadott paraméter a két oldatban mérhető fluoreszcencia intenzitások, ill. élettartamok aránya. Az élettartamok hányadosa a pH / pD függvényében ábrázolva a peptidekben lévő triptofánok esetében fordított harang-görbe grafikont eredményez, amennyiben a fluorofór valamelyik terminális csoport (C, N) hatása alatt áll (20. ábra). A görbe minimumhelye az adott terminális csoport pK értékénél van. A görbe függőleges kiterjedése, azaz a hányados relatív megváltozása nagyobb ha a triptofán közelebb helyezkedik el az adott funkcionális csoporthoz (20. ábra). A jelenség létrejöttében két effektus játszik döntő szerepet: 1., a fluoreszcencia élettartam hosszabb, ha a fluorofór  $\text{D}_2\text{O}$ -ban van, ami feltehetőleg a viszkozitások különbségével magyarázható (a domináns kioltó folyamatok diffúzió kontrol-



VIII. táblázat: A triptofán átlagos fluoreszcencia élettartama különböző peptidekben a hőmérséklet és a pH / pD függvényében.

t (°C)	Nectofibrin Hexapeptide			Dynorphin A		Adrenocorticotropic Hormone				
	pH3.0	pD3.0	pH9.4	pD9.4	pH7.45	pD7.45	pH2.55	pD2.55	pH9.4	pD9.4
Átlagos fluoreszcencia élettartam (ns)										
5.3					2.35	2.46	3.00	3.42	4.44	5.06
6.5			7.00	7.80						
7.3	1.79	2.21								
8.0										
10.1					2.08	2.14				
10.5			6.59	7.43						
12.0	1.58	1.97								
14.0					1.92	1.95	2.56	2.92	3.80	4.33
15.2			6.01	7.05						
19.4	1.22	1.61	5.56	6.66						
19.6							2.16	2.48	3.28	3.82
22.0					1.55	1.63	2.03	2.31	3.05	3.6
26.2	0.98	1.30	4.74	6.01			1.80	2.09	2.75	3.23
31.2					1.28	1.38				
32.0	0.82	1.10	4.07	5.36			1.54	1.74	2.32	2.77
36.2							1.36	1.58	2.06	2.52
36.5					1.18	1.35				
37.9			3.41	4.79						
40.3	0.66	0.89								
42.4							1.16	1.33	1.75	2.12
43.7					1.04	1.14				
44.8			2.72	4.09						
47.5		2.02								
48.5					0.96	1.07				
51.1							0.88	1.07	1.34	1.73
52.9			2.02	3.23						
54.0					0.87	0.98				
64.0					0.68	0.86				

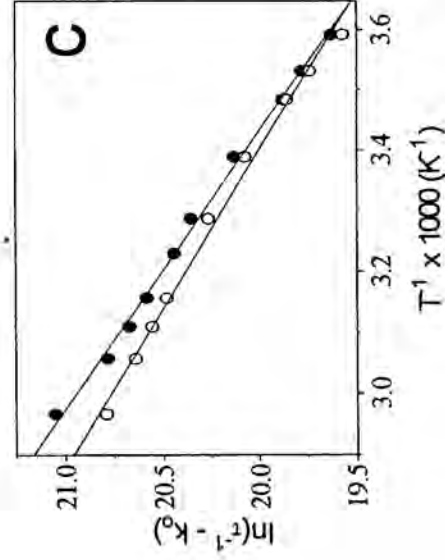
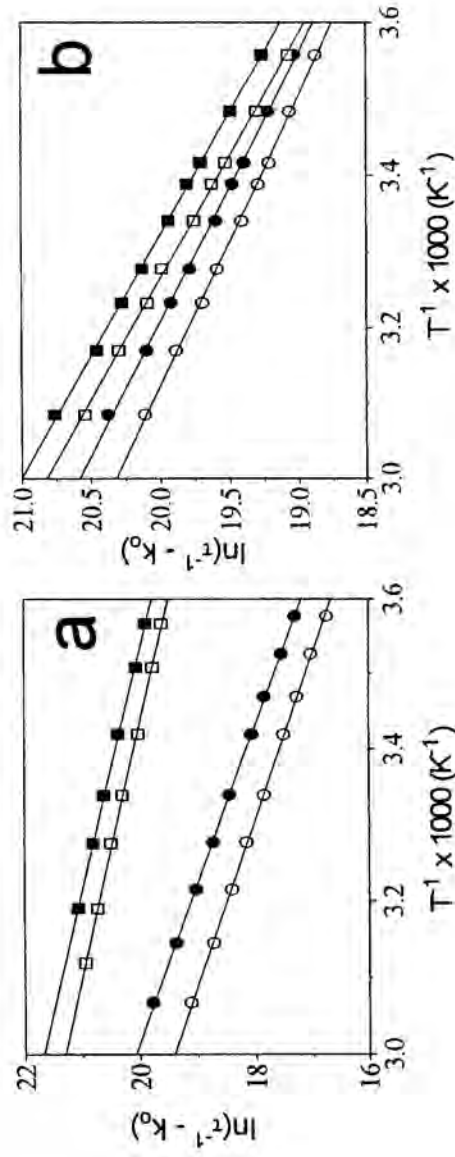
láltak (ld. később); 2., a peptidok pK értéke D<sub>2</sub>O-ban nagyobb, mint H<sub>2</sub>O-ban [Lehrer, 1970; McMahon és mtsai., 1992; Chang és mtsai., 1983].

A terminálisok hatására vonatkozó elképzeléseinket alátámasztandó megvizsgáltunk két olyan peptidet is, melyekben a triptofán az eddig tárgyalt peptidokhoz képest távol helyezkedik el a terminálisoktól. A bombesin és a somatostatin viszonylag hosszú peptid (14 aminosav). A triptofán fluoreszcencia élettartama sem a bombesinben, sem a somatostatinban nem változott meg jelentősen a puffer pH / pD értékének megváltozása hatására (20.g, h ábra). A Bombesin esetében a fent említett minimum az élettartamok hányadosának ( $\tau_D / \tau_H$ ) ábrázolásakor megfigyelhető (pH 7.0) (20.h ábra). Ennek a minimumnak a létezését valószínűleg a hosszú és flexibilis szerkezettel magyarázhatjuk, amely lehetővé teszi, hogy egyes konformációkban az N-terminális a fluorofór közelébe kerüljön, és annak fluoreszcencia élettartamát ütközéses kioltási mechanizmus során lecsökkentse. A somatostatin esetében a hányadosok ábrázolásakor nem találunk a fentiekben leírt minimumot (20.g ábra). A minimum hiánya jól értelmezhető figyelembe véve, hogy ez a peptid is a többenél hosszabb láncot képez, és a triptofán a szerkezetet tekintve távol helyezkedik el a functionális csoportoktól. A Bombesin esetében említett ütközéses kioltás a Somatostatinban a gyűrű alakú szerkezet miatt nem jön létre.

A nem-radiatív folyamatok leírása érdeklében vizsgáltuk a fluoreszcencia paraméterek hőmérsékletfüggését is. Ezen méréseket a triptofánon a Nectofibrin Hexapeptide-ban, Dynorphin A-ban és ACTH-ban végeztük el az 5 és 60 °C közé eső hőmérséklet-tartományon különböző pH / pD értékeken (VIII. táblázat). Az átlagos fluoreszcencia élettartamokat ábrázolva a T /  $\eta$  függvényében (ahol T az abszolút hőmérséklet,  $\eta$  az oldat viszkozitása) egyeneseket kaptunk (az adatokat nem tüntettük fel), ami arra utal, hogy a domináns kioltó folyamat(ok) diffúzió kontrollált(ak) [Frank és Vavilov, 1931; Förster, 1951].

A triptofán átlagos fluoreszcencia élettartamának Arrhenius ábrázolása (ld. III.4.7) ugyancsak egyeneseket eredményezett minden vizsgált peptid esetében (21.a, b, c ábra). Az egyenesek illesztése során a hőmérséklet-független sebességi állandó ( $k_0$ ) független paraméter volt. Ezen egyenesek meredekségéből az aktivációs energia ( $E^*$ ), tengelymetszetéből a frekvencia faktor számolható ( $A$ ). Ezen termodinamikai paraméterek

a jelenlévő kioltó folyamatok összességét, szuperpozícióját jellemzik, nem az egyes folyamatokat külön-külön, ami az adatok kiértékelésénél nehézségeket okozhat.



21. ábra: A fluoreszcencia élettartam adatok Arrhenius-ábrázolása a következő peptidekben és pH / pD értékeken: a.) nectofinrin hexapeptide pH / pD 3.0 (■, □) és pH / pD 9.4 (●, ○); b.) ACTH 4-10 pH / pD 2.55 (■, □) és pH / pD 9.4 (●, ○); valamint c.) dynorphin A pH / pD 7.45 (●, ○). A mérés során a triptofánt 295 nm-en gerjesztettük, míg az emissziót 340 nm-es interferencia szűrő (FWHM = 20nm) alkalmazásával mértük.

A frekvencia faktor  $2.0 \times 10^{11}$  és  $9.2 \times 10^{14} \text{ s}^{-1}$  értékek, míg az aktivációs energia 3.36 és 9.52 kcal / mol értékek közé esik (IX. táblázat), ami valószínűsíti, hogy a domináns kioltó folyamatokban meghatározó szerepet játszanak a proton / deutron-asszociált folyamatok.

A puffer izotóp tartalmának és az Arrhenius paramétereknek az összefüggéseit vizsgálva megállapítható, hogy az aktivációs energia, valamint a hőmérséklet-független állandó csak elhanyagolható mértékben módosul az izotópcserre hatására (IX. táblázat). Ugyanakkor a D<sub>2</sub>O-ban a frekvencia faktor értéke minden peptidben és pH / pD érteken kisebb, mint H<sub>2</sub>O-ban (IX. táblázat). A fluoreszcencia élettartamok vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a deutron alapú pufferekben ezen paraméter értéke minden esetben hosszabbnak bizonyult. Az Arrhenius paraméterek ismeretében ez a különbség elsősorban a frekvencia faktorokban

mutatózó eltéréseknek tulajdonítható, ami alátámasztja azt a korábbi következtetésünket, hogy a vizskozitásban megmutatózó különbségek meghatározó szerepet játszanak a fluoreszcencia paraméterek alakulásában.

IX. táblázat: az Arrhenius paraméterek különböző peptidekben.

Peptid	pH / pD	Frekvencia faktor (A) ( $10^{11} \cdot s^{-1}$ )	Aktivációs energia (E) (kcal / mol)	Hőmérséklet fgtl. állandó ( $k_0$ ) ( $10^{-9} \cdot s^{-1}$ )
ACTH	pH 2.5	153	6.19	0.10
ACTH	pD 2.5	124	6.17	0.10
ACTH	pH 9.4	40	5.59	0.04
ACTH	pD 9.4	17	5.18	0.04
Dynorphin A	pH 7.4	4	3.85	0.10
Dynorphin A	pD 7.4	2	3.36	0.10
Nectofibrin H.	pH 3.0	340	6.27	0.11
Nectofibrin H.	pD 3.0	138	5.93	0.11
Nectofibrin H.	pH 9.4	9178	9.52	0.13
Nectofibrin H.	pD 9.4	2600	9.12	0.13

Az ACTH esetében a pH / pD 2.5 értékekhez tartozó frekvencia faktor és hőmérséklet független állandó értékek nagyobbak mint a pH / pD 9.4-en mérték, míg az aktivációs energia megközelítőleg ugyanolyan értékeket vesz fel a két pH / pD -n (IX. táblázat). Mind a frekvencia faktor, mind a hőmérséklet független sebességi állandó növekedése a fluoreszcencia élettartam csökkenését segíti elő. Ezen adatok ismeretében tehát megállapítható, hogy az ACTH-ban a pH / pD 9.4-n mért hosszabb triptofán fluoreszcencia élettartamok a két paraméter együttes hatásának megváltozása miatt alakulnak ki. A frekvencia faktor megnövekedése valószínűleg a C-terminális csoport de-protonálódásának és ennek megfelelően a terminális által gyakorolt kioltó folyamatokkal szembeni védő hatás megszűnésének az eredménye.

A nectofibrin hexapeptide esetében a frekvencia faktor a magasabb pH / pD értéken nagyobb. Ez látszólag ellentmondásban van azzal, hogy a fluoreszcencia élettartam ezeken a magasabb pH / pD értékeken hosszabb. A hőmérséklet független sebességi állandó értéke csak kis mértékben változik meg a puffer izotóp tartalmában bekövetkező változás hatására (IX. táblázat). Ugyanakkor az aktivációs energia pH / pD 9.4-en megközelítőleg 50 %-al nagyobb mint pH / pD 3.0-n (IX. táblázat). A fluoreszcencia élettartam adatok ismeretében

az látszik valószínűnek, hogy a pH / pD megváltozása során az élettartam értékét meghatározó paraméterek változása közül az aktivációs energia megnövekedése játsza a domináns szerepet. Az aktivációs energia megnövekedése a magasabb pH / pD értékeken valószínűleg az N-terminális protonálódásával magyarázható. A protonálódással egyidejűleg a terminális által a kioltó folyamatokat gátló védő hatás felerősödik, ami az aktivációs energia megnövekedésében nyilvánul meg.

Méréseink alapján igazolódott, hogy az általunk vizsgált peptidekben a triptofán fluoreszcencia élettartamát csökkentő kioltó folyamatokban az oldat molekuláinak és a peptid funkcionális csoportjainak meghatározó szerepe van. A kioltási folyamatok diffúzió kontrolláltak, és proton / deuteron asszociáltak. A fluoreszcencia élettartam aktuális értéke szoros összefüggésben áll a triptofánnak a terminálisoktól való távolságával. Ezen terminális csoportok protonált állapotukban csökkentik az oldat által kifejtett kioltás hatásfokát. Ez a "védelem" az N-terminális környezetében erősebb, mint a C-terminális közelében, ami az N-terminális de-protonálódása után bekövetkező nagyobb élettartam csökkenésben mutatkozik meg. Tekintve, hogy a peptidek bizonyos szempontból jól modellezik a fehérjéket, eredményeink a triptofán fehérjékben mért fluoreszcencia élettartamát illetően is érdekesek lehetnek. Ugyanakkor nem szabad elfelejteni, hogy a fehérjékben, különösen ha az adott fluorofór a fehérje belsejében helyezkedik el, a fehérje egyes szegmenseinek a szerepe a kioltás folyamatában jelentősen megnőhet. Ezért az itt részletezett elképzelések a fluorofór és környezete viszonyát illetően nem alkalmazhatók megszorítások nélkül a fehérjékben található fluorofórokra.

## V. Az értekezés témakörébe tartozó saját közlemények

Hild, G., Nyitrai, M., Gharavi, R., Belágyi, J. and Somogyi, B., (1996), Fluorescence Quenching of the Tryptophan Emission from the F- and G-forms of Actin, *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, **35**, 175-179.

Nyitrai, M., G. Hild, J. Belágyi and B. Somogyi, (1997), Spectroscopic Study of Conformational Changes in Subdomain I of G-Actin: Influence of Divalent Cations. *Biophys. J., megjelenés alatt.*

Nyitrai, M., Kirk, W. R., Wessels, W. S., Jakubowski, H., Somogyi, B. and Prendergast, F. G., Environmental Factors in the Fluorescence Decay of Single Tryptophan-Peptides: Dynamical Quenching by Electron Transfer. *Előkészületben.*

Nyitrai, M., Lakos, Zs., Somogyi, B. and Prendergast, F. G., Cation-Dependence of Structural Dynamics of Mutant Chicken Troponin C: Fluorescence Lifetime and Anisotropy Decay of the Single Tryptophan Residue. *Előkészületben.*

Nyitrai, M., Hild, G., Lakos, Zs. And Somogyi, B., The Effect of  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$  Exchange on the Flexibility and / or Conformation of the Small Domain in Monomeric Actin. *Előkészületben.*

## VI. A hivatkozott irodalom

- Alcala, J. R., E. Gratton és F. G. Prendergast, 1987a, *Biophys. J.*, **51**, 587-596.
- Alcala, J. R., E. Gratton és F. G. Prendergast, 1987b, *Biophys. J.*, **51**, 597-604.
- Alcala, J. R., E. Gratton és F. G. Prendergast, 1987c, *Biophys. J.*, **51**, 925-936.
- Allen, T. StC., L. D. Yates és A. M. Gordon, 1992, *Biophys. J.* **61**, 399-409.
- Asakura, S., M. Taniguchi and F. Oosawa, 1963, *J. Mol. Biol.*, **7**, 55-69.
- Bajzer, Z. és Prendergast, F.G., 1993, *Biophys. J.*, **65**, 2313-2323.
- Beechem, J.M. és Brand, L., 1985, *Annu. Rev. Biochem.*, **54**, 43-71.
- Beechem, J.M. és L., Brand, 1985, *Annu. Rev. Biochem.*, **54**, 43-71.
- Belford, G. G., R. L. Belford és G. Weber, 1972, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **69**, 1392-1393.
- Bernhardt, R., N. T. Ngoc Dao, H. Stiel, W. Schwarze, J. Friedrich, G.-R. Janig és K. Bismuto, E., E. Gratton és G. irace, 1988, *Biochemistry*, **27**, 2132-2136.
- Blechner, S.L., A.G. Olah, N.C.J. Strynadka, R.S. Hodges és J Trehwella, 1992, *Biochemistry*, **31**, 11326-11334.
- Boens, N., Janssen, L.D., DeSchryver, F.C., 1989, *Biophys. Chem.*, **33**, 77-90.
- Boens, N., L.D. Janssen és F.C. DeSchryver, 1989, *Biophys. Chem.*, **33**, 77-90.
- Burtnick, L. D., 1984, *Biochim. Biophys. Acta.*, **791**, 57-62.
- Cachia, P.J., B.D. Sykes és R.S. Hodges, 1983, *Biochemistry*, **22**, 4145-4152.
- Carlier, M.F., D. Pantaloni és E. D. Korn, 1986, *J. Biol. Chem.*, **261**, 10778-10784.
- Carlier, M.F., D. Pantaloni és E.D. Korn, 1987, *J. Biol. Chem.*, **262**, 3052-3059.
- Carlier, M. F., 1990, *Adv. Biophys.*, **26**, 51-73.
- Chandra, M., W.D. McCubbin, K. Oikawa, C.M. Kay és L.B. Smillie, 1994, *Biochemistry*, **33**, 2961-2969.
- Chang, M.C., Petrich, J.W. McDonald, D.B. és Fleming, G.R., 1983, *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 3819-3824.
- Cheung, H. C., C. K. Wang, I. Gryczynski, W. Wiczek, G. Laczko, M. L. Johnson és J. R. Lakowicz, 1991, *Biochemistry*, **30**, 5238-5247.
- Cheung, H.C., C.-K. Wang és N.A. Malik, 1987, *Biochemistry*, **26**, 5904-5907.
- Collins, J.H., J.L. Theibert, J.-M. Francois, C.C. Ashley és J.D. Potter, 1991, *Biochemistry*, **30**, 702-707.

- Collins, J.H., M.L. Greaser, J.D. Potter és M.J. Horn, 1977, *J. Biol. Chem.*, **252**, 6356-6362.
- Colucci, W.J., Tilstra, L., Satter, M.C., Fronczek, F.R. és Barkley, M.D., 1990, *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 9182-9190.
- Creed, D., 1984, *Photochem. Photobiol.*, **39**, 537-562.
- Demaille, J., E. Dutruge, E. Eisenberg, J.-P. Capony és J.-F. Pechere, 1974, *FEBS Lett.*, **42**, 173-178.
- Demmer, D. R., D.R. James, R.P. Steer and R.E Verrall, 1987, *J. Photochem. Photobiol.* **45**, 39-48.
- Donzel, B., Gauduchon, P., Wahl, Ph., 1974, *J. Am Chem. Soc.*, **96**, 801-808.
- Eftink, M. R. és C. A. Ghiron, 1976, *J. Phys. Chem.*, **80**, 486-493.
- El-Saleh, S., K. D. Warber és J. D. Potter, 1986, *J. Muscle Res. and Cell. Motil.*, **7**, 387-404.
- Elzinga, M., J.H. Collins, W. M. Kuehl és R.S. Adelstein, 1973, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 2687-2691.
- Engl, R.A., Chen, L.X.-Q. és Fleming, G.R., 1986, *Chem. Phys. Lett.*, **126**, 365-372.
- Estes, J.E., L.A. Selden, H.J. Kinoshian ; L.C. Gershman, 1992, *J. Muscle Res. and Cell Motil.*, **13**, 272-284.
- Farah, C. S. és F. C. Reinach, 1995, *FASEB J.*, **9**, 755-767.
- Feller, G. és C. Gerday, 1989, *Comp. Biochem. Physiol.*, **94B**, 769-773.
- Ferreira, S.T., 1989, *Biochemistry*, **28**, 10066-10072.
- Feuer, G., F. Molnár, E. Pettkó and F.B. Straub, 1948, *Hung. Acta Physiol.* **1**, 150-163.
- Förster, T., 1948, *Annalen der physik*, **6(2)**, 55-75.
- Förster, T., 1951, *Fluoreszenz Organischer Verbindungen*, 206-212.
- Francois, J-M., C. Gerday, F. G. Prendergast és J. D. Potter, 1993, *J. Muscle Res. and Cell Motil.*, **14**, 585-593.
- Frank, J. és S. Vavilov (Wawilow), 1931, *Z. Physik.*, **69**, 100-111.
- Fraunfelder, H., Farak, F., Young, R.D., 1988, *Ann. Rev. Biophys. Chem.*, **17**, 451-479.
- Frieden, C., D. Lieberman and H. R. Gilbert, 1980, *J. Biol. Chem.* **255**, 8991-8993.
- Gahlmann, R. és L. Kedes, 1990, *J. Biol. Chem.*, **265**, 12520-12528.
- Gerday, C., J.-M. francois és I. Dubois, 1984, *Mol. Physiol.*, **6**, 43-54.



- Gershman, L.C., L.A. Selden, H.J. Kinoshian és J.E. Estes, 1989, *Biochim. Biophys. Acta*, **995**, 109-115.
- Golosinska, K., J.R. Pearlstone, T. Borgford et al., 1981, *J. Biol. Chem.*, **290**, 3770-3775.
- Grabarek, Z., T. Tao és J. Gergely, 1992, *J. Muscle Res. and Cell Mot.*, **13**, 389-393.
- Gudgin, E., R. Lopez-Delgado és W.R. Ware, 1981, *Can. J. Chem.*, **59**, 1037-1044.
- Gudgin, E., R. Lopez-Delgado és W.R. Ware, 1983, *J. Phys. Chem.*, **87**, 1559-1565.
- Hanson, J. és J. Lowy, 1963, *J. Mol. Biol.*, **6**, 46-60.
- Heidorn, D. B. és J. Trewhella, 1988, *Biochemistry*, **27**, 909-915.
- Herzberg, O. és M. N. G. James, 1985, *Nature*, **313**, 653-659.
- Herzberg, O. J. Moults és M. N. G. James, 1986, *J. Biol. Chem.*, **261**, 2638-2644.
- Holmes, K.C., D. Popp, W. Gebhard és W. Kabsch, 1990, *Nature*, **347**, 44-49.
- Houk, W. T., és K. Ue, 1974, *Anal. Biochem.*, **62**, 66-74.
- Hubbard, S.R., K.O. Hodgson és S. Doniach, 1988, *J. Biol. Chem.*, **263**, 4151-4158.
- Hudson, E. N. és G. Weber, 1973, *Biochemistry*, **12**, 4154-4161.
- Hutnik, C.M. és A.G. Szabó, 1989, *Biochem.*, **28**, 3923-3934.
- Huxley, A. F., 1974, *J. Physiol.*, **243**, 1-16.
- Huxley, A. F., 1992, *Physiol. Soc. Mag.*, 26-27.
- Huxley, H. E., 1969, *Science*, **164**, 1356-1366.
- Ikkai, T., P. Wahl és J. C. Auchet, 1979, *Eur. J. Biochem.*, **93**, 397-408.
- James, D.R. és Ware, W. R., 1985, *Chem. Phys. Lett.*, **120**, 450-454.
- Johnson, J. D. és J. D. Potter, 1978, *J. Biol. Chem.*, **253**, 3775-3777.
- Johnson, J. D., S. C. Charlton és J. D. Potter, 1979, *J. Biol. Chem.*, **254**, 3497-3502.
- Kabsch, W., H. G. Mannhertz, D. Shuck, E. F. Pai és K. C. Holmes, 1990, *Nature*, **347**, 37-44.
- Kabsch, W., H. G. Mannhertz és D. Suck, 1985, *EMBO J.*, **4**, 2113-2118.
- Kareva, V. V., A. B. Dobrovol'sky, L. A. Baratova, P. Friedrich és N. B. Gusev, 1986, *Biochem. Biophys. Acta.*, 322-329.
- Kawasaki, H. és R. H. Kretsinger, 1994, *Protein Profile*, **1**, 343-349.
- Kinoshian, H. J., L. A. Selden, J. E. Estes and L. C. Gershman, 1991, *Biochim. Biophys. Acta*, **1077**, 151-158.
- Kinoshita, K., S. Kawato és A. Ikegami, 1977, *Bophys. J.*, **20**, 289-305.
- Kirby, E.P., Steiner, R.F., 1970, *J. Phys. Chem.*, **74**, 4480-4490.

- Kobayashi, T. Takagi, K. Konishi és W. Wnuk, 1989b, *J. Biol. Chem.*, **264**, 18247-18259.
- Kobayashi, T. Takagi, K. Konishi, S. Morimoto és I. Ohtsuki, 1989c, *J. Biochem. (Tokyo)*, **106**, 55-59.
- Kobayashi, T., O. Kagami, T. Takagi és K. Konishi, 1989a, *J. Biochem. (Tokyo)*, **105**, 823-828.
- Kopp, S. J., J. T. Barron és J. P. Tow, 1990, *Biochim. Biophys. Acta*, **1055**, 27-35.
- Kushmeric, M. J., P. F. Dillon, R. A. Meyers, T. R. Brown, J. M. Krisanda és H. L. Sweeney, 1986, *J. Biol. Chem.*, **261**, 14420-14429.
- Lakowitz, J.R., 1983a, Measurement of Fluorescence Lifetimes. *In Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Plenum Press, New York and London, 52-95.
- Lakowitz, J.R., 1983b, Quenching of Fluorescence. *In Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Plenum Press, New York and London, 258-304.
- Leavis, P. C., S. Rosenfeld, Z. Grabarek és W. Drabikowski, 1978, *J. Biol. Chem.*, **253**, 5452-5459.
- Lehrer, S.S., 1970, *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 3459-3462.
- Leszyk, J., J.H. Collins, P.C. Leavis és T. Tao, 1987, *Biochemistry*, **26**, 7042-7047.
- Li, M. X., M. Chandra, J. R. Pearlstone, K. I. Racher, G. Trigo-Gonzalez, T. Borgford, C. M. Kay és L. B. Smillie, 1994, *Biochemistry*, **33**, 917-925.
- Li, M. X., S. M. Gagne, S. Tsuda, C. M. Kay, L. B. Smillie és B. D. Sykes, 1995, *Biochemistry*, **34**, 8330-8340.
- Liou, Y-M. és F. Fuchs, 1993, *Biochem. Biophys. Acta.*, **1202**, 92-98.
- Lorkin, P.A. és H. Lehmann, 1983, *FEBS Lett.*, **153**, 81-87.
- Loscalzo, J. és G. H. Reed, 1976, *Biochemistry*, **15**, 5407-5413.
- Lumry, R., E.L. Smith, és R.R. Glantz, 1951, *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 4330-4340.
- Maisonpierre, P.C., K.E.M. Hastings és C.P. Emerson, 1987, *Meth. Enzym.*, **139**, 326-337.
- Malencik, D.A., C.W. Heizmann és E.H. Fischer, 1975, *Biochemistry*, **14**, 715-721.
- Martonosi, A., C. M. Molino és J. Gergely, 1964, *J. Biol. Chem.*, **239**, 1057-1064.
- Matkó, J., L. Trón, M. Balázs, J. Hevessy, B. Somogyi és S. Damjanovich, 1980, *Biochemistry*, **19**, 5782-5786.
- McCubbin, W.D., K. Oikawa, B.D. sykes és C.M. Kay, 1982, *Biochemistry*, **21**, 5948-5956.

- McLaughlin, P. J., J. T. Gooch, H. G. Mannherz és A. G. Weeds, 1993, *Nature*, **364**, 685-692.
- McMahon, L.P., W.J. Colucci, M.L. McLaughlin és M.D. Barkley, 1992, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 8442-8448.
- Mei, G., N. Rosato, N. Silva, Jr., R. Rusch, E. Gratton, I. Savini és A. Finazzi-Agno, 1992, *Biochemistry*, **31**, 7224-7230.
- Miki, M., C. G. dos Remedios és J. A. Barden, 1987, *Eur. J. Biochem.*, **168**, 339-345.
- Milligan, R. A., M. Whittaker és D. Safer, 1990, *Nature*, **348**, 217-221.
- Moore, P. B., H. E. Huxley és D. J. DeRosier, 1970, *J. Mol. Biol.*, **50**, 279-295.
- Murray, A. C. és C. M. Kay, 1972, *Biochemistry*, **11**, 2622-2627.
- Nagy, B. és J. Gergely, 1979, *J. Biol. Chem.*, **254**, 12732-12737.
- Negele, J. C., D. G. Dotson, W. Liu, H. L. Sweeney és J. A. Putkey, 1992, *J. Biol. Chem.*, **267**, 825-831.
- Olah, G. és A. J. Trehwella, 1994, *Biochemistry*, **33**, 12800-12806.
- Oosawa, F., 1980, *Biophys. Chem.*, **11**, 443-446.
- Orlova, A. és E. H. Egelman, 1992, *J. Mol. Biol.*, **227**, 1043-1053.
- Orlova, A. és E. H. Egelman, 1993, *J. Mol. Biol.*, **232**, 334-341.
- Parmacek, M.S. és J.M. Leiden, 1989, *J. Biol. Chem.*, **264**, 13217-13225.
- Petrich, J.W., Chang, M.C., McDonald, D.B. és Fleming, G.R., 1983, *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 3824-3830.
- Potter, J. D., és J. Gergely, 1975, *J. Biol. Chem.*, **250**, 4628-4633.
- Punyiczki, M., J. A. Norman és A. Rosenberg, 1993, *Biophys. Chem.*, **47**, 9-19.
- Putkey, J.A., S.L. Carrol és A.R. Means, 1987, *Mol. Cell. Biol.*, **7**, 1549-1553.
- Rayment, I., H. M. Holden, M. Whittaker, C. B. Yohn, M. Lorentz, K. C. Holmes és R. A. Milligan, 1993, *Science*, **261**, 58-65.
- Ricci, R.W., 1970, *Photochem. Photobiol.*, **12**, 67-75.
- Richardson, J. S. és D. C. Richardson, 1988, *Proteins*, **4**, 229-239.
- Robbins, R.J., Fleming, G.R., Beddard, G.S., Robinson, G.W., Thiesletwaite, P.J., Woolfe, G.J., 1980, *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 6271-6279.
- Roher, A., N. Lieska és W. Spitz, 1986, *Muscle and Nerve*, **9**, 73-77.
- Romero-Herrera, A.E., O. Castillo és H. Lehmann, 1976, *C. J. Mol. Evol.*, **8**, 251-270.
- Ruckpaul, 1983, *Biochim. Biophys. Acta.*, **745**, 140-148.

- Saito, I., Sugiyama, H., Yamamoto, A., Muramatsu, S., Matsuura, T., 1984, *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 4286-4287.
- Sakabe, N., K. Sakabe, K. Sasaki, H. Kondo, P. Ema, N. Kamiya és M. Matsushima, 1983, *J. Biochem.*, **93**, 299-302.
- Schroder, R.R., D.J. Manstein, W. Jahn, H. Holden, K.C. Holmes and J.A. Spudich, 1993, *Nature*, **364**, 171-174.
- Schutt, C. E., J. C. Myslik, M. D. Rozycki, N. Goonesekere és U. Lindberg, 1993, *Nature*, **365**, 810-816.
- Selden, L. A., L. C. Gershman, H. J. Kinoshian és J. E. Estes, 1990, *Biophys. J.*, **57**, 325a.
- Shizuka, H., Serizawa, M., Kobayashi, H. és Kameta, K., 1988a, *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 1726-1732.
- Shizuka, H., Serizawa, M., Shimo, T., Saito és I., Matsuura, T.J., 1988b, *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 1930-1934.
- Somogyi, B., J. Matkó, S. Papp, J. Hevessy, G.R. Welch és S. Damjanovich, 1984, *Biochemistry*, **23**, 3403-3411.
- Somogyi, B., M. Puniczki, J. Hedstrom, J. A. Norman, F. G. Prendergast és A. Rosenberg, 1994, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1209**, 61-68.
- Spudich, J. A., H. E. Huxley és J. T. Finch, 1972, *J. Mol. Biol.*, **72**, 619-630.
- Spudich, J.A. and S. Watt, 1971, *J. Biol. Chem.*, **246**, 4866-4871.
- Straub, F. B., 1942, *Studies (from the Institute of Medical Chemistry University, Szeged)*, **II**, 3-15.
- Stryer, L., 1966, *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 5708-5712.
- Strzelecka Golaszewska, H., 1973, *Biochim. Biophys. Acta*, **310**, 60-69.
- Strzelecka Golaszewska, H., E. Prochniewicz és W. Drabikowski, 1978, *Eur. J. Biochem.*, **88**, 219-227.
- Strzelecka-Golaszewska, H. és W. Drabikowski, 1968, *Biochim. Biophys. Acta*, **162**, 581-595.
- Strzelecka-Golaszewska, H., J. Moraczewska, S. Y. Khaitlina és M. Mossakowska, 1993, *Eur. J. Biochem.*, **211**, 731-742.
- Suck, W., W. Kabsch és H. G. Mannherz, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 4319-4323.

- Sunaralingam, M., R. Bergstom, G. Strasburg, S. T. Rao, P. Roychowdhury. M. Greaser és B. C. Wang, 1985, *Science*, **227**, 945-948.
- Szabó, A.G., és D.M. Rayner, 1980, *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 554-563.
- Takagi, T. és K. Konishi, 1983, *J. Biochem. (Tokyo)*, **94**, 1753-1760.
- Talbot, J. és R.S. Hodges, 1981, *J. Biol. Chem.*, **256**, 2798-2802.
- Tao, T., 1969, *Biopolymers*, **8**, 609-632.
- Tilstra, L., Satter, M.C., Cherry, W.R. és Barkley, M.D., 1990, *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 9176-9182.
- Tirion, M.M. és D. ben-Avraham, 1993, *J. Mol. Biol.* **230**, 186-195.
- Tirion, M.M., D. ben-Avraham, M. Lorenz és K.C. Holmes, 1995, *Biophys. J.*, **68**, 5-12.
- Tobacman, L.S. és E.D. Korn, 1983, *J. Biol. Chem.*, **258**, 3207-3214.
- Tsien, R. Y., T. Pozzan és T. J. Rink, 1982, *J. Cell. Biol.*, **94**, 325-334.
- van Eerd, J. P. és Y. Káwasaki, 1972, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **47**, 859-864.
- van Eerd, J.-P. és K. Takahashi, 1976, *Biochemistry*, **15**, 1171-1180.
- van Eerd, J.-P., J.-P. Capony, C. Ferraz és J.-F. Pechere, 1978, *Eur. J. Biochem.*, **91**, 231-242.
- Wagner, B.D., James, D.R., Ware, W.R., 1987, *Chem. Phys. Lett.*, **138**, 181-184.
- Wakabayashi, T., H. E. Huxley, L. A. Amos és A. Klug, 1975, *J. Mol. Biol.*, **93**, 477-497.
- Wang, C-K., J. Lebowitz és H. C. Cheung, 1989, *Proteins*, **6**, 424-430.
- Wegner, A., 1976, *J. Mol. Biol.*, **108**, 139-150
- White, A., 1959, *Biochem. J.*, **71**, 217-220.
- Wilkinson, J.M., 1976, *FEBS Lett.*, **70**, 254-256.
- Wilkinson, J.M., 1980, *Eur. J. Biochem.*, **103**, 179-188.
- Yanagida, T., M. Nakase, K. Nishiyama és F. Oosawa, 1984, *Nature (London)*, **307**, 58-60.
- Yu, H.-T., Colucci, W.J., McLaughlin, M.L. és Barkley, M.D., 1992, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 8449-8454.
- Zot, A. és J. D. Potter, 1987, *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, **16**, 535-559.
- Zot, A.S., J.D. Potter és W.L. Strauss, 1987, *J. Biol. Chem.*, **262**, 15418-15421.
- Zot, H. G. és J. D. Potter, 1982, *J. Biol. Chem.*, **257**, 7678-7683.