Ph. D. értekezés

LIGANDUM–INDUKÁLT KONFORMÁCIÓVÁLTOZÁSOK KONTRAKTILIS FEHÉRJERENDSZERBEN

Hartvig Nóra

Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Központi Kutatólaboratórium
2002

Program megnevezése: Fehérje szerkezet és működés
Programvezető: Dr. Belágyi József, egyetemi tanár

Köszönetnyilvánítás

Köszönetet mondok témavezetőmnek, Dr. Belágyi József egyetemi tanárnak a szakmai irányításért és a munkám során nyújtott segítségért.

Köszönettel tartozom Dr. Kilár Ferenc egyetemi tanárnak, a PTE. ÁOK. Központi Kutatólaboratórium igazgatójának és Dr. Somogyi Béla egyetemi tanárnak, a PTE. ÁOK. Biofizikai Intézet igazgatójának támogatásukért, tanácsaikért.

Köszönöm Dr. Nyitrai Miklósnak és Dr. Gaszner Balázsnak önzetlen szakmai és baráti segítségüket.

Köszönöm Dr. Aradi Ferencnek és Dr. Pótó Lászlónak a dolgozat megírása során adott értékes tanácsaikat.

Köszönettel tartozom a PTE. ÁOK. Központi Kutatólaboratórium valamennyi dolgozójának a mindennapokban nyújtott segítségért.

Tartalomjegyzék

1. Irodalmi áttekintés 6
1.1 Az izomrost felépítése 6
1.1.1 A vékony filamentum és felépítése 7
1.1.2 A vastag filamentum 11
1.2 Az izomrost működése 14
1.2.1 Az ATPáz ciklus és az aktomiozin kapcsolat 14
2. Célkitűzések 16
3. Anyagok és módszerek 18
3.1 Izomrost 18
3.1.1 Izomrostok preparálása 18
3.1.2 Izomrostok jelölése 18
3.1.3 Nukleotidcsere izomrostokon 19
3.2 Miozin 19
3.2.1 Miozin preparálása 19
3.2.2 Szubfragmentum-1 preparálása 20
3.2.3 Esszenciális könnyűlánc jelölése 20
3.3 Aktin 21
3.3.1 Aktin preparálása 21
3.3.2 Az aktin spinpróbával való jelölése 22
3.3.3 Az aktin fluorofórokkal történő jelölése 22
3.3.4 Kation- és nukleotidcsere aktinon 23
3.3.5 Az aktin polimerizációja 23
3.3.6 ATPáz aktivitás mérés 24
3.4 Spektroszkópiai módszerek 25
3.4.1 EPR spektroszkópia 25
3.4.2 Az EPR spektrumok analízise 26
3.4.3 Fluoreszcencia spektroszkópiai mérések 28
4. Eredmények 33
4.1 Eredmények aktin monomereken 33
4.2 Eredmények aktin filamentumon 38
4.3 Eredmények izomrostokon 41
4.4 Eredmények izomrostba diffundáltatott S1-en 45
5. Következtetések 48
5.1 Nukleotidcsere hatása az aktin internális dinamikájára 48
5.2 Nukleotid-indukált konformációváltozások a miozin feji régiójában 52
6. Összefoglalás 54
7. Saját közlemények 56
8. Irodalomjegyzék 59

Rövidítések jegyzéke

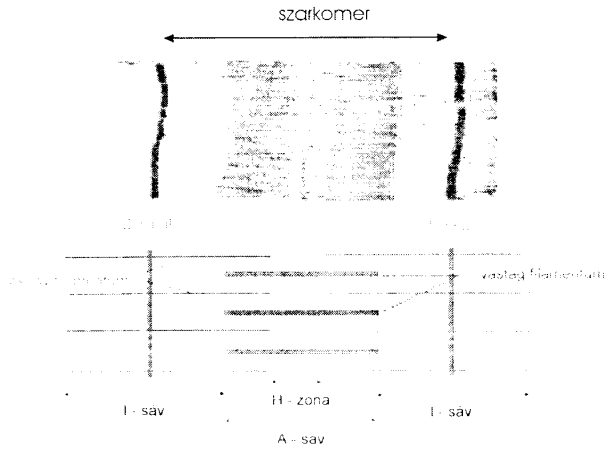
ADP	adenozin-5'-difoszfát
AM	aktomiozin
AMP.PNP	adenozin-5'-β,γ-imidotrifoszfát
ATP	adenozin-5'-trifoszfát
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
EGTA	etilénglikol-bisz-(β-aminoetil-éter)-N,N,N',N'-tetraecetsav
ELC	esszenciális könnyű lánc
ESR	elektronspin rezonancia
EPR	elektronparamágneses rezonancia
DTNB	5,5'-ditiobisz (2-nitrobenzoesav)
DTT	1,4 -dimerkapto-2,3-butándiol
F-aktin	filamentózus aktin
FC	fluoreszcein kadaverin
FDNB	2,4-dinitro-1-fluor-benzol
FRET	fluoreszcencia rezonancia energia transzfer
G-aktin	globuláris aktin
HEPES	4- (2-hidroximetil)-1-piperazin etán-szulfonsav
HMM	nehéz meromiozin (heavy meromyosin)
IAEDANS	N-(jódacetil)-N'-(5-szulfo-1-naftil)etiléndiamin
IAF	5-jódacetamido-fluoreszcein
LC	könnyű lánc (light chain)
LMM	könnyű meromiozin (light meromyosin)
MEA	2-merkapto-etanol
MOPS	4-morfolin-propán-szulfonsav
MSL	N-(1-oxil-2,2,6,6-tetrametil-4-piperidinil)maleimid spin jelölő
NADH	nikotinamid-adenin-dinukleotid
NEM	N-etil-maleimid
Pi	anorganikus foszfát
PMSF	fenil-metil-szulfonilfluorid
RLC	regulációs könnyűlánc
S1	szubfragmentum-1
S2	szubfragmentum-2
SH1	cisztein-707
SH2	cisztein-697
SDS	nátrium-laurilszulfát
ST	szaturáció transzfer
TCSL	4-izotiocianát-2,2,6,6-tetrametilpiperidinoxil spin jelölő
TES	N-tris-(hidroximetil)-metil-2-aminoetán-szulfonsav
TGáz	transzglutamináz
TNBS	2,4,6,-trinitro-benzolszulfonát
Trisz.HCl	2-Amino-2-hidroximetil-1,3-propándiol-hidroklorid

1. Irodalmi áttekintés

1.1 Az izomrost felépítése

Az élőlények hely-, helyzetváltoztató mozgását, vagy alakváltoztatását speciális fehérjekomplexek összehangolt működése eredményezi. A mozgásformák vizsgálatához legrégebb óta használt ilyen rendszer a gerincesek akaratlagos mozgását létrehozó vázizom. A vázizomzat izomrostokból, az izomrost pedig miofibrillumokból épül fel. Egy miofibrillum sorban elrendezett szarkomer egységekből áll – fénymikroszkópos képe jellemző harántcsíkolatot mutat (*1. ábra*), – és egy-egy szarkomert vékony és vastag filamentumok alkotnak. A vékony filamentum fő alkotója az aktin, a vastag filamentumé a miozin. Az izom összehúzódás során, a két filamentum rendszer ciklikus kölcsönhatásban áll egymással, egymáson történő elmozdulásuk, az ún. „sliding" mozgás eredményezi a szarkomer rövidülését (Huxley and Niedergerke 1954; Huxley and Hanson 1954).

A szarkomerek a vékony és vastag filamentumokon kívül számos egyéb szerkezeti tulajdonsággal és szabályozási funkcióval rendelkező fehérjekomplexet tartalmaznak, ilyen pl.: a tropomiozin, troponin, titin, α-aktinin, C protein, M protein és nebulin.



1. ábra: Egér harántcsíkolt izom elektronmikroszkópos képe. Az I - sáv csak vékony filamentumból, a H - zóna csak a vastag filamentumból, az A - sáv H - zóna nélküli része vastag és vékony filamentumokból épül fel.

Az összehúzódás folyamatához szükséges energiát a miozin molekulán lejátszódó ATP hidrolízis szolgáltatja. A hidrolízis során felszabaduló kémiai energia úgy alakul át (konvertálódik) mechanikai energiává, hogy az izom molekuláris rendszerében máig sem pontosan felderített szerkezeti változások következnek be.

A vékony filamentum és felépítése

Az aktin monomer (G-aktin)

Az aktin felfedezése és elnevezése Szent-Györgyi Albert és Straub F. Brúnó nevéhez fűződik (Banga et al. 1941; Straub 1942). Meglehetősen konzervatív fehérje, minden eukarióta sejtben megtalálható, mégpedig két meghatározó formában: monomer, más néven globuláris (G), illetve a monomerek polimerizációjából előálló filamentális (F) aktinként.

Az aktin monomereket egyetlen polipeptidlánc alkotja, a monomer relatív molekula tömege megközelítőleg 43 kDa. Háromdimenziós szerkezetét legelőször (a monomer formában történő kristályosítás nehézsége miatt DNáz-I jelenlétében) Kabschnak és munkatársainak sikerült meghatároznia (*2. ábra*) (Kabsch et al. 1990).

2. ábra: Nyúl harántcsíkolt izomból preparált aktin monomer szerkezetének szalagmodellje (Kabsch 1990).

Az aktin szerkezete két nagy alegységre bontható, ezek további két szubdoménből állnak. A nagy alegységek két egymáshoz közel húzódó polipeptid

szálon keresztül kapcsolódnak össze az aktin monomer 'alsó' részén. Ez a meglehetősen flexibilis kapcsolat lehetővé teszi, hogy a két alegység egymáshoz képest elmozduljon. A nagy alegységek között meglevo hasítek kation-, és nukleotidkötő helyei rendelkezik.

A kötött kation fiziológiás körülmények között Mg^{2+} (Kopp et al. 1990; Kushmerick et al. 1986; Tsien et al. 1982), de a monomerek képesek egyértékű és más kétértékű kationok megkötésére is. Az egyetlen nagy affinitású kationkötő hely más-más kationra eltérő affinitást mutat: $Ca^{2+} > Mn^{2+} > Cd^{2+} > Mg^{2+} > Zn^{2+} > Ni^{2+} > Sr^{2+}$ sorrendben (Loscalzo and Reed 1976; Strzelecka-Golaszewska 1973; Strzelecka-Golaszewska et al. 1978a; Strzelecka-Golaszewska et al. 1978b). Emellett léteznek egyéb, kisebb affinitású kationkötő helyek is, de ezek nem mutatnak eltérő affinitást ezekre a kationokra (Carlier et al. 1986). Az aktin kationkötése befolyással van a nukleotidkötő képességére, eltávolítva a kationt (valamilyen kelátképzővel) az aktin affinitása a nukleotidokhoz drasztikusan lecsökken (Gershman et al. 1991; Kuehl and Gergely 1969; Waechter and Engel 1977), a nukleotid hiánya pedig gyors denaturációhoz vezet (Kinosian et al. 1993). Abban az esetben, ha a monomerek Ca^{2+}-t kötnek, kritikus koncentrációjuk (aminél alacsonyabb koncentráció esetén nem alakulnak ki filamentumok) egy nagyságrenddel nagyobb, mint Mg^{2+}-mal telített monomereké (Kinosian et al. 1991), továbbá a Mg^{2+}-t kötő állapotban az aktin monomerekhez asszociált ATP hidrolízise felgyorsul (Carlier 1987).

1.1.1.2 Az aktin filamentum (F-aktin)

A monomerek polimerizációjának eredményeként egy nem kovalens polimer, az aktin filamentum jön létre. A filamentumban a monomerek helikális elrendeződésűek, amit kétféle módon lehetséges leírni: vagy egy egyszálú balmenetes hélixként, aminek a monomerenkénti menetemelkedése 2,75 nm és egy teljes menet (periódus) 36 nm, amit 13 monomer hoz létre, vagy egy kétszálú jobbmenetes hélixként, aminek a monomerenkénti menetemelkedése 5,5 nm és félperiódus hossza 36 nm (Aebi et al. 1986; Holmes et al. 1990; Milligan et al. 1990). A filamentumon belül a monomerek úgy helyezkednek el, hogy a szubdomén III és IV a hélix belsejében, míg a szubdomén I és II a periférián foglal helyet (Holmes et al. 1990; Lorenz et al. 1995).

Az izomban megtalálható vékony filamentumot az aktin polimer és a vele szoros

kapcsolatban álló tropomiozin–troponin komplex alakítja ki. A tropomiozin hét aktin monomert átérő, két α-helikális láncból összecsavarodott fehérje, amely a három troponin alegységgel (troponin-I, troponin-C és troponin-T) részt vesz az izomkontrakció szabályozásában azáltal, hogy lehetővé teszi, illetve megakadályozza a miozin aktinhoz való kötődését az izom összehúzódása során.

Az aktin mind az izomban (a vékony filamentum részeként), mind a citoszkeletális rendszerben dinamikus átrendeződésre képes szerkezetet alkot; ez teszi alkalmassá, hogy az izom összehúzódásában, a sejt alakváltozásainak szabályozásában valamint számos sejten belüli transzport folyamatban fontos szerepet töltsön be.

1.1.1.3 Az aktin-polimerizáció folyamata és szabályozása

Az aktin monomerek filamentummá alakulásának egyik első modellje a gömbszerű monomerek spirális összekapcsolódását feltételezte (Hanson and Lowy 1963). A filamentum dinamikus egyensúlyban van a monomerekkel, ami biztosítja a filamentum hosszának szabályozott változását (Rickard and Sheterline 1986). A mechanizmus az un. „treadmilling", melynek során az aktin filamentum épülő végén új monomerek kapcsolódnak a polimerhez, míg ezzel átellenes végen monomerek disszociálódnak a filamentumról (Wegner 1976). A miozin fragmentumokkal (HMM vagy S1) dekorált aktin filamentum elektronmikroszkópos képe alapján a gyarapodó véget „barbed end"-nek, míg az átellenes véget „pointed end"-nek nevezték el. A filamentumba beépülő monomer ATP-t és Mg^{2+}-t tart kötésben. A növekvő véghez való asszociációt követően az ATP hidrolizálódik, majd az anorganikus foszfát polimerből való kilépése után (Korn et al. 1987; Pollard and Weeds 1984) – a monomer a 'treadmilling' mechanizmusnak köszönhetően végigérve a filamentumon – disszociálódik a filamentum „pointed" végén (Carlier 1987; Carlier 1992) A kialakuló filamentumban a protomerek többsége (kivéve az éppen belépő, még ATP-t kötő, továbbá az ATP hidrolízis után a Pi-t még el nem eresztett monomereket) egységesen ADP-t tartalmaz. Létrehozható azonban aktin polimer úgy is, hogy kiinduláskor a monomerek ADP-t tartanak kötésben (mert az ATP jelenléte a monomerekben nem esszenciális a polimerizáció folyamatához). Ilyen kiindulási feltételek mellett a polimerizáció lassabban játszódik le, de a kialakult filamentumokban a protomerek

ebben az esetben is ADP-t tartalmaznak. Jamney és munkatársai összehasonlították a különböző kiindulási monomerekből polimerizált aktin filamentumok flexibilitását, és különbséget tapasztaltak a kétféle filamentum között. Arra a következtetésre jutottak, hogy a polimerizáció során a hidrolízissel felszabaduló energia elasztikus energiaként tárolódik a filamentumban, és fontos szerepet játszhat a filamentum és az aktinkötő fehérjék kapcsolatának kialakulásában (Janmey et al. 1990).

A polimerizáció során a filamentum két vége eltérő affinitást mutat a különböző nukleotidot tartalmazó monomerekre nézve. Az épülő vég az ATP-t, míg az átellenes vég az ADP-t kötő monomerekhez mutat nagyobb affinitást. Ez a különbség biztosítja a filamentum épülését (Pollard 1986), valamint jellemző „polaritást" ad a polimernek. A mechanizmus fiziológiás körülmények között feltételez egy közös ADP- és ATP-G-aktin készletet, amely a monomerek utánpótlását biztosítja, éppen ezért fiziológiás körülmények között, termodinamikai egyensúlyi állapotban az ADP-monomer disszociációja a leglassúbb lépés, ezért a polimerizáció sebesség-meghatározó lépése.

Fiziológiás ionerősség mellett a monomerek spontán képesek polimerizációra, viszont nem izom-eredetű állati sejtben a monomer formában lévő aktin mennyisége a teljes aktin koncentráció 50%-át is meghaladhatja, ezért a sejtben jelenlévő aktinkötő fehérjék (pl.: profilin, timozin, kofilin, DNáz-I) a polimerizáció szabályozásában nagy szerepet játszanak azzal, hogy meggátolják, vagy éppen elősegítik a monomerek és filamentumok kapcsolódását (Hitchcock 1980; Nishida 1985; Polzar et al. 1989; Tellam 1986). A polimerizáció alatt végbemenő ATP hidrolízis pontos mechanizmusa, és a filamentumképzés során betöltött szerepe nem teljesen tisztázott.. A kationok minősége befolyásolja a polimerizáció folyamatát, Ca^{2+}-mal telített aktin monomerek magasabb kritikus koncentrációnál és lassabban is polimerizálódnak mint a Mg^{2+}-t tartalmazó aktin [(Cooke 1975; Cooke and Murdoch 1973; Iyengar et al. 1964; Pollard and Weeds 1984; Tobacman and Korn 1983). A hőmérséklet nem befolyásolja a monomerek kritikus koncentrációját, de magasabb hőmérsékleten gyorsabb a polimerizáció, ha egyébként adott a folyamathoz szükséges összes feltétel.

Mindezekből kitűnik, hogy a környezeti paraméterek, az aktinkötő fehérjék, a monomerek nukleotid- és kationkötése és még számos fel nem derített faktor együttesen határozzák meg az aktin-polimerizációját, ami további lehetőségeket biztosít az aktin-polimerizáció mechanizmusának és szabályozásának kutatására.

1.1.2 A vastag filamentum

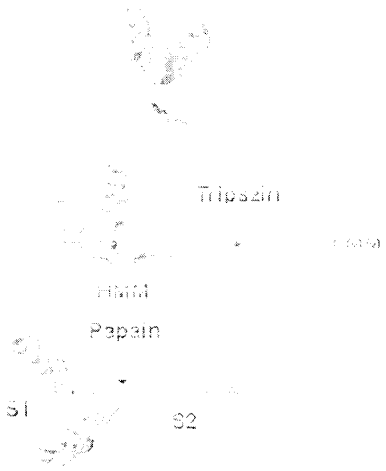
1.1.2.1 A miozin molekula

A miozin elnevezés, a szekvencia analízisnek köszönhetően, mára gyűjtőfogalommá vált. A miozin szupercsalád tagjai molekula motorok, vagyis olyan molekulák amik képesek az aktin filamentumhoz kapcsolódni és azon elmozdulni. Homológ szekvenciáik alapján legalább 15 családra különíthetők el, ezek közül az egyik legjobban ismert és tanulmányozott család a miozin II, amely családba a vázizomzat vastag filamentumát felépítő, általánosan miozinnak nevezett motorfehérje is tartozik.

A megközelítőleg 520 kDa molekulatömegű miozin molekula két 220 kDa-os nehézláncból és két pár 15-22 kDa-os könnyűláncból épül fel (Lowey et al. 1969; Weeds and Lowey 1971). A molekula nagy mértékben aszimmetrikus, mert a nehézlánc N-terminális szakasza két globuláris szerkezetű miozin fejet hoz létre, míg a C-terminális régió egymás köré tekeredett hosszú szuperhelikális rudat alkot.

A vastag filamentum kialakulásakor a miozin molekulák úgy kapcsolódnak egymáshoz, hogy a fejek a filamentum két vége felé egymással antiparalel helyezkednek el, míg a rúd részek egy fejmentes közös régiót alakítanak ki. A vastag filamentumok hossza gerincesek vázizomzatában meglehetősen egységes, 294 vagy 300 miozin molekula található vastag filamentumonként (Kensler and Stewart 1983; Luther et al. 1981).

Megfelelő körülmények között limitált proteolízissel a miozin – a két globuláris fejet tartalmazó, kis ionerősségnél is oldódó – nehéz meromiozinra (HMM) és – a molekula gerincét alkotó, kis ionerősségnél nem oldódó – könnyű meromiozinra (LMM) hasítható. A HMM további emésztésével megkapjuk a két miozin fejet, más néven szubfragmentum-1-et (S1), és a két fejet emésztés előtt összekapcsoló rövid rúd darabot, a szubfragmentum-2-t (S2) (*3. ábra*).



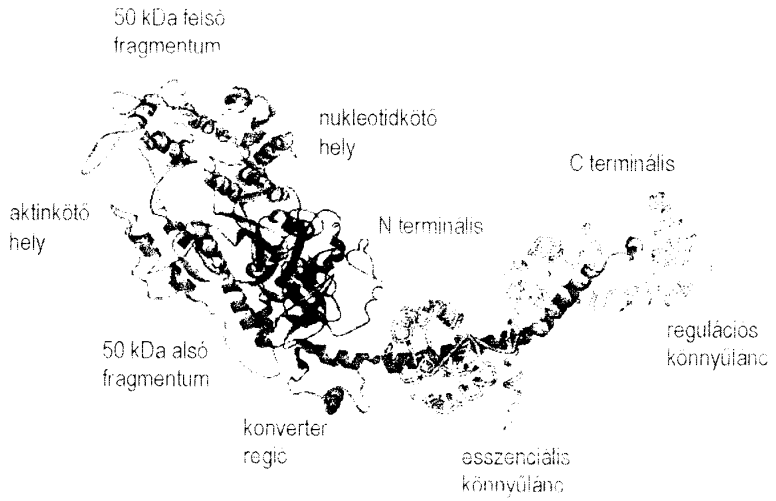
3. ábra: A miozin molekula limitált proteolízisének termékei.

Az S1 további limitált proteolízisével három fragmentum nyerhető, melyeket molekulatömegük alapján 25 kDa (N-terminális), 50 kDa (középső) és 20 kDa (C-terminális) fragmentumnak neveztek el (*4. ábra*) (Balint et al. 1975; Margossian and Lowey 1973a; Margossian and Lowey 1973b; Mornet et al. 1979). A három fragmentum nem alkot egy-egy működési egységet, közösen alakítják ki a miozin egyes funkcionális doménjeit. Az S1 két nagy doménre osztható, a motor és a könnyűlánckötő (regulációs) doménre. A motor doménen aktin- és nukleotidkötő régió található, míg a könnyűlánckötő doménhez kapcsolódik az esszenciális (ELC) és a regulációs (RLC) könnyűlánc.

A könnyűláncok vizsgálata során számos elnevezést használtak attól függően, hogy mi volt a vizsgálati technika. Az esszenciális könnyűlánc a nevét abból a megfigyelésből kapta, hogy alkalikus körülmények között elválasztható volt a miozintól és így a miozin elvesztette ATP hidrolizáló képességét, tehát a könnyűlánc jelenlétét esszenciálisnak ítélték az ATPáz aktivitás megőrzéséhez. Bár azóta ez az állítás megdőlt, az elnevezés mégis megmaradt (Sivaramakrishnan and Burke 1982; Wagner and Giniger 1981). Ugyanezt a könnyűláncot nevezik alkalikus könnyűláncnak is, utalva a miozintól való elválasztás körülményeire. (Mivel ennek a könnyűláncnak két izoformája is létezik megkülönböztetésképpen A1-gyel és A2-vel jelölték őket.) Ha a molekulatömegük alapján nevezték el a könnyűláncokat, akkor az LC1 és LC3 volt a két

ELC izoforma és LC2 a regulációs könnyűlánc. A regulációs könnyűlánc (RLC) nevét a simaizomban betöltött szabályozó szerepéről kapta, és mivel eltávolítható DTNB kezeléssel, DTNB könnyűláncnak is nevezték (Weeds 1969).

A röntgenkrisztallográfiás struktúrája alapján a motor domént hét β-redő építi fel, ezek kialakításában mind a három (25 kDa, 50 kDa, 20 kDa) proteolitikus fragmentum részt vesz. A β-lemezek számos α-hélixszel körülvéve egy hasítékot hoznak létre a nukleotidkötő, és az aktinkötő hely között úgy, hogy az kettészeli az 50 kDa-os fragmentumot és létrejön egy alsó, ún. aktinkötő régió és egy felső régió. (Rayment et al. 1993). Ez a felső régiója az 50 kDa fragmentumnak a 25 kDa-os fragmentummal közösen alakítja ki azt a nagy szerkezeti egységet (ami magában foglalja a β-redő 6 szálát), amelyen az ATP kötőhely található. Az ATP kötőhely fontos része a γ-foszfát kötőzseb, aminek jelentős szerepe van az ATP hidrolízis folyamatában.



4. ábra: Csirke harántcsíkolt izom miozin S1 szerkezetének szalag modellje. A 20 kDa-os fragmentum sötétzöld, az 50 kDa-os fragmentum piros és a 25 kDa-os fragmentum kék. (Rayment 1993.)

A miozin molekula fontos régiója a 25 kDa-os fragmentumhoz tartozó megtört hélix (SH-hélix); ezen a miozin két igen reaktív cisztein-je található: az egymástól tíz aminosav távolságra levő cisztein-707 (SH1) és cisztein-697 (SH2). A két aminosav jelentősége a helyzetében és a reaktivitásában van, mert megfelelő körülmények között szelektív jelölést tesznek lehetővé, és közel helyezkednek el az ún. konverter régióhoz.

A konverter régió az SH- és a könnyűlánckötő domén (amin a két könnyűlánc lokalizálódik) között helyezkedik el, nevét az erőátvitelben betöltött kulcsfontosságú szerepéről kapta (Houdusse and Cohen 1996; Xie et al. 1994). A könnyűlánckötő (regulációs) domén a kontrakció során valószínűleg az erőkar szerepét tölti be.

1.2 Az izomrost működése

1.2.1 Az ATPáz ciklus és az aktomiozin kapcsolat

A vastag filamentumból kinyúló miozinfejek és az aktin filamentum ciklikus kölcsönhatása felelős az izomrost rövidüléséért. Az összehúzódáshoz szükséges energiát a miozinfejben lejátszódó ATP hidrolízis szolgáltatja. A hidrolízis során a miozin konformációváltozások sorozatán megy keresztül, ennek eredményeként megváltozik a miozinfej aktinhoz viszonyított helyzete, és bekövetkezik az izom rövidülése.

A hidrolízis egymást követő lépéseit leíró modellekben az egyes lépések a miozin egy-egy elkülöníthető konformációjának felelnek meg. Biokémiai módszerekkel több mint hét állapot különböztethető meg. Az általunk használt EPR spektroszkópia csak a hosszú ideig stabil – vagy stabilizálható – lépések vizsgálatát teszi lehetővé ezért az állapotok jellemzéséhez (leírásához) Bagshaw és Trentham modelljét használtuk (Bagshaw and Trentham 1974). A modell négy miozinállapotot különít el az alábbi séma szerint:

$$M+ATP \leftrightarrow M^*.ATP \leftrightarrow M^{**}.ADP.Pi \leftrightarrow M^*.ADP+Pi \leftrightarrow M+ADP+Pi$$

ahol az M a miozint, a M*.ATP, M**.ADP.Pi és az M*.ADP pedig a hidrolízis ciklus köztes állapotait jelentik. A kontrakciós ciklus első lépéseként a miozin megköti az ATP-t, és disszociálódik az aktintól. A szabad miozinfejek hidrolizálják az ATP-t, majd visszakötődnek az aktinhoz, először egy nem specifikus, gyenge (ún. weak binding) kötéssel, majd egy sztereospecifikus, erős, (ún. strong binding) kötéssel, miközben eleresztik a hidrolízis termékeit. Ahhoz, hogy ezt a mechanizmust megértsük ismernünk kell az egyes állapotokhoz tartozó molekulaszerkezeteket. Mivel nem minden állapot vizsgálható a spektroszkópiai módszerekkel közvetlenül, ezért a tanulmányozáshoz

olyan anyagok szükségesek, amik szerkezetük miatt alkalmasak nukleotidanalógnak, de nem (vagy csak lassan) hidrolizálva, stabilizálják a miozin–nukleotid komplexet. Ilyen nukleotidanalóg az AMP.PNP (nem hidrolizáló ATP), vagy a lassan hidrolizáló γ-ATP, amelyek az M*.ATP állapot vizsgálatára alkalmasak és az AlF_4^-, BeF_x^- vagy a VO_4^- amik a foszfátion strukturális analógjaként az M**.ADP.Pi állapotot 'mimikálják' (Fisher et al. 1995; Smith and Rayment 1996).

A különböző röntgenkrisztallográfiás és krio-elektronmikroszkópos eredmények szerint a kontrakciós ciklus konformációváltozásait az ATP megkötése indítja. Az ATP kötésekor a miozinfej γ-foszfát kötőzsebe 'rázáródik' a terminális foszfátra (ún. closed állapot), ez az 50 kDa-os fragmentum alsó és felső részének részleges záródását eredményezi. Az alsó és felső szegmens elfordul néhány fokkal az 50 és 25 kDa-os szegmens határán lévő hélix körül és ezzel záródik a nukleotid kötőhely. Ezzel egyidőben az 50 kDa-os fragmentum alsó régiójában található hosszú α-hélix az un. switch-2 hélix, és a 'kifele' eső végéhez kapcsolódó hurok (switch-2 hurok) 24°-kal fordul el, a konverter domén elfordulása pedig 70°-os (Holmes 1996; Holmes 1997). Ez a felerősödött változás tevődik át a miozin regulációs doménjére és hozza létre az elmozdulást az aktin mentén.

A miozin aktinhoz történő asszociációjakor először az 50 kDa-os fragmentum alsó régiója kötődik nem specifikus gyenge kötődéssel az aktinhoz, majd a felső szegmens és a 20 és 50 kDa-os szegmens határán lévő hurok aktinhoz kapcsolódása létrehozza a specifikus erős kötődést és ezzel egyidőben kinyitja a γ-foszfát kötő zsebet (ún. open állapot). Valószínűsíthető, hogy az open–closed átmenet indítja el az ATP hidrolízisét. Kísérletek azonban azt mutatják, hogy az átmenettel járó konformációváltozás és az ATP hidrolízis folyamata elkülönül egymástól (Málnási-Csizmadia et al. 2001).

Irodalmi adatok szerint nukleotidmentes valamint ATP és ADP állapotokban a konformáció open, míg ADP.Pi, $ADP.AlF_4$ és ADP.Vi állapotokban a konformáció closed. AMP.PNP és $ADP.BeF_x$ állapotokban a konformáció heterogén, azaz a két konformáció között hőmérséklettől és ionerősségtől függő dinamikus egyensúly alakul ki (Geeves and Holmes 1999).

2. Célkitűzések

Vizsgálataink célja az izomkontrakció során létrejövő molekuláris szintű változások vizsgálata és az izmokat felépítő egyes komponensek dinamikai tulajdonságainak megismerése volt. Kísérleteinkben az egyes környezeti paraméterek megváltozásával járó konformációváltozásokat követtük nyomon elektron paramágneses rezonancia és fluoreszcencia spektroszkópia módszerével.

(i) A aktin monomerek polimerizáció–képességét sok környezeti faktor befolyásolja, és a polimerizáció szabályozása napjainkban is jelentős kutatási terület. Az eukarióta sejtek életében betöltött sokoldalú szerepe miatt a polimerizáció során bekövetkező konformációváltozasok felderítése, a konformáció változást kiváltó tényezők meghatározása és a változás polimerizáció sebességére gyakorolt hatása egyaránt időszerű kutatási téma. Kísérleteink célkitűzése volt a monomereken végbemenő nukleotidcsere szerkezetre gyakorolt hatásának vizsgálata.

(ii) A monomerek fiziológiás körülmények között ATP-t tartanak kötésben a polimerizációt megelőzően, viszont 'in vitro' az ADP-G-aktin is polimerizálható. A kialakult filamentumban a protomerek az épülő vég kivételével ADP tartalmúak. Vizsgálataink célja volt annak meghatározása, hogy van-e szerkezeti és/vagy dinamikai különbség az ATP-aktinból illetve az ADP-aktinból polimerizált aktin filamentumok között.

(iii) Az izomkontrakció során a miozin fejen nagyobb mérvű szerkezeti változások játszódnak le. A diffrakciós szerkezetet meghatározó módszerek a minta tömegeloszlásának megfelelően statikus információt nyújtanak a dinamikai folyamat kristályba 'fagyasztott' egyes állapotairól. A dinamikai vizsgálat egyik lehetséges módja, hogy mozgásra érzékeny spektroszkópiai szondákat helyezünk el a miozin molekula kitűntetett helyeire, olyan szerkezeti egységek közelébe, amelyek valószínűleg jelentős változáson mennek keresztül a húzási ciklus során. Kísérleteinkben paramágneses szondákkal jelöltük a miozin motor doménjének cisztein-707-es aminosav oldalláncát izomrostban, és a regulációs domén esszenciális könnyűláncán

található cisztein-177-es aminosav oldalláncot, izomrostba diffundáltatott S1 molekulán. Izomrosttal végzett vizsgálatainkban célunk volt a kontrakció alatti ATP hidrolízis egyes hosszú életidejű lépései során bekövetkezo konformációs változások detektálása és azok azonosítása a kontrakciós ciklus már meghatározott szerkezeti állapotaival.

3. Anyagok és módszerek

3.1 Izomrost

3.1.1 Izomrostok preparálása

A glicerinnel kezelt rostokat nyúl *musculus psoas* izmából preparáltuk (Rome 1972). A 3 mm széles 4-5 cm hosszú rostokat üvegbotra kötve 0 °C-on 30 percig áztattuk 0,1 mM PMSF tartalmú rigor oldatban (80 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 2 mM EGTA, 25 mM Trisz.HCl, pH 7,0). Ezt követően 30 percig 50 V/V % glicerint tartalmazó rigor oldatba helyeztük át. Az oldatcserét háromszor ismételtük 30 percenként, végül a rostokat felhasználásukig (1 hét - 1 hónap) 50 V/V %-os glicerint tartalmazó rigor pufferben, -20 °C-on tároltuk.

3.1.2 Izomrostok jelölése

A rostkötegek spinjelölését un. jelölő közegben végeztük (80 mM K-propionát, 25 mM Trisz.HCl, 5 mM $MgCl_2$, 2 mM EGTA, 2 mM pirofoszfát, pH 6,5). A jelölés specificitásának növelése érdekében előblokkoltuk a rostokat alacsony ionerősségű pufferben DTNB-vel (Roopnarine and Thomas 1994; Zhao et al. 1995), (1 mM DTNB, 1 mM EGTA, 5 mM $MgCl_2$, 20 mM MOPS, 1 óra, 0 °C, pH 7,5). A fölösleges blokkolót 2 x 10 perces rigoros mosással távolítottuk el (80 mM K-propionát, 25 mM Trisz.HCl, 5 mM $MgCl_2$, 2 mM EGTA, pH 7,0). A jelölés 20 percen keresztül zajlott 0 °C-on. Jelöléskor a rost becsült miozintartalmára számított kétszeres moláris fölöslegű MSL vagy TCSL paramágneses jelölőt használtunk (Belagyi et al. 1994). A fölösleges jelölőt 3 x 10 perces rigoros mosással távolítottuk el a rostokról. A paramágneses szondáink ilyen feltételek mellett a miozin fej cisztein-707-es (SH1) reaktív aminosav oldalláncához kapcsolódtak.

Mivel a TCSL jelölő nem csak cisztein, de lizin jelölésére is alkalmas, ezért az SH jelölés specificitásának közvetett bizonyítékaként a jelölést megelőzően, de már a DTNB blokkolást követően, 0,1 mM N-etil-maleimiddel (NEM) kezeltük a rostokat. Az N-etil-maleimid a jelöléshez szükséges kémiai tulajdonságaiban megegyezik az általunk leggyakrabban használt MSL jelölőével, csak nem szolgáltat EPR jelet, ezért alkalmas

arra, hogy meghatározzuk a nem specifikusan kötődő TCSL jelölők arányát. Abban az esetben, ha alkalmaztuk az NEM kezelést a TCSL jelölést megelőzően, a spektrumok intenzitása erősen redukálódott, megjelent egy gyengén immobilizálódott frakció, valamint a jelölő irányfüggése drasztikusan lecsökkent. Annak bizonyítékaként, hogy a TCSL nem lizin oldalánchoz kapcsolódott, a rostokat a jelölést megelőzően lizin blokkoló TNBS-sel kezeltük és kezelés nem befolyásolta jelentősen az EPR spektrumok irányfüggését.

3.1.3 Nukleotidcsere izomrostokon

Az izomkontrakciós ciklus átmeneti állapotainak vizsgálatához nukleotidokat és analógjaikat használtunk. A spinjelölés után a rostokat 0 °C-on 15 percig rigor oldatban tartottuk. Ezt követően az ADP állapot kialakításához 5 mM MgADP-t tartalmazó, az ADP.Pi állapot mimikálásához 5 mM MgATP-t és 4 mM Na_3VO_4-ot tartalmazó míg az ATP állapot mimikálásához 5 mM AMP.PNP-t tartalmazó rigor oldatban újabb 15 percen keresztül inkubáltuk a rostokat a mérést megelőzően.

3.2 Miozin

3.2.1 Miozin preparálása

A miozint nyúl vázizomból nyertük Margossian és Lowey módszere szerint (Margossian and Lowey 1982). Az izmot ledaráltuk, majd 2x15 perces extrahálást (extraháló puffer 0,3 M KCl, 0,15 M kálium-foszfát puffer, 2 mM $MgCl_2$, 0,2 mM ATP, 0,2 mM DTT, 0,23 mM PMSF, pH 6,5; 4 °C) követően gézen átszűrve, a szűrletet tízszeresére hígítottuk jéghideg desztillált vízzel. Az alacsony ionerősség hatására a miozin filamentumokat képez, és fehér, pelyhes csapadék formájában elválasztható az oldattól (12 000 *g*, 30 perc, 4 °C). A csapadékot feloldottuk, (0,5 M KCl, 50 mM kálium-foszfát, 1 mM DTT, pH 6,8) majd 50 000 *g*-n lecentrifugáltuk (4 °C, 30 perc). A felülúszót tisztítás céljából jéghideg desztillált vízzel 1,5 - szeresére hígítva újra kicsaptuk, majd 100 000 *g*-n centrifugáltuk (4 °C, 1 óra), és a pelletet magas ionerősségű oldattal felszuszpendáltuk (0,5 M KCl, 0,5 M kálium-foszfát puffer, 1 mM $MgCl_2$, 1

mM DTT, pH 6,8). A fehérje koncentrációt fényabszorpció méréssel határoztuk meg 280 nm-en, az abszorpciós koefficienst 0,53 $mg \cdot ml^{-1} \cdot cm^{-1}$-nek véve (Lowry et al. 1951). A tároláshoz a preparátum térfogatával megegyező térfogatú 100 %-os glicerint adtunk, és -20 °C-on tároltuk.

3.2.2 Szubfragmentum-1 preparálása

A szubfragmentum-1-et (S1) a miozin limitált proteolízisével nyertük (Weeds and Taylor 1975) úgy, hogy emésztés előtt a miozint (15-20 mg/ml) éjszakán át dializáltuk egy ún. félig kicsapó pufferrel szemben, (0,12 M NaCl, 20 mM Na_2HPO_4, 1 mM EDTA, pH 7,0; 4 °C). Az emésztés TLCK kezelt α-kimotripszinnel (0,05 mg/ml) történt, 10 percig, 25 °C-on. Az emésztés leállításához 0,2 mM PMSF-et használtunk, majd az elegyet centrifugáltuk (100 000 *g*, 1,5 óra, 4 °C-on). A felülúszóban volt az S1, a pellet pedig az emésztetlen miozin és a könnyű meromiozin (LMM) volt. A felülúszót tisztítás céljából éjszakán át dializáltuk (50 mM TES, 0,1 mM PMSF, pH 7,0; 4 °C), majd centrifugáltuk (100 000 *g*, 1,5 óra, 4 °C). Az S1 koncentrációját fényabszorpció méréssel határoztuk meg 280 nm-en, az abszorpciós koefficienst 0,745 $mg \cdot ml^{-1} \cdot cm^{-1}$-nek, a molekulatömegét 115 000 Da-nak tekintettük. Tároláshoz az S1 oldatot éjszakán át dializáltuk 60%-osan telített ammonium-szulfát oldattal szemben (25 mM TES, 5 mM EDTA, 0,2 mM PMSF, 1 mM DTT, pH 7,0, 4 °C). A kisózott fehérjét centrifugálással ülepítettük (100 000 *g*, 1 óra, 4 °C) majd a felülúszót leöntve légmentesen lezártuk. Felhasználásig –20 °C-on tároltuk.

3.2.3 Esszenciális könnyűlánc jelölése

A limitált proteolízissel nyert miozin fejek esszenciális könnyűláncát MSL szondával jelöltük Kasprzak és Smyczynski módszerét módosítva (Kasprzak et al. 1989; Smyczynski and Kasprzak 1997). Jelölés előtt a mintát éjszakán át dializáltuk (100 mM HEPES, pH 8,0, 4 °C). A jelölés szelektivitásának érdekében jelölés előtt a reaktív cisztein oldalláncokat 5-szörös moláris túlsúlyban levő FDNB-vel blokkoltuk (1 óra, 0 °C). A blokkolást a minta Sephadex G-25-ös oszlopon való átszűrésével állítottuk le. Az oszlopot NaCl tartalmú pufferral mostuk a szeparáció előtt (250 mM NaCl, 50 mM

TES, pH 7,0). A jelölés 1,2-szeres moláris jelölő felesleg mellett 1 órán át, 0 °C-on zajlott. A jelölést rigor pufferben (80 mM KCl, 25 mM Trisz.HCl, 5 mM $MgCl_2$, 2 mM EGTA, pH 7,0; 4 °C) éjszakán át tartó dialízissel állítottuk le. A jelölési arányt ami 0,85 - 0,95 mol/mol volt, az S1 koncentrációjának valamint az EPR spektrumok kettős integrál értékének meghatározásából számítottuk. A jelölés specificitását ATPáz aktivitás méréssel, valamint SDS-poliakrilamid gél elektroforézissel ellenőriztük (Ajtai et al. 1990; Laemmli 1970).

3.3 Aktin

3.3.1 Aktin preparálása

Az aktin preparálása két lépésben történt. Első lépésben készült az aktinforgács (Feuer et al. 1948). Az aktinforgács előállításához a nyúl vázizom darabokat EDTA-val kiöblített darálón ledaráltuk, majd tizenöt percig kevertük KCl pufferben (3 ml/mg, 0,15 M KH_2PO_4, 0,15 M K_2HPO_4, 0,1 M KCl, pH 6,5; 4 °C). Ezt követően a forgácsot tíz percig $NaHCO_3$ oldatban kevertük (2 l, 0,05 M $NaHCO_3$, 4 °C)és gézen átszűrtük, ezt követte az EDTA-val történő mosás (1 l, 1 mM EDTA, pH 7,0; 10 perc, 4 °C), majd 2 x 5 perc desztillált vízben való mosás (2 l, 4 °C), végül 5 x 10 perces acetonos mosás (1 l, szobahőmérsékleten). Az így kapott forgácsot éjszakán át elszívó fülke alatt szárítottuk, és felhasználásig –20 °C-on tároltuk.

A második lépésben az aktin izolálása történt aktinforgácsból, közvetlenül a kísérletek előtt (Mossakowska et al. 1988; Spudich and Watt 1971). Az aktinforgácsból 30, majd szűrés után 10 percig alacsony ionerősségű oldattal vontuk ki az aktint (20 ml/g, 2 mM Trisz.HCl, 0,2 mM Na_2ATP, 0,5 mM DTT, 0,2 mM $CaCl_2$, 0,005 % NaN_3, pH 8,0; 0 °C). Ezt követte egy tisztító centrifugálás (20 000 *g*, 30 perc, 4 °C). A felülúszót 2 órán át polimerizáltuk (50 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, 4 °C), majd a tropomiozint kisóztuk KCl-dal (0,6 M KCl végkoncentráció) fél órás gyenge keverés mellett. Az polimerizált aktint centrifugálással pelletáltuk (100 000 *g*, 2 óra, 4 °C), kétórányi duzzasztás után homogenizáltuk és éjszakán át dializáltuk ATP tartalmú alacsony ionerősségű oldattal szemben (A-oldat), hogy depolimerizálódjon az aktin (2 mM Trisz.HCl, 0,2 mM Na_2ATP, 0,2 mM $CaCl_2$, 0,005 % NaN_3, pH 8,0; 4 °C). Ezt követően centrifugálással (100 000 *g*, 2 óra, 4 °C) távolítottuk el a nem

depolimerizálódott filamentumokat. A G-aktin koncentrációját fotometriával határoztuk meg, az abszorpciós koefficienst 290 nm-en 0,63 $mg \cdot ml^{-1} \cdot cm^{-1}$-nek (Houk and Ue 1974) és a molekula tömegét 42 300 Da-nak tekintettük (Elzinga et al. 1973).

3.3.2 Az aktin spinpróbával való jelölése

A jelölést aktin polimereken végeztük (2 mg/ml G-aktin koncentráció), mert ilyen körülmények között a jelölő a filamentum felszínéhez közel lévő ciszteins-374-es aminosav oldalánchoz specifikusan kötődik. A reakció 0 °C-on, 1 mol aktin monomer : 1,2 mol MSL arány mellett 1 órán keresztül, folytonos keverés közben ment végbe. A jelölést ultracentrifugálással (100 000 *g*, 2 óra, 4 °C) állítottuk le. A pelletet duzzasztás után homogenizáltuk, majd éjszakán át A-oldattal szemben történő dializálással depolimerizáltuk. Az így kapott jelölt G-aktint ultracentrifugálással tisztítottuk (100 000 *g*, 2 óra, 4 °C).

3.3.3 Az aktin fluorofórokkal történő jelölése

A jelölés IAEDANS jelölő esetén is F-aktinon történt, hogy szelektíven jelölhessük a cisztein-374-es aminosav oldalláncot (Miki et al. 1987b). A reakció szobahőmérsékleten, 1 órán keresztül 1 mol aktin monomer: 10 mol IAEDANS jelölő arány mellett ment végbe. A jelölést 1 mM MEA jelenlétében centrifugálással állítottuk le (100 000 *g*, 2 óra, 4 °C). A centrifugálást követően a pelletet duzzasztottuk, homogenizáltuk, majd éjszakás A-oldattal szembeni dialízissel depolimerizáltuk. A jelölt monomereket ultracentrifugálással tisztítottuk (100 000 *g*, 2 óra, 4 °C). A jelölési arány meghatározásakor az IAEDANS abszorpciós koefficiensét 336 nm-en 6100 $M^{-1} \cdot cm^{-1}$-nek tekintettük (Houk and Ue 1974).

A glutamin-41-es aminosav oldalláncot monomer aktinon jelöltük FC-nel (Takashi 1988). A jelölés 4 °C-on, 1 mg/ml TGáz jelenlétében, 16 órán keresztül zajlott tízszeres moláris feleslegben lévő FC jelölő mellett. A jelölés leállításához az aktint polimerizáltuk (végkoncentrációban 100 mM KCl és 2 mM $MgCl_2$), majd centrifugáltuk (100 000 *g*, 2 óra, 4 °C). A depolimerizáció megegyezett az MSL és IAEDANS jelölésnél leírtakkal. A jelölési arány meghatározásakor a FC abszorpciós koefficiensét

493 nm-en 75500 $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ -nek tekintettük (Hudson and Weber 1973; Lorand et al. 1983).

Az aktin cisztein-374-es aminosav oldalláncának IAF-fel történt jelölését monomer aktinon végeztük. A jelölést 20-25 órán keresztül 4 °C -on végeztük, a jelölő : aktin molarány 15 : 1 volt. A jelölés leállítása megegyezett az FC jelölésnél leírtakkal. A jelölési arány meghatározásához az IAF abszorpciós kofficiensét 496 nm-en 77 000 $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ -nek tekintettük (Takashi 1979).

Az intermonomer FRET vizsgálatokhoz a nem jelölt, a donorral jelölt és az akceptorral jelölt monomereket (ismerve a jelölési arányokat) megfelelő arányban összekeverve, majd polimerizálva hoztuk létre a méréseinkhez szükséges donor, akceptor, aktin koncentrációt a filamentumban.

3.3.4 Kation- és nukleotidcsere aktinon

A kation- és nukleotidcsere aktin monomereken történt. A preparálási eljárás miatt kalciumot és ATP-t kötő monomerekben a kationt a fiziológiás körülményeket jobban megközelítő Mg^{2+} -ra cseréltük EGTA és $MgCl_2$ hozzáadásával (0,2 mM EGTA és 0,1 mM $MgCl_2$ végkoncentrációban, 10 perc, szobahőmérsékleten) (Nyitrai et al. 1997; Strzelecka-Golaszewska et al. 1993). A kationcserét követte a nukleotidcsere, amit ADP-glükóz-hexokináz rendszerrel végeztünk (1 mM ADP, 30 U/ml hexokináz, 25 mM glükóz, 1 óra, 4 °C) (Drewes and Faulstich 1991).

3.3.5 Az aktin polimerizációja

Az aktin polimerizációjakor az ATP-t, vagy az ADP-t kötő monomert tartalmazó mintákhoz 2 mM $MgCl_2$-ot és 100 mM KCl-ot adtunk (végkoncentrációk). Mivel az ADP -t tartalmazó monomerek polimerizációja lényegesen lassabb, ezért az – intermonomer dinamikai sajátságokra vonatkozó – méréseket megelőző polimerizációt szobahőmérsékleten, 12 órán keresztül végeztük. Ha a mérések falloidin jelenlétében történtek, akkor a mérések előtt – a filamentumok stabilizálása érdekében – az aktin filamentumokat szobahőmérsékleten, 4 órán keresztül inkubáltuk a monomer koncentrációjával egyező mennyiségű falloidinnel.

3.3.6 ATPáz aktivitás mérés

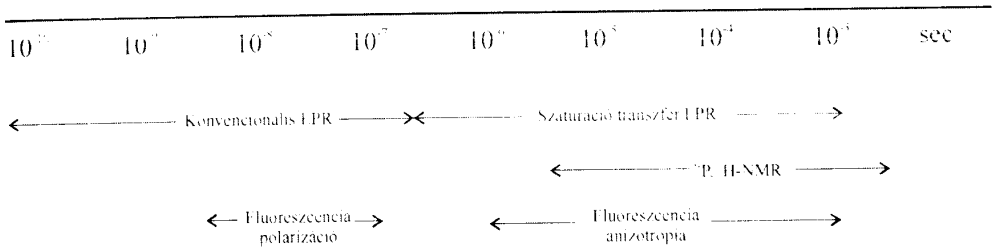
A rostok és a miozin fejek ATPáz aktivitását az ATP hidrolízisekor keletkező anorganikus foszfát mennyiségének meghatározásával számítottuk. A meghatározást két színváltozáson alapuló módszerrel végeztük el.

Trentham és munkatársai által kidolgozott piruvát-kináz - laktát-dehidrogenáz kapcsolt optikai módszert rostok ATPáz aktivitásának meghatározásához alkalmaztuk (Trentham et al. 1972). A reakció NADH-t, foszfoenol-piruvátot, piruvát-kinázt és laktát-dehidrogenázt tartalmazó közegben játszódott le (100 mM KCl, 20 mM MOPS, 1 mM $MgCl_2$, 0,5 mM EGTA, 0,15 mM NADH, 1 mM foszfoenol-piruvát, 20 U/ml piruvát-kináz, 40 U/ml laktát-dehidrogenáz, 0,5 mM ATP, pH 7,0, Mg^{+2} -ATPáz meghatározáshoz; és a Ca^{2+} - Mg^{+2} meghatározáshoz 1 mM $CaCl_2$ -ot is tartalmazott). A mérés során a NADH fogyását követtük nyomon 340 nm-en tíz percen keresztül, számítógéphez kapcsolt fotométerrel (Shimadzu UV-2100). A méréshez használt megközelítőleg 8-10 mg (nedves) tömegű rostkötegek platina vázra voltak feltekerve úgy, hogy ne kerüljenek a fényútba, és enyhén megfeszüljenek. A mérés folytonos keverés mellett történt. A NADH fogyásának mértékében az abszorpciót az idő függvényében ábrázolva egy egyenest kaptunk, melynek meredekségéből határoztuk meg az ATP hidrolízis mértékét. A számolás során feltételeztük, hogy a rostok száraz tömegének 50 % -a miozin. A NADH abszorpciós koefficiensét 340 nm-en $6{,}22 \cdot 10^3 \cdot M^{-1} \cdot cm^{-1}$-nek tekintettük.

Miozin és S1 molekulák ATPáz aktivitásának méréséhez Lanzetta és munkatársai által kidolgozott anorganikus foszfát meghatározás módszerét használtuk (Lanzetta et al. 1979). A vizsgálat során az ATP hidrolízis 0,02 mg/ml fehérjét tartalmazó pufferben játszódott le (K^+/EDTA ATPáz esetén 0,6 M KCl, 50 mM TES, és 10 mM EDTA, míg Ca^{2+} -ATPáz esetén EDTA helyett 9 mM $CaCl_2$ volt a pufferoldat összetétele). A mintában 1, 2, 4, 6, 8, perc alatt keletkezett Pi mennyiségét ammónium-molibdenátot és malachit zöldet tartalmazó oldat 660 nm-en detektált abszorpciójának mérésével határoztuk meg. A keletkezett anorganikus foszfát mennyisége egyenesen arányos az abszorpció mértékével, a keletkezett Pi koncentrációja kalibrációs görbe segítségével volt meghatározható.

3.4 Spektroszkópiai módszerek

A molekulák mozgási tulajdonságainak vizsgálatára többféle spektroszkópiai módszer áll rendelkezésre. A módszerek közös tulajdonsága, hogy a vizsgált anyagnak az elektromágneses sugárzással történő kölcsönhatását detektálja. A mérés során előálló spektrum alakja függ a molekula mozgásától. Attól függően, hogy milyen időtartammal jellemezhető a molekula forgása (egységnyi térszöggel való elfordulása), más és más spektroszkópiai módszer alkalmas a vizsgálatra. A 5. ábra a molekula forgási sebességét és a tanulmányozására alkalmas néhány spektroszkópiai módszert mutatja.



5. ábra: Néhány spektroszkópiai módszer "időablaka".

A vizsgált fehérjék strukturális és dinamikai tulajdonságainak jellemzésére az elektronparamágneses (EPR) vagy elektronspin rezonancia (ESR) spektroszkópia, valamint a fluoreszcencia spektroszkópia módszerét használtuk.

3.4.1 EPR spektroszkópia

A EPR spektroszkópia az elektromágneses kölcsönhatásokat vizsgáló spektroszkópiai módszerek egyike. Alkalmazása során a vizsgált rendszernek rendelkeznie kell párosítatlan spinű elektronnal. A biológiai rendszerek néhány kivételtől eltekintve általában nem rendelkeznek stabilan (tartósan) jelen levő párosítatlan elektronokkal, ezért közvetlen EPR spektroszkópiai vizsgálatra nem alkalmasak. A kivételek közé egyes fémionokat tartalmazó fehérjék tartoznak pl.: hemoglobin, mioglobin, ceruloplazmin, szuperoxid dizmutáz, stb.

A párosítatlan elektronokkal nem rendelkező biológiai rendszerek EPR vizsgálatához ezért a spinjelölés vagy a spincsapdázás technikáját kell alkalmazni. Munkánkban spinjelölést alkalmaztunk, melynek során egy stabil paramágneses jelölőt kötöttünk kovalensen egy célzott aminosav oldalláncho z. Ezek a stabil paramágneses jelölők általában nitroxid szabadgyököt tartalmazó piperidin, pirrol, pirrolidin vagy oxazolin molekulák. A jelölő molekulán megkülönböztethető a spektroszkópiailag aktív rész, ez a nitroxid csoport, amely a párosítatlan elektront tartalmazza, valamint a kémiailag aktív rész, amellyel a molekula kapcsolható a célzott aminosav oldalláncho z. A jelölőn található párosítatlan elektron 2pπ molekulapályájának magneses térhez viszonyított orientációja meghatározza a mágneses térrel való kapcsolatát. Ez tükröződik a detektált spektrum alakjában és a csúcsok helyében. Ha teljesül az, hogy a jelölő mereven kapcsolódik a fehérjéhez, akkor a kapott spektrum azon molekulaszegmens mozgását, rendezettségét, mintán belüli irányítottságát tükrözi, amelyhez a jelölő kismolekula kötődött.

3.4.2 Az EPR spektrumok analízise

Az EPR spektrumok alakjából következtetni lehet a vizsgált objektum forgási tulajdonságaira. Sebességük szerint a forgások három csoportba sorolhatók:

- A gyors forgás tartománya, ahol a rotációs korrelációs idő (τ_r) 10^{-12} - 10^{-9} s közötti, a gyök forgása izotróp, a spektrumvonalak jól elkülönültek és keskenyek. Ebben az esetben a spektrumból a rotációs korrelációs idő az alábbi egyenlettel számolható (Eletr and Inesi 1972; Kivelson 1960):

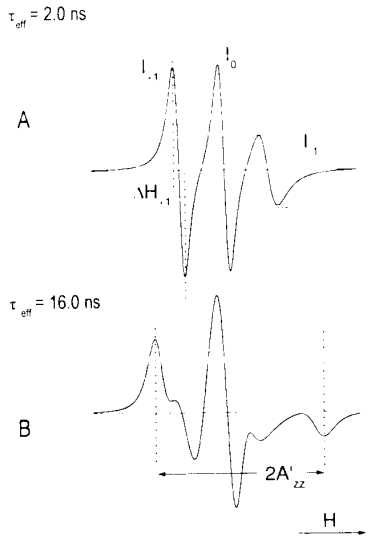
$$\tau_r = 6{,}65 \cdot 10^{-10}\, \Delta H_{+1}\, ((I_{+1} / I_{-1})^{1/2} - 1)$$

ahol τ_r a rotációs korrelációs idő, ΔH_{+1} az alacsony terű csúcs szélessége, I_{-1} az alacsony terű és I_{+1} a magas terű csúcs intenzitása (*6. ábra*).

- A lassú forgás tartománya, ahol a τ_r 10^{-9} - 10^{-6} s-os tartományba esik, a spektrumvonalak kiszélesedtek, ebben az esetben a rotációs korrelációs időt a Goldman formula segítségével számolhatjuk (Goldman et al. 1972):

$$\tau_r = a\,(1-(2A'_{zz}/2A_{zz}))^b$$

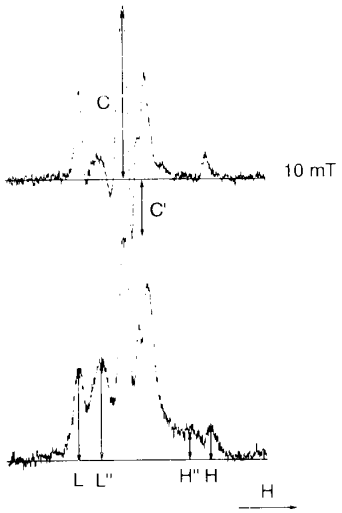
ahol $2A'_{zz}$ a minta spektrumának hiperfinom csatolási állandója (*6. ábra*), a $2A_{zz}$ pedig a mozgásmentes állapothoz, az ún. rigid limithez tartozó hiperfinom csatolási állandó értéke. Brown diffúziót feltételezve a konstansok értékei: a = 5,4 · 10^{-10} s és b = -1,36 (Goldman et al. 1972).



6 ábra: A gyors (A) és a lassú (B) forgás tartományára jellemző konvencionális EPR spektrumok. A jelölések a rotációs korrelációs idő számításához szükséges paramétereket jelölik.

- az igen lassú forgás tartománya (ST EPR technika), ahol a τ_r 10^{-6} - 10^{-3} s közötti. Ebben az esetben a spektrumok detektálása is és értékelése is eltér az előbbiektől. A spektrumok mérése során a mikrohullámú teljesítményt úgy kell megválasztani, hogy létrejöjjön a spinrendszer részleges telítődése (félszaturációs érték), és ilyen körülmények között a második harmonikus 90°-os fázissal eltolt abszorpciós spektrumát detektáljuk. A rotációs korrelációs idő meghatározásához a spektrumban megjelenő diagnosztikus csúcsok arányait (L''/L, C''/C és H''/H) kell összehasonlítani

spin jelölt hemoglobin rendszer ST EPR spektrumainak segítségével készített kalibrációs diagrammok értékeivel. A kalibrációs diagrammok a hemoglobin rendszerre számított rotációs korrelációs időket tartalmazzak feltételezve a hemoglobin gömbszimmetriáját (Horváth and Marsh 1988; Hyde and Dalton 1979; Marsh 1981; Thomas et al. 1975).



7. ábra: Az igen lassú forgás tartományára jellemző szaturáció transzfer (ST) EPR spektrumok. L és L'', C és C', H'' és H a rotációs korrelációs idő meghatározásához szükséges diagnosztikus csúcsokat jelölik.

Spin szondával jelölt fehérjéinket Bruker ESP 300E típusú elektronparamágneses rezonancia spektrométerrel vizsgáltuk. Konvencionális EPR mérésekhez 100 kHz modulációt, 0,1-0,2 mT modulációs amplitúdót és 20 mW mikrohullámú teljesítményt használtunk.

A szaturáció transzfer EPR (ST EPR) technikával a spektrumokat 63 mW mikrohullámú teljesítményen, 50 kHz moduláció és 0,5 mT modulációs amplitúdó mellett, 100 kHz out-of-phase detektálással rögzítettük.

3.4.3 Fluoreszcencia spektroszkópiai mérések

Fluoreszcencia méréseinket Perkin-Elmer LS50B típusú spektrofluorométerrel

végeztük. Az IAEDANS fluoreszcencia emissziójának időfüggését 350 nm-es gerjesztési hullámhossz mellett 480 nm-en detektáltuk. Az optikai rés 3 nm volt mind a gerjesztési mind az emissziós oldalon. Kation- és nukleotidcsere hatását a jelölt monomer aktinon a fluoreszcencia intenzitás változásával követtük nyomon. A kationcsere létrejöttét az intenzitás változás megszűnése jelezte. Ezt követte a nukleotidcsere a megfelelő mennyiségű glükóz, ADP és hexokináz hozzáadásával. Az IAEDANS fluoreszcencia intenzitását méréseink során egy órán keresztül követtük nyomon. Ahhoz, hogy a nukleotidcsere folyamán esetlegesen bekövetkező nem kívánt hatásokat jellemezni tudjuk, mértük az egyes komponensek külön-külön hozzáadására detektálható változásokat.

A donor (IAEDANS) és az akceptor (FC) molekulák között létrejövő fluoreszcencia rezonancia energia transzfer (FRET) hatásfoka (E), a donornak, akceptor molekulák jelenlétében valamint hiányában mért fluoreszcencia intenzitásaiból számolható:

$$E = (F_{DA}/F_D) / \beta$$

ahol F_D a donor fluoreszcencia intenzitása akceptor nélkül, F_{DA} a donor fluoreszcencia intenzitása akceptor jelenlétében és β az akceptor molekula jelölési aránya. Az IAEDANS emisszióját 470 nm-en mértük, hogy ezzel elkerüljük az akceptor járulékát a mért emisszióhoz.

A donor és az akceptor közötti távolság FRET hatásfokból történő meghatározásához ismernünk kell a Förster-féle kritikus távolságot (R_0). (Definíció szerint a Förster-féle kritikus távolságnak az a donor-akceptor (R) távolság felel meg, ahol a transzfer hatásfok 50 % -nak adódik). Az R_0 meghatározható az alábbi egyenlet szerint:

$$R_0^6 = (8{,}79 \cdot 10^{-11}) n^{-4} \kappa^2 \phi_D J$$

ahol n a közeg törésmutatója, κ^2 az orientációs faktor, ϕ_D a donor fluoreszcencia kvantumhatásfoka akceptor nélkül, és J az átfedési integrál a donor emissziós és az akceptor abszorpciós spektruma között. Az aktin filamentum vizsgálatakor a

törésmutató értéke (n) 1,4, az orientációs faktor értéke pedig (κ^2) 2/3 volt. A donor fluoreszcencia kvantumhatásfokának meghatározásához a fluoreszcencia intenzitását 400 nm és 700 nm hullámhossz tartományban detektáltuk, referenciának kinin-szulfát oldatot használtuk (kinin-szulfát 1 M-os NaOH oldatban).

Ha meghatároztuk a transzfer hatásfokot (E) és a kritikus Förster távolságot (R_0), akkor a donor-akceptor távolság (R) egy donor - egy akceptor rendszerben meghatározható a következő egyenlet alapján:

$$E = R_0^6 / (R_0^6 + R^6)$$

A FRET hatásfok kapcsolatba hozható az energiatranszferre jellemző sebességi állandó várható értékével $<k_t>$, amely megfelelő paraméter a lokális fluktuációk makromolekulákon történő vizsgálatához (Somogyi et al. 1984). A normalizált FRET hatásfok (f') felírható az alábbi alakban:

$$f' = E / \phi_{DA}$$

így $<k_t>$ kísérleti mérésekből meghatározható.

Az IAEDANS steady-state fluoreszcencia anizotrópiája érzékeny a fluorofór mikro-környezetének változásaira. Értékét a polarizált emissziós komponensek (F_{VV}, F_{VH}, F_{HV} és F_{HH}, ahol a V (vertikális) és H (horizontális) index a gerjesztési illetve emissziós irányokat jelzi) ismeretében az alábbi képlet alapján határoztuk meg:

$$r = (F_{VV} - GF_{VH}) / (F_{VV} + 2GF_{VH})$$

ahol $G = F_{HV} / F_{HH}$. A gerjesztési és emissziós hullámhossz 350 illetve 480 nm, és az optikai rés mindkét oldalon 3 nm-es volt.

A fluoreszcencia élettartam és anizotrópia lecsengés méréseket ISS K2 multifrekvenciás fázis-fluoriméterrel (ISS Fluorescence Instrumentation, Champaign, IL, USA) ún. keresztkorrelációs módszerrel végeztük. Fényforrásként 300 W-os xenon-lámpát alkalmaztunk, fényét Pockel-cella közbeiktatásával moduláltuk. A modulációs frekvenciát fluoreszcencia élettartam mérésekben 2 és 80 MHz között, míg anizotrópia

lecsengés mérésekor 2 és 120 MHz között változtattuk. Referenciaként frissen készített glikogén oldatot (0 ns) használtunk. A vizsgált minta fluoreszcencia paramétereit illesztéssel határoztuk meg (ISS187 Decay Analysis Software). Az illesztés jóságát az ún. redukált χ^2 értékek számításával jellemeztük (Lakowicz 1983). Az így kapott paraméterek segítségével az átlagos fluoreszcencia élettartam az alábbi egyenlet alapján számolható:

$$\tau_{atl} = (\Sigma\, \tau_i^2\, \alpha_i) / (\Sigma\, \tau_i\, \alpha_i)$$

ahol τ_i a fluoreszcencia élettartam komponenseket, míg α_i a komponensek amplitúdóját jelöli. Az anizotrópia lecsengés vizsgálatakor több exponenciális folyamat összegét tételeztük fel (Belford et al. 1972). Például két exponenciális komponens alkalmazásakor az anizotrópia lecsengés a következő alakban írható fel:

$$r(t) = r_0\, [g_1 \exp(-t/\varphi_1) + g_2 \exp(-t/\varphi_2)]$$

ahol r_0 a határanizotrópia, φ_1 és φ_2 a rotációs korrelációs idők valamint g_1 és g_2 a komponensekhez rendelhető amplitúdók.

Az aktin filamentumokban található cisztein-374-es aminosav oldallánc radiális koordinátáját a FRET kísérletek segítségével határoztuk meg 22 °C-on. A kísérlet során ez a cisztein oldallánc vagy donor, vagy akceptor molekulával volt jelölve, és a monomerek megfelelő arányban való összekeverésével előállítható volt a kívánt donor - akceptor arány. A polimerizációt követően a radiális koordináta a FRET hatásfok akceptor molaránytól függő változásából volt meghatározható. (Az akceptor molarány alatt az akceptorral jelölt monomer koncentrációjának arányát értjük a filamentumban levő teljes aktin monomer koncentrációjához viszonyítva). A meghatározás menete feltételezi a monomerek random beépülését a filamentumba polimerizációkor (Moens and dos Remedios 1997). A donor–akceptor elrendezés definiálásához öt monomert vettünk figyelembe úgy, hogy a központi monomert donor molekulával jelöltnek tekintettük, aminek m számú lehetséges akceptor szomszédja van (ahol m 0 és 4 közötti egész szám, a monomerek aktin filamentumban való elrendeződése miatt). Ilyen geometriai feltételek mellett 16 lehetséges elrendeződés alakulhat ki. Az akceptor

molarányát γ-val jelölve, m akceptor esetén egy elrendeződés valószínűsége az alábbi egyenlet szerint számolható:

$$p_m = \gamma^m (1 - \gamma)^{(4-m)}$$

Adott akceptor molarány (γ) esetén a teljes transzfer hatásfok az egyes hatásfokok súlyozott összegével kapható meg:

$$E = \Sigma (p_m E_m)$$

ahol E_m a transzfer hatásfok az m-dik elrendeződésben. A számolás során figyelembe kell venni annak a lehetőségét, hogy egy donor több akceptorral is létrehozhat energiatranszfert. Ezért az energiatranszfer hatásfoka módosul:

$$E = \Sigma (R_0/R_n)^6 / \{1 + \Sigma (R_0 / R_n)^6\}$$

ahol R_n jelenti az individuális donor - akceptor távolságot. Az egyes donor és mellettes akceptor távolság számolható, így az összesített transzfer hatásfok értéke megadható. A számolásokhoz az aktin filamentum geometriai paramétereit is figyelembe kellett venni, ezért az aktin genetikai hélixének fél menetemelkedését 27,5 Å -nek és az aktin monomerek relatív fordulását a hélix mentén 166°-nak tekintettük. Ha a radiális koordináta r, akkor az egyes (individuális) távolságok (R_n) az alábbi egyenlet szerint számolhatók (Taylor et al. 1981):

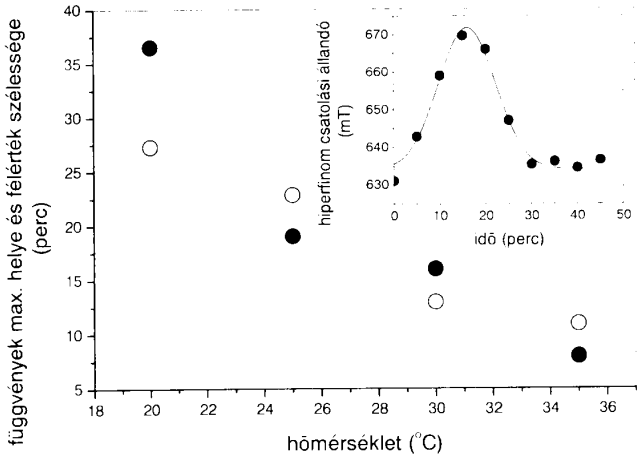
$$R_n = \{r^2 (1 - \cos (n \times 166^o))^2 + r^2 \sin^2 (n \times 166^o) + (n \times 27,5)^2)\}^{1/2}$$

Az egyenletet algoritmusként használva a szimulált adatok illeszthetők a kísérleti eredményekhez. Az illesztési eljárás során az egyetlen meghatározandó (szabad) paraméter a radiális koordináta. Az illesztő algoritmushoz MATLAB 5.2 programot használtunk. (MathWorks Inc., Natick, MA, USA).

4. Eredmények

4.1 Eredmények aktin monomereken

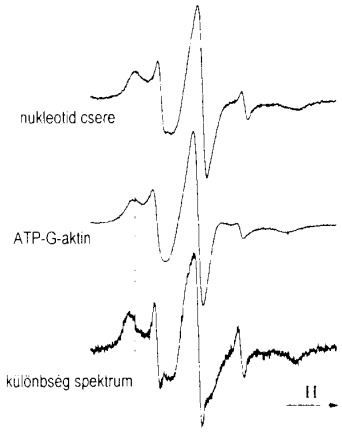
Konvencionális EPR technikával vizsgáltuk a nukleotidcsere aktin monomerre gyakorolt hatását. Vizsgálatainkban a cisztein-374-es aminosaván maleimid spinjelölt G-aktint használtunk. A megfelelően merev kapcsolat lehetővé tette az aktin monomerek rotációs mozgásváltozásának nyomon követését a nukleotidcsere során. A kísérletekben a jelölési arány 0,91 ± 0,07 mol/mol, a nem specifikusan kötődött (mobilis) jelölő mennyisége kevesebb mint 5 % volt. A hiperfinom csatolási állandó ATP-G aktin esetén 6,40 mT-nak adódott 20 °C-on, ez 19,6 ns-os rotációs korrelációs időnek felel meg, ami jó egyezést mutat a korábbi mérési adatokkal (Nyitrai et al. 1997). A hiperfinom csatolási állandó ($2A'_{zz}$) idő és hőmérséklet függését a nukleotidcsere elindításától követtük nyomon.



8. ábra: Nukleotidcsere hatása az ADP-G-aktin hiperfinom csatolási állandójára. A hiperfinom csatolási állandó időbeni változását közelítő Gauss függvény maximum helyét (teli kör) és félértékszélességét (üres kör) ábrázoltuk a hőmérséklet függvényében. A beillesztett ábra a hiperfinom csatolási állandó változását mutatja az idő függvényében. Nulla időpillanatnak a nukleotidcsere indítását tekintettük.

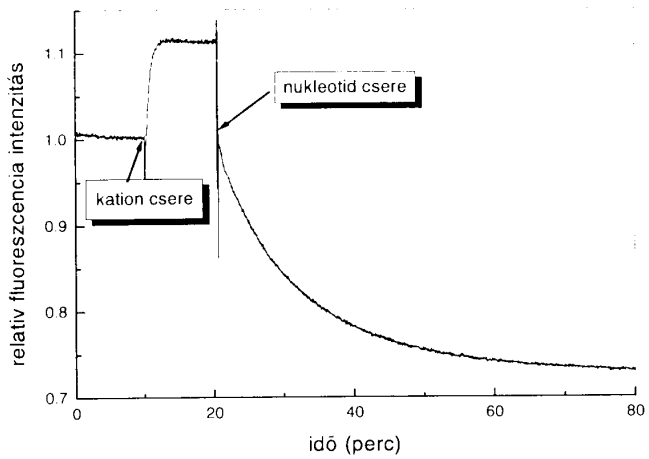
20 °C alatti hőmérsékleten a nukleotidcsere nem gyakorolt mérhető hatást az aktin monomerek hiperfinom csatolási állandójára, azonban 20 és 35 °C között a csatolási állandó jelentős változást mutatott. A nukleotidcsere indítását követően $2A'_{zz}$ értéke növekedett, majd néhány perc elteltével lecsökkent, megközelítve a kiindulási értéket. Négy különböző hőmérsékleten meghatározva a hiperfinom csatolási állandó értékének időfüggését (20, 25, 30 és 35 °C) az adatok Gauss függvénnyel közelíthetők voltak. Valamennyi hőmérsékleten elvégeztük az illesztést, és a görbékhez tartozó, a maximum helyeit valamint a félértékszélességeket a hőmérséklet függvényében ábrázoltuk. (*8. ábra*). Látható, hogy a hőmérséklet emelkedésével a $2A'_{zz}$ szélsoerteke hamarabb állt elő és a félértékszélesség csökkent.

Az átmeneti aktin populáció meghatározásához a kiindulási (ATP-G-aktin) spektrumból kivontuk a változás maximumán gyűjtött spektrumokat digitális spektrum manipuláció segítségével (*9. ábra*). A különbség spektrumokban azonosítottunk egy olyan aktin populációt, melynek a csatolási állandója (6,779 ± 0,04 mT) megközelítette a filamentális aktinban mérhető értékeket (6,787 mT). A két populáció aránya a spektrumok kettős integráljával meghatározható volt, arányuk: 0,500 ± 0,086.



9. ábra: MSL jelölt Mg-ATP-G-aktin konvencionális EPR spektrumai. A legfelső spektrumot a nukleotidcsere indítását követő 30. percben rögzítettük. A középső spektrum a nukleotidcserét megelőző állapotot mutatja. A különbségi spektrumot digitális spektrumanalízissel, a két spektrum egymásból történt kivonásával állítottuk elő. Az így azonosított aktin populáció csatolási állandója 6,779 mT volt.

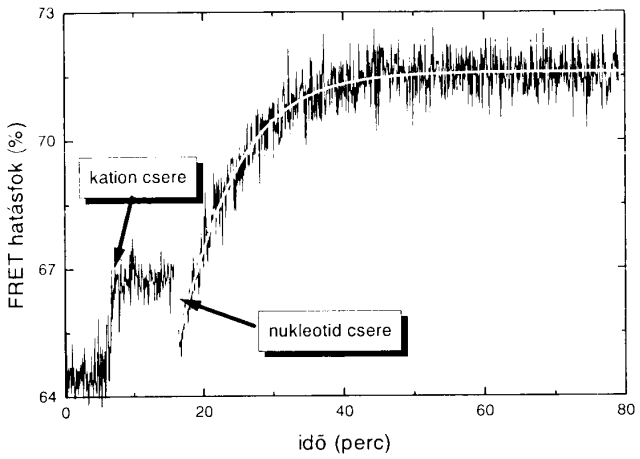
Fluoreszcencia spektroszkópiai vizsgálataink során az aktin monomerek cisztein 374-es aminosav oldalláncához IAEDANS volt fluorofórként kovalensen kapcsolva. A fluorofór steady-state fluoreszcencia anizotrópiája a nukleotidcserét követő egy órában nem mutatott változást, azonban a fluoreszcencia intenzitása Ca^{2+} – Mg^{2+} csere eredményeként 10 %-kal megnövekedett, viszont nukleotidcsere hatására megközelítőleg 35 % -kal csökkent az első órában, 20 °C-on (*10. ábra*). A csökkenés 8-9 % -a közvetlenül a nukleotidcseréhez szükséges komponensek hozzáadásakor jelentkezett, ami a kontroll kísérletek eredménye szerint a fehérje oldat megváltozott optikai tulajdonságaiból adódott. Az első órában tapasztalt csökkenő tendencia az indítást követő 12. órában is nyomonkövethető volt.



10. ábra: Az aktin cisztein-374-es aminosav oldalláncához kapcsolt IAEDANS molekula fluoreszcencia intenzitásának időbeli változása kation és nukleotidcsere hatására. A gerjesztési hullámhossz 350 nm, az emissziós hullámhossz 480 nm, az optikai rés mindkét oldalon 3 nm volt.

A folyamat kinetikájának meghatározásához egy, két és három exponenciális komponenst tartalmazó függvényeket illesztettünk az adatokhoz. A legjobb illesztést két exponenciális komponenst tartalmazó függvény eredményezte. Eszerint az intenzitáscsökkenésért két folyamat felelős, amelyek megfeleltethetők két, különböző sebességgel lejátszódó, konformációváltozásnak. A gyors folyamat féléletideje 25 perc 20 °C-on, míg a lassú komponensé órákban mérhető, és kinetikája jó egyezést mutat mások által kozolt eredményekkel (Drewes and Faulstich 1991).

A fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer méréseink során a cisztein-374-es aminosavhoz kötött IAEDANS molekula donorként szolgált, és a FC-t használtunk akceptorként, ami az aktin szubdomén II-n található glutamin-41-es aminosavhoz kapcsolódott kovalensen. A transzferhatásfok a kationcserét követően 65 % -ról 67 %-ra nőtt, ami megegyezett a korábban közölt adatokkal (Nyitrai et al. 1998), majd a nukleotidcsere során tovább emelkedett 72 %-ra 20 °C-on. A transzfer hatásfok növekedés harminc perc alatt lezajlott, ezt követően már nem detektáltunk változást (*11. ábra*).

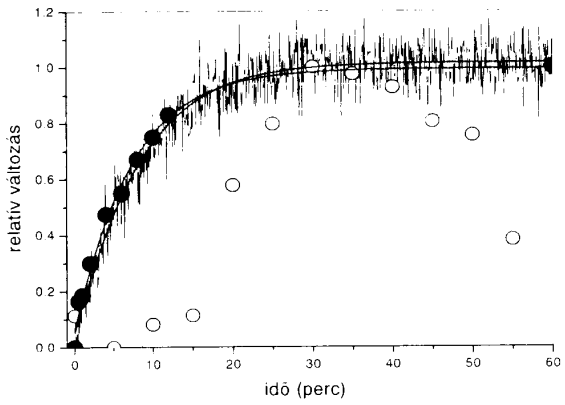


11. ábra: A FRET hatásfok változás időfüggése kation és nukleotidcsere során 20 °C-on. Az aktin cisztein-374-es aminosavához kapcsolt IAEDANS molekula donorként és a glutamin-41-es aminosavhoz kapcsolt FC molekula akceptorként szolgált. A gerjesztési hullámhossz 350 nm, az emissziós hullámhossz 480 nm az optikai rés 3 nm volt.

Az IAEDANS fluoreszcencia élettartamának meghatározásához a nukleotidcserét követő 10., 35., 60. percben indítottuk a méréseket. Az így kapott átlagos fluoreszcencia élettartam csökkenő tendenciát mutatott 17,4 ± 0,4; 16,7 ± 0,4; 16,4 ± 0,3 ns. Ez a csökkenő tendencia egyezést mutat az IAEDANS steady-state fluoreszcencia emissziójának kinetikájával. Az ATP-vel telített aktin monomerek átlagos fluoreszcencia élettartama 19,1 ± 0,3 ns volt. Mivel a nukleotidcsere során bekövetkező változás a cserét követő 15-20 percben befejeződik, ezért az élettartamra és a rotációs korrelációs időre vonatkozó mérések eredményei csak kvalitatív összehasonlítást tesznek lehetővé.

A fluoreszcencia anizotrópia lecsengés méréseinket szintén a nukleotidcserét követő 10., 35., 60. percben indítottuk. Az eredményekből megállapítottuk, hogy két aktin populáció van jelen a mérés során. Az egyik populációt a – Mg-ATP-G-aktinnal megegyező fluoreszcencia életidővel rendelkező monomer formában lévő aktin alkotja, míg a másik populáció egy hosszabb 52 ± 5 ns-os rotációs korrelációs idővel rendelkező formából áll.

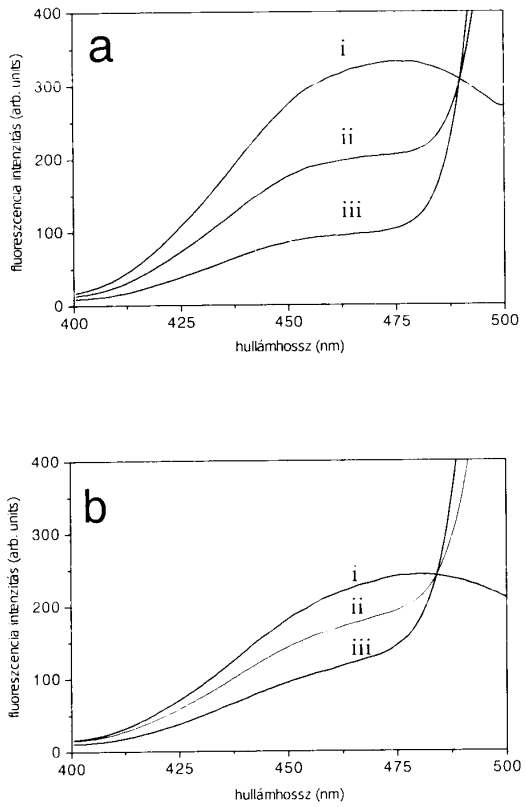
Biolumineszcenciás mérésekkel ellenőriztük a nukleotidcsere hatékonyságát, mérve az ATP koncentrációjának változását aktin monomerek jelenlétében és hiányában. A mérések körülményei megegyeztek a spektroszkópiai mérésekével. Aktin távollétében a kezdeti 200 μM-os ATP koncentráció 30 másodperc alatt a mérhető szint alá csökkent hőmérséklettől függetlenül, ezzel szemben aktin jelenlétében a kezdeti gyors ATP fogyást felváltotta egy lassabb, ami feltételezéseink szerint abból adódott, hogy csak a monomerek által kötésben tartott ATP disszociációja után vált hozzáférhetővé a glükóz–hexokináz rendszer számára. Ha az igaz, hogy a lassúbb ATP fogyás megfeleltethető a monomerekben kötött ATP mennyiségének felszabadulásával, akkor kalkulálhatóvá válik az ATP-t kötő aktin monomerek koncentrációja, és így a teljes monomer koncentráció ismeretében az ADP-t kötő aktin monomerek koncentrációja is. Az így számolt ADP-aktin koncentrációkat mutatja – egyebek mellett – a 12. ábra.



12. ábra: A FRET hatásfok- (összefüggő vonal), a hiperfinom csatolási állandó- (üres kör), és a számított ADP-aktin koncentráció (teli kör) relatív változásának összehasonlítása az idő függvényében. A relatív változás számításakor a 20 °C-on gyűjtött egyes adatsorokat osztottuk az adatsorhoz tartozó legnagyobb értékkel. Nulla időpillanatnak a nukleotidcsere indítását tekintettük.

4.2 Eredmények aktin filamentumon

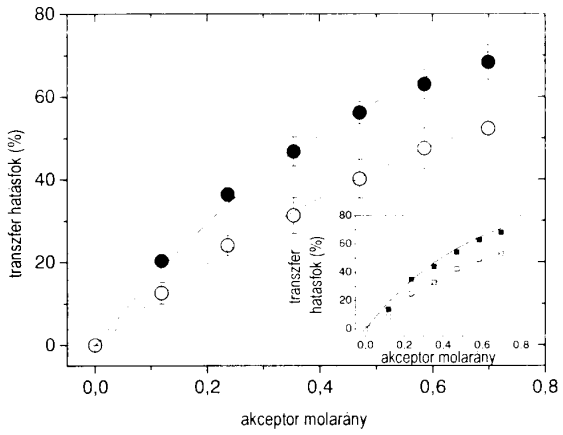
Élő sejtekben az aktin két alapvető formában lehet jelen: monomer és filamentózus aktinként. Az aktin polimerizációja együtt jár az ATP-t kötő aktin monomerek nukleotidjának hidrolízisével, bár az ATP jelenléte a monomerben nem esszenciális, mert az ADP-t kötő monomerek is polimerizálhatók. Monomereken történt nukleotidcsere vizsgálataink folytatásaként a kétféle (különböző) nukleotidot tartalmazó monomerekből polimerizált filamentumok flexibilitásbeli különbségét vizsgáltuk fluoreszcencia spektroszkópia módszerével.



13. ábra: Az IAEDANS molekula ATP (a) és ADP (b) tartalmú aktin monomerből polimerizált filamentumaiban mért emissziós intenzitása 22 °C-on. Akceptormentes (i), 0,24 (ii) és 0,59 (iii) akceptor molarány mellett (az akceptor koncentrációjának aránya a filamentumban lévő teljes aktin koncentrációhoz viszonyítva).

Az IAEDANS fluoreszcencia intenzitását vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy az ATP-t tartalmazó monomerekből polimerizált aktin filamentum fluoreszcencia intenzitása nagyobb volt mint az ADP tartalmú monomerből polimerizált filamentumé, valamint az utóbbi intenzitás maximumának eltolódása is megfigyelhető. Akceptor jelenlétében a donor fluoreszcencia intenzitása lecsökkent a fellépő fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer hatására (*13. ábra*).

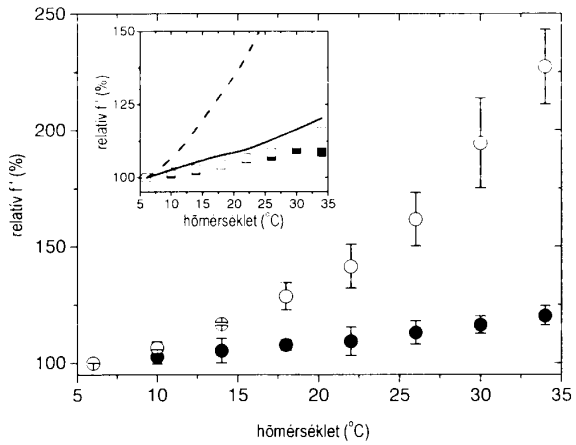
Az akceptor molarányának függvényében vizsgálva a FRET-hatásfok változását, az cisztein-374-es aminosav radiális koordinátája meghatározhatóvá vált. Attól függően, hogy a kiindulási monomerek milyen nukleotidot tartalmaztak a FRET-hatásfok változásának tendenciájában különbség mutatkozott (*14. ábra*).



14. ábra: ATP (tele kör) vagy ADP (üres kör) nukleotid tartalmú monomerből polimerizált aktin filamentumok FRET hatásfok változása az akceptor moláris arány változásának függvényében (az akceptor koncentrációjának aránya a filamentumban lévő teljes aktin koncentrációhoz viszonyítva). Az illesztést MATLAB 5.2 segítségével végeztük. A beillesztett ábra a FRET hatásfok változását mutatja az akceptor molarányának függvényében, falloidin jelenlétében ATP (tele négyzet) vagy ADP (üres négyzet) tartalmú monomerből polimerizált filamentumok esetén. Az egyenes és a szaggatott vonal a falloidinmentes mérési eredményeket tükrözi az adott filamentumon.

Abban az esetben, ha a filamentumokhoz falloidint adtunk (ami stabilizálja a filamentumot és eltolja a monomer–filamentum egyensúlyt a filamentum felé) a transzfer hatásfok nagysága sem az egyik sem a másik filamentum esetén nem változott jelentős mértékben, és a transzfer hatásfok változásának tendenciájában meglévő

különbség is megmaradt a két filamentum között (*14. betétábra*). A FRET hatásfokának falloidintől való függetlensége egyúttal bizonyította, hogy a polimerizáció során a monomerek random épültek be a filamentumokba. A radiális koordináta számolásához meg kellett határoznunk az IAEDANS–IAF fluorofór pár kritikus Förster távolságát mindkét típusú filamentumban. Ez ATP monomerből polimerizált filamentumban 47,74 Å-nek, míg ADP monomerből polimerizált filamentumban 40,83 Å -nek adódott. Ezeknek az adatoknak az ismeretében a cisztein-374-es aminosav radiális koordinátája ATP-G-aktinból polimerizált filamentum esetén 17,3 ± 1,1 Å, míg ADP-G-aktinból polimerizált filamentum esetén 16,7 ± 1,4 Å volt, ami jó egyezést mutatott korábban közölt adatokkal (Moens et al. 1994).



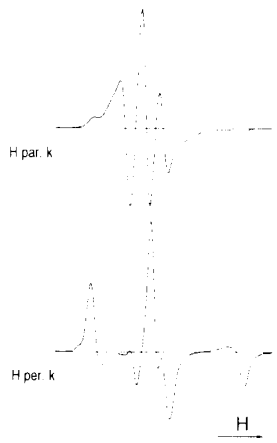
15. ábra: ATP (tele kör) vagy ADP (üres kör) nukleotid tartalmú monomerből polimerizált aktin filamentumokon mért f' változása a hőmérséklet függvényében. Az aktin összkoncentrációja 30 μM, az akceptor moláris aránya 0,66 és a donorral jelölt monomer koncentrációja 3 μM volt a filamentumban. A beillesztett ábra a hőmérsékletfüggő FRET paraméter falloidin jelenlétében bekövetkező változását mutatja ATP (tele négyzet) és ADP (üres négyzet) nukleotidot tartalmazó monomerekből polimerizált aktin filamentumok esetén. A szaggatott és egyenes vonal falloidin mentes ATP és ADP filamentumon mért értékeket mutatja.

A filamentumok intermonomer flexibilitásának meghatározásához vizsgáltuk a normalizált FRET hatásfok (*f'*) hőmérsékletfüggését a 6 és 34 °C közötti hőmérsékleti tartományban. Az ATP monomerből polimerizált filamentum *f'* növekedése aránylag kicsi volt (20%), míg ugyanebben a hőmérsékleti tartományban az ADP-F-aktin *f'*

változása több mint 100%-nak adódott (*15. ábra*). Abban az esetben, ha falloidint is adtunk a filamentumokhoz, akkor a relatív f' csak kis mértékben volt hőmérséklet függő mind az ATP-, mind az ADP monomerből polimerizált aktin filamentum esetén (*15. betétábra*).

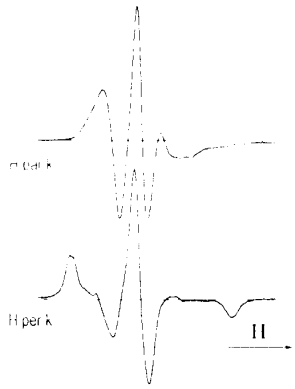
4.3 Eredmények izomrostokon

Konvencionális és szaturáció transzfer EPR technikákat alkalmaztunk a miozin fejen az ATP hidrolízis során bekövetkező konformációs változások nyomonkövetésére. Ehhez a miozin katalitikus doménjén található legreaktívabb ciszteint, a cisztein-707-et jelöltük TCSL és MSL jelölővel, glicerinezett izomrostban. Kísérleteinkben a kontrakciós ciklus négy állapotát modelleztük, a nukleotidmentes rigor állapotot, a hidrolízist megelőző M*.ATP állapotot, a hidrolízist követő M**.ADP.Pi állapotot, valamint a rigort megelőző M*.ADP állapotot.



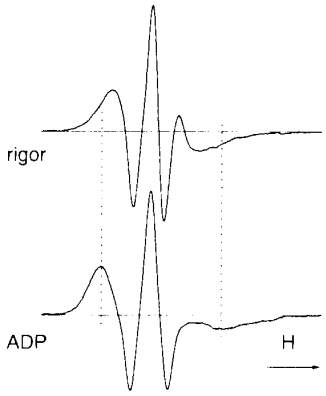
16. ábra: MSL jelölt izomrostok konvencionális EPR spektrumai rigor állapotban. Az izomrostok hossztengelye párhuzamos (felső ábra) és merőleges (alsó ábra) állású volt a mágneses tér irányára.

Rigor állapotban a fejek csak egyféle módon kötődhetnek az aktin filamentumhoz (Fajer 1994; Thomas and Cooke 1980), ha MSL próbával jelöltük a rostokat a jelölők egységes irányítottságot, nagyfokú rendezettséget mutattak (*16. ábra*). A rost hossztengelye és a jelölő kitűntetett iránya által bezárt szög 82° és a hozzá tartozó szögszórás 6° volt.



17. ábra: TCSL jelölt izomrostok konvencionális EPR spektrumai rigor állapotban. Az izomrostok hossztengelye párhuzamos (felső ábra) és merőleges (alsó ábra) állású volt a mágneses tér irányára.

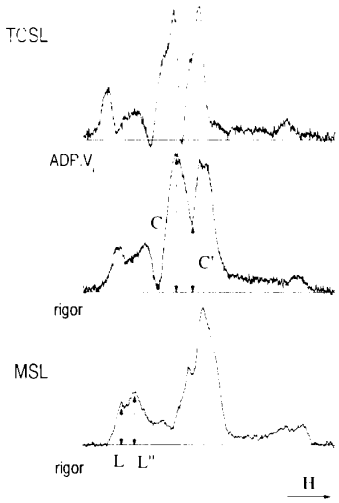
Ha a rost jelöléséhez TCSL jelölőt használtunk, az EPR spektrumok szintén nagyfokú rendezettséget mutattak (Belagyi et al. 1994) (*17. ábra*), de a jelölő kitűntetett irányának a rost hossztengelyével bezárt szöge 75°-nak, és a szögszórás 16° -nak adódott.



18. ábra: TCSL jelölt izomrostok hossztengelyének a mágneses tér irányára párhuzamos állásban mért konvencionális EPR spektrumai rigor és ADP állapotban.

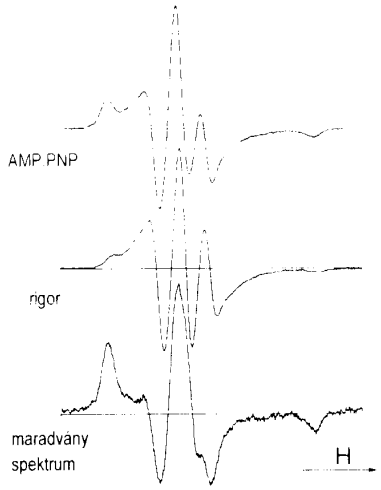
Az MSL szondával jelölt rostokhoz MgADP-t adva nem tapasztalható változás, a miozinfejek globális orientációja változatlan marad. Ezzel szemben TCSL szondával jelölt rostokat vizsgalva a jelölők kituntetett iranya es a rosttengely altal bezart szog 75° -ról 56° ra esökkent és a szögszórás 4° -kal megnött, viszont az irányfüggő rendezettség megmaradt a rostokban (*18. ábra*).

Ha ATP-t és ortovanadátot együttesen adunk rigor állapotban levő rostokhoz, ami az ADP.Pi állapotnak feleltethető meg, tartósan disszociáltathatjuk a miozin fejeket az aktin filamentumoktól. Az így detektálható spektrum egyetlen komponensből áll, amit a spinjelölők rendezetlen populációja alkot. A miozinfejek disszociációját az L''/L és C''/C diagnosztikus paraméterek csökkenése mutatja (*19. ábra*).



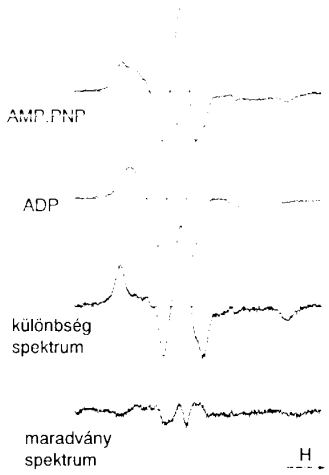
19. ábra: TCSL (felső kettő) és MSL (alsó) jelölt izomrostok ST EPR spektrumai rigor és ADP.Vi állapotban. L és L'', valamint C és C'' a rotációs korrelációs idő számolásához szükséges diagnosztikus csúcsokat jelölik. Az izomrostok hossztengelye a mágneses tér irányára merőleges állású volt.

Abban az esetben, ha a rostokhoz AMP.PNP-t (nem hidrolizáló ATP analóg) adtunk, mimikálva ezzel az ATP állapotot, a miozinfejek rendezettsége (függetlenül a jelölő fajtájától) megváltozott, ami a miozin fejek belső struktúrájában bekövetkezett konformációváltozásra utalt, és a spektrum egy random és egy rendezett jelölő populáció együttes jelenlétét mutatta (*20. ábra*). A rendezett frakció megközelítőleg 50%-a volt a teljes jelölő koncentrációnak.



20. ábra: MSL jelölt izomrostok AMP.PNP (felső) és rigor (középső) állapotban mért konvencionális EPR spektrumai. A rosttengelyek párhuzamosan álltak a mágneses tér irányára. A maradvány spektrum a rigor spektrum AMP.PNP spektrumból történt kivonásával jött létre.

Összehasonlítva az MSL jelölt és TCSL jelölt rostok AMP.PNP spektrumait azt tapasztaltuk, hogy mindkét jelölő esetén a random populáció megfelel a disszociálódott miozinfejek populációjának, azonban a rendezett frakciók eltérnek egymástól. Digitális manipulációval kivonva a rendezetlen frakciót a spektrumokból, meghatározható a megmaradt komponens irányfüggése. Az MSL jelölt rost esetén a rendezett frakció orientációja tökéletesen megfelelt a rigor állapotban meghatározott orientációnak, mintha a miozin fejek aktin kötése megmaradt volna (*20. ábra*). Ezzel szemben TCSL rostok esetén a rendezett frakció orientációja az ADP állapotban megtalálható orientációval volt megegyező (*21. ábra*).



21. ábra: TCSL jelölt izomrostok konvencionális EPR spektrumai. Legfelső spektrum az AMP.PNP kezelést követően detektált spektrum. Az alatta levő spektrum a rostok ADP kezelést követő állapotát tükrözi. A különbség spektrum az ADP spektrum AMP.PNP spektrumból történt kivonásával jött létre, alakja random módon orientált spin jelölők jelenlétére utal. A maradvány spektrumot a különbség spektrumból a ADP.Vi spektrumot (nincs feltűntetve) kivonva állítottuk elő.

Homogenizált izomrostok rigor és AMP.PNP állapotban mért EPR spektrumait összehasonlítva a hiperfinom csatolási állandó csökkenését tapasztaljuk AMP.PNP állapotban, ami megnövekedett rotációs mobilitásra utal. A hiperfinom csatolási állandó AMP.PNP állapotban 6,667 ± 0,03 mT (n = 4), míg rigor állapotban 6,780 ± 0,02 mT (n = 6) volt. A Goldman formulával számítható rotációs korrelációs idő AMP.PNP állapotban levő rostok esetén rövid (τ_r = 0,14 μs), ami vagy a miozinfejek disszociációjára, vagy az AMP.PNP kötésekor a jelölt szegmens környezetében megnövekedett mobilitásra utal.

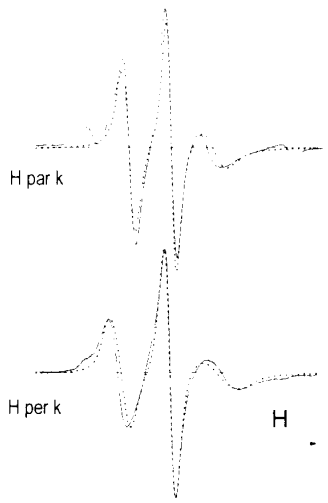
4.4 Eredmények izomrostba diffundáltatott S1-en

Kísérleteinkben az izolált miozinfej (S1) könnyűlánckötő doménjén elhelyezkedő esszenciális könnyűlánc (ELC), cisztein 177-es aminosav oldalláncát jelöltük MSL jelölővel, majd diffundáltattuk glicerinezett izomrostba. Az így kapott rendszeren vizsgáltuk az ATP hidrolízis ciklus egyes lépései során bekövetkező

konformációs változásokat a könnyűlánc kötő domén környezetében.

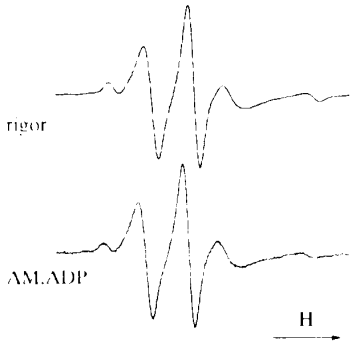
Oldatban mérve az ELC jelölt S1 spektrumait, a jelölő nagyfokú rotációs mobilitást mutatott, azonban a rostba diffundaltatast követoen a jelölo mobilitása lecsökkent és a spektrumokból rendezett, orientált rendszer létrejöttére következtethettünk (*22. ábra*).

Nukleotidmentes rigor állapotban a miozin fejek orientáltan kapcsolódtak az aktin filamentumokhoz. Spektrumszimuláció szerint: a diffúziót követően, a jelölo kitűntetett irányának a rost hossztengelyével bezárt szöge $\vartheta = 85^{\circ}$, a szögszórás $\sigma = 6^{\circ}$, és a jelölő egy $\gamma = 65^{\circ}$ -os nyílásszögű kúpban mozog.



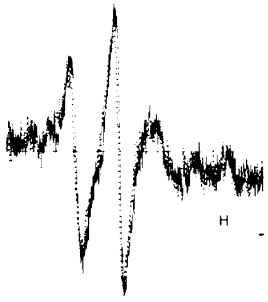
22. ábra: MSL jelölt (cisztein-177-es aminosav oldalláncon jelölt, izomrostba diffundáltatott) S1 konvencionális EPR spektrumai rigor állapotban. A rosttengelyek iránya a mágneses tér irányával párhuzamos (felső spektrum) és merőleges (alsó spektrum) állásúak. A folytonos vonallal jelölt spektrumok a mért, míg a szaggatott vonallal jelölt spektrumok a szimulációval előállított spektrumok.

ADP jelenlétében az MSL szonda – és/vagy az S1 aktinhoz történt kapcsolódásának – orientációja és rotációs mobilitása megfelelt a rigor állapotban meghatározott értékeknek. Ez az eredmény megegyezik a korábbi megfigyelésekkel, miszerint az ADP kötődése által kiváltott konformációváltozások nem befolyásolják távoli régiók mobilitását (Belágyi et al. 1994; Fajer et al. 1990)(*23. ábra*).



23. ábra: MSL jelölt (cisztein-177-es aminosav oldalláncon jelölt, izomrostba diffundáltatott) S1 konvencionális EPR spektrumai ADP és rigor állapotban. Az izomrostok hossztengelye a mágneses tér irányával párhuzamosan helyezkedtek el.

Az ADP.Pi állapot modellezéséhez ATP-t és ortovanadátot adtunk a rostokhoz. A vanadát miozinnal alkotott komplexének életideje hosszú, ezért elterjedten használják az ADP.Pi nukleotid állapot mimikálásához. ATP és ortovanadát jelenlétében a spektrumok irányfüggő rendezettsége megszűnt, a spektrum intenzitása lecsökkent, jelezve, hogy a fejek nagy része tartósan disszociált az aktin filamentumoktól és kidiffundált a rostot körülvevő folyadékkörnyezetbe a kezelés során (*24.ábra*).



24. ábra: MSL jelölt (cisztein-177-es aminosav oldalláncon jelölt, izomrostba diffundáltatott) S1 konvencionális EPR spektrumai ATP és ortovanadát jelenlétében. A folytonos vonal a mágneses tér irányával párhuzamos, a szaggatott vonal a mágneses tér irányára merőleges spektrumvonalat jelöli. A spektrumok gyengülése az S1 ek aktintól való disszociációjának és a környezetbe való kidiffundálásának köszönhető.

5. Következtetések

5.1 Nukleotidcsere hatása az aktin internális dinamikájára

Az aktin két formában, monomer és polimer, vagy filamentális aktinként található meg élő sejtekben. A filamentális formából felépülő aktin hálózat kialakulásának és újrarendeződésének szabályozását sok faktor befolyásolja a sejtben. Faktor lehet a monomerekben kötött nukleotid és kétértékű kation minősége, mert jelentősen befolyásolja a monomer polimerizációs készségét és a monomer – polimer egyensúlyt (Carlier et al. 1986; Kinosian et al. 1991; Nyitrai et al. 1997; Rickard and Sheterline 1986). Kísérleteinkben ATP–ADP csere hatását vizsgáltuk az aktin monomer szerkezeti és dinamikai tulajdonságaira EPR és fluoreszcencia spektroszkópia módszerével.

Az EPR eredményeink azt mutatták, hogy a nukleotidcsere során létrejött egy átmeneti aktin populáció (*8., 9. ábra*), ami lényegesen nagyobb rotációs korrelációs idővel jellemezhető, mint az ATP-Mg-G-aktin. Korábbi közlemények alapján feltételezhettük, hogy az általunk használt MSL jelölő rigiden kapcsolódott az aktin cisztein-374-es aminosav oldallánchoz, ezért a rotációs korrelációs idő a teljes monomer vagy egy nagyobb domén mozgási tulajdonságáról szolgáltatott információt (Mossakowska et al. 1988; Thomas et al. 1979). Nukleotidcsere során az átmenetileg tapasztalt megnövekedett csatolási állandó és az ehhez tartozó rotációs korrelációs idő nem származhatott aktin monomertől, vagy a monomeren bekövetkező belső konformáció változástól. Figyelembe véve a hiperfinom csatolási állandó változásának kinetikáját és a steady-state fluoreszcencia anizotrópia nukleotidcserére való érzéketlenségét, valamint korábbi eredményeket (Drewes and Faulstich 1991; Kasprzak 1994), az aktin filamentumok jelenléte a nukleotidcsere során kizárható volt. Mindezek alapján az ATP–ADP csere során a hiperfinom csatolási állandó értékének átmeneti növekedése egy jelentős mennyiségű, de átmeneti oligomer aktin populáció kialakulására utalt. Feltételezésünket alátámasztotta az a korábbi megfigyelés, hogy az aktin monomerek egymáshoz való affinitása nagyobb a különböző nukleotidot (ADP és ATP) egyaránt tartalmazó keverékoldat esetén, mint bármelyik egynemű oldatban

(Pantaloni et al. 1985).

Az átmeneti oligomer populáció élettartama hőmérsékletfüggő, életideje percekben merhető volt. Az ATP koncentráció mérések eredménye alapján megállapíthattuk, hogy a nukleotidcsere önmagában nem sebesség-meghatározó lépése az oligomer populáció kialakulásának. A hőmérséklet közvetlenül befolyásolta az oligomerizáció sebességét, alacsonyabb hőmérsékleten a folyamat lassú, sajnos 20 °C alatti hőmérsékleten a különböző hiperfinom csatolási állandójú spektrumok jelentős átfedése miatt a változás pontosan nem volt követhető.

A nukleotidcsere során létrejövő konformációváltozást FRET méréseink is alátámasztották. A transzfer hatásfok a csere indítását követő fél órán belül elérte 72 %-os maximum értékét. Mérési eredményeinkből arra következtethettünk, hogy az ATP–ADP csere folyamán az aktin monomeren konformációváltozás játszódik le, melynek eredményeként a két általunk jelölt aminosav oldallánc (cisztein-374, glutamin-41) közelebb került egymáshoz. Ez a konformációváltozás valószínűleg megegyezik az IAEDANS emisszió időfüggésének kiértékelése során gyors konformációváltozásként jellemzett, 25 perc körüli életidővel bíró komponenssel.

Szemben a hiperfinom csatolási állandó változásának időfüggésével, a FRET hatásfok értékek nem átmeneti, hanem tartós változásra utaltak. Ennek megfelelően a transzfer hatásfok növekedése nem magyarázható a nukleotidcsere során lejátszódó oligomerizáció folyamatával, hanem a monomerek olyan elrendeződését feltételezi az oligomereken belül, ami nem eredményez effektív protomerek közötti energia transzfert. Feltehetően az ATP-ADP csere által indukált oligomerizációban a szomszédos monomerek kapcsolódási régiója eltér a filamentumban találhatótól, erre abból következtethettünk, hogy általános esetben a filamentumot felépítő monomerek kapcsolódásakor a szubdomén I-en elhelyezkedő cisztein-374-es aminosav közel kerül a szomszédos monomer szubdomén II-n található glutamin-41-hez (Holmes et al. 1990; Milligan et al. 1990), és ez lehetővé tehetné az átmeneti oligomer populáció detektálását.

A nukleotidcsere alatt bekövetkező ADP-Mg-G-aktin koncentráció változásának időfüggését összehasonlítva a spektroszkópiai eredményekkel, további adatokat kaptunk az intra- és intermolekuláris változásokról. A FRET hatásfok párhuzamosan nőtt az ADP-Mg-G-aktin koncentrációjának növekedésével, ami – közvetlenül a nukleotidcsere

indítását követően – a glutamin-41 és a cisztein-374-es oldalláncokat tartalmazó régiók egymáshoz való közeledését jelezte. Ezzel szemben a hiperfinom csatolási állandó növekedése késéssel követte az ADP-Mg-aktin koncentrációváltozását, ami az oligomerek (intramonomer konformációváltozást követő) lassabb kialakulását mutatta (*12. ábra*).

Vizsgálatainkat kiterjesztettük aktin filamentumokra, ahol a polimerizációt megelőzően elvégeztük a kationcserét, valamint a nukleotidcserét, ha ADP-Mg-G-aktin volt a kiindulási monomer. Ahhoz, hogy a kísérleti adataink értékelhetőek legyenek, biztosnak kellett lennünk abban, hogy az aktin jelentős hányada filamentózus formában volt a mérésekkor. Éppen ezért egy meglehetősen hosszú, 10-12 órás polimerizációnak tettük ki az aktint szobahőmérsékleten, ami elegendő időt biztosított a megfelelő monomer–filamentum egyensúly kialakulásának (Pollard 1984). A vizsgálatok során az aktin egy része (a kritikus koncentrációnak megfelelően) monomer formában volt jelen, és nagy valószínűséggel ATP, vagy ADP monomertől függően más-más koncentrációban. A jelenlévő monomerek zavaró hatásának csökkentése érdekében viszonylag nagy kiindulási aktin koncentrációt (30 μM) használtunk a polimerizáláshoz, és a FRET hatásfok méréseket falloidin jelenlétében is elvégeztük. A falloidin stabilizáló hatással van az aktin filamentumokra úgy, hogy csökkenti a monomerek disszociációját, eltolva ezáltal a monomer–filamentum egyensúlyt a filamentózus forma felé (Barden et al. 1987; Dancker et al. 1975; Miki et al. 1987a; Moens et al. 1994; Steinmetz et al. 1997), így méréseink során megbecsülhetővé tette a monomerektől származó fluoreszcencia paramétereket. Mivel a falloidin jelenlétében kapott FRET hatásfok értékek nem változtak jelentősen 22 °C-on sem az ATP-t, sem az ADP-t tartalmazó monomerekből polimerizált filamentumok esetén bármelyik akceptor molarányt vizsgálva, ezért a monomerek hatását a vizsgálataink során elhanyagolhatónak tekintettük.

Az IAEDANS fluoreszcencia spektrumainak nukleotidfüggéséből arra következtettünk, hogy a különböző kiindulási monomerből polimerizált aktin filamentumok cisztein-374-es aminosav oldalláncának fehérje környezete eltérő konformációval rendelkezik. A nukleotidok IAEDANS intenzitására gyakorolt hatása a filamentumban jó egyezést mutatott korábbi, monomereken kapott eredményeinkkel (Gaszner et al. 1999).

A hőmérsékletfüggő FRET kísérleteink értékeléséhez elfogadottnak kell tekintenünk azt a feltételt, hogy a donor és akceptor molekulák relatív mozgásának amplitúdó növekedése a hőmérséklet emelkedésével, a flexibilisebb fehérje formában nagyobb, mint a rigidebb formában (Somogyi et al. 1984). Ezért a hőmérséklet emelkedésre a $<k_t>$ és így a kísérletileg meghatározható f' értékei nagyobb változást mutatnak a makromolekulák flexibilisebb formáiban. Ez a feltevés magában foglalja annak lehetőségét, hogy a hőmérséklet emelkedésére konformációváltozás játszódik le a molekulában. Azonban mind a monomer mind pedig a polimerizált aktinon végzett DSC mérések kizárják szignifikáns konformáció változás bekövetkezését a 0 – 50 °C közötti hőmérséklet tartományban (Lőrinczy et al. 1998) A DSC technika elsősorban globális konformációváltozásokra érzékeny tehát a jelölt helyek közvetlen környezetében létrejött lokális szerkezeti változás nem zárható ki. Kísérlettel nehéz alátámasztani ennek ellenkezőjét, de a relatív f' hőmérsékletfüggő értékeinek egyenletes tendenciája mindkét filamentum esetén mégis arra enged következtetni, hogy a hőmérsékletemelkedés nem okozott sem lokális sem globális konformációváltozást az aktin filamentumban.

A hőmérsékletfüggő FRET méréseink eredményei szerint az intermonomer kapcsolat a szomszédos monomerek között lazább az ADP-Mg-G-aktinból polimerizált filamentumban, mint az ATP-Mg tartalmú monomerből polimerizált esetén. Falloidin hozzáadásakor a monomerek közötti flexibilitás lecsökkent mindkét típusú filamentum esetén, de jelentősebb változást okozott az ADP-t tartalmazó monomerből polimerizált filamentumnál, ami az ATP-Mg-G-aktinból polimerizált filamentum falloidin nélkül is meglévő nagyobb rigiditását mutatta. Falloidin jelenlétében mindkét filamentumra kapott relatív f' értékek nagyon hasonlóak voltak, ami – a falloidin aktin filamentumra gyakorolt – egységes merevítő hatására utalt, függetlenül a kiindulási nukleotid tartalomtól. Mindezen eredmények azt mutatták, hogy a falloidin hatása a filamentum struktúrájára összetett, egyfelől megerősíti a filamentumban meglévő intermonomer kapcsolatokat, másfelől lecsökkenti a monomerek filamentumról történő disszociációját.

5.2 Nukleotid-indukált konformációváltozások a miozin feji régiójában

Az utóbbi évek szerkezet meghatározás területén elért eredményei lehetővé tették számunkra a molekuláris dinamikai jelenségek értelmezését az általunk használt EPR technika során alkalmazott mozgásra érzékeny spektroszkópiai szondák segítségével. Kísérleteink az ATPáz ciklus mechanizmusának pontosabb megismerésére irányultak. Ennek érdekében a miozin motordoménjének és könnyűlánckötő doménjének környezetében lejátszódó nukleotid-indukált konformációváltozásokat vizsgáltunk. Paramágneses szondáinkat az izomrost miozin fején található legreaktívabb cisztein oldalánchoz, a cisztein-707-hez, valamint a izolált S1 esszenciális oldalláncán található cisztein-177-es aminosav oldalánchoz kapcsoltuk kovalensen. Vizsgálatainkhoz az izomrost közvetlen jelölésekor egyaránt használtunk TCSL és MSL jelölőt.

Korábbi kísérleti eredmények azt mutatták, hogy (az általunk is használt) jelölési eljárás során az MSL molekula a miozin legreaktívabb cisztein oldalláncához kapcsolódik (cisztein-707), ennek eredményeként megváltozik a miozin molekula ATPáz aktivitása (Bobkov et al. 1997; Crowder and Cooke 1984), bizonyítva ezzel a jelölés szelektivitását. A munkánk során az izomrost jelöléséhez használt TCSL molekula kapcsolódhat a miozin reaktív lizin oldalláncához is (lizin-84). Abban az esetben, ha ez a lizin oldallánc TNBS-sel blokkolt, a miozin Mg^{2+}-ATPáz aktivitása húszszorosára növekszik (Fabian and Muhlrad 1968). Kísérleteinkben a TCSL jelölés nem növelte meg a rostok Mg^{2+}-ATPáz aktivitását. Ez a tény valamint az, hogy az MSL és TCSL jelölt rostok hasonló irányfüggést mutattak arra engedett következtetni, hogy a kétféle jelölő a miozin molekula ugyanazon pontjára kapcsolódik. Különbség mutatkozott azonban a két jelölő kitűntetett irányának a rosttengellyel bezárt szöge (ϑ), valamint a szögszórása (σ) között. A ϑ szögben és a szögszórásban való eltérést megmagyarázhatja a két jelölő eltérő kémiai struktúrája, és a jelölt ponthoz való kapcsolódásuk eltérő módja.

Konvencionális és ST EPR méréseink során, nukleotidmentes (rigor) állapotban, a glicerinezett izomrostokon mért EPR spektrumok nagyfokú irányfüggő rendezettséget mutattak mindkét jelölő esetén. AMP.PNP hozzáadására (mimikálva az M*.ATP állapotot), a spektrumok jelentős változást mutattak a miozinfejek orientációjában.

Megelőző munkák szerint MSL jelölt rostokban AMP.PNP hozzáadására a keresztbidak fele érintett a változásban. A változás eredménye dinamikus rendezetlenség, míg a orientált állapotban maradt frakció minden spektrális tulajdonságában megegyezik a rigor állapottal. A röntgendiffrakciós vizsgálatok eredménye azt mutatta, hogy a miozin fej AMP.PNP hatására disszociál az aktin filamentumról, ugyanakkor a mechanikai vizsgálatok szerint AMP.PNP jelenlétében az izomrost rugalmas feszültsége nem változik a rigor állapotban mérhető rugalmas feszültséghez képest (Fajer et al. 1988). Ez módosítja azt a feltételezést, hogy a miozin fejek mintegy fele a rigor állapotban marad AMP.PNP jelenlétében is. Viszont az is kísérleti tény, amit az EM megfigyelés mutatott, hogy az AMP.PNP relaxált állapotú cross-bridge orientációt eredményez (Reedy et al. 1992). Az általunk vizsgált TCSL jelölt rostban detektálható volt az 50 %-nyi rendezetlen frakció, de a rendezett állapotban maradt fejektől származó spektrum komponens az ADP állapotnak megfelelő konformációt tükrözte. Az MSL és TCSL jelölőkkel kapott eredmények mégsem ellentmondóak, mivel az MSL szonda merevebben kapcsolódik a miozin fejhez (L''/L = 1,2) mint a TCSL (L''/L = 0,83), így az MSL spektrumok a teljes miozinfej orientációjáról közvetítenek információt, szemben a TCSL szondával, ami flexibilisebb kapcsolódásával érzékeny lehet a belső struktúra kis változásaira. Az AMP.PNP hozzáadásával megnőtt a spinjelölők rotációs mobilitása, ami a miozin és az aktin közötti kölcsönhatás megváltozására utalt, valamint a TCSL szondával nyomon követhető lokális konformációváltozásra, ami a nukleotid kötés hatására következett be. A röntgendiffrakciós és EM vizsgálatok szerint a miozin fejek azonos módon viselkednek ellentétben a spektroszkópiai és mechanikai mérésekkel. Az ellentmondás csak úgy oldható fel, ha feltételezzük, hogy egy dinamikus egyensúly áll fenn a sztereospecifikus (ADP jellegű) és nem sztereospecifikus (AMP.PNP jellegű) kölcsönhatások között, és a kölcsönhatás dinamikus jellege csak spektroszkópiai módszer számára teszi lehetővé a két állapot megkülönböztetését.

6. Összefoglalás

Munkánk során elektronparamágneses rezonancia és fluoreszcencia spektroszkópia módszer alkalmazásával végeztünk vizsgálatokat kontraktilis fehérjerendszereken és az azokat felépítő molekulákon.

Aktin monomereken végzett kísérleteinkben a nukleotidcsere hatását vizsgáltuk az aktin polimerizációja során. Az EPR és fluoreszcencia spektroszkópiai adatok szerint legalább két konformációs átmenet detektálható az aktin monomerekben a nukleotidcsere indítását követően. Az egyik egy gyors konformációváltozás, aminek eredményeként a glutamin-41-es aminosav oldallánc és a cisztein-374-es aminosav oldallánc közelebb kerül egymáshoz. Az így létrejövő új konformáció egy olyan oligomer populáció kialakulását segíti elő, ahol a monomerek kapcsolódása eltér az aktin filamentumban azonosíthatótól. A másik konformációs átmenet lassúbb, hatása a nukleotidcsere indítását követő néhány órában is detektálható még. Ezek az eredmények segítségül szolgálnak ahhoz, hogy megértsük az aktin monomerek által kötött nukleotidok (ADP vagy ATP) szerepét az aktin polimerizációjának szabályozásában.

Aktin filamentumokon végzett fluoreszcencia spektroszkópiai kísérleteinkben a polimerizáció indításakor különböző nukleotidot (ATP-t vagy ADP-t) tartalmazó monomerekből polimerizált filamentumok flexibilitását vizsgáltuk. Eredményként megállapíthattuk, hogy összehasonlítva a kétféle filamentumot, eltérés tapasztalható az intermonomer flexibilitásban. A korábbi monomereken kapott eredményeknek megfelelően az IAEDANS fluoreszcencia intenzitása kisebb volt ADP-G-aktinból polimerizált filamentum esetén. A nukleotidcsere következtében a monomereken létrejövő konformációváltozás eltérő intermonomer kapcsolódáshoz vezethet a kétféle filamentumban. Ennek következménye lehet a kétféle filamentum dinamikai tulajdonságai között tapasztalt flexibilitásbeli különbség.

Glicerinezett izomrostokon végzett EPR vizsgálataink során a miozin molekula feji részén található legreaktívabb cisztein oldalláncot, a cisztein-707-et, MSL vagy TCSL szondákkal jelöltük. A kontrakciós ciklus különböző lépéseit nukleotidokkal vagy az egyes lépéseket stabilizálni képes nukleotid analógok hozzáadásával modelleztük.

Vizsgálataink eredményeként megállapíthattuk, hogy bármelyik jelölőt alkalmaztuk is, rigor állapotban a jelölők irányfüggő rendezettséget mutattak, de kitüntetett irányuk és szögszórásuk különbözött. Ez a különbözőség a jelölők eltérő kémiai strukturájával és a jelölő kapcsolódásának eltérő módjával magyarázható. Az ATP állapot közelítéséhez használt nem hidrolizáló ATP analóg (AMP.PNP) hatására, a kereszthídak fele konformációváltozás következtében rendezetlen állapotba kerül, míg a másik fele rendezett állapotban maradt. A random frakció megfelel az ADP.Pi állapotot közelítő (mimikáló) ADP.Vi állapotnak, azonban a rendezett frakció, attól függően, hogy melyik jelölő segítségével detektáltuk, eltérő elrendeződést mutatott. MSL jelölő esetén ez az állapot a rigor, TCSL jelölő esetén az ADP állapú rendezettségnek felelt meg. A kétféle jelölőről megállapítottuk, hogy míg az MSL jelölő rigid kapcsolódása miatt a teljes miozin fej orientációjáról nyújtott információt, addig a TCSL jelölő lazább kapcsolódása miatt a belső struktúrában végbemenő változások közvetítésére alkalmas.

Glicerinezett izomrostba diffundáltatott ELC jelölt S1 molekulák immobilizálódtak az aktin felszínén és spektrumaik irányfüggő rendezettséget mutattak. A rigor és ADP állapot között nem jött létre lényeges különbség, ATP és ortovanadát jelenlétében a fejek tartósan disszociáltathatók az aktin filamentumtól.

A nukleotidcsere során feltételezett átmeneti aktin populáció (az oligomerizáció) vizsgálható lenne fényszórási kísérletekkel.

Az ADP- és ATP-tartalmú aktin monomerekből polimerizált filamentumok flexibilitásbeli különbsége megnyilvánulhat az F-aktin gélben spontán kialakuló (makroszkopikus) rendezettségben is, ami további EPR mérésekkel vizsgálható lehet.

Az izomrostba diffundáltatott könnyűláncjelölt S1 esetén további feladat lehet TCSL alkalmazásával a stabilizálható nukleotid állapotok vizsgálata.

Ezek és további felvethető problémák illetve kísérletek természetesen újabb kérdésekhez vezetnek, amelyek hosszú időre kijelölik a munka folytatásának irányait.

7. Saját közlemények

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Gaszner B., Nyitrai M., **Hartvig N.**, Kőszegi T., Somogyi B., Belágyi J., Replacement of ATP with ADP Affects the Dynamic and Conformational Properties of Actin Monomer. *Biochemistry* 1999; 38(39):12885-12892.

Nyitrai M., Hild G., **Hartvig N.**, Belágyi J., Somogyi B., Conformation and Dynamic Differences between Actin Filaments Polymerized from ATP- or ADP-Actin Monomers. *Journal of Biological Chemistry* 2000; 275(52): 41143-41149.

Lőrinczy D., **Hartvig N.**, Belágyi J., Nucleotide analogue induces global and local changes in muscle fibres. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 2001; 64: 651-658.

Hartvig N., Lőrinczy D., Farkas N., Belágyi J., Effect of AMP.PNP on Myosin Head Domain Motions. (*Eur. J. Biochem.* című folyóirathoz közlésre elküldve)

Hartvig N., Kiss M., Lőrinczy D., Belagyi J., Effect of nucleotides and their analogues on essential light chains in myosin head (***J. Biochem. Bioph. Meth.*** című folyóiratnál közlés alatt)

Az értekezés alapjául szolgáló absztraktok

Lőrinczy D., **Hartvig N.**, Gaszner B., Belágyi J., Effect of AMP.PNP on myosin head domain motion. EPR and DSC measurements. 28th Europea Muscle Conference, York, UK, 1999. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 1999; 20(8): 815.

Hartvig N., Gaszner B., Schaffer B., Lőrinczy D., Belágyi J., Global and local conformational changes in myosin induced by AMP.PNP. 5th Symposium on Instrumental Analysis, Pécs, 1999.

Kiss M., **Hartvig N.**, Lőrinczy D., Belágyi J., Effect of oxigen free radicals on the internal dynamics of actin. 5th Symposium on Instrumental Analysis, Pécs, 1999.

Kiss M., **Hartvig N.**, Lőrinczy D., Belágyi J., Oxigén szabadgyökök hatása az aktin internális dinamikájára. A Magyar Biofizikai Társaság XIX. Vándorgyűlése, Kecskemét, 1999.

Hartvig N., Gaszner B., Lőrinczy D., Belágyi J., AMP.PNP indukált konformáció-változás harántcsíkolt izomrostban. DSC és EPR vizsgálat. A Magyar Biofizikai Társaság XIX. Vándorgyűlése, Kecskemét, 1999.

Gaszner B., Nyitrai M., **Hartvig N.**, Somogyi B., Belágyi J., Nukleotid indukált konformációváltozás aktin monomeren. A Magyar Biofizikai Társaság XIX Vándorgyűlése, Kecskemét, 1999.

Hartvig N., Farkas N., Lőrinczy D., Belágyi J., Nucleotide Induce Changes in Orientation Distribution of Spin Labels Attched to ELC of Myosin in Muscle Fibres. 29th Europea Muscle Conference, Berlin, Germany, 2000.

Lőrinczy D., **Hartvig N.**, Farkas N., Belágyi J., Study of global and local conformations in myosin by DSC and EPR. 3rd European Biophysics Congress, München, Germany, 2000. *European Biophysics Journal* 2000; 29(4-5): 336.

Kiss M., **Hartvig N.**, Lőrinczy D., Belágyi J., Effects of free radicals on muscle proteins. 3rd European Biophysics Congress, München, Germany, 2000. *European Biophysics Journal* 2000; 29(4-5): 337.

Hartvig N., Gaszner B., Lőrinczy D., Belágyi J., Orientation of spin labels attached to essential light chains in myosin head in muscle fibres. Joint Meeting with the Hungarian Physiological Society, Budapest 2000, *J. Physiol.* 2000; 526 P, 41.

Nyitrai M., Hild G., Szarka K., **Hartig N.**, Belágyi J., Somogyi B., Az ATP- és ADP-aktin monomerekből polimerizált filamentumok konformációs és dinamikai tulajdonságai különbözőek. XXX. Membrán-transzport konferencia, Sümeg, 2000.

Nyitrai M., Hild G., Szarka K., **Hartvig N.**, Belágyi J., Somogyi B., Conformational and dinakic differences between actin filaments polymerized from ATP- or ADP-actin monomers. III. International Conference on Molecular Recognition, Pécs, 2000.

Hartvig N., Farkas N., Belágyi J., Nucleotides affect the distribution of spin labels attached to ELC in muscle fibres. III. International Conference on Molecular Recognition, Pécs, 2000.

Hartvig N., Kiss M., Gaszner B., Belágyi J., Effect of nucleotides and their analogues on essential light chains in myosin head. 6th Symposium on Instrumental Analysis, Graz, Austria, 2001.

Lőrinczy D., **Hartvig N.**, Gombkötő Zs., Belágyi J., Analysis of nucleotide myosin complexes in skeletal muscle fibres by DSC. 6th Symposium on Instrumental Analysis, Graz, Austria, 2001.

Kiss M., Farkas N., **Hartvig N.**, Belágyi J., Effect of selectively generated thiyl free radicals on the motional dynamics of skeletal actin. An EPR study. 6th Symposium on Instrumental Analysis, Graz, Austria, 2001.

Belágyi J., **Hartvig N.**, Lőrinczy D., Farkas N., Characterization of BeF_x^- and AlF_4^- containing myosin nucleotide complexes by EPR. 6th Symposium on Instrumental Analysis, Graz, Austria, 2001.

Nyitrai M., Hild G., **Hartvig N.**, Belágyi J., Somogyi B., Az aktin filamentum konformációs és dinamikai tulajdonságainak függése a környezeti paraméterektől. A Magyar Biofizikai Társaság XX. Kongresszusa, Budapest, 2001.

Lőrinczy D., **Hartvig N.**, Belágyi J., Nukleotid miozin komplexek DSC vizsgálata harántcsíkolt izomrostokon. A Magyar Biofizikai Társaság XX. Kongresszusa, Budapest, 2001.

Hartvig N., Farkas N., Lőrinczy D., Belágyi J., AM.ADP.Pi intermedier állapot EPR vizsgálat. A Magyar Biofizikai Társaság XX. Kongresszusa, Budapest, 2001.

Hartvig N., Belágyi J., Hegyi Gy., Effect of Intermonomer Cross-linking on the Molecular Dynamics of F-actin. 30th Europea Muscle Conference Pavia Italy 2001.

8. Irodalomjegyzék

Aebi U, Millonig R, Salvo H, Engel A (1986) The three dimensional structure of the actin filament revisited. Ann N Y Acad Sci 483:100-19.

Ajtai K, Pótó L, Burghardt TP (1990) Specificity and orientation of (iodoacetamido)proxyl spin-labeled myosin subfragment 1 decorating muscle fibers: localization of protein- bound spin labels using SDS-PAGE. Biochemistry 29:7733-41.

Bagshaw CR, Trentham DR (1974) The characterization of myosin-product complexes and of product-release steps during the magnesium ion-dependent adenosine triphosphatase reaction. Biochem J 141:331-49.

Balint M, Sreter FA, Wolf I, Nagy B, Gergely J (1975) The substructure of heavy meromyosin. The effect of Ca^{2+} and Mg^{2+} on the tryptic fragmentation of heavy meromyosin. J Biol Chem 250:6168-77.

Banga I, Erdös T, Gerendás M, Mommaerts W, F., H., M., Straub F, B., Szent-Györgyi A (1941) Myosin and muscular contraction, vol 1, Szeged

Barden JA., Miki M, Hambly BD, Dos Remedios CG (1987) Localization of the phalloidin and nucleotide-binding sites on actin. Eur J Biochem 162:583-8.

Belágyi J, Frey I, Pótó L (1994) ADP-induced changes in ordering of spin-labelled myosin heads in muscle fibres. Eur J Biochem 224:215-22.

Belford GG, Belford RL, Weber G (1972) Dynamics of fluorescence polarization in macromolecules. Proc Natl Acad Sci U S A 69:1392-3.

Bobkov AA, Bobkova EA, Homsher E, Reisler E (1997) Activation of regulated actin by SH1-modified myosin subfragment 1. Biochemistry 36:7733-8.

Carlier MF (1987) Measurement of Pi dissociation from actin filaments following ATP hydrolysis using a linked enzyme assay. Biochem Biophys Res Commun 143:1069-75.

Carlier MF (1992) Nucleotide hydrolysis regulates the dynamics of actin filaments and microtubules. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 336:93-7.

Carlier MF, Pantaloni D, Korn ED (1986) Fluorescence measurements of the binding of cations to high-affinity and low-affinity sites on ATP-G-actin. J Biol Chem 261:10778-84.

Cooke R (1975) The role of the bound nucleotide in the polymerization of actin. Biochemistry 14:3250-6.

Cooke R, Murdoch L (1973) Interaction of actin with analogs of adenosine triphosphate. Biochemistry 12:3927-32.

Crowder MS, Cooke R (1984) The effect of myosin sulphydryl modification on the mechanics of fibre contraction. J Muscle Res Cell Motil 5:131-46.

Dancker P, Low I, Hasselbach W, Wieland T (1975) Interaction of actin with phalloidin: polymerization and stabilization of F-actin. Biochim Biophys Acta 400:407-14.

Drewes G, Faulstich H (1991) A reversible conformational transition in muscle actin is caused by nucleotide exchange and uncovers cysteine in position 10. J Biol Chem 266:5508-13.

Eletr S, Inesi G (1972) Phase changes in the lipid moieties of sarcoplasmic reticulum membranes induced by temperature and protein conformational changes. Biochim Biophys Acta 290:178-85.

Elzinga M, Collins JH, Kuehl WM, Adelstein RS (1973) Complete amino-acid sequence of actin of rabbit skeletal muscle. Proc Natl Acad Sci U S A 70:2687-91.

Fabian F, Muhlrad A (1968) Effect of trinitrophenylation on myosin ATPase. Biochim Biophys Acta 162:596-603.

Fajer PG (1994) Determination of spin-label orientation within the myosin head. Proc Natl Acad Sci U S A 91:937-41.

Fajer PG, Fajer EA, Brunsvold NJ, Thomas DD (1988) Effects of AMPPNP on the orientation and rotational dynamics of spin- labeled muscle cross-bridges. Biophys J 53:513-24.

Fajer PG, Fajer EA, Matta JJ, Thomas DD (1990) Effect of ADP on the orientation of spin-labeled myosin heads in muscle fibers: a high-resolution study with deuterated spin labels. Biochemistry 29:5865-71.

Feuer G, Molnár F, Pettko E, Straub F, B., (1948) Studies on the comosition and polymerization of actin. Hung. Acta Physiol. 1:150-163

Fisher AJ, Smith CA, Thoden JB, Smith R, Sutoh K, Holden HM, Rayment I (1995) X-ray structures of the myosin motor domain of *Dictyostelium discoideum* complexed with MgADP.BeF_x and MgADP.AlF_4. Biochemistry 34:8960-72.

Gaszner B, Nyitrai M, Hartvig N, Kőszegi T, Somogyi B, Belágyi J (1999) Replacement of ATP with ADP affects the dynamic and conformational properties of actin monomer. Biochemistry 38:12885-92

Geeves MA, Holmes KC (1999) Structural mechanism of muscle contraction. Annu Rev Biochem 68:687-728

Gershman LC, Selden LA, Estes JE (1991) High affinity divalent cation exchange on actin. Association rate measurements support the simple competitive model. J Biol Chem 266:76-82.

Goldman S. A.., Bruno G. V.., Polnaszek C. F.., Freed J. H.. (1972) An ESR study of anisotropic rotational reorientation and slow tumbling in liquid and frozen media. J. Chem. Phys. 56:716-735

Hanson J, Lowy J (1963) The structure of F-actin and of actin filaments isolated from muscle. J. Mol. Biol. 6:46-60

Hitchcock SE (1980) Actin deoxyroboncuclease I interaction. Depolymerization and nucleotide exchange. J Biol Chem 255:5668-73.

Holmes KC (1996) Muscle proteins--their actions and interactions. Curr Opin Struct Biol 6:781-9.

Holmes KC (1997) The swinging lever-arm hypothesis of muscle contraction. Curr Biol 7:R112-8.

Holmes KC, Popp D, Gebhard W, Kabsch W (1990) Atomic model of the actin filament. Nature 347:44-9.

Horváth L, Marsh D (1988) Improved Numerical Evaluation of Saturation Transfer Electron Spin Resonance Spectra. J. of Magn. Reson. 80:314-317

Houdusse A, Cohen C (1996) Structure of the regulatory domain of scallop myosin at 2 A resolution: implications for regulation. Structure 4:21-32.

Houk TW, Jr., Ue K (1974) The measurement of actin concentration in solution: a comparison of methods. Anal Biochem 62:66-74.

Hudson EN, Weber G (1973) Synthesis and characterization of two fluorescent sulfhydryl reagents. Biochemistry 12:4154-61.

Huxley A. F.., Niedergerke R (1954) Structural changes in muscle during contraction. Interference microscopy of living musclefibres. Nature 173:971-973

Huxley H. E.., Hanson J (1954) Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and the structural interpretation. Nature 173:973-976

Hyde J. S.., Dalton L. R.. (1979) Spin Labelling. Theory and Application, vol 2. Academic Press, New York

Iyengar MR, Glauser SC, Davies RE (1964) An ATP-induced conformational change in the acto-H-meromyosin system. Biochem Biophys Res Commun 16:379-83.

Janmey PA, Hvidt S, Oster GF, Lamb J, Stossel TP, Hartwig JH (1990) Effect of ATP on actin filament stiffness. Nature 347:95-9.

Kabsch W, Mannherz HG, Suck D, Pai EF, Holmes KC (1990) Atomic structure of the actin:DNase I complex. Nature 347:37-44.

Kasprzak AA (1994) Myosin subfragment 1 activates ATP hydrolysis on Mg^{2+}-G-actin. Biochemistry 33:12456-62.

Kasprzak AA, Chaussepied P, Morales MF (1989) Location of a contact site between actin and myosin in the three- dimensional structure of the acto-S1 complex. Biochemistry 28:9230-8.

Kensler RW, Stewart M (1983) Frog skeletal muscle thick filaments are three-stranded. J Cell Biol 96:1797-802.

Kinosian HJ, Selden LA, Estes JE, Gershman LC (1991) Thermodynamics of actin polymerization; influence of the tightly bound divalent cation and nucleotide. Biochim Biophys Acta 1077:151-8.

Kinosian HJ, Selden LA, Estes JE, Gershman LC (1993) Nucleotide binding to actin. Cation dependence of nucleotide dissociation and exchange rates. J Biol Chem 268:8683-91.

Kivelson D (1960) Theory of ESR linewidths of free radicals. J. Chem. Phys. 33:1094-1106

Kopp SJ, Barron JT, Tow JP (1990) Phosphatic metabolites, intracellular pH and free $[Mg^{2+}]$ in single, intact porcine carotid artery segments studied by ^{31}P-NMR. Biochim Biophys Acta 1055:27-35.

Korn ED, Carlier MF, Pantaloni D (1987) Actin polymerization and ATP hydrolysis. Science 238:638-44.

Kuehl WM, Gergely J (1969) The kinetics of exchange of adenosine triphosphate and calcium with G- actin. J Biol Chem 244:4720-9.

Kushmerick MJ, Dillon PF, Meyer RA, Brown TR, Krisanda JM, Sweeney HL (1986) ^{31}P NMR spectroscopy, chemical analysis, and free Mg^{2+} of rabbit bladder and uterine smooth muscle. J Biol Chem 261:14420-9.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-5.

Lakowicz J. R., (1983) Principles of Fluorescence Spectroscopy. Plenum Press, New York , London, pp 52-59

Lanzetta PA, Alvarez LJ, Reinach PS, Candia OA (1979) An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. Anal Biochem 100:95-7.

Lorand L, Parameswaran KN, Velasco PT, Hsu LK, Siefring GE, Jr. (1983) New colored and fluorescent amine substrates for activated fibrin stabilizing factor (Factor XIIIa) and for transglutaminase. Anal Biochem 131:419-25.

Lorenz M, Poole KJ, Popp D, Rosenbaum G, Holmes KC (1995) An atomic model of the unregulated thin filament obtained by X-ray fiber diffraction on oriented actin-tropomyosin gels. J Mol Biol 246:108-19.

Loscalzo J, Reed GH (1976) Spectroscopic studies of actin-metal-nucleotide complexes. Biochemistry 15:5407-13.

Lowey S, Slayter HS, Weeds AG, Baker H (1969) Substructure of the myosin molecule. I. Subfragments of myosin by enzymic degradation. J Mol Biol 42:1-29.

Lowry O. H.., Rosebrough N. J.., Farr A. L.., Randall R. J., (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275

Lőrinczy D, Könczöl F, Gaszner B, Belágyi J (1998) Structural stability of actin filaments as studied by DSC and EPR. Thermochomoca Acta 322:95-100

Luther PK, Munro PM, Squire JM (1981) Three-dimensional structure of the vertebrate muscle A-band. III. M- region structure and myosin filament symmetry. J Mol Biol 151:703-30.

Málnási-Csizmadia A, Pearson DS, Kovács M, Woolley RJ, Geeves MA, Bagshaw CR (2001) Kinetic resolution of a conformational transition and the ATP hydrolysis step using relaxation methods with a *Dictyostelium* myosin II mutant containing a single tryptophan residue. Biochemistry 40:12727-37.

Margossian SS, Lowey S (1973a) :Substructure of the myosin molecule. 3. Preparation of single-headed derivatives of myosin. J Mol Biol 74:301-11.

Margossian SS, Lowey S (1973b) Substructure of the myosin molecule. IV. Interactions of myosin and its subfragments with adenosine triphosphate and F-actin. J Mol Biol 74:313-30.

Margossian SS, Lowey S (1982) Preparation of myosin and its subfragments from rabbit skeletal muscle. Methods Enzymol 85:55-71.

Marsh D (1981) . In: Grell E (ed) Membrane Spectroscopy. Springer-Verlag, Berlin, pp 51-142

Miki M, Barden JA, dos Remedios CG, Phillips L, Hambly BD (1987a) Interaction of phalloidin with chemically modified actin. Eur J Biochem 165:125-30.

Miki M, dos Remedios CG, Barden JA (1987b) Spatial relationship between the nucleotide-binding site, Lys-61 and Cys-374 in actin and a conformational change induced by myosin subfragment-1 binding. Eur J Biochem 168:339-45.

Milligan RA, Whittaker M, Safer D (1990) Molecular structure of F-actin and location of surface binding sites. Nature 348:217-21.

Moens PD, dos Remedios CG (1997) A conformational change in F-actin when myosin binds: fluorescence resonance energy transfer detects an increase in the radial coordinate of Cys-374. Biochemistry 36:7353-60.

Moens PD, Yee DJ, dos Remedios CG (1994) Determination of the radial coordinate of Cys-374 in F-actin using fluorescence resonance energy transfer spectroscopy: effect of phalloidin on polymer assembly. Biochemistry 33:13102-8.

Mornet D, Pantel P, Audemard E, Kassab R (1979) The limited tryptic cleavage of chymotryptic S-1: an approach to the characterization of the actin site in myosin heads. Biochem Biophys Res Commun 89:925-32.

Mossakowska M, Belágyi J, Strzelecka-Golaszewska H (1988) An EPR study of the rotational dynamics of actins from striated and smooth muscle and their complexes with heavy meromyosin. Eur J Biochem 175:557-64.

Nishida E (1985) Opposite effects of cofilin and profilin from porcine brain on rate of exchange of actin-bound adenosine 5'-triphosphate. Biochemistry 24:1160-4.

Nyitrai M, Hild G, Belagyi J, Somogyi B (1997) Spectroscopic study of conformational changes in subdomain 1 of G- actin: influence of divalent cations. Biophys J 73:2023-32.

Nyitrai M, Hild G, Lakos Z, Somogyi B (1998) Effect of Ca^{2+}-Mg^{2+} exchange on the flexibility and/or conformation of the small domain in monomeric actin. Biophys J 74:2474-81.

Pantaloni D, Carlier MF, Korn ED (1985) The interaction between ATP-actin and ADP-actin. A tentative model for actin polymerization. J Biol Chem 260:6572-8.

Pollard TD (1984) Polymerization of ADP-actin. J Cell Biol 99:769-77.

Pollard TD (1986) Rate constants for the reactions of ATP- and ADP-actin with the ends of actin filaments. J Cell Biol 103:2747-54.

Pollard TD, Weeds AG (1984) The rate constant for ATP hydrolysis by polymerized actin. FEBS Lett 170:94-8.

Polzar B, Rosch A, Mannherz HG (1989) A simple procedure to produce monospecific polyclonal antibodies of high affinity against actin from muscular sources. Eur J Cell Biol 50:220-9.

Rayment I, Holden HM, Whittaker M, Yohn CB, Lorenz M, Holmes KC, Milligan RA (1993) Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. Science 261:58-65.

Reedy MK, Lucaveche C, Naber N, Cooke R (1992) Insect crossbridges, relaxed by spin-labeled nucleotide, show well- ordered 90 degrees state by X-ray diffraction and electron microscopy, but spectra of electron paramagnetic resonance probes report disorder. J Mol Biol 227:678-97.

Rickard JE, Sheterline P (1986) Cytoplasmic concentrations of inorganic phosphate affect the critical concentration for assembly of actin in the presence of cytochalasin D or ADP. J Mol Biol 191:273-80.

Rome E (1972) Relaxation of glycerinated muscle: low-angle X-ray diffraction studies. J Mol Biol 65:331-45.

Roopnarine O, Thomas DD (1994) A spin label that binds to myosin heads in muscle fibers with its principal axis parallel to the fiber axis. Biophys J 67:1634-45.

Sivaramakrishnan M, Burke M (1982) The free heavy chain of vertebrate skeletal myosin subfragment 1 shows full enzymatic activity. J Biol Chem 257:1102-5.

Smith CA, Rayment I (1996) X-ray structure of the magnesium(II).ADP.vanadate complex of the *Dictyostelium discoideum* myosin motor domain to 1.9 Å resolution. Biochemistry 35:5404-17.

Smyczynski C, Kasprzak AA (1997) Effect of nucleotides and actin on the orientation of the light chain- binding domain in myosin subfragment 1. Biochemistry 36:13201-7.

Somogyi B, Matkó J, Papp S, Hevessy J, Welch GR, Damjanovich S (1984) Forster-type energy transfer as a probe for changes in local fluctuations of the protein matrix. Biochemistry 23:3403-11.

Spudich JA, Watt S (1971) The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin. J Biol Chem 246:4866-71.

Steinmetz MO, Goldie KN, Aebi U (1997) A correlative analysis of actin filament assembly, structure, and dynamics. J Cell Biol 138:559-74.

Straub F. B., (1942) Actin. Stud. Szeged 2:3-15

Strzelecka-Golaszewska H (1973) Effect of tightly bound divalent cation on the equilibria between G- actin-bound and free ATP. Eur J Biochem 37:434-40.

Strzelecka-Golaszewska H, Moraczewska J, Khaitlina SY, Mossakowska M (1993) Localization of the tightly bound divalent-cation-dependent and nucleotide-dependent conformation changes in G-actin using limited proteolytic digestion. Eur J Biochem 211:731-42.

Strzelecka-Golaszewska H, Prochniewicz E, Drabikowski W (1978a) Interaction of actin with divalent cations. 1. The effect of various cations on the physical state of actin. Eur J Biochem 88:219-27.

Strzelecka-Golaszewska H, Prochniewicz E, Drabikowski W (1978b) Interaction of actin with divalent cations. 2. Characterization of protein-metal complexes. Eur J Biochem 88:229-37.

Takashi R (1979) Fluorescence energy transfer between subfragment-1 and actin points in the rigor complex of actosubfragment-1. Biochemistry 18:5164-9.

Takashi R (1988) A novel actin label: a fluorescent probe at glutamine-41 and its consequences. Biochemistry 27:938-43.

Taylor DL, Reidler J, Spudich JA, Stryer L (1981) Detection of actin assembly by fluorescence energy transfer. J Cell Biol 89:362-7.

Tellam RL (1986) Gelsolin inhibits nucleotide exchange from actin. Biochemistry 25:5799-804.

Thomas DD, Cooke R (1980) Orientation of spin-labeled myosin heads in glycerinated muscle fibers. Biophys J 32:891-906.

Thomas DD, Seidel JC, Gergely J (1979) Rotational dynamics of spin-labeled F-actin in the sub-millisecond time range. J Mol Biol 132:257-73.

Thomas DD, Seidel JC, Gergely J, Hyde JS (1975) The quantitative measurement of rotational motion of the subfragment-1 region of myosin by saturation transfer epr spectroscopy. J Supramol Struct 3:376-90

Tobacman LS, Korn ED (1983) The kinetics of actin nucleation and polymerization. J Biol Chem 258:3207-14.

Trentham DR, Bardsley RG, Eccleston JF, Weeds AG (1972) Elementary processes of the magnesium ion-dependent adenosine triphosphatase activity of heavy meromyosin. A transient kinetic approach to the study of kinases and adenosine triphosphatases and a colorimetric inorganic phosphate assay in situ. Biochem J 126:635-44.

Tsien RY, Pozzan T, Rink TJ (1982) Calcium homeostasis in intact lymphocytes: cytoplasmic free calcium monitored with a new, intracellularly trapped fluorescent indicator. J Cell Biol 94:325-34.

Waechter F, Engel J (1977) Association kinetics and binding constants of nucleoside triphosphates with G-actin. Eur J Biochem 74:227-32.

Wagner PD, Giniger E (1981) Hydrolysis of ATP and reversible binding to F-actin by myosin heavy chains free of all light chains. Nature 292:560-2.

Weeds AG (1969) Light chains of myosin. Nature 223:1362-4.

Weeds AG, Lowey S (1971) Substructure of the myosin molecule. II. The light chains of myosin. J Mol Biol 61:701-25.

Weeds AG, Taylor RS (1975) Separation of subfragment-1 isoenzymes from rabbit skeletal muscle myosin. Nature 257:54-6.

Wegner A (1976) Head to tail polymerization of actin. J Mol Biol 108:139-50.

Xie X, Harrison DH, Schlichting I, Sweet RM, Kalabokis VN, Szent-Györgyi AG, Cohen C (1994) Structure of the regulatory domain of scallop myosin at 2.8 Å resolution. Nature 368:306-12.

Zhao L, Naber N, Cooke R (1995) Muscle cross-bridges bound to actin are disordered in the presence of 2,3-butanedione monoxime. Biophys J 68:1980-90.