

PhD értekezés tézisei

Ligandum-indukált konformációváltozások kontraktilis fehérjerendszerben

Hartvig Nóra

**Alprogram megnevezése: Fehérje szerkezet és működés
Alprogram vezető: Dr. Belágyi József, egyetemi tanár**

**Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Központi Kutatólaboratórium**

2002.

Bevetés

Az élőlények mozgása régóta kutatott területe a biológiának. Az alakváltoztatás, a hely- és helyzetváltoztató mozgás az életjelenségek lényegi eleme. Ezen mozgásjelenségek háttérében felhárítandó szervek összehangolt működése áll.

A legismertebb ilyen rendszer a szarkomeregységekből felépülő izom, amelyet a vékony és vastag filamentumok bonyolult rendszere alkot. A vékony filamentum fő alkotója az aktin, a vastag filamentumé a miozin. Az izomösszehúzódás során a két filamentumrendszer egymáson történő elmozdulása eredményezi az izomrosti rövidülését. A folyamathoz szükséges energiát a miozin molekula által katalizált ATP hidrolízis szolgáltatja. A hidrolízis során a miozin konformációváltozások sorozatán megy keresztül, és változik a miozinfajok aktinhoz viszonyított térbeli helyzete. A folyamat eredményeként a felszabaduló kémiai energia mechanikai energiává alakul, az izom rövidül és erőt fejt ki.

Az izomműködés molekuláris szintű megismerésében áttörést jelentett a miozin és az aktin molekulák aminosavsorrendjének és háromdimenziós szerkezetének meghatározása. A szerkezetek ismeretében felgyorsultak azok a vizsgálatok, amelyek a ATPáz ciklus egyes lépéseinek egy-egy konformációs állapotot feleltetnek meg. Biokémiai módszerekkel több mint két állapot különböztethető meg. Az állathuak használt EPR spektroszkópia azonban csak a hosszú ideig stabil – vagy stabilizálható – lépések vizsgálatát teszi lehetővé, ezért ezen néhány állapot jellemzéséhez (létfésához) Bagshaw és Trenham modellijét használtuk, amely négy miozinallapot különít el az alábbi séma szerint:



ahol az M a miozint, a M*ATP, M**ADP.Pi és az M*ADP pedig a hidrolízis ciklus közös állapotait jelentik. A ciklus első lépéseként a miozin megkötöti az ATP-t, és disszociál az aktintól. A szabad miozinfajok 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 a hidrolízis termékei

szabaddá válnak. Ahhoz, hogy ezt a mechanizmust pontosan 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, és nem (vagy csak lassan) hidrolizálva stabilizálják a miozin-nukleoid komplexet. Ilyen nukleotidanalóg az AMP-PNP (nem hidrolizáló ATP), vagy a lassan hidrolizáló ATP- γ -S, amelyek az M⁺-ATP állapot vizsgálatára alkalmasak, továbbá az AlF₄⁻, BeF₃⁻ vagy a VO₂⁺, amik a foszfátion strukturális analógiaként az M⁺⁺-ADP-Pi állapotot 'mimikálják'.

Vizsgálatainkat a kontraktilis fehérjérendszer másik fő alkotójára, az aktinra is kiterjesztetük. Az aktin mind az izomban, mind a citoskeletonális rendszerben dinamikus átrendeződésre képes szerkezetet alkot; ez teszi alkalmassá, hogy az izom összehúzódásában, a sejt alakváltozásainak szabályozásában, valamint számos sejtben belüli transzportfolyamokban fontos szerepet töltsön b.É. Égő sejtben két formában, monomer (G) és polimer, vagy filamentális (F) aktinként található meg. A kontrakciós modellek az aktin filamentumokat passzív részvevőként kezelik. Kísérleti adatok alapján azonban a szerkezetükben és dinamikájukban bekövetkező változásoknak fontos szerepe lehet a sejtműködés és az izomkontrakció során. A filamentális formából felépülő aktin hálózat kialakulását és újrendeződését sok körülmény szabályozza a sejtben. Ilyen körülmény lehet a monomerekben kötött nukleotid és kationok kation minősége, mert jelentősen befolyásolja a monomer polimerizációs készségét és a monomer - polimer egyensúlyt.

Kísérleteinkben nukleotidok és nukleotid analógok hatását vizsgáltuk aktin monomerek, filamentumok, valamint glicerinnel izomrosztok szerkezetére, konformációs állapotaira és dinamikai jellemzőire.

Céltűzés

Vizsgálataink célja az izomkontrakció során létrejövő molekuláris szintű változásoknak vizsgálata, továbbá az izomokat felépítő egyes komponensek dinamikai tulajdonságainak megismerése volt.

(i) A aktin monomerek polimerizáció-képességét sok környezeti faktor befolyásolja, és a polimerizáció szabályozása napjainkban is jelentős kutatási terület. A polimerizáció során bekövetkező konformációváltozások felderítése, a konformáció változást kiváltó tényezők meghatározása, és e változásnak a polimerizáció sebességére gyakorolt hatása egyaránt időszertű kutatási téma. Kísérleteink célkitűzése volt a monomereken végbeemenő nukleotidcsere szerkezetére gyakorolt hatásának vizsgálata.

(ii) A monomerek fiziológiai körülmények között ATP-1 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 filamentumok között.

(iii) Az izomkontrakció során a miozin fejen jelentős szerkezeti változások játszódnak le. A diffrakciós szerkezet-meghatározó módszerek a minta tömegeloszlásának megfelelően sztatikus információkat nyújtanak a dinamikai folyamattal - kristályba 'fagyasztozt' - egyes állapotainról. A dinamikai vizsgálat egyik lehetséges módja, hogy mozgásra érzékeny spektroszkópiai szondákat helyezünk el a miozin molekula kiemelt helyeire. Célserősen olyan szerkezeti egységeket közelítve, amelyek valamilyen jelentős változáson mennek keresztül az izomműködés során. Kísérleteinkben paramágneses szondákkal jelöltük a miozin motor doménjének cisztein-707-es aminosav oldalláncát izomrosztban, és a regulációs doménja esszenciális könnyűláncán található cisztein-177-es aminosav oldalláncát az izomrosztba diffundáltatott SI molekulán. Izomrosztal végzett vizsgálatainkban célunk volt a kontrakció alatti ATP hidrolízis egyes hosszú életidejű lépései során bekövetkező konformációs változások detektálása és azonosítása a kontrakciós ciklus már meghatározott szerkezeti állapotjaival.

Alkalmazott módszerek

A molekulák mozgási tulajdonságainak vizsgálatára többféle spektroszkópiai módszer áll rendelkezésre. A módszerek közös tulajdonsága, hogy a vizsgált anyagnak az elektromágneses sugárzással történő kölcsönhatásait detektálják. A mérés során előállított 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 vizsgált fehérjék strukturális és dinamikai tulajdonságainak jellemzésére az elektronparamágneses (EPR) más néven elektronspin rezonancia (ESR) spektroszkópia, valamint a fluoreszcencia spektroszkópia módszereit használtuk.

EPR spektroszkópia

EPR méréseinket Bruker 300 E típusú elektronparamágneses rezonancia spektrométerrel végeztük. A konvencionális EPR méréseinkhez 100 KHz modulációt, 0,1-0,2 mT modulációs amplitúdót és 20 mW mikrohullámú teljesítményt használtunk. A szaturációtranszfer EPR (ST EPR) technikával a spektrométer 63 mW mikrohullámú teljesítményen, 50 KHz moduláció és 0,5 mT modulációs amplitúdó mellett 100 KHz 'out-of-phase' detektálással rögzítettük. Aktinon: és esszenciális könnyűláncon történt jelölésekhez N-(1-oxil-2,2,6,6-tetrametil-4-piperidinil)maleimid (MSL) paramágneses jelölőt, míg glicerinhez izomoszhoz MSL és 4-izotiocianát-2,2,6,6-tetrametil-piperidinil (TCSL) paramágneses jelölőt használtunk.

Fluoreszcencia spektroszkópia

A steady-state fluoreszcencia méréseket Perkin-Elmer LS50B típusú spektrofluoriméterrel, míg az időfüggő fluoreszcencia méréseket ISS K2 típusú (ISS Fluorescence Instrumentation, Champaign, IL USA) multifrekvenciás fázisfluoriméterrel végeztük. A donor-akceptor távolság meghatározásához és a radiális koordináta valamint a transzferhatások számításához fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer technikát (FRET) alkalmaztuk. Az aktin filamentumok közötti flexibilitásbeli különbségek meghatározásához a normalizált FRET hatások (J paraméter) hőmérséklet hatására történő változását mértük. Aktin monomerek közti FRET és J vizsgálatokhoz N-(6-ódcetil)-N'-(5-szulfó-1-naftil)etiléndiamin (IAEDANS) donorként és 5-jódcetamidofluorescein (IAF) akceptoroként, a monomereken belüli FRET mérésekhez pedig IAEDANS donor és fluoreszceninkadaverin (FC) akceptor fluorofór párt használtunk.

Eredmények és következtetések

Az aktin monomereken kapott EPR eredményeink azt mutatták, hogy a nukleotidcsere során létrejött egy átmeneti aktin populáció, ami lényegesen nagyobb rotációs korrelációs idővel jellemezhető, mint az ATP-Mg-G-aktin. Mivel az általunk használt MSL jelölő rigidén kapcsolódott az aktin cisztein-374-es aminosav oldalláncához, ezért a rotációs korrelációs idő a teljes monomer vagy egy nagyobb domén mozgási tulajdonságától szolgáltató információ. Nukleotidcsere során az átmenetileg tapasztalt megnövekedett csatolási állapot és az ehhez tartozó rotációs korrelációs idő nem származhatott aktin monomertől, vagy a monomeren bekövetkező belső konformációváltozástól, mert értéke a filamentumokra jellemző értékhez közelített. Figyelembe véve a hiperfinom csatolási állapot változásának kinetikáját, a steady-state fluoreszcencia anizotropia nukleotidcsereére való érzékenységi, valamint korábbi eredményeket, az aktin filamentumok jelenléte a nukleotidcsere során kizárható volt. Mind ezek alapján az ATP-ADP csere során a hiperfinom csatolási állapot értékének átmeneti növekedése egy jelentős mennyiségű, de átmeneti aktin oligomer populáció kialakulására utal. Feltételezésünket alátámasztotta az a korábbi megfigyelés, hogy az aktin monomerek egymáshoz való affinitása nagyobb a különböző nukleotidok (ADP- γ és ATP- γ) egyaránt tartalmazó keverékeknél esetén, mint bármelyik egyenlet oldatban.

Az átmeneti oligomer populáció élettartama hőmérsékletfüggő, életidője percekben volt mérhető. Az ATP koncentráció mérések eredménye alapján megállapíthatjuk, 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 állapotú spektromok jelentős átfordése miatt a változás pontosan nem volt követhető.

A nukleotidcsere során létrejövő konformációváltozást FRET méréseink is alátámasztották. A transzfer hatások a csere indíktását követő fél órán belüli elérté a 72 %-os maximum értékét. Mérési eredményeinkből arra következtethetünk, hogy az ATP-ADP csere folyamán az aktin monomeren konformációváltozás játszódik le, aminet

eredményként a két általunk jelölt aminosav oldallánc (cisztein-374, glutamin-41) közelebb került egymáshoz.

Szemben a hiperfinom csatolási állandó változásának időfüggésével, a FRET hatások értékek nem átmeneti, hanem tartós változásra utalnak. Ennek megfelelően a transzfer hatások növekedése nem magyarázható a nukleotidcsere során lejátszódó oligomerizáció folyamataival, hanem a monomerek olyan elrendeződését feltételezi az oligomereken belül, ami nem eredményez protomerek közötti hatékony energia transzfer. Feltehetően az ATP-ADP csere által indukált oligomerizációban a szomszédos monomerek kapcsolódási régiója eltér a filamentumban találhatóól.

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 hatások párhuzamosan nőtt az ADP-Mg-G-aktin koncentrációjának növekedésével, ami – közvetlenül a nukleotidcsere indítását követően – a glutamin-41 és a cisztein-374-es oldallánccal tartalmazó régiók egymáshoz való közeledését jelelte. Ezzel szemben a hiperfinom csatolási állandó növekedése késéssel követte az ADP-Mg-aktin koncentrációváltozását, ami az oligomerek (intranomomer konformációváltozást követő) lassabb kialakulását mutatta.

Vizsgálataink kiterjesztetük aktin filamentumokra, ahol a polimerizációt megelőződen végeztük el a kationcsereit, valamint a nukleotidcsereit, akkor ha ADP-Mg-G-aktin volt a kiindulási monomer. Ahhoz, hogy a kísérleti adataink értékelhetőek legyenek, biztonságosnak kellett lenniük abban, hogy az aktin jelentős hányada filamentózus formában volt jelen a mérések folyamán. Ezért hosszasan (10-12 óráig) polimerizáltuk az aktint szobahőmérsékleten, elegendő időt biztosítva a monomer-filamentum egyensúly kialakulásához. A vizsgálatok során az aktin egy része (a kritikus koncentrációnak megfelelően) monomer formában volt jelen. A jelenlévő monomerek zavaró hatásának csökkentése érdekében viszonylag nagy kiindulási aktin koncentrációt (30 μM) használtunk a polimerizáláshoz, és a FRET hatások mérésüket falloidin jelenlétében is elvégeztük. A falloidin stabilizáló hatással van az aktin filamentumokra úgy, hogy csökkent a monomerek disszociációját, eltolja a monomer-filamentum egyensúlyt a filamentózus forma felé, így méréseink során megbecsülhetővé tette a monomerektől származó járulékat. Mivel a falloidin jelenlétében kapott FRET hatások értékek nem

váltak jelentősen sem az ATP-t, sem az ADP-t tartalmazó monomerekből polimerizált filamentumok esetén – bármelyik akceptor moláritást vizsgálva –, ezért a monomerek zavaró hatását a vizsgálataink során elhanyagolhatónak tekintettük.

Az IAEDANS fluoreszcencia spektrumainak nukleotidfüggéséből arra következtettünk, hogy a különböző kiindulási monomerekből polimerizált aktin filamentumok cisztein-374-es aminosav oldalláncának fehérje környezete elértő konformációval rendelkezik. A nukleotidok IAEDANS intenzitására gyakorolt hatása a filamentumban jó egyezést mutatott korábbi, monomereken kapott eredményeinkkel.

A hőmérsékletfüggő FRET kísérleteink értékeléséhez elfogadottnak kell tekintenünk azt a feltevést, hogy a donor és akceptor molekulák relatív mozgásának amplitúdó növekedése a hőmérséklet emelkedésével a flexibilisebb fehérje formában nagyobb, mint a rigidebb formában. Ezért a hőmérséklet emelkedésre a kísérletileg meghatározható f értékei nagyobb változást mutatnak a makromolekulák flexibilisebb formában. Ez a feltevés magában foglalja annak lehetőségét, hogy a hőmérséklet emelkedésére konformációváltozás is lejátszódik 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. A DSC technika elsősorban globális konformációváltozásokra érzékeny, tehát a jelölt helyek közvetlen környezetben létezőt 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 internomomer kapcsolatot a szomszédos monomerek között lazább az ADP-Mg-G-aktinból polimerizált filamentumban, mint az ATP-Mg tartalmú monomerekből polimerizált esetén. Falloidin hozzáadásakor a monomerek közötti flexibilitás lecsökkent mindkét típusú filamentum esetén, de jelentősebb változást az ADP-t tartalmazó monomerekből polimerizált filamentumnál okozott. Mivel az ATP-Mg-G-aktinból polimerizált filamentum falloidin nélkül is megérvő nagyobb rigiditását mutatta. Falloidin jelenlétében mindkét filamentumra kapott relatív f értékek nagyon hasonlóak voltak, ami a falloidin – aktin

filamentumra gyakorolt – egyseges merevítő hatására utal, függetlenül a kindulási nukleotid tartalomtól. Az eredményekből az is következik, hogy a falloidin hatása a filamentum struktúrájára összetett, egyfelől megerősíti a filamentumban meglévő intermonomer kapcsolatokat, másfelől lecsökkenti a monomerek filamentumról történő disszociációját.

Az utóbbi évek szerkezet-meghatározás területén elért eredményei lehetővé tették számunkra a mozgásra érzékeny spektroszkópiai szondák segítségével vizsgált molekuláris dinamikai jelenségek értelmezését. Kísérleteink az ATPáz ciklus mechanizmusának pontosabb megismerésére irányultak. Ennek érdekében a miozin motoroménijének és könnyűláncoként doménjének környezetében lejátszódó nukleotid-indukált konformációváltásokat vizsgáltuk. TCSSL és MSL paramágneses szondáinkat az izomrost miozin fején található legreaktívabb cisztein oldallánchoz, a cisztein-707-bez, valamint a izolált S1 esszenciális oldalláncán található cisztein-177-es aminosav oldalláncához kapcsoljuk.

Konvencionális és ST EPR méréseink során, nukleotidmentes (rigor) állapotban, a glicerinbezt izomrosztokon mért EPR spekttrumok nagyfokú irányfüggő rendezettségét mutattak mindkét jelölő esetén. AMP.PNP hozzáadására (minimálva az M^+ .ATP állapotot), a spekttrumok jelentős változást mutatnak a miozinefejek orientációjában. Megelőző munkánk szerint MSL jelölt rostokban AMP.PNP hozzáadására a keresztirányú fele érintett a változásban. A változás eredménye dinamikus rendezetlenség, míg az 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 izomroszt rugalmas feszültsége nem változik a rigor állapotban mérhető rugalmas feszültségéhez képest. Ez módosítja azt a feltevést, hogy a miozin fejek mintegy fele rigor állapotban marad AMP.PNP jelenlétében is. Viszont az is kísérleti tény, amit elektronmikroszkópos (EM) megfigyelések mutatnak, hogy az AMP.PNP relaxált állapotú cross-bridge orientációt eredményez. Az általunk vizsgált TCSSL jelölt rostban detektálható volt az 50 %-nyi rendezetlen frakció, de a rendezett állapotban maradt fejektől származó spektrum komponens az ADP állapotnak

megfelelő konformációt tükrözött. Az MSL és TCSSL jelölőkkel kapott eredmények mégsem ellentmondások, mivel az MSL szonda merevebben kapcsolódik a miozin fejhez ($L^*/L = 1,2$) mint a TCSSL ($L^*/L = 0,83$), így az MSL spekttrumok a teljes miozinej orientációjáról közvetlenebb információ, szemben a TCSSL 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 utal, valamint a TCSSL szondával nyomom követhető lokális konformációváltásra, ami a nukleotid kötés hatására következett be. A röntgendiffrakciós és EM vizsgálatok szerint a miozin fejek azonos módon viselkednek, ellentétben a spektroszkópiái és mechanikai mérésekkel. Az ellentmondás csak úgy oldható fel, ha feltelevizünk, hogy egy dinamikus egyensúly áll fenn a sztereospecifikus (ADP jellegű) és nem sztereospecifikus (AMP.PNP jellegű) kölcsönhatások között, és a kölcsönhatás dinamikus jellege csak spektroszkópiái módszer számára teszi lehetővé a két állapot megkülönböztetését.

Oldalban mérve az esszenciális könnyűláncon jelölt S1 spektrogramit, a jelölő nagyfokú rotációs mobilitást mutatott, azonban a rostba diffundáltaást követően a jelölő mobilitása lecsökkent és a spektrogramokból rendezett, orientált rendszer létrejöttére következtethetünk. Nukleotidmentes (rigor) állapotban a miozin fejek orientáltan kapcsolódtak az aktin filamentumokhoz. ADP jelenlétében az MSL szonda – és/vagy az S1 aktinhoz történő kapcsolódásának – orientációját és rotációs mobilitását megfelelt a rigor állapotban meghatározott értékeknek. Ez az eredmény megegyezik a korábbi megfigyelésekkel, miszerint az ADP kötődése által kiváltott konformációváltások nem befolyásolják távoli régiók mobilitását. Az ADP.Pi állapot modellezéséhez ATP-1 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 spektrogramok irányfüggő rendezettség megszűnt, a spektrum intenzitása lecsökkent, jelezve, hogy a fejek nagy része tartósan disszociált az aktin filamentumoktól és a rostot körülvevő folyadékterületbe diffundált a kezelés során.

Összefoglalás

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

1.a/ 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 monomereken 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 lassabb, 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.

b/ Aktin filamentumokon végzett fluoreszcencia spektroszkópiai kísérleteinkben a polimerizáció indításakor különböző nukleotidok (ATP-1 vagy ADP-1) tartalmazó monomerekből polimerizált filamentumok flexibilitását vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy ellérés tapasztalható a kétféle filamentum intermonomer flexibilitásában. A korábbi, monomereken kapott eredményeknek megfelelően az IAEDANS fluoreszcencia intenzitása kisebb volt ADP-G-aktinből polimerizált filamentum esetén. A nukleotidcsere következtében a monomereken létrejövő konformációváltozás eltér intermonomer kapcsolódáshoz vezethet a kétféle filamentumban. Ennek következménye lehet a kétféle filamentum dinamikai tulajdonságai között tapasztalt flexibilitásbeli különbség.

2.a/ Glicerinezett izomrosztokon végzett EPR vizsgálatunk során a miozin molekula feji részén található legreaktívabb cisztein oldalláncot, a cisztein-707-et, MSL vagy TCSL szondákkal jelöltük. A kontrakciós ciklus különböző lépései nukleotidokkal vagy az egyes lépéseket stabilizáló nukleotid analógok hozzáadásával modelleztük. Vizsgálataink eredményeként megállapítottuk, hogy bármelyik jelöltöt alkalmaztuk is,

rigor állapotban a jelölők irányfüggő rendezettségét mutattak, de kitüntetett irányuk és szögviszonyaik különbözők. Ez a különbözőség a jelölők eltérő kémiai struktúrájával és a jelölő kapcsolódásának eltérő módjával magyarázható. Az ATP állapot közelítéséhez használt nem hidrolizáló ATP analóg (AMP-PNP) hatására a keresztmunkák fele konformációváltozás és/vagy konformációváltozás következtében véletlenszerű irányfüggést mutatott, míg a másik fele rendezett, aktinhoz kötött állapotban maradt. A random frakció megfelel az ADP-Pi állapotot közelítő 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 állapot 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 végbemennő változások közvetítésére is alkalmas.

b/ Glicerinezett izomroszta diffundáló S1 molekulák immobilizálódtak az aktin felszínén és spektrumaik irányfüggő rendezettségét mutattak. A rigor és ADP állapot között nem mutatható ki lényeges különbség. ATP és ortovanádát jelenlétében a fejek tartósan disszociálhatnak az aktin filamentumtól.

Az eredmények természetesen újabb kérdésekhez vezetnek, amelyek hosszú időre kijelöltek a munka folytatásának irányait. Ezek lehetnek a miozin feji régiójában lejátszódó dinamikai változások, és azok kapcsolata az ATP hidrolízis egyes köztes állapotjaival, valamint az energiatárolás belső mechanizmusának megismerése.

Az értékezés alapjául szolgáló közlemények

- Gaszner B., Nyitrai M., Hartwig 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., Hartwig 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., Hartwig N., Belágyi J., Nucleotide analogue induces global and local changes in muscle fibres. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 2001; 64: 651-658.
- Hartwig N., Lőrinczy D., Farkas N., Belágyi J., Effect of AMP-PNP on Myosin Head Domain Motions. (*Eur. J. Biochem.* című folyóirathoz közlésre elküldve)
- Hartwig N., Kiss M., Lőrinczy D., Belágyi J., Effect of nucleotides and their analogues on essential light chains in myosin head (*J. Biochem. Biophys. Meth.* című folyóirathal közlés alatt)
- Az értékezés alapjául szolgáló absztraktok**
- Lőrinczy D., Hartwig N., Gaszner B., Belágyi J., Effect of AMP-PNP on myosin head domain motion. EPR and DSC measurements. 28th European Muscle Conference, York, UK, 1999. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 1999; 20(8): 815.
- Hartwig 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., Hartwig 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., Hartwig N., Lőrinczy D., Belágyi J., Oxigen szabadgyökök hatása az aktin internális dinamikájára. A Magyar Biofizikai Társaság XIX. Vándorgyűlése, Kecskemét, 1999.
- Hartwig N., Gaszner B., Lőrinczy D., Belágyi J., AMP-PNP indukált konformáció-változás hármasláncú izomrostokban. DSC és EPR vizsgálata. A Magyar Biofizikai Társaság XIX. Vándorgyűlése, Kecskemét, 1999.

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

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

Lőrinczy D., Hartwig 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., Hartwig 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.

Hartwig 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., Hartwig N., Belágyi J., Somogyi B., Az ATP- és ADP-aktin monomerektől polimerizált filamentumok konformációs és dinamikai tulajdonságai különbözők. XXX. Membrán-transzport konferencia, Sümeg, 2000.

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

Hartwig 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.

Hartwig 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., Hartwig 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., Hartwig N., Belágyi J., Effect of selectively generated thyl 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_3^- 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 paramétereiktől. A Magyar Biofizikai Társaság XX. Kongresszusa, Budapest, 2001.

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

Hartvig N., Farkas N., Lőrinczy D., Belágyi J., AM-ADP-Pi intermediér 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 European Muscle Conference Pavia Italy 2001.