

Dictyostelium miozin II switch I térszerkezeti átrendeződéseinek karakterizálása tranziens kinetikai módszerekkel

Kintses Bálint

szakdolgozat



Témavezető: Dr. Málnási-Csizmadia András
ELTE Biokémiai Tanszék
Tanszékvezető: Prof. Gráf László

Budapest, 2005

Tartalomjegyzék

1 Bevezetés	3
2 Irodalmi áttekintés	5
2.1 A miozinokról általában	5
2.2.1 A miozin szerkete	6
2.2.2 A motor domén szerkezete	6
2.2.3 A <i>Dictyostelium</i> motor domén szerkezetek	8
2.3 Kinetikai áttekintés	11
3 Célkitűzések	13
4 Anyagok és módszerek	14
4.1 DNS konstrukciók	14
4.2 Rekombináns DNS technikák	14
4.2.1 <i>E. coli</i> transzformálás és transzformánsok növesztése	14
4.2.2 Plazmid DNS izolálása	15
4.3 <i>Dictyostelium</i> expressziós rendszer	15
4.3.1 pDXA-3H expressziós vektor	16
4.3.2 Sejtkultúra fenntartása	17
4.3.3 <i>Dictyostelium</i> sejtek transzformálása elektroporálással	17
4.4 Fehérje expresszió	18
4.4.1 Folyadékkultúra felnövesztése	18
4.4.2 Expresszió ellenőrzése	19
4.5 Fehérje preparálás	19
4.6 Fehérje tisztítása	20
4.7 Elektroforetikus technikák	21
4.7.1 Agaróz gélelektroforézis	21
4.7.2 SDS poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE)	22
4.8 Triptofán fluoreszcencia	22
4.9 Egy triptofános motor domén steady-state fluoreszcencia mérése	23
4.9.1 Emissziós spektrumok felvétele	23
4.9.2 ATP-áz aktivitás mérése	24
4.9.3 Fluoreszcencia hőmérséklet függése	24
4.10 Gyorskinetika - megállított áramlás módszer (stopped-flow technigue)	24

4.11 Adatok kiértékelése	27
5 Eredmények	28
5.1 W239+ és W242+ preparátumok előállítása	28
5.2 Triptofán szenzorok tesztelése	28
5.3 Enzim aktivitás ellenőrzése	30
5.4 Hány állapotot érzékelünk?	30
5.5 Az ATP kötés és az aktin disszociáció kapcsolatának vizsgálata	32
5.5.1 ATP kötés vizsgálata megállított áramlásos módszerrel aktin távollétében	32
5.5.2 ATP kötés vizsgálata megállított áramlásos módszerrel aktin jelenlétében	35
5.6 Akto-miozin komplex kialakulásának vizsgálata megállított áramlásos módszerrel	37
5.7 ADP kötés megállított áramlásos vizsgálata	38
5.8 Mg elvonásos kísérletek	41
6 Eredmények értelmezése	46
7 Összefoglalás (Summary)	54
8 Köszönetnyilvánítás	56
9 Rövidítés jegyzék	57
10 Irodalom jegyzék	58

1 Bevezetés

A miozinok olyan molekuláris motorok, amik képesek az ATP-ben tárolt kémiai energiát térszerkezeti átalakulásokon keresztül mechanikai munkává alakítani, és így az aktin filamentum mentén előrehaladó mozgást végezni. Ennek a konverzióknak kulcseleme a miozin motor doménnek nevezett része, amely rendelkezik egy aktin és egy nukleotid kötő régióval, illetve a térszerkezeti átrendeződések felerősítésére szolgáló erőkar bázisával. Az aktinhoz kötött motor domén megköti az ATP-t, minek hatására az aktin disszociál a miozinról. Az ATP hidrolízishez kapcsolt konformációs átrendeződés folyamán a motor doménhez kapcsolódó erőkar felhúzott állapotba kerül. Az aktin visszakötődés hatására a felhúzással ellentétes irányú átrendeződéssel (power stroke) újból a lecsapott térszerkezeti állapotába tér vissza a motor domén, miközben a hidrolízis termékek felszabadulásával párhuzamosan az aktin egyre szorosabban köt a miozinhoz. Az enzim ciklus során megfigyelhető az aktin illetve a nukleotidok antagonisztikus affinitása, ami az aktin és a nukleotid kötő régiók közötti összetett kommunikációs útvonalak meglétéről árulkodik.

Egészen a közelmúltig csupán olyan kristályszerkezetek álltak rendelkezésre, amelyek a motor domén kis aktin affinitású állapotait reprezentálták, így a két régiót összekötő, az idáig láthatatlan „kapcsoló” egyetlen állapota volt megfigyelhető. A 2003-as év bő termésű esztendő volt, mivel két kristályszerkezet (Reubold és mtsai, 2003, Coureux és mtsai, 2004) és több spektroszkópiai megfigyelés (Holmes és mtsai, 2003, Conibear és mtsai, 2003) is napvilágot látott, melyekben az aktin kötő régió és a nukleotid kötő zseb közötti kapcsolat új mechanizmusát felfedve, megmagyarázhatóvá vált az aktin és a nukleotid affinitás közötti ellentétes összefüggés. A titok nyitja a G-fehérjék analógiáján elnevezett Switch I régió, melynek így már két konformációs állapota volt megfigyelhető. Nukleotid kötött állapotokban a zárt nukleotid kötő zseb kialakításában fontos szerepet játszó, úgynevezett zárt konformációs állapotot vesz fel, míg nukleotid nélkül, nyitott nukleotid kötő zseb, és így nyitott switch I konformációs állapot figyelhető meg (Reubold és mtsai, 2003).

A kristály szerkezetek által szolgáltatott predikció ezek alapján a következő mechanizmust fogalmazza meg: az akto-miozin komplexhez kötődő ATP hatására a Switch I régió nyitottból zárt konformációs állapotba megy át, minek következtében az aktin kötő árok kinyílik és az aktin disszociál. Az ATP hidrolízisét követően az aktin visszakötődik, és az aktin kötő árok záródásának hatására, a zárt nukleotid kötő zsebet megbontva, a Switch I régió nyitott térszerkezeti állapotába kerül.

Mivel a kristály szerkezetek csak egy statikus képet szolgáltatnak, ezért a különböző állapotok közötti átalakulások mechanizmusa illetve sorrendje csupán feltételezéseken és következtetéseken alapulhat. Ennélfogva fontos, hogy az előbbieken vázolt mechanizmus oldatban való vizsgálatával egy dinamikus képet kapjunk, és ilyenformán a szerkezetek ötvözése a kinetikai adatokkal a folyamat jobb megértését és erőteljesebb modell felállítását biztosíthatja.

Vizsgálataink objektuma a *Dictyostelium discoideum* sejtes nyálkagomba miozin II motor doménje. Olyan egy-triptofános mutáns változatait terveztük meg, amelyek alkalmasak a Switch I régió térszerkezeti átalakulásainak nyomon követésére az egyetlen triptofán oldallánchoz hozzárendelhető fluoreszcencia vizsgálatával. Ennélfogva munkánk során géntechnológiai, fehérjeexpressziós és preparatív, valamint steady-state és gyorskinetikai spektroszkópos technikákat alkalmaztunk.

Munkánk megkezdésekor a következő feltevésekre kerestük a választ:

- Valószínűsíthetően az ATP kötésekor lezajló nyitott-zárt konformációs átmenete a Switch I régióknak milyen állapotokon át, hány lépésben történik, és hozzárendelhető-e ehhez a konformáció változáshoz az akto-miozin komplex disszociációja.
- Az aktin és az ATP egymás affinitását 1000X-en gyengítik a motor doménhez. A *Dictyostelium* miozin II esetében az ADP-re ez csak néhányszorosan igaz (Nyitrai és Geeves, 2004). Ha feltételezzük, hogy a Switch I régió térszerkezeti állapota felelős a motor domén aktin affinitásának kialakításáért (Reubold és mtsai 2003, Holmes és mtsai, 2003, Málnási-Csizmadia és mtsai, 2003, Coureux és mtsai, 2004), akkor ellentmondásos adatokba ütközhetünk. A kristály szerkezetek alapján csupán két állapota különíthető el a régióknak, és az ATP és ADP kötött állapotban ugyan az (Gulick és mtsai, 1997). Érdekes kérdés, hogy spektroszkópiai módszerekkel sikerül-e a Switch I régió több állapotának meglétét láthatóvá tenni, és azzal az ellentmondást feloldani.

Talán nem ideillően most szeretném megjegyezni, hogy a *Dictyostelium* miozin II motor domén hőmérsékletugrásos kísérletei témavezetőm, Málnási-Csizmadia András leicesteri mérései, ezért a többi kísérlettől eltérően azokat az Eredmények megvitatása c. fejezetben prezentálom részletes metodikai bemutatásuk nélkül.

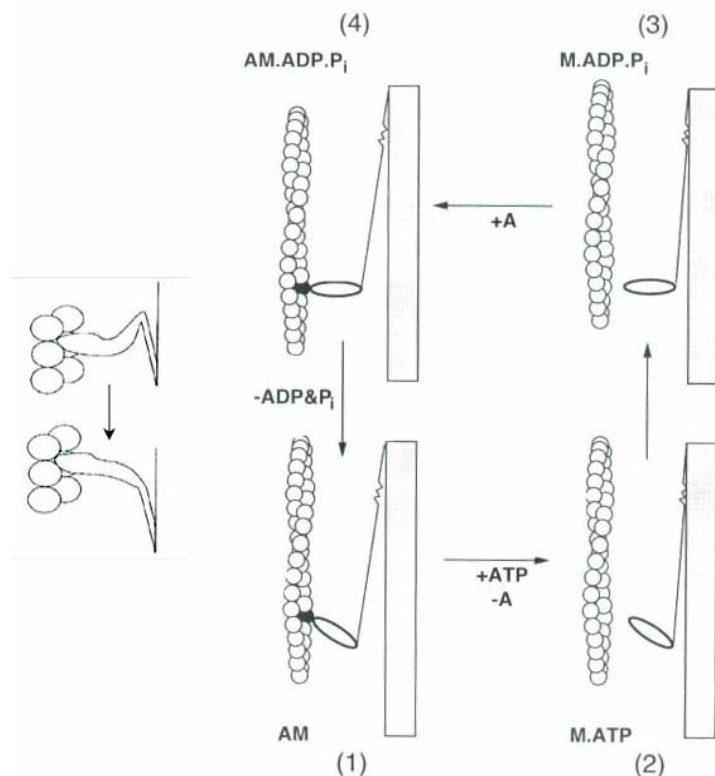
2 Irodalmi áttekintés

2.1 A miozinokról általában

A molekuláris motorok az enzimek azon családját alkotják, amelyek kémiai energiát alakítanak át mechanikai munkává. Az izomműködésen túl számos alapvető sejtfolymat kulcs-enzimeit, úgymint a sejtalk- és helyváltoztatással kapcsolatos mozgásjelenségek, a sejtorganelumok és általánosságban a sejten belüli átrendeződések és molekuláris transzportfolymatok. Népes családjukból legismertebbek az izmokat is felépítő miozinok, amelyek az aktin filamentum motorfehérjéi.

Az izomkontrakció molekuláris mechanizmusának áttörő elméletét Lymn és Taylor alkották meg 1972-ben (ábra), mely az addigi megfigyeléseket egy átfogó modellben ötvözte (1. ábra). Az elképzelés szerint a miozin kereszthíd része nukleotid távollétében képes erősen megkötni az aktint, megalkotva a „rigor akto-miozin komplexet”. Az ATP a kereszthídhöz kötve a miozin gyors leválását okozza az aktin filamentról, majd az ATP hidrolízise következtében a kereszthíd felhúzott konformációba kerül. A hidrolízis termékeit kötve a kereszthíd visszaköt az aktinra, majd egy kilendülő mozgást végezve (kilendülő kereszthíd modell) eltolja azt a miozin filamentumhoz képest (csúszó filamentum modell). Az aktin kötés hatására a hidrolízis termékek felszabadulnak, és ezzel az erősen aktin-kötött kiindulási rigor állapotba jutunk vissza.

ábra: A Lymn-Taylor modell. Kiindulási ütem a rigor akto-miozin komplex, amely nukleotid hiányában a miozin kereszthíd erős aktin-kötött állapota (1.). A kereszthíd ATP kötés közben leválik az aktinról (2.), majd az ATP hidrolízis hatására az aktinhoz viszonyított orientációja megváltozik, vagyis felhúzott állapotba kerül (3.). A kereszthíd visszaköt az aktinra (4.). Az aktin kötés hatására a kereszthíd egy kilendülő mozgással eredeti orientációjába tér vissza (kilendülő kereszthíd modell), és ezzel az aktin filamentumot eltolja a miozin filamentum mentén. Később azonosították a kereszthíd mozgásáért felelős erőkart, és így a mechanizmust kilendülő emelőkar modellre nevezték át (kis kép).



Később a spektroszkópos technikák fejlődésével azonosították a kereszthíd mozgásáért felelős részt, és így az elméletet kilendülő emelőkar modellté módosították (Rayment és mtsai, 1993).

A Lymn-Taylor modell érvényességét még ma sem veszítette el, habár az ATP-áz ciklusról alkotott kép a rengeteg kutatási eredménynek köszönhetően összehasonlíthatatlanul részletgazdagabb. Ennek ellenére az aktin és ATP antagonisztikus kötésének mechanizmusa a mai napig nem letisztázott teljes valójában.

2.2.1 A miozin szerkezete

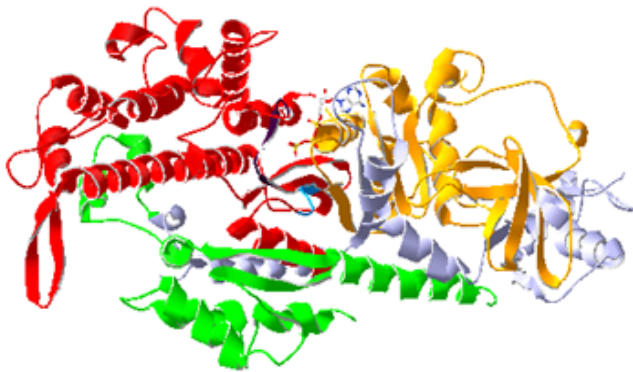
A miozinokról általánosan elmondható, hogy több alegységből felépülő fehérjék, melyek N-terminálisan helyezkedik el a feji régió, vagy más néven S1 (a miozin proteolitikus hasításával nyerhető 1. szubfragmentum), amely tartalmazza a katalitikusan aktív motor domént, és ahhoz C-terminálisan kapcsolódó regulációs domént. A motor domén konzervatív központi része egy héttagú β -lemez szerkezet, amely tagjait összekötő „hurkok” a miozin szupercsaládon belül változatos felépítést kölcsönöznek az egyes miozin formáknak. A motor domén aktivitásához köthető az aktin és az ATP ciklikus kötése, és annak konformációs átrendeződései eredményezik az ATP-ben tárolt kémiai energia átkonvertálását mechanikai munkává. A motor doménhez kapcsolódó α -helikális „nyak” a regulációs domén, amely az erőgenerálás során az emelőkar funkcióját látja el, illetve kötési felszínt szolgáltat a motor domén aktivitást szabályozó könnyűláncok számára. A nyaki régió C-terminális folytatása a miozin forma funkciójától függően igen változatos lehet. Az izomszövetet is felépítő konvencionális miozinok esetében általános az α -helikális „farok” rész, amely a miozin dimerizációja során coiled-coil szerkezetet képezve lehetővé teszi a miozin filamentum kialakulását. Más, nem konvencionális miozinok esetében előfordulhat globuláris farok domén, amely például a miozinhoz kapcsolódó „molekuláris szállítmányok” kötésére szolgálhat.

2.2.2 A motor domén szerkezete

A konvencionális miozin II S1 önmagában is rendelkezik ATP-áz aktivitással és motilitással. Működőképes heterológ expressziója prokariótákban a dajkafehérjék hiánya miatt akadályozott, erre nyújtott megoldást a *Dictyostelium* sejtes nyálkagomba expressziós rendszer (Manstein és mtsai, 1989). A *Dictyostelium* miozin II S1 ATP-áz mechanizmusa nagy fokú hasonlóságot mutat a miozin II osztály gerincesekben megtalálható tagjaihoz

(Ritchie és mtsai, 1993), így rekombináns fragmentumai könnyű előállíthatósága miatt kedvelt vizsgálati objektumai motor fehérjék kutatásának. Másik előnyös tulajdonsága, hogy a regulációs doménjétől megfosztott motor domén is a vad típushoz hasonló ATP-áz aktivitással rendelkezik (Kurzawa és mtsai, 1997). A „nyaka-vesztett” motor domén sokkal globulárisabb, így könnyebb kristályosítani (Geeves és Holmes, 1999). Ennek köszönhetően a *Dictyostelium* motor domén fragmentumokból egy sor kristályszerkezet áll rendelkezésünkre.

A motor domén funkcionálisan négy szubdoménre osztható (2. ábra). Ezek elnevezései a motor domén proteolitikus hasításának eredményeként kapott fragmentumok tömegeiből származnak (Bálint és mtsai, 1975). Ennek megfelelően megkülönböztetünk 25 KDa, felső és alsó 50kDa, és konverter szubdoméneket.

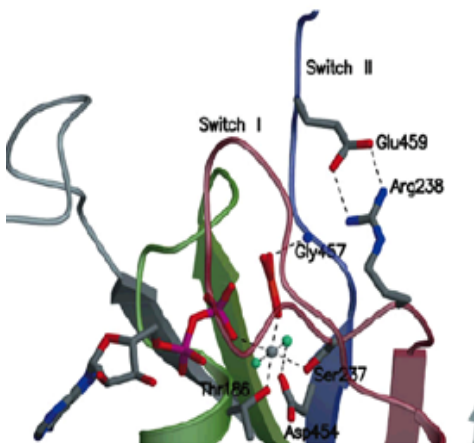
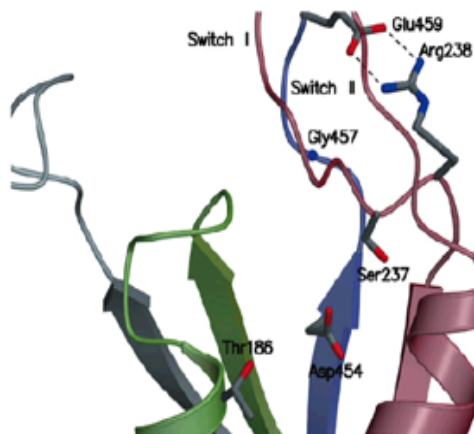


3. ábra: *Dictyostelium* miozin motor domén fragmens ATP-kötött kristályszerkezete. Négy funkcionális szubdoménre osztható: 25KDa (sárga), felső 50KDa (piros), alsó 50KDa és konverter (fehér) szubdomén. A felső és alsó 50KDa szubdomén fogja közre az aktin kötő árkot, míg az ellentétes oldalon a 25KDa és felső 50KDa szubdomének között a nukleotid kötő zseb helyezkedik el. A nukleotid-kötő zsebet alkotja a switch I (fekete) és a switch II (kék) elnevezésű „hurkok”.

A konverter az eltávolított erőkar alapjaként szolgál, míg a felső és alsó 50KDa szubdomén fogja közre az aktin kötő árkot. Ezzel ellentétes oldalon a 25KDa és felső 50KDa szubdomének között a nukleotid kötő zseb helyezkedik el. Nagy leegyszerűsítéssel azt lehet mondani, hogy az ATP-áz ciklus folyamán bekövetkező térszerkezet változások a szubdomének merev egységekként történő mozgásai, melyeket a motor domén core részében elhelyezkedő rövid kapcsok konformáció változásai indukálnak, vagy közvetítenek egyik szubdoménről a másikra. Ilyen kapcsok a felső és alsó 50KDa szubdomént összekötő switch II (454-459) a 25 és felső 50KDa szubdomént összekötő switch I (233-239), a konvertert és alsó 50KDa szubdomént összekötő relé, illetve 25KDa és konverter szubdomént összekötő SH1 hélix.

2.2.3 A *Dictyostelium* motor domén szerkezetek

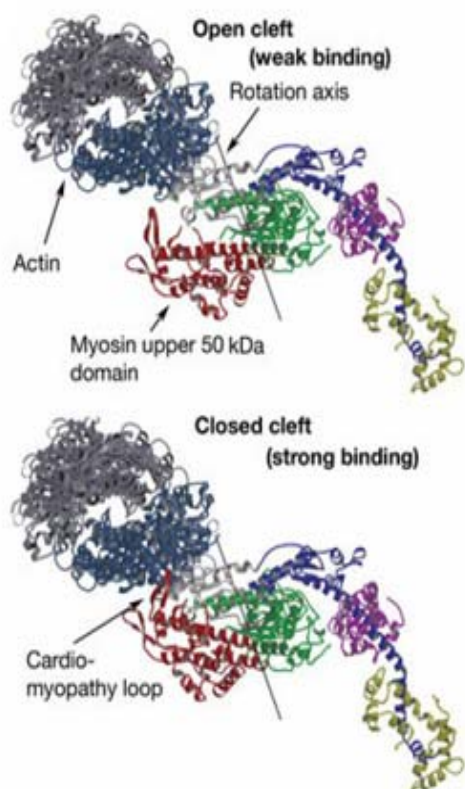
A motor domén fragmentumok kristályszerkezetei az ATP-áz ciklus során kialakuló egyes konformációs állapotokat reprezentálják, attól függően, hogy a nukleotid kötő zsebben lévő ATP, ADP, ADP.Pi vagy ezek szintetikus nukleotid analógjai melyik lépés során „fagyaszttják le” az enzim ciklust. Problémát jelent, hogy a motor domén aktin komplexe ma még nem kristályosítható, ezért a ciklus során aktin-kötött állapotok szerkezetében az aktin hatása nem



jelenik meg. A szerkezetek három csoportra oszthatóak. Az első, az apo állapotú motor domén, amely nem tartalmaz nukleotidot a nukleotid-kötő zsebben. Ezt a szerkezetet rigor szerű állapotnak is nevezik, mivel a rigor akto-miozin komplex szerkezetét imitálja, leszámítva az aktin térszerkezet módosító hatásait. Az apo szerkezet teljesen nyitott nukleotid-kötő zsebet tartalmaz, vagyis a nukleotid kötésében résztvevő switch I és switch II hurkok a nukleotid-kötő zsebtől eltávolodva, egymással sóhidat képezve (R239-E459) figyelhetőek meg. Jelentősége, hogy ez az első szerkezet, amelyik nyitott switch I konformációt mutat (3. ábra), és emellett az aktin kötő árok szélessége a nukleotid-kötött állapotokban megfigyeltnél szélesebb, ami felső 50KDa szubdomén rotációjának következménye. Ezzel egy ismeretlen kommunikációs mechanizmust tárt fel a nukleotid-kötő zseb és az aktin-kötő árok között (Reubold és mtsai, 2003).

3. ábra: *Dictyostelium* motor domén switch I és switch II különböző konformációs állapotai. Nukleotid-mentes állapotban a switch I és a switch II is nyitott konformációt vesz fel (felső kép). ADP és ATP analógok kötésekor a switch I zárt, de a switch II nyitott konformációban található (középső kép). Ezt az állapotot rigor utáni, vagy ATP kötött állapotnak nevezik. ADP.Pi analógok hatására a switch II is bezáródik (alsó kép). Ezt az állapotot átmeneti állapotnak nevezik. (Reubold és mtsai, 2003)

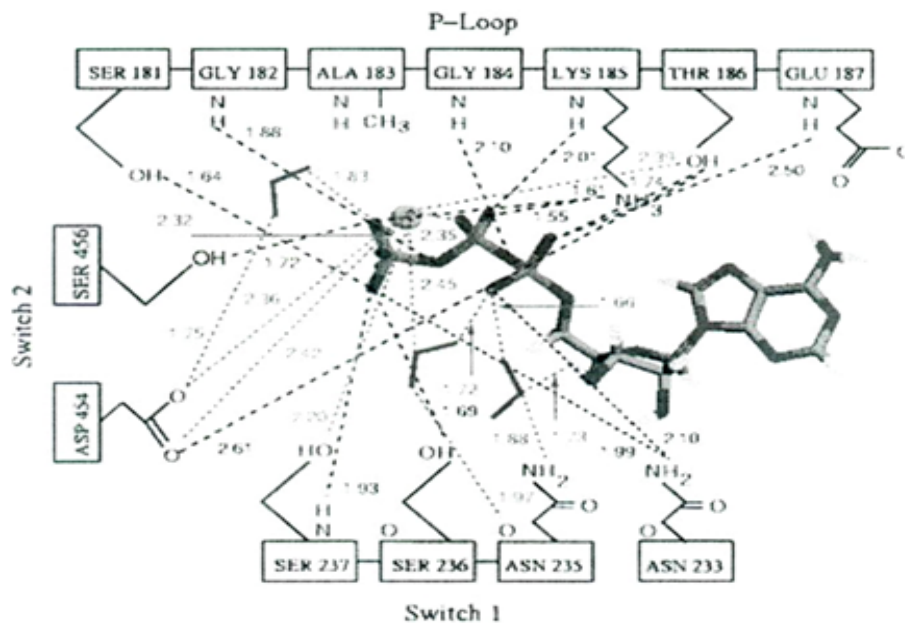
A szerkezetek fényében a switch I és az aktin-kötő árok konformációjának kapcsoltságára utal az a korábbi megfigyelés is, amely során a sóhid kialakulásának megakadályozása tízszeresen megnövelte az aktin disszociáció sebességét (Furch és mtsai, 1999). Az apo kristályszerkezet mellett elektronmikroszkópos technikával vizualizált rigor akto-miozin komplex is alátámasztja, hogy erős aktin-kötött állapotban a switch I régió a nukleotid zsebtől eltávolodva, nyitott konformációban és emellett az aktin-kötő árok zárva található (Holmes és mtsai, 2003) (4. ábra).



4. ábra: Az akto- S1 elektronmikroszkópos felvételének sematikus ábrája. Gyenge aktin-kötött állapotban az aktin-kötő árok nyitva (felső ábra), míg erős aktin-kötött állapotban zárva található (alsó ábra) (Holmes és mtsai, 2003).

A kristályszerkezetek második csoportjának közös tulajdonsága, hogy a switch I zárt konformációban, míg a switch II a nukleotid-kötő zsebtől távol, nyitott térszerkezeti állapotában található (3.b ábra). Ezekben a szerkezetekben ADP, AMP.PMP, ATP γ S, ATP vagy ADP.BeF_x van kötve a nukleotid zsebben (Gulick és mtsai, 1997, Bauer és mtsai, 2000, Fisher és mtsai, 1995). A switch I a nyitott állapothoz képest 8Å-t mozdul el a nukleotid irányába, ezzel a switch II –vel kapcsolt sóhid felszakad, és másodlagos kötések alakít ki a nukleotiddal illetve a Mg ionnal. A zárt konformációjú switch I kiterjedt kötéshálózatát az 5. ábra szemlélteti. Az N233 illetve a konzervatív, S237, R238 aminosavak megléte esszenciális az ATP-áz ciklus zavartalan működéséhez (Shimada és mtsai, 1997). Az N233 kötést alakít ki a nukleotid α -, β -, γ -foszfátjával és ribózával, az N235 a β -foszfátjával. A S236 köztiterméke a hidrolitikus víz és a γ -foszfát között lezajló protontranszfernek, illetve a távozó foszfáttal tart hidrogén-kötést. A S237 a γ -foszfáttal és a Mg ionnal alakít ki kötést, illetve az R238 a már említett sóhid kialakításában játszik szerepet (Fisher és mtsai, 1995). Ez az állapot az ATP-áz ciklusban elfoglalt helye szerint rigor utáni, vagy aktinról levált

állapotnak nevezik, és az ATP kötést követően alakul ki. Aktin kötő árka nyitott konformációban helyezkedik el.

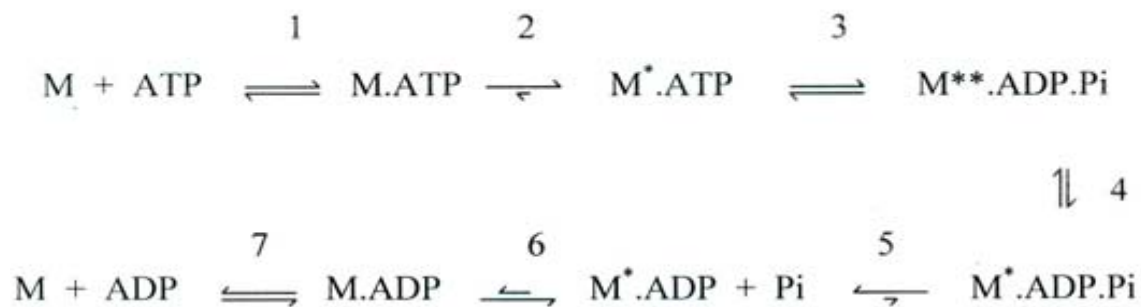


5. ábra: A *Dictyostelium* miozin II nukleotid-kötő zsebének sematikus ábrája. Mind a switch I, mind a switch II zárt konformációban kialakult hidrogén-híd kötés hálózatát szemlélteti az ábra (Fisher és mtsai, 1995).

A szerkezetek harmadik csoportja zárt konformációjú switch I-t és zárt switch II-t tartalmaz. Nyitott konformációban csak egy víz molekulán keresztül van kapcsolatban a switch II D454 a nukleotid γ -foszfáttal, más kötés nem alakul ki. Ezzel szemben a switch II záródásakor 4Å mozdul a nukleotid felé, és közvetlen hidrogén-kötés alakul ki G457 és a γ -foszfát között, illetve ismét sóhidat képez a E459 a switch I A238 aminosavval (Fisher és mtsai, 1995). Ez a zárt konformáció ADP.Pi szerkezeti analógjaival kristályosítható: ADP.V_i, ADP.AlF₄; illetve bizonyos kristályosítási körülmények között ADP.BeF_x kötött állapotban (Holmes és Geeves, 2000). A switch II zár konformáció kialakulása elengedhetetlen a hidrolízis lépés kialakulásához (Málnási-Csizmadia és mtsai, 2000), és ennek záródásával kapcsolt térszerkezeti változás, a relé-hélix és a konverter szubdomén közvetítésével, az emelőkar felhúzott állapotba kerülése is, ami az erőgenerálás során kilendülő erőkar mozgásának inverze. Ez alapján ezt a térszerkezeti elrendeződést felhúzott, vagy átmeneti állapotoknak nevezik. A switch II a felső és alsó 50KDa szubdoméneket összekötő kapocs, így záródása az aktin-kötő árok kis mértékű kinyílásával is kapcsolt (Reubold és mtsai, 2003).

2.3 Kinetikai áttekintés

Nem sokkal a Lymn-Taylor modell megalkotása után nyúl vázizom motor doménjének intrinzik fluoreszcencia változásai alapján részletes kinetikai modell dolgoztak ki az ATP-áz ciklus működéséről (Bagshaw és Trentham, 1974) (1. séma).



1. séma: Bagshaw-Trentham kinetikai modell az ATP-áz ciklusról nyúl vázizom triptofán fluoreszcencia változásai alapján.

Ennek alapján a miozin ATP kötése a fluoreszcencia változás gyors fázisához köthető ($M^* \cdot ATP$) kétlépéses folyamat, ahol a gyors ütközési lépést a szubsztrát által indukált, irreverzibilis térszerkezeti átrendeződés követ. Ezt követi a hidrolízis lépés, ami további fluoreszcencia emelkedéssel jár ($M^{**} \cdot ATP$). A sebesség meghatározó foszfát felszabadulás közben a 2. lépést követő fluoreszcencia intenzitás alakul ki, majd ezt követi az ADP felszabadulása, ami az ATP kötés kétlépéses mechanizmusával megegyező, csak ellentétes irányultságú. A nukleotid kötés a kötő zseb szájánál található W113 és W131 aminosavak fluoreszcencia változásához köthető, míg hidrolízissel járó második fluoreszcencia emelkedés a relé-hélixben elhelyezkedő, W510 aminosavhoz (*Dictyosteliumban* W501).

A nukleotid kötés és felszabadulás kétlépéses mechanizmusát azóta kiterjesztették más miozinokra is. Az ADP felszabadulás fontos szerepet tölt be az ATP-áz ciklus irányításában. Az egyes miozin formáknál az ADP és az aktin különböző mértékben módosítják egymás affinitását, viszont általánosan elmondható, hogy amennyire gyengíti az ADP a motor domén aktin affinitását, annyira gyengíti az aktin az ADP affinitást. Az ezt kifejező mennyiség a termodinamikai kapcsoltsági arány: $K_{AD}/K_D = K_{DA}/K_A$, ahol K_D , K_{AD} az ADP affinitása a miozinnak és az akto-miozinnak, K_A , K_{DA} az aktin affinitása a miozinnak és az ADP-miozin komplexnek. Ez az arány alacsony (1-10) azoknál a miozinoknál, amik egy második, ADP indukált erőkar kilendülést is mutatnak (Nyitrai és Geeves, 2004), a többinél

20-200 között figyelhető meg. Ezzel szemben az ATP okozta aktin affinitás csökkenés hozzávetőlegesen 1000X. Ennek köszönhető, hogy az ATP kötése után az aktin disszociál a miozinról, majd a hidrolízist követően ADP.Pi állapotban köt vissza. Az ADP.Pi kötött motor domén szintén alacsony aktin affinitással rendelkezik ($K_d \ll 1\mu\text{M}$), ezért először gyengén köt az aktin, ami vélhetően a foszfát felszabadulással párhuzamosan átalakul erős aktin kötött állapottá (Conibear és mtsai, 2004). A kezdeti gyenge kölcsönhatás során az aktinhoz csak az alsó 50KDa szubdomén köt, majd az aktin kötő árok záródásával, a felső 50KDa aktin kötése erősíti meg a kölcsönhatást (Holmes és mtsai, 2003). A kristályszerkezetek tanúsága szerint, ezzel a konformáció változással kapcsolt a switch I kinyílása. A switch I ezen térszerkezeti átalakulása kinetikailag nem karakterizált, hiszen a közelmúltig egyetlen konformációja volt ismert. Közvetett mérések utalnak a switch I funkciójára, melyek során a hurokban elhelyezett mutációk hatását vizsgálták az enzim kinetikai paramétereire (Kurzawa és mtsai, 1997, Shimada és mtsai, 1997).

Az ATP-áz ciklus sebesség meghatározó lépése a hidrolitikus foszfát felszabadulás, ami az erőgenerálást közvetlenül megelőző lépés (Conibear, 2004). Az aktin kötése a foszfát felszabadulási lépést energetikailag kedvezőbbé téve „aktiválja” az ATP-áz ciklust. Az aktin kötések mind a switch I, mind a switch II zárt konformációban található, de az a szerkezetük, amiről a foszfát felszabadul nem ismert. Hipotetikusán először a switch I nyílik ki (Conibear és mtsai, 2004, Reubold és mtsai, 2003), létrehozva a csatornát (back-door, trap-door), amin keresztül a foszfát felszabadul.

3 Célkitűzések

1. Későbbi vizsgálatra tervezett, egy-triptofános motor domén mutánsok előállítása *Dictyostelium* expressziós rendszerben.
2. A switch I régió, valószínűsíthetően ATP kötésekor kialakuló térszerkezet változásának vizualizálása, és kinetikai karakterizálása. Ennek érdekében a switch I régióba elhelyezett triptofán szenzorokat alkalmazunk gyorskinetikai vizsgálatokhoz.
3. A switch I régió konformáció változása és az aktin disszociáció között feltételezett kapcsolat oldatban való igazolása.
4. A switch I régió konformációs különbségeinek felderítése különböző nukleotid kötött állapotokban.

4 Anyagok és módszerek

4.1 DNS konstrukciók

Vizsgálati objektumaink a *Dictyostelium* miozin II motor doménjének két mutáns változata, melyek első 761 aminosavát kódoló szekvenciák pDXA-3H expressziós vektorban (lásd expressziós rendszer fejezetben) álltak rendelkezésünkre munkánk megkezdésekor. A vad típusú motor domén génjétől abban térnek el, hogy mind a négy eredeti triptofán kodon (36, 432, 501, 584) helyett fenilalanint kódoló tripletet tartalmaz, így további mutagenezissel egyetlen triptofánt tartalmazó motor domének előállítására alkalmasak (Málnási-Csizmadia és mtsai, 2000). Jelen esetben az egyik konstrukció a 239-es (pDXAW239+), a másik a 242-es (pDXAW242+) fenilalanin helyén tartalmaz triptofán kodont.

4.2 Rekombináns DNS technikák

4.2.1 *E. coli* transzformálás és transzformánsok növesztése

A pDXAW239+ és a pDXAW242+ konstrukciók amplifikálásának céljából DH5 α -T1 Z-kompetens sejt vonalat használtunk, amely dimetilszulfoxiddal és polietilén-glikollal való kezeléssel (Z-competent *E. coli* transformation buffer set, Zymo research, Cat# T3002) kompetenssé téve nem igényel hősokkolást.

- 50 μ l sejthez 0,2 -0,5 μ g miniprep DNS hozzáadása jégen.
- 60 perc inkubáció jégen.
- Szélesztés előmelegített (37°C) LB-agar lemezre (100 μ g/ml ampicillin).
- Növesztés 37°C-on egy éjszakán keresztül.
- A lemezről 1-1 telep átoltása 5ml folyadékkultúrába (100 μ g/ml ampicillin tartalmú LB médium).
- Növesztés 37°C-on rázatva (150-200rpm) egy éjszakán keresztül.

4.2.2 Plazmid DNS izolálása

Qiagen QIAprep miniprep kit (Cat# 27104) felhasználásával izoláltuk a transzformált *E. coli* sejtekből a pDXAW239+ és a pDXAW242+ DNS konstrukciókat a hozzá tartozó útmutató alapján.

- Sejtek összegyűjtése centrifugálással (1perc, 12000rpm), médium eltávolítása.
- Sejtek felszuszpendálása 250µl RNáz tartalmú P1 oldatban.
- Sejtek lizálása 250µl P2 (SDS, magas pH) oldat hozzáadásával, óvatos keverés után 5 perc inkubáció. Magas pH-n a fehérjék, és a DNS is kicsapódik. Optimális inkubációs idő és gyengéd összerázás mellett, a kromoszómális DNS még nem, de a plazmid DNS felszabadul a sejtekből.
- Nagy ionerejű 350µl N3 oldat hozzáadásával a kromoszómális DNS, fehérjék, más sejt törmelékek és az SDS kicsapódása mellett a plazmid DNS neutralizálódik.
- Csapadék elválasztása centrifugálással (10perc, 12000rpm).
- Felülúszó átvitele szilika-gél membrán oszlopra, amely az alkalmazott oldat magas ionerején köti a plazmid DNS-t.
- Oldat eltávolítása centrifugálással (1perc, 12000rpm).
- Oszlop átmosása 500µl PB oldat hozzáadásával, majd centrifugálással (1perc, 12000rpm), mely az endonukleázok eltávolítását szolgálja.
- Oszlop átmosása 750µl PE oldat hozzáadásával, majd centrifugálással (2x1perc, 12000rpm), sók eltávolítása végett.
- Izolált DNS lemosása az oszlopról 40-50µl EB oldat (alacsony ionerejű Tris puffer) hozzáadásával, majd 1 perc inkubációt követően centrifugálással (1perc, 12000rpm).
- Az izolált DNS ellenőrzése agaróz gélelektroforézissel (lásd elektroforetikus technikák).

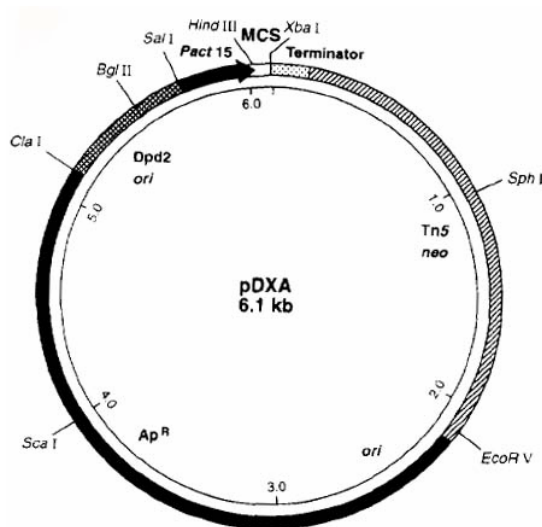
4.3 *Dictyostelium* expressziós rendszer

A *Dictyostelium discoideum* sejtes nyálkagomba expressziós rendszer hatékony és egyszerű módja mind heterológ, mind saját, katalitikusan aktív miozin motor domén fragmentumok előállítására. Előnye a prokarióta rendszerekkel szemben, hogy alkalmas olyan rekombináns fehérjék expressziójára, amelyek emlős-szerű poszttranszlációs módosításokat,

illetve (akárcsak a miozin „fej”) a natív térszerkezet kialakulásához eukarióta dajkafehérjéket igényelnek. A rendszer hátránya, hogy nem alkalmazható széleskörűen rekombináns fehérjék termelésére, aminek az egyik oka lehet, a gomba sejtekben nagy mennyiségben jelenlévő lizoszómális proteázok. A miozin fragmentumok plusz védelmét szolgálja (a proteázgátlókon túl) a sejtek lízisét követő proteolitikus degradáció ellen a posztmortális rigor aktomiozin komplex oldhatatlansága (Manstein és Hunt, 1995a).

4.3.1 pDXA-3H expressziós vektor

A miozin motor domén fragmentumot kódoló gént nagy kópia számú extrakromoszómális vektor segítségével, a pDXA-3H expressziós plazmid (Manstein és mtai, 1995b) (6. ábra) módosított változataival visszük be a sejtekbe. A klónozási lépések *E. coli* baktérium törzsekben végezhetőek el (shuttle vektor), mivel a plazmid tartalmaz a bakteriális replikációhoz szükséges replikációs origót (*colE1*) és a transzformánsok szelekciójához szükséges ampicillin rezisztencia gént.



6. kép: pDXA-3H expressziós plazmid sematikus felépítése. *colE1*= bakteriális replikációs origó, *Ap*= ampicillin rezisztencia gén, *Ddp2ori*= *Dictyostelium* replikációs origó, *Pact15*= konstitutív aktin promóter, *Tn5 neo*= *Tn5* transzpozon neomicin rezisztencia génje, *MCS*= multi cloning site.

A plazmid gomba sejtekben funkcionális részei a *Dictyostelium* replikációs origó, a rekombináns fehérjék expressziójához szükséges erős, konstitutív aktin promóter és terminátor, illetve a kettő között elhelyezkedő transzkripció start kodon, valamint a transzformáns sejtek szelekciójához szükséges *Tn5* transzpozon neomicin rezisztencia génje. A vektor klónozó része (multiple cloning site) olyan felépítésű, hogy a termeltetett fehérje C-

terminális részéhez a fehérje tisztításához használt 8 hisztidinből álló affinitás címke kapcsolódik (His-tag).

4.3.2 Sejtkultúra fenntartása

A széleskörűen alkalmazott AX3-ORF+ *Dictyostelium discoideum* sejtvonalat használtuk miozin motor domén fragmenseink termelésére. Ez olyan sejtvonalt, aminek a genomjába a Ddp2 nyitott leolvasási keret (Ddp2 ORF) több kópiában van jelen. Ez eredetileg a vad típusú *Dictyostelium* plazmidokon található szekvencia, fehérje terméke pedig a Ddp2 replikációs origóhoz kötődik, és elengedhetetlen az extrakromoszómális replikációhoz (Leiting és mtai, 1990).

- A sejtkultúra létrehozása -80°C-on, 20%-os glicerinben tárolt spórák leoltásával 75cm² felületű szövettenyésztő edényekbe (20ml HL-5 médium (Formedium), 12,4g/l glükóz, 100unit/ml Penicillin, 0,1mg/ml Streptomycin antibiotikumok (Sigma)).

-A folyadékkultúra növesztése 21°C-on.

-Konfluencia (az edény aljának teljes benövése) elérésekor, 3-4 naponta a letapadt sejtek egy részének átoltása friss tápoldatba úgy, hogy a sejtkoncentráció ne essen 10⁵ sejt/ml alá.

A transzformált sejtkultúra fenntartása is ezen a módon történik. A transzformánsokat 15mg/l G418 (geneticin) szintetikus neomicin-analóg alkalmazásával szelektáltuk.

4.3.3 *Dictyostelium* sejtek transzformálása elektroporálással

A pDXAW239+, illetve a pDXAW242+ konstrukciókat elektroporálással (Egelhoff és mtai, 1991) vittük be az AX3-ORF+ *Dictyostelium* sejtekbe.

- A konfluensen benőtt szövettenyésztő lemez aljára letapadt sejtek átoltása 100ml HL-5 médiumba (12,4g/l glükóz, 100unit/ml Penicillin, 0,1mg/ml Streptomycin) és rázatva (120rpm) növesztés 21°C-on 4x10⁶sejt/ml koncentrációig.

(Innentől minden lépés 0°C-on és továbbra is sterilen végzendő)

- Sejtek összegyűjtése centrifugálással (1000rpm, 5perc), média leöntése.
- Sejtek mosása kétszer hideg elektroporáló pufferben (17,2g/l glükóz, 1,37g/l NaH₂PO₄, 0,44g/l Na₂HPO₄·12H₂O, pH 6,1) való felszuszpendálással, majd centrifugálással (1000rpm, 5perc).
- A Csapadék felszuszpendálása elektroporáló pufferben úgy, hogy a sejtkoncentráció 5×10⁷ sejt/ml legyen.
- 0,2 cm szélességű elektroporáló küvetében 20μl (kb. 5μg) nagy tisztaságú plazmid DNS illetve 400μl sejtszuszpenzió összekeverése.
- 5-10 perc inkubálás jégen a sejtek lízisét elkerülendő teljes hűtöttség biztosításáért.
- Elektroporálás Gene Pulser II, Bio-Rad készülékkel (beállítások: 3μF, 0,87kV, 600Ω), 2 kisütés mintánként (kb.0,5 msec).
- 5-10 perc inkubálás jégen.
- A szövettenyésztő edényben 100μl kúráló pufferre (100mM CaCl₂, 100mM MgCl₂) 200μl elektroporátum cseppentése és szobahőmérsékleten inkubálása 15 percig.
- 20ml HL-5 médium hozzáadása (12,4g/l glükóz, 100unit/ml Penicillin, 0,1mg/ml Streptomycin).
- A sejteket 21°C-on növesztjük.
- 12-24 óra múlva 15mg/l G418 (Gibco-BRL) hozzáadása.
- Az elektroporálás után 5-8 nappal a transzformálódott sejtkolóniák a szövettenyésztő edény alján szemmel is láthatóvá válnak. A tápoldat lecserélésekor a nem transzformálódott és elhalt sejtek a tápoldat leöntésével és az edény aljának finom mosásával eltávolíthatóak.
- 3-4 napra rá, mikor a sejtek újból benövik az edény alját, a telepek összemosása, és új edénybe oltása.

4.4 Fehérje expresszió

4.4.1 Folyadék kultúra felnövesztése

- Konfluencia elérésekor a szövettenyésztő edény aljáról a sejteket 100ml tápoldatba (HL-5 médium, 12,4g/l glükóz, 100unit/ml Penicillin, 0,1mg/ml Streptomycin, 15mg/l geneticin egy 250ml Erlenmeyer lombikban) oltottuk át.
- Növesztés 4×10⁶ sejt/ml sejtkoncentrációig 21°C-on, rázatva.
- A felnőtt 100ml-es sejt kultúra 400ml tápoldatba (1l Erlenmeyer lombikban) oltása.

-Növesztés 21°C-on, rázatva, majd a 400ml sejt szétosztása 4x800ml tápoldatba (2l Erlenmeyer lombikokban).

-Növesztés 21°C-on, rázatva, 5×10^6 - 10^7 sejt/ml-ig.

4.4.2 Expresszió ellenőrzése

A konstitutív aktin promóternek köszönhetően a pDXAW239+ és a pDXAW242+ plazmidokról az átírás, és a fehérje termelése folyamatos, így a sejtek növesztésének bármelyik lépésekor felnőtt kultúrából néhány ml minta alkalmas az expressziós szint ellenőrzésére. A teljes sejtlyúzatumot denaturáló közegben Agaróz-Ni²⁺-NTA affinitás kromatográfiás oszlop töltet alkalmazásával (lásd fehérje tisztítása) tisztítottuk meg kellőképpen ahhoz, hogy a miozin fragmentumok expressziós szintje megállapítható legyen.

-1ml felnőtt sejt kultúra centrifugálása (7perc, 2000rpm)

-A sejtek lizálása 1ml Guanidin-hidroklorid oldatban (6M GuHCl, 20mM HEPES, pH7.5)

-Sejttörmelék összegyűjtése centrifugálással (15perc, 14000rpm).

-Felülúszóhoz 50µl Agaróz-Ni²⁺-NTA (Novagen) hozzáadása, majd 5perc inkubáció a kötés kialakulásához.

-Az Agaróz-Ni²⁺-NTA His-tag fehérje komplex összegyűjtése centrifugálással (1perc, 4000rpm), felülúszó leöntése.

- Az Agaróz-Ni²⁺-NTA His-tag fehérje komplex átmosása (6M urea, 20mM HEPES, 5mM metilamin pH7.5), majd centrifugálás (1perc, 4000rpm).

-A His-tag fehérje lemosása a hordozóról 150µl urea-imidazol oldattal (6M urea, 1M imidazol, 20mM HEPES pH7.5), majd centrifugálás (1perc, 4000rpm).

-A felülúszó megfuttatása SDS-gélelektroforézissel (elektroforetikus technikák). A mintát melegen érdemes felvinni a géltre, mert szobahőmérsékleten az SDS néha kicsapódik ureában.

4.5 Fehérje preparálás

- 5×10^6 - 10^7 sejt/ml sejt koncentrációig növesztett 4x800ml sejt kultúra centrifugálása (7perc, 2700rpm, 4°C), média leöntése.

-A Csapadék átmosása hideg PBS pufferben (100mM NaCl, 50mM NaPi, pH 7,0) való felszuszpendálással, majd centrifugálással (7perc, 2700rpm).

-Csapadék tömegének meghatározása.

-Csapadék felszuszpendálása, homogenizálása 4ml/g sejt lízis pufferben (50mM TrisHCl, pH8, 2mM EDTA, 0,2mM EGTA, 1-3mM DTT, 5mM benzamidin, 2000x proteáz inhibitor mix (15mg Pepstatin, 2mg Leupeptin, 66mg TPCK, 25mg TLCK, 66mg PMSF feloldva DMSO-ban (Sigma).

-Sejtek lízise 2ml/g sejt 1V/V% Triton-X100 (Sigma) detergenst tartalmazó Lízis Puffer hozzáadásával és szonikálással 10 perc 70% fokozat, folyamatos üzemmód (Sonifier 250, Branson).

-1 óra inkubáció jégen a sejtek maradéktalan degradációjáig.

-Ultracentrifugálás 4°C-on (60perc, 55000 rpm, 55.1Ti Beckman rotor), felülúszó leöntése.

-Csapadék mosása 60-100ml Extrakciós Pufferben (50mM HEPES (név,Sigma), pH7.3, 30mM KAc (káliumacetát), 10mM MgAc (magnéziumacetát), 3mM β -merkaptoetanol, 5mM benzamidin, 40 μ g/ml PMSF) való felszuszpendálással, homogenizálással a Triton, EDTA, EGTA eltávolítására, és az ionerő beállítására.

-Ultracentrifugálás 4°C-on (45perc, 45000 rpm, 55.1Ti Beckman rotor), felülúszó leöntése.

-Csapadék felszuszpendálása, homogenizálása 1,6ml/g sejt ATP tartalmú Extrakciós Pufferben (+20mM ATP, 10mM MgCl, pH 7,3). Az ATP hatására a miozin motor domén fragmensek disszociálnak az aktin filamentumokról, így a következő fugálás után a felülúszóban lesznek (Manstein és Hunt, 1995a).

-Ultracentrifugálás 4°C-on (60perc, 55000 rpm, 55.1Ti Beckman rotor), felülúszó elválasztása.

4.6 Fehérje tisztítása

A pDXA-3H vektor felépítése olyan, hogy a rekombináns fehérje C terminálisához egy nyolctagú hisztidin címke kapcsolódik. Mivel a természetben nem fordul elő ilyen szekvencia, a fehérje szelektíven elválasztható His-tag affinitás kromatográfiás eljárással agaróz-Ni²⁺-NTA oszlopon (Novagen). Az agaróz gyantára kötött NTA komplexbe viszi a Ni²⁺ iont, amely a hisztidin ϵ -N-atomjának nem kötő elektron párjával további komplex kötést hoz létre.

A fehérje tisztítását ATKA FPLC készülékkel, 4°C-on, 15ml oszloptérfogattal végeztük. Az áramlás sebessége 2ml/perc.

-A Ni²⁺-NTA oszlop mosása 40ml alacsony sókoncentrációjú pufferrel (50mM HEPES, pH7.3, 30mM Kac, 3mM benzamidin, 3mM β-merkaptóetanol).

-A preparálásból származó felülúszó oszlopra vitele.

-Mosás 40ml alacsony sókoncentrációjú pufferrel a nem specifikusan kötődött fehérjék eltávolítására.

-Mosás 40ml magas sókoncentrációjú pufferrel (50mM HEPES, pH7.3, 300mM Kac, 3mM benzamidin, 3mM β-merkaptóetanol), az ionos kötéssel odatapadt fehérjék lemosására.

-Mosás 20ml alacsony sókoncentrációjú pufferrel az ionerő visszaállításáért.

-Mosás 10V/V% imidazol tartalmú puffer (0,5M imidazol, 3mM azid, pH7.3) és 90V/V% alacsony sókoncentrációjú puffer elegyével, amely az erősebben odakötött histidin tartalmú fehérjék eltávolítására szolgál. Ezt a lépést 3ml/perc áramlási sebességgel végeztük. A mosást addig kell folytatni, amíg az oszlopról lejövő fehérje mennyiségének Bredford reagenssel (1csepp, kb. 10μl eluátum 1ml reagensbe) való folyamatos monitorozása azt mutatja, hogy több fehérje nem jön le az oszlopról.

-A rekombináns fehérje lemosása az oszlopról 90% imidazol tartalmú puffer (0,5M imidazol, 3mM azid, pH7.3, 3mM benzamidin, 3mM β-merkaptóetanol) és 10V/V% alacsony sókoncentrációjú puffer elegyével, 1ml/perc áramlási sebességgel történik.

-Az imidazol eltávolítását a fehérjét tartalmazó oldatából dialízissel végeztük 2l mérési pufferben (assay puffer: 40mM NaCl, 1mM MgCl₂, 20mM HEPES, 3mM benzamidin, 3mM β-merkaptóetanol, pH7.3, high retention dial tube, Sigma).

A rekombináns miozin fragmenseink meglétét, illetve tisztaságát poliakrilamid gélelektroforézis alkalmazásával ellenőriztük (lásd elektroforetikus technikák).

A miozin fragmensek mennyiségét Bredford módszerrel határoztuk meg ismert koncentrációjú BSA sorozathoz viszonyítva. A fehérje koncentrációjával (0-20μg/ml fehérje koncentráció tartományban) egyenes arányban változó abszorbanciát 595nm-en mértük.

4.7 Elektroforetikus technikák

4.7.1 Agaróz gélelektroforézis

A DNS konstrukciók minőségi ellenőrzése agaróz gélelektroforézis technikával történt. Futtatás: 100-120V.

- 1%-os gél: 1g agaróz (Sigma) 100ml TAE pufferben oldva. A gél öntésekor 0,6µg/ml Etidium-bromid hozzáadása. (funkció)
- TAE futtató puffer: 40mM Trisz-HCl, 0,114% ecetsav, 1mM EDTA, pH8.0 desztillált vízben oldva.
- 6x DNS kezelő: 0,25% brómfenolkék, 15% ficoll, 30% glicerin TE pufferben oldva (mM Trisz-HCl, mM EDTA).
- DNS molekulásúly marker: Sigma Wide Range DNA Marker (Cat# D7058)

4.7.2 SDS poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE)

A mintákat SDS kezelő hozzáadása után 5 percig forraltuk felvitelüket megelőzően. A futtatás paraméterei: 200V, 30mA.

- 5% koncentráció gél: 422µl 30% akrilamid (29% akrilamid, 1%bisz-akrilamid), 312 µl 1M Trisz-HCl pH6.8, 25µl 10% SDS, 25 µl 10% APS, 10 µl TEMED, 1,75 ml desztillált víz.
- 9% futtató gél: 1,5ml 30% akrilamid (29% akrilamid, 1%bisz-akrilamid), 1,85ml 1M Trisz-HCl pH8.8, , 50µl 10% SDS, 50 µl 10% APS(), 10 µl TEMED, ml desztillált víz.
- Tankpuffer: 14,2g/l glicin, 3g/l Trisz-HCl, 1g/l SDS desztillált vízben oldva.
- SDS kezelő: 15,2g/l Trisz-HCl, pH6.8, 20% glicerin, 20g/l SDS, 2% β-merkaptotanol, 10mg/l brómfenolkék desztillált vízben oldva.
- Molekula súly marker: ?
- Festék: 2,5g/l Coomassie R250, 50% etanol, 9% ecetsav desztillált vízben oldva.
- Festéktelenítő oldat: 50% etanol, 9% ecetsav desztillált vízben oldva.

4.8 Triptofán fluoreszcencia

A triptofán aminosav gyakran használt fluorofór fehérjék térszerkezet változásainak nyomon követésére. Erre alkalmassá teszi azon tulajdonsága, hogy elektrosztatikus hatásokra (oldószer, környezetében lévő, töltéssel rendelkező aminosavak) delokalizált elektronrendszere torzulásokon esik át, melyek az emitált fény intenzitását befolyásolják. Így a triptofán környezetében történő polaritás változások, amit leggyakrabban a fehérje konformáció változásai okoznak, könnyen nyomon követhető. Bár gyenge fluorofór, de

határozott előnye, hogy kicsi perturbációt jelent a fehérje térszerkezetében. Általában a fehérjék kevés triptofánt tartalmaznak, így irányított mutagenezissel könnyen megszabadulhatunk a nagy fluoreszcens háttérrel jelentő passzív fluorofóroktól. 296nm fölött szelektíven gerjeszthető más aromás aminosavaktól.

4.9 Egy triptofános motor domén steady-state fluoreszcencia mérése

A motor domén mutánsokkal végzett összes spektroszkópai kísérletet mérési pufferben (assay buffer) végeztük el. Összetétele: 40mM NaCl, 1mM MgCl₂, 20mM HEPES, 3mM benzamidin, 3mM β-merkaptotanol, pH7.3 desztillált vízben oldva. A kísérlet leírásánál továbbiakban ezt nem tüntetjük fel kivéve, ha annak összetétele eltér az itt leírtaktól.

A méréseket SPEX320 Fluoromax típusú spektrofluoriméteren kiviteleztük. A fényforrás xenon lámpa, a triptofánokat 296nm-es fényrel gerjesztettük 0,5mm átmérőjű rést használva a legnagyobb jelváltozás érdekében. Ezen a hullámhosszon (pontosabban < 295nm) kikerülhető a tirozinok gerjesztése szűk rés alkalmazásával, ami a fluorofórok kioltását (photobleaching) is minimalizálja (Wakelin és mtsai, 2002). Ezen beállítási paraméterek mellett az alkalmazott nukleotidoknak nincsen jelentős optikai hatásuk (inner filter effect) (Kovács és mtsai, 2002), és triptofán mentes motor domén alkalmazásával bizonyítható, hogy csak a triptofán fluoreszcenciáját érzékeljük (Málnási-Csizmadia és mtsai, 2004). Az emissziós oldalon a rés szintén 0,5mm-es

4.9.1 Emissziós spektrumok felvétele

A motor domének emissziós spektrumát 300nm-től 420nm-ig vettük fel. A fehérje minták koncentrációja 3μM 140μl térfogatú mérési pufferben. A szubsztrátként alkalmazott nukleotidokat (ATP, ADP (Roche)) nagy feleslegben (1mM) adtuk a motor doménekhez.

4.9.2 ATP-áz aktivitás mérése

A mérés során a triptofán fluoreszcencia egyetlen hullámhosszon detektált (345nm) intenzitását mérjük az idő függvényében. Az enzimhez (3 μ M) ismert fölöslegben adtuk az ATP-t (15 μ M) pár másodpercel a detektálás elindítása után. Az enzim aktivitás ezzel a módszerrel csak akkor mérhető, ha a reakció steady-state szakaszában a legnagyobb mennyiségben előforduló köztitermék (intermedier) és a reakció lecsengésekor jelenlevő termék elkülöníthető a detektált jel alapján. Ebben az esetben ez azt jelenti, hogy a motor domén ATP, illetve ADP kötött állapota között a triptofán által emitált fény intenzitásában különbség van.

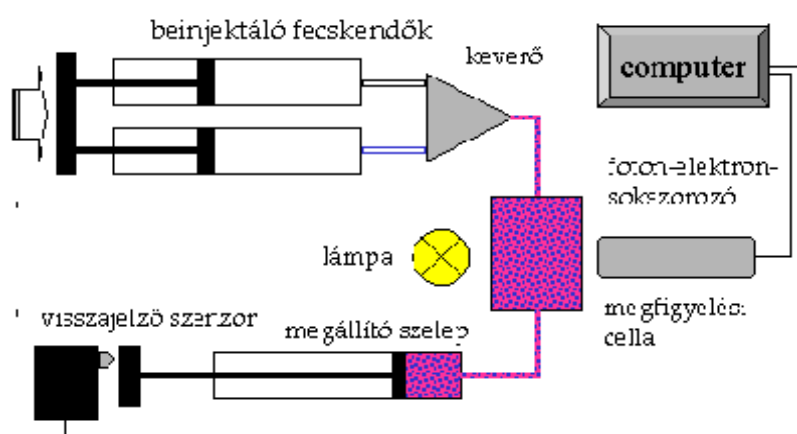
A másik lehetőség, hogy a fehérje oldaton szóródó gerjesztő fényt detektáljuk (340nm). A motor doménhez (3 μ M) kis mennyiségben adunk aktint (0,1 μ M), és az ismert fölöslegben adott ATP elfogyásakor a kialakuló akto-miozin komplexen szóródó fény intenzitása jóval nagyobb, mint disszociált állapotban. Az aktin jelenléte ellenére bazális ATP-áz aktivitást mérünk, mert az aktin nagyon kis mennyiségben van jelen.

4.9.3 Fluoreszcencia hőmérséklet függése

Fluoreszcencia intenzitást mértünk az idő függvényében úgy, hogy közben a kűvetta hőmérsékletét 6°C-ról legfeljebb 26°C fűtöttük. Közben a oldat hőmérsékletét monitorozva, diszkrét hőmérsékletekhez fluoreszcencia intenzitásokat rendeltünk. Kontrollként 5 μ M NATA fluoreszcencia hőmérséklet függését mértük.

4.10 Gyorskinetika - megállított áramlás módszer (stopped-flow technigue)

Gyorskeveréses technikák alkalmazásával az enzimreakció követése a szubsztrát hozzáadását követő egyetlen enzimciklus időtartományban is elvégezhető. Ez lehetővé teszi, hogy az enzim által katalizált folyamat során kialakuló kémiai és konformációs köztitermékeket elkülönítsük, és így a teljes reakciót egyszerű sebességi egyenletekkel leírható, elemi lépések sorozatára bontsuk.



7.ábra: Megállított áramlásos berendezés sematikus ábrája. A reaktánsokat szervomotor injektálja a keverőbe, ahonnan csővezetéken a megfigyelési cellába jut. Az optikai jel detektálása itt történik. A reaktánsok áramát a megállító szelep állítja meg. Ekkor kezdődik el a reakció detektálása.

A megállított áramlásos technikával a reakció nyomon követése úgy történik, hogy a rendszer egy optikai tulajdonságának időbeli változását mérik. A kiindulási anyagok nagy sebességű árama csővezetéken keresztül a keverőkamrában egyesül, majd a megfigyelési cellába jut, ahol a reakció lefolyása az áramlás megállítását követően monitorozható (7. ábra). A keverést követően a reakcióelegy kb. 1ms alatt jut el a megfigyelési cellába, ami a rendszer holtidejét adja. Ebből következik, hogy a jel ettől az időpillanattól kezdve akár perces időtartományig követhető.

A számítógép grafikusán megjeleníti a jel változását az idő függvényében, és a kísérleti adatokra közvetlenül a megfelelő függvény illeszthető. Pseudoelsőrendű körülményeket teremtve (a monitorozott reaktánshoz képest a többi nagy feleslegben alkalmazva, azok koncentrációja a reakció során állandónak tekinthető) az elsőrendű integrált sebességi egyenletből származtatott egyszeres-(1), vagy többlépéses folyamat esetén, dupla-exponenciális (2) függvény illeszthető:

$$Y = Ae^{-kt} + C \quad (1)$$

$$Y = A_1 e^{-k_1 t} + A_2 e^{-k_2 t} + C \quad *$$

* $k = k_1$ az első-, illetve k_2 a második tagban

Ahol „A” a változás amplitudója, „k” a sebességi állandója, „C” pedig a végpont.

A megállított áramlásos méréseket KinTec SF-2003 Stopped-Flow (KinTek corporation) készüléken végeztük. A fényforrás egy 150W-os Hg-Xe lámpa (Superguiet),

amivel 5nm-es résen keresztül 297 nm-en gerjesztettük mintáinkat. Az emissziós oldalon a detektálás 2 elektronsokszorozóval, T-geometriájú elrendezésben történt. Ha triptofán fluoreszcenciát detektáltunk, akkor az emitált fény útjába egy UG11 és egy WG345 cut-off optikai szűrőt helyeztünk az egyik detektálási csatornán, míg a másikon egy 340 interferencia filtert. Ezek fényáteresztő spektruma a 8. ábrán látható. Ezzel a detektálási eljárással specifikusan elkülöníthető a triptofán fluoreszcencia.

Ha aktin jelenlétében vizsgáltuk a motor domén működését, akkor a fluoreszcencia mellett a másik detektoron fényszórás változását is nyomon követtük. A széles rés alkalmazásával a gerjesztő fény nem teljesen monokromatikus, így a mintára kisebb mennyiségben jut 297nm-nél nagyobb hullámhosszú direkt fény is. Ez a fehérje oldat elektronjaival rugalmatlanul ütközve 90°-os szögben detektálható szórt fényként az UG11 szűrőt alkalmazva. Ekkor a fluoreszcenciához 340 interferenciaszűrőt használtuk.

Az ADP motor domén komplex disszociáció sebességét egy fluoreszcens szubsztrát analóggal, a mant-ATP-vel vizsgáltuk. A mant-ATP az ADP-nél nagyobb affinitással (10X) kötődik a miozinhoz, így utóbbit leszorítja arról. Mivel a fluoreszcencia változással járó mant-ATP kötés gyorsabb az ADP felszabadulásnál, ezért a fluoreszcencia változás sebességét az ADP disszociációja fogja meghatározni. Kétféleképpen gerjesztettük a mant-ATP-t. Az egyik mód, hogy 280nm-es fényel a tirozinokat és triptofánokat gerjesztve, azok energia transzferrel hozzák gerjesztett állapotba a kötött mant-ATP-t. Ekképpen a nem kötött mant-ATP gerjesztése elkerülhető, viszont a miozin egyéb térszerkezet változásai is megjelenhetnek a fluoreszcencia tranzienseiben. A másik módszer, hogy közvetlenül a mant-ATP-t gerjesztjük. Ilyenkor a nem kötött fluoreszcens szubsztrát nagy háttérrel ad, ezért csak limitált koncentrációban alkalmazható. Mind a két esetben a detektálás 450nm-en végezhető, így az emissziós csatornában 395nm-es long-pass filtert használtuk.

Kísérleteink során minden esetben a reaktánsokat mérési pufferben vettük fel. Aktin hiányában 3 μ M motor domén koncentrációt alkalmaztunk, ami a keveredés során 1,5 μ M-ra hígult. Ha aktin jelenlétében történt a mérés, akkor a 1,5 μ M motor domén és 2 μ M aktin koncentrációval (keveredés előtti) dolgoztunk. A mérés leírásakor a szubsztrát koncentrációk mindig a reaktánsok keveredése utáni értéket jelentik. Optimális jelváltozást úgy kaptunk, ha a reaktánsokból 80-80 μ l-t a 20 μ l megfigyelési cellába 14ml/s sebességgel lőttük be. A méréseket állandó hőmérsékleten, 20-, 12- illetve 4°C-on végeztük. Ha a motor domént aktin nélkül lőttük össze valamilyen szubsztráttal, akkor a zaj kiátlagolásához elegendő volt 5-10 ismétlés. Aktin jelenlétében, a szórt fény és a fluoreszcens háttér megnövekedése következtében 10-20 ismétlés szükséges volt. Általában logaritmikus beosztású időskálán

vettük fel az adatpontokat a milliszekundumos események kihangsúlyozásának érdekében. Ha az adatpontok rögzítése lineáris beosztású időskálán történt, akkor azt a mérési eredmények prezentálásakor feltüntetjük.

4.11 Adatok kiértékelése

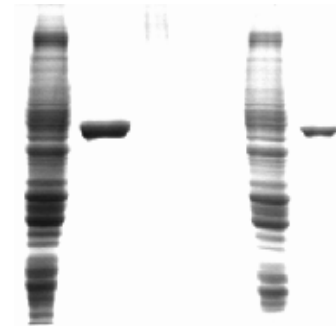
A megállított áramlásos méréseknél az adatok rögzítése és kiértékelése a készülékhez tartozó KinTecSim programmal, Microcal Origin 5.0 és Microsoft Exel programokkal történt.

5 Eredmények

5.1 W239+ és W242+ preparátumok előállítása

Vizsgálatainkhoz szükséges W239+, illetve W242+, egy triptofánt tartalmazó *Dictyostelium* miozin II motor domén fragmenseinket sikeresen expresszáltuk a 4. fejezetben leírt módszer alkalmazásával. A hatékony tisztítási eljárásnak köszönhetően 1 liter sejt kultúrából 3-4mg nagy tisztaságú motor domén preparátumokat készítettünk (9. ábra).

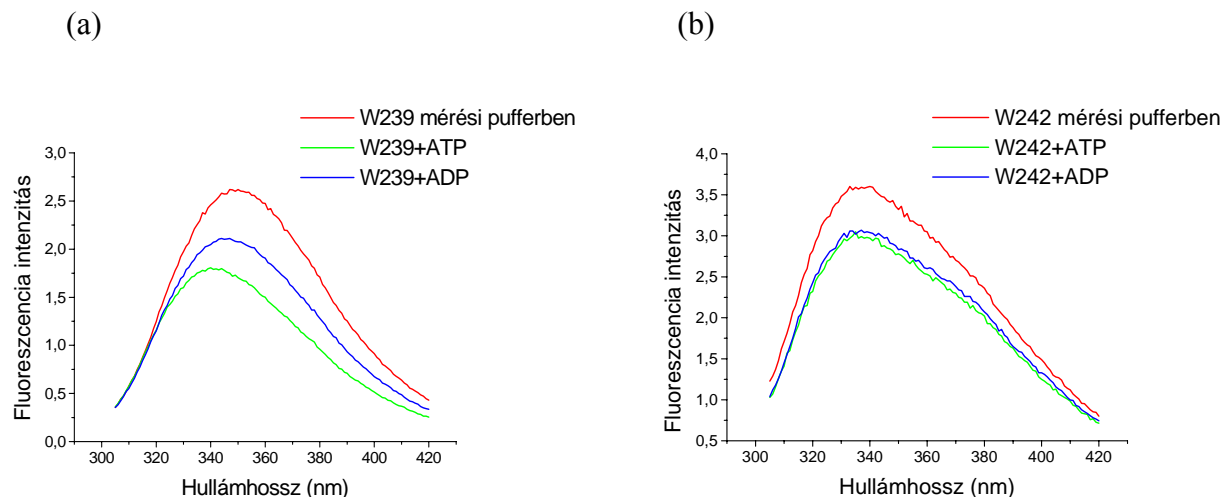
9. ábra: a W239+ (jobb) és a W242+ (bal) motor domént kifejező *Dictyostelium* teljes sejtizátuma, illetve a tisztítás után nyert motor domén preparátumok. Sajnos a molekulatömeg marker lemaradt.



5.2 Triptofán szenzorok tesztelése

Ahhoz, hogy az ATP-áz ciklus során a motor domén különböző kémiai és konformációs átmenetei érzékelhetőek legyenek, olyan triptofán szenzorokra van szükség, amelyek nukleotid szubsztrátok hatására nagy jelváltozást mutatnak.

A 239-es és a 242-es triptofán alkalmasságának kiderítésére steady-state fluoreszcencia méréseket végeztünk. Emissziós spektrumukat 20°C-on mérési pufferben, ATP, majd ADP jelenlétében vettük fel (10. ábra).



10. ábra: (a) W239+ és (b) W242+ motor domén fluoreszcencia emissziós spektruma 20°C-on. Az egyetlen triptofánt tartalmazó motor domén mutánsok (3 μ M) 296nm-en gerjesztettek mérési pufferben apo állapotban (nukleotid nélkül), illetve ADP (1mM) és ATP (1mM) kötött állapotban.

A W239+ motor domén 296nm hullámhosszú gerjesztő fény hatására 350nm-nél jelentkező emissziós maximummal jellegzetes triptofán emissziós spektrumot mutat. Látható, hogy ezen a gerjesztési hullámhosszon triptofán szenzorunk a tirozinoktól szelektíven gerjeszthető, hiszen utóbbiak emissziós maximuma 315nm körül jelenne meg. ATP hozzáadására a nukleotid-mentes állapothoz képest jelentős fluoreszcencia intenzitás csökkenést (a teljes fluoreszcencia intenzitáshoz viszonyítva 30%) és a maximális intenzitáshoz tartozó hullámhossz 9nm kékeltolódást mutat. ADP hatására szintén jelentős csökkenés (20%) és 6nm kékeltolódás figyelhető meg. Nem hidrolizáló ATP analógokkal (AMP.PMP, ATP γ S) felvett emissziós spektrumok az ATP kötött állapotéval megegyezőt mutattak.

A W242+ emissziós spektruma szintén megfeleltethető a triptofán fluoreszcens spektrumának. Az emisszió maximális intenzitását 338nm körül éri el. Ennél a hullámhossznál ATP és ADP hatására a fluoreszcencia intenzitás ugyanakkora, hozzávetőlegesen 20% csökkenést mutat a teljes fluoreszcenciához viszonyítva a maximális értékhez tartozó hullámhossz jelentősebb eltolódása nélkül.

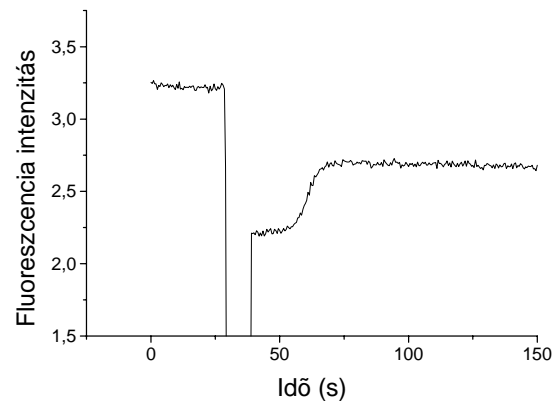
5.3 Enzim aktivitás ellenőrzése

Szintén steady-state fluoreszcencia mérésekkel ellenőriztük, hogy a bevitt mutációk milyen mértékben módosítják a vad típuséhoz képest a W239+ és a W242+ motor domén mutánsok bazális, azaz aktin aktíválltság nélküli ATP-áz aktivitását. Mivel feltételezésünk szerint a switch I régió kiemelkedő fontosságú a nukleotid kötőzseb és az aktin kötő felszín közötti kommunikációs útvonalon és így az ATP-áz ciklus és a periodikus aktin kötés összehangolásában, ezért fontos, hogy triptofán szenzoraink ne okozzanak jelentős perturbációt e régió működésében.

A W239+ esetében a bazális ATP-áz aktivitást úgy mértük, hogy a motor domént (ábra) összekevertük ismert feleslegben alkalmazott ATP-vel (multiple-turnover), és a triptofán fluoreszcenciát követtük nyomon. Az ATP hozzáadást követően (40s) a bazális ATP-áz reakció steady-state szakasza elkülöníthető az ADP kötött végállapottól a fluoreszcencia intenzitás különbségnek köszönhetően, és az így meghatározható enzim aktivitás $0,17s^{-1}$. A vad típusú motor domén bazális ATP-áz aktivitása $0,07\pm 0,01s^{-1}$, viszont a triptofán mentes motor domén konstrukciónak a vad típus háromszorosa ($0,21\pm 0,05s^{-1}$), ami a

konzervatív 501-es triptofán hiányával hozható összefüggésbe (Málnási-Csizmadia és mtsai, 2000).

X.ábra: W239+ motor domén (3 μ M) bazális (aktin nélküli) ATP-áz aktivitás vizsgálata triptofán fluoreszcencia alapján, feleslegben alkalmazott ATP (15 μ M) hozzáadásával (40s). Az ATP elfogyását a fluoreszcencia csökkenés lecsengése jelzi



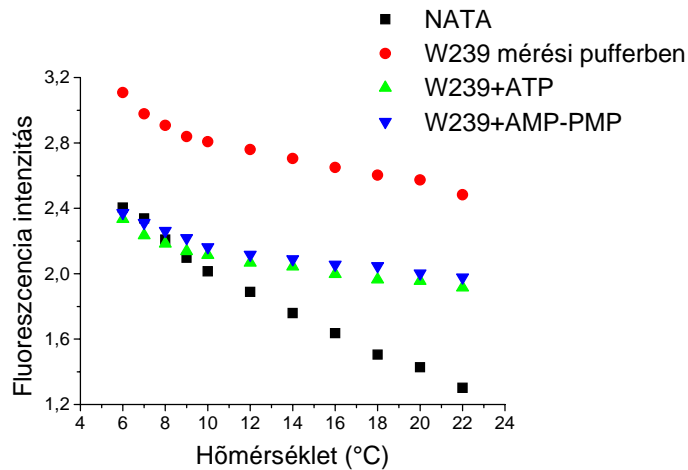
Utóbbihoz viszonyítva megállapítható, hogy a 239 triptofán mutáció nem okoz jelentős változást az enzim bazális aktivitásában.

A W242+ esetében ADP és ADP.Pi kötött állapotban megegyezik a fluoreszcencia intenzitás, ezért ebben az esetben az akto-miozin komplexen szóródó gerjesztő fényt detektáljuk. Ezek alapján a W242+ bazális ATP-áz aktivitása $0,2s^{-1}$.

5.4 Hány állapotot érzékelünk?

A 239-es triptofán 20°C-on fölvelt fluoreszcencia spektruma alapján az alkalmazott nukleotidokkal három állapot különíthető el. Kérdéses, hogy ezek a steady-state fluoreszcencia intenzitások egy-egy domináns állapot meglétéből adódnak, vagy egyensúlyban lévő állapotok keverékének átlag fluoreszcenciájához rendelhetőek.

A triptofán által emittált fluoreszcens fény intenzitása érzékeny a hőmérséklet változására. A fluoreszcenciának eme hőmérsékletfüggése egy triptofán származékkal, az N-acetil-L-triptofánammal (NATA) jól jellemezhető. A 11. ábrán látható, hogy a hőmérséklet növekedésével a NATA fluoreszcenciája ebben a hőmérséklettartományban egyenletesen csökken. Ha a fehérjénk egyetlen triptofánjához hozzárendelhető emisszió hőmérsékletfüggése jelentősen eltér ettől az összefüggéstől, akkor az a fehérje több konformációs állapotának jelenlétére utal, melyek megkülönböztethetőek az emittált jel alapján. Ekkor a fluoreszcencia hőmérsékletfüggése tükrözi a konformációs állapotok egyensúlyának hőmérsékletfüggését is a fluoreszcencia saját hőmérsékletfüggése mellett (Málnási-Csizmadia és mtsai, 2001).



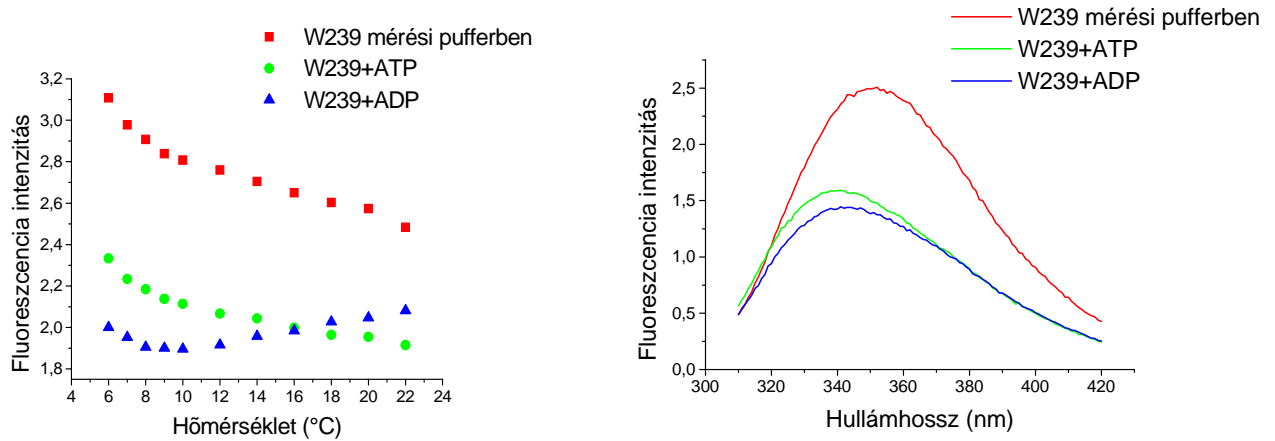
11. ábra: W239+ fluoreszcenciájának hőmérsékletfüggése. Apo, ATP ésAMP.PMP kötött állapotban a hőmérsékletfüggés közel párhuzamos lefutásokat eredményez. Ez arra utalhat, hogy a hőmérséklet változtatásával nem perturbálunk különböző fluoreszcenciájú állapotok között fennálló egyensúlyt.

Az ábrán látható, hogy az apo állapotú W239+ motor domén fluoreszcencia intenzitás változása közel párhuzamos a NATA esetében tapasztalt változással, valamint hogy kisebb deviációkat leszámítva a fluoreszcencia csökkenése egyenletesen csökken a hőmérséklet növekedésével. Természetesen ekkora eltérés az ideális hőmérsékletfüggéstől nem meglepő, hiszen egy enzim komplex rendszer, és így a hőmérséklet változtatásával a fehérje más tulajdonságait is befolyásoljuk. Ebből levonható olyan következtetés is, hogy apo állapotban a 239-es triptofán által érzékelt egyetlen domináns állapot létezik, mivel a hőmérséklet változtatásával nem tapasztalunk olyan eltérést, ami különböző fluoreszcenciájú állapotok között fennálló egyensúly eltolásából fakadna. Előfordulhatna az is, hogy több állapot van, és a közöttük fennálló egyensúlyok látszólag érzéketlenek a hőmérséklet változtatására.

Ha telítési koncentrációban adunk a motor doménhez ATP-t, akkor a fluoreszcencia intenzitás a már prezentált emissziós spektrumnál is megfigyelt mértékben lecsökken. 10°C fölött a fluoreszcencia változása lassabban csökken, mint az apo állapotban tapasztalt, de az eltérés nem jelentős. Ha olyan nem hidrolizáló ATP analóggal (AMP-PMP) végeztük el a mérést, amely ATP állapotba (post-rigor állapot) fagyasztja a motor domént, akkor is az ATP állapotra jellemző profilt kaptuk.

Tranziens kinetikai hőmérsékletugrások kísérletek alátámasztják eddigi következtetéseinket, miszerint mind apo, mind ATP állapotban egyetlen konformációs állapot különíthető el a 239-es triptofán jel alapján (Málnási-Csizmadia, még nem publikált eredmény).

Ha ADP jelenlétében vizsgáltuk a W239+ motor domén fluoreszcenciájának hőmérsékletfüggését, akkor az apo és az ATP állapotban megfigyelt lineáris összefüggéstől jelentősen eltérő változás tapasztalható (12. ábra).

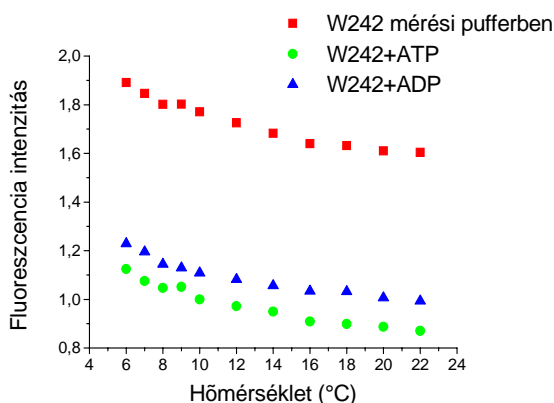


12. ábra: Ha ADP jelenlétében vizsgáltuk a W239+ motor domén fluoreszcenciájának hőmérsékletfüggését, akkor az apo és az ATP állapotban megfigyelt "közel lineáris" összefüggéstől jelentősen eltérő változás tapasztalható (a). Ez a triptofán környezetében több konformációs állapot meglétére utal. A 239-es triptofán 6°C-on felvett emissziós spektruma (b). Összehasonlítható a 11/a. ábrával, ami a 20°C-on elvégzett mérést mutatja. Az eredmény konzisztens a hőmérsékletfüggésből kapott fluoreszcencia intenzitásokkal.

Ez azt jelenti, hogy két, különböző fluoreszcenciájú állapot figyelhető meg steady-state körülmények között az ADP-miozin komplexben, melyek között fennálló egyensúlyt a hőmérséklet változtatásával eltoltuk. Ahogyan növekszik a hőmérséklet, úgy egyre több van jelen a magasabb fluoreszcenciával jellemezhető ADP kötött motor doménből. Ez szintén megfigyelhető a 6°C-on illetve a 20°C-on felvett emissziós spektrum összehasonlításával (x.b, x.a ábra).

Megvizsgálva a W242+ motor domén által emitált fény hőmérsékletfüggését, annak egyik állapotában sem tapasztaltunk jelentős eltérést a NATA fluoreszcencia változásával kimutatott csökkenéshez. Ebből az következik, hogy nagy valószínűséggel mind apo, mind

nukleotid kötött állapotokban egy-egy domináns konformációs állapota figyelhető meg a 242-es triptofán környezetének.



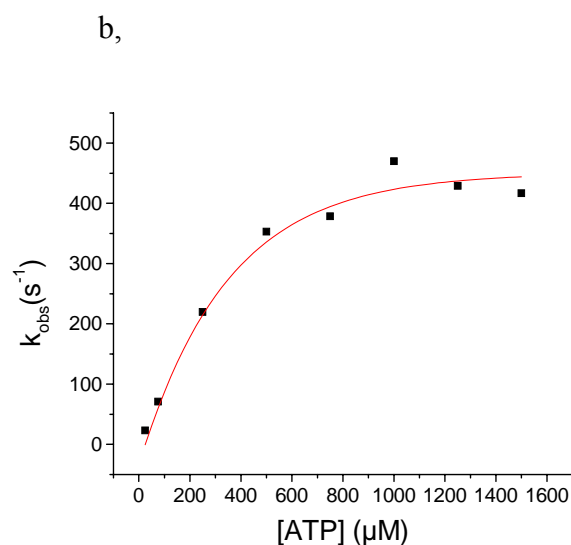
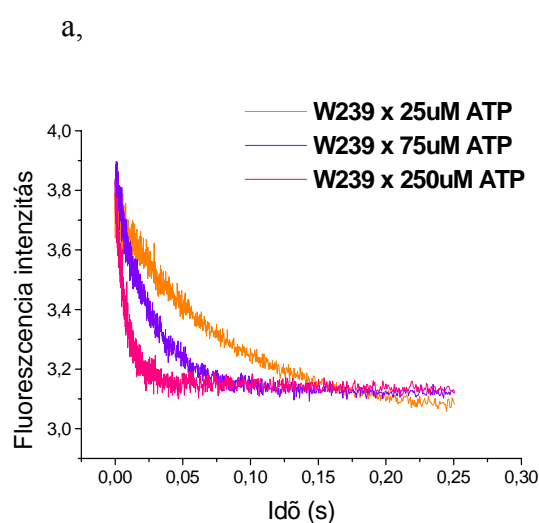
13. ábra: Megvizsgálva a W242+ motor domén által emitált fény hőmérsékletfüggését, annak egyik állapotában sem tapasztaltunk jelentős eltérést a NATA fluoreszcencia változásával kimutatott csökkenéshez.

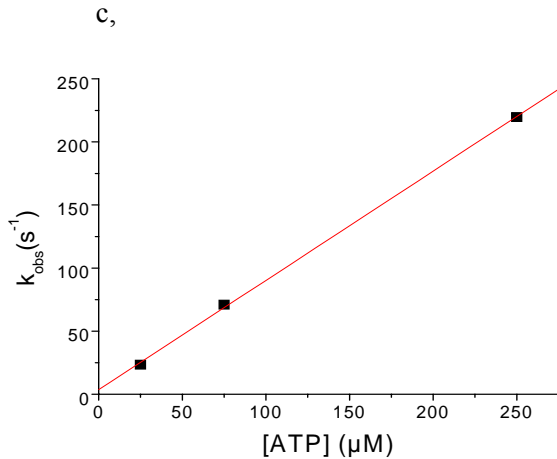
5.5 Az ATP kötés és az aktin disszociáció kapcsolatának vizsgálata

5.5.1 ATP kötés vizsgálata megállított áramlásos módszerrel aktin távollétében

Első közelítésben a W239+ motor domén fluoreszcencia változását vizsgáltuk ATP kötés hatására aktin távollétében. Mivel ez a mutáns valamivel nagyobb jelváltozást mutatott ATP-re, mint a W242+, illetve az utóbbtól eltérően a 239-es triptofán fluoreszcencia intenzitása jelentősen különbözik ATP és ADP kötött állapotban, ezért vizsgálatainkat elsősorban erre a fehérjére fókuszáltuk.

A W239+ motor domént különböző koncentrációjú ATP-vel (25-1500 μ M) löttük össze a stopped-flow apparátusban. A fluoreszcencia csökkenés milliszekundumos időtartományban lezajlik a reaktánsok keveredését követően. A csökkenés amplitúdója kb. 15-20%, ami kisebb a steady-state fluoreszcencia vizsgálatok során megállapított (14/a. ábra) fluoreszcencia intenzitás különbségnél (30%), mivel jelen vizsgálatnál a reakció egy része lezajlik a detektálás megkezdése előtt a készülék holtidejében (kb.1,8ms). A görbékre az egyszeres exponenciális függvény ($Y=Ae^{-kt}+C$) tökéletesen illeszthető volt. Az ebből kapott megfigyelt sebességi állandók (k_{obs}) az ATP koncentráció függvényében telítési görbét mutatnak (x.ábra). A méréseket 5°C végeztük, mivel 20°C, magas ATP koncentráció mellett a fluoreszcens jel változásával járó folyamat olyan gyors volt ($<800s^{-1}$), hogy nagy része a készülék holtidejében lezajlott.





14. ábra: W239+ (1,5μM) 5°C-on fölvevett megállított áramlásos tranziensei közül néhány különböző koncentrációjú ATP-vel való összelövés hatására (a). A 297 nm-en gerjesztett 239-es triptofán fluoreszcens jelváltozásaira egyszeres exponenciális függvény illeszthető, ami megadja a reakciók megfigyelt pszeudoelsőrendű sebességi állandóit (k_{obs}). Ha ezeket ábrázoljuk az ATP koncentráció függvényében, akkor egy telítési görbét kapunk (b). Alacsony ATP koncentráció mellett a megfigyelt sebességi állandó egyenesen arányos az ATP koncentrációval (c).

Ezek az eredmények megfeleltethetők egy olyan kétlépéses szubsztrát kötési kinetikai modellnek, ahol a gyors egyensúlyra vezető ütközési lépést, a fluoreszcens jel változásával járó, szubsztrát által indukált térszerkezeti átrendeződés követi (2. séma). A nukleotid kötési folyamatban alacsony ATP koncentráció mellett a másodrendű ütközési lépés a sebesség meghatározó, és ilyen körülmények közt (25-250Mm ATP) a megfigyelt sebességi állandó lineárisan változik az ATP koncentrációjával (x/c.ábra). Az egyenes meredeksége meghatározza az ATP kötés másodrendű sebességi állandóját (K₁k₂), aminek értéke 8,7 x10⁵M⁻¹s⁻¹.



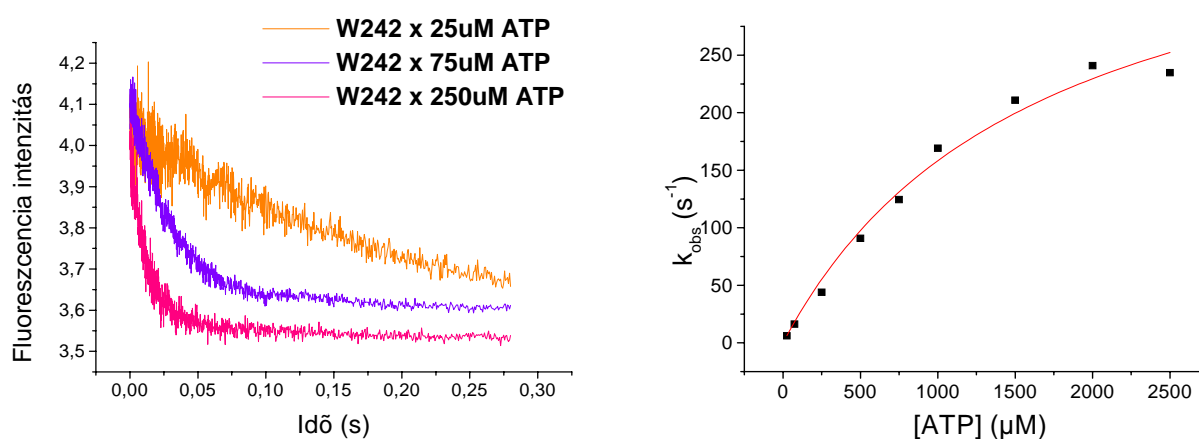
X. séma: A W239+ motor domén ATP kötésének kinetikai ábrája, ami a 239-es triptofán fluoreszcens jel alapján egy kétlépéses indukált illeszkedés (iduced fit). A csillag a fluoreszcens jel által elkülönített konformációs állapotát jelzi a motor doménnek.

Magasabb ATP koncentrációnál a második, izomerizációs lépés válik a sebesség meghatározó lépésé, az összefüggés már nem lineáris, k_{obs} értéke telítési görbét mutat, amire a következő hiperbola illeszthető:

$$k_{obs} = k_2 [ATP] / (K_d + [ATP]) + k_{-2} \quad K_d = k_{-1} / k_1$$

A maximális megfigyelt elsőrendű sebességi állandó k₂ + k₋₂, mivel magas ATP koncentráció esetén [ATP]/(K_d + [ATP]) ≈ 1, értéke pedig 450s⁻¹.

A W242+ motor domén ATP kötését is megvizsgáltuk megállított áramlásos módszerrel, hogy bizonyosságot kapjunk arról, nem csak a 239-es triptofán oldallánc lokális átrendeződésből következő fluoreszcencia kioltásról van szó, hanem ez a térszerkezeti átrendeződés az egész switch I régióra jellemző. A kapott tranziensekre illeszkedő egyszerűes exponenciális függvény, és az ATP koncentráció növekedésével telítődő megfigyelt sebességi állandó alapján a 242-es triptofán is az ATP kötés előbbiekben vázolt kétlépéses mechanizmusát mutatja. A kötés másodrendű megfigyelt sebességi állandója (K_1k_2) $2 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, a térszerkezeti átrendeződés megfigyelt sebességi állandója ($k_2 + k_{-2}$) pedig 400s^{-1} (15. ábra).

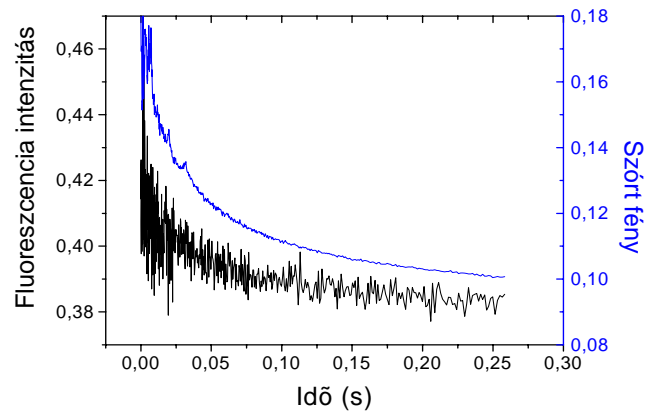


15. ábra: W242+ ($1,5 \mu\text{M}$) megállított áramlásos tranziensei közül néhány különböző koncentrációjú ATP-vel való összelövés hatására (a). Akárcsak a W239+ esetében, a jelváltozásokra egyszerűes exponenciális függvény illeszthető, és a reakciók megfigyelt pszeudoelsőrendű sebességi állandói (k_{obs}) az ATP koncentráció függvényében telítési görbét mutatnak (b). Ebből a kötés másodrendű megfigyelt sebességi állandója (K_1k_2) $2 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, a térszerkezeti átrendeződés megfigyelt sebességi állandója ($k_2 + k_{-2}$) pedig 400s^{-1} .

5.5.2 ATP kötés vizsgálata megállított áramlásos módszerrel aktin jelenlétében

Először a W239+ motor domén aktin komplexet löttük össze ATP-vel a stopped-flow készülékben. Az egyik csatornán a triptofán fluoreszcenciát detektáltuk, a másikon az aktomiozin komplexen szóródó gerjesztő fény azon kis hányadát, ami a 300nm fölött átengedő emissziós filteren átjut. Utóbbi a komplex disszociációjának monitorozására alkalmas, ugyanis mértéke a disszociációval csökken.

16. ábra: W239+ motor domén és aktin komplexét ($0,75\mu\text{M}$) löttük össze ATP-vel ($250\mu\text{M}$) stopped-flow készülékben. A fluoreszcencia változás látszólagos sebességi állandója 138s^{-1} , az aktin disszociációt monitorozó szórt fény változásának látszólagos sebességi állandója 40s^{-1} .



Összehasonlítva azonos ATP koncentráció ($250\mu\text{M}$) mellett az aktin nélkül (16.ábra) és aktinnal (x.ábra) kapott eredményeket megállapítható, hogy a fluoreszcens jel változása közel azonos lefutású. Aktin jelenlétében a görbére illesztett dupla exponenciális függvény, az aktin hiányában is érzékelt változás látszólagos sebességi állandóját 138s^{-1} -nak adja. Ez hozzávetőlegesen fele az aktin nélkül kapott eredménynek (5°C -on 220s^{-1} , 20°C -on 280s^{-1}). Nagy nukleotid koncentráció ($2,5\text{mM}$) mellett a fluoreszcencia változás látszólagos sebességi állandójának maximális értéke hozzávetőlegesen 350s^{-1} . Alacsony ATP koncentráció mellett a látszólagos sebességi állandókra illesztett egyenes az ATP kötés másodrendű sebességi állandóját $5 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ -nak adja, bár a tranziensek rossz jel-zaj aránya miatt ez csak pontatlanul meghatározható, viszont megfeleltethető már publikált eredményekkel (Kuhlman és Bagshaw, 1997, Kurzawa és mtsai, 1997), (1.táblázat). Az intenzitás változása a teljes fluoreszcenciához viszonyítva 8%. Ez azt jelenti, hogy a változás relatív amplitúdója harmadára csökkent az aktin hiányában mért értékhez képest. Ennek oka, hogy a fluoreszcens háttér jelentősen megnőtt, mivel sztöhiometrikus mennyiségű aktinban négyszer annyi triptofán van, mint az egy-triptofános motor doménben. Triptofán mentes motor domén alkalmazásával kimutatott, hogy az aktinban lévő triptofánok fluoreszcenciája nem változik miozin kötés hatására, viszont az emissziós csatornában az aktin miatt megnőtt szórt fény a filterekre jutva, azok fluoreszcenciáját váltja ki, így a disszociációval együtt járó szórt fény intenzitásváltozás műtermékként jelentkezik a triptofán fluoreszcencia detektálásában (Málnási-Csizmadia, 2004). A triptofán mentes motor domén esetében ez az intenzitásváltozás 2% a teljes fluoreszcenciához viszonyítva. Ez negyede a 239-es triptofánnál érzékelt fluoreszcencia változás relatív amplitúdójától, ami megerősíti, hogy a motor domén triptofán perturbációját érzékeljük. Talán a detektált fluoreszcencia változás lassú fázisa tulajdonítható a fényszórásból fakadó artefaktnak.

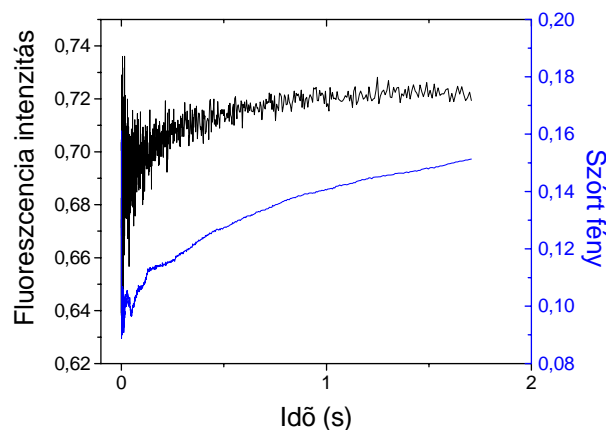
A másik csatornán a szórt fényt detektáltuk, aminek intenzitása egy nagyságrenddel nagyobb a fluoreszcens fény intenzitásánál, ezért utóbbinak nincs számottevő hatása a jel

változására. 250 μM ATP hatására a fluoreszcens jel változásával azonos fázisban lezajló aktin disszociáció látszólagos sebességi állandója 40s^{-1} a szórt fény változása alapján. Ez az érték megfeleltethető a vad típusú motor domén fragmentumnál észlelttel azonos nukleotid koncentráció mellett (Kurzawa és mtsai, 1997). Sajnos a szórt fény intenzitásának változékonysága és a megnövekedett jel-zaj arány megnehezítette a méréseket, ezért csak néhány nukleotid koncentráció mellett sikerült a fényszórás pontos, más eredményekkel összeegyeztethető kiértékelése.

5.6 Akto-miozin komplex kialakulásának vizsgálata megállított áramlásos módszerrel

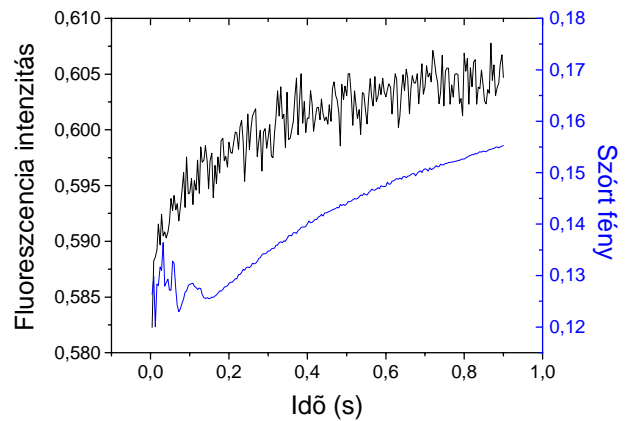
Megvizsgáltuk azt is, hogy a 239-es triptofán érzékel-e konformáció változást az apo állapotú motor domén és az aktin kapcsolódásakor. Ebben az esetben W239+ motor domént aktinnal lőttük össze, majd az egyik emissziós csatornán a fluoreszcencia-, a másikon a szórt fény változását követtük nyomon (17.ábra). Látható, hogy mind a két esetben a jelváltozás azonos fázisban jelentkezik, és mind

fluoreszcencia változásra, mind a fényszórás változására egyszeres exponenciális illeszthető, egyenként $3,4\text{s}^{-1}$ és $1,6\text{s}^{-1}$ látszólagos sebességi állandóval. Az érzékelt fluoreszcencia változás amplitúdója a teljes fluoreszcenciához viszonyítva 5%. Ez közel kétszerese a triptofán mentes apo állapotú motor domén és aktin összelövésekor tapasztalt relatív fluoreszcencia változásnak. (3%) (Málnási-Csizmadia, 2004).



17. ábra: W239+ motor domén ($0,75\mu\text{M}$) és aktin ($1\mu\text{M}$) interakciójának megállított áramlásos tranziensei. Mind a 239 triptofán fluoreszcencia változására (fekete), mind az akto-miozin komplex kialakulásának következtében létrejövő szórt fény intenzitásváltozásra (kék) egyszeres exponenciális illeszthető, egyenként $3,4\text{s}^{-1}$ és $1,6\text{s}^{-1}$ látszólagos sebességi állandóval. A fluoreszcens változás kicsi amplitúdójából arra lehet következtetni, hogy az aktinnak nincs jelentős hatása az apo állapotú motor domén switch I régiójának térszerkezetére.

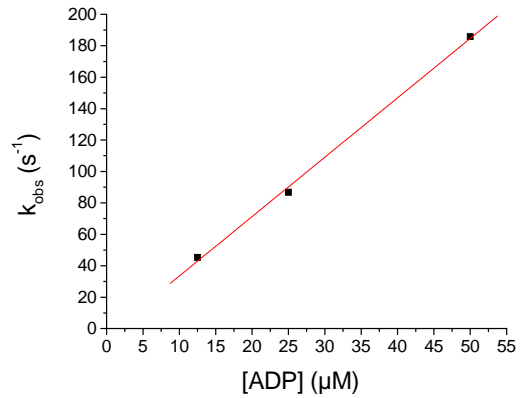
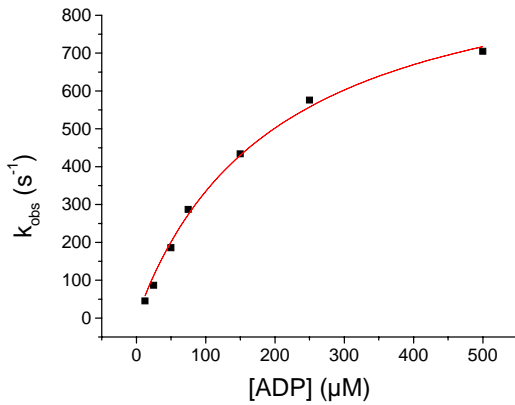
A W242+ motor domén aktin kötését megvizsgálva ugyan azt az eredményt kaptuk, megerősítve a W239+ esetében tapasztaltakat (18. ábra). Egyszeres exponenciális illesztésével a fluoreszcencia változás látszólagos sebességi állandója $4,8s^{-1}$, amplitúdója a teljes fluoreszcenciához viszonyítva 3%. A szórt fény változásának látszólagos sebességi állandója $2 s^{-1}$, bár utóbbi megbecslése eléggé bizonytalan a szórt fény változékonysága miatt. Jelen esetben az adatpontok rögzítése az eddigiekkel ellentétben lineáris időskálán történt.



18. ábra: W242+ motor domén ($0,75\mu M$) és aktin ($1\mu M$) interakciójának megállított áramlásos tranziensei. Mind a fluoreszcens jel, mind a fényszórás változása megerősíti a W239+ aktin kötése során tapasztaltakat. Jelen esetben az adatpontok rögzítése lineáris időskálán történt.

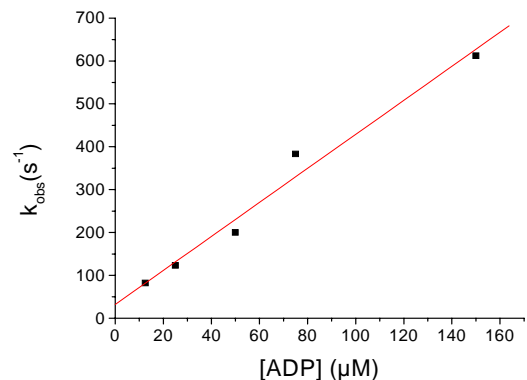
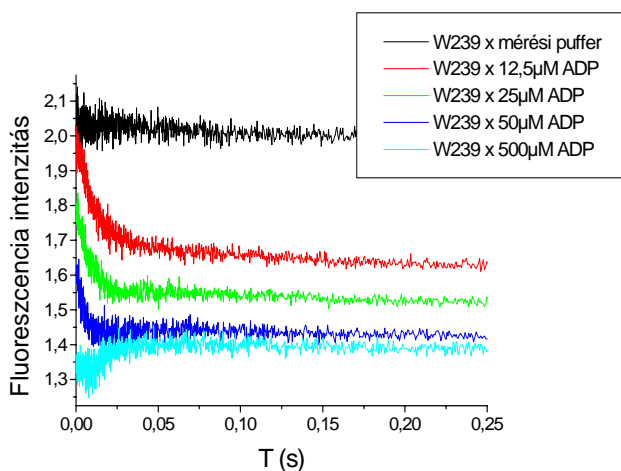
5.7 ADP kötés megállított áramlásos vizsgálata

A W239+ motor domén ADP kötés hatására mutatott steady-state fluoreszcencia csökkenésének megállított áramlásos vizsgálatát különböző hőmérsékleten végeztük el. A $3\mu M$ -os W239+ motor domént különböző koncentrációjú (25 - $1000\mu M$) ADP-vel löttük össze. A $4^{\circ}C$ -on felvett tranziensek egyfázisúak voltak, az egyszeres exponenciális függvény jól illeszkedett. Alacsony ADP koncentráció tartományban ($12,5$ - $50\mu M$) a megfigyelt sebességi állandó lineárisan változott az ADP koncentrációjával, és így a kötés másodrendű sebességi állandóját $3,4 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ -nek adta. Az ATP koncentráció további növekedésével a megfigyelt sebességi állandó maximális, $1000s^{-1}$ -os értékéhez tart, ami a nukleotid kötetést követő térszerkezeti átrendeződés látszólagos sebességi állandója (19. ábra).



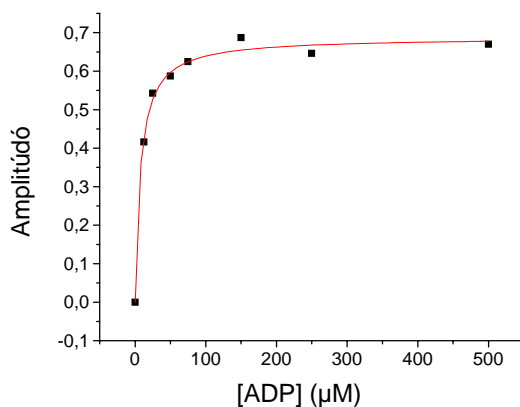
19. ábra: A W239 motor domén ADP kötésének megállított áramlásos tranzienseinek kiértékelése. A mérést 4°C -on végeztük. Az egyszeres exponenciális függvény jól illeszkedett. Alacsony ADP koncentráció tartományban ($12,5\text{-}50\mu\text{M}$) a megfigyelt sebességi állandó lineárisan változott az ADP koncentrációjával, és így a kötés másodrendű sebességi állandóját $3,4 \times 10^6 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ -nek adta. Az ATP koncentráció további növekedésével a megfigyelt sebességi állandó maximális, 1000s^{-1} -os értékéhez tart, ami a nukleotid kötetést követő térszerkezeti átrendeződés látszólagos sebességi állandója

A 12°C -on felvett tranziensek esetében (20/a ábra) alacsony ADP koncentráció mellett a fluoreszcencia csökkenés pszeudoelsőrendű látszólagos sebességi állandóira illesztett egyenes meredeksége a kötés másodrendű sebességi állandóját $4 \times 10^6 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ -nak, az y-tengely metszet a disszociációs sebességi állandót 30s^{-1} -nak adja (20/b ábra). Nagy nukleotid koncentráció mellett a fluoreszcencia csökkenés olyan gyorsá válik ($<700\text{s}^{-1}$), hogy nagy része lezajlik a detektálás megkezdése előtt a készülék holtidejében.



A 12°C -on felvett tranziensei a W239+ ADP kötésének. Alacsony ADP koncentráció mellett a fluoreszcencia csökkenés pszeudoelsőrendű látszólagos sebességi állandóira illesztett egyenes meredeksége a kötés másodrendű sebességi állandóját $4 \times 10^6 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ -nak, az y-tengely metszet a disszociációs sebességi állandót 30s^{-1} -nak adja.

Ha a fluoreszcencia csökkenés amplitúdóját ábrázoljuk az ADP koncentráció függvényében, akkor a kapott telítési görbére egy hiperbola illeszthető (21. ábra), aminek fél telítési értéke a miozin-ADP komplex disszociációs állandóját $7,6\mu\text{M}$ -nak adja. Mivel $K_d = k_{\text{off}} / k_{\text{on}}$, ezért a másodrendű asszociációs sebességi állandó és a disszociációs állandó szorzata megadja a disszociációs sebességi állandót. Utóbbi megegyezik az előgyensúlyt feltételező kétlépéses szubsztrát kötési modellben k_{-2} -vel, értéke pedig 30s^{-1} . Ezt az értéket kaptuk a látszólagos sebességi állandók által meghatározott y-tengely metszetből is.



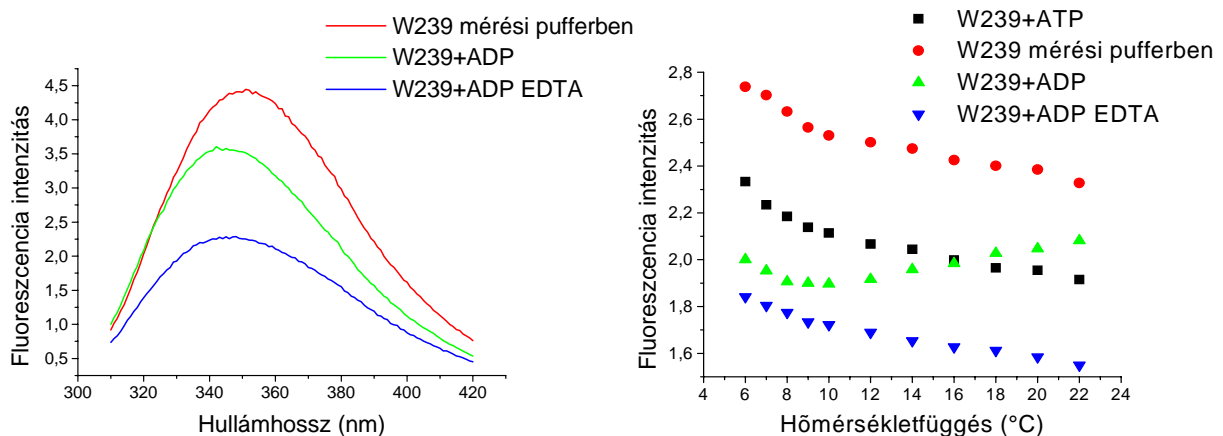
21. ábra: Ha a 12°C -on $W239+$ ADP kötés esetében tapasztalt fluoreszcencia csökkenés amplitúdóját ábrázoljuk az ADP koncentráció függvényében egy telítési görbét kapunk. Az ebből számolt disszociációs állandója az ADP-nek $7,6\mu\text{M}$.

Magasabb ADP koncentráció mellett ($<75\ \mu\text{M}$) a gyors fluoreszcencia csökkenést követően megjelenik egy fluoreszcencia emelkedéssel járó második fázis is. A változás látszólagos sebességi állandója hozzávetőlegesen 100s^{-1} , ami független a nukleotid koncentrációjától. Feltehető, hogy ez a fluoreszcencia emelkedés az alacsony és a magas fluoreszcenciával jellemezhető két ADP kötött állapot közötti átmenetnek tulajdonítható, vagyis az ADP-miozin ütközési komplex kialakulását követő térszerkezeti átalakulás folyamán először az alacsonyabb fluoreszcenciával jellemezhető ADP-kötött állapot alakul ki. Hőmérsékletugrásos vizsgálatok alátámasztják ezt a felvetést (Málnási-Csizmadia, még nem publikált eredmények, lásd eredmények megvitatása), mivel 12°C -on a két állapot közötti átalakulás látszólagos sebességi állandója ott is $100\ \text{s}^{-1}$ -nak adódott.

Az ADP kötés 20°C -on felvett megállított áramlásos tranziensein a fluoreszcencia csökkenéssel járó folyamat már alacsony ADP koncentráció mellett is olyan gyorsan lefut, hogy a változás amplitúdójának nagy része elveszik a holtidőben. Ekképpen a sebességi állandók pontos meghatározása nem lehetséges.

5.8 Mg elvonásos kísérletek

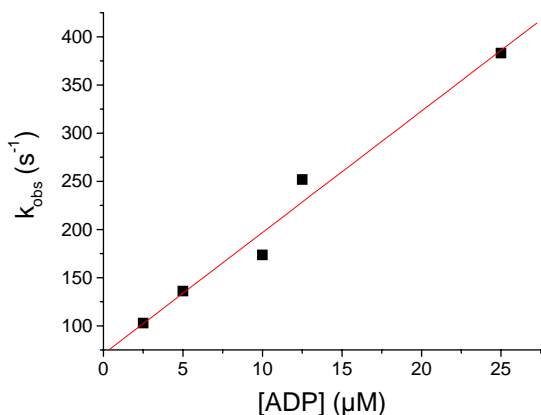
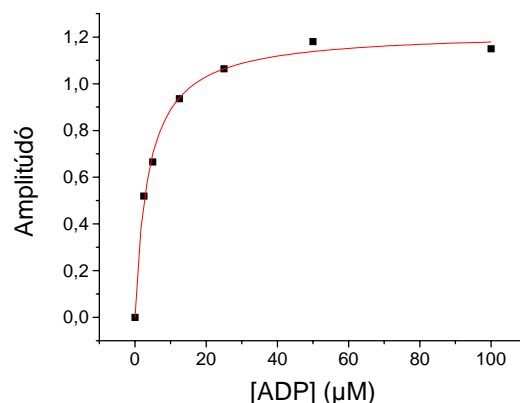
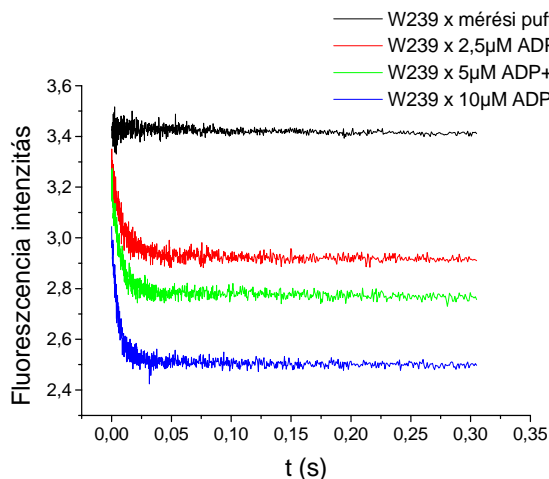
Az ADP állapotban fölvevett 239-es triptofán emissziós spektrumában jelentős különbséget tapasztaltunk, ha azt Mg jelenlétében és távollétében vettük föl (22/a. ábra). Mg elvonás hatására a fluoreszcencia intenzitás 40%-t csökkenést, illetve 4nm vörös eltolódást mutat. Megvizsgálva a Mg nélküli ADP állapot steady-state fluoreszcencia hőmérsékletfüggését, megállapítható, hogy a fluoreszcencia intenzitás hőmérsékletfüggése párhuzamos az apo, illetve az ATP kötött állapotban tapasztaltnal, így feltételezhető, hogy Mg hiányában egyetlen térszerkezeti állapota van az ADP kötött motor domén 239-es triptofán környezetének (22/b. ábra). Ezt az állapotot megpróbáltuk megállított áramlásos kísérletekkel is karakterizálni.



22. ábra: Az ADP állapotban fölvevett 239-es triptofán emissziós spektrumában jelentős különbséget tapasztaltunk, ha azt Mg jelenlétében és távollétében vettük föl (a). Mg elvonás hatására a fluoreszcencia intenzitás 40%-t csökkenést, illetve 4nm vörös eltolódást mutat. Megvizsgálva a Mg nélküli ADP állapot steady-state fluoreszcencia hőmérsékletfüggését, megállapítható, hogy a fluoreszcencia intenzitás hőmérsékletfüggése párhuzamos az apo, illetve az ATP kötött állapotban tapasztaltnal, így feltételezhető, hogy Mg hiányában egyetlen térszerkezeti állapota van az ADP kötött motor domén 239-es triptofán környezetének (b).

Először a W239+ motor domén ADP kötését vizsgáltuk meg Mg távollétében. 3 μM W239+-t löttünk össze különböző koncentrációjú (2,5-100 μM) ADP-vel. A reakcióoldatában 5mM EDTA biztosította a pufferben lévő összes Mg megkötését. 100 μM fölötti ADP koncentráció mellett a tapasztalt fluoreszcencia csökkenés nagy része a holtidőben elveszett, viszont az alacsonyabb ADP koncentráció tartományban rögzített tranziensek tökéletesen illeszkedtek az egyszeres exponenciális függvény. A megfigyelt sebességi állandókra illesztett egyenes a kötés másodrendű sebességi állandó értékét $1,2 \times 10^7 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ -nak,

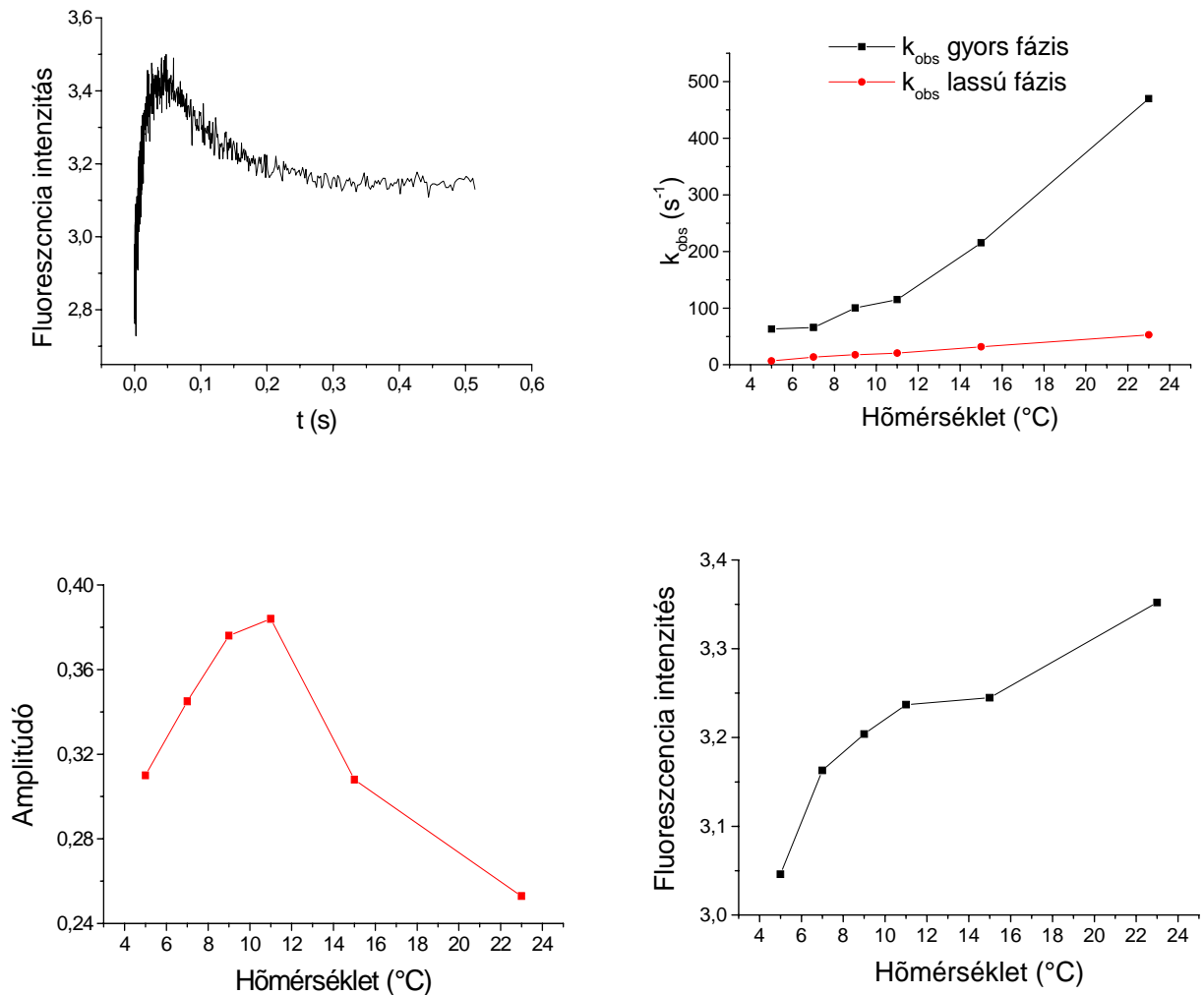
míg az y-tengely metszet az ADP disszociációs állandóját hozzávetőlegesen 70 s^{-1} -nak határozza meg. Ha a fluoreszcencia csökkenés amplitúdóját ábrázoljuk az ADP koncentráció függvényében, akkor a kapott telítési görbére egy hiperbola illeszthető (x.ábra), aminek fél telítési értéke a miozin-ADP komplex Mg távollétében mért disszociációs állandóját $4 \mu\text{M}$ -nak adja. Az ADP ebből számolt disszociációs sebességi állandója 50 s^{-1} .



23. ábra: A W239+ ADP kötésének megállított áramlásos tranziensei Mg távollétében, 20°C -on. Ha a fluoreszcencia csökkenés amplitúdóját ábrázoljuk az ADP koncentráció függvényében, akkor a kapott telítési görbére egy hiperbola illeszthető(b), aminek fél telítési értéke a miozin-ADP komplex Mg távollétében mért disszociációs állandóját $4 \mu\text{M}$ -nak adja. Az ADP ebből számolt disszociációs sebességi állandója 50 s^{-1} . A megfigyelt sebességi állandókra illesztett egyenes a kötés másodrendű sebességi állandó értékét $1,2 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ -nak (c)

Azzal, hogy az ADP kötött W239+ motor domén különböző fluoreszcenciájú állapottal rendelkezik Mg jelenében és távollétében, egy alkalmas jelet nyertünk a Mg kötés és felszabadulás vizsgálatára is.

A Mg kötést úgy vizsgáltuk megállított áramlásos módszerrel, hogy 1,5mM EDTA-t tartalmazó, 1,5 μ M W239+ motor domén és 250 μ M ADP oldatát löttük össze 10mM Mg és 250 μ M ADP oldatával. Ilyen körülmények között az összes motor domén ADP kötött állapotban van ($K_d=4 \mu$ M), illetve a Mg mennyisége bőven elegendő, hogy az összes EDTA telítődjön. A reakciót követve két fázisú tranzienseket kaptunk, ahol az első, gyors fázis fluoreszcencia emelkedés, a lassabb fázis pedig fluoreszcencia csökkenés volt (24/a. ábra).

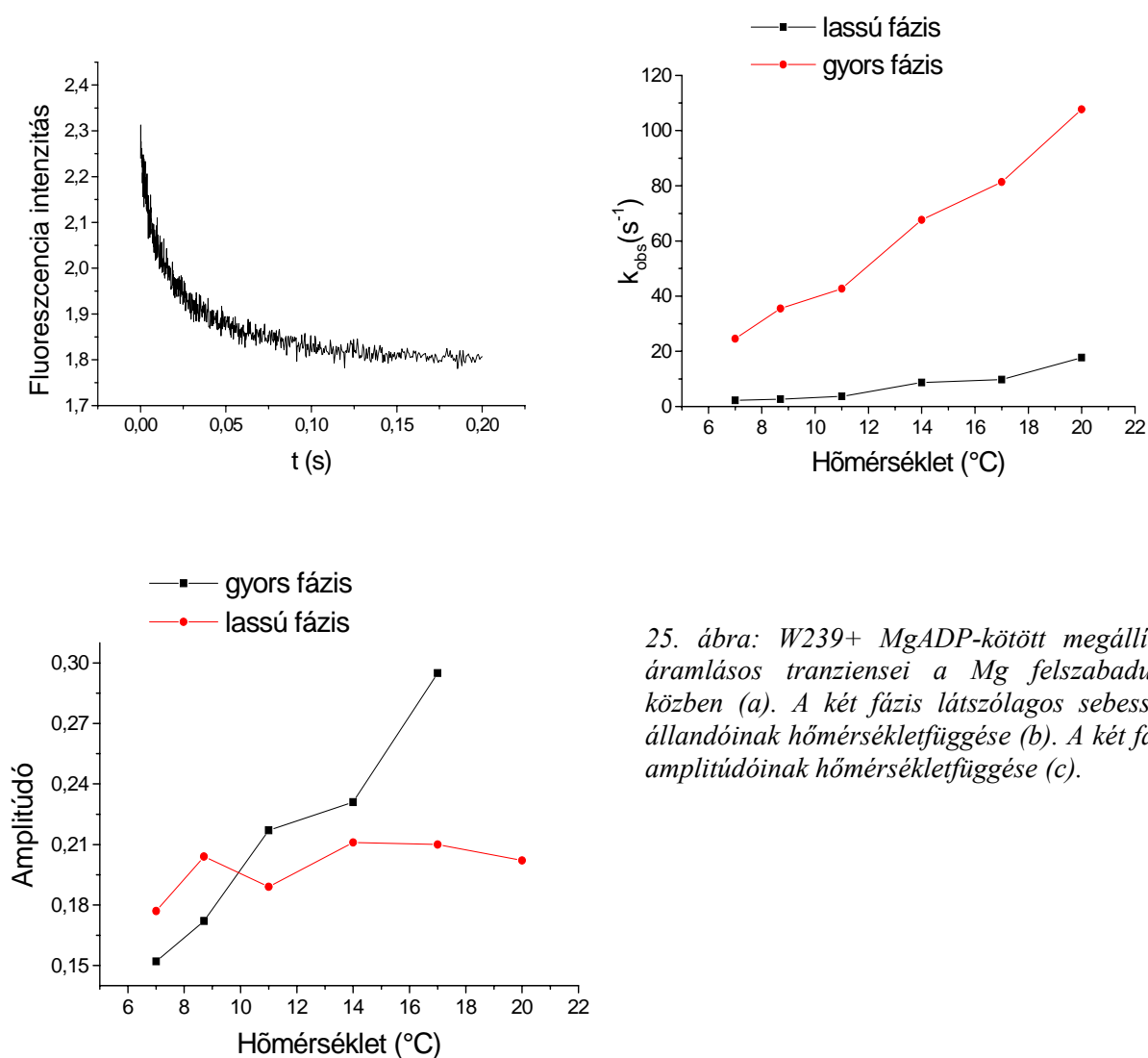


24.ábra: ADP-kötött W239 motor domén meállított áramlásos tranziensei Mg kötés hatására (a). A két fázis látszólagos sebességi állandóinak hőmérsékletfüggése (b). A lassabb fluoreszcencia csökkenés amplitudójának hőmérsékletfüggése (c). A tranziensek végpontjainak hőmérsékletfüggése (d).

Látható, hogy a legalacsonyabb fluoreszcenciájú, Mg nélküli ADP állapotból kiinduló reakció során először egy magasabb fluoreszcenciájú állapotba jutunk, majd egy lassabb reakció folyamán a kettő közötti fluoreszcencia intenzitással jellemezhető állapot alakul ki. Ez jól összeegyeztethető a három ADP kötött állapot steady-state fluoreszcencia intenzitásaival (22. ábra). Ezek szerint a Mg kötése egy gyors reakció folytán a magasabb fluoreszcenciájú MgADP állapot kialakulását eredményezi, majd a lassabb reakció az alacsonyabb fluoreszcenciájú MgADP kötött állapot kialakulása. Ezek szerint ez a második fázis megfeleltethető az 5.7. fejezetben vázolt, két ADP kötött állapot közötti egyensúlyi reakciónak. Ezen átalakulás hőmérsékletugrásos kísérleteiből megállapított látszólagos sebességi állandója 12°C-on 100s^{-1} , ami jelen mérés során, azonos hőmérsékleten felvett tranziensre illesztett exponenciálisból 20s^{-1} -nak adódott. A különbség magyarázata az lehet, hogy jelen mérésnél a gyors fluoreszcencia emelkedésbe beleolvad a második reakció fluoreszcencia változásának egy része, így a gyakorlatilag látható rész csak az exponenciális ellaposodó, második fele, ami a látszólagos sebességi állandó alábecsülését eredményezi.

A fluoreszcens tranzienseket különböző hőmérsékleteken rögzítettük. A két fázis látszólagos sebességi állandóinak hőmérsékletfüggését a 24/b ábra mutatja. Látható, hogy a hőmérséklet növekedésével a gyors fázis sebessége meredeken emelkedik és 20°C-on már 400s^{-1} értéket ér el, míg a lassabb fázis ezen a hőmérsékleten 50s^{-1} látszólagos sebességi állandóval jellemezhető. A fluoreszcencia csökkenés amplitúdóját ábrázolva a hőmérséklet függvényében (24/c ábra) kitűnik, hogy a 23°C-ról csökkentve a hőmérsékletet a változás amplitúdója folyamatosan növekszik egészen 11°C-ig. Ennek nyilvánvaló oka, hogy a két MgADP kötött állapot között fennálló egyensúly a hőmérséklet csökkenésével az alacsonyabb fluoreszcenciájú állapot felé tolódik el (5.4 fejezet). Erre utal az is, hogy a teljes vizsgált hőmérséklettartományban a hőmérséklet csökkenésével a végállapot fluoreszcenciájának intenzitása egyre alacsonyabb (24/d ábra). Ezen kívül az is megfigyelhető, hogy 11°C alatt a hőmérséklet további csökkenésével a gyors fázist követő fluoreszcencia csökkenés amplitúdója egyre kisebb. Ezek az adatok legegyszerűbben azzal magyarázhatóak, hogy az alacsonyabb fluoreszcenciájú MgADP állapot nem csak a magasabb fluoreszcenciájú MgADP állapoton keresztül alakulhat ki, hanem a Mg kötésekor közvetlenül is. Ennek a reakciónak a sebessége jóval alacsonyabb lehet a magas fluoreszcenciájú állapot Mg kötéséhez képest, ezért csak alacsonyabb hőmérsékleten érzékelhető, amikor a kompetitív reakcióút sebessége drasztikusan lecsökken (24/b. ábra).

A Mg felszabadulását az ADP W239+ komplexről úgy vizsgáltuk, hogy Mg tartalmú 1,5 μ M W239+ motor domén és 250 μ M ADP oldatot löttünk össze 250 μ M ADP-t tartalmazó EDTA oldattal. A kapott fluoreszcencia csökkenés két fázisú volt (25. ábra), melyre illesztett dupla exponenciálisból a látszólagos sebességi állandók 120s⁻¹ és 19 s⁻¹ 20°C-on mérve. A reakciót megvizsgáltuk több hőmérsékleten. A két fázis látszólagos sebességi állandóinak, illetve amplitúdóinak hőmérsékletfüggését a 25/b-c.ábra mutatja. A gyors fázis meredeken csökkenő amplitúdójából talán arra lehet következtetni, hogy az a magasabb fluoreszcenciájú MgADP kötött állapot Mg felszabadulásához köthető.



25. ábra: W239+ MgADP-kötött megállított áramlásos tranziensei a Mg felszabadulás közben (a). A két fázis látszólagos sebességi állandóinak hőmérsékletfüggése (b). A két fázis amplitúdóinak hőmérsékletfüggése (c).

6 Eredmények értelmezése

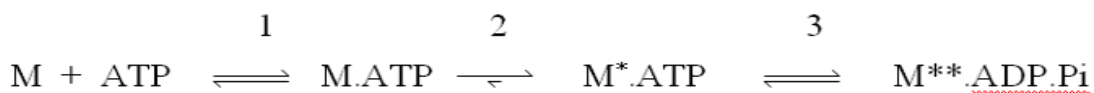
Egy triptofánt tartalmazó motor domén fragmentumaink működését karakterizálva, megállapíthatjuk, hogy a Switch I régióba előzetes kutatásokra alapozva (Shimada és mtsai, 1997) bevitt mutációk nem okoztak jelentős változást az ATP-áz ciklus működésében. A bazális enzim aktivitás ugyan háromszorosa a vad típuséhoz viszonyítva, de ez az 501-es triptofán hiányával hozható összefüggésbe (Málnási-Csizmadia és mtsai, 2000). Ezen munka során megállapított sebességi és egyensúlyi állandókat az 1. táblázat foglalja össze, összehasonlítva más *Dictyostelium* miozin II konstrukciókkal.

	szubsztrát	S1dC	M761	W239+	W242+	dimenzió
motor domén egyedül						
k_{KAT}	ATP	0,02	0,06	0,17	0,2	s^{-1}
K_1k_2	ATP	0,17	0,61	0,87*	0,2*	$\mu M^{-1}s^{-1}$
k_2+k_{-2}	ATP	-	-	450*	400*	s^{-1}
k_{-6}/K_7	ADP	0,24	-	4**	-	$\mu M^{-1}s^{-1}$
$k_{-6}+k_6$	ADP	-	-	<1000**	-	s^{-1}
k_6	ADP	1,1	-	30**	-	s^{-1}
$K_d (K_6 \times K_7)$	ADP	4-8	-	7,6**	-	μM
motor domén aktinnal						
K_1k_2	ATP	0,5	0,21	0,5	-	$\mu M^{-1}s^{-1}$
k_2+k_{-2}	ATP	-	-	350	-	s^{-1}
k_{-A}	ATP	150	411	-	-	s^{-1}
k_{+A}	-	0,16	1,3	1,6	2	s^{-1}
K_A	-	0,11	0,01	-	-	μM
K_A	ADP	-	-	0,02	-	μM

1.táblázat: *Dictyostelium* miozin II ATP-ázkinetikai paraméterei. Az egyensúlyi és sebességi állandók jelölése a Bagshaw ATP-áz kinetikai shéma szerint történt (x.shéma). S1dC = vad típusú, teljes motor domén (Kuhlman és Bagshaw, 1997), M761 = vad típusú, 761 aminosavból álló motor domén fragmentum (Kurzawa és mtsai, 1997). * = 5°C-on mért eredmény, ** = 12°C-on mért eredmény,

Már régóta ismert, hogy a miozin ATP kötése kétlépéses folyamat, ahol a másodrendű ütközési lépést a fehérje leginkább irreverzibilis térszerkezeti átrendeződése követ. Először vad típusú nyúl vázizom intrinzik fluoreszcenciája alapján figyelték meg az ATP kötés indukált illeszkedését (Bagshaw és mtsai, 1974), majd a kötés eme sémáját kiterjesztették többek között a *Dictyostelium* miozin II-re is (Ritchie és mtsai, 1993, Kurzawa és mtsai, 1997). Utóbbinál az ATP kötéssel járó irreverzibilis konformáció változás a nukleotid kötő

zseb szájánál elhelyezett triptofán szenzor alapján két, egymást követő lépésre bontható, egyenként $1800s^{-1}$ (2.a.) és $450s^{-1}$ (2.b.) sebességi állandóval jellemezhetően (Kovács és mtsai, 2002). A kötést követő lépések az ATP-áz ciklusban a Switch II nyitott-zárt átmenet és az ehhez kapcsolt hidrolízis lépés (3). A switch II előbb említett konformáció változásának érzékelésére a W501+ egy-triptofános motor domén alkalmas, és a folyamatot kísérő fluoreszcencia változás $20^{\circ}C$ $30s^{-1}$ látszólagos sebességi állandóval telíthető (Málnási-Csizmadia és mtsai, 2000, Kuhlman és mtsai, 1998) (3.séma).



3.séma

Ebbe a modellbe tökéletesen integrálható a Switch I régióba elhelyezett 239-es és 242-es triptofán által, a motor domén ATP kötésekor megfigyelt kétlépéses indukált illeszkedés. Valószínűsíthető, hogy az általunk érzékelt gyors ütközési lépést követő konformáció változás ($4^{\circ}C$ -on $400s^{-1}$, $20^{\circ}C$ pedig $800s^{-1}$ fölötti megfigyelt sebességi állandóval jellemezhető) egyidejűleg zajlik le a nukleotid kötő zseb szájánál detektált második konformációs átrendeződéssel (2.b.). Szenzoraink fluoreszcenciájának hőmérsékletfüggéséből megállapítható, hogy ATP kötését követően egyetlen domináns konformációja alakul ki a Switch I régióknak, ami azt is jelenti, hogy a kötést követő átrendeződés közel irreverzibilisnek mondható. Fontos megjegyezni, hogy mind a W239+, mind a W242+ esetében az ATP hatására kialakuló fluoreszcens változásokra csak egyszeres exponenciális illeszthető, vagyis egyetlen folyamathoz köthetőek, ami nem összeegyeztethető a $30s^{-1}$ sebességi állandóval jellemezhető Switch II nyitott-zárt átmenettel. Nem hidrolizáló ATP analóg (AMP-PMP) kötésekor (nem prezentált eredmény) tapasztalt fluoreszcencia csökkenés amplitúdója megegyezik az ATP kötésekor érzékelttel, ami szintén megerősíti, hogy szenzoraink nem érzékenyek a Switch II nyitott-zárt átmenetre és az ahhoz kapcsolt hidrolízis lépésre. Ezen eredményekből megállapítható, hogy triptofán szenzorainkkal sikerült oldatban is láthatóvá tenni a Switch I régió nyitott-zárt térszerkezeti átrendeződését, amelynek kezdeti konformációját az apo állapotú motor domén kristályszerkezet (Reubold és mtsai, 2003), végpontját pedig az ATP kötött szerkezet (Bauer és mtsai, 2000) jelöli ki.

Régóta ismert, hogy az ATP kötése okozza az aktin leválását a miozinról (Lymn és Taylor, 1970), ezért az előbbieken vázolt folyamatot megvizsgáltuk aktin jelenlétében is. Ha

összehasonlítjuk azonos ATP koncentráció mellett az aktinnal és aktin nélkül kapott eredményeket, akkor látható, hogy az aktin jelentősen (2-3X) lelassította a fluoreszcencia változással járó térszerkezeti átrendeződést (aktin jelenlétében a 350s^{-1} , távollétében $<800\text{s}^{-1}$ látszólagos sebességi állandóval jellemezhető). Ennek valószínűsíthető oka, hogy a nukleotid kötését hátráltatja az aktin kötéséből adódó ellenerő, ami az aktin-kötő árkot zárva, a switch I régiót, és ezzel a nukleotid-kötő zsebet pedig nyitott konformációs állapotban tartja (Holmes és mtsai, 2003). Ez a jelenség megfigyelhető az ATP kötő zseb bejáratánál elhelyezett triptofán szenzorokkal is, melynek konformációs átrendeződését szintén harmadára lassította a kötött aktin (Conibear és mtsai, 2004).

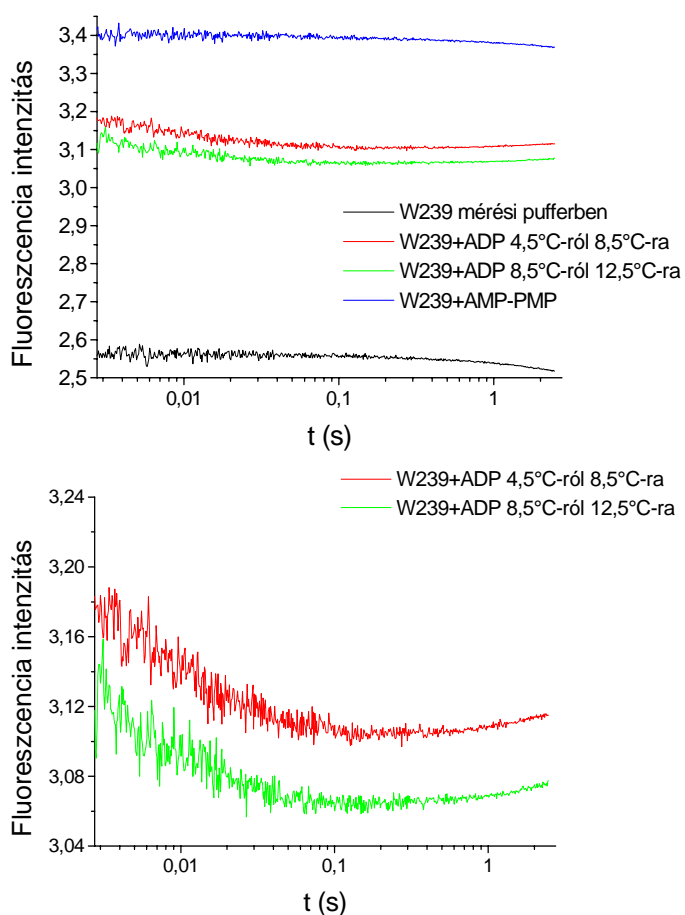
Egyszerre monitorozva az aktin-W239+ komplex ATP kötés térszerkezeti átrendeződését és az aktin disszociációt, megfigyelhető, hogy a két folyamat egy fázisban, közel egyidejűleg játszódik le. Az aktin disszociáció maximális megfigyelt sebességi állandója 150 s^{-1} (Kuhlman és Bagshaw, 1997, Kovács, 2002), ami lassabb, mint az általunk érzékelt switch I régió nyitott-zárt konformációs átrendeződés. Ez alátámasztja azt a korábbi megfigyelést, hogy az aktin disszociáció közvetlenül követi az ATP indukált konformáció változást (Conibear és mtsai, 2004).

Kristályszerkezetek és spektroszkópiai megfigyelések azt mutatják, hogyha az aktin-kötő árok nyitva van, akkor a switch I zárva, illetve ha az aktin kötő árok zárva, akkor a switch I nyitva van (Reubold és mtsai 2003, Holmes és mtsai, 2003, Coureux és mtsai, 2004). Emellett azt is tudjuk, hogy az aktin disszociációja az aktin-kötő árok kinyílásának következménye (Conibear és mtsai, 2003). Ezek alapján a következő séma vázolható föl: A miozin ATP ütközési komplex kialakulását követően az ATP által indukált, nagy szabadenergia változással járó térszerkezeti átrendeződésen keresztül a switch I régió nyitottból zárt konformációs állapotába (amikor kapcsolódik a γ -foszfáthoz és a Mg-hoz) kerül, ami a felső 50KDa szubdomént távolabb mozditja az alsó 50KDa szubdoméntól, és így az aktin-kötő árok kinyílik, ami az aktin leválását eredményezi.

Megvizsgáltuk azt is, hogy a 239-es illetve a 242-es triptofán érzékel-e konformáció változást az apo állapotú motor domén és az aktin kapcsolódásakor. Az aktomiozin komplex kialakulását követő kicsi fluoreszcencia változás arra enged következtetni, hogy az apo állapotú motor doménben és a rigor aktin-miozin komplexben a Switch I azonos térszerkezetet vesz fel. Más szóval mind a két állapotban a switch I régió nyitott konformációs elrendeződésben található, vagy olyan egyensúlyban, ami túlnyomórészt nyitott állapotot tartalmaz. Ezt alátámasztja, hogy összehasonlítva az aktin kötés hatását olyan egy-triptofános motor domének relatív fluoreszcencia változásával (Conibear és mtsai, 2004), amelyeknél

valószínűsíthetően nincs az aktin kötésének hatása a triptofán környezetének térszerkezetére, közel akkora amplitúdó figyelhető meg, mint a W239+ esetében tapasztalt. Hőmérsékletugrások kísérletek is azt mutatják, hogy apo állapotban egyetlen térszerkezeti állapota létezik a Switch I régióknak (Málnási-Czizmadia, még nem publikált eredmény), ami az apo kristályszerkezet alapján a nyitott.

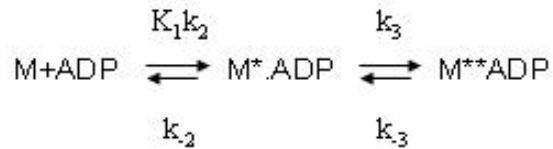
A nukleotid-mentes és ATP-kötött W239+ motor doménnal ellentétben, ADP-kötött állapotban a hőmérséklet változtatásával perturbálható egyensúly mutatható ki a 239-es triptofán fluoreszcens jel alapján. Ennek az egyensúlynak a meglétét hőmérsékletugrások kísérletekkel támasztottuk alá (Málnási-Csizmadia, még nem publikált eredmény). Ebben a kísérletben a W239+ motor domén két ADP kötött konformációs állapota között fennálló egyensúlyt a hőmérséklet eltolásával perturbáltuk, és az új egyensúly kialakulásáig bekövetkező átalakulás a 239-es triptofán fluoreszcencia monitorozásával volt nyomon követhető (26. ábra).



26. ábra: W239+ motor domén hőmérsékletugrások transziensei. Apo és AMP-PMP kötött állapotban egyetlen konformációs állapot figyelhető meg a fluorofór környezetében, mivel a hőmérséklet hirtelen változtatása nem eredményez eltérést a fluoreszcenciában. ADP kötött állapotban a hőmérséklet hirtelen 4°C-os emelésével a fluoreszcenciában exponenciális változás figyelhető meg. Ez két konformációs állapotra, és a közöttük fennálló egyensúly meglétére utal. A transziensek végén megfigyelhető intenzitás változás a küvetta visszahűlésének következménye. Az y tengely minusz egyszerese feleltethető meg a dolgozatban prezentált többi grafikon y tengelyének. Az x tengely logaritmikus időskála. (Málnási-Csizmadia, még nem publikált eredmények.)

Ezek a kísérletek közvetlen bizonyítékot szolgáltatnak arról, hogy az ADP kötött W239+ motor doménban két konformációs állapota létezik a switch I régióknak. Az 5.7 fejezetben leírt

kinetikai mérések, és az előbbieken vázolt hőmérsékletugrásos kísérletek alapján a 27. ábrán vázolt kinetikai séma állítható fel, amelyhez tartozó, 12°C-on mért kinetikai paramétereket 2. táblázat foglalja össze.



$K_1 k_2$	4	$\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	27. ábra: W239+ motor domén ADP kötésének sematikus ábrája, ahol az első reakció a nukleotid kétlépéses indukált illeszkedése, amit a W239+ triptofán jel alapján felderített két ADP állapot között kialakuló egyensúlyi reakció követ. A * az alacsonyabb, ** a magasabb fluoreszcenciájú ADP állapot.
k_2	30	s^{-1}	
k_3+k_{-3}	100	s^{-1}	
K_d	7,6	μM	

2.táblázat: az 27. ábrán bemutatott modell 12°C-on mért kinetikai paramétereit összefoglaló táblázat. $K_1 k_2$ a kötés másodrendű sebességi állandója, k_2 az ADP disszociációs állandója, k_3+k_{-3} a két ADP kötött állapot közötti átalakulás látszólagos sebességi állandója. 12°C-on $k_3=k_{-3}$ mivel $K_3=1$. K_d a disszociációs állandója a W239+ ADP-nek.

Az 27. ábrán az első egyensúlyra vezető lépés az ADP kétlépéses indukált illeszkedésének feleltethető meg (Bagshaw és Trentham, 1974). Az előre mutató reakció az ADP kötés másodrendű sebességi állandójával (Bagshaw ATPáz kinetikai séma szerint k_6/K_7), a visszafelé mutató reakció pedig az ADP disszociáció sebességi állandójával (Bagshaw ATPáz kinetikai séma szerint k_6) jellemezhető. Összehasonlítva más motor domén konstrukciókkal látható, hogy a W239+ motor domén esetében tapasztalt ADP kötés és disszociáció sebessége nagyobb a vad típusnál mért értékeknél (Kuhlman és Bagshaw, 1997, 1. táblázat), viszont az ADP affinitás (K_d) megegyező értéket mutat.

Az ADP kötés során az alacsonyabb fluoreszcenciájú állapot alakul ki először, majd k_3+k_{-3} látszólagos sebességi állandóval jellemezhető sebességgel a magasabb fluoreszcenciájú ADP kötött állapot. Hőmérsékletugrásos kísérletekből tudjuk, hogy 12°C-on 1 az egyensúlyi állandó (K_3) értéke, mivel erre a hőmérsékletre fűtve figyelhető meg a legnagyobb amplitúdójú fluoreszcencia változás. Ekkor az előre és visszairányuló reakció sebessége megegyezik, vagyis $k_3=k_{-3}=50\text{s}^{-1}$, mivel 12°C $k_3+k_{-3}=100\text{s}^{-1}$.

Kinetikai adatokból nagyon veszélyes a szerkezetre utaló következtetéseket levonni. Következésképpen az eltérő 239-es triptofán fluoreszcencia alapján megkülönböztetett, két ADP-kötött switch I konformációs állapot térbeli elhelyezkedéséről sem tudunk biztosat mondani. Amit tudunk, hogy mind a két állapot fluoreszcencia intenzitása eltér az ATP-kötött W239+ motor domén fluoreszcenciájától, ami a triptofán eltérő mikrokönyezetére utal. Elképzelhető, hogy mind a két ADP állapot különbözik a zárt switch I konformációtól, de az is meglehet, hogy az egyik ADP-kötött Switch I konformáció megegyezik az ATP hatására is kialakuló zárt switch I térszerkezeti elrendeződéssel, csak az utóbbinál jelenlévő γ -foszfát a triptofán fluoreszcencia kioltásával módosítja annak intenzitását. Ezt a feltevést támasztja alá az MgADP kötött kristályszerkezet, ahol a switch I zárt konformációban található (Gulick és mtsai, 1997), akárcsak MgATP és MgAMP-PMP kötött állapotban (Bauer és mtsai, 2000, Fisher és mtsai, 1995). Elképzelhető, hogy a kristályosítás során, a két állapot között fennálló egyensúlyt eltolva, a zárt térszerkezet a preferált, de ez nem jelenti azt, hogy oldatban is ez a domináns állapot (Zeng és mtsai, 2004). Hasonló jelenség figyelhető meg a Dictyostelium miozin II switch II térszerkezeténél is ADP.BeFx-kötött állapotban, ahol a kristályosítási körülményeket változtatva zárt és nyitott állapot is kikristályosítható (Holmes és Geeves, 2000), összeegyeztethetően az oldatban megfigyelt konformációkkal (Málnási-Csizmadia és mtsai, 2001).

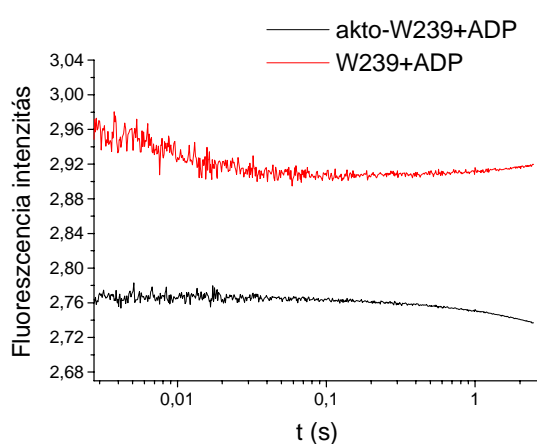
Az is biztosan elmondható, hogy egyik ADP-kötött switch I konformáció sem feleltethető meg az apo és rigor állapotban megfigyelt nyitott szerkezetnek, hiszen a switch I záródása (vagy legalább részleges záródása), annak a nukleotidhoz kapcsolódó kiterjedt kötésrendszerén keresztül (Fisher és mtsai, 1995), elengedhetetlen a nagy affinitással történő nukleotid kötés kialakításához. Ezt támasztják alá azok a megfigyelések is, miszerint az N233A, illetve a S237A motor domén mutánsok alacsony koncentráció mellett egyáltalán nem kötik a mant-ADP fluoreszcens ADP analógot (Shimada és mtsai, 1997), illetve, hogy a miozin V apo kristályszerkezetbe a switch I, és így a nukleotid kötő zseb záródása nélkül az ADP csak kis affinitással kötődik (Coureux és mtsai, 2004). Különböző hőmérsékleten, az egyensúlyt az egyik és a másik ADP állapot felé eltolva, megvizsgáltuk az ADP kötését, és nem tapasztaltunk az ADP affinitás szempontjából számottevő csökkenést.

A képet még az a megfigyelés is kiegészíti, hogy a W242+ motor domén triptofán környezetében csak egyetlen konformációs állapotot sikerült kimutatni, mivel ugyan olyan fluoreszcencia intenzitás-változással reagál ATP és ADP kötésére, valamint egyik nukleotid-kötött állapotban sem sikerült hőmérséklettel perturbálható egyensúlyt, és így több állapot jelenlétét érzékelni.

Ezek a megfigyelések alapján az ATP-, illetve az ADP-kötött switch I térszerkezeti elrendeződésének különbségei, természetesen csak közvetlen szerkezeti bizonyíték hiányában, néhány aminosavra leszűkíthetőek. Elképzeléseim szerint, mind ATP és ADP kötött állapotokban a switch I N-terminális felőli szakasza (233-235) hasonló, vagy teljesen megegyező térszerkezeti elrendezésben, a zárt nukleotid-kötő zsebnek megfelelő, zárt konformációs állapotban egzisztál. Ezen aminosavak közül kiemelkedő jelentőségű a konzervatív R233, amelynek kiterjedt kötésrendszere a nukleotid ribóz, α -, β -, γ - foszfát koordinálásában vesz részt (Fisher és mtsai, 1995, Smith és Rayment, 1996). Ezzel szemben a switch I C-terminális felőli szakasza (236-240) lehet az a rész, ami különböző konformációt vesz fel ADP-t és ATP-t kötve. A két nukleotid közötti, jól ismert különbség a γ -foszfát hiányában és meglétében van, és a switch I ezen szakasza az, amely a γ -foszfát megléte esetén annak elhelyezkedését koordinálja két aminosavon keresztül, amelyek a konzervatív S236-os és S237-es aminosavak (Fisher és mtsai, 1995). A γ -foszfáton kívül ez a két aminosav közvetlenül a nukleotid más részéhez nem kötődik, hovatovább R238-os, F239-es, G240-es aminosavak egyáltalán nem kapcsolódnak a nukleotidhoz.

Ezen ismeretek fényében elmondható, hogy aktin távollétében a switch I nem kétállású kapcsolóként üzemel, hanem ADP kötésekor csak részlegesen csukódik be, és ez az a konformáció, amit a 239-es triptofán fluoreszcencia alapján meg tudunk különböztetni a switch I zárt konformációjától. Ezzel megmagyarázható, hogy miért okoz csak részleges, és lassabb aktin disszociációt az ADP kötése az ATP kötéséhez képest (Kuhlman és Bagshaw, 1998).

Hőmérsékletugrásos kísérletekkel megvizsgáltuk, hogy hogyan befolyásolja a 239-es triptofán által érzékelt, két ADP kötött állapot között fennálló egyensúlyt az aktin kötése (26. ábra).



26. ábra: az ADP kötött W239+ motor domén hőmérsékletugrásos tranziensei aktin jelenében, illetve távollétében. A triptofán fluoreszcencia változásából látható, hogy aktin nélkül a két eltérő fluoreszcenciájú ADP kötött állapot közötti egyensúly perturbálható, míg aktin jelenében a fluoreszcencia jelentős változása nem mutatható ki. Ez arra utal, hogy az aktin kötött motor doménben ez az egyensúly valamelyik irányba teljesen el van tolva. . Az y tengely mínusz egyszerese feleltethető meg a dolgozatban prezentált többi grafikon y tengelyének. Az x tengely logaritmikus időskála. (Málnási-Csizmadia, még nem publikált eredmények.)

Azt tapasztaltuk, hogy az ADP kötött W239+ motor domén hőmérsékletugrásos tranziensei aktin jelenében nem mutatták az aktin távollétében megfigyelt triptofán fluoreszcencia változást. Első közelítésben ez azt jelentheti, hogy az aktin kötése valamelyik irányba teljesen eltolja az aktin hiányában megfigyelt egyensúlyt, és így az akto-miozin-ADP komplexben a switch I a 239-es triptofán által érzékelhetően egyetlen konformációt vesz fel. Kérdéses, hogy a végállapot már a rigor állapotú teljesen nyitott switch I konformáció, vagy az aktin nélküli ADP állapotban megfigyelt, részlegesen nyitott. Összehasonlítva a rigor komplex és az ADP kötött akto-miozin komplex aktin affinitását, a szakirodalmi adatok ellentmondásosak. Saját mérésünk alapján a W239+ motor domén fragmentum aktin affinitása ADP jelenlétében $0,02\mu\text{M}$ -os (nem prezentált eredmény). A vad típusú motor domén fragmentum (M761) rigor komplexének aktin affinitása $0,01\ \mu\text{M}$ -os (Kurzawa és mtsai, 1997), így az ADP hozzávetőlegesen felére csökkenti az aktin affinitást, amely mások által is alátámasztott (Cremo és Geeves, 1998, Ritchie és mtsai, 1993, Conibear és mtsai, 2003). Ezzel szemben más szakirodalmi adatok szerint ez az arány jóval nagyobb (Kuhlman és Bagshaw, 1997, Bobkov és mtsai, 1997, Nyitrai és Geeves, 2004). A termodinamikai kapcsoltság értelmében amennyire az ADP gyengíti a miozin aktin affinitását, annyira gyengíti az aktin az ADP-ét (Nyitrai és Geeves, 2004). Ezek szerint, ha az aktin csak kétszeresen gyengíti a motor domén ADP affinitását, akkor elképzelhető, hogy az általunk kimutatott valamelyik ADP-kötött switch I konformáció létezik az ADP-kötött akto-miozin komplexben is. Ugyanis 12°C -on aktin nélkül a W239+ ADP affinitása $7,6\mu\text{M}$ és tudjuk, hogy ezen a hőmérsékleten $K_3=1$. Ebből $7,6\mu\text{M}=(K_D+K_{AD})/2$, illetve a termodinamikai kapcsoltsági arányból $K_{AD}/K_D=2$. A két egyenletet megoldva $K_D=5\mu\text{M}$ és $K_{AD}=10\mu\text{M}$. Ez azt jelenti, hogyha aktin távollétében különböző hőmérsékleten megmérjük a motor domén ADP affinitását, és ennek megfelelő értékeket kapunk, akkor a feltevés igaz lehet. Ha termodinamikai kapcsoltsági arány ennél jóval nagyobb, akkor aktin távollétében a motor domén ADP affinitás hőmérsékletfüggésének is nagyobbak kell lennie. Előzetes mérések ezt nem igazolják. Ez azt jelenti, hogy nagyobb termodinamikai kapcsoltsági arány esetén az ADP kötött akto-miozin komplexben az általunk aktin távollétében megfigyelt ADP kötött switch I konformáció nem alakul ki. Ennek pontos meghatározása további méréseket igényel. Az ADP felszabadulás sebességének drasztikus hőmérsékletfüggését nyúl vázizom esetében megfigyelték (Bagshaw és Trentham, 1974).

A miozin család más tagjainál, bizonyított, hogy létezik olyan állapot, ami erősen köti az ADP-t és az aktint is (Nyitrai és Geeves, 2004, De La Cruz és mtsai, 1999). A switch I részlegesen nyitott konformációja jó magyarázattal szolgálhatna ezen megfigyelés szerkezeti megoldásaként.

7 Összefoglalás

Régóta ismert, hogy az ATP kötődése az akto-miozin komplexhez az aktin disszociációját okozza, míg az aktin kötése az ADP és a foszfát felszabadulását gyorsítja. Ennek ellenére csak a közelmúltban láttak napvilágot azok a motor domén szerkezetek, amelyek felfedték az ATP kötő zseb és az aktin kötő árok között fennálló kommunikációs csatornát, és megmagyarázhatóvá tették a nukleotid és az aktin affinitás közötti ellentétes kapcsolatot. Mivel a szerkezetek csak egy statikus képet szolgáltatnak, ezért a különböző állapotok közötti átalakulások csak feltételezésen alapulhatnak. Spektroszkópiai vizsgálataink során olyan egy-triptofános motor domén konstrukciókat használtunk, amelyek fluoreszcencia változásai alkalmasak a szerkezetek által felvázolt állapotváltozások nyomon követésére, és ezzel dinamikus képet próbáltunk alkotni a kérdéses folyamatról, annak jobb megértése érdekében.

Ezek alapján elmondható, hogy gyorskinetikai módszerrel láthatóvá tettük a switch I régió „nyitott-zárt” konformáció váltását, és igazoltuk, hogy az apo állapotú motor domén ATP kötésekor bekövetkező, az ATP által indukált térszerkezeti átrendeződésről van szó. Elsőként bizonyítottuk oldatban, hogy a nukleotid kötő zseb e térszerkezeti átalakulása kontrolálja az aktin leválását a miozinról, és ezzel alátámasztottuk a kristályszerkezetek alapján felállított hipotézist. Igazoltuk, hogy az apo motor doménben a switch I régió egyetlen állapota a nyitott konformáció, és ez megegyezik a rigor komplexben kialakuló térszerkezetével. Ha valóban igaz, hogy a switch I régió nyitott-zárt térszerkezeti átalakulás felelős a motor domén aktin affinitásának drasztikus csökkenéséért, akkor miért okoz az ATP és az ADP eltérő mértékű aktin disszociációt, holott mind a két nukleotid kötött kristályszerkezetben a switch I ugyan olyan, zárt konformációt vesz fel. Vizsgálataink során sikerült feloldani a szerkezetek okozta ellentmondást, mivelhogy ADP-kötött állapotban triptofán szenzorunk által megkülönböztethető, két térszerkezeti állapotát érzékeltük a switch I régióknak, melyek kialakulását gyorskinetikai módszerekkel karakterizáltuk.

A munka korántsem ért véget, hiszen kérdéses, hogy a switch I eddig ismeretlen konformációja integrálható-e valódi köztitermékként az aktin aktivált ATP-áz ciklusba. Külön öröm, hogy ADP kötött állapotban a switch I régióba elhelyezett szenzorunk érzékeli a Mg ion jelenlétét, ami további izgalmas kísérletek lehetőségét vetíti előre.

Summary

It has long been known that ATP binding to the acto-myosin complex causes the dissociation of actin, while the actin binding speeds up the release of ADP and phosphate. Regardless of this, the motor domain structures which revealed the communication pathway between the nucleotide-binding pocket and the actin-binding cleft and defined the antagonistic correlation between the affinity of actin and nucleotide have only been discovered in the recent past. As the structures provide only a static picture, the transition between states rest on mere assumptions. For spectroscopical experiments we used such single-tryptophan motor domain constructions, which had suitable fluorescence changes for the monitoring of the conformational changes predicted by the structures, and we tried to form a dynamic picture for the better understanding of the process.

On the basis of this we could visualize the open – closed transition of switch I by means of transition kinetics and we could demonstrate that it is an ATP induced conformational change which exists during the ATP binding of the nucleotide-free motor domain. First we proved in solution that this conformational change of the nucleotide binding pocket controls the dissociation of acto-myosin thus being able to support the hypothesis based on crystal-structures. We demonstrated that the switch I of apo motor domain has only open conformation, which is the same in the rigor complex. If it is indeed true that the open-closed transition of switch I is responsible of the drastic decrease in the actin affinity of the motor domain, then why do ATP and ADP cause different levels of actin dissociation, although the switch I conformation is the same in both nucleotide-bound crystal structures. Our research offered a solution to the contradiction between the structures as our tryptophane sensor identified two conformational states of the switch I in the ADP-bound motor domain.

The work is far from being finished as the question that the yet unobserved conformation of switch I can be integrated as a real intermediate in the actin-activated ATP-ase is still open. Predicting further exciting experiments our sensor engineered into switch I senses the presence of Mg ion in the ADP-bound motor domain.

8 Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Málnási-Csizmadia Andrásnak, hogy felvett magához és tanulhatok tőle illetve, hogy mély hallgatással elviseli mikor balgaságot beszélek. Prof Gráf Lászlónak és a Biokémia Tanszék valamennyi tanárának az elméleti és gyakorlati okításokért.

Gyimesi Máténak, Hnisz Dénesnek és Jelinek Balázsnak a rengeteg gyakorlati tanácsért.

És végül, de nem utolsó sorban köszönöm családomnak a kitartó támogatást.

9 Rövidítés jegyzék

ADP adenosin 5'-difoszfát
ADPBeF_x berilliumfluorid-adenosin5'-difoszfát
ADP.Vi vanadát-adenosin5'-difoszfát
ADP.AlF₄ alumínium fluorid-adenosin5'-difoszfát
AMP.PMP adenosin 5'-β,γ-imidotrifoszfát
APS ammónium perszulfát
ATP adenosin5'-trifoszfát
BSA bovine serum albumin
EDTA etiléndiamintetraecetsav
EGTA etilénlikol-bis(2-aminoetiléter)-NNN'N'-tetraecetsav
DMSO dimetilszulfoxid
DTT ditiotritol
k_{obs} látszólagos sebességi állandó
KAc káliumacetát
M miozin
MgAc magnéziumacetát
NATA N-acetil-L-triptofánamid
NTA nitrilo-trieecetsav
PMSF fenilmetilszulfonil-fluorid
SDS sódiium dodecil szulfát
TAE Tris, acetát, EDTA
TE Tris, acetát
TEMED n,n,n,n-tetrametiletiléndiamid
TPCK N-tosil-l-fenilalanin-clorometil-ke-ton
TLCK N-tozil-L-lizin-clorometil-ke-ton

10 Irodalomjegyzék

- Bagshaw, C. R. & Trentham, D. R. 1974 The characterization of myosin-product complexes and of product-release steps during the magnesium ion-dependent adenosine triphosphatase reaction. *Biochem J* **141**, 331-349.
- Bauer, C. B., Holden, H. M., Thoden, J. B., Smith, R. & Rayment, I. 2000 X-ray structures of the apo and MgATP-bound states of Dictyostelium discoideum myosin motor domain. *J Biol Chem* **275**, 38494-38499.
- Bálint, M., Sreter, F. A., Wolf, I., Nagy, B., and Gergely, J.: 1975 The substructure of heavy meromyosin. The effect of Ca²⁺ and Mg²⁺ on the tryptic fragmentation of heavy meromyosin. *J Biol. Chem.* **250**, 6168
- Bobkov, A. A., Sutoh, K., Reisler, E. 1997 Nucleotide and actin binding properties of the isolated motor domain from Dictyostelium discoideum myosin. *J. Muscle Res. Cell Motil.***18**, 563-571
- Conibear, P. B., Bagshaw, C. R., Fajer, P. G., Kovacs, M. & Malnasi-Csizmadia, A. 2003 Myosin cleft movement and its coupling to actomyosin dissociation. *Nat Struct Biol* **10**, 831-835.
- Conibear, P. B., Malnasi-Csizmadia, A., Bagshaw, C. R., 2004 The effect of F-actin on the relay helix position of myosin II, as revealed by tryptophan fluorescence, and its implications for mechanochemical coupling *Biochem.* **43**, 15404-15417
- Coureux, P. D., Sweeney, H. L. & Houdusse, A. 2004 Three myosin V structures delineate essential features of chemo-mechanical transduction. *The Embo journal* 2004, 1-11
- Cremonese, C. R., and Geeves, M. A., 1998 Interaction of actin and ADP with the head domain of smooth muscle myosin: implications for strain-dependent ADP release in smooth muscle. *Biochem.* **37**, 1969-1978
- Egelhoff, T. T., Titus, M. A., Manstein, D. J., Ruppel, K. M., Spudich, J. A., 1991 Molecular genetic tools for study of the cytoskeleton in Dictyostelium. *Meth. In Enzym.* **196**, 319-330
- Fisher, A. J., Smith, C. A., Thoden, J. B., Smith, R., Sutoh, K., Holden, H. M. & Rayment, I. 1995 X-ray structures of the myosin motor domain of Dictyostelium discoideum complexed with MgADP.BeFx and MgADP.AIF₄. *Biochemistry* **34**, 8960-8972.
- Geeves, M. A. & Holmes, K. C. 1999 Structural mechanism of muscle contraction. *Annu Rev Biochem* **68**, 687-728.

- Gulick, A. M., Bauer, C. B., Thoden, J. B. & Rayment, I. 1997 X-ray structures of the MgADP, MgATP γ S, and MgAMPPNP complexes of the Dictyostelium discoideum myosin motor domain. *Biochemistry* **36**, 11619-11628.
- Holmes, K. C., Angert, I., Kull, F. J., Jahn, W. & Schroder, R. R. 2003 Electron cryo-microscopy shows how strong binding of myosin to actin releases nucleotide. *Nature* **425**, 423-427.
- Holmes, K. C. & Geeves, M. A. 2000 The structural basis of muscle contraction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **355**, 419-431.
- Kovacs, M., Malnasi-Csizmadia, A., Woolley, R. J. & Bagshaw, C. R. 2002 Analysis of Nucleotide Binding to Dictyostelium Myosin II Motor Domains Containing a Single Tryptophan Near the Active Site. *J. Biol. Chem.* **277**, 28459-28467.
- Kuhlman, P. A. & Bagshaw, C. R. 1998 ATPase kinetics of the Dictyostelium discoideum myosin II motor domain. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **19**, 491-504.
- Kurzawa, S. E., Manstein, D. J. & Geeves, M. A. 1997 Dictyostelium discoideum myosin II: characterization of functional myosin motor fragments. *Biochemistry* **36**, 317-323.
- Leiting, B., Lindner, I. J., Noegel, A. A., 1990 The extrachromosomal replication of Dictyostelium plasmid Ddp2 requires a cis-Acting element and a plasmid-encoded trans-acting factor. *Mol. And Cel. Biol.* 3727-3736
- Lynn, R. W. & Taylor, E. W. 1971 Mechanism of adenosine triphosphate hydrolysis by actomyosin. *Biochemistry* **10**, 4617-4624.
- Malnasi-Csizmadia, A., Pearson, D. S., Kovacs, M., Woolley, R. J., Geeves, M. A. & Bagshaw, C. R. 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**, 12727-12737.
- Malnasi-Csizmadia, A., Woolley, R. J. & Bagshaw, C. R. 2000 Resolution of conformational states of Dictyostelium myosin II motor domain using tryptophan (W501) mutants: Implications for the open-closed transition identified by crystallography. *Biochemistry* **39**, 16135-16146.
- Manstein, D. J., Ruppel, K. M., Spudich, J. A., 1989 Expression and characterization of functional myosin head fragment in dictyostelium discoideum. *Science* **246**, 656-658
- Manstein, D. J., Hunt, D. M., 1995 Overexpression of myosin motor domains in Dictyostelium: screening of transformants and purification of the affinity tagged protein. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **16**, 325-332

- Manstein, D. J., Schuster, H. P., Morandini, P., Hunt, D. M., 1995 Cloning vectors for the production of proteins in *Dictyostelium discoideum*. *Gene*, **162**, 129-134
- Nyitrai, M., and Geeves M. A., 2004 *Phil. Trans. R. Soc. B* **359**, 1867-1877
- Rayment, I., Holden, H. M., Whittaker, M., Yohn, C. B., Lorenz, M., Holmes, K. C. & Milligan, R. A. 1993 Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. *Science* **261**, 58-65.
- Reubold, T. F., Eschenburg, S., Becker, A., Kull, F. J. & Manstein, D. J. 2003 A structural model for actin-induced nucleotide release in myosin. *Nat Struct Biol* **10**, 826-830.
- Ritchie, M. D., Geeves, M. A., Woodward, S. K. & Manstein, D. J. 1993 Kinetic characterization of a cytoplasmic myosin motor domain expressed in *Dictyostelium discoideum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 8619-8623.
- Shimada, T., Sasaki, N., Ohkura, R. & Sutoh, K. 1997 Alanine scanning mutagenesis of the switch I region in the ATPase site of *Dictyostelium discoideum* myosin II. *Biochemistry* **36**, 14037-14043.
- Smith, C. A. & 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**, 5404-5417.
- Wakelin, S., Conibear, P. B., Woolley, R. J., Floyd, D. N., Bagshaw, C. R., M., K. & Malnasi-Csizmadia, A. 2002 Engineering *Dictyostelium discoideum* myosin II for the introduction of site-specific probes. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **24**, 673-683.