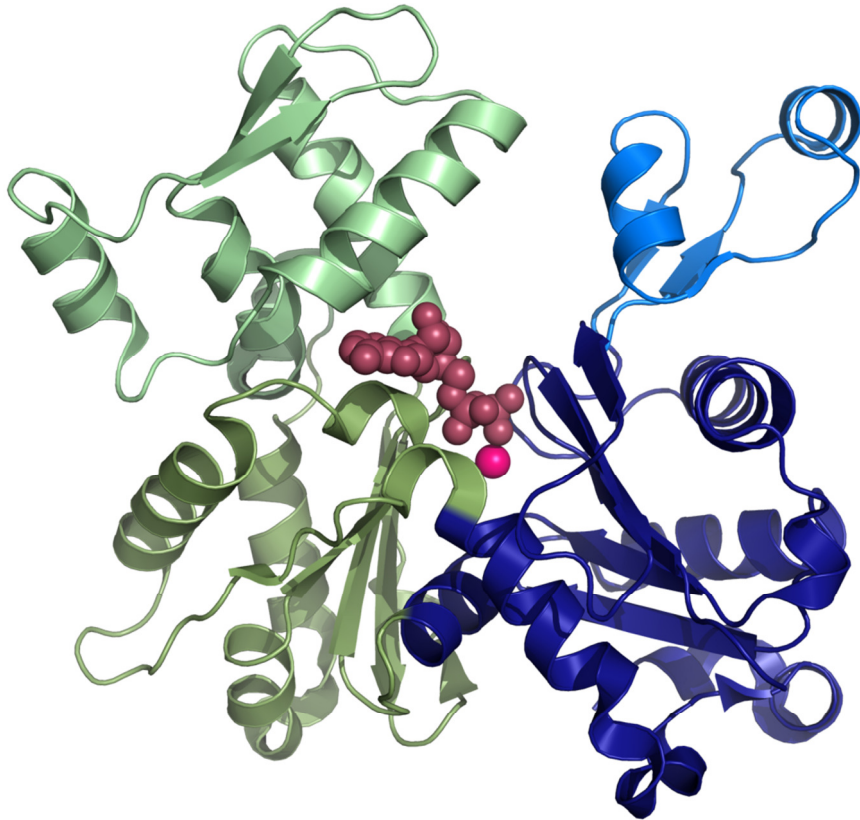


Ph.D. ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Aktin kötő fehérjék hatása az aktin monomer
struktúrájára és konformációs dinamikájára



Kardos Roland

Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Biofizikai Intézet

Pécs, 2014

Aktin kötő fehérjék hatása az aktin monomer struktúrájára és konformációs dinamikájára

Kardos Roland

Témavezető: Dr. Hild Gábor

Doktori Iskola: Interdisciplinary Medical Science D93

Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Sümegi Balázs

Program: Funkcionális fehérje dinamika vizsgálata
biofizikai módszerekkel (B-130)

Program Vezető: Prof. Dr. Nyitrai Miklós



Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Biofizikai Intézet

Pécs, 2014

Bevezetés

Aktin a legnagyobb mennyiségben előforduló fehérje ami minden eukariota organizmusban megtalálható a növényektől az állatokig. Az aktin azon tulajdonsága, hogy reverzibilis módon képes filamentumokat képezni alkalmassá teszi, hogy nélkülözhetetlen szerepet játsszon különböző celluláris folyamatokban, mint például sejt mozgás, morfogenezis, membrán transzport, és sejt osztódás. Ahhoz, hogy ezt a sokféle funkciót megfelelően hajtsa végre a térbeli és időbeli szerveződése a különböző aktin hálózatoknak aktinkötő fehérjék segítségével kontrolált. Ezek az effektorok lebontják a szükségtelenné vált „előregedett” aktin hálózatokat és segítenek különböző architektúrával rendelkező hálózatok felépítésében attól függően, hogy mire van szüksége a sejtnek. Ahhoz, hogy megértsük az aktin alapú celluláris folyamatokat szükséges megvizsgálnunk milyen konformációs és dinamikai változások lépnek fel az aktin molekulán belül az aktin kötő fehérjék hatására.

Aktin egy ATPáz aktivitással rendelkező fehérje, ami hasonló háromdimenziós struktúrával rendelkezik, mint például a hexokinázok, glicerolkinázok, Hsp70 fehérjék. Az aktin atomi szerkezete alapján két fődoménből áll, melyek „nagy” és „kis” doménnek nevezünk. A fődomének tovább oszthatók aldoménekre; a nagy domén a 3-as és 4-es aldoménből áll, míg a kis domén az 1-es és a 2-es aldoménből. Az ATP kötő zseb a két fődomén között található a molekula központi részén.

Az aktin monomerek megfelelő kondíciók mellett képesek egymással összekapcsolódni és egy kétszálú hélixet létrehozni, amit aktin filamentumnak (F-aktin) nevezünk. Az aktin monomerek aszimmetrikus természete miatt, az F-aktin szerkezeti polaritással rendelkezik. Miozinnal dekorált aktin filamentumok elektronmikroszkópos képe alapján az egyik véget szakállas, míg a másikat hegyes végnek nevezzük.

Az aktin polimerizációja 2-4 aktin monomert tartalmazó aktin nukleuszok kialakulásával kezdődik. Az aktin polimerizáció nukleációs lépés termodinamikai szempontból kedvezőtlen, az aktin dimerek és trimerek instabil természete miatt. A nukleuszok kialakulása után a két vég különböző kinetikával hosszabbodni kezd. A szakállas vég gyorsan nő (gyorsan növekvő vég, + vég) míg a hegyes vég lassan hosszabbodik (lassan növekvő vég, - vég). A filamentumok növekedése addig tart, amíg ki nem alakul egy dinamikus egyensúly az aktin monomerek és filamentumok között. A dinamikus egyensúly körülbelül 0,14 μM aktin monomer folyamatos jelenlétét eredményezi az oldatban. Ez a steady-state

koncentrációja az aktin monomereknek (C_{SS}) valamivel nagyobb, mint a szakállas véghez tartozó kritikus koncentráció ($C_{KSZ}=0.12 \mu M$), és jóval alacsonyabb, mint a hegyes véghez tartozó kritikus koncentráció értéke ($C_{KH}=0.62 \mu M$). A kritikus koncentráció arra az aktin monomer koncentrációra utal, ami fellett az aktin monomerek beépülhetnek az aktin filamentumba. Az aktin monomerek és aktin filamentumok közti stoichiometria következtében az aktin monomerek beépülése a filamentumba a szakállas végen ($C_{SS}>C_{KSZ}$), míg az aktin monomerek leválása a hegyes végen ($C_{SS}<C_{KH}$) dominál. Az aktin monomerek folyamatos mozgása a filamentum szakállas végétől a hegyes vég irányába az aktin filamentumok „treadmilling”-jének nevezzük. Ez az egyirányú növekedése az aktin filamentumoknak szolgáltatja a toló erőt a sejt membránnal szemben, az aktin alapú sejtmozgások esetében.

Az aktin, monomer formában nagyon gyenge ATPáz aktivitással rendelkezik, de miután beépül a filamentumba a kötött ATP elhidrolizál ADP+Pi-re néhány másodperc után. Ezt követően a szerves foszfát 6 perces felezési idővel felszabadul a filamentumból ami ADP-t tartalmazó aktin egységek megjelenéséhez vezet. A disszociáló ADP-t tartalmazó aktin monomereknek át kell menniük egy nukleotid kicserélődési folyamaton mielőtt újból beépülnek a filamentumba. Az ADP kicserélődése ATP-re spontán lejátszódik a sejtekben, amit bizonyos aktin kötő fehérjék mint például profilin, kofilin, cikláz asszociált fehérje, és twinfilin képes befolyásolni.

Az ADP kicserélődése ATP-re egy fontos folyamat, mivel az ADP-t tartalmazó aktin monomereknek gyengébb a polimerizációs képességük, mint az ATP-t kötő monomereknek. Emellett az ADP-t tartalmazó aktin monomerekből felépülő aktin filamentumok jobban ki vannak téve a filament szétesését elősegítő aktin filamentum kötő fehérjék aktivitásának, mivel ezek a fehérjék (pl. kofilin, Aip1) jobban kötődnek az ADP-t tartalmazó filamentum szegmensekhez.

A profilin fehérje családba tartozó fehérjék nagy része képes a nukleotid kicserélődés folyamatát elősegíteni. Az egyik meghatározott atomi struktúrája a profilin-aktin komplexnek a nukleotidkötő zseb szélesen nyitott konformációs állapotát mutatja. Az aktin molekula, ezen konformációja lehetővé teszi a nukleotid gyors mozgását az aktin molekula és az oldószer között. A twinfilin ADF-homológ doménjének aktinnal alkotott komplexének atomi szerkezete szintén alátámasztani látszik a nukleotidkötő zseb és a nukleotid kicserélődés folyamatának kinetikája közti kapcsolatot. Ebben a szerkezetben az aktin molekula nukleotid kötő zsebe egy zárt konformációs állapotban látható, ami összhangban

van azzal a megfigyeléssel, hogy az ADF-homológ domént tartalmazó fehérjék gátolják a nukleotid kicserélődést az aktin monomeren.

ADF/kofilin fehérje család

Az ADF/kofilin fehérje család tagjai kis (13-19 kDa) aktinkötő fehérjék melyek 1 (pl. koaktozin, kofilin, GMF) vagy 2 (pl. twinfilin) karakterisztikus ADF/kofilin (AC domén) domént tartalmaznak. Az aktin monomerral 1:1 arányú komplexet alkotnak és képesek az aktin filamentumokhoz is kötni. Az élő sejtekben a kofilin főfunkciója az aktin filamentumok treadmillingjének az elősegítése az aktin citoskeleton dinamikus átrendeződő részein. Számos mechanizmuson keresztül képes a kofilin ezt a funkciót ellátni. Az aktin filamentumok hegyes végén elősegítik az aktin monomerek leválását, aktin filamentum hasító tulajdonságuk segítségével az előregedett aktin hálózatokat szétszedik, és bizonyos körülmények között az aktin filamentumok polimerizációjának nukleációs szakaszában stabilizálják az aktin dimereket. Másrészt a lebontott aktin struktúrák építő egységein gátolják az ADP kicserélődését ATP-re, ami lassítja az aktin monomerek beépülését az aktin filamentumok gyorsan növekvő szakállas végén.

Profilin fehérje család

A profilin egy kis (19 kDa) aktinkötő fehérje, ami széles körben előfordul minden eukarióta organizmusban a növényektől az állatokig. A profilin főfunkciója egy polimerizációra képes aktin monomer raktár fenntartása a sejtek citoplazmájában, ami szükség esetén gyorsan felhasználható új aktin struktúrák felépítésére. Ezt a feladatot a profilin az aktinnal kapcsolatos különböző funkciói révén hajtja végre. A legtöbb profilin izoforma elősegíti az ADP kicserélődését ATP-re, ami egy polimerizáció kompetens aktin monomer raktár feltöltéséhez vezet. Az ATP-t kötő aktin monomerek profilinnal alkotott komplexei nem képesek új filamentumok kialakítására, de képesek effektív módon beépülni a már létező aktin filamentumok szakállas végén. A profilin ezen effektusai az ATP-vel feltöltött aktin monomereket az aktin filamentumok gyorsan növekvő végei felé hajtja.

Célkitűzések

A tézisben leírt kísérletes munka főcélja volt meghatározni azokat a konformációs és dinamikai változásokat az aktin molekula szerkezetén belül, ami a kofilin és profilin fehérje család nukleotid kicserélődésre kifejtett hatását magyarázza. A kofilin és profilin fehérje család legtöbb tagjának ellentétes hatása van az aktin monomeren lejátszódó nukleotid kicserélődés folyamatára, és feltételezhetően az aktin nukleotidkötő zsebének konformációjára is. Ezenfelül szeretnénk volna kideríteni, hogy az aktin kis doménjének konformációs dinamikája, mennyiben járul hozzá a nukleotid kicserélődés folyamatához.

A következő kérdésekre kerestük a választ:

- 1.) Hogyan képes befolyásolni az élesztő kofilin és profilin a nukleotid kicserélődés folyamatát α -szkeletál aktin monomeren?*
- 2.) Milyen konformációs változások történnek az ATP-t kötő aktin monomer nukleotid kötő zsebében élesztő kofilin és profilin hatására?*
- 3.) Hogyan befolyásolja az élesztő kofilin és profilin az aktin kis doménjének szerkezetét és konformációs dinamikáját?*
- 4.) Milyen kapcsolat áll fenn az aktin monomer hő stabilitása és a nukleotid kötő zseb konformációja között?*

Kísérleti és preparatív eljárások

Fehérje preparálás

A szkeletális aktint tartalmazó szárított izom forgácsot nyúl vázizomból preparáltuk Feuer és kollégáinak protokollja alapján. Az aktin monomereket szárított izom forgácsból vontuk ki Spudich és Watt protokollja szerint. GST-jelölt élesztő kofilin és His-jelölt élesztő profilin túltermeltetését BL21 (DE3) E. coli törzsből végeztük. A baktérium lizátumban jelenlévő kofilin molekulákat Glutathion-agaróz gyöngyök felszínére kötöttük ki, majd tovább tisztítottuk méret kizárásos kromatográfia segítségével. A baktérium lizátumból a megtermeltetett profilin molekulákat Nikkel-NTA gyöngyök segítségével vontuk ki, majd méret kizárásos kromatográfia segítségével tovább tisztítottuk.

Nukleotid kicserélődés kinetikájának vizsgálata

A nukleotid kicserélődés kinetikáját fluoreszcens ATP analóggal (ϵ -ATP) jelölt aktin monomereken vizsgáltuk egy Applied Photophysics SX.18MV-R megállított áramlású fluoriméter segítségével vizsgáltuk. Az ϵ -ATP disszociációját nagy feleslegben (1 mM) nem fluoreszcens ATP oldat aktin mintákkal való összekeverésével értük el. Az aktinhoz kötött ϵ -ATP-nek nagyobb a fluoreszcencia intenzitása, mint az oldatban szabadon lévő ϵ -ATP-é, ezért a nukleotid kicserélődés folyamata vizsgálható a fluoreszcencia intenzitás csökkenésének nyomon követésével, miután az ϵ -ATP-vel jelölt aktin mintát összekeverjük nem fluoreszcens ATP-vel. A kicserélődés kinetikáját jellemző, megfigyelt sebességi állandókat, a fluoreszcencia görbék exponenciális függvény illesztésével kaptuk.

Fluoreszcencia kioltása ϵ -ATP jelölt aktinnak

A fluoreszcencia intenzitását az ϵ -ATP jelölt aktinnak aktinkötő fehérjék hiányában és jelenlétében akrilammal (neutrális kioltó) oltottuk ki. A fluoreszcencia intenzitás egy termosztálható küvettatartóval rendelkező Perkin-Elmer LS50B spektrofluoriméter segítségével mértük. Az akrilamid koncentráció (Q) függvényében mért intenzitás értékek Stern-Volmer ábrázolását a Stern-Volmer egyenlet egy módosított formájával elemeztük ki:

$$\frac{F_0}{F} = \left(\sum_{i=1}^n \frac{\alpha_i}{(1 + K_{SV_Si}[Q])(1 + K_{SV_Di}[Q])} \right)^{-1}$$

ahol az F_0 a fluoreszcencia intenzitás a kioltó molekula hiányában, míg az F a kioltó jelenlétében mért fluoreszcencia intenzitást jelenti. A K_{SV_Si} és K_{SV_Di} az i -edik fluorofor populáció statikus és dinamikus komponensét jelenti, míg az α_i az i -edik fluorofor populáció frakciójára utal.

Fluoreszcencia rezonancia Energia transzfer (FRET)

FRET kísérleteket szintén egy termosztálható küvetttartóval rendelkező Perkin-Elmer LS50B spektrofluoriméter segítségével végeztük el. A Cys374-hez (1.-es aldomén) konjugált donor fluorofor (IAEDANS) és az akceptor fluoroforral (FITC) jelölt Lys61 (2.-es aldomén) közti energia transzfer hatásfokát a következő egyenlet szerint számoltuk:

$$E = \left[1 - \left(\frac{F_{DA}}{F_D} \cdot \frac{c_D}{c_{DA}} \right) \right] / \beta$$

ahol F_{DA} a donor fluorofor mért intenzitása az akceptor molekula jelenlétében, míg az F_D a donor fluorofor mért intenzitását jelenti az akceptor molekula hiányában. A β az akceptor fluorofor jelölési arányára utal, míg a c_{DA} és c_D a donor fluorofor koncentrációját jelenti az akceptor fluorofor jelenlétében és hiányában.

A fluoreszcensen jelölt pontok közti fehérje mátrix flexibilitása a hőmérséklet függvényében (5 °C és 35 °C között) a flexibilitási faktor kiszámolásával határoztuk meg a következő összefüggés alapján:

$$f' = E/F_{DA}$$

Anizotrópia lecsengés

Az időfüggő fluoreszcencia anizotrópia méréseket egy egyedi foton számláló üzemmódban működő Horiba Jobin-Yvon Nanolog spektrofluoriméter segítségével kiviteleztük. A vertikális síkban polarizált gerjesztő nyaláb által kiváltott fluoreszcencia emissziót párhuzamos (I_{VV}) és merőleges (I_{VH}) polarizációs síkban detektáltuk. A fehérje komplexek és

a fluoreszcens jelölő molekula rotációs diffúzióját karakterizáló rotációs korrelációs időket (θ) a párhuzamos és merőleges elrendezésben felvett fluoreszcencia lecsengésekből határoztuk meg a következő egyenletek segítségével:

$$I_{VH}(t) = G \int_{-\infty}^t IRF_{VH}(t') \frac{1}{3} \sum_{i=1}^n \alpha_i e^{-\frac{t-t'}{\tau_i}} \left[1 + 2(R_{INF} + \sum_{j=1}^m \beta_j e^{-\frac{t-t'}{\theta_j}}) \right] dt'$$

$$I_{VV}(t) = G \int_{-\infty}^t IRF_{VV}(t') \frac{1}{3} \sum_{i=1}^n \alpha_i e^{-\frac{t-t'}{\tau_i}} \left[1 + 2(R_{INF} + \sum_{j=1}^m \beta_j e^{-\frac{t-t'}{\theta_j}}) \right] dt'$$

ahol θ_j a rotációs korrelációs ideje a j-edik komponensnek és β_j a j-dik komponens hozzájárulása az anizotrópia lecsengés folyamatához. G (geometriai faktor) a detektáló rendszer érzékenységének aránya a vertikálisan és horizontálisan polarizált fényre vonatkozóan. R_{INF} a maradék anizotrópia, τ_i az i-dik komponens élettartama, míg α_i az i-dik élettartam komponens amplitúdója.

A fluoreszcens riporter molekula mozgásának térbeli korlátozottságát karakterizáló félkúp szöget (θ_0) a következő képlet segítségével számoltuk:

$$\frac{r_G}{r_0} = \left[\frac{1}{2} \cos \theta_0 (1 + \cos \theta_0) \right]^2$$

ahol r_G a fehérje teljes mozgásához tartozó amplitúdó, míg r_0 a nulla időpillanatban mért anizotrópiát jelenti.

Differenciáló pásztázó kalorimetria (DSC)

A DSC méréseket egy Setaram Micro DSC III kaloriméter segítségével végeztük el. A hőáram-hőmérséklet görbéket $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ és $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ között, 0.7 atm nyomás alatt és 0.3K/min felfűtési sebesség mellett regisztráltuk. Ahhoz, hogy eldöntsük milyen a hő denaturáció természete (reverzibilis vagy irreverzibilis) a mintákat kétszer fűtöttük fel. A fehérjék olvadási hőmérsékletét és fél maximumhoz tartozó szélesség értékét a hő tranzíciós görbékre illesztett Gauss függvény segítségével határoztuk meg. Az entalpia változást, a hőáram-idő görbék alatti terület integráljából számoltuk.

Eredmények és megbeszélés

Kofilin és profilin hatása a nukleotid kicserélődés folyamatára

Ahhoz hogy meghatározzuk, hogy a kofilin és profilin hogyan képes módosítani a nukleotid kicserélődés folyamatát, tranziens kinetikai méréseket végeztünk fluoreszcens ATP analóggal jelölt aktin monomereken. A nukleotid kicserélődést vizsgáló kísérletek azt mutatták, hogy a kofilinnak és profilinnak ellentétes hatása van a nukleotid kicserélődés kinetikájára. A mi kísérleti elrendezésünkben a megfigyelt sebességi állandó $0,012 \text{ s}^{-1}$ volt az aktinkötő fehérjék hiányában. Élesztő kofilin jelenlétében a megfigyelt sebességi állandó $0,002 \text{ s}^{-1}$ -re csökkent le, miközben az élesztő profilin $0,75 \text{ s}^{-1}$ -re növelte a megfigyelt sebességi állandó értékét. Az eredmények alapján az élesztő kofilin gátolja és az élesztő profilin elősegíti a nukleotid kicserélődés folyamatát hasonlóan a kofilin és profilin fehérje család tipikus tagjaihoz.

A nukleotidkötő zseb konformációja

A lehetséges konformációs változások, amik a módosított nukleotid kicserélődéshez vezetnek fluoreszcencia kioltásos kísérletekkel volt vizsgálva. Az aktinhoz kötött ATP egy fluoreszcens ATP analógra volt kicserélve és annak hozzáférhetősége akrilammal mint neutrális kioltóval volt vizsgálva. A kioltás folyamata komplex volt a szabad és a kötött ϵ -ATP miatt ezért a steady-state kioltásos kísérletekben kapott mérési adatok a Stern-Volmer egyenlet egy módosított formájával értékeltük ki.

Az időfüggő fluoreszcencia kioltásos kísérletek megmutatták, hogy a szabad ϵ -ATP kizárólag dinamikus, míg az aktin kötött ϵ -ATP kizárólag statikus folyamatban képes kioltódni. Továbbá ezek a mérések megmutatták, hogy sem a kofilin sem a profilin nem változtatja meg a kötött ϵ -ATP élettartamát, utalva arra, hogy ezek az aktinkötő fehérjék nem módosítják a nukleotidot aktinhoz kötő hidrogén hálózatot.

A Stern-Volmer állandó (K_{SV}), ami karakterizálja a nukleotidkötő zsebben található ϵ -ATP hozzáférhetőségét, $0,24 \text{ M}^{-1}$ volt. Ez az érték két nagyságrenddel kisebb, mint a szabad ϵ -ATP-re kapott K_{SV} utalva arra, hogy az aktinhoz kötött nukleotid védve van a körülötte lévő fehérje mátrix által. Ez az eredmény összhangban van az aktin atomi struktúrájával, ami alapján a kötött nukleotid mélyen be van ágyazva a molekula központi részén. A kofilin a K_{SV} -t lecsökkentette $0,034 \text{ M}^{-1}$ -re indikálva egy kevésbé hozzáférhető környezetet a fluorofor

körül. Ezzel ellentétben, profilin $3,5 \text{ M}^{-1}$ -re növelte a K_{SV} értékét, ami egy hozzáférhetőbb környezetre utal a fluorofor körül. Ezek az eredmények a kofilin-aktin komplex esetében a nukleotidkötő zseb zárt, míg a profilin-aktin esetében egy nyitott konformációs állapotát indikálják.

Kofilin és profilin hatása az aktin kis doménjának konformációjára és dinamikájára

Abból a célból, hogy felmérjük, hogyan járul hozzá az aktin 2. aldóménjének orientációja a molekula maradék részéhez képest az aktinkötő zseb nyitottságához hőmérséklet-függő FRET méréseket alkalmaztunk. A kísérleti elrendezésben az aktin Cys374 aminosava (1. aldómén) a donor fluoroforral volt megjelölve, míg a Lys61 (2. aldómén) az akceptor fluoroforral volt konjugáltatva. Az eredmények alapján sem a kofilin sem a profilin nem változtatta meg a jelölt pontok közti energia transzfert és következésképpen a Cys374 és Lys61 közti távolságra egyik aktinkötő fehérjének sincs hatása a vizsgált hőmérsékleti tartományban. Ugyanakkor a flexibilitási faktor egy meredekebb tendenciát mutatott a hőmérséklet függvényében az aktinkötő fehérjék hiányában, ami egy kevésbé flexibilis fehérje mátrixot tükröz a jelölt pontok között a kofilin-aktin és a profilin-aktin komplexek esetében. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy az aktinnak a mobilis 2-es aldóménje nem járul hozzá a nukleotidkötő zseb záródásához és kinyílásához.

Kofilin és profilin hatása a donor és az akceptor fluoroforok dinamikájára

Azért, hogy eldöntsük okoz-e valamilyen változást a kofilin és a profilin jelenléte a donor, és az akceptor molekula dinamikájában, ami esetleg hozzájárulhat a megfigyelt csökkenéshez az aktin kis doménjének flexibilitásában, fluoreszcencia anizotrópia lecsengéses méréseket végeztünk. A donor vagy az akceptor jelölt aktin monomerek anizotrópia lecsengését 5°C és 35°C között vettük fel aktinkötő fehérjék jelenlétében vagy hiányában. Az anizotrópia lecsengési görbékből két rotációs korrelációs időt tudtunk megbízhatóan meghatározni. A lassú komponens az aktin monomer rotációs mozgásához, míg a gyors komponens a fluorofor mozgásához rendeltük hozzá. A gyors rotációs korrelációs idő a fluorofor dinamikájáról ad információt.

A gyors rotációs korrelációs idő, a donor jelölt aktin esetében $4,83 \text{ ns}$ -ról $2,06 \text{ ns}$ -ra csökkent le, ahogy a hőmérsékletet 5°C -ról 35°C -ra emeltük. Az aktinkötő fehérjék jelenlétében hasonlóan változott a gyors rotációs korrelációs idő a hőmérséklet függvényében,

mint amikor az aktin egyedül volt jelen az oldatban. A kofilin jelenlétében a gyors rotációs korrelációs idő 4,03 ns-ről 1,92 ns-ra, míg a profilin jelenlétében 3,22 ns-ről 2,17 ns-ra csökkent le a hőmérséklet emelésével. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy egyik aktinkötő fehérje sem képes befolyásolni a donor fluorofor dinamikáját az alkalmazott hőmérsékleti tartományban. Következésképpen az aktin kis doménjének megnövekedett rigiditását nem a Cys374-hez kapcsolt fluorofor csökkent dinamikája eredményezi.

Az akceptor jelölt aktin monomer esetében a meghatározott gyors rotációs korrelációs idő 1,48 ns-ről 1,24 ns-ra csökkent, ahogy a hőmérséklet 5 °C-ról 35 °C-ra emeltük. A kofilin-aktin komplex esetében a gyors rotációs korrelációs idő 1,47 ns-ről 1,38 ns-ra, míg a profilin-aktin komplex esetében 1,4 ns-ről 1,22 ns-ra csökkent a hőmérséklet függvényében. Ezen eredmények alapján elmondható, hogy egyik aktinkötő fehérje sem képes befolyásolni az akceptor molekula dinamikáját. Ez a megfigyelés kizárja, hogy az aktin kis doménjének csökkent flexibilitása kofilin és profilin jelenlétében a Lys61-hez kapcsolt akceptor molekula csökkent dinamikájának lenne a következménye

Kofilin és profilin hatása a fehérje szerkezetre a riporter molekulák környezetében

Ahhoz, hogy további információt kapjunk a fluoreszcensen jelölt pontok körüli fehérje szerkezetre vonatkozóan meghatároztuk a fluoroforok mozgásának térbeli korlátozottságát karakterizáló félkúp szöveget (θ_0) az 5 °C és 35 °C közötti hőmérséklet tartományban. A félkúp szögek meghatározásához az aktin molekula rotációs mozgásához tartozó amplitudót és a nulla időpillanatban mért anizotrópia értéket használtuk (Egyenletx).

A Cys374-hez csatolt IAEDANS rotációs diffúziós mozgásához tartozó félkúp szög 14,52°-ról 32,02°-ra változott, ahogy a hőmérsékletet 5 °C-ról 35 °C-ra emeltük. A hőmérséklet indukálta növekedés az IAEDANS rotációs mozgásához tartozó félkúp szögében egy kevésbé kompakt szerkezet megjelenését indikálja a jelölt pont környezetében. A fluorofor rotációs mozgásához tartozó félkúp szög nem változott szignifikánsan az aktinkötő fehérjék jelenlétében. A kofilin-aktin komplex esetében θ_0 15,87°-ról 33,65°-ra, míg a profilin-aktin esetében 14,83°-ról 28,3°-ra változott, ahogy a hőmérsékletet megemeltük. Ezen eredmények alapján elmondható, hogy sem a kofilin sem a profilin nem befolyásolja a Cys374 környezetében az aktin szerkezetének zártságát az alkalmazott hőmérsékleti tartományban.

A Lys61-hez csatolt FITC rotációs diffúziós mozgásához tartozó félkúp szög $28,59^\circ$ -ról $34,43^\circ$ -ra változott, ahogy a hőmérsékletet 5°C -ról 35°C -ra emeltük. Ezen eredmény alapján elmondhatjuk, hogy a FITC molekula rotációs mozgásának orientációs korlátozottsága lecsökken a hőmérséklet növekedésével, ami egy kevésbé zárt struktúra megjelenésére utal a Lys61 környezetében. A félkúp szögben megfigyelt változás hasonló volt a kofilin-aktin és a profilin-aktin esetében ahhoz, amit az aktin esetében tapasztaltunk. A hőmérséklet emelésével, a félkúp szög a kofilin-aktin komplex esetében $26,73^\circ$ -ról $32,06^\circ$ -ra, míg a profilin-aktin esetében $27,69^\circ$ -ról $32,68^\circ$ -ra növekedett. Ezen eredmények alapján, sem a kofilin sem a profilin nem okoz változást az aktin molekula struktúrájában a Lys61 közelében az alkalmazott hőmérsékleti tartományban.

Kofilin és profilin hatása az aktin monomer hő stabilitására

Levitsky és kollégái felvetették, hogy az aktinkötő zseb konformációja és az aktin monomer hő stabilitása között szoros kapcsolat áll fenn. Ezen javaslat szerint a nyitottabb nukleotidkötő zseb egy a hővel szemben kevésbé ellenálló aktin struktúrához vezet. Ezért, hogy további támogatást kapjunk a zárt és nyitott nukleotidkötő zseb létezésével kapcsolatban pásztázó kalorimetriás kísérleteket végeztünk. A kofilin megnövelte az aktin olvadási hőmérsékletét $55,5^\circ\text{C}$ -ról $59,2^\circ\text{C}$ -ra ami egy a hő denaturációval szemben ellenállóbb fehérje struktúra jelenlétére utal. Ezzel ellentétben, a profilin lecsökkentette az aktin monomer olvadási hőmérsékletét $55,5^\circ\text{C}$ -ról $47,6^\circ\text{C}$ -ra, ami egy csökkent hő stabilitással rendelkező szerkezetre utal. Ezek az eredmények tovább erősítik az aktin nukleotidkötő zsebének kofilin jelenlétében megfigyelt zárt és a profilin jelenlétében megfigyelt nyitott konformációs állapotát.

Összefoglalás

A leírt eredmények alapján megállapítottuk, hogy:

- Az élesztő kofilin gátolja, míg az élesztő profilin elősegíti az aktin monomereken lejátszódó nukleotid kicserélődés folyamatát.
- Az aktinhoz kötött nukleotid az aktin fődoménjai által védett pozícióban helyezkedik el a molekulán belül, mivel az aktin-kötött ϵ -ATP hozzáférhetőségét karakterizáló Stern-Volmer konstans 2 nagyság renddel kisebb, mint az oldatban szabadon lévő ϵ -ATP Stern-Volmer állandója.
- Egyik aktinkötő fehérje se képes a kötött nukleotidot stabilizáló hidrogén hálózat átrendezésére, mivel az ϵ -ATP élettartama nem változik sem a kofilin sem a profilin aktinnal alkotott komplexének esetében.
- A kofilin hatására az aktin nukleotidkötő zsebe egy zárt konformációs állapotot vesz fel, mivel az ϵ -ATP hozzáférhetőségét karakterizáló Stern-Volmer állandó 1 nagyságrenddel kisebb a kofilin-aktin komplex esetében a komplexben nem lévő aktin esetéhez képest.
- A profilin hatására az aktin nukleotidkötő zsebe egy nyitott konformációs állapotot vesz fel, mivel az ϵ -ATP hozzáférhetőségét karakterizáló Stern-Volmer állandó 2 nagyságrenddel nagyobb a profilin-aktin komplex esetében a komplexben nem lévő aktin esetéhez képest.
- A kofilin és profilin hatására megjelenő zárt és nyitott konformációjú nukleotidkötő zseb az aktin 1-es és 2-es aldoménjének integrált elmozdulása következtében jelenik meg, mivel a FRET kísérletek alapján a két alegység egymáshoz viszonyított orientációja nem változik kofilin és profilin hatására.
- Az aktin kis doménjében, kofilin és profilin hatására fellépő flexibilitásbeli csökkenés szintén az 1-es és 2-es aldomének együttes mozgását látszik alátámasztani.
- A kofilin és profilin hatására megfigyelt flexibilitásbeli változás az aktin kis doménjében nem a használt jelölők környezetében bekövetkező változások eredménye, mivel sem a jelölők rotációs diffúziójának dinamikája sem a mozgásuk térbeli korlátozottsága nem változik az aktinkötő fehérjék jelenlétében.
- Az alkalmazott aktinkötő fehérjéknek ellentétes hatásuk van az aktin monomer hő stabilitására, mivel a kofilin növeli, míg a profilin csökkenti az aktin olvadási hőmérsékletét.
- Az aktin hő stabilitása erősen függ a nukleotidkötő zseb konformációjától; a nyitottabb konformáció kisebb hő rezisztenciát eredményez.

Publikációk

Tézishez kapcsolódó cikkek

The effects of ADF/cofilin and profilin on the conformation of the ATP-binding cleft of monomeric actin. *Roland Kardos, Kinga Pozsonyi, Elisa Nevalainen, Pekka Lappalainen, Miklós Nyitrai, and Gábor Hild*, *Biophysical Journal*, Volume 96, March 2009, Pages 2335–2343, IF: 4.39

The Effect of ADF/Cofilin and Profilin on the Dynamics of Monomeric Actin
Roland Kardos, Elisa Nevalainen, Miklós Nyitrai, and Gábor Hild, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, Volume 1834, Issue 10, October 2013, Pages 2010–2019, IF: 3.73

The other side of the coin: Functional and structural versatility of ADF/cofilins

Gábor Hild, Lajos Kalmár, Roland Kardos, Miklós Nyitrai, Beáta Bugyi, *European Journal of Cell Biology*, Manuscript has been accepted, 2013, IF: 3.32

Tézishez kapcsolódó poszterek

-The effect of actin-binding proteins on the dynamic properties of G-actin *Roland Kardos, Elisa Nevalainen, Pekka Lappalainen, Miklós Nyitrai and Gábor Hild*, Symposium for Graduate Students in Biology, November 2009, Pécs, Hungary.

-The effect of actin-binding proteins on the dynamic properties of monomeric actin
Roland Kardos, Mónika Tóth, Kinga Futó, Elisa Nevalainen, Pekka Lappalainen, Miklós Nyitrai and Gábor Hild, 23rd Congress of Hungarian Biophysical Society, August 2009, Pécs, Hungary.

-The effect of actin-binding proteins on the dynamic properties of monomeric actin
Roland Kardos, Andrea Vig, Réka Dudás, Tünde Kupi, Elisa Nevalainen, Pekka Lappalainen, Miklós Nyitrai and Gábor Hild, 23rd European Cytoskeleton Forum, FEBS/ECF Workshop, 2008, Potsdam, Germany.

-Effect of actin binding proteins on the conformation of nucleotide binding cleft of actin
Gábor Hild, Roland Kardos, Kinga Pozsonyi, Andrea Vig, Miklós Nyitrai, 37th Membrane Transport Conference, May 2007, Sümeg, Hungary.

Tézishez kapcsolódó előadások

-Effect of actin-binding proteins on the actin monomer Roland Kardos, Pekka Lappalainen, Miklós Nyitrai, Gábor Hild, EBSA Satellite Conference on Intracellular Fluorescence Microscopy August 2011, Pécs, Hungary.

-The effect of actin-binding proteins on the dynamic properties of G-actin Roland Kardos, Elisa Nevalaine, Pekka Lappalainen, Miklós Nyitrai and Gábor Hild, Symposium for Graduate Students in Biology, Pécs, Hungary, November 2009.

-Aktinkötő fehérjék hatása az aktin monomer dinamikai tulajdonságaira Kardos Roland, Tóth Mónika, Futó Kinga, Elisa Nevalainen, Pekka Lappalainen, Nyitrai Miklós és Hild Gábor, MBFT XXIII. Kongresszusa 2009 Augusztus, Pécs.

-The effect of actin-binding proteins on the dynamic properties of monomeric actin Roland Kardos, Andrea Vig, Réka Dudás, Tünde Kupi, Elisa Nevalaine, Pekka Lappalainen, Miklós Nyitrai and Gábor Hild, 23rd European Cytoskeleton Forum, FEBS/ECF Workshop, Potsdam, Germany, 2008.

-Aktinkötő fehérjék hatása az aktin nukleotidkötő zsebének konformációjára Hild Gábor, Kardos Roland, Pozsonyi Kinga, Vig Andrea, Nyitrai Miklós, 37. Membrán-Transzport Konferencia Sümeg 2007 Május.