

PhD értekezés tézisei

**Izomfehérjék vizsgálata
lumineszcencia spektroszkópia alkalmazásával**

Bódis Emőke

Program	Biokémia és molekuláris biológia
Programvezető	Dr. Sümegi Balázs
Alprogram	B-130: Funkcionális fehérjedinamika vizsgálata biofizikai módszerekkel
Alprogramvezető	Dr. Somogyi Béla

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar
Biofizikai Intézet

2005.

Irodalmi áttekintés

A harántcsíkolt izomsejt a szervezet egyik legnagyobb méretű sejtje, térfogatának jelentős részét a kétféle filamentális rendszerből, a főként aktint tartalmazó ún. vékony és a miozint tartalmazó ún. vastag miofilamentumokból felépülő miofibrillumok foglalják el. E filamentális rendszerek szabályos, egymással párhuzamos elrendeződéssel hozzák létre az izomkontrakció elemi egységét, a szarkomert. Izomösszehúzódáskor az aktin és miozin tartalmú filamentumok egymás mentén elmozdulnak, amely a szarkomer megrövidülését és az izomsejt (izomrost) kontrakcióját okozzák. A kontrakcióhoz szükséges energiát a miozin által kötött ATP hidrolíziséből felszabaduló energia biztosítja.

A miozin egy motor fehérje, amely ATP-bontásból származó kémiai energiát egy szupramolekuláris fehérjekomplex részeként mechanikai munkává képes alakítani. Definiálhatjuk aktin-aktivált Mg^{2+} -ATPáz enzimként is, amely aktin jelenléte nélkül is hidrolizálja az ATP-t. Két, kb. 220 kDa súlyú nehéz láncból és két pár kb. 20 kDa súlyú könnyű láncból álló hexamerikus polipeptid. A polipeptid N-terminálisa, mintegy 850 aminosav a miozin fej régiót („cross-bridge”) képezi, míg a fehérje többi része a stabilitási funkciót ellátó vastag filamentum formálásában játszik szerepet. A globuláris szerkezetű fej tartalmazza az ATP-kötő zsebet és az aktinkötő régiókat.

A miozin molekula legkisebb funkcionális egysége, amely az enzim aktivitását és aktinkötő képességét még megtartja, a szubfragmentum 1 (S1). Miozinból α -kimotripsinnel hasított S1 alkalmazása *in vitro* körülmények között praktikus, mert szemben az ép miozinnal a környezet alacsony sókoncentrációja mellett sem csapódik ki. Az S1 nehéz lánc tripszines emésztéssel 3 fragmentumra bontható tovább, keletkezik egy 20 kDa-os, egy 50 kDa-os és egy 25 kDa-os fragmentum.

Az ATP hidrolízisének egy cikusa során a miozin nukleotid-kötő zsebe szerkezeti változások sorozatán megy át, amely változás kihat(hat) a molekula egészére. Nukleotidmentes állapotban a zseb nyitott („open”), majd az ATP asszociációját követően a zseb záródik („closed”), amely zárt állapot a hidrolízist

követően (ADP.P_i) is fennmarad, majd az inorganikus foszfát (P_i) és az ADP távozásakor a zseb ismét nyitott („open”) pozíciójává válik, alkalmas újabb ATP kötésre. Az S1 különböző nukleotidállapotai közül az ATP és ADP.P_i állapot spektroszkópiai vizsgálata azok rendkívül rövid életidejük miatt nehezen tanulmányozhatók. A probléma áthidalására nem hidrolizálható nukleotid analógokkal mimikáljuk a kívánt állapotot. Széles körben elterjedt, hogy az ATP állapotot ADP.BeF_x, míg az ADP.P_i állapotot ADP.AlF₄⁻ vagy ADP.V_i alkalmazásával valósítjuk meg.

Az aktin egyaránt felépítője a mikrofilamentum alapú citoskeletonnak és az izomszövet vékony filamentumának. Kétféle formában van jelen mind *in vivo* mind *in vitro*: monomer és polimer. A monomer globuláris struktúrájú, kation (Ca²⁺, Mg²⁺), illetve nukleotid (ADP, ATP) kötőhelyet tartalmaz egy, a molekulát csaknem kettéosztó hasadékban. A monomer aktin röntgen-krisztallográfián alapuló 3D térbeli szerkezeti modellje 1990-ben született meg, a filamentális forma pedig a monomer szerkezetét alapul véve modellezéssel készült. Az aktin szerkezeténél fogva egy kisebb és egy nagyobb doménre, a kisebb domén a szubdomén I-re és II-re, míg a nagyobb domén a szubdomén III-ra és IV-re osztható.

A fluorofórként is alkalmazható triptofán aminosavakból 4 darab található egy aktin monomerben, mind a szubdomén I-ben, amely régió tartalmazza a miozin kötésben résztvevő aminosavakat is. G. B. Strambini és S. S. Lehrer triptofán foszforeszcencia spektroszkópia alkalmazásával vizsgálta a monomer és filamentum közötti konformációs és dinamikai különbségeket. Eredményeik szerint a triptofánok jelentős heterogenitást mutattak, amely arra enged következtetni, hogy a fluorofórok környezetének polaritása és lokális flexibilitása nagymértékben különbözik egymástól. Összehasonlítva a monomer és filamentális formák foszforeszcencia tulajdonságait, arra a megállapításra jutottak, hogy a szubdomén I-ben lévő triptofánok körüli lokális környezet csak kis mértékben változik a polimerizáció során.

Célkitűzések

Vizsgálataink központjában a miozin intramolekuláris flexibilitásának feltérképezése, illetve az aktin-miozin közötti kapcsolatnak mind a miozin, mind az aktin oldaláról történő karakterizálása áll.

1.) Célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk a miozin S1 intramolekuláris flexibilitását, mint dinamikai paramétert különböző, olyan, az enzimatis tevékenység szempontjából aktív régiók között, mint az aktin-kötő régió, az ATP-kötő zseb és a legnagyobb reaktivitású cisztein (SH1, Cys⁷⁰⁷). Továbbá, feltérképezzük, hogy ez a paraméter hogyan változik az ATP hidrolízis egy ciklusán belül, ahol ATP, ADP.Pi, ADP és nukleotidmentes állapotokat különböztetünk meg, és amelyekben a γ -foszfát kötőhely nyitott vagy zárt állásban lehet. A kísérletek elvégzéséhez fluoreszcencia spektroszkópiai módszereket alkalmaztunk: rezonancia energiatranszfer (FRET), élettartam és „steady-state” anizotrópia méréseket.

2.) A miozin aktin-kötő felszínéhez közel található a Lys⁵⁵³ aminosav, amely szelektíven jelölhető extrinzik fluorofórral (FHS). Fluoreszcencia kioltási kísérletekkel kívántuk jellemezni a fluorofór környezetét és az abban bekövetkező változásokat aktin jelenlétében és nélküle, a miozin nukleotidmentes és ADP állapotaiban.

3.) További célul tűztük ki, hogy az aktin-miozin kapcsolatot az aktin oldaláról is vizsgáljuk. Ehhez „steady-state” és időfüggő foszforeszcencia spektroszkópiai módszereket használtunk, amelyekben kromofórként az aktin triptofánjait alkalmaztuk. A módszerekkel jellemezhetjük az aktinban a kromofórok körüli lokális környezetben bekövetkező szerkezeti és dinamikai változásokat a miozinnal való kölcsönhatáskor. A miozin modellezésére triptofánmentes miozin motor domént (MD/W-) használtunk, amelynek aktivitása és aktin-kötő képessége közel megegyezik a natív S1-gyel.

Alkalmazott módszerek

A „steady-state” fluoreszcencia méréseket Perkin Elmer LS50B spektrofluoriméteren végeztük. A Förster-féle rezonancia energia transzfer (FRET) hatásfokának (E) meghatározásához a donor intenzitást mértük akceptor jelenlétében (F_{DA}) és nélküle (F_D):

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

A donor-akceptor közti távolság (R) a transzferhatásfok (E) és a Förster-féle kritikus távolság (R_0) ismeretében kalkulálható:

$$E = R_0^6 / (R_0^6 + R^6) \quad (2)$$

A Förster-féle kritikus távolság az a donor-akceptor távolság, amely az 50%-os transzferhatásfokhoz tartozik. A normált transzferhatásfok, f' , definiálható a következőképpen:

$$f' = E / F_{DA} \quad (3)$$

Az f' hőmérséklet-függése (alakja és meredeksége) információt ad a fehérje két jelölt pontja közötti fehérje térrész flexibilitásáról. Minél nagyobb az f' meredeksége, annál flexibilisebb a donor-akceptor közötti fehérjemátrix.

Steady-state anizotrópia méréseket 6-26°C tartományon mértük 8 hőmérsékleten nukleotidmentes állapotban. Az eredményeket a Perrin-egyenlet segítségével értékeltük ki:

$$1 / r = 1 / r_0 (1 + (k T / V \eta) \tau) \quad (4)$$

ahol r a steady-state anizotrópia, r_0 a határanizotrópia, k a Boltzman állandó, T az abszolút hőmérséklet, V a gömb alakúnak feltételezett rotáló egység térfogata, η a viszkozitás és τ a fluorofór élettartama.

Fluoreszcencia élettartam méréseket ISS K2 multifrekvenciás fázisfluoriméteren végeztük. Az átlagélettartam számolásához a következő összefüggést használtuk fel:

$$\tau_{\text{átl}} = \sum \tau_n^2 \alpha_n / \sum \tau_n \alpha_n \quad (5)$$

ahol τ_n az n -dik élettartam komponens, az α_n a hozzá tartozó amplitúdó.

Fluoreszcencia kioltás hatékonyságának meghatározásához korrigált „steady-state” fluoreszcencia spektrumokat vettünk fel illetve élettartamok mértünk különböző koncentrációjú kioltó jelenlétében és az eredményeket a Stern-Volmer egyenlet segítségével analizáltuk:

$$F_0 / F = \tau_0 / \tau = 1 + K_{SV}[Q] \quad (6)$$

ahol F_0 és τ_0 a kioltó nélküli intenzitás és élettartam, F és τ pedig a kioltó jelenlétében mért intenzitás és élettartam.

$$K_{SV} = k_+ \tau_0 \quad (7)$$

ahol k_+ a bimolekuláris kioltási állandó, értéke a fluorofór megközelíthetőségéről, töltött kioltók alkalmazása esetén a töltésviszonyok alakulásáról ad információt.

Foszforeszcencia méréseket házilag készített és fejlesztett foszforiméteren végeztük G.B. Strambini laboratóriumában (CNR, Pisa, Olaszország). Az aktin és/vagy miozin motor domén (MD/W-) „steady-state” spektrumait 140 K-en vettük fel az oldat 60%-os glicerin tartalama mellett, ahol a közeg üvegszerű állapotban található („glass matrix”). Kromofórként az aktin triptofánjait alkalmaztuk. A spektrumok analizálásánál a triplet gerjesztett és a singlet alap állapot alsó vibrációs szintjei közötti ($\lambda_{0,0}$) átmeneteket vizsgáltuk. Ezek helyzete a hullámhossz függvényében informál a kromofór oldat felőli megközelíthetőségéről.

A foszforeszcencia élettartam lecsengéseket 0.5 és 20 °C-on mértük puffer környezetben. A lecsengéseket exponenciálisok illesztésével analizáltuk Global illesztőprogram (Global Unlimited, LFD, University of Illinois) segítségével. Minden esetben a 3 exponenciális illesztése jobb eredményt adott, mint 2 exponenciális összegének alkalmazása. Tapasztalat alapján a hosszabb élettartam a kromofór körüli alacsonyabb flexibilitású mikrokörnyezet, rigidebb régió jelenlétére utal, ahol a kioltó hatások nehezebben érvényesülnek.

Mérési eredmények

1.) A miozin S1 intramolekuláris flexibilitásának vizsgálata

Az S1-en különböző régiók között hoztunk létre spektrális feltételeknek megfelelő FRET (donor-akceptor) párokat: Ser¹⁸¹ (ANN, donor) - Lys⁵⁵³ (FHS, akceptor), Ser¹⁸¹ (ANN, donor) - Cys⁷⁰⁷ (IAF, akceptor), Cys⁷⁰⁷ (IAEDANS, donor) - Lys⁵⁵³ (FHS, akceptor). A donor-akceptor párok között transzferhatásfokot mértünk, amelyből az r^2 paraméter számoltuk a hőmérséklet függvényében. Négy különböző nukleotid állapotot vizsgáltunk: nukleotid mentes, ADP, ATP, ADP.P_i. Ez utóbbi két állapotot nukleotid analógokkal (ADP.BeF_x, ADP.AlF₄⁻ és ADP.V_i) mimikáltuk.

Vizsgálataink alapján az S1 intramolekuláris flexibilitása heterogén, amely heterogenitás a kötött nukleotid minőségétől függetlenül fennmarad. Azonban a fehérje különböző régiói másképp reagálnak az ATP hidrolízis okozta szerkezeti változásokra. Az aktin-kötő régió (50 kDa-os alsó domén) egy rendkívül merev területe a fehérjének, a tőle kb. 4 nm-re lévő nukleotid-kötő zsebben a különböző nukleotidok által okozott szerkezeti változások nem sokban zavarják meg e rigiditást. Az 50 kDa-os felső domén viszont rendkívül flexibilisnek bizonyult, amely az ATP ciklus különböző nukleotid állapotokban mindvégig megmarad. Ez a flexibilitás feltehetően a gyors foszfátkötés, disszociáció és az ezt kísérő lokális strukturális átrendeződés miatt szükséges. A nagyfokú dinamikus mozgás teret és rugalmasságot ad a gyorsan lejátszódó konformációs átalakulásoknak. A dinamikai szempontból heterogén S1-re általánosságban jellemző, hogy „closed” állapotban a molekula rigidebb, mint „open” állapotban, amelynek hátterében az állhat, hogy a rigidebb szerkezet mechanikai alapot nyújt az információ nukleotid-kötő zsebtől a „lever arm”-ig való terjedéséhez. Habár az irodalom az ADP.BeF_x molekulát az ATP-, az ADP.AlF₄⁻ és ADP.V_i molekulákat pedig az ADP.P_i állapotoknak feleltették meg, kísérleteink alapján különbséget találtunk az analógoknak az S1-en mimikált állapotai között. Eredményeink szerint a tisztán „closed” állapotot az ADP.V_i hozta létre, míg a másik két nukleotid analóg az „open-closed” átmenet közötti egyensúly eltolásával mindkét állapot megjelenését megengedi.

2.) Az S1 aktinkötő felszínén ek jellemzése fluoreszcencia kioltással

Az S1 Lys⁵⁵³ aminosavát módosítottuk FHS fluorofórral. Fluoreszcencia kioltási kísérleteinket CoCl₂ kioltóval végeztük. Eredményeink alapján a CoCl₂ kioltotta az FHS fluoreszcenciáját mind aktin jelenlétében és nélküle, mind rigor és ADP állapotban egyaránt. A „steady-state” spektrumokból és élettartam adatokból meghatározott Stern-Volmer ábrákon látható, hogy az FHS fluoreszcencia kioltása sztatikus módon történik. Az aktin kötése nem változtatta meg a kioltás hatékonyságát, amiből következtethető, hogy az aktin nem okoz olyan szerkezeti vagy töltésviszonyokban bekövetkező változást, amelyet a pozitív töltésű kioltó alkalmazása detektálni tudna. Mindazonáltal a kioltás hatékonysága függ az S1 nukleotid tartalmától, ADP állapotban ugyanis a kb. 40 %-kal csökken a nukleotidmentes állapothoz képest. MacLean és munkatársai eredményeivel összevetve valószínű, hogy ADP kötés hatására a térbeli hozzáférhetőség és nem az elektrosztatikus viszonyok megváltozása tükröződik az eredményekből.

3.) Aktin szerkezeti vizsgálata miozin kötés hatására

Vizsgáltuk az aktin filamentum 140 K-en felvett „steady-state” spektrumát illetve a szobahőn megfigyelhető élettartam lecsengését. Eredményeink szerint az aktin filamentum triptofán foszforeszcencia spektruma és élettartam lecsengése egyaránt heterogén, utalva a triptofánok heterogén környezetben való elhelyezkedésére a molekulán belül. Az eredmények alapján valószínűsítettük, hogy melyik spektroszkópai paraméter mely triptofán(ok)hoz rendelhető.

Vizsgáltuk milyen hatással van az aktomiozin komplex kialakulása az aktinban található triptofánok környezetére. Mivel a miozin S1-ben 6 triptofán található, az aktomiozin spektrum a sok egymásra szuperponálódó jel miatt nem bontható fel komponenseire. Az élettartam komponensek között azonban megjelent egy, külön sem az aktinra sem a miozin S1-re nem jellemző komponens. A miozin-kötés hatásának modellezésére triptofánmentes motor (MW-) domént alkalmaztunk, hogy e konstrukció alkalmazása segítsen kideríteni, mely spektroszkópai tulajdonságok rendelhetők az aktomiozin komplexhez és melyek a miozinhoz. Eredményeink

alapján az miozin-kötés hatása a triptofánok közül leginkább a W356 aminosav környezetének változásában figyelhető meg, holott ez az aminosav nincs közvetlen kapcsolatban az aktomiozin kötőfelszínnel. Az aktin felszínén elhelyezkedő W79-es aminosav mikrokörnyezete szintén érzékeny a miozin kötésre, bár a kísérleti eredmények alapján csupán enyhe konformációs különbség figyelhető meg a miozin jelenlététől függően. Ez azt mutatja, hogy a W79 nem vesz részt a miozin kötésben. A mélyen eltemetett W340-es aminosav körüli régió rigiditása fokozódik miozin kötésre, holott ez a triptofán a molekula belsejében eltemetetten található, „távol” a kötőfelszíntől. Feltételezhető, hogy e változás is a W340 körüli lokális konformáció változás következménye, amelyet a miozin-kötés közvetetten okoz.

Vizsgáltuk a tropomiozinnak, az aktomiozin szabályozásban résztvevő, az aktinhoz kötődő fehérjének a hatását is az aktin triptofánjainak környezetére. Eredményeink alapján a fehérjekomplexnek vagy nincs hatása az aktin triptofánokat tartalmazó régiójára, vagy ha van hatása, az általunk alkalmazott spektroszkópai módszerekkel e hatás nem kimutatható.

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Bódis, E., Szarka, K., Nyitrai, M., and Somogyi, B.: *Dynamic reorganisation of the motor domain of myosin subfragment 1 in different nucleotide states*. **Eur J Biochem**. 2003 Dec;270(24):4835-45.

Bódis, E., Strambini, G.B., Gonnelli, M., Málnási-Csizmadia, A. and Somogyi, B.: *Characterisation of F-actin tryptophan phosphorescence in the presence and absence of tryptophan-free myosin motor domain*. 2004, **Biophysical Journal** 2004 Aug;87(2):1146-54.

Az értekezés alapjául szolgáló posztterek

Bódis, E., Nyitrai, M., Hild, G., Halasi, S., Lukács, A., and Somogyi, B.: A miozin aktin-kötő régiójának vizsgálata fluoreszcenciás módszerekkel: az aktin és az ADP hatása. XXIX. Membrántranszport Konferencia. 1999, május 24-28, Sümeg.

Bódis E., Szarka K., Nyitrai M. és Somogyi B.: Irányfüggő flexibilitás a miozin S-1 katalitikus doménjén belül. XXX. Membrántranszport Konferencia. 2000, május 23-26, Sümeg.

Szarka, K. Bódis, E., Nyitrai, M. and Somogyi, B.: Direction-dependent flexibility in the catalytic domain of myosin subfragment 1. 2001. Graz, Austria

Szarka K. Bódis E., Lukács A. Nyitrai M. és Somogyi B.: Miozin és tropomiozin hatása az aktin filamentum flexibilitására. Magyar Biofizikus Társaság XX. Vándorgyűlése. 2001. Budapest.

Lukács, A., Nyitrai, M., Bódis, E., Hild, G. and Somogyi, B.: The effect of ADP on the flexibility and conformation of myosin-subfragment-1 in its complex with actin. European Muscle Conference 2001. Pavia, Italy

Bódis E., Szarka K., Strambini GB., Gonelli M., Nyitrai M. and Somogyi B.: Az aktin-kötő fehérjék hatása az aktin filamentum konformációjára és flexibilitására. XXXII. Membrántranszport Konferencia. 2002., május 23-26, Sümeg

PhD Thesis

Research of muscle proteins applied by luminescence spectroscopy

Bódis Emőke

Programme	Biochemistry and molecular biology
Head of the Programme	Dr. Sümegei Balázs
Subprogramme	B-130: Research of functional dynamics of proteins applying biophysical methods
Head of the Subprogramme	Dr. Somogyi Béla

University of Pécs, Faculty of Medicine

Department of Biophysics

2005.

Introduction

One of the biggest cell of the organisation is the striated cell, its volume is filled in by two types of filamental system: (i) the thin myofilament, containing mainly actin and the (ii) thick myofilament, containing myosin. These filaments are regularly arranged, their paralell build-up creates the base of the muscle contraction, the sarkomer. At muscle contracion the two types of filements move pass each other causing the shortening of the sarkomer and the whole muscle cell (muscle fibre). The energy which is needed for the power generation is arrised from ATP hydrolysis.

Myosin is a motor protein, which is able to convert the chemical energy from ATP hydrolysis into mechanical work. This is also an actin-activated Mg^{2+} -ATPase enzyme, which can function in the absence of actin too. It is a hexameryc polipepdide containing two, ~220 kDa heavy chains and two pairs of ~20 kDa light chains. The N-terminal of the polipeptide, approximately 850 amino acides form the myosin head („cross-bridge”), while the rest of the protein has the function of stability and takes part in the forming of the thick filaments. The globular head contains the ATP-binding cleft and the actin-binding regions.

The smallest portion of the molecule, which doesn't loose its functional activity, is the subfragment 1 (S1). Applying S1 digested from myosin by α -chymotrypsin in *in vitro* circumtenses is practical, because it is soluble in a solution with low salt concentration in contrast with intact myosin. The heavy chain of S1 can be digested by trypsin in 3 fragments: (i) 20 kDa, (ii) 50 kDa and (iii) 25 kDa.

During one cycle of ATP hydrolysis the nucleotide-binding cleft of myosin undergoes a chain of conformational changes, which can affect the whole molecule. In the absence of nucleotide the cleft is open, then after the ATP association the cleft will be closed, and this closed state will remain after the hidolysis at ADP. P_i binding as well. At inorganic phosphate (P_i) and ADP release the cleft will have again an open position, now it is able to bind the next ATP molecule. The investigation of ATP and ADP. P_i states by spectroscopic methods are difficult, because they have

extremely short lifetimes. Solving the problem, it is able to apply non-hydrolyzable nucleotide analogues, they can mimic the given nucleotide states. It is widely used to mimic the ATP state by applying ADP.BeF_x, while the ADP.P_i state by applying ADP.AlF₄⁻ or ADP.V_i

Actin is the unit of the cytoskeletal microfilament and also the thin filaments of the muscle tissue. It has two appearing form both *in vivo* and *in vitro*: monomer and polymer. Monomer has a globular structure, it contains bivalent cation (Ca²⁺, Mg²⁺), and nucleotide (ADP, ATP) binding sites in the pocket inside the molecule. The X-ray crystallographic 3D model of monomer actin was born in 1990, the filament actin was prepared by modelling based on the monomeric form. The monomer can be divided into two domains, the smaller domain contains two subdomains: I and II, the bigger domain contains also two subdomains: III and IV.

There are 4 tryptophans in a monomer, all of them are located in the subdomain I, which region comprises the amino acids binding to myosin. The huge advantage of tryptophan is that it can function as a fluorophore or chromophore in spectroscopic experiments. G. B. Strambini and S. S. Lehrer investigated the conformational and dynamic differences between the monomer and filament forms applying tryptophan phosphorescence spectroscopy. According to their results the environments of tryptophans are highly heterogeneous, the conclusion is given that the local environments have different polarity and local flexibility. Comparing the spectroscopic features of the monomer and the filament forms, they found that subdomain I hardly changes during the polymerisation.

Aims

In the focus of our research the intramolecular flexibility of myosin is as well as the relation of actin-myosin complex characterising either from the myosin side or from the actin side.

1.) Our aim was to investigate the intramolecular flexibility as a dynamic parameter between enzymatically active regions: (i) actin-binding region, (ii) ATP-binding cleft and (iii) highest reactivity cysteine (SH1, Cys⁷⁰⁷). Furthermore we plan to follow, how this parameter changes during one cycle of ATP hydrolysis, where ATP, ADP.Pi, ADP and nucleotide-free states can be distinguished. We applied fluorescence spectroscopic methods: resonance energy transfer (FRET), lifetime and steady-state anisotropy measurements.

2.) Lys⁵⁵³ amino acid of S1 is located close to the actin-binding surface and can be labelled selectively with extrinsic fluorophore (FHS). We required to characterise the environment of the fluorophore by fluorescence quenching measurements in the presence and absence of actin and/or ADP.

3.) In addition our aim was to characterise the changes in actin upon actin-S1 complex formation. We applied steady-state and time-resolved phosphorescence methods, where tryptophans functioned as chromophores. This method allows to detect the conformational and dynamic changes of the local environment of the probes upon the complex formation. Modelling of myosin we used tryptophan-free motor domain (MD/W-), which enzymatic activity and ability of actin-binding are close to the native S1.

Methods

The steady-state fluorescence measurements were carried out on Perkin Elmer LS50B spectrofluorometer. To determine the transfer efficiency (E) of the Förster-type resonance energy transfer (FRET) we measured the intensity of the donor in the presence (F_{DA}) and in the absence (F_D) of the acceptor:

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

The distance (R) between the donor and acceptor can be calculated in the knowledge of transfer efficiency (E) and Förster-type critical distance (R_0):

$$E = R_0^6 / (R_0^6 + R^6) \quad (2)$$

The Förster-type critical distance is that of the distance between the donor and acceptor, which would be at 50% transfer efficiency. The definition of the normalised transfer efficiency (f') is the following:

$$f' = E / F_{DA} \quad (3)$$

The temperature dependence of f' provides information about the flexibility of the protein matrix between the two labelled points. The higher slope of f' , the more flexible is the protein matrix between the donor and acceptor.

Steady-state anisotropy measurements on S1 were carried out in nucleotide-free state between 6-26°C at 8 temperature values. The results were analysed by the Perrin-equation:

$$1 / r = 1 / r_0 (1 + (k T / V \eta) \tau) \quad (4)$$

where r is the steady-state anisotropy, r_0 is the limited anisotropy, k is the Boltzman constant, T is the absolute temperature, V is the volume of the sphere-shape rotating unit, η is the viscosity and τ is the lifetime of the fluorophore.

Fluorescence lifetime measurements were made on ISS K2 multifrequenz phasefluorometer. The average lifetime were calculated as following:

$$\tau_{\text{atl}} = \sum \tau_n^2 \alpha_n / \sum \tau_n \alpha_n \quad (5)$$

where τ_n is n^{th} lifetime component, α_n is the belonging amplitude.

For the determination of the efficiency of fluorescence quenching corrected steady-state fluorescence spectra were taken up and also the lifetime values in the presence of different concentration of quencher were measured. The results were analysed with the help of Stern-Volmer equation:

$$F_0 / F = \tau_0 / \tau = 1 + K_{SV}[Q] \quad (6)$$

where F_0 and τ_0 are the intensity and lifetime in the absence of quencher, F and τ are the intensity and lifetime in the presence of quencher, K_{SV} is the Stern-Volmer constant .

$$K_{SV} = k_+ \tau_0 \quad (7)$$

where k_+ is the bimolecular quenching constant, its value gives information about the exposition of the fluorophore, in case of charged quencher about the distribution of charges of the protein matrix.

The phosphorescence measurements were carried out on a home-made phosphorometer in G.B. Strambini's laboratory (CNR, Pisa, Italy). The steady-state spectra of actin and/or myosin motor domain (MD/W-) were taken up at 140 K, where the glycerol concentration of the solvent was 60%, in this case the matrix has a so-called glass state („glass matrix”). The tryptophans of actin were the chromophores of the spectroscopic measurements. By the analysis of the spectra we investigated the relaxation between the triplet excited state and the lowest vibronic level of the singlet ground state ($\lambda_{0,0}$). The peaks of the spectra as a function of the wavelength characterises the solvent exposition of the chromophore.

The phosphorescence lifetime decays were taken at 0.5 and 20 °C. The decays were analysed by the fitting of exponential functions applying Global software (Global Unlimited, LFD, University of Illinois). In all cases the addition of 3 exponential functions gave a better fit, than the addition of 2 exponential functions. Based on an empirical study the longer lifetime refers to a less flexible microenvironment of the chromophore, where the quenching processes are less effective.

Results and Conclusions

1.) Research of the intramolecular flexibility of myosin S1

We made three different FRET (donor-acceptor) pairs inside S1: Ser¹⁸¹ (ANN, donor) - Lys⁵⁵³ (FHS, acceptor), Ser¹⁸¹ (ANN, donor) - Cys⁷⁰⁷ (IAF, acceptor), Cys⁷⁰⁷ (IAEDANS, donor) - Lys⁵⁵³ (FHS, acceptor). We measured the transfer efficiency between the donor-acceptor pairs and calculated the f^2 parameter as a function of the temperature. We investigated four different nucleotide states: nucleotide-free, ADP,

ATP, ADP.P_i. The last two states were mimiced by nucleotide analogues (ADP.BeF_x, ADP.AlF₄⁻ és ADP.V_i).

According to our results the intramolecular flexibility of S1 is heterogen, and this heterogenity is independent on the quality of the bound nucleotides. The actin-binding region (50 kDa lower domain) is a highly rigid area of the protein, the conformational changes during the ATP hidrolysis in the 4 nm far nucleotid-bindng cleft don't influence the rigidity of the actin-binding domain. The 50 kDa upper domain seemed highly flexible, which flexibility remains during the hydolysis cycle. We suppose, this remarkable flexibility is needed for the quick phosphate binding, conformationl change and release. The great flexibility and dynamic movement gives opportunity for the quick enzymatic processes coupled with significant conformational changes. Although the S1 is dynamically heterogen, in general it is true, that the closed state is more rigid, while the open state is more flexible. The reason can be, that the more rigid conformation provides a more stable mechanical base for the transfer of infomation from the nucleotide binding cleft to the lever arm. It is widely thought, that the ADP.BeF_x molecule mimics the ATP state, the ADP.AlF₄⁻ and ADP.V_i molecules mimic the ADP.P_i state, however our results could find differences between the three nucleotide analogue states. According to our results closed state is produced by ADP.V_i, while the two other analogues generate an equilibrium between the open-closed transition.

2.) Characterisation of the actin-binding region of S1 by fluorescence quenching experiments

We modified Lys⁵⁵³ amino acid of S1 by FHS extrinsic fluorophore. The quenching experiments were carried out by applying CoCl₂ as a quencher. According to our results CoCl₂ quenched the fluorescence of FHS in the presence and in the absence of actin, both in nucleotide-free and ADP states. By the Stern-Volmer plots the mechanism of quenching process is static. The binding of actin to S1 doesn't change the efficiency of quenching, therefore we think, that the effect of actin doesn't cause such a change, which could be revealed by applying positive quenchers. Nevertheless the efficiency of quenching depends on the quality of bound nucleotide: in case of

ADP state the efficiency decreases by 40% relative to the nucleotide-free states. Our conclusion comparing to the results of MacLean laboratory is, that in ADP state the spatial exposition changes (not the distribution of charges).

3.) Investigation of actin upon myosin binding

We examined the steady-state spectra of actin tryptophans at 140 K and the lifetime decays at room temperature. According to our results both the spectra and lifetime decays are heterogen, referring to the heterogen microenvironment of tryptophans. By the results we assigned the spectroscopic parameters to the proper tryptophans.

We investigated, how myosin binding can influence the local environment of tryptophans of actin. S1 has 6 tryptophans, therefore the spectra cannot be divided into components, because of the too many signal-superposition. Among the lifetime components a new component was appeared, which is not characteristic either actin, or S1. Modelling the binding of S1 to actin, we applied a tryptophan-free construction: MD/W-. This motor domain helps us to divide the spectroscopic features of actin-myosin complex and myosin itself. According to our results, the bound motor domain changes mainly the microenvironment of Trp356 amino acid, although this amino acid is not in direct connection with the actin-myosin binding surface. On the actin surface localised Trp79 was also sensitive to the motor domain binding, but the experiments show only a slightly conformation change. It directly proves, that this amino acid doesn't take part in myosin binding. Interestingly, the rigidity of the deeply buried Trp340 amino acid is increasing, although it is „far” from the binding surface, the effect of myosin binding can only indirectly influence the local region around Trp340.

We examined the effect of tropomyosin on actin and/or MD/W-. We could not found any changes in spectra or lifetime decays. It means, that this regulating protein has either no effect on actin and/or MD/W- or its effect cannot detect based on phosphorescence spectroscopy methods.

Publications

Bódis, E., Szarka, K., Nyitrai, M., and Somogyi, B.: *Dynamic reorganisation of the motor domain of myosin subfragment 1 in different nucleotide states.* **Eur J Biochem.** 2003 Dec;270(24):4835-45.

Bódis, E., Strambini, G.B., Gonnelli, M., Málnási-Csizmadia, A. and Somogyi, B.: *Characterisation of F-actin tryptophan phosphorescence in the presence and absence of tryptophan-free myosin motor domain.* 2004, **Biophysical Journal** 2004 Aug;87(2):1146-54.

Posters

Bódis, E., Nyitrai, M., Hild, G., Halasi, S., Lukács, A., and Somogyi, B.: A miozin aktin-kötő régiójának vizsgálata fluoreszcenciás módszerekkel: az aktin és az ADP hatása. XXIX. Membrántranszport Konferencia. 1999, május 24-28, Sümeg.

Bódis E., Szarka K., Nyitrai M. és Somogyi B.: Irányfüggő flexibilitás a miozin S-1 katalitikus doménjén belül. XXX. Membrántranszport Konferencia. 2000, május 23-26, Sümeg.

Szarka, K. Bódis, E., Nyitrai, M. and Somogyi, B.: Direction-dependent flexibility in the catalytic domain of myosin subfragmentum 1. 2001. Graz, Austria

Szarka K. Bódis E., Lukács A. Nyitrai M. és Somogyi B.: Miozin és tropomiozin hatása az aktin filamentum flexibilitására. Magyar Biofizikus Társaság XX. Vándorgyűlése. 2001. Budapest.

Lukács, A., Nyitrai, M., Bódis, E., Hild, G. and Somogyi, B.: The effect of ADP on the flexibility and conformation of myosin-subfragment-1 in its complex with actin. European Muscle Conference 2001. Pavia, Italy

Bódis E., Szarka K., Strambini GB., Gonelli M., Nyitrai M. and Somogyi B.: Az aktin-kötő fehérjék hatása az aktin filamentum konformációjára és flexibilitására. XXXII. Membrántranszport Konferencia. 2002., május 23-26, Sümeg

