

Ph.D. értekezés tézisei

Az aktin kölcsönhatása forminnal: EPR és DSC vizsgálatok

Horváth-Kupi Tünde



Témavezetők:

Dr. Nyitrai Miklós

Dr. Belágyi József †

Pécsi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Biofizikai Intézet

Pécs

2015.

Ph.D. értekezés tézisei

Az aktin kölcsönhatása forminnal: EPR és DSC vizsgálatok

Horváth-Kupi Tünde

Interdiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola D93

Iskolavezető: Dr. Sümegi Balázs

Program: B-130; Funkcionális fehérjedynamika vizsgálata biofizikai módszerekkel

Programvezető: Dr. Nyitrai Miklós

Témavezetők: Dr. Nyitrai Miklós
Dr. Belágyi József †



Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Biofizikai Intézet
Pécs

1 Bevezetés

Az eukarióta citoszkeleton egyik legfontosabb alkotója az aktin, mely a sejtek alakjának és mozgásának biztosítása mellett szerepet játszik a sejten belüli transzport folyamatokban, a sejtosztódásban, endo- és exocitózisban, és számos további sejtfunkcióban. Az élő sejtekben az aktin globuláris monomerként (G-aktin), illetve filamentáris polimereként (F-aktin) található meg. Az aktin monomer 42,3 kDa molekulatömegű, két doménből álló fehérje. A domének további két-két szubdoménre oszthatók (S1-4). A két domén között található hasadék kationok (Mg^{2+} , Ca^{2+}) és nukleotidok (ATP, ADP, ADP- P_i) kötőhelyeként szolgál. A globuláris (G) aktin molekulák polimerizálva jobbra csavarodó, dupla helikális szerkezetű filamentumokat képeznek. A filamentumok kialakulása egy lassú nukleációs fázissal kezdődik, amikor a G-aktin molekulák összekapcsolódva dimereket és trimereket (ún. nukleuszokat) alkotnak. A következő, úgynevezett elongációs fázis során a további aktin monomerek kapcsolódása már gyorsabb, a filamentum hossza növekszik. Mivel az összekapcsolódó monomerek orientációja azonos, a filamentum poláris szerkezetű lesz. A dinamikus egyensúly beállta jelenti az utolsó fázist, melynek során az úgynevezett taposómalom (*treadmilling*) mechanizmus eredményeként a filamentumok hossza nem változik. Ilyenkor a filamentumok mindkét végén végbemegy a monomer asszociáció és disszociáció is, ám az úgynevezett szakállas végen (*barbed end*) az asszociáció, hegyes végen (*pointed end*) pedig a disszociáció folyamata dominál.

Az aktin fehérjék változatos szerkezetű filamentumokat képesek létrehozni, melyek alakjának és hossz-dinamikájának szabályozásában számos aktin-kötő fehérje játszik szerepet. A nukleáció folyamatát szabályozó nukleációs faktorokat három fehérjecsaládba sorolhatjuk. az ARP 2/3 fehérjék a már meglévő aktin filamentumon hoznak létre elágazó oldalágakat. A WH2-domént tartalmazó fehérjék, több aktin monomer megkötésével segítik a nukleuszok kialakulását. Ide sorolhatjuk a Spire, Cordon-bleu (Cobl), VopF/VopL és Leiomodin (Lmod) fehérje-családokat. A nukleációs faktorok harmadik családját alkotó forminok elágazásmentes filamentumokat hoznak létre.

A forminok nagyméretű, ezernél több aminosavból felépülő fehérjék, melyek evolúciósan konzervált doménekből épünek fel. A forminok részt vesznek a sejtmozgásban, a sejt polaritásának kialakításában, a sejtosztódásban, és számos más folyamatban. A fehérjecsalád közös szerkezeti jellemzői a Formin Homológia (FH) domének. A prolinban

gazdag FH1 domén a legtöbb, míg a leginkább konzervált FH2 minden forminban előfordul. Az FH2 domén filogenetikai analízise szerint a szövetes állatokban (*metazoa*) előforduló forminok hét alcsaládra oszthatók: Dia (*diaphanous*), DAAM (*dishevelled-associated activator of morphogenesis*), FRL (*formin-related gene in leukocytes*), FHOD (*formin homology domain containing protein*), INF (*inverted formin*), FMN (*formin*) és *delphinin*.

Az FH2 domén, egy kb. 400 aminosavból álló szekvencia, mely a forminok aktin kötéséért felelős. Az emlős FRL1, mDia1 és mDia2 FH2 domének szintén dimer szerkezetűek. Az FH2 domén tartalmaz egy mozgékony linker régiót az N-terminális közelében, mely elengedhetetlen szerepet játszik a dimerek kialakulásában. A dimereket alkotó, félhold alakú monomerek antiparallel módon kapcsolódnak össze. Majdnem minden forminban megtalálható a profilin-kötő FH1 domén az FH2 domén N-terminális szomszédságában, melynek hossza nagy változatosságot mutat (15-229 aminosav).

A forminok FH1 és FH2 doméneken kívüli részei jelentősen különbözhetnek. A harmadik Formin Homológia domén (FH3) számos forminnál az FH1 domén mellett, N-terminális irányban található meg, de önálló doménként való viselkedése még kérdéses. Az mDia1 forminnál az FH3-nak megfelelő régió legalább két különálló domént tartalmaz: a DID és a dimerizációért felelős szakaszt.

Az emlős forminok működésének szabályozása a Diaphanous-related forminok (DRF) körében a legismertebb. Ide tartoznak a Dia, FRL és DAAM alcsaládok, melyeket intramolekuláris szabályozásmódjuk hasonlósága alapján rokonítottak. Mindhárom alcsaládban megtalálható egy Rho-GTPáz-kötő domén (RBD) az N-terminális régióban. Az mDia1 forminban egy 241 aminosavból álló auto-inhibíciós régió található az RBD-ben, melyet *diaphanous inhibitory domain* (DID) néven is említene. Másik lényeges eleme a C-terminális DAD régió (*diaphanous auto-regulatory domain*), mely képes kapcsolódni az N-terminális szakaszhoz. A DID és a DAD régió összekapcsolódása eredményezi a formin működés gátlását. A Rho-GTPáz megkötésekor a DID- DAD kölcsönhatás felbomlik, és a formin fehérje aktiválódik.

Az FH2 domének különböző mértékben gyorsítják a nukleáció folyamatát. A forminok aktin nukleációt elősegítő hatása az instabil nukleációs köztes termékek stabilizálása révén valósul meg. Az FH2 domén egyik legfontosabb tulajdonsága, hogy képes kötődni az aktin filamentumok szöges végéhez, miközben képes processzív módon, folyamatosan

együtt mozogni a filamentum gyorsan növekedő szöges végével. Az FH2 domén további lényeges szerepe a sapka fehérjék kapcsolódásának gátlása, ami lehetővé teszi az aktin filamentum hosszabbodását sapka fehérjék jelenlétében is.

A formin egyik legvalószínűbb funkciója a sejtben, hogy az aktin filamentum szöges végéhez kapcsolódva védelmet nyújt a sapka fehérjékkel szemben. Gátló faktorok hiányában az újonnan képződött aktin filamentumokhoz kevesebb, mint egy másodperc alatt kapcsolódnak a sapka fehérjék, így a filamentumok hossza az 500 nm-t sem éri el. Formin jelenlétében az emlős sejtekben levő aktin alapú filamentumok hossza meghaladhatja az egy mikrométert.

2 Célkitűzések

Munkám az aktin citoskeleton szabályozási mechanizmusainak megismerését célzó, szélesebb körű kutatások részét képezte a PTE ÁOK Biofizikai Intézetében.

Céлом volt, hogy az aktin 2. alegységének vizsgálatához spin jelölésre alkalmas aminosavak kiválasztásával megfelelő jelölési módszert dolgozzak ki, s azt optimáljam. Az aktin két alegységének paramágneses jelölésével a következő kérdések mentén folytattuk vizsgálatainkat:

- Milyen rotációs dinamika jellemzi az aktin 1. és 2. alegységét a monomer és a filamentális aktin esetében?
- Hogyan változik a két alegység dinamikai tulajdonsága a hőmérséklet függvényében?
- Hogyan befolyásolja a formin FH2 domén kapcsolódása az aktin alegységek mobilitását?
- Hogyan változik az aktin dinamikájának hőmérsékletfüggése formin jelenlétében?

További munkám során az mDia1 formin FH2 doménjének EPR-es vizsgálatát kívántam elvégezni, amihez szükséges volt a formin spinnel való jelölésének kidolgozása.

- Milyen az mDia1 formin FH2 doménjének rotációs dinamikája a jelölt aminosav környezetében?
- Hogyan változik a formin mobilitása aktin jelenlétében?
- Hogyan befolyásolja a hőmérséklet változtatása a formin dinamikai tulajdonságait?
- Milyen hatással van az aktin kötődése a formin hőmérsékletfüggő dinamikai változásaira?

A formin FH2 doménjének jellemzését differenciál pásztázó kaloriméteres mérésekkel egészítettük ki. Az EPR és a DSC mérések közös értelmezésén keresztül az aktin-formin fehérje komplexen belüli kölcsönhatások még részletesebb megismerése vált lehetővé.

3 Anyagok és módszerek

3.1 Aktin preparálás

Az α -aktin fehérjét házi nyúl (*Oryctolagus cuniculus domestica*) hátizmából (*M. psoas*) nyertük. A preparálás első részében Feuer és munkatársai módszere szerint acetone forgácsot készítettünk. Az aktin acetone forgácsból való kinyerése Spudich és Watt módszere szerint történt. A kinyert aktint A-pufferben (4 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,2 mM ATP, 0,1 mM CaCl₂) 4 °C-on tároltuk felhasználásig. A G-aktin koncentrációt Shimadzu UV-2100 spektrofotométer segítségével határoztuk meg 290 nm-es hullámhosszon, 0,63 mg⁻¹·ml·cm⁻¹ abszorpciós koefficiens használva. Az F-aktin előállításához 2 mM MgCl₂-ot és 100 mM KCl-ot adtunk a tároló pufferhez, majd 2 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk a fehérjét.

3.2 Formin preparálás

Az emlős mDia1 formin FH2 doménjét korábban leírt módszerünk alapján preparáltuk. A formin fehérje tisztaságát SDS-poliakrilamid gélelektroforézis segítségével ellenőriztük. A fehérje koncentrációt fotometriásan határoztuk meg 280 nm-en, 20580 M⁻¹·cm⁻¹ extinkciós koefficiens segítségével.

3.3 Maleinimid jelölés

Az aktin filamentumokat 1:1,2 arányban 12 órán keresztül 2 °C-on inkubáltuk N-(1-oxil-2,2,6,6-tetrametil-4-piperidiny)-maleinimid spin jelölővel (MSL). A jelölést ultracentrifugálással állítottuk le (400000g, 45 perc, 4 °C), majd a felülúszóban maradt, nem kötődött jelölőt a felülúszóval együtt eltávolítottuk. Az aktin pelletet G-pufferben (4 mM Tris-HCl, pH 7.6, 0,2 mM ATP, 0,2 mM CaCl₂) felfuszpendáltuk, homogenizáltuk és G-pufferrel szemben dializáltuk. A jelölt protein koncentrációját ismert koncentrációjú MSL-oldatok EPR-spektrumaival való összehasonlítás során határoztuk meg.

3.4 F-proxil jelölés

Az aktint G-formában 1:1,2 molarányban inkubáluk 3-(5-fluoro-2,dinitroanilino)-(1-oxil-2,2,5,5-tetrametil-3-pirrolidin) (FDNA) spin jelölővel 24 órán keresztül 2 °C-on. A

jelölési eljárás végén a szabad spin jelölőt az oldatból G-pufferrel szemben dializálva távolítottuk el.

3.5 A formin FH2 domén spin jelölése

A fehérje doméneket 1:2 mólarányban jelöltük N-(1-oxil-2,2,6,6-tetrametil-4-piperidinil)-maleinimid spin jelölővel (MSL) 24 órán keresztül 2 °C-on. A nem kötődött jelölőt DTT-mentes T-pufferben való dialízissel távolítottuk el. A jelölési arányt a fehérje minta és ismert koncentrációjú MSL-oldatok EPR spektrumának összehasonlítása révén határoztuk meg.

3.6 Alkalmazott mérési módszerek

3.6.1 EPR spektroszkópia

Az elektron paramágneses rezonancia (EPR), más néven elektron spin rezonancia (ESR) spektroszkópia azon alapul, hogy a párosítatlan spinű elektronokat tartalmazó atomi vagy molekuláris rendszerekben az elektronspinhez kapcsolódó energiaállapotok mágneses térben energetikailag felhasadnak, azaz a spin állapottól függően különböző energiaállapotok különülnek el. Az eltérő energiaállapotok között ekkor megfelelő energiájú (frekvenciájú) elektromágneses sugárzással átmenetek generálhatók: abszorpció vagy az abszorpció után emisszió mérhető. Az elektronállapotok energiáját a paramágneses centrumnak a környezetével való kölcsönhatásai befolyásolják. Mivel a párosítatlan elektront tartalmazó atomok atommagjai is befolyásolják a mágneses térben lévő elektronok energiaállapotait, ezért az energiaállapotok leírásakor mind az elektron saját spinjét, mind az atommag (gyakran nem csak egyetlen atommag) spin állapotát is figyelembe kell venni. Az utóbbi kölcsönhatást írjuk le az ún. hiperfinom csatolási állandóval. A környezet polaritása megváltoztatja az elektroneeloszlás szimmetriáját, ami a hiperfinom csatolási állandó nagyságának változásában is jelentkezik.

A biológiai minták, így a fehérjék esetében *extrinsic* paramágneses szondák, vagy spin jelölők hozzákapcsolása szükséges a vizsgált molekulához, mivel a legtöbb biológiai (makro)molekula nem rendelkezik *intrinsic* paramágneses centrummal.

Fehérjék vizsgálatakor a spin jelölőt célzottan hozzákapcsolhatjuk egy adott aminosavhoz, ezáltal részletes információt nyerhetünk az adott fehérje alegység szerkezetéről, a jelölt

aminosav környezetéről. A vizsgált molekula konformáció változása nyomon követhető a spektrum alakjának, a karakterisztikus csúcsok helyzetének elemzésével.

A spinjelölés technikája során leggyakrabban nitroxid szabadgyököt tartalmazó paramágneses szondákat használnak (pirrol, pirrolidin, piperidin, oxazolin), melyek kovalensen kötődnek a vizsgált molekulához. Az EPR mérés során a nitroxid spin jelölő aszimmetrikus térbeli eloszlású 2π molekulapályája lép kapcsolatba a mágneses térrel. Munkám során maleinimid (MSL) és F-proxyl (FDNA) paramágneses szondákat használtam aktin, illetve formin fehérjék specifikus jelölésére.

3.6.1.1 Az EPR mérések kivitelezése

Elektron paramágneses rezonancia méréseinket ESP 300E (Bruker Biospin, Németország) spektrométeren végeztük. A konvencionális EPR spektrumokat általában 20 mW mikrohullámú teljesítménnyel, 100 kHz modulációs frekvencián rögzítettük, 0,1 – 0,2 mT modulációs amplitúdóval. Az ST–EPR spektrumok felvételéhez 63 mW teljesítményt és 50 kHz-es modulációs frekvenciát alkalmaztunk, 0,5 mT amplitúdóval.

Amennyiben szükséges volt, a spektrumokat a kétszeres integráljuk figyelembe vételével hasonlítottuk össze. Ennek az eljárásnak az alapján határoztuk meg a jelölési arányokat is. A jelölési arány meghatározásakor a fehérjék EPR spektrumait, azonos körülmények között (modulációs amplitúdó, mintatérfogó, erősítés, felvételi idő) mért, ismert koncentrációjú TEMPO oldatok EPR spektrumaival hasonlítottuk össze: a kétszeres integrálok értékei arányosak az adott mintatérfogóban lévő spinek, így a jelölt molekulák számával. A fehérjekoncentráció és a meghatározott spin jelölő koncentráció ismeretében a jelölési arány egyszerűen számítható.

Az EPR spektrumokat általában $23 \pm 0,1$ °C-on vettük fel. A hőmérsékletfüggő mérések esetében 0 °C és 60 °C között, 0,1 °C-os pontossággal vettük fel a spektrumokat.

3.6.2 Differenciál pásztázó kalorimetria (DSC)

A differenciál pásztázó kalorimetria (Differential Scanning Calorimetry, DSC) nagy érzékenységgel mérhető módszer a fehérjék, fehérje komplexek termodinamikai állapotváltozásainak vizsgálatára, melyek segítségével azok térszerkezeti stabilitása, konformációs változásai is leírhatóak.

A formin, aktin, illetve aktin-formin minták hődenaturációját SETARAM Micro DSC-III kaloriméter segítségével vizsgáltuk. Minden mérést 20 °C és 100 °C között végeztünk 0,3 K/perces felfűtési sebességgel. A kísérletek során Hastelloy mérőcellákat használtunk, mérésenként átlagosan 800 µl mintával. Referenciaként a vizsgált fehérje puffer oldatát használtunk.

4 Eredmények

4.1 EPR mérések

4.1.1 A Cys-374-en jelölt aktin vizsgálata

Az aktin 1. alegységének EPR vizsgálatához az maleinimid (MSL) paramágneses jelölőt alkalmaztuk, mely a Cys-374 aminosavhoz képes szelektív módon kapcsolódni.

Az aktin filamentumokon mért konvencionális EPR spektrumok csatolási állandója szobahőmérsékleten $2A'_{zz}$ $6,803 \pm 0,010$ mT volt ($n = 22$ mérés átlagából). Az ebből az értékből számított rotációs korrelációs idő $\tau_2 \sim 50$ ns volt, ami a jelölt aktin domén mozgását tükrözi.

A szaturáció transzfer EPR spektrumok L''/L értéke F-aktin esetében $0,91 \pm 0,05$ ($n = 12$) volt, ami körülbelül 100-120 μ s-os rotációs korrelációs időnek felel meg. Az ST-EPR mérések C'/C diagnosztikus paramétere $0,09 \pm 0,12$ ($n = 12$) volt. Az ST-spektrumok paraméterei az aktin filamentum több szomszédos alegységének együttes, torziós mozgását jellemzik.

Munkánk további részében mDia1 FH2 formin MSL-jelölt aktinra gyakorolt hatását vizsgáltuk.

A konvencionális EPR méréseket 1 : 50, 1 : 25, 1 : 10 és 1 : 5 formin : aktin molarányú mintákon végeztük. A forminnak az MSL-aktinhoz való kapcsolódása a csatolási állandó ($2A'_{zz}$) csökkenését eredményezte minden minta esetében. Az alacsony terű csúcsok arányának elemzése Mason és Freed módszere szerint az aktinon levő jelölő rotációs korrelációs idejének csökkenését mutatta; 25 : 1-es aktin : formin aránynál a korrelációs idő 50 ns-ről 30 ns-ra csökkent. A többi aktin-formin aránynál is hasonlóan rövidebb rotációs korrelációs időket számoltunk.

A formin FH2 aktin filamentumokhoz való hozzáadása után a konvencionális EPR spektrumokon a gyors forgású tartományra jellemző spektrumvonalak amplitúdóinak növekedését tapasztaltuk. A spektrumok két részből tevődnek össze: 1.) olyan spin jelölők spektrumából, ami az aktin filamentum egészének a mozgását tükrözi; 2.) a fellazult szegmenseknek tulajdonítható spektrális járulékból. A második komponens járulékát a különbségi spektrumok alapján határozhatjuk meg. Az újonnan megjelent spektrumkomponens kétszeres integrálja a teljes EPR abszorpció körülbelül 10%-át adja.

A szaturáció transzfer EPR mérések során mind az L^*/L és a C^*/C diagnosztikus EPR paraméter a jelölő megnövekedett immobilizációját mutatta a formin F-aktinhoz történő hozzáadása után. Ugyanakkor a formin : aktin koncentráció arány növelésekor az ST–EPR paraméterek csak kis mértékben változtak. Az alacsony térerejű L^*/L paraméterek alapján az aktin filamentum rotációs korrelációs ideje 100 μ s-ról 150 μ s-ra nőtt a formin kötése után. Ugyanakkor a C^*/C paraméter felhasználásával számított rotációs korrelációs érték 7 μ s-ról 40 μ s-ra nőtt.

4.1.1.1 Hőmérséklet hatása az MSL-aktinra és forminnal alkotott komplexére

Az EPR technika lehetővé teszi a spinjelölt fehérjék különböző hőmérsékleten való vizsgálatát is. A Cys-374-en jelölt aktint és formin FH2-vel alkotott komplexét 0 és 60 °C közötti tartományban vizsgáltuk.

A hiperfinom csatolási állandó értékek $1000/T$ függvénye minden esetben lineárisnak bizonyult, ám a regressziós együttható (b) kissé különbözött az eltérő aktin-formin arányoknál. 1 : 25 formin- aktin molaránynál a regressziós együttható $b = 0,392 \pm 0,008$ és $b = 0,519 \pm 0,014$ volt F-aktin és F-aktin-formin komplex esetében, míg 1 : 5 aránynál a $b = 0,402 \pm 0,018$ és $b = 0,540 \pm 0,022$ értéket számoltunk F-aktin és F-aktin-forminra vonatkozóan. Az aktin-formin komplex hiperfinom csatolási állandója az egész vizsgált hőmérsékleti tartományban kisebb volt, mint az F-aktiné.

A kötött spin jelölő rotációs korrelációs idejét a Goldman egyenlet segítségével számíthatjuk ki:

$$\tau = a (1 - 2A'_{zz} / 2A^r_{zz})^b$$

ahol $a = 5,4 \times 10^{-10}$ s és $b = -1,36$. A molekulák rotációs diffúziójának hőmérsékletfüggésére is alkalmazható a diffúziós együttható és a diffúzió aktiválási energiája közötti Arrheniusi összefüggés. Az Arrhenius-féle összefüggés alapján meghatároztuk a rotációs diffúzióra vonatkozó aktiválási energiákat. F-aktin esetében a számításaink $E_a = 18$ kJ/mol, F-aktin-formin komplex esetében $E_a = 15$ kJ/mol értékeket adtak. Rigid limitként $2A^f_{zz} = 7,055$ mT-t használtunk. Ezt a rigid limit értéket F-aktin mintán határoztuk meg 40%-os cukoroldatban, - 18 °C hőmérsékleten.

4.1.2 FDNA- jelölt aktin vizsgálata

Az aktin 9 kDa-os 2. alegységének EPR vizsgálatához az FDNA paramágneses jelölőt alkalmaztuk, mely a Lys-61 aminosavhoz képes szelektív módon kapcsolódni.

Az F-aktinhoz kapcsolódó FDNA jelölő EPR spektrumán mért maximális felhasadási érték szignifikánsan kisebb ($2A'_{zz} = 6.121 \pm 0.021$ mT, ($n = 21$)), mint az MSL-F-aktiné.

Az FDNA-jelölt F-aktin konvencionális EPR spektrumán a magas térerejű spektrumkomponens kiszélesedése, egyes esetekben kettős csúcs, tapasztalható. Ez a jelenség arra utal, hogy a Lys-61-hez kapcsolódó spin jelölőnek két különböző rotációs dinamikájú konformációja van, vagy arra, hogy néhány jelölő másik aminosavhoz kötődik, pl. a Lys-113-hoz. Ezzel ellentétben az FDNA G-aktin spektrumából csupán egy csatolási állandó érték származtatható, melynek átlagértéke $2A'_{zz} = 5,912 \pm 0,05$ mT ($n = 7$). Ez arra utal, hogy a jelölő az F-aktin esetén is csak egy Lys-hez kapcsolódott, mert az F-aktint a jelölt G-aktin minta polimerizációjával kaptuk. A szimulációval nyert csatolási állandó rigid limitjének (6,915 mT) felhasználásával a G-aktinon levő FDNA-jelölő rotációs korrelációs ideje $\tau \sim 8-9$ ns-nak bizonyult. Ez az érték rövidebb, mint az egész monomer molekula rotációs korrelációs ideje (~ 18 ns), ami arra utal, hogy a Lys-61-et tartalmazó szegmens a teljes monomerhez képest is mozgást végez.

Formin hozzáadása után az FDNA-jelölt F-aktin konvencionális EPR spektruma a mobilitás növekedést mutatott, amit a csatolási állandó csökkenésén túl egy új spektrumkomponens megjelenése is kísért. A spektrum mobilis részének megjelenése szinte teljesen független volt a formin : aktin aránytól 1 : 10 alatt. A formin aktinhoz való kötődése által indukált konformációs változás mobilitás növekedést eredményezett a Lys-61-es aminosav környezetében. Ezzel ellentétben a 120-150 μ M-os koncentrációjú FDNA-jelölt aktinon és aktin-formin komplexen végzett ST-EPR mérések az L'/L és a C'/C paraméterek növekedését mutatták, ami az aktin filamentum mobilitásának csökkenését jelzi.

4.1.2.1 Az FDNA-aktin hőmérsékletfüggő vizsgálata

Az FDNA-jelölt aktin és aktin-formin mintákon a csatolási állandó és a reciprok abszolút hőmérséklet között szigmoid összefüggést találtunk. Mindemellett nem állapítottunk meg különbséget az aktin és az aktin-formin komplex spektrumának hőmérsékletfüggésében. A 0 és 60 °C-on mért konvencionális spektrumok vizsgálata azt mutatta, hogy bár

mindkét esetben két, összeadódó spektrumkomponens van, csak az egyikük határozza meg a mért csatolási állandót. Ezt a feltételezést a későbbiekben bemutatott spektrum szimuláció eredményei is alátámasztják. A rotációs diffúzió hőmérséklet-függésére vonatkozó értelmezés alapján a külső csúcsok hőmérsékleti függését egy szigmoid Boltzmann-függvénnyel kíséreltük meg illeszteni:

$$2A'_{zz}(z) = [(2A'_{zz,\min} - 2A'_{zz,\max}) / (1 + \exp(z - z_0/\delta z))] + 2A'_{zz,\max}$$

ahol z_0 az inflexiós pont és δz a növekedési sebesség. $2A'_{zz,\min}$ és $2A'_{zz,\max}$ a mérés során nyert legkisebb és legnagyobb csatolási állandók. A legjobb illeszkedést a $z = 1000/T$; $z_0 = 3,256$ (34 °C); $\delta z = 0,155$ paramétereknél, $2A'_{zz,\min} = 5,10$ mT és $2A'_{zz,\max} = 6,94$ mT értékeknél találtuk. A különböző hőmérsékleten mért EPR spektrumok szimulációja azt mutatta, hogy egyik spektrum sem írható le egyetlen lassú mozgású komponenssel, mivel a mobilis komponens minden kísérleti spektrumon látható volt, de kb. 30 °C alatt elhanyagolhatóvá vált. A gyors forgású tartományba eső spektrumkomponens mellett minden esetben két eltérő, lassabb korrelációs idejű járulék volt szükséges a kísérleti spektrumok szimulációjához: egyetlen, izotróp Brown rotációs diffúzióval nem lehetett leírni a Lys-61-en jelölt F-aktin forgását.

4.1.3 mDia1 FH2 forminon végzett EPR mérések

A maleinimiddel jelölt G- és F-aktinnal ellentétben a formin EPR spektruma a jelölők inhomogén eloszlását mutatta: mind a gyengén, mind az erősen immobilizálódott MSL molekulák jele detektálható volt. A kísérleti spektrumok számítógépes elemzése során sikerült szétválasztani a két populáció elemeit. A jelölő molekulák kb. 60%-a erősen immobilizálódott állapotban volt. Az MSL-formin csatolási állandója $2A'_{zz} = 6,538 \pm 0,044$ mT ($n = 4$) volt szobahőmérsékleten. A forminon erősen immobilizálódott jelölő rotációs korrelációs ideje 25 ns volt, míg a gyengén immobilizálódott jelölő esetében 3,5 ns értéket számoltunk. Az F-aktin MSL-forminhoz való hozzáadása a csatolási állandó növekedését eredményezte: ez az érték 6,538 mT-ről 6,727 mT-ra nőtt amint az aktin : formin molarányát nulláról 1 : 1-re növeltük, míg $6,640 \pm 0,032$ mT ($n = 7$) értéket mértünk 5 : 1 aktin-formin molarány esetében. A formin aktinhez való kötődésének hatása a fehérjék molarányától függetlenül tűnt a jelölt formin szegmens környezetében.

4.1.3.1 MSL-forminon végzett hőmérsékletfüggő EPR mérések

A spinjelölt formin konformációját különböző hőmérsékleten végzett EPR mérésekkel is vizsgáltuk a 0 és 60 °C közötti tartományban, 5 °C-os lépésekben. A hőmérséklet emelkedésével a mobilis EPR jelhez tartozó populáció aránya nőtt (ezt az I_{+1} csúcs relatív amplitúdója jelzi), ezzel egyidejűleg az immobilis populáció hiperfinom csatolási állandója csökkent. A csatolási állandó reciproka hőmérséklet függvényében való ábrázolásakor 40 °C körül egy töréspont figyelhető meg, ami a fehérjében bekövetkezett konformációs változásra utal. A rotációs korrelációs időt a Goldman, Bruno és Freed által javasolt összefüggés alapján határoztuk meg, $2A_{zz}^r = 7,104$ mT rigid limit értéket használva. A hőmérsékletfüggő mérések eredményei alapján egy töréspont azonosítható 42,8 °C körül. Az aktiválási energiák ezek szerint a töréspont előtt, illetve után különböztek egymástól; a számított aktivációs energia 23,5 kJ/mol, illetve 14,6 kJ/mol volt. Ugyanakkor a paramágneses jelölő környezetében nem lép fel jelentős konformációváltozás az aktinnal való kölcsönhatás eredményeként. Mindezen eredmények nem zárják ki azt a lehetőséget, hogy a formin–aktin kölcsönhatás során olyan konformációváltozás lép fel, ami a forminnak csak kisebb-nagyobb szegmensére terjed ki. Meghatároztuk az I_{+1}/I_m hányadost, ahol I_m az alacsony térerőhöz tartozó csúcs magassága, I_{+1} pedig a gyengén immobilizálódott jelölőtől származó jel csúcs-csúcs magassága. Az I_{+1}/I_m arányt ábrázolva a reciproka abszolút hőmérséklet függvényében közel exponenciális összefüggést kaptunk. Aktin jelenlétében az exponenciális függvény lecsengési állandója szignifikánsan kisebb, azaz a formin aktin kölcsönhatás befolyásolja a mobilis/immobilis populációk arányát. A mért EPR spektrumok alapján az MSL-formin és aktinnal alkotott komplexének spektrumai mobilis és immobilis komponensekből állnak. A komponensek relatív aránya függ a hőmérséklettől.

Számítástechnikai módszerek segítségével kiszámítható a két komponens kétszeres integráljának aránya, azaz a komponensek relatív járuléka az $m = +1$ EPR átmenetnél, a hőmérséklet függvényében. A_{im} jelöli az erősen immobilizálódott jelölőhöz tartozó alacsony térerejű spektrumrész kétszeres integrálját, míg A_m a gyengén immobilizálódott jelölőktől származó jel első komponensének kétszeres integrálja. Az A_{im}/A_m arány – ami megegyezik az adott hőmérsékleten meghatározható egyensúlyi állandóval (K) – exponenciális összefüggést mutat az abszolút hőmérséklet reciprokának függvényében. A szabadenergia változás (ΔG) esetünkben 6,7 kJ/mol volt $T_m = 20$ °C-on. A $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ összefüggést használva kiszámítható az entalpia és az entrópia változása is;

$\Delta H = 55 \text{ kJ/mol}$ és $\Delta S = 0,16 \text{ kJ/mol}\cdot\text{K}$, a T_m -nek megfelelő hőmérsékleten. A van't Hoff ábrázolás alapján, ebben a hőmérséklet tartományban a reakció szabadentalpia változása állandónak tekinthető, ami az aktinnak és a forminnak a kölcsönhatási folyamatában az immobilis \leftrightarrow mobilis átalakulását jellemzi.

4.2 DSC mérések

A formin (FH2) és a formin-aktin komplexek DSC átmenete kalorimetrikusan irreverzibilis volt. Az olvadási hőmérséklet $T_m = 43,1 \text{ }^\circ\text{C}$ volt. A kalorimetrikus entalpiaváltozás $\Delta H = 104 \text{ kJ/mol}$, az entrópia változás $\Delta S = 0,33 \text{ kJ/molK}$ a T_m -nek megfelelő hőmérsékleten. A Gibbs-féle szabadenergia változás: $\Delta G = 7,7 \text{ kJ/mol}$; $t = 20 \text{ }^\circ\text{C}$ -on. A PeakFit 4.0 program (Jandel Scientific) segítségével a termikus átmenet többlet hőkapacitása ($C_{p,ex}$) jól illeszthető volt egy exponenciálisan módosított Gauss-görbével (EMG függvény). A függvény maximuma $T_m = 43,19 \text{ }^\circ\text{C}$ -nál volt, félérték szélessége pedig $dW = 4,95 \text{ }^\circ\text{C}$ -nek adódott.

A DSC mérés során felvett termogramokat a Conjero-Lara és munkatársai által kidolgozott módszer szerint összehasonlítottuk a szimulált görbékkel. A szimulált hőmérsékleti görbék megfelelő paraméterei – olvadási hőmérséklet, félérték szélesség – jól közelítették a mért átmeneteket, figyelembe véve a kísérleteinkben elérhető jel/zaj arány mértékét. A formin FH2 domén F-aktinhoz való hozzáadása befolyásolta a fehérje komplex átmeneti hőmérsékletét formin-aktin komplexen mért átmeneti hőmérséklet csökkenése $1,5\text{--}2 \text{ }^\circ\text{C}$ volt a formin-mentes aktin mintákhoz képest. Ezek az eredményeink megfeleltek a korábbi megfigyeléseknek, melyek szerint a formin aktin filamentumokhoz való kapcsolódása csökkenti az aktin termodinamikai stabilitását.

A formin-F-aktin molarány változtatásával a komplex átmeneti hőmérséklete változott. Amennyiben az aktin:formin molarány $3 : 1$ volt, a mért $T_m = 66,5 \text{ }^\circ\text{C}$; $5 : 1$ aránynál $T_m = 65,1 \text{ }^\circ\text{C}$; $10 : 1$ aránynál pedig az érték megközelítette a formin mentes F-aktin átmeneti hőmérsékletét, $T_m = 68,2 \text{ }^\circ\text{C}$ -ot. Az aktin-formin komplex DSC görbéjének alakja arra utal, hogy az átmenet nem egy egyszerű kétállapotú folyamat, valószínűleg több kölcsönható domén egymást követő és/vagy összehangolt kitekeredését foglalja magába.

Az átmeneti görbék aszimmetriája kvázi-független egységek összegződéséből adódhat, ami a szerkezeti domének közötti szétcsatlóadás eredménye. Ennek oka a több doménből

álló fehérjében lezajló, hőmérséklet indukálta konformációs változás, vagy a fehérje komplex alegységei közötti megváltozott kölcsönhatás lehet.

5 Következtetések

A konvencionális és szaturáció transzfer EPR segítségével nyomon követtük az aktin és a formin kölcsönhatásakor bekövetkező lokális és globális konformációs változásokat mind az aktin, mind a formin fehérjékben. Az aktin Cys-374 és Lys-61-es aminosavának paramágneses jelölésével lehetővé vált az 1. és a 2. aktin alegység konformációjának összehasonlítása, továbbá a formin indukálta változások vizsgálata is.

Az FDNA-aktintól származó konvencionális spektrum csatolási állandója kisebb volt az MSL-aktin csatolási állandójánál, ami a 2. alegység lazább konformációjára utal. A forminnak az F-aktinhoz történő hozzáadása mindkét jelölő esetében a konvencionális spektrumokon mérhető csatolási állandó csökkenését eredményezte. Az MSL-aktin esetében kifejezettebb változást tapasztaltunk. Ennek oka az MSL-jelölő környezetének eleve merevebb szerkezete lehet. A csatolási állandó csökkenése mindkét jelölés esetében csak kis mértékben függött a formin-aktin koncentráció aránytól.

A mDia1-FH2 képes kötődni az aktin filamentumok oldalához is, ám ennek a kötődésnek az affinitása gyenge. Az aktin szöges végéhez jóval nagyobb affinitással kötődnek a forminok (20–50 nM). Figyelembe véve az alacsony formin-aktin koncentráció arányt, kizárhatjuk, hogy a formin a filamentumok oldalához kötődve idézte elő a megfigyelt hatást. Eredményeink jó egyezést mutatnak a korábban közölt fluoreszcenciás mérésekkel, amelyek a formin hatására az aktin protomerek flexibilitásának növekedését mutatták.

A hőmérsékletfüggő EPR mérések szerint az MSL-aktin és F-aktin-formin komplex csatolási állandója lineáris összefüggést mutatott a reciprok abszolút hőmérséklettel. Az aktin-formin komplex csatolási állandója a teljes 0–60 °C-os tartományban kisebb volt az F-aktinnál mért értékeknél, továbbá a komplex aktivációs energiája is alacsonyabb volt, mint az MSL-aktiné. Ezek az eredmények alátámasztják a már korábban közölt kalorimetriás megfigyeléseket, melyek szerint a formin hatására csökken az aktin filamentumok denaturációs hőmérséklete.

A formin FH2 domén paramágneses jelölésével lehetőség nyílt az aktin-formin kölcsönhatás forminra gyakorolt hatásának vizsgálatára. Az MSL-formintól származó, szobahőmérsékleten mért, összetett konvencionális EPR spektrumból két csatolási állandó értéket tudtunk meghatározni, amelyekből 25,0 ns-os és 3,5 ns-os rotációs korrelációs időket számoltunk. Az erősen immobilizálódott jelölő populáció aránya körülbelül 60%

volt. A hosszabb korrelációs idő valószínűleg a formin FH2 monomer mozgását jellemzi. A formin dimerek processzív módon képesek együtt mozogni az aktin filamentumok növekvő pozitív végével. Ennek megfelelően a formin monomerek közötti flexibilis kapcsolat kulcsfontosságú lehet a formin processzív sapkafehérjeként való működésében.

A hőmérsékletfüggő EPR mérések szerint a csatolási állandó csökkent, a mobilis komponens aránya nőtt a hőmérséklet növelésével. A csatolási állandók hőmérsékletfüggése egy konformációs változásra utal 41 °C körül. A formin szerkezetének fellazulása az átmeneti hőmérséklet fölötti tartomány aktivációs energia csökkenésében is megmutatkozott. A 41 °C alatt és fölött mért csatolási állandók közötti különbség kicsi volt, azaz a jelölők rotációs mobilitása ezen a hőmérsékleten csak kis mértékben változott. Ennek magyarázata a jelölő környezetének eleve flexibilis szerkezete lehet. F-aktin MSL-forminhoz való hozzáadása a csatolási állandó növekedését eredményezte a teljes hőmérsékleti tartományban, ami a formin szerkezetének rigidebbé válására utal. A csatolási állandók hőmérsékletfüggése MSL-formin-aktin komplex esetében 44,2 °C-nál mutatott hődenaturációra utaló töréspontot.

Az mDia1 formin FH2 doménjének termodinamikai jellemzését kalorimetriás vizsgálatokkal egészítettük ki. A formin FH2 domén átmeneti hőmérséklete 43,1 °C volt. Az aktin-formin komplex átmeneti hőmérséklete megközelítette az F-aktinra jellemző értéket, de annál körülbelül 2 °C-al alacsonyabb volt, ami a korábban közölt DSC eredményekkel jó egyezést mutatott. A forminra jellemző denaturációs átmenet nem volt kimutatható aktin-formin minták esetében. Ennek oka egyrészt a formin alacsony koncentrációja lehetett a vizsgált mintákban, másrészt az aktin forminra gyakorolt stabilizáló hatása is előidézhetette az átmeneti hőmérséklet eltolódását 60 °C fölé.

A hőmérsékletfüggő EPR és a DSC eredmények közötti különbségek oka a két módszer érzékenységének különbsége abban a tekintetben, hogy a konvencionális EPR a spinjelölt aminosav környezetének szegmentális mozgását tükrözi, míg a DSC átmenetek a teljes fehérje, vagy fehérje komplex termodinamikai változásait jellemzik. A két módszer alkalmazásával tehát mind a forminon belüli lokális, mind a teljes aktin-formin komplex globális szerkezeti és dinamikai tulajdonságai vizsgálhatók.

Mindezen megfigyeléseink rávilágítottak arra, hogy a forminokon belül a különböző környezeti faktorok és partner molekulák hatására számos konformációs állapotváltozás jelentkezik. Ezek egy összetett rendszert alkotnak. Ezen konformációs átmeneteket csak

egyres esetekben tudjuk közvetlenül kapcsolni a funkcióbeli módosulásokhoz, szükségletekhez, és számos további szerkezeti módosulás szerepe még tisztázásra vár.

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Tünde Kupi, Pál Gróf, Miklós Nyitrai and József Belágyi: The uncoupling of the effects of formins on the local and global dynamics of actin filaments. *Biophys J.* Vol. 96 (2009), 2901-2911

Tünde Kupi, Pál Gróf, Miklós Nyitrai and József Belágyi: Interaction of formin FH2 with skeletal muscle actin. EPR and DSC studies. *Eur Biophys J.* Vol. 42 (2013), 757-765

Az értekezésben nem szereplő közlemények

Réka Dudás, Tünde Kupi, Andrea Vig, József Orbán and Dénes Lőrinczy: Effect of Phalloidin on the Skeletal Muscle ADP-actin Filaments. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, Vol. 95 (2009) 3, 709 – 712.

Andrea Vig, Réka Dudás, Tünde Kupi, József Orbán, Gábor Hild, Dénes Lőrinczy and Miklós Nyitrai: Effect of Phalloidin on Filaments Polymerized from Heart Muscle ADP-actin Monomers. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, Vol. 95 (2009) 3, 721 – 725.

Tamás Deák, Tünde Kupi, Róbert Oláh, Lóránt Lakatos, Lajos Kemény, György D. Bisztray, Ernő Szegedi: Candidate plant gene homologues in grapevine involved in *Agrobacterium* transformation. *Cent. Eur. J. Biol.* 8(10), (2013), 1001-1009

Tünde Kupi, Tamás Deák, Ernő Szegedi: Detection of self-complementary inverted repeats by a single forward primer driven PCR. *Acta Biologica Szegediensis*, Vol. 58. (2014)