

# Nitroxid spinjelölők a motor proteinek kutatásában.

BELÁGYI József

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Biofizikai Intézet

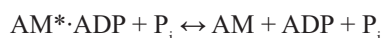
Szigeti u. 12, 7624 Pécs, Magyarország

Az élő rendszerek alapvető tulajdonsága, amely megkülönbözteti őket élettelen környezetüktől, hogy olyan belső felépítéssel és szervezettséggel rendelkeznek, amellyel vektoriális folyamatokat képesek elvégezni, mint pl. jól meghatározott irányban végzett mozgás, anyag- és energiateranszport sejtek membránjain keresztül, magasan szervezett makromolekuláris struktúrák és organellumok felépítése. A folyamatokat többnyire olyan fehérje gépezetek végzik, amelyek kémiai energiát használnak fel a biokémiai és biológiai folyamatok irányítására és megvalósítására.

A protein gépezetek családjából az egyik legrészletesebben tanulmányozott csoport az eukarióta sejtekben az ATP-t hidrolizáló motor proteinek, amelyek három szuperfamiliát alkotnak: a kinezin, a miozin és a dynein szuperfamilót, a család tagjai a sejten belüli mozgások - transzport és erőgenerálás - döntő többségéért felelősek. A motor proteinek fontos szerepet játszanak az izmok kontrakciójában, a csillómozgásban, a sejtosztódásban. A szuperfamilia egyes tagjai aminosav összetételüket tekintve hasonló motor doménnel rendelkeznek, ezek alkotják a motor fehérje erőgeneráló elemét, és az erőgenerálás folyamatában közreműködnek az ATP hidrolízisében. A motor doménhez egy rúdalakú domén/alegység kapcsolódik, amely a biológiai szereptől függően változó szerkezetű.

A harántcsíkolt izomban a miozin működése az izom rövidülésében és az erő kifejtésében nyilvánul meg. Az erő kifejtés és a rövidülés egy másik fehérjével, az aktinnal való ciklikus kölcsönhatás eredményeként valósul meg, amely az ATP hidrolízis során megy végbe. Az ATP hidrolízis ciklus folyamán a  $\beta$ - $\gamma$  foszfát kötés hasításakor a szabadentalpia változás  $\Delta G = -1.4$  kcal/mol, míg nem-enzimatikus reakcióban - oldatban - a szabadentalpia változás kb.  $-7.5$  kcal/mol, ami azt jelenti, hogy a hidrolízis és erőgenerálás folyamata elválik egymástól; a kémiai energia más formában az enzim-szubsztrát komplexben halmozódik fel. Az anorganikus foszfát disszociációja során vagy közvetlen azt követően történik olyan konformációváltozás az aktin-miozin komplexben, amely az erőgenerálást eredményezi, és képessé teszi a miozint egy újabb ATP molekula hidrolízisére<sup>1,2</sup>.

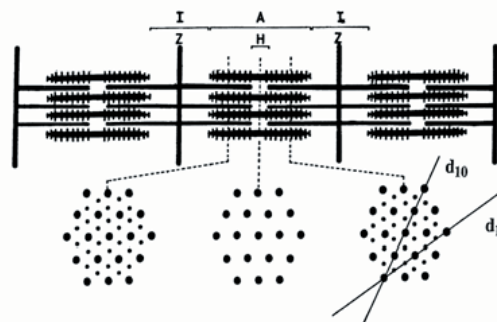
A miozin által katalizált ATP hidrolízis biokémiai ciklusa 1974 óta Bagshaw és Trentham<sup>3</sup> nyomán jól ismert:



ahol M jelenti a miozint, A az aktint, a csillaggal jelzett megkülönböztetés pedig köztes konformációs állapotokra utal. A ciklust 1974 óta eltelt időszakban többen módosították, finomították, de lényegét tekintve a séma változatlan maradt. Az ATP két lépésben kötődik a miozinhoz, az elsőt

a diffúzió határozza meg, amelyet egy gyors irreverzibilis konformációváltozás követ. Az ATP hidrolízisét követően a termék kötve marad, majd egy lassú protein izomerizáció után az anorganikus foszfát gyorsan ledisszociál. A feltételezések szerint az anorganikus foszfátot ( $P_i$ ) követő disszociáció után következik az erőgeneráló lépés, amely szabadentalpia változással és az ADP disszociációjával van összekapcsolva.

A harántcsíkolt izom fénymikroszkópos szerkezetének megismerése szolgáltatta az alapot H. Huxley<sup>4</sup> és munkatársai számára, hogy kidolgozzák a izomműködés sliding hipotézisét, amely a miozin molekula ATP-t kötő és hidrolizáló két feji részének ciklikus mozgását tételezi fel (1. ábra). A miozin molekula feji részeinek az aktin molekulával történő kölcsönhatása konformációs változást generál, amelynek eredménye az aktin filamentumok csúszó mozgása. A miozin feji részeinek mozgását ismétlődő, evezőlápatyszerű mozgásnak tételezik fel.

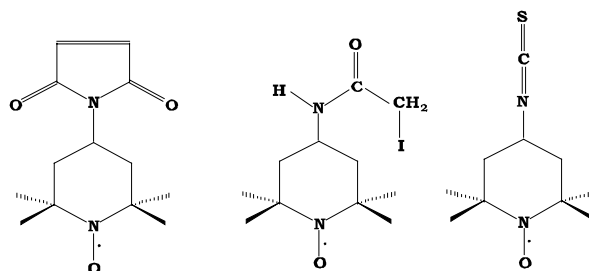


1. Ábra. A harántcsíkolt izom szerkezetének elektronmikroszkópos képe (JEOL 100 C mikroszkóp, eredeti nagyítás 12.500) és vázlatos felépítése. A szarkomer (Z-Z csík, kb. 2.2-2.5  $\mu$ m) az izomműködés legkisebb működőképes egysége. A vastag filamentumok miozinból (A szakasz), a vékony filamentumok aktinból (I szakasz) épülnek fel. A vastag filamentumból nyúlnak ki a miozin ATP-t hasító feji részei. A sliding mozgás a szarkomer rövidülését eredményezi. A keresztmetszeti képen feltüntetett rácssíkokon elhajló röntgensugarak elemzésével következtetnek a működés sajátosságaira.

Az elmúlt két évtizedben számos erőfeszítés történt a különböző laboratóriumokban különböző módszerekkel, hogy a miozin molekula feji részének orientációját és mozgását detektálják, és segítségével értelmezzék az izom- és biológiai mozgások mechanizmusát. Fontos és a további kutatások számára gyümölcsöző részeredményeket szolgáltatott az elektronmikroszkópos, a röntgendiffrakciós és az optikai kettőtörésen alapuló módszerek, valamint a mágneses rezonanciát felhasználó technikák. A különböző módszerek természetesen a mozgás különböző aspektusait tárják fel. Az elektronmikroszkópos technikákat és a röntgendiffrakciót alkalmazó módszerek elsősorban az erőgenerálásban szerepet játszó protein molekula globális szerkezetéről adnak felvilágosítást, míg a jelző molekulát alkalmazó spektroszkópai módszerek, így a fluoroforral illetve spin szondával dolgozó spektroszkópai eljárások inkább a jelölt hely környezetében végbemenő lokális változásokról tudósítanak. A módszerek egy része pl. az elektronmikroszkópos technika nem rendelkezik elegendő érzékenységgel az orientáció változásának detektálására, a jelző molekulával dolgozó módszerek esetén pedig a spektroszkópai jel értelmezése lehet problematikus.

Miozinhoz, aktinhoz, valamint az izomműködést szabályozó regulációs fehérjékhez kapcsolt paramágneses vagy fluoreszkáló szondákat sikerrel alkalmaztak fehérjerendszerek és izommodellek tanulmányozására. A molekuláris szondák célzottan kapcsolhatók egy-egy aminosav oldalláncához kémiai kötés segítségével. Szerencsés esetben, és ezt komoly biokémiai vizsgálatok előzik meg, a molekuláris próbák még szupramolekuláris komplex esetén is szelektíve kapcsolhatók egy-egy kiszemelt csoporthoz, a molekuláris szonda spektroszkópai tulajdonsága révén a kapcsolódási hely és annak környezetében bekövetkező változásokról, a változások dinamikájáról tudósít. Rigid kapcsolat esetén a molekuláris szonda mozgása követi a fehérje vagy annak működés szempontjából lényeges alegysége mozgását. Hasonlóan, ha a makromolekulák térbeli rendezettséget mutatnak, mint esetünkben a miozin vagy aktin molekulák a szarkomér A- és I-szakaszaiban (1. ábra), akkor a molekuláris szondák elárulják a térbeli rendezettséget és a térbeli rendezettségben a működés közben bekövetkező változásokat. A biokémiai módszerek felhasználásával elvégzett kísérletek meglehetősen részletes képet tudnak ma már adni az aktin és miozin kölcsönhatásáról és az ATP felhasználás egyes közbülső lépéseiről. A kérdés az, milyen dinamikai állapotok és fehérje konformációk felelnek meg az izom rendezett szupramolekuláris rendszerében az egyes biokémiai módszerekkel azonosított közbülső állapotoknak. Elegáns kísérletekkel, mint pl. fény hatására bomló vegyületből kiszabaduló ATP-vel (caged ATP) - ez biztosítja, hogy a mérés kezdetén az izomrostok belsejében mindenütt elegendő ATP áll rendelkezésre az izom működéséhez - sikerült kimutatni a miozin feji régiójának mozgását kontrakció közben. Mivel a protein molekulák nem merevek, hanem felépítésüknél fogva flexibilis struktúrával rendelkeznek, remény van arra, hogy megismerjük azokat a belső mozgási folyamatokat és konformációs változásokat, amelyek az ATP hidrolízisét kísérik, és megmutatják a kémiai energia mechanikai energiává alakulásának elemi lépéseit.

A Pécsi Tudományegyetem Orvostudományi Kar Bioanalitikai Intézetében az elmúlt másfél évtizedben elsősorban az electron paramágneses rezonancia technika felhasználásával végeztünk méréseket harántcsikolt izomból preparált fehérjéken és vékony izomrostot kötegen a spinjelölés lehetőségeinek felhasználásával. A globális konformációváltozások megismerésére a differenciális pásztázó kalorimetria (DSC) módszerét alkalmaztuk. Szerencsés körülménynek bizonyult, hogy az egyetem Szerves és Gyógyszerkémiai Intézetében prof. dr. Hideg Kálmán vezetésével dolgozó munkacsoport számos eredeti, biológiai rendszerek jelölésére alkalmas nitroxid szabadgyök vegyületet szintetizált, amelyeket sikerrel tudunk felhasználni számos biofizikai probléma megoldására (2. ábra):



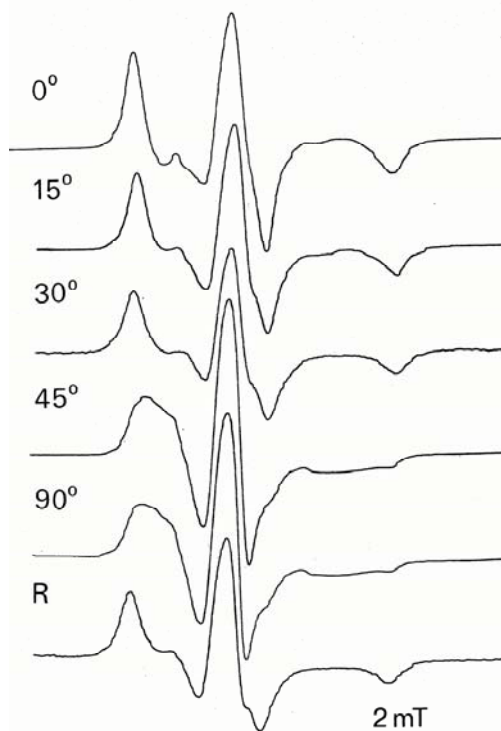
2. Ábra. Maleimid, jódiacetamid és izotiocianát riporter molekulák szerkezete.

Ebben a munkában elsősorban az elmúlt évtizedben a motor proteinek molekuláris dinamikai viselkedésének megismerésére irányuló saját vizsgálatainkat mutatjuk be három különböző területen. Mivel a világon számos - munkásságuk alapján elismert - kutatócsoport is dolgozik hasonló problémákon, ezért eredményeik részleges bemutatása nem kerülhető meg.

### Az aktin dinamikája.

Az aktin, az egyik legkonzervatívabb fehérje, a sejtekben történő széleskörű előfordulása és sokirányú funkciója miatt áll az érdeklődés előterében<sup>5,6,7</sup>. Az élő sejtekben két meghatározó formában fordul elő: monomer (G-aktin), illetve a monomerek polimerizációja után filamentális aktinként (F-aktin). A monomer aktin egy polipeptid láncból álló globuláris fehérje, relatív molekulatömege kb. 43 kDa; a monomer további alegységre (doménekre, szubdoménekre) bontható. A G-aktin monomerek filamentummá kapcsolódva egy balmenetes hélixet alkotnak, amely periódusonként 13 monomert tartalmaz. Az aktin az izomban a vékony filamentum részeként vagy a citoskeletális rendszerben rendkívül dinamikus, gyors átrendeződésre képes szerkezetet alkot. Ezen tulajdonság teszi lehetővé, hogy részt vegyen az izomösszehúzóásban, sejt alakváltozásainak szabályozásában, sejtmozgásban, valamint számos intracelluláris transzport folyamatban. Alapvető tulajdonságai közé tartozik, hogy képes egy- és kétértékű kationok, valamint nukleotidok (ADP és ATP) megkötésére, továbbá, ami az izomműködés szempontjából lényeges, hogy képes aktomiozin komplexben aktiválni a miozin ATPáz aktivitását.

Fiziológias körülmények mellett a monomer egy magnézium-ATP komplexet tart kötésben. A polimerizáció együtt jár a kötött ATP sztöchiometrikus hidrolízisével. A mechanizmus során az ATP hidrolízise nem közvetlenül az új monomer beépülésekor, hanem attól térben és időben elhatárolódva, már a filamentum belsejében történik. A keletkezett anorganikus foszfát csupán ezt követően lép ki a filamentumból, hátrahagyva ADP-aktin monomereket, melyek a filamentumot alkotják. Újabb elképzelések szerint az ATP-ből felszabaduló kémiai energia a filamentumokban elasztikus energia formájában tárolódik, amely más biokémiai reakció során a szupramolekuláris rendszer számára elérhetővé válhat<sup>8</sup>. Ez a kísérleti tény, valamint további újabb tudományos eredmények utalnak arra, hogy a korábbi elméletek által passzív szerkezeti elemnek feltételezett aktin filamentumok az aktomiozin rendszerben és az intracelluláris transzport folyamatokban egyaránt aktív dinamikai szerepet játszanak<sup>9,10</sup>. A kísérleti eredmények alapján joggal feltételezhető, hogy több egymással szorosan összefüggő tényező (aktinhoz asszociált fehérjék, nukleotidok, kationok, környezeti faktorok, mint pH, hőmérséklet, ionális milliő) együttesen határozza meg az aktin sejtfunkciókban betöltött szerepét<sup>11</sup>. Számos bizonyíték van arra is, hogy a polimerizált aktin flexibilis, torziós és rotációs rezgési módusai könnyen gerjeszthetők, ezen tulajdonság szerepet játszhat a sejtszintű folyamatokban<sup>12,13</sup>. Az aktin és miozin alkotta dinamikus fehérjerendszer a mozgásra érzékeny paramágneses és fluoreszcens spektroszkópiai szondákkal, valamint azok kombinációjával jól vizsgálhatónak tűnik, mivel a mérések szerint az erőgenerálás folyamatában kulcsszerepet játszó további szignifikánsan nagyobb szögszórású ( $43^\circ$ ) eloszlás is megfigyelhető (centruma  $(63 \pm 5)^\circ$ ), amely random módon

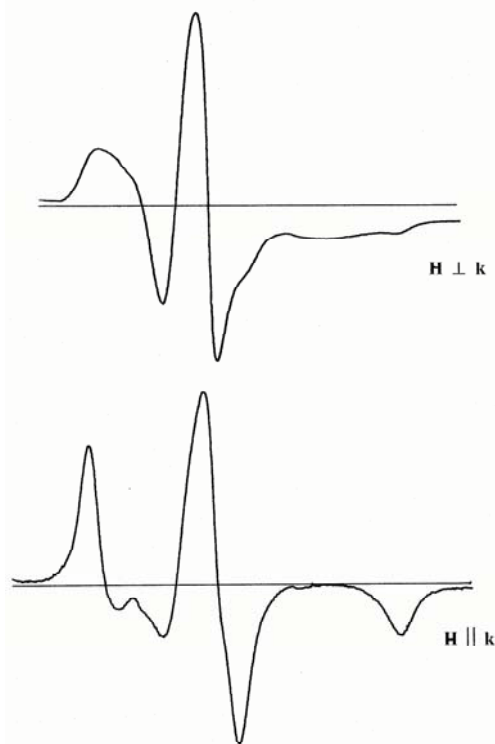


**3. Ábra.** A Cys-374 helyen maleimid spinjelölővel jelzett F-aktin filamentumok EPR spektrumainak irányfüggése. Az ábrán feltüntetett szögek a filamentumok hossz tengelye és a mágneses tér által bezárt szöget jelentik. R: véletlenszerűen orientált aktin filamentumok EPR spektruma.

aktin-miozin-ADP.Pi komplex életideje összemérhető a különböző mozgási módusok korrelációs idejével<sup>14,15</sup>. Így az ATP hidrolízisével felszabaduló energia éppen ezen mozgási módusokat gerjesztheti, mielőtt a környezetbe disszipálódnék.

Az aktin öt -SH csoporttal rendelkezik, amelyek közül a polimerizált aktinban a felszínen elhelyezkedő Cys-374 -es aminosav oldallánca viszonylag egyszerűen, könnyen és specifikusan jelölhető maleimid típusú paramágneses szondával. A riporter molekula rotációs korrelációs ideje G-aktin esetén 19.6 ns -nak, míg F-aktin esetén 60 - 80  $\mu$ s -nak adódik<sup>16</sup>. Az utóbbi adat az aktin filamentum hat -nyolc monomerjének együttes mozgását tükrözi, az adat jól jellemzi a filamentum belső flexibilitását. A filamentumban a monomerek szabályos elrendeződése miatt várható, hogy a makroszkópiusan orientált aktin filamentum rendszerben az EPR spektrum alakja függ a filamentum hossz tengelye és a statikus mágneses tér által bezárt szögtől<sup>17,18</sup> (3. ábra).

A orientált filamentum preparátum többféle módon is megvalósítható, de elérhető jelölt monomereknek a harántcsikolt izom szarkomerjébe történő diffúziójának segítségével is. Elektronmikroszkópos vizsgálatok eredményei azt mutatják, hogy az inkorporált aktin az aktin és miozin filamentumok átfedési zónájában helyezkedik el, valamint asszociálódnak a miozin filamentumokhoz (4. ábra).

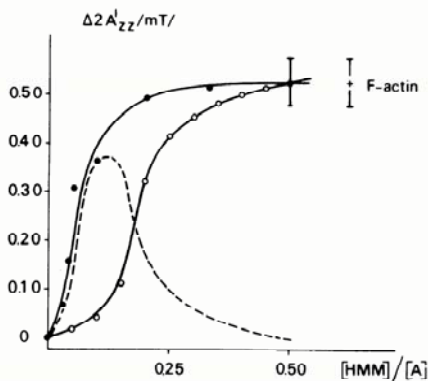


**4. Ábra.** Glicerinezett izomrostokba diffundáltatott spinjelölt G-aktin EPR spektrumai két különböző orientációban a laboratóriumi mágneses tér irányához viszonyítva.

A spektrumszimulációval is alátámasztott értékelés szerint a szondamolekulák eloszlásához rendelt Gauss-eloszlás centruma  $(34 \pm 3)^\circ$ -t zár be a filamentum hossz tengelyével,

a teljes szögcsatorna  $23^\circ$ . A mondott eloszlás mellett egyelhelyezkedő és/vagy részben denaturálódott monomerekhez kapcsolódó jelző molekuláktól származik.

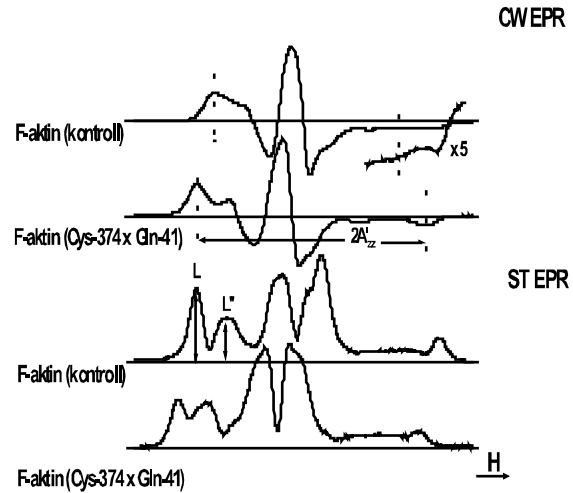
Miozin és fragmentumai (nehéz meromiozin: HMM, szubfragment-1: S1) kötődnek az aktinhoz, amit az EPR spektrum jellegzetes megváltozása is mutat mind a konvencionális (CW), mind pedig a szaturáció transzfer (ST) EPR időtartományában. A CW spektrumra jellemző  $2A'_{zz}$  hiperfinom csatolási állandó és az ST spektrumból kapható  $L'/L$  diagnosztikus paraméter nem lineárisan változik a miozin/aktin moláris arány változásával, ami a kölcsönhatás kooperatív jellegére utal (5. ábra). A maximális változás a hiperfinom csatolási állandóban ( $\Delta 2A'_{zz}$ ) kb. 1:10 miozin:aktin aránynál következik be; növekvő aránynál (miozin/aktin  $> 0.5$ ) a  $2A'_{zz}$  paraméter kissé csökken<sup>16</sup>. Ennek magyarázata a nitroxid csoport környezetében bekövetkező hidrofóbicitás növekedése, amit a miozin vagy fragmentumának leárnyékoló hatása eredményez. Az aktomiozin képződését az aktin filamentumok flexibilitásának és orientált rendszer esetén a rendezettségnek csökkenése kíséri.



5. Ábra. A HMM indukálja a G-aktin polimerizációját. Az aktomiozin komplex hiperfinom csatolási állandójának nagysága nem lineáris módon függ a HMM-aktin moláris aránytól. A szaggatott görbe a kísérleti eredmények (●) és a kooperatív kölcsönhatás feltételezése nélkül szimulált görbe (○) közötti eltérést mutatja.

Általános a nézet, hogy az aktomiozin kölcsönhatás, amely az izom struktúrájában rövidülést és erő kifejtést eredményez, nem valósulhat meg az aktin belső struktúrájának dinamikája nélkül. Igen érdekesek azok az eredmények, amelyeket speciális F-aktin preparátumokon kaptunk. Biokémiai reakciókkal elérhető, hogy az aktin monomerek között keresztkötés alakuljon ki. A polimerizáció során kettős helix struktúra alakul ki a filamentumban, így egy helix struktúrán belül (Cys 374 - Gln 41) vagy a két helix között (Gln 41- Lys 113) egyaránt keresztkötés alakítható ki a monomerek között.

Az itt nem részletezendő aktin-miozin biokémiai hatásváltozásokon kívül, amelyeket speciális *in vitro motility assay* kísérleti elrendezésben kaptak, a spektroszkópiai mérések jól mutatják, hogy a filamentum flexibilitásának csökkenése lényegesen nagyobb, ha a keresztkötés a helikális struktúrán belül alakul ki, mint a két helix között<sup>9,19</sup> (6. ábra).



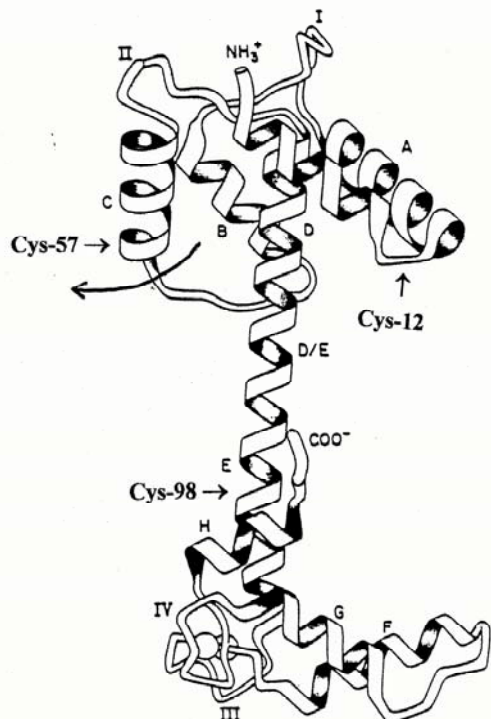
6. Ábra. Kontroll és keresztkötött (Cys-374 x Gln-41) aktin filamentumok konvencionális (CW) és szaturáció transzfer (ST) EPR spektrumai. A  $2A'_{zz}$  hiperfinom csatolási állandó és az  $L'/L$  hányados növekedése jól mutatja keresztkötött aktin esetében a flexibilitás csökkenését.

Hogy ebben az esetben nem kizárólag lokális változásról van szó, azt a DSC mérések világosan mutatják. A HMM-aktin komplexben az aktinra jellemző tranzíciós hőmérséklet ( $T_m = 67.3^\circ\text{C}$ ) mintegy  $4^\circ\text{C}$ -kal nagyobb, mint F-aktin esetében, ha a keresztkötés a helixen belül alakul ki.

#### Az izomműködés szabályozása: a troponin rendszer.

Az akaratlagos működésű harántcsíkolt izomban a szabályozásért egy szupramolekuláris rendszer a felelős, amely a vékony filamentumban alkot egységes rendszert<sup>20,21</sup>. Egyik alkotórésze az aktin monomerekből felépülő kettős  $\alpha$ -helix. A kettős helix árkában a csaknem teljesen  $\alpha$ -helikális szerkezetű tropomiozin (Tm) foglal helyet. A tropomiozin molekulák vég-a-véghez kapcsolódással haladnak az árokban, egy-egy tropomiozin molekula hét aktin monomert fed le. A filamentum hossz tengelye irányában  $38.5\text{ nm}$  periodicitással egy harmadik fehérje helyezkedik el, a troponin (Tn). A troponin molekulák kapcsolódási  $40 - 60$  tropomiozin molekulával együtt. A troponin - három különböző alegységből álló fehérje: a troponin C (TnC), a troponin I (TnI) és a troponin T (TnT) komplexe - a szabályozás első fázisában játszik alapvető szerepet. A kísérleti tapasztalatok szerint az izomműködés beindítását a troponin C-hez kötődő  $\text{Ca}^{2+}$ -ionok valósítják meg. A  $\text{Ca}^{2+}$ -kötés lokális konformációváltozásokkal jár együtt, amelynek eredményeként megváltozik a kölcsönhatás az alegységek és a szupramolekuláris komplexet alkotó más fehérjék között. Az így kialakult térszerkezet már lehetővé teszi a vékony filamentumban lévő harmadik komponens, az aktin és a vastag filamentumokat alkotó miozin komponensek ATP függő kölcsönhatását és az erőgenerálás folyamatát.

Röntgendiffrakciós mérések mutatják, hogy az élő izom kontrakciója alatt a Tm elmozdul. Ez az elmozdulás szünteti meg az aktin-miozin kölcsönhatás fizikai akadályát, és teszi lehetővé a miozin ATPáz aktiválását az aktin által. Ez a tankönyvekben sokszor idézett "steric blocking" modell egyszerűsége miatt széles körben elfogadott, azaz a Tm közvetlenül gátolja a miozin fejek aktinhoz történő

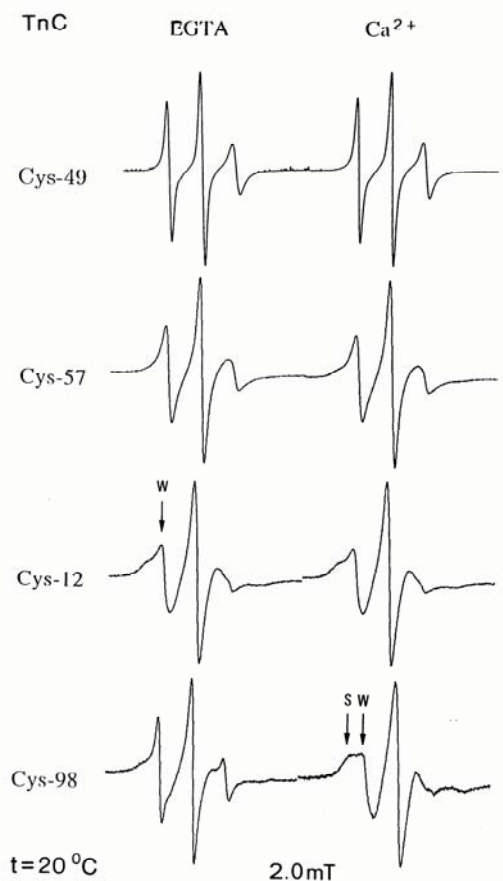


7. **Ábra.** A troponin C molekula modellje. Az ábrán feltüntetjük azon aminosavak helyét, amelyeknél pontmutáció történt. A nyíl a TnC működésénél a C-helix feltételezett elmozdulását mutatja.

hozzáférését. Ugyancsak röntgendiffrakciós vizsgálatokkal sikerült Herzberg és munkatársainak (1985) a troponin C molekulaszervezetét megállapítani<sup>22</sup>. Az N-terminális doménnél található az alacsony affinitású  $\text{Ca}^{2+}$ -kötőhelyek (I és II), amelyekről úgy vélik, hogy alapvetőek a szabályozás szempontjából<sup>23</sup>. Genetikai manipuláció révén előállított pontmutások új kísérleti lehetőséget teremtettek meg; a spektroszkópiai szondát hordozó cisztein aminosav a szabályozás szempontjából lényeges N-terminális domén megfelelő szegmenseihez helyezhető át, így a kation kötést kísérő lokális konformációs változások és belső mozgások jól követhetővé válnak (7. ábra). Pontmutások esetén az eredeti Cys-98 aminosav helyét leucin foglalta el.

A Ser-12 - Cys és Ala-57 - Cys cserével olyan mutánsokhoz jutunk, amelyeknél a ciszteinhez kapcsolt paramágneses szonda az alacsony affinitású kation kötőhelyekhez van közel, másrészt egy olyan szegmenshez kapcsolódik (C-helix), amely a korábbi kísérletek eredményei szerint részt vesz az alegység-alegység kölcsönhatásban<sup>24,25</sup>.

Saját méréseinkben a pontmutásokat a maleimid spinjelölt változatával módosítottuk a cisztein aminosav oldalláncoknál, és vizsgáltuk a TnC -t különböző állapotaiban és fehérjekomplexekben, végezetül a miofibrilláris szuszpenzióban. A vad típusú és pontmutások EPR spektrumait a 8. ábra mutatja kationmentes (EGTA) és  $\text{Ca}^{2+}$ -állapotokban. Szembetűnő, hogy a természetes TnC-nél, ahol a molekula egyetlen ciszteinjét (Cys-98) jelöltük paramágneses szondával, a  $\text{Ca}^{2+}$ -ionok kötődése (III és IV kötőhelyek) a szonda környezetére erőteljes immobilizáló hatást gyakorol, míg a pontmutásoknál az N-terminális domén szerkezete változatlanok tűnik.

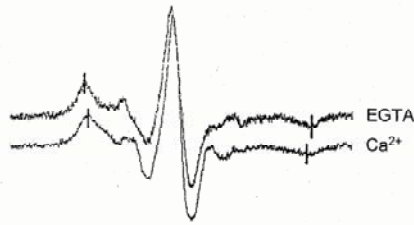


8. **Ábra.** Különböző spinjelölt troponin C mutánsok EPR spektrumai EGTA és  $\text{Ca}^{2+}$ -telített állapotban. S jelzi az erősen, W a gyengén immobilizálódott riporter molekulákat.

A magyarázat a fehérje szerkezetében keresendő; a C-terminális doménnél a  $\text{Ca}^{2+}$ -ionok kapcsolódását a szerkezet laza konfigurációból helikális szerkezetbe történő átalakulása kíséri, míg az N-terminális doménben kationmentes állapotban is kialakul a helix-hurok-helix szerkezet, amelyet a leucin, fenilalanin és izoleucin aminosavak között kialakuló hidrofób kontaktusok stabilizálnak. A  $\text{Ca}^{2+}$ -ionok kötődését valószínűleg csupán a helikális szegmensek orientációváltozása kíséri, amely nem eredményez mobilitásbeli változást izolált TnC esetében a paramágneses szonda környezetében. Lényeges változás következik be azonban a szonda molekula rotációs mobilitásában az N-terminális doménben is, ha fehérje komplexekben vizsgáljuk a kationmentes, a  $\text{Ca}^{2+}$ - és a  $\text{Mg}^{2+}$ -állapotokat.

A TnC(Cys-12).TnT bináris komplex esetén a  $\text{Ca}^{2+}$ -állapotban a mobilitás csökken az A-helix környezetében a kationmentes és a  $\text{Mg}^{2+}$ -állapotban mérhető képest. A kationmentes és  $\text{Mg}^{2+}$ -állapotok között rotációs dinamikai szempontból nincs kimutatható különbség, ami alátámasztja azt a feltételezést, hogy az alacsony affinitású kötőhelyek  $\text{Ca}^{2+}$ -ionokra specifikusak.

Eltérőek a kísérleti eredmények a TnC(Cys-57) mutánsnál. A  $\text{Ca}^{2+}$ -ionok távollétében mért rotációs mobilitás a TnC.TnI bináris komplexben a C-helikális szegmensnél megnövekedik, ha az alacsony affinitású kötőhely  $\text{Ca}^{2+}$ -ionokat köt (9. ábra).



9. Ábra. TnC(Cys-57) troponin I-vel alkotott bináris komplexének EPR spektruma EGTA és  $\text{Ca}^{2+}$ -állapotban.  $\text{Ca}^{2+}$ -állapotban a spinjelölő mobilitása megnövekedik.

Ez arra enged következtetni, hogy a C szegmens a központi összekötő E-helixtől kifelé távolodik, így a rotációs mobilitása növekedhet. Az eredmény alátámasztja azt a feltételezést, hogy a kation kötését a TnC és TnI közötti kölcsönhatás megváltozása kíséri. Ez a  $\text{Ca}^{2+}$ -ionok kötésével járó konformációváltozás nagyobb fehérje komplexekben is nehézség nélkül kimutatható, sőt miofibrillákban is, ahol biokémiai módszerekkel előzetesen a TnC-t a TnC(Cys-57) mutánsal cserélték ki. A miofibrillum az izomsejt egyik modellje, amely az izomműködés csaknem minden jellemző sajátosságát jól mutatja.

A TnC pontmutációkon végzett spektroszkópiai mérések azt eredményezik, hogy az izomműködés szabályozásában alapvető szerepet játszó  $\text{Ca}^{2+}$ -kötés által indított szignál három úton (TnC→TnI→aktin, TnC(N-domén)→TnT→Tm→aktin és TnC(C-domén)→TnT→Tm→aktin) is továbbjuthat az erőgeneráló rendszerhez; mindezt a TnC molekula kationfüggő internális dinamikája teszi lehetővé.

### A harántcsíktolt izommodell.

Az izomműködés molekuláris szintű vizsgálatának kedvelt modellje a vázizomból egyszerűen preparálható glicerinezett izomrost vagy rostköteg. Az irodalomból ismert, hogy a glicerinezett izomrost jól mutatja az intakt izom sajátosságait, rendelkezik ATPáz aktivitással, és csaknem akkora erő kifejtést mutat, mint egy hozzá hasonló geometriájú vázizom. H. E. Huxley<sup>4</sup> és A. F. Huxley-B. Simmons (1971) tételezték fel először a miozin molekula feji részének mozgását kontrakció alatt; ez a gondolat számos újabb elméletnek és kísérletnek vált kiinduló pontjává. Az ATP hidrolízis ciklus során biokémiai módszerekkel felismert köztes állapotokhoz rendelhető molekuláris dinamikai állapotok csak szerencsés esetben vizsgálhatók EPR módszer segítségével a köztes állapotok gyors időbeli lefolyása miatt. A köztes állapotok egy része a nem vagy a lassan hidrolizáló ATP analógokkal stabilizálhatók az EPR mérés idejére. A hidrolízis ciklus során az aktin és miozin kölcsönhatásában két alapvető állapotot különböztetnek meg:

- a./ aktinhoz erősen kötött és
- b./ aktinhoz gyengén kötött miozin állapotot.

Az előbbit, amely nukleotidmentes (rigor) állapotban vagy ADP jelenlétében valósul meg, sztereospecifikus aktin-miozin kötés jellemzi, míg a másik esetben, amely az ATP, a nem-hidrolizáló AMP.PNP, a lassan hidrolizáló  $\gamma$ -ATP és az erőgenerálást megelőző ADP.P, állapotokat jellemzi, az aktin-miozin kölcsönhatás aspecifikus sajátosságot mutat. Azaz, rigor (R) és ADP állapotban minden miozin molekula

az aktinhoz kötődik, és a kötés egy és csakis egy módon valósulhat meg (sztereospecifikus rigid kötés), míg a többi állapotban pontosan nem meghatározható kötés valósul meg (a miozin feji régió sem térbeli, sem dinamikai rendezettséget nem mutat).

A kontraktilis rendszert alkotó aktomiozin komplex egyik, vizsgálatok szempontjából szerencsés sajátossága, hogy a miozin fehérje ATP-t kötő doménje, a szubfragment 1 (S1) az ATP kötőhely környezetében két reaktív –SH csoportot tartalmaz (Cys-697 és Cys-707) (10. ábra). A két –SH csoport alkalmas pufferoldatban és hőmérsékleten specifikusan jelölhető –SH reagensekkel. A jelölés elvégezhető úgy, hogy az izolált S1-t jelölik maleimid vagy jódecetamid típusú jelölővel, amelyet jelölés után diffúzióval juttatnak az izomrost belsejébe, de a szonda molekula közvetlenül is specifikusan kapcsolható a rostban lévő miozin molekulák S1 fragmentumához. A jelölés eredményességét biokémiai módszerrel, ATPáz aktivitás mérésével lehet ellenőrizni. A szonda molekula rigidén kapcsolódik a motor doménhez, amelyet mind a CW, mind pedig az ST EPR spektrum jól mutat; a rotációs korrelációs idők becsült értékei<sup>26</sup>:  $\tau_2 = 20$  ns és  $\tau_2 = 0.3$   $\mu$ s miozin esetében.



10. Ábra. A miozin S1 szubfragment szerkezete a két reaktív –SH csoport megjelölésével.

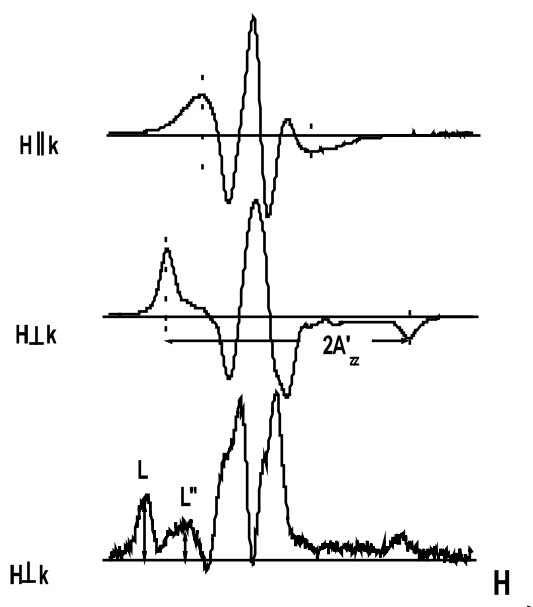
Szignifikánsan megváltoznak az EPR spektrumok a szupramolekuláris struktúrában:

- a./ nukleotidok távollétében a miozin vagy az S1 aktinnal történő specifikus kölcsönhatása miatt a riporter molekulák mozgékonyasága drasztikusan csökken ( $\tau_2 > 1$  ms);
- b./ a vázizom szerkezeti felépítése miatt (1. ábra) a spektrum alakja függ a sztatikus mágneses tér és az izomrost hossz tengelye által bezárt szögtől (11. ábra).

Szerencsés körülménynek bizonyult, hogy a nukleotid kötőhely és a Cys-707 aminosavhoz kapcsolódó riporter molekula térbeli közelsége miatt a spektrum paraméterei függenek a kötött nukleotidtól és ezzel együtt az aktomiozin rendszer állapotától. Míg a maleimid spinjelölő esetén a nukleotidmentes (rigor állapot, R) és az ADP állapot nem különböztethető meg, az általunk alkalmazott izotiocianát spinjelölő spektruma a két állapotban eltérő<sup>27</sup>. A spektrumok kiértékelését és szimulációját megkönnyíti, hogy a nitroxid csoport párnélküli elektronjának  $2\pi$  molekulapályája közel merőlegesen helyezkedik el az izomrost hossz tengelyére<sup>28</sup>. Az EPR spektrumok a szimuláció segítségével értelmezhetők<sup>29</sup>;

a riporter molekulák eloszlásához Gauss-eloszlás rendelhető, amelynek centruma maleimid spinjelölő esetén  $82^\circ$ -t, jóacetamid spinjelölő esetén  $68^\circ$ -t és izotiocianát riporter molekula esetén  $76^\circ$ -t zár be az izomrost hossz tengelyével.

Az eloszlásfüggvények teljes szélessége félmagasságnál kb.  $16^\circ$ . A miozin Cys-707 oldalláncához kovalensen kapcsolt riporter molekulák rosttengelyhez viszonyított orientációs eloszlása egy modell-független közelítéssel is levezethető<sup>27</sup>. Az eloszlás centruma rigor állapotú rostoknál  $75^\circ$ , szögszórás  $16^\circ$ , míg MgADP jelenlétében az eloszlás centruma  $56^\circ$ -ra változik, a szögszórás  $28^\circ$ . Az ST EPR spektrumok tanulsága szerint a két állapotban a riporter molekulák mozgékonyága nem különböztethető meg (a spinjelölők mozgására jellemző rotációs korrelációs idő  $\tau_2 > 1$  ms), ami arra utal, hogy ADP kötődése a miozin feji részéhez csupán a riporter molekula orientációját változtatja meg, de nem változtatja meg a dinamikai állapotát a rigor állapothoz képest. Ez az eredmény deuterizált N15-maleimid szondával is igazolható<sup>30</sup>.

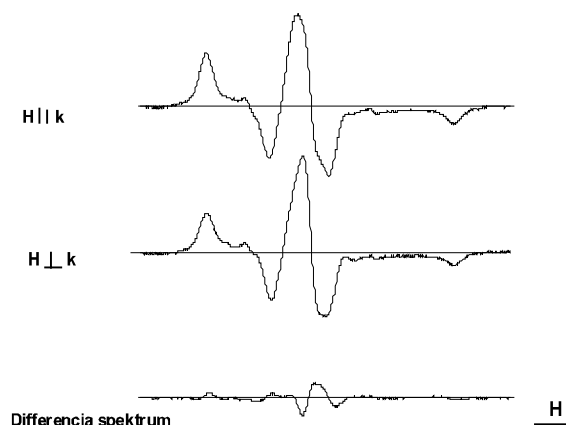


11. Ábra. A glicerinezett izomrost konvencionális és szaturáció transzfer EPR spektrumai. Az alkalmazott spinjelölő: izotiocianát.

Alkalmos kísérleti elrendezésben CaATP-t tartalmazó oldatban az erőgenerálás, ATP-t tartalmazó relaxált oldatban, amikor a miozin feji része disszociál az aktintól, az erőgenerálást megelőző állapot is vizsgálható. A relaxált állapot kényelmesen megvalósítható ATP-hez adott anorganikus foszfát analógok – ortovanadát, alumíniumfluorid, berilliumfluorid – segítségével, amelyekkel a kontraktilis rendszer az  $ADP.P_i$  állapotnak megfelelő  $ADP.V_i$ ,  $ADP.AIF_4$  vagy  $ADP.BeF_x$  állapotban stabilizálható. A nem specifikus aktin-miozin kölcsönhatás miatt irányfüggés a spektrumban nem tapasztalható, a miozin szubfragment 1 izotróp rotációs mozgást végez<sup>31</sup> (12. ábra). Az ST EPR spektrumok a riporter molekulák rotációs korrelációs idejének szignifikáns csökkenését mutatják, ami a miozin feji régiójának aktintól való disszociációját jelzi. Kontrakciót kiváltó oldatban az EPR spektrum összetett, a miozin fejek ciklikus működésének következményeként orientált és izotróp spinjelölőkre jellemző spektrum egyaránt megfigyelhető.

A M.ATP állapot nem-hidrolizáló AMP.PNP segítségével vizsgálható. Az EPR spektrum két spektrum szuperpozíciója, mintegy 50 % a járulék az erősen kötött miozin szubfragment 1-től és 50 % a gyengén kötött miozin szubfragment 1-től. Az izomroston végzett mechanikai mérések alátámasztják azt a következtetést, hogy AMP.PNP jelenlétében a miozin molekula két feji régiója közül az egyik specifikusan kötve marad az aktinhoz és biztosítja az izomrost rugalmasságát, míg a másik fej disszociált állapotban van. A maleimid jelző EPR spektruma az erősen kötött állapotra rigor állapotú jellegzetességet mutat<sup>32</sup>, saját méréseink izotiocianát próbával azonban azt jelzik, hogy az állapot ADP jellegű<sup>33</sup> (13. ábra).

A M.ATP állapot nem-hidrolizáló AMP.PNP segítségével vizsgálható. Az EPR spektrum két spektrum szuperpozíciója, mintegy 50 % a járulék az erősen kötött miozin szubfragment 1-től és 50 % a gyengén kötött miozin szubfragment 1-től.

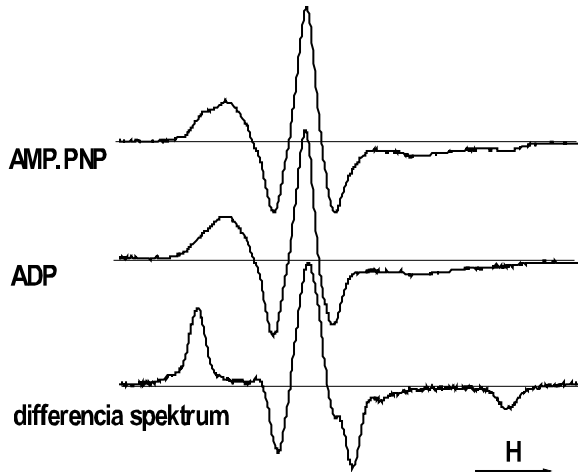


12. Ábra. Izotiocianát riporter molekulával miozinon jelölt glicerinezett izomrostok CW EPR spektrumai relaxált (ATP.V<sub>i</sub>) oldatban. Az izomrost hossz tengelye párhuzamos és merőleges állásban helyezkedett el a laboratóriumi mágneses tér irányához képest.

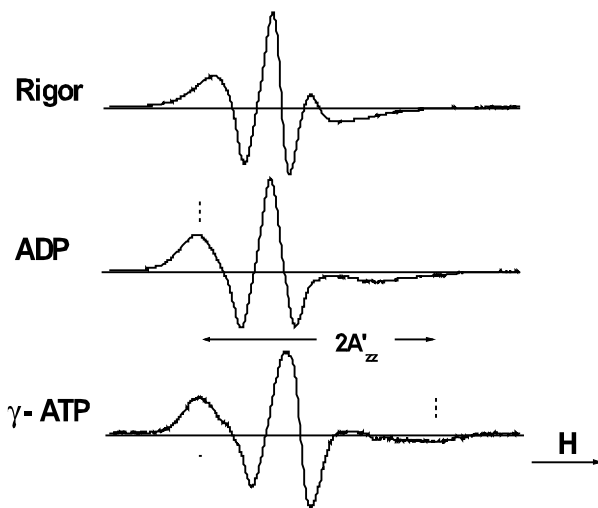
Az izomroston végzett mechanikai mérések alátámasztják azt a következtetést, hogy AMP.PNP jelenlétében a miozin molekula két feji régiója közül az egyik specifikusan kötve marad az aktinhoz és biztosítja az izomrost rugalmasságát, míg a másik fej disszociált állapotban van. A maleimid jelző EPR spektruma az erősen kötött állapotra rigor állapotú jellegzetességet mutat<sup>32</sup>, saját méréseink izotiocianát próbával azonban azt jelzik, hogy az állapot ADP jellegű<sup>33</sup> (13. ábra).

A lassan hidrolizáló  $\gamma$ -ATP jelenlétében mért spektrumok különböznek mind a rigor, mind pedig az ADP jelenlétében mérhető spektrumoktól (14. ábra). Megfelelő  $\gamma$ -ATP koncentráció ( $> 5$  mM) esetén a spektroszkópiai szondákhoz rendelhető eloszlás jó közelítéssel izotrópnak tekinthető, ami a miozin fejek disszociációjára utal. Ha a lassú hidrolízis során keletkező ADP megkötéséről nem gondoskodunk pl. az oldatokhoz adott apiráz enzim segítségével, akkor az EPR spektrumban a miozin.ADP állapotra jellemző spektrum is megjelenik.  $Ca^{2+}$  plus  $\gamma$ -ATP esetén a spektrumban az aktinhoz erősen kötött miozin járuléka tovább növekedik, ami a működő izomra jellemző.

A kísérleti technikák, az elektronmikroszkópos és a



13. Ábra. Izotiocianát riporter molekulával miozinon jelölt glicerinezett izomrostok CW EPR spektrumai AMP.PNP-t tartalmazó oldatban. A spektrum dekompozíciója szerint az összetevő spektrumok spinkoncentrációja közel egyenlő, és az aktinnal erős kötésben lévő miozin ADP állapotú.



14. Ábra. Izotiocianát riporter molekulával miozinon jelölt glicerinezett izomrostok CW EPR spektrumai rigor, ADP és  $\gamma$ -ATP-t tartalmazó oldatban.

röntgendiffrakciós módszerek, de elsősorban az eredményes fehérjekristályosítási módszerek és a genetika sikereiből adódó lehetőségek, pl. az irányított pontmutációk, a protein mutánsok preparálása, ma már lehetővé teszik, hogy a miozin feji részében, annak egyes szegmenseiben, a monomer aktin szubdoménjeiben a konformációváltozásokat és a belső dinamikai folyamatokat, továbbá a miozin családok sajátosságait, az aktinkötő fehérjék finom kölcsönhatásait megismerjük, és azokat összekapcsoljuk a működéssel.

### Módszerek

A vizsgálatok elvégzéséhez szükséges proteineket (aktin, miozin, troponin), az izommodellként elfogadott glicerinezett izomrostot a nyúl vázizmaiból nyertük az irodalomban korábban leírt módszerek szerint. A paramágneses riporter molekulákat az általánosan használt eljárások segítségével kapcsoltuk a célzott helyekre. A jelölések specificitását biokémiai módszerekkel ellenőriztük (ATPáz aktivitás, gélelektroforézis, spektrofotometria).

**EPR mérések:** Az EPR méréseket Bruker ESP 300 E típusú X-sávú spektrométerrel végeztük konvencionális (CW) és szaturácértékelésre szolgáló out-of-phase null módszer helyett egy előnyösebbnek vélt módszert dolgoztunk ki, amely elsősorban kis koncentrációjú paramágneses molekulákat tartalmazó minták esetén bír jelentőséggel<sup>33</sup>. Az alkalmazott módszer kiküszöböli a kis teljesítménynél (< 1 mW) beállítandó fázisszög megkeresését, és egy alkalmasan írt számítógépes szoftver szolgáltatja a keresett spektrumot. A mérési eljárás Robinsón ötlete nyomán a legkisebb négyzetek elvét használja fel: az out-of-phase spektrum varianciájának a teljes spektrumtartományra nézve minimálisnak kell lennie:

$$S = \sum_i^n (sp(i) - m)^2 = \min.$$

ahol  $sp(i)$  a digitalizált spektrum amplitúdója ( $n = 1024$ ),  $m$  az átlag. Általános esetben a spektrum előállítható mint az in-phase és az out-of-phase komponensek lineáris kombinációja:

$$sp(i) = A(i) \cos \vartheta + B(i) \sin \vartheta,$$

ahol  $\vartheta$  a fázisszög,  $A(i)$  és  $B(i)$  pedig a megfelelő amplitúdók. Differenciálva  $S$ -t  $m$  és  $\vartheta$  szerint, majd a szélsőérték számítás elve szerint kapjuk, hogy

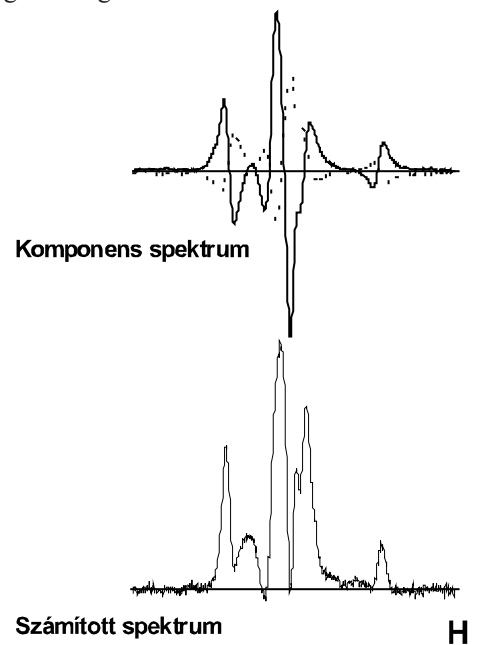
$$m = \overline{sp(i)} \quad \text{és} \quad \text{tg} 2\vartheta = \frac{2V_{AB}}{V_B - V_A}$$

ahol  $V_A$  és  $V_B$  az  $A(i)$  és  $B(i)$  komponensek varianciái,  $V_{AB}$  pedig a közös variancia. A módszer alkalmazásához két spektrum felvétele szükségeltetik, amelyek pontosan  $90^\circ$  fázisszögben különböznek egymástól:

$$sp1(i) = A(i) \cos \vartheta + B(i) \sin \vartheta,$$

$$sp2(i) = -A(i) \sin \vartheta + B(i) \cos \vartheta,$$

ahol  $sp1(i)$ -t egy tetszőleges  $\vartheta$  fázisszög esetén kapjuk, míg az  $sp2(i)$  spektrumot  $\vartheta + 90^\circ$  fázisszögnél. A kiszámított  $\vartheta$  segítségével végzett lineáris transzformáció lehetővé teszi



15. Ábra. A variancia módszerrel felvett (felső spektrumok) és számított ST EPR spektrum (alsó spektrum).



az in-phase és az out-of-phase spektrumok meghatározását (15.ábra). A két spektrum felvételénél alkalmazott mikrohullámú teljesítmény a felszaturációnak megfelelő teljesítmény, esetünkben 63 mW.

### Köszönetnyilvánítás

A felsorolt kísérleti eredmények és azok publikációi ETT, FKFP és OTKA pályázati támogatások nélkül nem valósulhattak volna meg (ETT 32/2000; ETT T-06017/1997; FKFP 0387/2000; OTKA 2044/1990; OTKA CO-123, OTKA T 017099/1995; OTKA T 030248/1999, OTKA T 034874/2001).

### Hivatkozások

- Holmes, K.C. *Acta Crystallogr. A* **1998**, *54*, 789-797.
- Geeves, M.A.; Holmes, K.C. *Annu. Rev. Biochem.* **1999**, *68*, 687-728.
- Bagshaw, C.R.; Trentham, D.R. *Biochem. J.* **1974**, *141*, 331-349.
- Huxley, H.E. *Science* **1969**, *164*, 1356-1365.
- Sheterline, P.; Clayton, J.; Sparrow, J.C. *Actin*, Oxford Univ. Press: New York, **1998**.
- Pollard, T.D.; Blanchoin, L.; Mullins, R.D. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2000**, *29*, 545-576.
- Graceffa, P.; Dominguez, R. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 34172-34180.
- Janmey, P.A.; Hvidt, S.; Oster, G.P.; Lamb, J.; Stossel, T.P.; Hartwig, J.H. *Nature* **1990**, *347*, 95-99.
- Kim, E.; Bobkova, E.; Hegyi, G.; Muhlrad, A.; Reisler, E. *Biochemistry* **2002**, *41*, 86-93.
- Orlova, A.; Egelman, E.H. *J. Mol. Biol.* **1995**, *245*, 582-597.
- Gábor, P.; Bugyi, B.; Ujfalusi, Z.; Barkó, Sz.; Hild, G.; Somogyi, B.; Nyitrai, M. *Biophys. J.* **2006**, *91*, 2564-2572.
- Hild, G.; Nyitrai, M.; Somogyi, B. *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 842-849.
- Nyitrai, M.; Hild, G.; Lakos, Z.; Somogyi, B. *Biophys. J.* **1998**, *74*, 2474-2481.
- Ng, C.M.; Ludescher, R.D. *Biochemistry* **1994**, *33*, 9098-9104.
- Prochniewicz, E.; Thomas, D.D. *Biochemistry* **1997**, *36*, 12845-12853.
- Gaszner, B.; Nyitrai, M.; Hartvig, N.; Köszegi, T.; Somogyi, B.; Belagyi, J. *Biochemistry* **1999**, *38*, 12885-12892.
- Prochniewicz, E.; Walseth, T.F.; Thomas, D.D. *Biochemistry* **2004**, *43*, 10642-10652.
- Mossakowska, M.; Belagyi, J.; Strzelecka-Golaszewska, H. *Eur. J. Biochem.* **1988**, *175*, 557-564.
- Naber, N.; Lorentz, M.; Cook, R. *J. Mol. Biol.* **1994**, *236*, 703-709.
- Ostap, E. M.; Thomas, D.D. *Biophys. J.* **1991**, *59*, 1235-1241.
- Hegyi, G.; Belagyi, J. *FEBS J.* **2006**, *273*, 1896-1905.
- Leavis, P.C.; Gergely, J. *CRC Critical Rev. Biochem.* **1984**, *16*, 253-305.
- Zot, A.S.; Potter, J.D. *Ann. Rev. Biophys. Biochem.* **1987**, *16*, 535-559.
- Herzberg, O.; James, M.N.G. *Nature* **1985**, *313*, 653-659.
- Potter, J.D.; Gergely, J. *Biochemistry* **1974**, *13*, 2697-2703.
- Grabarek, Z.; Tan, R.-Y.; Wang, J.; Tao, T.; Gergely, J. *Nature* **1990**, *345*, 132-135.
- Fujimori, K.; Sorenson, M.; Herzberg, O.; Moulton, J.; Reinach, F.C. *Nature* **1990**, *345*, 182-184.
- Thomas, D.D.; Seidel, J.C.; Gergely, J.; Hyde, J.S. *J. Supramol. Struct.* **1975**, *3*, 376-390.
- Belagyi, J.; Frey, I.; Pótó, L. *Eur. J. Biochem.* **1994**, *224*, 215-222.
- Thomas, D.D.; Cooke, R. *Biophys. J.* **1980**, *32*, 891-906.
- Fajer, P.G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 937-941.
- Fajer, P.; Fajer, E.; Matta, J.; Thomas, D.D. *Biochemistry* **1990**, *29*, 5865-5871.
- Lőrinczy, D.; Hartvig, N.; Belagyi, J. *J. Biochem. Biophys. Methods* **2002**, *53*, 75-87.
- Fajer, P.G.; Fajer, E.A.; Brusvold, N.J.; Thomas, D.D. *Biophys. J.* **1988**, *53*, 513-524.
- Hartvig, N.; Lőrinczy, D.; Farkas, N.; Belagyi, J. *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 2168-2177.
- Goldman, S.A.; Bruno, G.V.; Freed, J.H. *J. Phys. Chem.* **1972**, *76*, 1858-1960.

### Application of nitroxide compounds in motor protein research

The force generation in muscle during contraction arises from direct interaction of the two main proteins, myosin and actin. The process is driven by the energy liberated from the hydrolysis of ATP. The energy released from hydrolysis produces conformational changes in myosin and actin, which can be manifested as an internal motion of myosin head while bound to actin. The myosin heads attached to actin produce conformational changes during the hydrolysis process, which results in a strain in the head portion of myosin in an ATP-dependent manner. These structural changes lead to a large rotation of myosin neck region relieving the strain.

Spectroscopic probes are widely used in muscle research. Nitroxide compounds provide a direct method in which dynamic changes, rotation and orientation of specifically labelled proteins can be followed. In muscle fibre studies, the probe molecules, especially the maleimide-based nitroxides or iodoacetamide spin labels are usually attached to the reactive sulfhydryl site of the motor domain or to the regulatory light chain. The main task of these studies is to identify the role of the different structural elements and their interaction during ATP binding and hydrolysis, and the consequence of these in interaction of myosin head with F-actin.

Actin is an essential component of the motile apparatus of muscle and nonmuscle cells. Several studies have shown structural and dynamic changes of actin filaments under interaction with myosin.

EPR studies showed internal rotation of the nitroxide probes attached to actin filaments in the microsecond range, and the binding of myosin heads to actin filaments further restricts the rotational motion co-operatively. In partially oriented F-actin system the probe molecules exhibited orientation dependence with respect to the long axis of the filament. The mean value of the angle between the filament long axis and the principal z axis for the spin label was  $34 \pm 4^\circ$ . Addition of myosin or myosin subfragment (HMM, S1) to the filament system, the orientation order was reduced.

It is particularly interesting whether flexibility restrictions affect the functional properties of actin filaments. Cross-linking studies of actin provide detailed information on the link between actin's motility and its structure and dynamics. We demonstrated that intrastrand cross-linking of filaments strongly reduced the rotational mobility of the attached probe, however little change was found in the case of interstrand cross-linking. The intermonomer cross-linking altered the dynamics of F-actin with heavy meromyosin in the weak binding state.

The recent model of regulation in striated muscle supposes a cascade of events before the actomyosin ATPase is activated and the contraction is initiated. The original steric-blocking model was modified in much respect including the coupling with the actin-myosin interaction, but the lateral movement of Tm is maintained.

The model involves the large-scale motion of troponin and its subunits induced by  $\text{Ca}^{2+}$ -binding to sites I and II, and by signal transmission.

Troponin, a complex of three different subunits (troponin C, troponin I and troponin T), is a component of the thin filament in vertebrate striated muscle and plays an essential role in the regulation of contraction. To reveal the dynamics of troponin C, three mutants were involved in the experiments, where the single cysteine of the molecule was located on the A-helix (Cys-12), B-helix (Cys-49) and C-helix (Cys-57) of the troponin C, respectively. EPR measurements indicated that nitroxide labels had different rotational mobility on the different locations. Interaction of troponin I and/or troponin T with troponin C, and binding of  $\text{Ca}^{2+}$  to the low-affinity binding sites induced conformational changes in the environment of both C-helix and A-helix, and produced increased intersubunit interaction. The results suggest an internal dynamics in the A- and C-helices of troponin C, allowing the signal transmission in the thin filament regulatory system to the force generating unit.

In muscle fibre studies in the absence of nucleotides and in the presence of ADP the CW EPR spectra of spin-labelled myosin showed a narrow distribution of probe molecules with respect to the longer axis of the fibres. Three different labels were used: maleimide, iodoacetamide and isothiocyanate probe molecules. The spin labels were attached to the reactive cystein-707 residue of

myosin. In contrast to maleimide spin label, the binding of ADP to myosin resulted in a change in the mean angle of the distribution of spin labels in the case of isothiocyanate spin label. It shows that this label had a preferred orientation with respect to fibre axis which is sensitive to nucleotide binding. The orientation order and the degree of immobilization remained preserved, suggesting a strong binding of myosin to actin.

However, almost no orientation dependence was detected in the relaxing solution. The myosin heads represented disordered populations with reduced rate of rotational motion. The ST EPR spectra which are characteristic of rotational mobility in the millisecond time domain showed about the same rotational correlation times for rigor and ADP state, but exhibited a significant decrease in the presence of relaxing solution. The increased rotational correlation time is the sign of the dissociation of myosin heads from actin. After addition of  $\text{Ca}^{2+}$  to the fibre system the ST-EPR spectra showed changes, which implies that there is an increased stiffness in myosin head or a weak binding between myosin and actin. This weak binding precedes the specific binding of myosin to actin that is required for force generation. In the presence of the non-hydrolysable analogue AMP.PNP the spectrum deconvolution resulted in two populations; about 50% of labels belonged to the ordered fraction, and 50% of labels was randomly oriented. The myosin heads that exhibited high degree of order were in strongly binding ADP-state, the heads being attached to actin differ from those of heads in rigor.