

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. Izomösszehúzódkor 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 spektroszkópai 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 spektroszkópai 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