

A titin PEVK domén aktinkötése és mechanikai tulajdonságai

Nagy Attila

A program megnevezése: Biokémia és molekuláris biológia
Programvezető: Dr. Sümegi Balázs
Az alprogram megnevezése: Funkcionális fehérjedynamika vizsgálata
biofizikai módszerekkel
Alprogramvezető: Dr. Somogyi Béla
Témavezető: Dr. Kellermayer Miklós S. Z.,

Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Biofizikai Intézet

Pécs

2006

BEVEZETÉS

A harántcsíkolt izmot relaxált, nem aktív állapotban meghúzva passzív erő fejlődik. E passzív erő kifejlődésért a szarkomerben a vékony és vastag filamentum mellett jelen lévő harmadik filamentumrendszer felelős. E kevésbé ismert, ám a harántcsíkolt izom nagyfokú rendezettségét biztosítani hivatott filamentumrendszert egyetlen óriásfehérje, a titin (korábban connectin) alkotja. Molekulamérete 3.0-3.7 MDa, így a titin a legnagyobb fehérjemolekula. A titin N-terminálisa a Z-csíkhöz, míg C-terminálisa az M-csíkhöz rögzül, így a titin a szarkomer felét, mintegy 1 μm -nyi távolságot hidal át.

A titin 90%-át immunglobulin (Ig) és fibronektin (FNIII) típusú domének építik fel. A titin tömegének a doméneken kívül fennmaradó részét egyedi szekvenciák teszik ki. A leginkább vizsgált és funkcionális szempontból is legfontosabbnak tartott egyedi szekvencia a titin I-szakaszbeli részében található PEVK domén. A PEVK domén (hasonlóan az egész titin molekulához) mérete szövettípusonként változik. A legkisebb PEVK domén a N2B típusú szívizom titinben található, amely mindössze 163 aminosav, míg a *m. soleus*ban található titinmolekula PEVK doménjének hossza 2174 aminosav. E titin szakasz nevét a szekvenciájának több mint 70%-át kitevő prolin (P), glutaminsav (E), valin (V) és lizin (K) aminosavakról kapta. A *m. soleus* (hasonlóan a többi titin izoforma kisebb PEVK szakaszaihoz) szekvenciájában periodikus ismétlődések figyelhetők meg. Két fő szekvencia motívumot különböztetünk meg a PEVK-szegmensben: a PPAK és a polyE motívumokat. Az átlagosan 28 aminosav hosszúságú PPAK motívumokban a bázikus oldalláncú aminosavak dominálnak, míg a polyE szekvenciában savas oldalláncú glutamátok.

A viszonylag rövid szakaszon elhelyezkedő, nagy számú töltött aminosav-oldallánc egymásra gyakorolt vonzó és taszító hatása következtében a PEVK-szegmens a feltetelezések szerint nem rendelkezik stabil másodlagos szerkezettel. NMR és CD-spektroszkópiás mérésekkel a PEVK doménben a random szerkezet mellett sikerült kimutatni rövid életidejű, egymásba könnyen átalakuló másodlagos szerkezeti elemeket, poliprolin hélixet, β -redőt, azonban a PEVK szakasz másodlagos szerkezetét illetően még sok a nyitott kérdés. A titin PEVK doménjén végzett vizsgálataink egyik célja éppen az volt, hogy egyedi-molekula atomerőmikroszkópiával információt nyerhessünk e domén szerkezetét illetően.

Az titin kötődik az aktinhoz. A Z-csík közelében mintegy 100 nm hosszan a titin N-terminális része igen erős kölcsönhatást alakít ki a vékony filamentummal. A titin a szarkomer A-szakaszában lévő részében található bizonyos fibronektin- és immunglobulin doménekről is kimutatták, hogy kötődnek az aktinhoz, azonban a jelenség fiziológias szerepe

nem tisztázott. A szívizomban található titin izoforma PEVK szakasza kötődik az F-aktinhoz. Ezt a kölcsönhatást a Ca^{2+} /S100 fehérje szabályozza. A vázizom PEVK C-terminálisa kötődik ugyan az aktinhoz, de jóval kisebb látszólagos affinitással, mint az említett, szívizomban található PEVK. Megjegyzendő, hogy a vázizomban található titin izoforma PEVK domén C-terminálisának utolsó 163 aminosava megegyezik a szívizom-titin PEVK szekvenciájával. A PEVK szegmens aktinkötésének pontos mechanizmusa és kötés fiziológiai szerepe még nem ismert. A doktori értekezésem alapjául szolgáló munka során jellemezni kívántuk a PEVK domén és a domént alkotó PPAK, valamint polyE motívumok aktinkötését.

CÉLKITÚZÉSEK

Célunk a PEVK domén aktinkötésének szisztematikus vizsgálata, valamint e domén mechanikai jellemzése volt. Ennek érdekében célul tűztük ki a következőket:

- megfelelő PEVK rekombináns fragmentumok klónozása, expressziója, tisztítása és fluoreszcens jelölése;

- a PEVK domén - F-aktin kölcsönhatás vizsgálata többféle (*in vitro* motilitási próba, szilárd felszínhez való kötődési próba (solid-state surface binding assay) és aktin-keresztkötési próba, aktin-PEVK koszedimentáció vizsgálat, steady-state aktin-aktivált ATP-áz mérés) módszerrel;

- az egyedi molekula mechanikai vizsgálatokhoz a PEVK darabok végeinek specifikus megragadásához szükséges molekuláris fogantyúk kialakítása, illetve a specifikus megragadást lehetővé tevő felszínes kialakítása;

- a PEVK darabok mechanikai jellemzése egyedi-molekula atomerőmikroszkópiával.

ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

A humán vázizom PEVK-darabok klónozása, expressziója és tisztítása

A humán vázizom cDNS könyvtár Dr. Siegfried Labeit ajándéka volt. A *m. soleus* titin izoforma PEVK domén három, megközelítőleg egyforma hosszúságú darabban (a továbbiakban szegmensek) (PEVK I: 16852-19074, II: 19075-21192 és III: 21193-23373, (GenBank hivatkozása szám: X90569 (X90569.1 verzió) (8)) expresszáltuk. A PEVK domént felépítő polyE-"gazdag" (20305-20757) és PPAK (17413-18015) fragmentumokat, illetve egy csak polyE-szekvenciából ("tisztá"-polyE) álló rekombináns fehérjét (a továbbiakban fragmentumok) is expresszáltunk, mely utóbbi a X90569 GenBank hivatkozási számú PEVK cDNS 20305-20520 közé eső szakaszának megkettőzése. Az expresszálni kívánt fehérjedarabokat kódoló DNS-darabokat megfelelő restriktív endonukleázzal végzett emésztés után pET-28a (Novagen) vektorba ligáltuk, majd BL21(DE3)pLysS *E. coli* (Promega) sejtekbe transzformáltuk, majd e sejtvonalban expresszáltuk. Mindegyik rekombináns fragmentum N-terminálisán His-tag, C-terminálisán két szomszédos cisztein aminosav található. A rekombináns fehérjéket Ni²⁺-affinitás kromatográfiával tisztítottuk NTA-oszlopon (Novagen). Az esetlegesen szükséges további tisztítást Sephadex G25-ös vagy G75-ös (Sigma) gélszűrő vagy DE52 ioncserélő (Sigma) oszloppal végeztük. A fragmentumok koncentrációját Bradford reagenssel (Sigma) határoztuk meg.

Fehérjepreparálás

Az aktint, a miozint valamint a HMM-et korábban ismertetett eljárások alapján preparáltuk. Az F-aktint fluoreszcens jelölését tetramethylrhodamine-isothiocyanatephalloidinnal (TRITC-phalloidin, Molecular Probes) végeztük.

A PEVK domén – aktin filamentum kölcsönhatása során alkalmazott módszerek: In vitro motilitási próba, szilárd felszínhez való kötődési próba (solid-state surface binding assay) és aktin-kereszt-kötési próba, aktin-PEVK koszedimentáció vizsgálat, steady-state aktin-aktivált ATP-áz mérés.

Miofibrillumok izolálása, jelölése és vizualizálása

A PEVK II-es fragmentumot a C-terminálisán lévő cisztein aminosav oldalláncán jelöltük meg iodoacetamido-fluoresceinnel (IAF, Molecular Probes) a gyártó által javasolt módszer szerint. Az izolált miofibrillumokat (31) negyed órán át inkubáltuk a fluoreszcensen jelölt

PEVK fragmentummal. Az üvegfelületre kitapadt fluoreszcens titinmolekulák leképezéséhez lézerpasztázó konfokális mikroszkópot használtunk (Bio-Rad MRC-1024ES, Nikon Eclipse TE300 inverz mikroszkóp, Nikon Plan Fluor 40/0,75NA olajimmerziós objektív). A mintát egy Ar-ion lézerrel (488 nm) gerjesztettük.

Steady-state aktin-aktivált ATP-áz mérés

A HMM steady-state ATP-áz aktivitását NADH-csatolt reakció (Coupled Assay) segítségével határoztuk meg. A mérést Jasco V-550 UV-VIS spektrofotométerrel végeztük.

Adatanalízis

Az erő - megnyúlás görbékre a féregszerű lánc (Wormlike Chain, WLC) modellt illesztettük:

$$\frac{FA}{k_B T} = \frac{z}{L} + \frac{1}{4(1 - z/L)^2} - \frac{1}{4},$$

ahol A - perzisztenciahossz, k_B - Boltzmann állandó, L - kontúrhossz, T - abszolút hőmérséklet, z – vég – vég távolság.. Az illesztést 0–50 pN tartományban végeztük.

A PEVK domén, mint polielektrolit lánc leírásakor a Odijk-Skolnick-Fixman (OSF) elméletet vettük alapul.

EREDMÉNYEK

A vázizom titin PEVK domént három, szekvenciálisan egymást követő darabban fejeztük ki prokarióta (*E. coli*) expressziós rendszer segítségével. Az N-terminális (PEVKI), középső (PEVKII) és C-terminális (PEVKIII) szakaszok eltérően kötődtek az F-aktint szilárd felszínhez való kötődési, keresztkötési és *in vitro* motilitási próbákban. A látszólagos aktin-affinitás sorrendje PEVKII > PEVKI > PEVKIII volt. Az aktin kötés további részleteinek megismerése érdekében a PEVK domént felépítő PPAK és polyE motívumokat klónoztuk, és a PEVK-harmadokhoz hasonlóan prokarióta expressziós rendszerben fejeztük ki. A polyE motívum aktinnal szemben mutatott látszólagos affinitása nagyobb, mint a PPAK motívumé. Összehasonlítva, a polyE motívumok relatív mennyisége a különböző PEVK harmadokban ugyancsak PEVKII > PEVKI > PEVKIII, azaz a lokális aktinkötő tulajdonságért a lokális polyE motívum koncentráció tűnik felelősnek. A titin PEVK domén aktinkötő tulajdonságának élettani szerepe nem pontosan ismert. Modellünkben a PEVK aktin kötése egy viszkózus ütköző szerepet játszhat, mely szabályozza a harántcsíktolt izom terheletlen összehúzódási sebességét. A viszkózus ütköző hangolható a PPAK és polyE motívumok relatív mennyiségének izoformánként megfigyelhető, differenciált hasítással történő változtatásával.

E munka folytatásaként megkezdtük a PPAK és polyE motívumok F-aktinnal való asszociációjának gyors-kinetikai jellemzését. A mérés során millisecundumos időskálán vizsgáljuk a PPAK-, illetve polyE – aktin komplex kialakulásának kinetikáját stopped-flow berendezés segítségével. Előzetes eredményeink azt mutatják, hogy mindkét fragmentum esetében az aktinnal való asszociáció legalább kétlépéses folyamat. Az asszociáció gyors- és lassabb lépésének pontos jellemzése, azok mechanizmusának modellezése, illetve a fragmentumok és az aktin filamentumok asszociációjának/disszociációjának pontos kinetikai jellemzése által pontosabban megérthetjük a PEVK domén és a vékony filamentum kölcsönhatásának szerepét a szarkomerben.

A három, megközelítőleg egyforma hosszúságú (mintegy 700 aminosav) fehérje mechanikai sajátosságait egyedi molekula szinten erőmérő atomerő mikroszkóp (AFM) segítségével határoztuk meg. Mivel a három fragmentum teljes egészében lefedi a PEVK szakaszt, az eredmények összegzésével a vázizom titin PEVK szegmensének mechanikai sajátossága jól leírható. Az egyes szegmensek N-terminális végén His-tag, míg C-terminálisán szomszédos cisztein pár található, így Ni-NTA-val borított tárgylemez és arannyal fedett AFM rugólapka segítségével mód nyílt a fehérje-fragmentumok végeinek specifikus

megragadására. Eredményeink szerint a PEVK szegmens mindhárom fragmentumának erő - megnyúlás görbéjére jól illeszthető a wormlike chain (WLC) modell. A WLC modell a polimerláncot hajlítható kontínuumként írja le. A lánc hajlítómerevségét a perzisztencia hosszal jellemezzük, ami az a távolság, melyen belül a termikusan gerjesztett hajlító mozgások korreláltak. 500 nm/s-os húzási sebességnél egyik szegmens esetében sem tapasztaltunk hiszterézist, ami arra utal, hogy a PEVK ideális rúgóként jellemezhető. Az egyes harmadok mechanikai jellemzése során arra az eredményre jutottunk, hogy a látszólagos perzisztenciahosszak hierarchikus elrendeződést mutatnak. A PEVK domén N-terminálisa felé eső PEVK I szegmens bizonyult a legmerevebbnek, míg a C-terminális vég felőli PEVK III a leginkább flexibilisnek. Az immunoelektronmikroszkópos kísérletek is azt mutatták, hogy a PEVK domén hajlítómerevsége annak C-terminálisa felé haladva egyre csökken. A PEVK domén flexibilitásának, és a jelenség mögötti mechanizmus feltárásának érdekében az egyes PEVK szegmensek mechanikai viselkedését különböző ionerejű oldatokban is elvégeztük. Az effektív perzisztenciahosszak az ionerő növelésével csökkentek, ami jó egyezést mutat a polielektrolit láncok viselkedését leíró Odijk-Skolnick-Fixman (OSF) modellel. Mind a mai napig homály fedi azt az igen fontos kérdést, hogy mely fehérje vagy fehérjék „érik” a szarkomer megfeszítettségének mértékét. A PEVK domén különleges, változó hajlítómerevsége alkalmassá teszi a titint erre az igen fontos feladatra.

További célunk a teljes *m. soleus* PEVK domén mechanikai jellemzése atomerő mikroszkóp és lézercsipesz segítségével. Ennek érdekében a 2174 aminosav hosszúságú szakaszt egy darabban, bakulovírus expressziós rendszerben fejezzük ki. Az expresszióhoz szükséges DNS konstrukció elkészült, jelen pillanatban az expressziós rendszer beállítása és a legoptimálisabb tisztítási eljárás kidolgozása zajlik.

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

1. Nagy, A., Cacciafesta, P., Grama, L., Kengyel, A., Málnási-Csizmadia, A. and Kellermayer, M. S. Z. 2004 Differential actin binding along the PEVK domain of skeletal muscle titin. *J Cell Sci.* 117(Pt 24):5781-9. IF 7.25.

2. Nagy, A., Grama, L., Huber, T., Bianco, P, Trombitás, K, Granzier, H. L. and Kellermayer, M. S. Z. 2005. Hierarchical extensibility in the PEVK domain of skeletal-muscle titin. *Biophys J.* 89(1):329-36. IF 4.463.

3. Grama, L., Nagy, A., Scholl, C., Huber, T. and Kellermayer M.S.Z. 2005. Local variability in the mechanics of tandem Ig segments. *Croat Chem Acta.* 78: 405-411. IF 0.729.

ABSZTRAKTOK

1. Grama, L., Nagy, A., Málnási-Csizmadia, A., Kellermayer, M.S.Z. Mechanical stability of an eight-domain segment in titin's differentially-spliced tandem-Ig region. *Biophys J* 84, 563a, 2003.

2. Nagy, A., Grama, L., Málnási-Csizmadia, A., Kellermayer, M.S.Z. Expression and molecular mechanics of skeletal-muscle titin's PEVK segment. *Biophys J.* 84, 563a, 2003.

3. Nagy, A., Cacciafesta, P., Grama, L., Kengyel, A., Málnási-Csizmadia, A., and Kellermayer, M.S.Z. Differential actin binding along the PEVK domain of skeletal-muscle titin *Biophys J.* 86, 567A, 2004.

4. Nagy, A., Cacciafesta, P., Grama, L., Kengyel, A., Málnási-Csizmadia, A., and Kellermayer, M.S.Z. Elastic and actin-binding properties of full-length skeletal muscle titin's PEVK domain. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 25, 263, 2004.

5. Nagy, A., Cacciafesta, P., Grama, L., Kengyel, A., Málnási-Csizmadia, A., and Kellermayer, M.S.Z. Elastic and actin-binding properties of full-length skeletal muscle titin's PEVK domain. *Biophys. J.* 88, 2005.

6. Nagy, A., Grama, L., Málnási-Csizmadia, A. and Kellermayer, M S. Z. Titin óriás izomfehérje PEVK doménjének expressziója és molekuláris mechanikája. XXXII. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2002.

7. Nagy, A., Grama, L., Málnási-Csizmadia, A. and Kellermayer, M S. Z. Expression and single-molecule mechanics of skeletal muscle titin's PEVK segment. Biophysical Society 47th Annual Meeting, San Antonio, Texas, 2003.

8. Nagy, A., Grama, L., Málnási-Csizmadia, A. and Kellermayer, M S. Z. Rekombináns titin fragmentumok molekuláris mechanikája. XXXIII. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2003.

9. Nagy, A., Grama, L., Cacciafesta P., Málnási-Csizmadia, A. and Kellermayer, M S. Z. Differential actin binding along the PEVK domain of skeletal-muscle titin. Biophysical Society 48th Annual Meeting, Baltimore, 2004.

10. Nagy, A., Grama, L., Málnási-Csizmadia, A. and Kellermayer, M S. Z. Hierarchical extensibility in the PEVK domain of skeletal-muscle titin. EMBO-HHMI Conference, Budapest, 2005.

11. Nagy, A., Bainco P., Grama, L., Málnási-Csizmadia, A. and Kellermayer, M S. Z. Elastic and actin-binding properties of skeletal muscle titin's PEVK domain. Biophysical Society 49th Annual Meeting, Los Angeles, 2005.

12. Nagy, A., Grama, L., Huber, T., Bianco P., Trombitas, K., Granyier H. L. and Kellermayer, M S. Z. Hierarchical extensibility in the PEVK domain of skeletal-muscle titin. Alpbach Workshop, "Coiled-coils, Collagen and Co-Proteins." September 17-22, 2005, Alpbach, Austria.

EGYÉB KÖZLEMÉNYEK ÉS ABSZTRAKTOK

1. Nagy, A., Malnasi-Csizmadia, A., Somogyi, B., Lőrinczy, D. 2004. *Thermal stability of chemically denatured green fluorescent protein (GFP)*. Thermochemica Acta, 410, 161-163. IF 1.161.

2. Szenthe, B., Gaspari, Z., Nagy, A., Perczel, A., Graf, L.. 2004. *Same fold with different mobility: backbone dynamics of small protease inhibitors from the desert locust, Schistocerca gregaria*. *Biochemistry*. 43(12):3376-84. IF: 4.278.

3. Kellermayer, M. S. Z., Grama, L., Karsai, A., Nagy, A., Kahn, A., Datki, Z. L., Penke, B. 2005. *Reversible mechanical unzipping of amyloid beta-fibrils*. *J Biol Chem*. 280(9):8464-70. IF 6.482.

4. Horvath, I., Harmat, V., Perczel, A., Palfi, V., Nyitray, L., Nagy, A., Hlavanda, E., Naray-Szabo, G., Ovadi, J. 2005. *The structure of the complex of calmodulin with KAR-2: a novel mode of binding explains the unique pharmacology of the drug*. *J Biol Chem*. 280(9):8266-74. IF 6.482.

5. Karsai, Á., Nagy, A., Kengyel, A., Mártonfalvi, Zs., Grama, L., Penke, B. and Kellermayer, M.S.Z. 2005. *Effect of lysine-28 side chain acetylation on the nanomechanical behavior of Alzheimer amyloid β 25-35 fibrils*. *J. Chemical Information and Modeling*. **45** (6), 1641-1646, 2005 IF 3.078.

6. Karsai, Á., Mártonfalvi, Zs., Nagy, A., Grama, L., Penke, B. and Kellermayer, M.S.Z. *Mechanical manipulation of Alzheimer's amyloid β 1-42 fibrils*. *J. Struct Biol*. In the press. IF 3.092.

7. Kellermayer, M.S.Z., Grama, L., Karsai, Á., Nagy, A., Kahn, A., Datki, Z. and Penke, B. *Reversible unzipping of amyloid β -fibrils*. *Biophys. J*. 88, 198A-199A, 2005.

8. Kellermayer, M. S., Grama, L., Karsai, Á., Nagy, A., Kahn, A., Datki, Z., Penke, B. (2005) *Structural dynamics of amyloid explored by manipulating individual fibrils* *FEBS Journal* 272 (s1) F2-016P.