
PhD értekezés tézisei

FEHÉRJEDINAMIKA VIZSGÁLATA A LUMINESZCENCIA
SPEKTROSKÓPIA MÓDSZEREIVEL

Szatka Ágnes

PÉCS, 1998

FEHÉRJEDINAMIKA VIZSGÁLATA A LUMINESZCENCIA
SPEKTROSKÓPIA MÓDSZERÉVEL

Szatka Ágnes

Pécsi Orvostudományi Egyetem
Biofizikai Intézet
1998

BEVEZETÉS

Napiainkban általában elfogadott nézet, hogy a fehérjék nem rigid, sztatikus szerkezettel bíró makromolekulák, hanem különböző szinteken fellépő, különböző amplitúdójú és frekvenciájú intramolekuláris mozgások eredője által meghatározott dinamikus szerkezettel rendelkeznek. A konformációs állapotok közötti folyamatos átmenetek - a konformációs fluktuációk - a fehérjék alapvető tulajdonságát jelentik. E belső fluktuációk széles időskálán változva kb. 15 nagyságrendet ölelnek fel, 10^{-15} sec-től órákig terjedhetnek, s mintegy 0.01 Å-től 10 Å-nyi elmozdulást jelentenek. Működése során gyakorlatilag minden enzim konformációs változásokon megy keresztül. Ebből következik, hogy az enzimek működésének, szabályozásának megismerése céljából nagy jelentősége van a konformációs állapotok, valamint a különböző konformációs állapotok közötti átmenetek tanulmányozásának. A fehérjék dinamikus viselkedésének, fluktuációs mozgásformáinak tanulmányozására számos kísérleti módszer áll rendelkezésre, melyek közül a legelterjedtebb módszerek csoportját a spektroszkópiai módszerek (ESR, NMR, CD és ORD, IR-, lumineszcencia-spektroszkópia, stb.) alkotják.

A fehérjék szerkezeti fluktuációjának fokozatos megismerése elvezetett a klasszikus enzimmodellek átértékeléséhez, s lehetővé tették különböző dinamikus enzimmodellek felállítását. Ezen modellek megengedik, vagy feltételezik, hogy a fehérjedinamika komoly szerepet tölthet be az intra- és intermolekuláris információtranszferben olyan értelemben, hogy a makromolekulák egymástól távoli pontjai dinamikus karakterük módosításával válaszolnak más pontokon bekövetkező zetti lokális kölcsönhatásokra.

Munkám során a fehérjék nanoszekundumos, valamint az annál hosszabb időskálán lejátszódó szerkezeti fluktuációjának vizsgálatára alkalmas lumineszcenciás technikákat alkalmaztam. Ezen technikák felhasználása ez esetben különösen előnyös és kényelmes, mivel kis perturbáló hatással járó, s ugyanakkor sok információt szolgáltató beavatkozást jelentenek.

CÉLKITŰZÉSEK

Célul tűztük ki, hogy az enzimműködés szempontjából különösen fontos nanoszekundumos időskálájú fluktuációs jelenségek tanulmányozására alkalmazható fluoreszcencia spektroszkópiás módszereket továbbfejlesszük. Kísérletet tettünk egy *steady-state* fluoreszcencia spektroszkópiás módszer kidolgozására, melynek

segítségével a dinamikus és statikus fluoreszcencia kioltási állandók szeparáltan meghatározhatók *steady-state* mérési körülmények között.

A foszforiláz *b* enzim allosztérikus ligandjainak kötődése során bekövetkező lokális, ill. globális konformáció-változásokat a lumineszcencia spektroszkópia módszerének alkalmazásával kívántuk követni.

A glikogén foszforiláz enzim aktív centrumára vonatkozó és jelenleg még nem tisztázott kérdés, hogy milyen módon képezhető el a koeenzimnek és mikrokomplexének konformációjának közvetlen részvételével a katalitikus folyamathoz. Ennek megválaszolására megpróbáltunk közvetlen kísérletes adatok alapján információt szerezni a foszforiláz *b* aktív centrumának lokális dinamikájáról. Erre az aktív zsebben kötött és fluoreszcens sajátosságokkal rendelkező koeenzim, a piridoxal-5'-foszfát (PLP) adott lehetőségét, aminnek fluoreszcencia kioltását tanulmányoztuk anionos (I^- és IO_3^-) kioltókkal. A kioltási kísérletek során kapott nem-lineáris Stern-Volmer görbék analízisére egy modellt kívántunk kidolgozni.

ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

A dinamikus és statikus kioltási állandók szelektív meghatározására kidolgoztunk egy *steady-state* fluoreszcencia spektroszkópiai módszert, ami az ún. "Quenching Resolved Emission Anisotropy" (Eftink, Biophys. J., 43, 323, 1983) eljárás továbbfejlesztett változata. A módszer pontosságát számiógiépes szimulációval ellenőriztük. A módszer alkalmazhatóságát a következő modellrendszeren vizsgáltuk: fluoroforként piridoxamin-5'-foszfáttal (PMP) jelölt lizozim enzimet, kioltóként akrilamidot használtunk. A lizozim jelölését Churrich leírása (Biochemistry, 4, 1405, 1965) szerint végeztük. A méréseket 50 mM-os foszfát-pufferben (pH=7.0) 20.0 °C-on, 325, ill. 390 nm gerjesztési és emissziós hullámhosszon, 4, ill. 8 nm résszélesség mellett végeztük. Vízszokozásifüggő kísérleteink során a vízszokozást glicerinrel növeltük.

A glikogén foszforiláz *b* enzimet (EC.2.4.1.1) nyúl vázizomból preparáltuk Fischer és Krebs módszere szerint (Methods in Enzymology, 5, 369, 1962). A háromszor átkristályosított enzimet 50 mM-os β -glicerofoszfát pufferben (pH=6.8), 10 mM MEA, 1.5 mM EDTA jelenlétében tároltuk. Az enzimpreparátumot közvetlen felhasználás előtt nukleoid mentesítés és a kristályosításhoz szükséges kismolekulájú anyagoktól való eltávolítás céljából Sephadex G-25 oszlopon géliszűrtük. A foszforiláz *b* aktív

centrumának lokális dinamikájának jellemzésére az enzimben kötött koeenzim fluoreszcenciájának kioltását vizsgáltuk anionos kioltók (jodid, jodát) alkalmazásával. A kioltási folyamat kinetikai jellemzése és a mechanizmus tisztázása érdekében összehasonlító vizsgálatokat végeztünk a koeenzim modellvegyületén, a piridoxamin-5'-foszfáton (PMP) is. A foszforiláz *b* esetben kapott nem-lineáris kioltási görbék analízisét az általunk kidolgozott modell segítségével végeztük el.

A fluoreszcencia kioltás

A *steady-state* fluoreszcencia kioltási méréseket Hitachi MPF-4, ill. Perkin-Elmer LS50B spektrofluoriméteren végeztük. A fehérje oldatok abszorpcióját a gerjesztési és emissziós hullámhosszon 0.05 alatt tartottuk a belső szűrő hatások elkerülése céljából. A kioltási kísérleteknél a különböző koncentrációjú kioltó jelenlétében mért fluoreszcencia intenzitásokból határoztuk meg a kioltási paramétereket a Stern-Volmer, ill. a módosított Stern-Volmer összefüggés alapján.

Fluoreszcencia élettartam meghatározása

A fluoreszcencia élettartam méréseket ISS K2 multifrekvenciás fázis-fluoriméteren (ISS Fluorescence Instrumentation, Champaign, Illinois, USA) végeztük, az ún. "cross-correlation" módszer felhasználásával. Gerjesztő fényforrásként 300 W-os xenon lámpát használtunk, melynek fényét Pockels cella közbeiktatásával moduláltuk. Az emisszió fáziskésését és demodulációját mértük. Referenciaként glikogén oldatot használtunk (0 ns-os élettartam). A minták gerjesztése monokromátoron keresztül történt, az emissziós oldalon pedig a mintáknak megfelelő optikai szűrőket használtunk. A modulációs frekvencia-tartományt a várható fluoreszcencia élettartamnak megfelelően választottuk ki. Legáltalában 10 különböző frekvencia értéken mértük, melyek logaritmikus skálán egyenletesen oszlottak el. A mért fázis és modulációs adatokat az "ISS Decay Analysis Software" segítségével értékeltük ki. Az illesztések jószágának ellenőrzésére a redukált χ^2 értéket alkalmazzuk.

Fluoreszcencia rezonancia energia transzfer hatásfokainak meghatározása

A foszforiláz *b* enzim ligandjai által indukált konformációváltozás követésére Somogyi és munkatársai által leírt (*Biochemistry*, 24, 6674, 1984), ill. komplex donor-akceptor rendszerekre kiterjesztett (4. sz. közlemény) a fluoreszcencia rezonancia energia transzfer mérésen alapuló módszert alkalmaztuk. Az energiáttranszfer hatásfokának a donor kvantumhatásfokával, ill. a fluoreszcencia intenzitásával normált értékét (f' paraméter) határoztuk meg hőmérséklet függésben. A rezonancia energia transzfer hatásfokának meghatározására az akceptor fluoreszcencia érzékenyítés módszerét használtuk. A foszforiláz *b* esetben az enzimben található triptofán (*Trp*) csoportok donorként, a koenzim (PLP) pedig akceptorként szolgált. Ezeket a méréseket is Perkin-Elmer LS50B spektrofluoriméteren végeztük.

Foszforeszcencia élettartam meghatározása

A foszforiláz *b* enzimben található triptofán (*Trp*) csoportok foszforeszcencia élettartamának mérését Prof. Giovanni Strambini laboratóriumában Olaszországban végeztük (Istituto di Biofisica, Pisa), Strambini és munkatársai által összeállított foszforeszcencia élettartam mérő készüléken. Gejjesztéshez 295 nm-re hangolt festéklézeret használtunk (UV 500 M-Candela). Az enzimben található triptofán csoportok foszforeszcencia lecsengését 430 nm-en detektáltuk a gejjesztési impulzust követően 1 ms-mal egy elektronikusán vezérelt zár segítségével. A lecsengési görbék analizisét a nemlineáris legkisebb négyzetek módszerén alapuló "Global Analysis" programmal végeztük. A mintákban oldott oxigént Strambini és munkatársai által leírt módszer szerint távolítottuk el (*Biophys. J.*, 52, 23, 1987).

EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

A dinamikus és sztatikus fluoreszcencia kioltási állandók szétválasztására alkalmas *steady-state* módszer

A fehértjeddinamika jellemzésére új fluoreszcenciás technikát dolgoztunk ki a dinamikus és sztatikus kioltási állandók *steady-state* módszerrel történő szelektív meghatározására. A módszerünk az ún. "Quenching Resolved Emission Anisotropy" eljárás továbbfejlesztett változata, ami a *steady-state* emissziós anizotrópia különböző

koncentrációjú kioltó jelenlétében történő meghatározásán alapszik. A módszer előnye az, hogy korábban a *steady-state* fluoreszcencia intenzitás mérések mellett szükség volt idő- és költségigényes fluoreszcencia élettartam mérésekre is ahhoz, hogy a dinamikus kioltási állandók értékét meghatározzuk. Módszerünk felhasználásával egyes kísérleti rendszereknél ez a nehézség kikerülhető. A módszer pontosságát számítógépes szimulációval ellenőrizve megállapítottuk, hogy annak hibája összemérhető a klasszikus fluoreszcencia kioltási kísérletek hibájával. A módszer alkalmazhatóságát lízozimhoz kovalensen kötött piridoxamin-5'-foszfát fluoreszcenciájának akrilammiddal történő kioltásával ellenőriztük. A közeg viszkozitásának glicerinnel történő változtatásával dinamikus kioltási állandó viszkozitás-függésére az irodalomban élettartam mérésekkel igazolt elméleti leírásnak megfelelő (diffúzió-limitált) reciprok összefüggést kaptunk. Összegezve megállapítható, hogy a módszer korlátai - homogén emitter populáció ($\alpha=1$, monoexponenciális lebomlás) - ellenére jól alkalmazható a sztatikus és dinamikus kioltási állandók szeparált meghatározására *steady-state* mérési körülmények között (1. sz. közlemény).

Allosztérikus ligandok hatása a foszforiláz *b* enzim intramolekuláris dinamikájára

A foszforiláz *b* enzim ligandjai (AMP, ATP, G-1-P) által indukált konformációváltozást tanulmányozva kimutattuk, hogy az ATP kötődésekor a *Trp* csoportokhoz rendelhető szobahőmérsékletű foszforeszcencia élettartam jelentősen lecsökken. A többi alkalmazott ligand (AMP és/vagy G-1-P) jelenléte nem okozott jelentős változást a *Trp* csoportok foszforeszcencia élettartamában. Ez arra utal, hogy az ATP kötődése az emitáló csoportok közvetlen környezetét flexibilisebbé teszi. Annak eldöntésére, hogy ez a változás globális vagy csak a *Trp* csoportok közvetlen környezetében detektálható, a *Trp* csoportok fluoreszcenciájának akrilammiddal történő kioltását tanulmányoztuk. Ez utóbbi vizsgálatok azt mutatták, hogy az enzim globális flexibilitása nem változik az ATP bekötődésével, vagyis a foszforeszcencia mérésekkel detektált változás a foszforeszcenciát mutató (elemetett) *Trp* csoport(ok) környezetére lokalizált (3. sz. közlemény). Megvizsgáltuk a foszforiláz *b* enzimben található triptofán csoportok (donor molekulák) és a koenzim, PLP (akceptor) közötti Förster típusú rezonancia energia transzfer hőmérsékletfüggését a ligand-mentes enzimben, valamint ligandjainak jelenlétében. Az energia transzfer hatásfokának a donor kvantumhatásfokával normált értéke (f') meredekebben emelkedik a hőmérséklettel, ha a

donor-akceptor közötti fébfémátrix flexibilisebb. Ezen mérések alapján megállapítottuk, hogy az inhibitorral (ATP) telített enzim szerkezete a *Tryp* csoportok és a koenzim között - a foszforeszcencia élettartam mérésekkel összhangban - lazább, míg az enzim aktívátorának (AMP) kötődése rigidebb struktúrát eredményezett (6. sz. közlemény).

A foszforiláz b enzim aktív centrumának lokális dinamikája

A foszforiláz *b* aktív centrumának lokális konformációs dinamikájának jellemzésére az aktív centrumban kötött koenzim (PLP) fluoreszcenciájának kioltását tanulmányoztuk anionos kioltókkal (jodid, jodát anionnal). A kioltási kísérleteknél kapott nem-lineáris Stern-Volmer görbék analízisére kidolgoztunk egy modellt, aminek segítségével lehetőség nyílt arra, hogy a koenzim fluoreszcencia kioltásánál fellépő párhuzamos kioltási folyamatokat jellemezzük (2. sz. közlemény). A módszer lehetővé tette, hogy a különböző kioltási folyamatok kioltási állapotai, valamint a G-1-P kötőhelyhez kapcsolódó anionok disszociációs állapotai meghatározhatók. A *steady-state* és időfüggő kioltási kísérletek alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a PLP fluoreszcencia jodid, vagy jodát anionnal történő kioltása egyrészt a G-1-P szubsztrát kötőhelyéhez kapcsolódó kioltóktól származik, másrészt valószínűleg létezik legalább egy kisebb affinitású kötőhely a piridoxil-gyűrű közvetlen közelében. Erre a helyre kötődő kioltók sztatikus kioltást eredményeznek. Meghatároztuk, illetve becsültük a kioltók ezen kötőhelyekre vonatkozó disszociációs állapotait. A szubsztrát kötőhelyhez kapcsolódó kioltók reakciósebességi állapotainak értékei alapján megállapítottuk, hogy a G-1-P kötőhelyét tartalmazó láncrez és a PLP-t kötő szegmens relatív fluktuációja egy 10^7 s^{-1} frekvenciájú, természetesen aktivált kollektív mozgásnak tekinthető. Ezen közepes frekvenciájú lokális fluktuációnak funkcionális jelentősége lehet, mivel ezáltal a két csoport már kellő közelségbe kerülhet egymáshoz ahhoz, hogy a katalitikus folyamat azon lépései, melyek a koenzim és szubsztrát közvetlen kölcsönhatásait feltételezik végbe menjenek. Feltételezésünk szerint a másodlagos kötőhely(ek) szerepe egyrészt az lehet, hogy az aktív zseben belül a szubsztrát lokális koncentrációját megnöveli, másrészt a szubsztrát kötődése ehhez a helyhez indukálhat egy olyan konformáció változást, ami elősegítheti a szubsztrát nagy affinitású kötőhelyhez történő kötődését (5. sz. közlemény).

AZ EREDMÉNYEK GYAKORLATI JELENTŐSÉGE

A fébfémák intramolekuláris dinamikájának követésére kidolgozott *steady-state* módszerünk által lehetővé vált a dinamikus fluoreszcencia kioltási állapotok szelektív meghatározása olyan laboratóriumokban is, melyek a költéséjényes időfüggő mérésekre alkalmas berendezésekkel nem rendelkeznek. A glikogén foszforiláz *b* enzimből az alloszterikus ligandok kötődésének hatására bekövetkező konformációs változások detektálása, valamint az aktív centrum lokális dinamikájának vizsgálata során kapott eredményeink hozzájárulhatnak a katalitikus folyamat még tisztázatlan lépéseinek felderítéséhez.

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBE TARTOZÓ SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

1. Lakos, Zs., Szarka, Á., Koszorus, L., Somogyi, B.: Quenching-resolved emission anisotropy: A steady-state fluorescence method to study protein dynamics. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 1995, 27, 55-60.
 2. Somogyi, B., Szarka, Á., Lakos, Zs.: The local dynamics of the active site region of phosphorylase *b*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1995, 209, 936-943.
 3. Szarka, Á., Gonnelli, M., Gabellieri, E., Cioni, P., Lakos, Zs., Somogyi, B.: Alteration of the intramolecular dynamics of glycogen phosphorylase *b* by allosteric ligands. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 1998, 42, 52-56.
 4. Somogyi, B., Lakos, Zs., Szarka, Á., Nyitrai, M.: Protein flexibility as revealed by fluorescence energy transfer: An extension of the method for systems with multiple labels. *Biochemistry*, 1998, (közlésre elküldve).
 5. Szarka, Á., Lakos, Zs., Somogyi, B.: Anionic quenching of the coenzyme pyridoxal-5'-phosphate of phosphorylase *b* (előkészületben).
 6. Szarka, Á., Lakos, Zs., Nyitrai, M., Somogyi, B.: The flexibility of glycogen phosphorylase *b* revealed by fluorescence resonance energy transfer: the influence of nucleotides (előkészületben).
- Az értekezés témakörébe nem tartozó saját közlemények**
7. Lakos, Zs., Szarka, Á., Somogyi, B.: Fluorescence quenching in membrane phase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1995, 208, 111-117.

8. Miseta, A., Bogner, P., Szarka, Á., Kallermayer, M., Galambos, Cs., Wheatlay, D.N., Cameron, I.L.: Effect of Non-lytic Concentrations of Brij-series Detergents on the Metabolism-Independent Ion Permeability Properties of Human Erythrocytes. *Biophys. J.* 1995, 69, 2563-2568.
9. Bogner, P., Miseta, A., Szarka, Á., Csutora, P., Somogyi, B., Wheatley, D.N.: Correlation between total, ouabain resistant Rb^+ uptake and membrane lipid fluidity of different mammalian erythrocytes. BBA, közlésre elküldve.
- Poszterek, előadások**
10. Lakos, Zs., Szarka, Á., Nagy, P., Somogyi, B., Danjanovich, S.: Fehérfék fluoreszcencia kioltása emissziós anizotropia követésével. Magyar Biokémiai Egyesület XXV. Vándorgyűlés, Budapest, 1988. jún.28-júl.2.
11. Somogyi, B., Lakos, Zs., Szarka, Á.: Quenching-resolved anisotropy: a steady-state cost-effective fluorescence technique applicable instead of time-resolved quenching measurements. In Proceedings of the 11th International Conference on Low Cost Experiments in Biophysics (LCCEB), December 18-20, 1989, Cairo
12. Lakos, Zs., Szarka, Á., Danjanovich, S., Somogyi, B.: Quenching-resolved emission anisotropy: a steady-state method to resolve static and dynamic quenching components. In Proceedings of the 10th International Biophysics Congress, Vancouver, Canada, júl.29-aug.3., 1990, (p.231.)
13. Somogyi, B., Lakos, Zs., Szarka, Á., Danjanovich, S.: Fluorescence energy transfer as a tool to study protein dynamics: an extended model. In Proceedings of the 10th International Biophysics Congress, Vancouver, Canada, júl.29-aug.3., 1990, (p.230.)
14. Szarka, Á., Lakos, Zs., Somogyi, B.: A foszforiláz b enzim aktív centrumának dinamikus modelljei (előadás). "Az élő rendszerek biomatematikai modellezése" c. konferencia, Siófok, 1991, szept.6-7.
15. Szarka, Á., Lakos, Zs., Somogyi, B.: A foszforiláz b enzim aktív centrumának lokális dinamikája. Magyar Biofizikai Társaság XVI. Vándorgyűlés, Budapest, 1991, júl.2-4. (p.97.)
16. Somogyi, B., Lakos, Zs., Szarka, Á.: The local dynamics of the active site of phosphorylase b. 2nd Symposium on Instrumental Analysis, Austria, Graz, 1993. May. 25-28. (19) (előadás)
17. Szarka, Á., Lakos, Zs., Somogyi, B.: Quenching-resolved anisotropy: a steady-state method to resolve static and dynamic quenching components. 2nd Symposium on Instrumental Analysis, Austria, Graz 1993. May. 25-28. (P2)
18. Szarka, Á., Lakos, Zs., Somogyi, B.: Theoretical model for the quenching of the co-factor fluorescence of phosphorylase b. 11th International Biophysics Congress, Hungary, 1993. July 25-30. (A3.114)
19. Somogyi, B., Lakos, Zs., Szarka, Á.: Local dynamics of the active center of phosphorylase b. 11th International Biophysics Congress, Hungary, 1993. July 25-30. (S.B.2.2.)
20. Szarka, Á., Lakos, Zs., Somogyi, B.: A foszforiláz b enzim aktív centrumának lokális dinamikája. Országos Lumineszcencia-Spektroszkópia Konferencia, Pécs, 1994 október 4-6.
21. Szarka, Á., Gabellieri, E., Lakos, Zs., Strambini, G.B., Somogyi, B.: Intramolecular dynamics of glycogen phosphorylase b as revealed by luminescence spectroscopy. 3rd Symposium on Instrumental Analysis, Hungary, Pécs, 1995. May. 2-5. P23
22. Szarka, Á., Gabellieri, E., Lakos, Zs., Strambini, G.B., Somogyi, B.: A foszforiláz b enzim intramolekuláris dinamikájának vizsgálata lumineszcencia spektroszkópiai módszerekkel. Magyar Biofizikai Társaság XVII. Vándorgyűlés, Debrecen, 1995, júl. 2-5. P41
23. Szarka, Á., Gabellieri, E., Lakos, Zs., Strambini, G.B., Somogyi, B.: A foszforiláz b enzim intramolekuláris dinamikájának vizsgálata lumineszcencia spektroszkópiai módszerekkel. Országos Lumineszcencia-Spektroszkópia Konferencia, Pécs, 1995. Október
24. Szarka, Á., Gonnelli, M., Cioni, P., Gabellieri, E., Lakos, Zs., Somogyi, B.: Alteration of the intramolecular dynamics of glycogen phosphorylase b by allosteric ligands. Magyar Biofizikai Társaság XVIII. Vándorgyűlés, Pécs, 1997, júl. 6-9. p.115
25. Somogyi, B., Szarka, Á., Lakos, Zs., Nyitrai, M.: Macromolecular flexibility as revealed by Förster-type energy transfer. XIIIth Scool "Spectroscopy of Molecules and Crystals", Kiev, Ukrajna, 1997, április 22-28.