

Ph.D. értekezés tézisei

Toxinok által létrehozott konformációs és dinamikai változások az aktin filamentumban

Visegrády Báázs

Program: Biokémia és molekuláris biológia

Programvezető: Dr. Sümegi Balázs

Alprogram: B-130: Funkcionális fehérjedynamika vizsgálata biofizikai módszerekkel

Alprogramvezető: Dr. Somogyi Béla

Témavezetők: Dr. Nyitrai Mklós

Dr. Lőrinczy Dénes

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar,
Biofizikai Intézet

2005

Bevezetés

A phalloidin az *Amanita phalloides*-ből (gyilkos galóca) származó ciklikus polipeptid, citotoxin. A phalloidin nagy affinitással kötődik aktin filamentumhoz, stabilizálva ezzel annak szerkezetét (Faulstich et al., 1977; Miyamoto et al., 1986). A phalloidin stabilizált aktin filamentum alkalmazása széles körben elterjedt az *in vitro* kísérletek során. Többféle fluoreszcens phalloidin származékot (pl.: rodamin-phalloidin, fluorszcein-phalloidin, eosin-phalloidin) használnak például fluoreszcencia mikroszkópiai eljárásokban az aktin citoszkeleton láthatóvá tételére.

Egy másik ciklikus polipeptid, citotoxin, a tengeri szivacsból (*Jaspis johnstoni*) származó jasplakinolide hatása ugyanakkor sokkal kevésbé ismert. *In vitro* a jasplakinolide szintén kötődik az aktin filamentumhoz és stabilizálja annak szerkezetét (Bubb et al., 1994). Gyorsítja az aktin polimerizációját (Bubb et al., 1994), és nem polimerizáló körülmények között az aktint polimerizációra készíti. Míg a phalloidin stabilizálja az aktin oligomereket, a jasplakinolide hasonló hatást nem mutat (Spector et al., 1999). A jasplakinolide a phalloidinnal versengve képes az aktin filamentumhoz kötődni, ami valószínűsíti azt, hogy a két toxikus peptid kötőhelye az aktinon egybeesik, vagy nagymértékű átfedést mutat (Senderowicz et al., 1995). A két toxin között lényeges különbség van a tekintetben, a jasplakinolide - szemben a phalloidinnal - szabadon képes a sejtbe jutni. Mint láthatjuk, e két toxin egyes esetekben hasonló, más esetekben azonban eltérő hatást gyakorol az aktin filamentumra. Munkánk során a phalloidin és a jasplakinolide hatását vizsgáltuk az aktin filamentum dinamikai tulajdonságaira és termikus jellemzőire.

Célkitűzések

1. Az aktin filamentum dinamikájában phalloidin és jasplakinolide kötésének hatására bekövetkező változások leírása és azok összehasonlítása fluoreszcencia spektroszkópia alkalmazásával.

2. A toxinok hatása alatt álló, illetve a toxinmentes filamentum termodinamikai jellemzőinek meghatározása, és összehasonlítása kalorimetria segítségével.

3. Az aktin filamentum jellemzése szubsztöchiometrikus toxinkoncentrációk esetén.

4. A toxinok által kiváltott allosztérikus hatás kvantitatív modellel történő leírása.

Alkalmazott módszerek

„Steady-state” fluoreszcencia kísérletek

A „steady-state” fluoreszcencia kísérleteket egy Perkin-Elmer LS50B Lumineszcencia Spektrométerrel végeztük, amely termosztálható mintatartóval volt felszerelve. A mérés során az alábbi puffert használtuk 2 mM Tris/HCl, 0,2 mM ATP, 0,005 % NaN₃, 0,5 mM 2-merkaptoetanol, 100 mM KCl, 2 mM CaCl₂ illetve MgCl₂ (A puffer).

A FRET hatásfok az alábbi egyenlettel meghatározható a donor fluoreszcencia intenzitásának ismeretében:

$$E = 1 - (F_{DA} / F_D) \quad (1)$$

ahol F_{DA} a donor akceptor jelenlétében, és F_D a donor akceptor nélkül mért fluoreszcencia intenzitása.

A normált FRET hatásfok (f'), definíció szerint a FRET hatásfoknak és a donor akceptor jelenlétében mért intenzitásának a hányadosa (Somogyi et al., 1984):

$$f' = E / F_{DA} \quad (2)$$

Munkánk során célunk volt a fehérje különböző állapotainak flexibilitásáról információkat szerezni, ezért hőmérsékletfüggő FRET kísérleteket végeztünk. Az f' érték hőmérsékleti profilja (2. egyenlet) a donor és akceptor közötti fehérjemátrix flexibilitására jellemző (Somogyi et al., 1984).

Differenciális pásztázó kalorimetria (DSC)

Az aktin filamentumon végzett differenciális pásztázó kalorimetria (DSC) kísérleteket SETARAM Micro DSC-II kaloriméteren, 0 és 100 °C közötti hőmérséklettartományon végeztük. Az endoterm denaturáció kalorimetrikus entalpiaváltozását (ΔH) a hőáram-hőmérséklet görbe integráljából SETARAM program segítségével határoztuk meg. A denaturáció entrópiaváltozását (ΔS) a denaturációs hőmérsékletére számítva (T_m) az alábbi képlettel kaptuk:

$$\Delta S = \Delta H / T_m \quad (3)$$

A Gibbs-féle szabad entalpiaváltozást szobahőmérsékletre számítottuk ki a következő képlettel:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S. \quad (4)$$

Eredmények

Az aktin filamentum flexibilitásának és termikus stabilitásának vizsgálata Ca-aktin filamentumban

Munkánk során két toxikus peptidnek, a phalloidin-nek és a jaspalakinolide-nek az aktin filamentum flexibilitására gyakorolt hatását kívántuk vizsgálni. Korábbi munkák során igazolódott, hogy Mg-aktin esetén phalloidin hatására a filamentum flexibilitása csak kis mértékben változott, míg Ca-aktin esetében nagymértékben csökkent (Nyitrai et al., 2000). Ezen megfontolások alapján a Ca-aktin filamentumot választottuk, mint alkalmas modellrendszert, a toxinok hatásának vizsgálatára. A toxinkezelést minden esetben toxin : aktin monomer = 1 : 1 arányban végeztük az aktin filamentumokon.

Fluoreszcencia rezonancia energia transzfer (FRET)

Kísérleteink egyik sorozatánál, az aktin fluoreszcens jelölése során kialakított IAEDANS-aktin, illetve IAF-aktin monomerek a polimerizálás előtt megfelelő arányban lettek összekeverve. Az így kialakított aktin filamentumon intermonomer flexibilitás kísérleteket végeztünk. Más esetben ugyanazon monomeren belül kettős jelölés végeztünk, majd az így kialakított IAEDANS-FC-aktin monomerek aktin filamentumba építésével, az aktin monomerek monomeren belüli, intramonomer flexibilitását vizsgálatuk.

A toxinok (phalloidin vagy jaspalakinolide) jelenlétében tapasztalt kisebb mértékű relatív f' növekedés a filamentum erősebb monomer-monomer kölcsönhatását, a filamentális szerkezet stabilabbá válását mutatta. A jaspalakinolide hatása a phalloidin hatásánál minden esetben erősebbnek mutatkozott.

Differenciális pásztázó kalorimetria (DSC)

A kalorimetriás kísérleteket a 0 és 100 °C közötti hőmérséklettartományban végeztük Ca-aktin filamentumokon. A DSC görbéken - minden esetben - egy, a filamentum hődenaturációjához tartozó csúcsot találtunk (>60 °C). A denaturációs csúcsok

maximumértéke („melting point” vagy T_m) toxinmentes esetben 67,3 °C volt, míg phalloidin, illetve jasplakinolide kezelt aktin esetében 79,3 és 87,7 °C-nak adódott. A magasabb T_m értékek a phalloidin, illetve a jasplakinolide kezelt esetekben a filamentum nagyobb hőstabilitását mutatják. Az eredmények - megerősítve ezzel a FRET mérés eredményeit - igazolták, hogy a jasplakinolide erősebb stabilizáló hatással van a Ca-aktin filamentumra, mint a phalloidin.

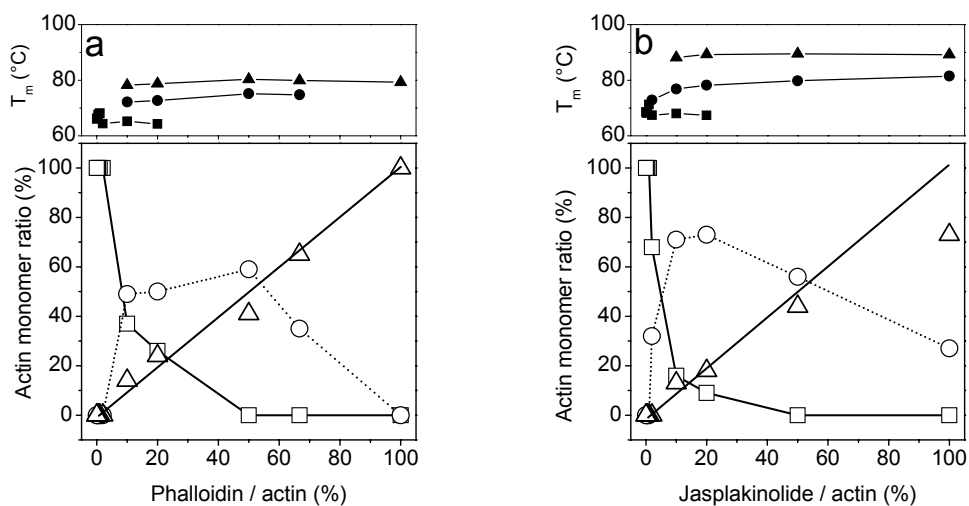
A toxinok hatásának kooperativitása Mg-aktin filamentumokban

Számos aktin filamentumhoz kötődő ligandum molekula képes a filamentumban konformációváltozást okozni a kötőhelytől távolabbi monomerekben is Drewes, 1993 #65; Orlova, 1995 #57; Steinmetz, 1997 #85}. Ilyen kooperatív módon terjed a phalloidin hatása is (Drewes and Faulstich, 1993; Orlova and Egelman, 1995). A phalloidin-aktint, mint referencia modellt alkalmaztuk. Munkánk során azt vizsgáltuk, hogy a jasplakinolide képes-e kooperatív hatás kialakítására.

Az aktin filamentum toxinok hatására kialakuló konformációs állapotai

Az aktin filamentumokat 1 : 500, illetve 1 : 1 moláris arány között több, különböző toxin : aktin monomer arányban kezeltük a DSC kísérletekhez. A vizsgált minták DSC görbéi mindkét toxin esetében tipikusan három denaturációs csúccsal rendelkeztek szubsztöichiometrikus körülmények között. Az egyes átmenetek az aktin filamentumok különböző konformációs állapotait tükrözik. Meghatároztuk a különböző konformációkhoz tartozó T_m értékeket, majd az egyes T_m értékekhez tartozó görbe integrálokat. A több denaturációs csúccsal rendelkező esetekben a görbét az egyes maximumokhoz illesztett Gausz-görbékkel dekonvoláltuk.

A különböző T_m csúcsokhoz tartozó entalpia értékek alapján meghatároztuk a csúcsokhoz tartozó aktin protomer konformációk arányát. Az egyes konformációkhoz tartozó T_m értékeket az alacsonyabb, közepes és magas denaturációs hőmérsékleteknek megfelelően T_m^a , T_m^b és T_m^c -vel jelöltük (1.a,b ábra). Minden egyes toxin : aktin monomer arány esetében a T_m^a azonos volt a toxin mentes aktin esetében kapott T_m értékkel. A T_m^c denaturációs hőmérséklet megegyezett azzal a hőmérsékleti maximummal, amit 1 : 1 arányú toxinkezelés esetén phalloidin (~ 80 °C), illetve jasplakinolide esetében (~ 90 °C) tapasztaltunk. A jasplakinolide Mg-aktin esetében is stabilabb filamentális szerkezetet eredményezett mint a phalloidin. A hőabszorpciós görbe T_m^c -hez tartozó integrálja a toxinkoncentráció emelkedésével lineárisan nőtt (1.a,b ábra).



1. ábra

Felső ábra: a Mg-aktin filamentum T_m^a (■), T_m^b (●) és T_m^c (▲) értékei a toxin:aktin monomer arány függvényében phalloidin (a), illetve jasplakinolide (b) esetében.

Alsó ábra: A Mg-aktin filamentum T_m^a (□), T_m^b (○) és T_m^c (△) értékekhez tartozó, különböző konformációjú monomereinek relatív koncentrációja a toxin:aktin monomer arány függvényében, phalloidin kezelt (a), illetve jasplakinolide kezelt (b) aktin esetében.

Ez a megfigyelés azt mutatja, hogy az aktin filamentumokon belül van egy olyan maximálisan stabilizált monomer populáció, amelyet a monomereket közvetlenül kötő toxinmolekulák stabilizálnak. Mindkét toxin esetében, nem teljes toxinkezelést alkalmazva megjelent a DSC görbéken egy harmadik (T_m^b) denaturációs csúcs is. A T_m^b denaturációs csúcs értelmezésünk szerint azon monomerek hődenaturációját jelzi, amelyeket nem stabilizálnak közvetlenül toxinmolekulák, viszont amelyekre távolabb lévő, toxint kötő monomerek kooperatív stabilizációs hatása érvényesül.

A kooperatív hatás modellje

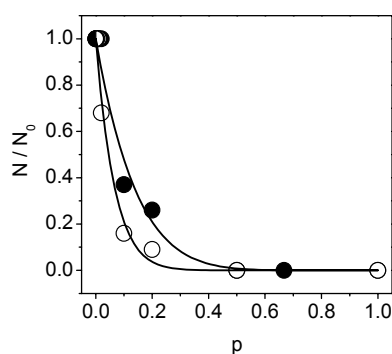
A kvantitatív leírás során feltételeztük, hogy a toxinmolekulák az aktin filamentumhoz véletlenszerűen kötődnek. Meg kívántuk határozni egy kötött toxin kooperatív hatása során kialakuló kooperatív egység nagyságát (protomerek száma).

Meghatároztuk annak valószínűségét, hogy egy monomer ne legyen toxin hatása alatt a filamentumban (N/N_0):

$$N / N_0 = (1 - p)^{2k+1} \quad (5)$$

ahol p annak a valószínűsége, hogy egy protomer toxint köt, N_0 a monomerek száma a filamentumban, valamint N azon protomerek száma a filamentumban amelyek toxinhatástól mentesnek mutatkoznak.

Az N/N_0 értékét a kísérleti eredményekből a DSC görbék T_m^a denaturációs csúcsához tartozó integráljaiból, p értékét pedig az alkalmazott toxin : aktin monomer arányból tudtuk meghatározni. Az (5) egyenlettel görbét illesztettünk a mérési pontokra (2. ábra), így k értékére phalloidin-nél $3,0 \pm 0,5$, jaslakinolide-nál pedig $6,9 \pm 1,1$ kaptunk.



2. ábra

Toxin hatásától mentesnek talált monomerek aránya (N/N_0), a phalloidin (●) és jaslakinolide (○) kezelés arányának függvényében Mg-aktin filamentum esetében.

A kooperatív egység ezek alapján $2k + 1 = 7$ aktin protomer phalloidin, és 15 aktin protomer jaslakinolide esetében. Az alloszterikus hatás tehát jaslakinolide esetén nagyobb, mint a phalloidin esetében.

Összefoglalás

Munkánk során összehasonlítottuk az aktin filamentumban phalloidin és jasplakinolide hatására bekövetkező molekuláris szintű dinamikai és szerkezeti változásokat. Megállapítottuk, hogy mindkét toxin stabilizáló hatást gyakorolt az aktin filamentumra. A FRET és a DSC eredmények is egybehangzóan igazolták, hogy a jasplakinolide stabilizáló hatása nagyobb a phalloidin stabilizáló hatásánál.

Megállapítottuk, hogy mindkét toxin hatása kooperatív módon terjed a Mg-aktin filamentumok mentén. A kísérleti eredmények alapján felállítottunk egy modellt, ami alapján meghatároztuk a kooperatív egység nagyságát jasplakinolide (15 protomer) és phalloidin (7 protomer) estében.

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Visegrády B, Lőrinczy D, Hild G, Somogyi B, Nyitrai M. The Effect of Phalloidin and Jasplakinolide on the Flexibility and Thermal Stability of Actin Filaments. FEBS Lett. 2004, 565(1-3), 163-6.

Visegrády B, Lőrinczy D, Hild G, Somogyi B, Nyitrai M. A Simple Model for the Cooperative Stabilisation of Actin Filaments by Phalloidin and Jasplakinolide FEBS Lett. 2005, 579(1-3), 6-10.

Az értekezésben nem szereplő közlemények

Visegrády B, Konecsni T, Grobuschek N, Schmid MG, Kilár F, Aboul-Enein HY, Gübitz G. Chiral Separation of Tiazide Diuretics by HPLC on Chiralcel OD-RH(R), Chiralcel OJ-R(R) and Chirobiotic-T(R) Phases. J Biochem Biophys Methods. 2002, (1-3), 15-24. IF: 1.383

Kilár F, Visegrády B. Mapping of Stereoselective Recognition Sites on Human Serum Transferrin by Capillary Electrophoresis and Molecular Modelling. Electrophoresis. 2002, (6), 964-71. IF: 4.325

Szarka K, Bódis E, Visegrády B, Nyitrai M, Kilár F, Somogyi B. 9-Anthroylnitrile Binding to Serine-181 in Myosin Subfragment 1 as Revealed by FRET Spectroscopy and Molecular Modeling. Biochemistry. 2001, 40(49), 14806-11. IF: 4.114

Visegrády B, Than NG, Kilár F, Sümegi B, Than GN, Bohn H. Homology Modelling and Molecular Dynamics Studies of Human Placental Tissue Protein 13 (galectin-13). Protein Eng. 2001, (11), 875-80. IF: 2.718

Than NG, Visegrády B, Berente Z, Than GN, Sümegi B. Humán Placenta Protein 13 (PP13): aminosav-szekvencia, szerkezet és funkció. Biokémia. 2000. március, XXIV. Évf. 1.szám

Hivatkozott közlemények

- Bubb, M.R., A.M. Senderowicz, E.A. Sausville, K.L. Duncan, and E.D. Korn. 1994. Jasplakinolide, a cytotoxic natural product, induces actin polymerization and competitively inhibits the binding of phalloidin to F-actin. *J Biol Chem* 269(21):14869-14871.
- Drewes, G., and H. Faulstich. 1993. Cooperative effects on filament stability in actin modified at the C-terminus by substitution or truncation. *Eur. J. Biochem.* 212(1):247-253.
- Faulstich, H., A.J. Schafer, and M. Weckauf. 1977. The dissociation of the phalloidin-actin complex. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* 358(2):181-184.
- Miyamoto, Y., M. Kuroda, E. Munekata, and T. Masaki. 1986. Stoichiometry of actin and phalloidin binding: one molecule of the toxin dominates two actin subunits. *J. Biochem. (Tokyo)* 100(6):1677-1680.
- Nyitrai, M., G. Hild, N. Hartvig, J. Belagyi, and B. Somogyi. 2000. Conformational and dynamic differences between actin filaments polymerized from ATP- or ADP-actin monomers. *J. Biol. Chem.* 275(52):41143-41149.
- Orlova, A., and E.H. Egelman. 1995. Structural dynamics of F-actin: I. Changes in the C terminus. *J Mol Biol* 245(5):582-597.
- Senderowicz, A.M., G. Kaur, E. Sainz, C. Laing, W.D. Inman, J. Rodriguez, P. Crews, L. Malspeis, M.R. Grever, and E.A. Sausville. 1995. Jasplakinolide's inhibition of the growth of prostate carcinoma cells in vitro with disruption of the actin cytoskeleton. *J Natl Cancer Inst.* 87(1):46-51.
- Somogyi, B., J. Matko, S. Papp, J. Hevessy, G.R. Welch, and S. Damjanovich. 1984. Forster-type energy transfer as a probe for changes in local fluctuations of the protein matrix. *Biochemistry* 23(15):3403-3411.
- Spector, I., F. Braet, N.R. Shochet, and M.R. Bubb. 1999. New Anti-Actin Drugs in the Study of the Organization and Function of the Actin Cytoskeleton. *Microscopy Research and Technique* 47:18-37.
- Steinmetz, M.O., D. Stoffler, A. Hoenger, A. Bremer, and U. Aebi. 1997. Actin: from cell biology to atomic detail. *J. Struct. Biol.* 119(3):295-320.