

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Kémiai Doktori Iskola
Fehérje szerkezet és működés c. program

Glicerinezett izomrostok vizsgálata ATP hidrolízis köztes állapotaiban EPR és DSC technikával

PhD értekezés tézisei

Dergez Tímea

Témavezető:
Prof. Dr. Belágyi József
Emeritus professzor

PÉCS, 2006

Bevezetés

Az élőlények egyik legjellemzőbb életjelensége a mozgás, mely a biológia tudománynak egyik régóta kutatott területe. Az élővilágban a mozgásnak számtalan formájával találkozunk, melyek háttérben bonyolult fehérjerendszerek összehangolt működése áll.

A magasabb rendű élőlények legismertebb mozgásformája az izomkontrakció, melynek leggyakoribb modellje a gerincesek akaratlagos mozgását létrehozó vázizom. A vázizomzat szarkomer egységekből épül fel, melyet vékony és vastag filamentumok rendszere alkot. A vékony filamentum fő alkotója az aktin, a vastag filamentumé a miozin. Az izomösszehúzódás során a két filamentumrendszer egymáson történő elmozdulása, az ún. „*sliding mozgás*” eredményezi az izomrost rövidülését. A folyamathoz szükséges energiát a miozin feji részében lejátszódó ATP hidrolízis szolgáltatja. A hidrolízis során a miozin konformációváltozások sorozatán megy keresztül, melynek során megváltozik a miozinfaj aktinhoz viszonyított helyzete. A folyamat eredményeként a felszabaduló kémiai energia részben mechanikai energiává alakul, melynek eredményeként bekövetkezik az izom rövidülése és erő kifejtése.

Az izomműködés kutatásában nagy áttörést jelentett az aktin és miozin fehérjék aminosav sorrendjének meghatározása és háromdimenziós szerkezetének megismerése. A szerkezetek ismeretében egyre több kutatás foglalkozott az ATP hidrolízis ciklus egyes lépéseinek vizsgálatával, melyeket egy-egy konformációs állapotnak feleltettek meg. Biokémiai módszerekkel több, mint hét állapot különíthető el. Az általunk használt DSC és EPR technikával azonban csak a hosszú ideig stabil, vagy stabilizálható állapotok tanulmányozhatók, ezért ezek jellemzéséhez Bagshaw és Trentham modelljét alkalmaztuk, amelyben a következő négy miozinállapotot különíthetjük el:



A modellben az M a miozint, a M*.ATP, M**.ADP.Pi és az M*.ADP pedig a hidrolízis ciklus köztes állapotait jelentik. A kontrakciós ciklus első lépéseként a miozin megköti az ATP-t, és disszociál az aktintól. A szabad miozinfajok hidrolizálják az ATP-t, majd visszakötődnek az aktinhoz, először egy nem specifikus, gyenge (ún. „*weak binding*”) kötéssel, majd egy sztereospecifikus, erős (ún. „*strong binding*”) kötéssel, mindeközben pedig elengedik a hidrolízis termékeit. A mechanizmus megértéséhez szükséges, hogy

ismerjük az egyes állapotokhoz tartozó molekulaszervezeteket. Mivel az általunk használt EPR és DSC módszerekkel nem minden állapot vizsgálható, ezért a kísérletek elvégzéséhez olyan anyagokra van szükség, amelyek szerkezetük miatt nukleotidanalógnak alkalmasak, és nem vagy csak nagyon lassan hidrolizálva stabilizálják a miozin-nukleotid komplexet. Ilyen nukleotid analóg az AMP.PNP (nem hidrolizáló ATP analóg), vagy a lassan hidrolizáló ATP- γ -S, amelyek az M*.ATP állapot modellezésére alkalmasak. A „*weak binding*” állapotok modellezésére az AlF_4 , BeF_x vagy a VO_3^- ionok használhatók, melyek a foszfátion strukturális analójként az M**.ADP.Pi állapotban lévő szerkezetet szimulálják.

Célkitűzés

Vizsgálataink célja az izomkontrakció során létrejövő molekuláris szintű szerkezeti változások vizsgálata és az izomrostokat felépítő komponensek dinamikai tulajdonságainak megismerése volt. Kísérleteinkben a környezeti paraméterek megváltozásával járó konformáció változásokat tanulmányoztuk elektron paramágneses rezonancia spekroszkópia (EPR) és differenciál pásztázó kalorimetria (DSC) módszerével.

1. Az izomkontrakció során a miozin fejen jelentős mértékű szerkezeti változások játszódnak le. A dinamikai vizsgálat egyik lehetséges módja, hogy mozgásra érzékeny paramágneses szondákkal jelöljük a miozin molekula kitüntetett helyeit, amelyek olyan szerkezeti egységek közelében vannak, amelyek valószínűsíthetően jelentős változáson mennek keresztül az izomkontrakciós ciklus során. Munkánk során ilyen spektroszkópiai szondákkal (MSL és TCSL) jelöltük a miozin motor doménjének cisztein 707-es aminosav oldalláncát. Izomrosttal végzett vizsgálatainkban célunk volt a kontrakció alatti ATP hidrolízis egyes lépései során a miozinfaj belső szerkezetében bekövetkező konformációs változások detektálása az erősen kötött ún. strong binding állapotban (rigor és ADP állapot) és a gyenge kötődésű „*weak binding*” állapotokban nukleotidok és analógjaik segítségével.
2. Az EPR mérésekkel párhuzamos DSC mérések görbéinek jelanalízise és a többkomponensű jelek dekompozíciója felvilágosítást ad a proteinszerkezet globális konformációs változásairól. Izomrostokon végzett DSC kísérletekre az irodalomban nem találtunk adatokat. Célunk volt, hogy a különböző köztes állapotokban mért termikus változásokat megkíséreljük olyan részfolyamatokra felbontani, melyek kapcsolatba hozhatók valamely domén mozgásával, végeredményben pedig, jól visszaadják a vizsgált jelenséget. Vizsgálataink arra irányultak, hogy nyomon kövessük a dinamikai változások globális hatásait, amelyek révén a kontrakciót elindító jel a regulációs doménről a katalitikus doménre terjed. EPR és DSC módszerek együttes alkalmazását az irodalomban eddig csak fehérjeoldatokon végezték, ezen kísérleti módszerek használatát izomrost vizsgálatok során mi publikáltuk először.

Alkalmazott módszerek

Fehérjerenedezereken végbemenő strukturális és dinamikai változások vizsgálatára több módszer ismeretes, mi méréseinkhez ezek közül az elektron paramágneses rezonancia spektroszkópiát és a differenciál pásztázó kalorimetriát alkalmaztuk.

EPR spektroszkópia

Az EPR spektroszkópia az elektromágneses kölcsönhatásokat vizsgáló spektroszkópiai módszerek egyike. Alkalmazása során a vizsgált rendszernek rendelkeznie kell párosítatlan spinű elektronnal. EPR módszerrel a biológiai rendszerek közvetlenül általában nem vizsgálhatók, mivel nem vagy ritkán rendelkeznek paramágneses centrumokkal, ezért a mérések elvégzéséhez a spinjelölés módszerét alkalmaztuk, melynek során egy stabil paramágneses jelölőt kötünk kovalensen egy célzott aminosav oldallánchoz. A sonda által kapott EPR spektrumból következtetni lehet a jelölt molekulaszegmens mozgására és rendezettségére.

A miozin fejen, az ATP hidrolízis során bekövetkező konformáció változások megfigyelésére a miozin katalitikus doménjén található legreaktívabb ciszteint, a cisztein-707-et jelöltük N-(1-oxil-2,2,6,6-tetrametil-4-piperidinil) maleimid (MSL) és 4-izotiocianát-2,2,6,6-tetrametil piperidinoxil (TCSL) jelölővel, glicerinezett izomrostban.

EPR méréseinket Bruker 300 E típusú elektronparamágneses rezonancia spektrométerrel végeztük. A konvencionális EPR méréseinkhez 100 kHz modulációt, 0.1-0.2 mT modulációs amplitúdót és 20 mW mikrohullámú teljesítményt használtunk. A szaturáció transzfer EPR (ST EPR) technikával a spektrumokat 63 mW mikrohullámú teljesítményen, 50 kHz moduláció és 0.5 mT modulációs amplitúdó mellett 100 kHz 'out-of-phase' detektálással rögzítettük.

Differenciál pásztázó kalorimetria

Az EPR spektroszkópiai mérésekből nyert eredményekből a riportertermék környezetében végbemenő változásokra következtethetünk, azonban a globális változásokról nem ad egyértelmű információt, ezért ezzel párhuzamosan DSC méréseket végeztünk, melyek alkalmasak a globális változások jellemzésére.

A differenciál pásztázó kalorimetria (DSC) egy igen érzékeny és széles körben alkalmazott módszer fehérjék termikus denaturációjának vizsgálatára.

A műszer a hőáram mérés elvén működik. Egy hűthető-fűthető hőelnyelő blokkban található az azonos térfogatú mérő- és referencia cella, amely a műszer egyik legfontosabb része. A cellák felfűtése ugyanazon időben ugyanolyan módon történik. Mivel a két cella hőkapacitása közel azonos, a programozott fűtés során a két edény hőmérséklete azonos módon változik, hőmérsékletkülönbséget mindaddig nem tapasztalhatunk, amíg valamilyen hőmérsékletindukált változás nem jön létre valamelyik cellában. A termikus egyensúly fenntartása érdekében a mérő vagy a referencia cellába kell energiát táplálnunk. A hőmérsékleti különbség előjelétől függően, a fűtőáramot ΔI -vel annyira megnöveli, hogy a két cella közti hőmérsékletkülönbség kiegyenlítődjön. A mérések során a rendszer entalpiaváltozását mérik a hőmérséklet függvényében.

A kalorimetriás kísérleteket a PTE ÁOK Biofizikai Intézetében végeztük egy Setaram Micro DSC-II kaloriméteren. Minden mérés 5-80°C hőmérsékleti tartományban történt Hastelloy mintatartó edényekben. Az izomrostok nedves tömege 150-250 mg volt. Méréseink során az indukált denaturáció irreverzibilisnek bizonyult. Az entalpiaváltozás a görbék alatti területek számításával került meghatározásra.

Eredmények és következtetések

Izomrostokon végzett EPR méréseinkkel az izomkontrakció ATP hidrolízis ciklusa hosszú élettartalmú köztes állapotainak szimulálásával a molekuláris átrendeződéseket, konformációváltozásokat vizsgáltuk spektroszkópai szondák beültetésének segítségével. MSL jelölő EPR spektrumából a miozinfaj globális orientációjára, míg TCSL jelölő esetén a belső, lokális változásokra is következtethetünk.

- a) Konvencionális és ST EPR méréseink eredményeiből megállapítottuk, hogy rigor állapotban az izomrostokon mért EPR spektrumok nagyfokú irányfüggő rendezettséget mutattak mindkét jelölőnek (TCSL, MSL) a cys 707-hez való kapcsolódása esetén. Különbség csak a kitüntetett irányokban és a szögszórásban volt. Ez a különbség a jelölők eltérő tulajdonságaival magyarázható, hiszen különbözik kémiai szerkezetük és kapcsolódásuk módja is. A spektrumok alakjából arra következtettünk, hogy a labellek erősen immobilizált állapotban vannak a konvencionális EPR időskáláján.
- b) Szaturáció transzfer EPR méréseink bizonyították, hogy a két fehérje molekula kapcsolódása rigid, rigor állapotban minden miozin molekula aktinhez kötődik; ez a kötődés sztereospecifikus rigid kötés, azaz a kötés egy és csakis egy módon valósulhat meg.
- c) ADP jelenlétében az EPR spektrum az AM.ADP köztes állapotnak felel meg. Összehasonlítva a rigor és ADP állapotra jellemző spektrumokat MSL szondamolekula használata esetén a miozinfajok orientációja változatlanak tűnt, ezzel szemben TCSL-rostok esetében szignifikánsan eltérőnek bizonyultak.
- d) MSL és TCSL szondákat használtunk a hidrolízis ciklus „*weak binding*” kötést modellező állapotainak vizsgálatához is. Ezek közül az AM.ADP.Pi állapotot ATP és ortovanadát segítségével modelleztük, amikor tartósan disszociáltattuk a miozin fejeket az aktin filamentumoktól. Ebben az esetben mind MSL mind pedig TCSL jelölő használata esetén jelentős változást figyeltünk meg az EPR spektrumokon, az előző két állapothoz képest a miozin

fejek szögeloszlásában. Mindkét jelölő esetén egy random eloszlású labelekre jellemző populációt azonosítottunk. Különbséget találtunk abban az esetben is, ha ATP helyett ADP-t alkalmaztunk V_i mellett, hiszen ATP esetén szinte kizárólag csak az előbb említett random populáció jelent meg, míg ADP esetén a random populáció mellett az ADP orientált populáció jelenlétét is bizonyítottuk. Kimutattuk, hogy ebben az állapotban a spektrum nem orientációfüggő, és valószínűsítettük, hogy „*weak binding*” kötés nem idéz elő jelentős effektust a miozin fejek globális konformációjában.

- e) Weak binding állapot modellezésére ADP.AIF₄ és ADP.BeF_x rostokat vizsgáltunk. EPR kísérleti eredményeinkből arra a következtetésre jutottunk, hogy ADP.BeF₄ állapotra jellemző spektrum eltér mind az ADP.AIF₄, mind az ADP.V_i állapotokban mért spektrumtól. ADP.BeF_x állapotban két konformációt azonosítottunk 60-40% arányban. A nagyobb arányban jelenlévő populációt az M.**ADP.Pi closed weak binding állapotnak, míg a kisebb arányú populációt M.*ATP állapotnak feleltettük meg. Feltevéseinket spektrummanipulációval is alátámasztottuk, további γ -ATP-t használva kísérletekkel valószínűsítettük. EPR eredményeink alapján bebizonyítottunk véljük, hogy az ADP.BeF_x és γ -ATP valószínűleg ugyanazt az állapotot reprezentálja. ADP.AIF₄ állapotban lévő izomrostok EPR spektrumait nem tudtuk megkülönböztetni az ADP.V_i (ADP.Pi) állapotú izomrostokétól.
- f) ATP állapot modellezéséhez használt AMP.PNP esetén két miozin populációt figyeltünk meg; egy random frakciót, amely az ADP.Pi állapotot közelítő ADP.V_i állapotnak felel meg és egy rendezett, aktinhoz kötött állapotot. A rendezett állapot MSL jelölő használata esetén rigor állapotnak, TCSL jelölő esetén ADP állapotnak, tehát mindenképpen „*strong binding*” kapcsolatnak felelt meg. A rendezett állapotú frakció megközelítőleg 50%-a volt a teljes jelölő koncentrációnak.

A különböző konformációs állapotokban bekövetkező globális változások tisztázására DSC mérést alkalmaztunk. A DSC nem szerkezeti vizsgáló módszer, az általa szolgáltatott adatok csak közvetve engednek bepillantást a szerkezetbe, így a termogramokból csak kellő

óvatossággal lehet következtetéseket levonni, viszont kitűnő kiegészítője és megerősítője az EPR eredményeknek.

Glicerinezett izomrostok hőátmeneti görbéit Gauss típusú függvényekkel leírható hőátmenetekre bontottuk fel, és az egyes átmenetekhez tartozó dinamikai folyamatokat valószínűsítettük. Izomrostok esetén 4 fő komponensre bontható a mintázat.

Az első átmenetet a miozin feji régiójának azonosítottuk, s valószínű, hogy ez több jel szuperpozíciójából jött létre, s magában foglalja a szubfragment-2 jelét is. A második átmenet reprezentálja a miozin rudat, a harmadik hőátmenet az aktintól származik. Ezek az átmenetek gyakorlatilag nem vagy csekély mértékben változnak nukleotidok jelenlétében a különböző intermedier állapotokban.

A legmagasabb, negyedik tranzíciós hőmérséklet esetében viszont szignifikáns változás figyelhető meg, elmozdult a magasabb hőmérsékleti tartomány felé, amikor a puffer oldatba az AMP.PNP, AM.ADP.V_i, valamint ADP.BeF_x és ADP.AIF₄ jelenlétében. Valószínűsíthető, hogy ez az átmenet az ADP bekötődésének köszönhető a miozin nukleotid kötő doménjéhez vagy az aktinhoz. A változás mértéke függ a nukleotid analóg típusától. Nukleotid kötődése stabilitást eredményez a szerkezetben, amely nagyobb hőstabilitásban nyilvánul meg.

- a) Rigor és ADP állapotban csupán MOPS puffer használata esetén tapasztaltunk változást, hiszen a pH stabilitás a denaturációs mérés során csak MOPS puffer használata esetén maradt változatlan. ADP bekötődése tehát hőstabilitást eredményez az izomrostban, amelyet a 4. hőátmenet közel 3°C-os emelkedése bizonyít. Nagy a valószínűsége annak, hogy ADP bekötődésére a doménon belüli flexibilitás-és/vagy orientációváltozás- lehet a magyarázata a rigor és ADP állapot eltérő termikus denaturációjának.
- b) „*Weak binding*” állapot modellezése esetén ADP-t és ortovanadátot adva a rostokhoz, létrehozva ezzel az AM.ADP.Pi állapotot, a negyedik átmenet szintén szignifikánsan eltolódott a magasabb hőmérsékleti tartományba. Ez az átmenet részben -a miozin nukleotid kötő doménje mellett- a miozin aktinkötő doménjének és az F-aktin olvadásának tulajdonítható. A DSC görbe ezen komponensének kiszélesedése és a magasabb hőmérséklet felé tolódása a megnövekedett kalorimetriás entalpiával együtt arra is utal, hogy a ligand kötés révén az aktinkötő domén stabilitása megnövekedett, a nukleotidkötő zseb környezete jobban „csomagolt” vanadát jelenlétében.

Differenciális DSC mérések arra utalnak, hogy a nukleotid aktinhoz kötődése jelentős termikus hatással jár.

- c) Termikus denaturációs vizsgálatainkból megállapítottuk, hogy AM.ADP.Vi, AMP.PNP, valamint ATP és BeF_x vagy AlF₄ kötésekor keletkező állapotok konformációja és energetikája különbözik a rigortól, és nem azonos az erősen kötött állapottal. Az eltérő tranzíciós hőmérsékletek és kalorimetriás entalpiák szignifikáns különbségeket jeleznek a miozin fej belső szerkezetében és a nukleotid-miozinfej kölcsönhatásban, valamint az F-aktin szerkezetében: a legmagasabb denaturációs hőmérséklet a Vi, AMP.PNP és BeF_x sorrendben nő az F-aktinra jellemző denaturációs csúcs határozott elkülönülésével. Ez a megfigyelés arra enged következtetni, hogy az ATP hidrolízis ciklus modellezett köztes állapotaiban, „*weak-binding*” állapotokban AM.ADP.BeF_x esetén a leggyengébb a miozin aktinhoz való affinitása.

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Dergez T., Könczöl F., Farkas N., Belágyi J., Lőrinczy D., DSC study of glycerol-extracted muscle fibers in intermediate states of ATP hydrolysis. *J Thermal Anal Calorim* 2005; 80: 445-449. IF.: 1.478

Dergez T., Könczöl F., Kiss M., Farkas N., DSC study on the motor protein myosin in fibre system. *Thermochimica Acta* 2006, 445:205-209. IF.: 1.161

Dergez T., Lőrinczy D., Könczöl F., Farkas N., Belágyi J., Differential scanning calorimetric study of glycerinated muscle fibres in intermediate state os ATP hydrolysis. *J. Struct. Biol.* című folyóirathoz közlésre elküldve. IF.: 3.49

Egyéb közlemények

Farkas N., Lőrinczy D., **Dergez T.**, Kilár .F, Belágyi J., DSC and EPR study of effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on erythrocyte membranes. *Enviromental Toxicology and Pharmacology* 2004; 16: 163-168. IF.: 1.28

Könczöl F., Farkas N., **Dergez T.**, Belágyi J and Lőrinczy D., Effect of tetracaine on erythrocyte membrane by DSC and EPR. *J Thermal Anal Calorim* 2005; 82: 201-206. IF.: 1.478

Gyetzvai Á., Emri T., Takács K., **Dergez T.**, Fekete A., Pesti M, Pócsi I and Lenkey B., Lovastatin possesses a fungistatic effect against *Candida albicans* but does not trigger apoptosis in this opportunistic human pathogen. *FEMS Yeast Research*, 2006.

Az értekezés alapjául szolgáló absztraktok

Lőrinczy D., **Dergez T.**, Belágyi J., Effect of free radicals on small globular proteins (BSA, HH). The 58th Calorimetry Conference and The Japan Society of Calorimetry and Thermal Analysis, Brigham Young University-Hawaii, 2003.

Lőrinczy D., **Dergez T.**, Belágyi J., ATP hidrolízis intermedier állapotainak vizsgálata harántcsíkolt izomrostokon. Magyar Biofizikai Társaság XXI. Kongresszusa, Szeged, 2003.

Lőrinczy D., **Dergez T.**, Belágyi J., ATP hydrolysis intermediate states in psoas skeletal muscle fibres by DSC. 32th European Muscle Conference, Montpellier, France, 2003. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 2003; 24(4-6): 329.

Dergez T., Farkas N., Könczöl F., Belágyi J., Lőrinczy D., DSC study of glycerinated muscle fibres in intermediate states of ATP hydrolysis. 33th European Muscle Conference, Isola d'Elba, 2004. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 2004; 25(3): 250.

Kiss M., Könczöl F., **Dergez T.**, Farkas N., Belágyi J., Lőrinczy D., Study of site-specific oxidation of thiol groups in skeletal muscle actin. 18th IUPAC Conference on Chemical Thermodynamics and The 12th National Conference on Chemical Thermodynamics and Thermal Analysis, Beijing, China, 2004.

Dergez T., Farkas N., Könczöl F., Belágyi J., Lőrinczy D., DSC study of glycerinated muscle fibres in intermediate states of ATP hydrolysis. ICTAC 13, 13th International Congress on Thermal Analysis and Calorimetry, XXVI Conference AICAT-GICAT, Chia Laguna, 2004

Dergez T., Könczöl F., Belágyi J., Lőrinczy D., Intermediate states of ATP hydrolysis cycle in glycerinated muscle fibres by DSC. Biophysical Society 49th Annual Meeting, Long Beach, California, 2005.

Dergez T., Könczöl F., Kiss M., Farkas N., Analysis of intermediate states of ATP hydrolysis cycle in muscle fibres by DSC. 16th Ulm-Freiberger Kalorimetrietage, Freiberg, Németország, 2005.

Dergez T., Könczöl F., Farkas N., Belágyi J., Analysis of intermediate states of ATP hydrolysis cycle in muscle fibres by DSC. CEEPUS Summer School, Prague, 2005.

Dergez T., Farkas N., Könczöl F., Belágyi J., Lőrinczy D., DSC study on the motor protein myosin. 15th IUPAB & 5th EBSA International Biophysics Congress, Montpellier, France, 2005. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* 2005, 34(6): 832.