

IZOMFEHÉRJÉK FUNKCIONÁLIS DINAMIKÁJÁNAK
VIZSGÁLATA FLUORESCENCIA SPEKTROSKÓPIÁS
MÓDSZEREKKEL

Nyitrai Miklós

Pécsi Orvostudományi Egyetem

Biofizikai Intézet

1997

BEVEZETÉS

A mozgás legismertebb megnyilvánulása a magasabb rendű biológiai rendszerekben az izmok összehúzódása. Az izom-összehúzódás folyamatának létrejöttéhez motor- és szabályozó fehérjék összehangolt tevékenysége szükséges. A motor-fehérjék közül meghatározó jelentőségű az aktin és a miozin. A harántcsíkolt izom működésének szabályozását a troponin komplex végzi.

Ezen fehérjék a környezeti paraméterek függvényeként különböző konformációs állapotokban vannak, biológiai funkciójuk egyes fázisai általában szorosan kapcsolhatók konformációs állapotuk és dinamikai tulajdonságaik változásaihoz. Az izom-összehúzódás folyamatának megértéséhez tehát ismernünk kell a folyamatban résztvevő fehérjék ezen alapvető jellemzőit, ill. a környezet megváltozásának ezen paraméterekre gyakorolt hatását. Ilyen fontos, pontosan nem tisztázott probléma az aktin monomer és a filamentumba beépült protomer összehasonlítása, a kationok hatása a troponin C, valamint az aktin monomer konformációs állapotára, dinamikai jellemzőire.

A kutatások során a funkcióval kapcsolatos kérdések megválaszolásában a fehérje szerkezetének pontosabb megismerése fontos szerepet játszott. Ennek megfelelően a röntgenkristallográfiás vizsgálatok eredményei vitathatatlanul az egyik legfontosabb forrását jelentik a szerkezettel kapcsolatos ismereteinknek. Ezzel a módszerrel a tömegeloszláson alapuló átlagos konformáció határozható meg. Ugyanakkor ezen térszerkezeti modellek csak korlátozott mértékben képesek leírni az adott fehérje belső mozgásait, különböző konformációs állapotait. A már meglévő szerkezeti ismeretekre támaszkodva további ismeretek megszerzése válik lehetővé a belső mozgások sebességére, kiterjedtségére vonatkozóan a spektroszkópia módszereinek, így pl. az általunk is használt fluoreszcencia spektroszkópia alkalmazásával.

A fluoreszcencia vizsgálatán alapuló módszerek felhasználásakor adódnak olyan technikai problémák, melyek megoldásával a mérések megbízhatóbbak lesznek, és a vizsgált rendszer fluoreszcens tulajdonságait jellemző mérési eredmények interpretációja pontosabb lehet. Ezeket a problémákat két nagy csoportba sorolhatjuk. Az elsőbe tartoznak azok, amelyek megválaszolása a mérés során felhasznált berendezések tökéletesítésére, ill. az elemzés során felhasznált matematikai módszerek alkalmasabbá tételére irányul. A másik nagy

csoportha ezen besorolás szerint a fluorofórok és környezetük fiziko-kémiai tulajdonságainak, és a mérés eredményeként kapott fluoreszcencia tulajdonságoknak az összefüggéseit vizsgáló kérdések tartoznak. Az ezen paraméterekkel kapcsolatban felmerülő bizonytalanság általában megnehezíti a kísérleti eredmények kiértékelését.

CÉLKITŰZÉSEK

Az izom-összehúzódról, és általában az izomműködésről rendelkezésünkre álló ismeretek még nem elégségesek a mechanizmus pontos megértéséhez. Ugyanakkor az alkalmazott módszerekkel kapcsolatban felvetődnek olyan elméleti és technikai vonatkozású problémák, melyek megoldásával a kísérleti eredmények pontosabbá tehetők, a mérhető értékek tartománya kibővül, vagy a mérési eredmények interpretációja során újabb következtetések levonása válik lehetővé.

A fluoreszcencia spektroszkópia módszereinek alkalmazása lehetővé teszi a fehérjék dinamikai, szerkezeti tulajdonságainak vizsgálatát, ill. ezek megváltozásának tanulmányozását a környezeti paraméterek módosulásának hatására. Ezen spektroszkópiás eljárások segítségével kívántuk tanulmányozni az aktin monomer és filamentális állapota közötti különbségeket, valamint a kationok hatását az aktin monomer, ill. a szabályozásban meghatározó szerepet betöltő troponin C tulajdonságaira. Terveink között szerepelt továbbá, hogy pontosabban megismerjük a környezeti paramétereknek a triptofán fluoreszcencia paramétereire gyakorolt hatását. Ennek érdekében egyetlen triptofánt tartalmazó rövid peptideket tanulmányoztunk.

ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

Fehérjék, peptidok

Az aktint nyúl vázizomból preparáltuk. A mutáns troponin C Dr. James D. Potter (Miami Egyetem, FL, USA) ajándéka volt. A triptofán fluoreszcencia jellemzőinek a környezeti paraméterektől való függését a következő peptideket tanulmányoztuk: Nectofibrin Hexapeptide; Dynorphin A; Luteinizing Hormone-Releasing Hormone; Bombesin;

Somatostatin; Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor; Adrenocorticotrophic Hormone 4-; Endothelin-C-Terminal Hexapeptide (Peninsula Laboratories Inc.).

Ioncsere, polimerizálás

Az aktin monomer az izolálás után Ca^{2+} -al volt telítve. A Ca^{2+} - Mg^{2+} csere során az oldathoz EGTA-t és MgCl_2 -ot adtunk, aminek hatására a kationok kicserélődése 10 percen belül végbement. Az aktin polimerizációjának folyamatát az ionerősség megnövelésével indítottuk el. A troponin C esetében, amennyiben méréseinket kationmentes, vagy Mg^{2+} -al telített mintán terveztük kivitelezni, az oldás után a fehérjét dializáltuk EGTA-t tartalmazó pufferrel szemben. A kationmentes fehérjén végzett vizsgálatok során ugyanazt a puffert alkalmaztuk, amit a dializáláshoz is használtunk. Amennyiben a Mg^{2+} -os forma tanulmányozása volt célunk, a dializálás után a mintához MgCl_2 -ot adtunk. Nem használtunk EGTA-t a Ca-troponin C-n történt mérések előkészítése során, és a fehérje oldathoz CaCl_2 -ot adtunk.

Fluoreszcens jelölések

IAEDANS-jelölés: F-aktint 1 órán keresztül inkubáltunk 10-szeres moláris túlsúlyban lévő IAEDANS-el szobahőmérsékleten. Ezt követően a mintát centrifugáltuk, majd dializáltuk a megfelelő pufferrel szemben. FITC-jelölés: a G-aktint 3 órán keresztül inkubáltuk 20-szoros moláris túlsúlyban lévő FITC-el szobahőmérsékleten. Ezután az ionerősséget megnöveltük, a jelölési elegyet centrifugáltuk. A felülúszót oszlop-kromatográfiával tisztítottuk tovább, majd dializáltuk a megfelelő pufferrel szemben.

Spektroszkópiai mérések

Az abszorbción Shimadzu UV-2100 típusú spektrofotométerrel mértük. A steady-state fluoreszcencia méréseket Perkin-Elmer LS50B típusú spektro-fluoriméterrel, míg a fluoreszcencia élettartam és anizotrópia lecsengés vizsgálatokat ISS K2 multifrekvenciás fázis-fluoriméterrel végeztük. A kioltási kísérletekben a különböző koncentrációjú kioltó jelenlétében mért fluoreszcencia élettartamokból határoztuk meg a kioltási állandókat (a klasszikus Stern-Volmer-egyenletből). A fluoreszcencia rezonancia energia transzfer mérések során a donor fluoreszcencia intenzitását mértük akceptor jelenlétében, ill. annak hiányában,

és ezen paramétereiből számoltuk az energia transzfer hatásfokát. A mért fluoreszcencia élettartam és anizotrópia lecsengési paraméterek felhasználásával további információkat nyertünk a fluorofór mikrokozonyzetére vonatkozólag a Perrin-egyenlet, az Arrhenius-egyenlet, valamint a kúp-modell (vagy "wobble-in-cone" modell) alkalmazásával.

EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

Az aktin monomer és protomer összehasonlítása

Vizsgálatainkat semleges és töltéssel rendelkező kioltók felhasználásával végeztük. Az akrilamid alkalmazásával mért bimolekuláris kioltási állandó gyakorlatilag változatlan maradt az aktin polimerizációja során. Ezzel szemben a cézium-ion jelenlétében mért bimolekuláris kioltási állandók vizsgálata során különbséget mutattunk ki az aktin két formája között. A kioltási állandó az aktin filamentális formáját vizsgálva megközelítőleg kétszer nagyobbak bizonyult a monomer formában mért értékénél. Ezen eredményeink azt mutatják, hogy a négy triptofán környezetének (és így valószínűleg a subdomén 1-nek) a szerkezete a térkitöltés tekintetében nem különbözik a monomer és a filamentumba beépült protomer formákban. Ugyanakkor ezen környezet töltése, vagy polarizációs viszonyai legalább az egyik triptofán körül megváltoznak a polimerizáció hatására. A filamentumok kialakulása során a monomer szerkezete tehát nem marad változatlan. Ez alátámasztja azt az elképzelést, miszerint a filamentumba beépülő monomer, az ún. protomer, nem tekinthető csupán strukturális szerepet betöltő részegységnek. A monomerek tehát aktív alkotórészei lehetnek az izom-összehúzódásra képes fehérje-rendszernek, és így a közöttük kialakuló kapcsolatok minősége és kiterjedtsége befolyással lehet az izomkontrakció folyamatára.

A C-terminális alegység összehasonlítása Ca-G- és Mg-G-aktinban

Méréseink során igazolódott, hogy az aktin monomer kationtartalmában bekövetkező módosulás konformációváltozást okoz a molekula C-terminális alegységén belül. Eredményeink alapján megállapítható, hogy a subdomén 1 szerkezete, vagy legalább is a Cys-374 aminosav környezete ezen alegységén belül merevebbé válik a Ca^{2+} - Mg^{2+} csere hatására.

A fluorofór mozgását (modellünk szerint) korlátozó kúp felszöge kisebb Mg-G-aktinban, mint Ca-G-aktinban, ami arra utal, hogy a Mg^{2+} -al telített monomerben a C-terminális régióban lévő Cys-374 aminosav kevésbé hozzáférhető az oldat számára, mint a Ca-G-aktinban.

A subdomén 1 egyike a feltételezett monomer-monomer kapcsolódási pontoknak az aktin filamentumon belül. A Mg^{2+} -al telített aktin nukleációja a polimerizálódás során nagyságrendekkel gyorsabb, mint Ca^{2+} jelenlétében. A jelenség magyarázatául az irodalomban fellelhető adatok szerint az szolgál, hogy az ATP hidrolízise gyorsabb a Mg-G-aktinban, mint a Ca-G-aktinban. Ugyanakkor az is elképzelhető, hogy a vizsgálataink során a monomer két formája között kimutatott szerkezeti és dinamikai különbségek ugyancsak hozzájárulnak a nukleáció folyamatának eltérő voltához. Figyelembe véve a Mg-G-aktin merevebb, ugyanakkor zártabb konformációját, lehetséges, hogy az aktin monomer ezen formájában a más monomerekhez való kapcsolódás valószínűsége megnő, így az összekapcsolódás folyamata felgyorsul.

A kisebb domén összehasonlítása Ca-G-, és Mg-G-aktinban

Az aktin monomer Lys-61 és Cys-374 aminosavjai közötti fehérjemátrix dinamikai tulajdonságait vizsgáltuk a fluoreszcencia rezonancia energia transzfer mérések segítségével a fehérje Ca^{2+} -al, ill. Mg^{2+} -al telített állapotában. Kimutattuk, hogy az aktin monomer vizsgált két pontja között a fehérje-mátrix a Mg-G-aktinban ugyanolyan flexibilitást mutat, mint Ca-G-aktinban. Ugyanakkor a Ca-G-aktinban szobahőmérséklet feletti hőmérsékleten olyan konformációs állapotváltozás alakul ki, melynek létrejötte Mg-G-aktinban nem mutatható ki.

A Cys-374 mikrokozonyzete a Mg-G-aktinban merevebb, mint Ca-G-aktinban, amint azt az előző szakaszban láttuk. Az itt leírt eredmények alapján valószínű, hogy ezen flexibilitásbeli különbség térbeli kiterjedtsége kisebb annál, semhogy befolyásolná az egész kisebb domén flexibilitását. Ugyanakkor az sem zárható ki (de nem is valószínű), hogy a donor merevebb környezetének hatását Mg-G-aktinban a kisebb domén egészének lazább szerkezete ellensúlyozza. Eredményeink alapján továbbá az is megállapítható, hogy az aktin filamentum különböző kationokkal (Ca^{2+} , ill. Mg^{2+}) telített állapotai között kimutatott flexibilitásbeli különbség a monomerek között kialakuló kötések eltérő erősségével, és nem a protomerek flexibilitásának különbségével magyarázható.

A Ca^{2+} , ill. a Mg^{2+} hatása a troponin C C-terminális alegységének szerkezetére és dinamikájára.

Csirke troponin C C-terminális alegységében lévő triptofán fluoreszcencia paramétereit vizsgálva tanulmányoztuk a fehérje kationmentes, Ca^{2+} -al, ill. Mg^{2+} -al telített állapotai közötti különbségeket. Megmutattuk, hogy mind a Ca^{2+} , mind a Mg^{2+} bekötődésének hatására a troponin C H-hélixben elhelyezkedő triptofán környezete merevebbé válik a kationmentes fehérjéhez képest, és ezzel egyidejűleg a fluorofór rendelkezésére álló tértartomány leszűkül. Ugyanakkor a Ca^{2+} -troponin C-ben ezen fehérjetartomány merevebb, mint a Mg^{2+} -troponin C-ben. Ezen eredmények összefüggésbe hozhatók a troponin C biológiai funkciójával.

A nyugalomban lévő sejtben a troponin C N-terminális alegységében lévő Ca^{2+} -specifikus kationkötő helyek (I, II) nem kötnek kationt, ugyanakkor a C-terminális kationkötő helyei (III, IV) Mg^{2+} -al vannak telítve. A Ca^{2+} -szint megnövekedését a troponin komplexen belül a troponin C érzékeli. A Mg^{2+} jelenlétében üres N-terminális kötőhelyek ekkor Ca^{2+} -ot kötnek, és elképzelhető, hogy ezzel egyidőben a Mg^{2+} a C-terminális kötőhelyeken is Ca^{2+} -ra cserélődik le. A troponin C szerkezetében beálló változások tehát kapcsolhatók akár a C-, akár az N-terminális régiók által kötött kation minőségének a megváltozásához. A méréseink során alkalmazott ion-koncentrációk mellett a kationok kicserélődése mind a két troponin C alegységben létrejött. Eredményeink alapján megállapítható, hogy ezek együttes hatására a troponin C C-terminális szakaszának a szerkezete a Mg^{2+} - Ca^{2+} csere hatására merevebbé vált.

A troponin C és troponin I kapcsolat meghatározó szerepet tölt be a Ca^{2+} szignál továbbításában. Korábbi tanulmányok során bizonyossá vált, hogy a troponin I (szintetizált) inhibitor szegmense (104-115 aminosavak) képes kölcsönhatásba lépni mind a troponin C-vel, mind a tropomiozin-aktin komplexszel. Kimutatták azt is, hogy a Cys-98, mely a troponin C-n belül a C-terminális vég közelében helyezkedik el, közvetlen kölcsönhatást létesít a troponin I inhibitor régiójával, azaz a troponin C-troponin I kapcsolat kialakulásában a troponin C C-terminális alegysége részt vesz. A tropomiozin-aktin komplex és a troponin C versenyez a troponin I inhibitor szegmenséért. A troponin I inhibitor peptidje Mg^{2+} jelenlétében mind az tropomiozin-aktin komplexhez, mind a troponin C-hez kötődik, de a két kapcsolat közül

ekkor (Mg^{2+} jelenlétében) a tropomiozin-aktin kapcsolat dominál, szemben a troponin C-hez való kapcsolódással. Ennek megfelelően az aktin-tropomiozin-troponin I komplexben a térbeli elrendeződés olyan, hogy a miozin nem fér hozzá az aktinon lévő kapcsolódási helyeihez, azaz az izom-összehúzódás nem jöhet létre. A Ca^{2+} szint megnövekedésével a troponin I-troponin C kapcsolat válik meghatározóvá. A troponin I-troponin C kapcsolat stabilizálódása a Ca^{2+} kötődésének hatására a két fehérje konformációjának megváltozásával hozható összefüggésbe. A Ca^{2+} által történő izom-aktiválódás folyamata ennek megfelelően kapcsolható a troponin C dinamikájának a megváltozásához. Ez a változás valószínűleg szükséges a troponin C-troponin I kapcsolat stabilizálása szempontjából, és így fontos szerepet játszik a Ca^{2+} szignál terjedésében.

A C-terminális alegység dinamikai tulajdonságaiban általunk kimutatott különbség a troponin C Ca^{2+} -al, ill. Mg^{2+} -al telített formája között tehát ennek a dinamikai változásnak a tükröződése lehet. A Ca^{2+} jelenlétében merevebb szerkezet a C-terminális alegységen belül hozzájárulhat a troponin I inhibitor szegmensének erősebb kötéséhez, ami a fentiek alapján meghatározó jelentőségű a troponin komplexen belül létrejövő konformációs módosulások kialakulásának szempontjából. A Ca^{2+} jelenlétében megfigyelhető stabilabb troponin I-troponin C kötődéssel az aktin-tropomiozin komplex kötődése a troponin I inhibitor szegmenséhez elveszti dominanciáját. Ennek megfelelően az aktin-tropomiozin rendszeren belül is konformációs változás jön létre, melynek hatására a miozin kötő helyek az aktin filamentumon hozzáférhetővé válnak a miozin számára, kialakulhat az aktin-miozin kölcsönhatás, és így létrejöhet az izom-összehúzódás.

A környezeti paraméterek hatása a triptofán fluoreszcencia paramétereire peptidekben

Vizsgálataink során az oldat proton(deuteron)-koncentrációjának, ill. a fluorofór környezetében lévő funkcionális csoportoknak a triptofán fluoreszcencia tulajdonságainak megváltozásában betöltött szerepét tanulmányoztuk. Méréseink alapján beigazolódtott, hogy az általunk vizsgált peptidekben a triptofán fluoreszcencia élettartamát csökkentő kioltó folyamatokban az oldat molekuláinak és a peptid funkcionális csoportjainak meghatározó szerepe van. A kioltási folyamatok diffúzió kontrolláltak, és proton / deuteron asszociáltak. A fluoreszcencia élettartam aktuális értéke szoros összefüggésben áll a triptofánnak a peptidlánc

végeitől való távolságával. Ezen terminális csoportok protonált állapotukban csökkentik az oldat által kifejtett kioltás hatásfokát. Ez a "védelem" a peptidlánc N-terminális környezetében erősebb, mint a C-terminális szakasz közelében, ami az N-terminális vég de-protonálódása után bekövetkező nagyobb élettartam csökkenésben mutatkozik meg. Tekintve, hogy a peptidok bizonyos szempontból jól modellezik a fehérjéket, eredményeink a triptofán fehérjékben mért fluoreszcencia élettartamát illetően is érdekesek lehetnek. Ugyanakkor nem szabad elfelejteni, hogy a fehérjékben, különösen ha az adott fluorofór a fehérje belsejében helyezkedik el, a fehérje egyes szegmenseinek a szerepe a kioltás folyamatában jelentősen megnőhet. Ezért az itt részletezett eredmények a fluorofór és környezete viszonyát illetően nem alkalmazhatók megszorítások nélkül a fehérjékben található fluorofórokra.

AZ EREDMÉNYEK GYAKORLATI JELENTŐSÉGE

Az értekezésben bemutatott eredményeknek elsősorban az izom-összehúzóds folyamatának, valamint a harántcsíkolt izom szabályozási mechanizmusának pontosabb megértésében van jelentősége. Az aktin monomer és filamentális állapotának vizsgálata során kimutatott szerkezeti és dinamikai különbségek megismerése hozzájárul az izom-összehúzóds molekuláris hátterének, ezen belül is az aktin funkciójának pontosabb megértéséhez. A troponin C-ben, ill. az aktin monomerben a kationok hatására létrejövő módosulások megismerésével közelebb kerültünk a kationok biológiai funkciójának a megértéséhez.

Az egyetlen triptofánt tartalmazó peptidok vizsgálata során megmutatott összefüggések elősegítik a fluorofór és környezete közötti kölcsönhatás pontosabb megismerését, és ezáltal az alkalmazott módszer, a fluoreszcencia spektroszkópia eredményeinek hatékonyabb felhasználását.

AZ ÉRTEKEZÉSBEN FELHASZNÁLT KÖZLEMÉNYEK

Hild G., Nyitrai M., Gharavi, R., Belágyi, J. and Somogyi, B., (1996), Fluorescence Quenching of the Tryptophan Emission from the F- and G-forms of Actin, *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, **35**, 175-179.

Nyitrai M., G. Hild, J. Belágyi and B. Somogyi, (1997), Spectroscopic Study of Conformational Changes in Subdomain 1 of G-Actin: Influence of Divalent Cations. *Biophys. J. megjelenés alatt.*

AZ ÉRTEKEZÉSHEZ KAPCSOLÓDÓ ELŐADÁS

Nyitrai M., G. Hild, J. Belágyi, B. Somogyi, The Effect of Divalent Cations on the Conformation of Subdomain 1 in G-Actin: a Spectroscopic Study. "4th Symposium on Instrumental Analysis". (1997 May, Graz, Austria).

AZ ÉRTEKEZÉSHEZ KAPCSOLÓDÓ POSZTEREK

Hild G., M. Nyitrai, R. Gharavi, J. Belágyi, B. Somogyi, Fluorescence Quenching of the Tryptophan Emission from F- and G- Forms of Actin. "3rd Symposium on Instrumental Analysis" (1995 May, Pécs, Hungary.)

Nyitrai M., F. G. Prendergast, B. Somogyi, Environmental Factors in the Fluorescence Decay of Single Tryptophan-Peptides: Dynamical Quenching by Electron Transfer. "A Magyar Biofizikai Társaság XII. Vándorgyűlése" (1995. July, Pécs, Hungary.)

Nyitrai M., G. Hild, J. Belágyi, B. Somogyi, Fluorescence Study of Conformational Changes in Subdomain 1 of G-actin: Influence of divalent cations. "2nd Conference on Molecular Recognition" (1996 August, Pécs, Hungary.)