

Záróbeszámoló

A. A kutatás célkitűzései

A citoszkeletális rendszer fehérjei fontos mechanikai szerepet töltenek be az eukarióta sejtekben. A mechanikai funkciók közé tartoznak a sejt alakjának, rugalmasságának és mechanikai stabilitásának determinálása, továbbá a sejtmozgás és összehúzódás, illetve intracelluláris transzport és erőkifejtés. A fehérjék mechanikai funkciói konvencionális biológiai és biokémiai vizsgálatokkal nehezen vizsgálhatók, mert az elmozdulás és erőkifejtés molekulaszintű vektoriális mennyiségek, amelyek átlaga zérus egy független statisztikai molekulasokaságban. Pályázatunk célja, hogy nanotechnológiai módszerekkel, azaz egyedi molekulákon vizsgáljuk citoszkeletális fehérjék – esetünkben izomfehérjék – mechanikai tulajdonságait és funkcióit. Kísérleteinkben izolált, illetve genetikailag expresszált rekombináns fehérjéket (titin, aktin, miozin) vizsgálunk újszerű, részben saját fejlesztésű technikákkal: lézercsipeszsel, atomerőmikroszkóppal, konfokális mikroszkóppal és *in vitro* motilitási próbával. A módszerek lehetővé teszik, hogy kapcsolatot keressünk a citoszkeletális fehérjemolekulák szerkezete és funkciói között, megvizsgáljuk egyedi motorfehérjék (miozin) által kifejtett elmozdulás és erő nagyságát, és megmérjük egyedi elasztikus fehérjék (titin) rugalmas tulajdonságait, mechanikai stabilitását és mechanikailag vezérelt tekeredését (folding). Konkrét célkitűzéseink voltak, hogy 1) konstans húzási erő alkalmazásával megállapítsuk a titinmolekula, illetve rekombináns titin domének polimerjének egyensúlyi kitekeredési erőgörbét, 2) felszínadszorbeált titinmolekulák egyensúlyi alakjának atomerőmikroszkópos jellemzésével kiszámítsuk a natív konformációjú titinmolekula hajlítómerevségét jellemző perzisztenciahosszt, 3) megállapítsuk a titinben fellépő mechanikai fáradás pontos mechanizmusait, 4) fluoreszcensen jelölt titinmolekulát vizualizáljunk, miközben mérjük a nyújtás közben fellépő erőt, 5) megmérjük, hogy F-aktin, illetve miozin titinhez kapcsolódása hogyan befolyásolja a titin rugalmasságát és *vice versa*, a titin relatív megnyúlása hogyan befolyásolja aktin, illetve miozinkötő tulajdonságait, 6) feltérképezzük humán, műtéti szívizom-mintából izolált miozin mechanikai funkcióit (motilitás és erőkifejtés), és korrelációt keressünk a kórkép és a miozin funkció között, 7) lokális, intramolekuláris erőmérésre alkalmas, mechanoszenzitív fluoreszcens molekulát szintetizáljunk és teszteljük. Pályázatunkban hangsúlyt fordítottunk a kísérleti módszerek és technikák fejlesztésére is: 1) erővisszacsatolású lézercsipesz és atomerőmikroszkóp építése, 2) egyedi molekula mechanika ötvözése egyedi molekula vizualizációval, 3) mechanoszenzitív fluorofór szintézise.

B. Eredmények

A különböző munkák egyenként és összességükben elsősorban a titin óriás izomfehérje, annak rekombináns fragmentumai és egyéb izom-citoszkeletális fehérjék nanobiotechnológiai vizsgálatával foglalkoztak. Egyedi titinmolekulák és rekombináns titin fragmentumok molekuláris mechanikai tulajdonságait és a miozin motorfehérjék *in vitro* motilitási sajátosságait tanulmányoztuk. Egyedi molekulák mechanikai manipulálására kifejlesztett erőmérő lézercsipesz berendezésünket továbbfejlesztettük, és fluoreszcens technikákkal kombináltuk. Ugyancsak egyedi molekulák mechanikai manipulálására alkalmas atomerőmikroszkópos berendezést helyeztünk üzembe. Atomerőmikroszkópos (AFM) berendezésünket és módszereinket továbbfejlesztettük, mellyel lehetővé vált egyedi fehérjék célzott, *in situ* mechanikai manipulálása. Az AFM módszert sikerrel kombináltuk teljes belső visszaverődés fluoreszcencia mikroszkópiával (TIRFM), mellyel lehetővé vált sejtek és molekulák egyidejű topográfiai és fluoreszcenciás vizsgálata. A különböző technikai, kísérletes és analitikai munkákat alább részletezem.

1. Fluoreszcenciával kombinált direkt erőmérő lézercsipesz fejlesztése.

Molekuláris erőmérő lézercsipesz berendezésünket továbbfejlesztettük úgy, hogy közvetlenül képes mechanikai erőt mérni, a fotonimpulzusváltozási sebesség mérésén keresztül. Ezáltal elkerülhető a gyakran körülményes és nehézkes erőkalibráció. Emellett lézercsipesz berendezésünket kombináltuk fluoreszcenciás technikával, ami lehetővé teszi, hogy a megfogott, fluoreszcensen

jelölt molekulákat vizualizáljuk. A fejlesztéshez egyéb anyagi erőforrásokat is igénybevevünk (HHMI, FKFP, OM Műszer).

2. Molekuláris erőmérő atomerőmikroszkóp üzembe helyezése

Sikerrel állítottunk üzembe egy egyedi molekulák mechanikai megnyújtására alkalmas atomerőmikroszkópos (AFM) berendezést. Segítségével a natív, illetve rekombináns titinmolekulák molekuláris mechanikáját vizsgáljuk. A fejlesztéshez egyéb anyagi erőforrásokat is igénybevevünk (HHMI, FKFP, OM Műszer).

3. Rekombináns citoszkeletális fehérjék expresszáására

Annak érdekében, hogy a titin egyes szakaszait külön-külön vizsgálhassuk, E.coli fehérjeexpressziós rendszert állítottunk fel az ehhez szükséges technikai feltételekkel (pl. PCR készülék, rázóinkubátor, stb.) együtt. A humán titin cDNS könyvtárat Siegfried Labeit professzortól (University of Mannheim) kaptuk ajándékba. Az aktinot gelsolin fehérje expresszáálásához használt vektor Helen Yin professzor asszony (University of Boston) ajándéka.

4. Natív titin molekuláris mechanikai és szerkezeti vizsgálata atomerőmikroszkóppal.

A titin fontos szerepet játszik a passzív izomerő meghatározásában azáltal, hogy a láncszerű polimermolekula entropikus rugalmassággal rendelkezik. A natív konfigurációjú titinmolekula rugalmasságát jellemző perzisztenciahossz és ennek a paraméternek tengelyirányú változásai nem ismertek pontosan. Felszínadszorbeált titinmolekulák atomerőmikroszkóppal megállapított alaki sajátosságainak leírásával kiszámítottuk a natív titin perzisztenciahosszát (~18 nm), illetve a molekulák megnyújtásával a mechanikailag kitekeredett molekula perzisztenciahosszát (~1.5 nm).

5. Rekombináns titin PEVK fragmentumok expresszáása és molekuláris mechanikája

A PEVK a titin in situ nyúlékonyságáért elsősorban felelős prolin-, glutamát-, valin- és lizidús szakasz, melynek sem a belső szerkezete, sem a rugalmassága nem ismert pontosan. Vázizom titin PEVK szegmenst klónoztunk és expresszáltunk, három különböző szakaszban (N-terminális, középső és C-terminális harmad, mindegyik szakasz 700 aminosavból áll). A PEVK fragmentumokat sikerrel nyújtottuk atomerőmikroszkóppal. A perzisztenciahossz 0.3 – 1.1 nm között változott, és az ionerősség növelésével alacsonyabb értékek felé tolódott. A PEVK szakaszok szignifikánsan különböző hajlítómerevséget mutattak: legmerevebb az N-terminális, és legrugalmasabb a C-terminális harmad. Ennek megfelelően a PEVK doménben mechanikai hierarchia van, és a domén nem egyenletesen nyúlik. Immunelektronmikroszkópos kísérletek alapján ugyanez a hierarchikus nyúlékonyság figyelhető meg a szarkomerben is. A PEVK szakaszok hajlítómerevsége (perzisztenciahossza) csökken növekvő ionerősség hatására, amit azzal magyarázunk, hogy a hasonló töltésű oldalláncok alacsony ionerősségen mintegy kimerevítik a láncot. Eredményeinket jól illesztettük az Odijk-Skolnick-Fixman polielektrolit láncmodellel.

6. Rekombináns titin tandem Ig domének molekuláris mechanikája.

A PEVK mellett a titin tandem Ig szakaszokat tartalmaz, melyek sorbakapcsolt immungolbulinszerű doménekből épülnek fel. Az egyes molekulaszakaszok mechanikai, kémiai és termikus stabilitása nem ismert pontosan. A titin differenciálisan expresszált, tehát nem minden izoformában előforduló szakaszának egy nyolc Ig-típusú doménből álló darabját (I55-62 oktamer) klónoztunk, expresszáltuk és izoláltuk. Az oktamer mechanikai tulajdonságait AFM segítségével vizsgáltuk. Az I55-62 oktamer mechanikai stabilitása alacsonyabbnak adódott, mint a titin konstitutívan expresszálandó szakaszaiból származó molekuladarab.

7. Humán szívizom miozin motorfehérje in vitro motilitása

Egyedi motorfehérjék (pl. miozin) mechanikai funkciói jól vizsgálhatók in vitro motilitási próba segítségével. A módszerben egyedi, fluoreszcensen jelölt aktin filamentumok mozognak miozinnal borított felszínen. Kísérleteinkben nyitott szívűtét során vett humán izommintákból (pitvarfülcse,

pitvari trabecula, papillaris izom) preparált miozint vizsgáltunk. Az izolált miozinmolekulák nehézlánc izoforma tipizálását különleges (alacsony akrilamid koncentráció, glicerin, éjszakán át 4 fokon történő futtatás) SDS-PAGE segítségével végeztük. Sikerral regisztráltunk motilitást a kamrai miozin minták esetében, míg a pitvari miozin esetében a motilitás elmaradt.

8. Teljes belső visszaverődés fluoreszcencia mikroszkópiával kombinált AFM fejlesztése.

A teljes belső visszaverődés fluoreszcencia mikroszkópiában (TIRFM) egy továtűnő, evaneszcens mező jön létre az alacsony törésmutatójú közegben egy alacsony és egy nagy törésmutatójú közeg határán akkor, ha a nagy törésmutatójú közegből érkező fény teljes visszaverődést szenved a közeghatáron. Az evaneszcens mező magassága néhány száz nanométer, és intenzitása exponenciálisan csökken a közeghatártól távolodva. A TIRFM alkalmas egy monomolekuláris réteg fluoreszcenciás gerjesztésére úgy, hogy közben a jel/zaj viszony magas marad. A TIRF mikroszkópiát sikerrel kombináltuk felszínpásztázó AFM-mel. A módszer alkalmas arra, hogy ugyanazon molekula fluoreszcenciáját és felszíni topográfiáját térben és időben szinkronizált módon kövessük. Ezáltal különböző tér- és időskálán zajló folyamatokat tudunk egyszerre vizsgálni. A módszerrel sikerrel vizsgáltuk monolayer sejtek (HeLa) phalloidinnal festett aktin filamentális rendszerét és a sejtek felszíni topográfiáját.

9. In situ molekuláris erőspektroszkópia fejlesztése

Az in situ molekuláris erőspektroszkópiában egyedi molekulák mechanikai tulajdonságait vizsgáljuk célzott módon. Első lépésben a felszínadszorbeált minta felszíni topográfiáját vizsgáljuk meg. Ezt követően a felszín kiválasztott pontját mechanikailag perturbáljuk (pl. az ott levő molekulákat megnyújtjuk). Végül a felszínt ismét letapogatjuk, és a nyert topográfiai képet összehasonlítjuk a kiindulási állapottal annak érdekében, hogy a mechanikai perturbáció által kiváltott globális szerkezeti változásokat megállapítsuk. A módszert sikerrel alkalmaztuk amiloid fibrillumok mechanikai vizsgálatára, ami megvetette egy újabb tematikájú pályázat kísérleti alapjait. Az eredmények alapján számos előadás és poszter, illetve egy nemzetközi folyóiratban publikált cikk jelent meg.

10. Rekombináns titin PEVK fragmentumok aktin-kötése

A PEVK domén a titin óriás izomfehérje különleges, prolinban, glutamátban, valinban és lizinben gazdag, máig sem teljesen ismert szerkezetű doménje. A vázizom titin izoforma PEVK doménjét három sorbakapcsolt szakaszban expresszáltuk. Ezen túlmenően a PEVK domén különböző motívumait (PPAK és polyE) klónoztuk és expresszáltuk. Kimutattuk, hogy a doménszakaszok és motívumok kötik az F-aktint, de különböző erősséggel. Legerősebben a tiszta polyE motívum kötötte az aktint. A PEVK domén lokális aktin-kötő tulajdonságait ezért a lokális polyE motívum denzitás határozza meg. A PEVK domén aktin-kötése mintegy viszkózus ütközőként működhet az izomban, ahol a szarkomer összehúzóási sebességét regulálhatja.

11. PEVK-aktin interakciós erőmikroszkópia

Korábbi munkánkban kimutattuk, hogy a titin PEVK domén különböző szakaszai kötik az F-aktint (lásd fent), és a jelenségnek szerepe lehet az izomösszehúzóadás szabályozásában. Az, hogy a PEVK-aktin kölcsönhatás mennyiben befolyásolja az izomösszehúzóadást attól is függ, hogy a PEVK-aktin kapcsolat mekkora mechanikai erővel szakítható fel. A kérdés megvizsgálására lézercsipeszes interakciós erőmikroszkópiás méréseket végeztünk. Aktinnal, illetve különböző PEVK fragmentumokkal bevont mikrogyöngyöket nyomtunk egymáshoz lézercsipesz segítségével, majd a mikrogyöngyöket adott sebességgel eltávolítottuk egymástól. Vizsgáltuk azt az erőt, amelynél a mikrogyöngyök disszociálnak. Eredményeink alapján úgy tűnik, hogy a PEVK-aktin kötés hátterében több-kötőhely – több-ligandum mechanizmus működik. Az elemi kötés erőssége kb. 5 pN erővel felszakítható. Dinamikus erőspektroszkópiai mérések alapján megállapítottuk, hogy a PEVK-aktin spontán asszociációs (k_{ON}) és disszociációs (k_{OFF}) sebessége aránylag alacsony.

Valószínűsíthető, hogy a PEVK-aktin kölcsönhatásnak az izom máig sem pontosan ismert mechanizmussal fellépő thixotropiás tulajdonságaiban lehet szerepe.

12. Dezmin intermedier filamentumok molekuláris mechnikája.

A dezmin az izomszövet intermedier filamentuma. A dezmin izommechanikában betöltött fontosságát számos korábbi munka aláhúzta, azonban a háttérben húzódó molekuláris mechanizmusok egyáltalán nem ismertek. Sikerrel izoláltunk dezmint csirke zúzából. Az izolált és polimerizált dezmin filamentumok morfológiáját és mechanikáját AFM segítségével vizsgáltuk. Eredményeink alapján a dezmin protofilamentumokat laterálisan összetartó erők sokkal alacsonyabbak, mint a dezmin dimereket hosszanti irányban összetartó erők. Mechanikai manipulálás hatására a dezmin molekula alfa-helikális szerkezetű doménjei kitekeredtek, melyek jellegzetes, fűrészfog alakú erőátmenetekként jelentkeztek az erőspektumban.

C. A kutatás további lehetséges irányai

A pályázattal támogatott kutatás rendkívül perspektívikus, és számos új kutatási irányvonalat nyit meg. Egyedi molekulák vizsgálatával olyan kérdésekre kereshetünk választ, amelyek más módszerekkel nem, vagy csak nehezen megközelíthetők. Ilyenek például a sztochasztikus folyamatok és effektusok (pl. blinking), a párhuzamos útvonalakon zajló folyamatok (pl. fehérje folding), és a molekuláris mechanikai tulajdonságok. Kutatócsoportommal számos olyan problémán kezdtünk el dolgozni, amely egyedi molekulák vizsgálatával kapcsolatos, és épít a pályázattal támogatott előzetes kutatómunkára és fejlesztésekre. A titin különböző rekombináns szakaszait expresszáltuk bakteriális (*E. coli*) rendszerben, és ezen molekulaszakaszok mechanikai tulajdonságait vizsgáltuk lézercsipesszel és atomerőmikroszkóppal. Fluoreszcensen jelölt titinmolekulákat együttesen vizsgáltunk atomerőmikroszkóppal és egy fejlesztés alatt álló kombinált AFM/evaneszcens mező fluoreszcencia mikroszkóppal. Ezáltal egy mechanikailag manipulált molekula fluoreszcencia intenzitás változásait követhetjük. Rekombináns poli-GFP molekulák mechanikai tulajdonságait és fluoreszcenciáját vizsgáljuk hasonló módon. A kifejlesztett és megépített lézercsipesz berendezéssel egyedi motorfehérjék mechanikai tulajdonságait (erőkifejtés, elmozdulás) vizsgálhatjuk. A molekuláris biológiai és egyedi molekula módszerek kombinációjából egyéb pályázati támogatások segítségével egy Nanobiotechnológiai központot hoztunk létre. Kísérleteink és eredményeink jelentősége sokrétű és túlmutat a jelen pályázat céljain, mert nem csupán az izom élettanával és biofizikájával foglalkoznak, hanem alapvető hatással lehetnek annak megértésére, hogy a fehérjék milyen mechanizmussal tekerednek és veszik fel háromdimenziós alakjukat, hogy mechanikai erők hogyan befolyásolják a biomolekulák lokális és globális alakját és kölcsönhatásaikat.

D. A kutatás megvalósításához kapott egyéb támogatások

1. Európai Közösség V. Keretprogram. Muscle and Motility EC Network Grant. RTN1-1999-00419. 2000-2002.
2. Howard Hughes Medical Institutes International Research Scholar Grant 55000314. "Molecular Biophysics of the Muscle Cytoskeleton" 2001-2005.
3. FKFP pályázat, Dél-Dunántúli Kooperációs Kutatási Központ, Nanobiotechnológiai csoport.

Pécs, 2006. február 28.



Dr. Kellermayer Miklós (ifj)