

MOTORENZIMEK MŰKÖDÉSÉNEK SOKFÉLESÉGE

MTA doktori értekezés tézisei



Kovács Mihály

**Eötvös Loránd Tudományegyetem
Természettudományi Kar
Biológiai Intézet
Biokémiai Tanszék**

2010

Tartalomjegyzék

1. Összefoglalás	3
2. Tudományterületi háttér	3
2.1 Az energia-átalakítás az élővilágban megfigyelhető mozgások alapja	3
2.2 Hidrolitikus hajtóerő munkára fogása NTPáz enzimekben	4
2.3 A miozinok funkcionális sokfélesége	4
2.4 A nukleinsavak szerkezet-átalakító és hibajavító motorjai	5
3. Kérdések és célkitűzések	6
3.1 Miozinok működésmódjainak sokfélesége	6
3.2 Az erőgenerálás útvonalai a miozinban: általános alapelvek és speciális adaptációk	7
3.3 Az NTPáz működés specializációja az információ-anyagcsere enzimeiben	7
4. Módszertan	8
4.1 Módszertani fejlesztések	8
4.2 Géntechnológia, fehérjék előállítása és módosítása	8
4.3 Fluoreszcencia-jelek, spektroszkópia	8
4.4 <i>Steady-state</i> és tranziens enzimkinetika	9
4.5 Motilitási tesztek, egyedimolekula-mérések	10
4.6 Szerkezet-meghatározó módszerek	10
4.7 Modellezés	10
5. Új tudományos eredmények összefoglalása	10
5.1 Miozinok működésmódjainak sokfélesége	11
5.2 Az erőgenerálás útvonalai a miozinban: általános alapelvek és speciális adaptációk	11
5.3 Az NTPáz működés specializációja az információ-anyagcsere enzimeiben	13
6. Tervek, perspektívák	14
7. Közlemények jegyzéke	15
7.1 Az értekezés alapjául szolgáló saját nemzetközi közlemények	15
7.2 A Ph.D. fokozat megszerzése előtti saját nemzetközi közlemények	16
7.3 Magyar nyelvű saját közlemények	16

1. Összefoglalás

Felfedezéseink hozzájárultak a sejtosztódásban és -differenciációban, a citoplazmatikus anyagszállításban és az információ-anyagcserében kulcsszerepet játszó motorenzimekről alkotott képünk alakulásához. Az aktomiozin rendszer számos új motilitás-típusát fedeztük fel, és kiderítettük, hogy ezek a molekuláris mechanizmusok hogyan határozzák meg a miozinok sokrétű élettani hatásait. Megváltoztattunk az aktomiozin-működéssel kapcsolatos számos paradigmátikus nézetet. Megmutattuk, hogy egyes filamentális miozinok magas aktinkötöttségi arány mellett működnek, valamint hogy e motorok termékgátlási mechanizmusa a kontraktilis és erőtartó üzemmódok közötti váltást tesz lehetővé. Kimutattuk azt is, hogy az aktin-alapú anyagtranszport nemcsak egyedi miozin-molekulák processzív működésével, hanem molekulacsoportok együttműködése révén is megvalósulhat. A molekuláris erőgenerálás megértéséhez azzal járultunk hozzá, hogy gátlószerezrel stabilizáltuk a miozin erő kifejtő lépésének kezdőállapotát, illetve kimutattuk a molekulában a folyamat során létrejövő mechanikai feszültséget. Megmutattuk azt is, hogy a nukleotidcsere folyamata a miozinokban időzítő és a haladási sebességet szabályozó szereppel bír. A folyamat mechanikai terhelés-érzékenységének detektálásával hozzájárultunk az allosztérikus szabályozás új formájának megismeréséhez, amelyben a fehérjemolekulára kifejtett mechanikai erőhatás befolyásolja az enzim működését. A miozinokon végzett tanulmányok mellett kidolgoztunk egy, a nukleinsavak mentén haladó motorenzimek működési jellemzőinek meghatározására alkalmas eljárást. Meghatároztuk továbbá a humán BLM DNS-helikáz mechanokémiai mechanizmusát, amely rávilágított a sejt-váz- és nukleinsav-motorműködések általános elveire illetve a működéstípusok közötti legfontosabb különbségekre.

2. Tudományterületi háttér

2.1 Az energia-átalakítás az élővilágban megfigyelhető mozgások alapja

Az irányított és szabályozott, aktív mozgásra való képesség (motilitás) a legalapvetőbb életjelenségek egyike. A sejtalkotók, sejtek, testrészek és végső soron az élő szervezetek mozgását molekuláris motorok teszik lehetővé. Ezek a motorok enzimfehérjék, amelyek valamely szabadenergia-felszabadulással járó kémiai folyamathoz irányított mechanikai funkciót, munkavégzést kapcsolnak. A molekuláris motorok közé tartoznak többek között a lineáris mozgatót végző eukarióta sejt-váz-fehérjék (tubulin-kinezin, tubulin-dinein illetve aktomiozin rendszer), a baktériumok forgómozgást végző flagelláris motorjai, valamint a nukleinsav „síneken” mozgó DNS- és RNS-polimerázok, illetve számos egyéb, nukleinsavakat módosító enzim (helikázok, transzlokázok, rekombináázok) is.

A kémiai energia mechanikai munkává történő magas (akár 80 %-os) hatásfokú direkt átalakítása a leglenyűgözőbb „mutatványok” egyike, amire az élő szervezetek képesek. E működés megértése transzdiszciplináris megközelítést igénylő izgalmas tudományos kihívás. A motor-mechanizmusok közel 70 éve folyó intenzív kutatása ellenére az erőgenerálás számos alapkérdése még tisztázásra vár.

Sokat tudunk már arról, hogy a különböző biológiai makromolekulák működését hogyan befolyásolja a kötőpartnereikkel (szubsztrátokkal, templátokkal vagy „sín”-filamentumokkal, modulátorokkal, más ligandumokkal) létesített kémiai kölcsönhatás. A fizikai erőhatásoknak

a biomolekulák szerkezetére és működésére gyakorolt hatását leíró tudományág, a mechanobiokémia azonban még gyermekcipőben jár. Természetéből adódóan a motorenzimek világa kínálja a legalkalmasabb kísérleti rendszereket, amelyekben a mechanobiokémiai effektusok vizsgálhatók.

A sokféleség, mint az élővilág alapvető aspektusa, a motorenzimek szerkezeti, működésbeli és funkcionális változatosságában is megmutatkozik. Könnyű elképzelnünk, hogy egy olyan motornak, mint a vázizom miozin 2, amely a vastag filamentum, egy több száz molekulából felépülő egység részeként fejt ki működését és gyors izom-összehúzódást produkál, alapvetően más mechanikai teljesítményre és ehhez szorosan kapcsolt enzimek mechanizmusra van szüksége, mint például a miozin 5-nek, amely egyedi molekulaként lépeget az aktinszálon, és vezikulumok transzportját végzi. Ezt a funkcionális sokféleséget eltérő enzimek mechanizmusok teszik lehetővé, amelyek közül számosat részletesen felderítettünk munkánk során.

2.2 Hidrolitikus hajtóerő munkára fogása NTPáz enzimekben

A nukleotidok és fehérjék közötti kölcsönhatás az élet kémiájának alapvető, ősi jelensége. A nukleotid-hidrolízis enzimatis katalízise az anyagcsere és energiaforgalom nélkülözhetetlen folyamatain túlmenően rendkívül sokféle motor- és jelátvivő enzim működésének hajtóerejéül is szolgál. E magas fokon specializált aktivitások teszik lehetővé a magasabbrendű szervezetek komplexitását és alkalmazkodó-képességét.

A motor- és jelátvivő NTPázok a nukleozid-trifoszfát (NTP) molekulák hidrolízise során felszabaduló szabadenergiát használják fel olyan intramolekuláris átalakulások hajtóerejeként, amelyek a partnerekkel (fehérjékkel, nukleinsavakkal, lipidekkel) történő kölcsönhatások révén hatékony erőgeneráló vagy jeltovábbító működést eredményeznek. Ezek az univerzális mechanizmusok olyan szerkezeti (allostérikus) kommunikációs útvonalakat hasznosítanak, amelyek evolúciós konzerváltsága még egészen különböző élettani folyamatokban szereplő enzimek (pl. miozinok, kinezinek és G-fehérjék) esetében is nyilvánvaló.

A teljes NTP-hidrolízis reakcióciklusban felszabaduló igen jelentős szabadenergia-mennyiségnek az egyes enzimatis részlépések közötti megoszlása, illetve e részlépések kinetikai hangolása döntő szereppel bír a biológiai aktivitások megvalósulásában. A nukleotidkötés, -hidrolízis, a termékek felszabadulása, valamint az e lépésekhez kapcsolt – gyakran igen nagy mértékű – szerkezet-változások, illetve a partner-kölcsönhatás közötti kapcsoltág rendkívül sokféle módon valósulhat – és valósul – meg az NTPázok világában. Nem nehéz belátni, hogy e kulcsfontosságú folyamatok megértése kizárólag részletes kvantitatív (kinetikai, energetikai, finomszerkezeti) elemzés révén lehetséges.

2.3 A miozinok funkcionális sokfélesége

Több évtizede ismert, hogy a különböző miozin izoformák minden eukarióta sejtben jelen vannak. A miozinok kulcsenzimek a vázizom-, szívizom- és simaizom-kontrakció folyamatának, illetve szerepet játszanak vezikulumok és molekula-komplexek citoplazmatikus transzportjában, illetve a sejtmigráció és -differenciáció, citokinézis, endo- és exocitózis folyamataiban.

A miozin az ATP-ben tárolt kémiai energiát – szerkezeti átalakulásokon keresztül – mechanikai energiává alakítva az aktinsínen történő egyirányú elmozduláshoz hasznosítja.

Jelenlegi ismereteink szerint valamennyi miozin izoforma a Lymn és Taylor által javasolt általános mechanokémiai sémának megfelelően fejt ki működését. E modellben a miozinfaj (a molekula katalitikus és erőtovábbító része) ATP-kötése az aktinszárról való leválással jár együtt. Az ATP-hidrolízishez kapcsoltn a fej „felhúzott” állapotba kerül, és így kötődik vissza az aktinszárhoz. Az erő kifejtő lépés során az aktinkötött miozinfaj a felhúzott állapotból a lecsapott konformációba tér vissza, ezzel elhúzva a miozin farokrészét az aktinszárhoz képest. Az erő kifejtő lépés a hidrolízis-termékek (foszfát és ADP) aktin-aktivált felszabadulásához kapcsol.

Az energia-átalakítás megértéséhez elengedhetetlenül szükséges a ciklus során bekövetkező szerkezeti átalakulásokat a kinetikai-energetikai aspektusokkal integráló komplex modell megalkotása és finomítása. Az erőgenerálás vizsgálatát azonban igencsak megnehezíti az a körülmény, hogy a legfontosabb köztiállapotok életideje rövid és *steady-state* részaránya nagyon alacsony. Szintén a megoldatlan kulcsproblémák között szerepel az erősen kötött aktomiozin komplex szerkezete.

A különböző élettani funkciók szempontjából rendkívül fontos szerepet játszanak az egyes miozin izoformák kinetikai specializációi, amelyek a mechanizmus részlépéseinek mérhető paramétereiben tükröződnek. A legfontosabb funkcionális paraméterek egyike a terhelési arány (*duty ratio*), amely kifejezi, hogy a *steady-state* működés során egy miozinfaj a ciklusidő mekkora hányadát tölti erősen aktinkötött állapotban. Szintén fontos funkcionális paraméter a processzivitás, amely azt fejezi ki, hogy a sínhez (jelen esetben az aktinhoz) való kötődést követően egyes motormolekulák hány enzimciklus és azzal járó mechanikai lépés elvégzésére képesek a sínről történő leválás előtt.

A miozinok változatos méretű szupramolekuláris szerveződési egységekben (kétféjű egyedi molekulaként, szálakba vagy membránkötött motorcsoportokba szerveződve) fejtik ki működésüket. Ezen egységek felépítésében részt vevő fejek száma meghatározza az adott motor számára megfelelő terhelési arányt és processzivitást. A legfontosabb szempont egyrészt a motorkomplex folyamatos sín-kötöttségének fenntartása (túl alacsony terhelési arány mellett, ha egy adott pillanatban egy fej sem köt a sínhez, a motorkomplex disszociál a sínről); másrészt annak elkerülése, hogy az egyes fejek akadályozzák egymás működését (ami túl magas terhelési aránynál következhet be). Kétféjű egyedi molekulaként mozgó miozinok (pl. a miozin 5a vezikulum-transzporter) esetén így magas (50 % feletti), míg a gerinces vázizom több száz miozinfaj tartalmazó vastag szálaiban működő miozin 2 izoforma esetén alacsony (1 % körüli) terhelési arány a legmegfelelőbb.

2.4 A nukleinsavak szerkezet-átalakító és hibajavító motorjai

Az NTP-hidrolízis reakciót hasznosító motorok nemcsak a citoplazmában, hanem a sejtmagban is nagy változatossággal fordulnak elő. A nukleinsavak mentén mozgó motorfehérjék egyik legnagyobb csoportját a DNS- és RNS-helikázok alkotják. E fehérjék aktivitásának alapja az egyszálú nukleinsav-lánc mentén történő egyirányú transzlokáció, amely alapul szolgál a kétszálú DNS szálainak szétválasztásához.

A különböző helikázok a biológiai információ-anyagcsere rendkívül sokféle folyamatában játszanak nélkülözhetetlen szerepet: egyes helikázok központi jelentőségűek a DNS-replikáció, rekombináció, transzkripció folyamataiban, míg más enzimek RNS-molekulák szerkezetének átrendezését, illetve DNS- és RNS-kötő fehérjék eltávolítását végzik. Ezekben a folyamatokban a helikázok sokféle mechanokémiai aktivitást fejtenek ki, amelyek az említett transzlokációs és szétválasztó működések mellett a szálvándorlást (*branch migration*),

különböző DNS-hurkok propagálását és szétbontását, illetve a homológ szakaszok szálpárosítását (*strand annealing*) is magukba foglalják. Ezen aktivitások részletes, kvantitatív szinten történő vizsgálata – amely rendkívül jelentős tudományos kihívást jelent az enzimek iránt érdeklődő biokémikus számára – elengedhetetlenül szükséges a molekuláris genetikai folyamatok megértéséhez.

A RecQ családba tartozó DNS-helikázok (*RecQ-family helicases*, RFH) a homológ rekombináción (HR) alapuló DNS-hibajavítást végző sejtbeli gépezet központi elemei. Az ember öt RFH-izóformája közül a Bloom-szindróma (BLM-) helikáz többféle szerepet játszik a HR során: gátolhatja annak beindulását („minőségellenőrző” funkció), ugyanakkor a folyamat későbbi szakaszaihoz szükségesek az enzim szálszétválasztó és szálpárosító funkciói.

Ismertetett munkáinkban a BLM-helikáz mechanokémiai mechanizmusának megértése révén szeretnénk feltárni, hogy az enzim molekuláris aktivitásai hogyan járulnak hozzá a HR-alapú DNS-hibajavítás folyamatához.

3. Kérdések és célkitűzések

Pályafutásom kezdetén abban a szerencsében volt részem, hogy az ELTE Biokémiai Tanszékén bekerülhettem az eredetileg Szent-Györgyi Albert és munkatársai által Szegeden alapított izom-biokémiai iskola szellemi vérkeringésébe. Ezen iskola negyedik generációs növendékeként engem is az élő természet egyik legizgalmasabb jelensége, a kemomechanikai energia-átalakítás bűvölt el leginkább. A kutatási terület fókuszában hagyományosan legismertebb motorenzim-csoport, az izom aktomiozin-rendszere állt. A tudománytörténet e területen a törzsfeljődéssel mintegy ellentétes útvonalat járt be: a régóta egyedülként vizsgált izom-aktomiozinnál a molekuláris sejtbiológiai ismeretek bővülése révén kiderült, hogy az az eukarióta világban mindenütt előforduló általános mozgatórendszer szélsőségesen specializált formája.

3.1 Miozinok működésmódjainak sokfélesége

Doktori (Ph.D.) munkám elvégzését követően egyre inkább a mozgásformák sokfélesége kezdett érdekelni, amivel kapcsolatban az alábbi kérdések fogalmazódtak meg:

- A rendkívül sokoldalú sejtműködések és élettani funkciókat ellátó miozin izóformák makroszkóposan megfigyelhető, hasonlóan változatos mechanikai működését az enzimmolekulák milyen biokémiai-biofizikai adaptációi teszik lehetővé?
- A milliszekundumok alatt lezajló vázizom-összehúzódás és az órákig tartó sejtosztódás időbeli lefutása közötti sok nagyságrendnyi különbséget mennyiben határozzák meg az e mozgásokat hajtó enzimek molekuláris sajátosságai?
- A szélsőségesen eltérő szupramolekuláris szerveződésű motorenzimek (gondoljunk az izom vastag filamentumaira illetve az egyedi molekulaként működő szállítófehérjékre) működése hogyan adaptálódott az optimális teljesítmény elérése érdekében?
- Vannak-e olyan motorenzimek, amelyeknek az összehúzódás illetve anyagtranszport helyett statikus erőtartás a szerepük?

3.2 Az erőgenerálás útvonalai a miozinban: általános alapelvek és speciális adaptációk

A fenti aktivitásokat megvalósító molekul szerkezeti átalakulásokkal, illetve a máig tisztázatlan erőgeneráló működéssel kapcsolatban a következő kérdések vetődtek fel:

- Az erőgenerálás kulcslépései (aktomiozin kölcsönhatás létrejötte, erőkar-mozgás, hidrolízis-termékek felszabadulása) milyen útvonalakon, milyen kapcsoltsági módban zajlanak?
- A más biokémiai rendszerekből jól ismert szabályozómechanizmusok (ligandumkötés, kovalens módosítás) mellett vajon az enzimekre ható külső mechanikai erő (ellenállás) is jelentősen módosíthatja azok biokémiai-biofizikai sajátosságait?
- Mire jó az élő sejtben egy ilyen szabályozó mechanizmus? Arra, hogy az erőgenerálás „energiatakarékos” módon (a lehető legkevesebb „üzemanyag-molekula” felhasználásával) menjen végbe? Arra, hogy a különböző sebességű motorok ne akadályozzák egymás mozgását? Arra, hogy a szupramolekuláris rendszerek egyedi motoregységei között „hosszú távú” allosztérikus koordináció jöheszen létre?

3.3 Az ATPáz működés specializációja az információ-anyagcsere enzimeiben

Az élet kémiája mellett egyetemi hallgató korom óta a genetika, a biológiai információfeldolgozás folyamatai felé fordultam a legnagyobb érdeklődéssel. Kutatócsoportommal ezért a közelmúltban – a két érdeklődés összekötésével – a RecQ-családba tartozó, a DNS-hibajavítás és homológ rekombináció folyamataiban kulcsszerepet játszó humán Bloom-szindróma- (BLM-) helikáz enzim molekuláris aktivitásait derítettük fel. A következő kérdéseket vizsgáltuk:

- Milyen általános elvek fedezhetők fel a különböző ATPáz motorenzimek (miozinok, DNS-helikázok) működésében?
- Az ATP és a makromolekula-partner („sínfehérje”, nukleinsav) kötőhelye között mindig történik allosztérikus kommunikáció?
- E kommunikáció mennyiben szükséges az enzimek hatékony működéséhez?
- Az ATP-hidrolízisből származó szabadenergia a soklépéses mechanizmusok mely részfolyamata(i)ban szabadul fel?
- Az egyes lépések energetikájának mintázata összefüggésben áll-e az egyes enzimek funkciójával?

A molekuláris genetikai folyamatok többségét hajtó enzimek többsége nukleinsav mentén mozgó motorfehérje. Az összetett genetikai folyamatok számos enzim együttműködéséből illetve „kötélhúzásából” (antagonisztikus viselkedéséből) adódó sztochasztikus jelenségekként foghatók fel. Ezért ésszerű azt feltételezni, hogy ezen enzimek biokémiai-biofizikai sajátosságai nagymértékben meghatározhatják az információ-feldolgozási folyamatok kimenetelét. E hipotézis a következő távlati – a jövőben vizsgálandó – kérdéseket veti fel:

- Milyen molekuláris folyamatok és működési mechanizmusok révén járulnak hozzá a DNS-helikáz motorenzimek egyrészt a genom épségének fenntartásához, másrészt az új génváltozatok elterjedéséhez?

- Milyen összefüggés áll fenn az egyes enzimek haladási sebessége, processzivitása, erő kifejtése, energetikai hatékonysága illetve a makroszkóposan megfigyelhető genetikai és evolúciós folyamatok, sajátságok (adaptáció, mutációk keletkezése és stabilizálódása, genomépség fenntartása, új változatok elterjedése) között?

4. Módszertan

4.1 Módszertani fejlesztések

Az elmúlt másfél évtized során a motorenzimek vizsgálatának módszertani fejlesztéséhez az alábbiakkal járultam hozzá:

- Fehérjék konformáció-változásainak detektálására alkalmas egyedi-triptofán és *extrinsic* fluoreszcens próbák tervezése és alkalmazása (2;13;18;19);
- Olyan technikák fejlesztése, amelyek segítségével a mechanikai terhelésnek az egyes enzimatisz részlépések kinetikájára gyakorolt hatása oldatbeli körülmények között vizsgálható (5;17);
- Segédkeztem egy új tranziens kinetikai mérőapparátus (*temperature-jump/stopped-flow*) kifejlesztésében (14);
- Kutatócsoportommal a közelmúltban kidolgoztunk egy, a nukleinsavak mentén mozgó motorfehérjék legfontosabb funkcionális paramétereinek meghatározására általánosan alkalmazható, viszonylag könnyen és gyorsan kivitelezhető analitikai eljárást (22).

4.2 Géntechnológia, fehérjék előállítása és módosítása

A kísérleteinkben vizsgált fehérjék többségét rekombináns úton állítottuk elő. Gerinces és *Drosophila* miozin izoformák előállítására az Sf9 rovarsejt-bakulovírus expressziós rendszert alkalmaztuk, míg *Dictyostelium* miozin konstrukciókat rekombináns *Dictyostelium* sejtekben termeltettünk. A rekombináns miozinokat His-címke/Ni-NTA affinitás-, illetve FLAG-címke/antiFLAG ellenanyag affinitás-kromatográfia segítségével tisztítottuk. Aktint, illetve vázizom-miozint, valamint utóbbinak a proteolitikus fragmentumait klasszikus fehérjetisztítási eljárásokkal állítottuk elő nyúl vázizomból. A humán BLM-helikáznak a kísérleteinkben használt katalitikus modulját *E. coli* bakteriális expressziós rendszerekben állítottuk elő. A tervezett helyeken egyedi ciszteint tartalmazó rekombináns fehérjéket, illetve a természetes állapotban szelektíven jelölhető ciszteint tartalmazó nem-rekombináns fehérjéket SH-specifikus reaktív csoporthoz konjugált fluorofórokkal jelöltük. A jelölt termékeket klasszikus fehérjekémiai technikákkal tisztítottuk és analizáltuk.

4.3 Fluoreszcencia-jelek, spektroszkópia

A fluoreszcens jelet tartalmazó fehérjék illetve ligandumok *steady-state* (gerjesztési és emissziós) fluoreszcencia-spektrumainak, -intenzitásának és -kvantumhatásfokának a különböző enzimatisz állapotok közötti változásai szerkezeti és dinamikai információt szolgáltatnak. A jelváltozások kiválóan alkalmasak az enzimreakciók részlépéseinek tranziens kinetikai módszerekkel történő követésére is (lásd alább).

A fehérjékben található triptofán-oldalláncok természetes fluoreszcens jelzőcsoportként érzékelik az enzimek szerkezet-változásait. Több esetben egy-triptofános mutáns fehérjét állítottunk elő, a triptofánokat a fehérje különböző kulcsrégióiba helyezve: e fehérjékben a fluoreszcens jel egyértelmű helybeli hozzárendelése jelentős többletinformációt hordozott.

A pirén fluorofórral jelölt aktin kiválóan alkalmas az aktomiozin kölcsönhatás vizsgálatára, illetve miozint is jelöltünk pirénnel ugyanezen kötés analíziséhez.

Különböző fluorofórokkal jelölt nukleotidokat (metil-antraniloil- (mant), illetve kumarin- (deac) jelölt ATP-t és ADP-t, illetve ezek dezoxi-variánsait) alkalmaztunk a miozin és DNS-helikáz enzimek nukleotid-kölcsönhatásának vizsgálatára.

A foszfátnak az enzimekről történő felszabadulását kumarin-származékkal fluoreszcensen jelölt bakteriális, nagy affinitású foszfátkötő fehérje (MDCC-PBP) segítségével mértük.

Időfelbontott fluoreszcencia-mérésekkel meghatároztuk az alkalmazott fluorofórok élettidejét, ami a molekulák szerkezeti dinamikájáról fontos többletinformációt hordozott. *Steady-state* és időfelbontott fluoreszcencia-anizotrópia-mérésekkel további dinamikus információhoz jutottunk. A fluorofórok oldószer-kitettséget fluoreszcencia-kioltási kísérletekkel vizsgáltuk.

4.4 *Steady-state* és tranziens enzimkinetika

A miozin, az aktomiozin és a DNS-helikázok *steady-state* ATPáz aktivitását piruvát kináz-laktát dehidrogenáz (PK/LDH) kapcsolt reakción alapuló méréssel határoztuk meg.

A *steady-state* enzimkinetikai paraméterek bonyolultabb soklépéses reakciók esetén (az enzimek döntő többsége így működik) az elemi lépések és állandók bonyolult kombinációit tükrözik, és ezért az enzimechanizmusról önmagukban kevés információval szolgálnak. Emiatt a működési mechanizmusok részletes vizsgálatához tranziens gyorskinetikai technikákra volt szükség, amelyekkel a reaktánsok gyors összekeverése (vagy más perturbációk, lásd alább) után a rendszerben az egyensúly (vagy *steady-state* szakasz) beállásának időgörbéjét követtük nyomon. Ezáltal az egyes részlépéseket izoláltan tudtuk vizsgálni, és meg tudtuk határozni az elemi sebességi és egyensúlyi állandókat. A *stopped-flow* berendezés képes a reagensek (pl. egy enzim és egy szubsztrát) kb. 1 ms idő alatti összekeverésére. A *stopped-flow* kísérlet során a reagensek a tároló-fecskendőkből egy lökést követően a keverőkamrán keresztül egy optikai cellába jutnak, ahol az áramlás megállása után a reakció lefutása optikai jelek (abszorbancia, fluoreszcencia, fényszórás) folyamatos mérésével követhető. A *quenched-flow* mérőműszer szintén képes a reaktánsok milliszekundumos időléptékű összekeverésére. Ebben a műszerben a reakcióelegy egy előre megadott időtartam (1 ms – 1 perc) után egy újabb gyorskeverés során leállítószerrel (pl. savval) keveredik össze, amely az enzim gyors denaturációját vagy a reakció egyéb módon történő megszakadását okozza. Egy adott reakciót egy kísérletsorozatban különböző időtartamokig lejátszatva – a komponensek (pl. szubsztrát, termék) utólagos kémiai analízisével – a reakció időbeli lefutása követhető.

A kémiai reakciók egyensúlyi állandója kisebb-nagyobb mértékben függ fizikai paraméterektől (pl. hőmérséklet, nyomás). A relaxációs kísérletek (hőmérsékletugrás (*temperature-jump*), nyomásugrás (*pressure-jump*)) során valamely paraméter gyors (μ s időskálán történő) megváltoztatását követően detektáltuk a reakcióelegy összetételének időbeli változását (pl. optikai jelek használatával) a sebességi állandók meghatározása céljából.

4.5 Motilitási tesztek, egyedimolekula-mérések

Az *in vitro* motilitási tesztek segítségével közvetlenül vizsgálhatók a motorenzimek által végrehajtott mozgatus paraméterei (sebesség, irányultság stb.). A klasszikus tesztben fluoreszcensen jelölt aktinszálaknak a mikroszkóp-tárgylemezen létrehozott folyadékcella felszínéhez kötött miozinmolekulák általi mozgatusát követtük ATP jelenlétében, fluoreszcencia-mikroszkóp segítségével. Egyedi molekulák vizsgálatára TIRF (*total internal reflection fluorescence*) és ebből kifejlesztett FIONA (*fluorescence imaging with one nanometer accuracy*) módszereket alkalmaztunk. A TIRF kísérletekben a folyadékcellát a tárgylemez felől olyan szögben világítottuk meg, hogy a tárgylemez testébe visszaverődő gerjesztő fény a folyadéknak csak egy vékony rétegébe (az ún. evanescens mezőbe, amely néhány 100 nm vastagságú) hatoljon be. Ezáltal a felszínhez közel elhelyezkedő fluorofórokat szelektíven tudtuk gerjeszteni (a folyadékcellában lévő többi fluorofór háttérhatását kiküszöbölve), ami lehetővé tette egyedi molekulák fluoreszcenciájának vizsgálatát. A FIONA-analízis révén megfelelő mennyiségű foton begyűjtésével és az intenzitás-adatok kétdimenziós normáeloszlás-illesztésével a fluorofór elhelyezkedése nanométeres pontossággal meghatározható, ami az egyedi motorlépések vizsgálatában döntő jelentőséggel bír.

4.6 Szerkezet-meghatározó módszerek

Számos esetben – szakmai együttműködések keretében – szerkezet-meghatározó módszereket (röntgen-krisztallográfia, elektron-mikroszkópia, kisszögű röntgenszórás) alkalmaztunk a kinetikai-funkcionális sajátosságok szerkezeti alapjainak vizsgálatára.

4.7 Modellezés

A vizsgált enzimek szerkezet-változásait molekuláris dinamikai és kvantumkémiai módszerekkel, illetve a ligandumok kötését vak-dokkolásos számításokkal modelleztük.

A kísérletesen meghatározott sebességi és egyensúlyi állandókból az enzimátikus ciklusok részletes kvantitatív modelljeit alkotjuk meg. A kísérletileg nem vizsgálható paramétereket, illetve a rendszer egészének különböző körülmények között tanúsított viselkedését, külső hatásokra adott válaszait numerikus szimulációkat végző kinetikai modellező programok (*Gepasi*, *KinTek Global Kinetic Explorer*) segítségével tudtuk kiszámítani illetve előre jelezni.

5. Új tudományos eredmények összefoglalása

A dolgozatban ismertetett eredmények átfogó közös témája az élőlényekben működő motorenzimek működés módjának a biológiai szerepeknek megfelelően kialakult sokfélesége. Az 5.1 fejezetben összegzett eredményeink (1;3;5;7;8;10-12;20) arra derítették fényt, hogy a miozin szupercsaládba tartozó sejtvázmotor izoformák sokrétű élettani funkcióit hogyan biztosítja a biokémiai működés specializációja. Az 5.2 fejezetben vázolt munkákban (2;4;6;9;15-18;21;23;25-27) azt vizsgáltuk, hogy a miozinok változatos aktivitását hogyan határozzák meg a molekulán belül a működési ciklus során lezajló szerkezetváltozások, illetve hogy e változások közül melyek tükrözik általános elveket, és melyek az egyedi specializáció megnyilvánulásai. Végül az 5.3 fejezetben összesített munkákban (19;22;24) azt

vizsgáltuk, hogy a hidrolitikus hajtóerőt hogyan hasznosítják az információ-anyagcserében működő enzimek a nukleinsavak szerkezetének átalakítására.

5.1 Miozinok működésmódjainak sokfélesége

Munkánkat megelőzően ismert volt a többek között a különböző izom-miozin 2 izoformák, valamint a vezikulumok szállítását processzív egyedi molekulaként végző miozin 5a enzimmechanizmusa. Az ismeretek alapján az a kép uralta a terület közvéleményét, hogy a szálakat képező miozin 2 izoformákra a gyors, alacsony terhelési arány mellett történő működés jellemző, míg az egyedi molekulaként az aktinszálon vándorló miozin 5 számára a magas terhelési arány szükséges. Alább összegzett eredményeinkkel hozzájárultunk mindkét paradigmatisztikus nézet megdöntéséhez illetve a motorműködésről alkotott képünk alakulásához.

- Az aktomiozin sejtmotor számos új motilitás-típusát fedeztünk fel (1;3;5;7;8;10-12;20). E mechanizmusok rávilágítanak arra, hogy a változatos időskálán és szerveződésben működő miozinok élettani aktivitásait döntően az egyes izoformák biokémiai, enzimkinetikai sajátosságai határozzák meg. A kinetikai változékonyság – a szerkezeti sajátosságok többségével szemben – nem a törzsfajlódás szerinti rokonságot követi, hanem az élettani szerepekhez történő gyors, rugalmas adaptáció eredménye.
- Kimutattuk, hogy a sejtosztódás és -differentiáció motorja, a nem-izom miozin 2 működése során magas aktinkötöttségi hányadot (terhelési arányt) mutat (1;3;5;8). E miozinokban a hidrolízis termék ADP által okozott termékgátlás hosszú távú teher tartást tesz lehetővé, így sejt autonóm mechanikai válaszképességének alapjául szolgál. A felsorolt sajátosságok mindegyike szöges ellentétben áll az izomkutatásban a filamentális motorokról korábban kialakult általános nézetekkel.
- A sejtalkotókat szállító miozin-5a működésének megismerésével alakult ki az az elképzelés, hogy az aktin-alapú citoplazmatikus transzportot egyedi miozinmolekulák processzív működése hajtja. Ezzel ellentétben két másik miozin 5 izoformáról kimutattuk, hogy azok csak nagyobb molekulacsoportokban – azaz nem egyedi molekulaként – képesek processzív haladásra (10;20). A citoplazmában zajló transzport jelentős része tehát a szállított sejtalkotók (pl. vezikulumok) felszínén jelentős koncentrációban jelenlévő motormolekulák együttes működésének eredménye.
- Megmutattuk, hogy a miozin 7 izoformák – processzív mozgásuk természetes adottságai (hosszú futáshossz és lassú transzlokációs sebesség) révén – az egyedimolekula-vizsgálatok számára más miozinoknál előnyösebb motortípust képviselnek (11;12).
- Eredményeink szerint a filopódiumokban anyagszállítást végző miozin 10 az enzimciklus minden állapotában viszonylag magas aktin-affinitással rendelkezik, ami az aktinkötegen való folyamatos haladást segíti (7).

5.2 Az erőgenerálás útvonalai a miozinban: általános alapelvek és speciális adaptációk

A következőkben összegzett munkákban azt igyekeztünk részleteiben felderíteni, hogy az 5.1 fejezetben említett változatos motoraktivitásokat a miozin-molekula milyen szerkezeti

átalakulásai teszik lehetővé, illetve hogy ezek a szerkezetváltozások hogyan illeszthetők átfogó kinetikai-energetikai sémába. A mechanokémiai ciklus legizgalmasabb, ám legkevésbé felderített része az erőgenerálási lépés, amelynek lehetséges útvonalait összefoglaló cikkben elemeztük (26). Az erőgenerálás energetikai megközelítésében kiemelkedő jelentőségű, hogy megismerjük annak kezdő- illetve végállapotát: alábbi eredményeink ezek megközelítéséhez is jelentősen hozzásegítettek (2;6;9;15;23;27). További munkáinkban azt vizsgáltuk, hogy a miozinfaj nukleotid-kötőhelye és erőkarja között milyen szerkezeti-kinetikai kapcsoltság áll fenn, és ennek mi a funkcionális jelentősége (4;16-18;21;25): az erőkarra gyakorolt hatás szabályozhatja-e az aktívhelyen zajló enzimműködést, illetve az aktívhely befolyásolása kihat-e az erőkar mozgás által megvalósuló mozgatóképessegre? Az erőgenerálással kapcsolatos legfontosabb új eredményeink a következők:

- Összefoglaló cikkünkben (26) rámutattunk, hogy a hatékony erőgenerálás párhuzamos reakció-utakon történhet. A mechanokémiai ciklust kinetikai útvonalválasztási mechanizmus tereli a hatékony erőgenerálás felé a felesleges, „ATP-pocsékoló” ciklusok helyett. A miozin ATPáz aktin-aktivációja a hatékony erőgenerálási útvonalak magas fluxusarányát teszi lehetővé. Az aktiváció tehát nem szükséges a motorműködéshez *per se*, hanem annak energetikai hatékonyságát befolyásolja. Az aktin-aktiváció foka általában alacsonyabb a gyors kontrakció helyett elsősorban erőtartó szerepet betöltő miozin izoformák esetében.
- Jelentős lépéseket tettünk az aktomiozin mechanokémiai ciklus legfontosabb, ám legkevésbé hozzáférhető és ezért legkevésbé felderített folyamata, az erőgenerálás megértése felé. Meglepetésre azt találtuk, hogy a blebbistatin nevű gátlószer – ADP jelenlétében – a miozinfaj az erőkifejtő lépés kezdőállapotában stabilizálja: ez a felhúzott erőkarú és magas aktin-affinitású szerkezet korábban nem volt stabilan előállítható (6;23).
- A miozin 2 erőkarjának kiindulópontjánál lévő taszító jellegű szubdomén-kölcsönhatás pontmutáció-indukált változtatásai révén azt találtuk, hogy az erőkarlengés egyensúlyi állapotjának megváltozása – a lépések kapcsoltsága folytán – befolyásolja az ATP-hidrolízis kinetikáját, így kimutattuk, hogy a vizsgált kölcsönhatásnak fontos szerepe van az enzimaktivitás finomhangolásában (4;18).
- Demonstráltuk, hogy a különböző miozinok aktinkötésének energetikai profilját a miozinfajban lévő ún. aktinkötő árok bezáródásának folyamata határozza meg. Ez a felfedezés összhangban áll azzal a nézetrel, hogy az erőkifejtés során a miozinfaj magjában elhelyezkedő β -lemez energiatovábbító rugóként viselkedik az erőgenerálás során. Eredményeink azonban – a korábbi elképzelésekkel ellentétben – arra utaltak, hogy az aktinhoz történő indukált illeszkedés a rugó megfeszülésével jár (15;27).
- Az NTPázok aktívhelyén történő nukleotidcsere – azaz a hidrolízis-termékek új NTP-szubsztrátra való felváltása – a jelátvivő enzimekben (pl. G-fehérjékben) időzítő kapcsolóként működik. Megmutattuk, hogy ez a folyamat a filamentális (nem-izom miozin 2) és egységmolekula- (miozin 5a) motorenzimekben is időzítő szereppel bír: a motor lépésének kinetikai kapujaként szabályozza az aktin mentén történő előrehaladás sebességét (17;25).
- Felderítettük a nem-izom miozin 2-ben történő nukleotidcsere mechanikai terhelés általi szabályozását (17). E mechanizmus a klasszikus allosztéria-fogalom kiegészítésével értelmezhető, amelyben nem valamely ligandum kötése, hanem a

fehérjemolekulára adott irányban kifejtett mechanikai erőhatás befolyásolja az enzimműködést hajtó szerkezeti egyensúlyokat. Az eredmények egy olyan – a filamentális miozinok körében addig „elképzeltetlenné” tartott – mechanizmusra engedtek következtetni, amelyben mechanikai terhelés hatására a kétfejú miozin 2 molekulák kettősen aktinkötött állapota is jelentős arányban járulhat hozzá a tehertartáshoz a működési ciklus során. Ez a kontraktilis és tehertartó ciklusok közötti üzemmódváltás modelljéhez vezetett (17).

- Megállapítottuk, hogy a nem-izom miozin 2 izoformák minden eddig vizsgált miozinnál nagyobb, közel 5 nanométeres erőkar-kilengést mutatnak az ADP-felszabaduláshoz kapcsolva: ez a sajátság képezi a terhelésfüggő nukleotidcsere szerkezeti alapját (16). A szerkezeti adatok kinetikai-energetikai számításainkkal is összhangban álltak (17).
- Kimutattuk, hogy a miozin aktívhelyében lévő *switch 2* hurok szerkezete meghatározza a miozin 5a processzív haladási sebességét (25). Az eredmények azt is jelezték, hogy a *switch 2* génszabványi módosítása mesterséges motorok sebességének hangolására is felhasználható, a processzivitás képességének érintetlenül hagyása mellett. A *switch 1* hurok mutagenézisével viszont csökkenteni tudtuk a miozin 5a processzív futáshosszát, míg a futási sebesség változatlan maradt (21). A két sajátság tehát elkülönülten szabályozható.

5.3 Az NTPáz működés specializációja az információ-anyagcsere enzimeiben

A miozin motorokon végzett kísérletek mellett részletesen megvizsgáltuk azt is, hogy az NTP-hidrolízis folyamata hogyan zajlik a nukleinsav-anyagcsere különböző enzimeiben. Részt vettem a dUTPáz enzim katalitikus mechanizmusának felderítésében (19), valamint csoportom újabb kutatási irányaként meghatároztuk a RecQ-családba tartozó humán BLM DNS-helikáz mechanokémiai működésmódját. Ezen enzimek vizsgálatában hatékonyan alkalmaztuk a miozin-kutatásban elsajátított elméleti és technikai ismereteket.

DNS-helikázokkal kapcsolatos munkánk arra a központi hipotézisre épül, amely szerint a helikázok által katalizált transzlokációs és DNS-szálelválasztási ciklusnak – a miozin motorokhoz hasonló módon – alapvető eleme a nukleotid- és sín-kötőhelyek közötti intramolekuláris kommunikáció, amely a sín-affinitásnak a nukleotid-állapottól függő modulációja révén vezet a DNS-szálak mentén történő tovahaladáshoz és a két szál elválasztásához. A dolgozatban ismertetett legfontosabb eredményeink a következők:

- Kidolgoztunk egy analitikai eljárást, amelynek segítségével a nukleinsavak mentén haladó motorfehérjék (transzlokázok, helikázok, polimerázok) legfontosabb működési jellemzői (egy NTP-hidrolízisciklus alatt megtett nukleinsav-hossz, transzlokációs sebesség, NTPáz aktivitás, processzivitás) egyetlen tranziens kinetikai kísérletsorozatban meghatározhatók (22).
- Meghatároztuk a BLM-helikáz DNS-en történő transzlokációjának mechanokémiai mechanizmusát (24). Kimutattuk, hogy az araszoló processzív haladást végző helikáz az erőkar-alapú motilitást mutató miozinokétól több lényegi ponton – az ATP- és sínkötés kapcsoltságában, illetve a sín általi enzimaktiváció mechanizmusában – eltérő kinetikai-energetikai ciklus során hasznosítja az ATP-hidrolízisből származó szabadenergiát. A BLM-helikáz általunk azonosított, ADP-kötött állapotban

bekövetkező, sebesség-meghatározó szerkezet-változása az enzim mechanikai lépésének alapjául szolgálhat.

A fentieket összegezve megállapítható, hogy a biológiai motorok energia-átalakító működésének kinetikai-termodinamikai elvei azonosak, a kapcsoltsági mechanizmusok és szerkezeti elvek sokfélesége azonban az adott funkcióhoz történő rugalmas alkalmazkodást tükrözi.

6. Tervek, perspektívák

A dolgozatban ismertetett eredmények természetesen a felfedezések által kijelölt kutatási irányokban való további haladásra sarkallnak. Az alábbiakban röviden ismertetem a kutatócsoportomban jelenleg zajló munkák célkitűzéseit és kifutási lehetőségeit.

A miozinkutatás egyik "Szent Gráljának" számító erőgeneráló lépés további szerkezeti részleteinek megismerése céljából a 6.2.2 fejezetben leírt miozin.ADP.blebbistatin komplex aktinkötött formájának stabil előállítását és a komplex szerkezetvizsgálatát tervezzük.

A BLM DNS-helikáz DNS-hibajavító működésének megértésében a következő lépéseket a ciklus molekuláris mechanikai sajátságainak meghatározásával kívánjuk megtenni. Ezen felül Kellermayer Miklós csoportjával együttműködésben egyedimolekula-módszerekkel vizsgáljuk a helikáznak a működés szempontjából vélhetőleg központi jelentőségű – ám adataink alapján az adott DNS-szubsztrát szerkezetétől dinamikusán függő – oligomerizációját. A hibajavító aktivitás megértéséhez részletesen megvizsgáljuk a helikázok fehérjepartnerekkel történő együttműködését is.

A 2. fejezetben felvetett legizgalmasabb kérdések közé tartozik, hogy a nukleinsavakat módosító enzimek enzimológiai és biofizikai sajátságai hogyan befolyásolják az egyes szervezetek genetikai alkalmazkodóképességét. A RecQ-helikáz hibajavító működésének vizsgálatára *E. coli*-ban az irányított evolúció adta lehetőségeket is fel kívánjuk használni, illetve tervezzük e módszertan kiszélesítését. Az enzim hibajavító működése által az UV-sugárzással szemben biztosított ellenálló-képesség a RecQ-helikáz funkcionális szelekciójára ad lehetőséget. Random mutagenézissel nagyszámú RecQ-variánst hozunk létre, amelyeket *E. coli* klónokban kifejezve az UV-stressz körülmények hangolásával valósítjuk meg a szelekciót. A funkcionálisan kiválogatott pontmutánsok izolálása és enzimológiai-biofizikai jellemzése révén kívánjuk meghatározni, hogy a mechanoenzimatis sajátságok – többek között a 4.10 fejezetben leírt működések által – hogyan járulnak hozzá a szervezetek alkalmazkodó-képességhez és evolúciós folyamataihoz.

A RecQ-helikázok közismert genomépség-fenntartó szerepe mellett Vellai Tiborral megvizsgáltuk ezen enzimeknek az eukarióta genomok evolúciójában betöltött potenciális új szerepét is. Hipotézisünk szerint a meiotikus rekombináció során a RecQ-helikázok kulcsszerepet játszhatnak egy, a deléciók szelektív kiküszöbölését és az újonnan megjelenő inszerciók és duplikációk elterjesztését szolgáló genetikai mechanizmusban. E működést *in vitro* és *in vivo* kísérleti módszerek kombinált alkalmazásával tervezzük vizsgálni.

7. Közlemények jegyzéke

7.1 Az értekezés alapjául szolgáló saját nemzetközi közlemények

Az első- illetve utolsó szerzős cikkeket – beleértve a megosztott elsőszerzőket (*) is – félkövér szedés, a levelező szerzős munkákat pedig aláhúzott sorszám jelöli.

1. Wang, F.*, Kovacs, M.*, Hu, A., Limouze, J., Harvey, E. V., and Sellers, J. R. (2003) Kinetic mechanism of non-muscle myosin IIB: functional adaptations for tension generation and maintenance, *J. Biol. Chem.* **278**, 27439-27448.
2. Conibear, P. B., Bagshaw, C. R., Fajer, P. G., Kovacs, M., and Malnasi-Csizmadia, A. (2003) Myosin cleft movement and its coupling to actomyosin dissociation, *Nat. Struct. Biol.* **10**, 831-835.
3. Kovacs, M.*, Wang, F.*, Hu, A., Zhang, Y., and Sellers, J. R. (2003) Functional divergence of human cytoplasmic myosin II: kinetic characterization of the non-muscle IIA isoform, *J. Biol. Chem.* **278**, 38132-38140.
4. Kovacs, M., Toth, J., Malnasi-Csizmadia, A., Bagshaw, C. R., and Nyitray, L. (2004) Engineering lysine reactivity as a conformational sensor in the Dictyostelium myosin II motor domain, *J. Muscle Res. Cell Motil.* **25**, 95-102.
5. Kovacs, M., Toth, J., Nyitray, L., and Sellers, J. R. (2004) Two-headed binding of the unphosphorylated nonmuscle heavy meromyosin-ADP complex to actin, *Biochemistry* **43**, 4219-4226.
6. Kovacs, M., Toth, J., Hetenyi, C., Malnasi-Csizmadia, A., and Sellers, J. R. (2004) Mechanism of blebbistatin inhibition of myosin II, *J. Biol. Chem.* **279**, 35557-35563.
7. Kovacs, M., Wang, F., and Sellers, J. R. (2005) Mechanism of action of myosin X, a membrane-associated molecular motor, *J. Biol. Chem.* **280**, 15071-15083.
8. Kim, K. Y.*, Kovacs, M.*, Kawamoto, S., Sellers, J. R., and Adelstein, R. S. (2005) Disease-associated mutations and alternative splicing alter the enzymatic and motile activity of nonmuscle myosins II-B and II-C, *J. Biol. Chem.* **280**, 22769-22775.
9. Liu, X., Shu, S., Kovacs, M., and Korn, E. D. (2005) Biological, biochemical, and kinetic effects of mutations of the cardiomyopathy loop of Dictyostelium myosin II: importance of ALA400, *J. Biol. Chem.* **280**, 26974-26983.
10. Toth, J., Kovacs, M., Wang, F., Nyitray, L., and Sellers, J. R. (2005) Myosin V from Drosophila reveals diversity of motor mechanisms within the myosin V family, *J. Biol. Chem.* **280**, 30594-30603.
11. Yang, Y.*, Kovacs, M.*, Xu, Q., Anderson, J. B., and Sellers, J. R. (2005) Myosin VIIb from Drosophila is a high duty ratio motor, *J. Biol. Chem.* **280**, 32061-32068.
12. Yang, Y.*, Kovacs, M.*, Sakamoto, T.*, Zhang, F., Kiehart, D. P., and Sellers, J. R. (2006) Dimerized Drosophila myosin VIIa: A processive motor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**, 5746-5751.
13. Forgacs, E., Cartwright, S., Kovacs, M., Sakamoto, T., Sellers, J. R., Corrie, J. E., Webb, M. R., and White, H. D. (2006) Kinetic mechanism of myosinV-S1 using a new fluorescent ATP analogue, *Biochemistry* **45**, 13035-13045.
14. Kintses, B., Simon, Z., Gyimesi, M., Toth, J., Jelinek, B., Niedetzky, C., Kovacs, M., and Malnasi-Csizmadia, A. (2006) Enzyme kinetics above denaturation temperature: a temperature-jump/stopped-flow apparatus, *Biophys. J.* **91**, 4605-4610.
15. Yang, Y., Gourinath, S., Kovacs, M., Nyitray, L., Reutzel, R., Himmel, D. M., O'Neill-Hennessey, E., Reshetnikova, L., Szent-Gyorgyi, A. G., Brown, J. H., and Cohen, C. (2007) Rigor-like structures from muscle myosins reveal key mechanical elements in the transduction pathways of this allosteric motor, *Structure*. **15**, 553-564.
16. Iwamoto, H., Oiwa, K., Kovacs, M., Sellers, J. R., Suzuki, T., Wakayama, J., Tamura, T., Yagi, N., and Fujisawa, T. (2007) Diversity of structural behavior in vertebrate conventional myosins complexed with actin, *J. Mol. Biol.* **369**, 249-264.
17. Kovacs, M., Thirumurugan, K., Knight, P. J., and Sellers, J. R. (2007) Load-dependent mechanism of nonmuscle myosin 2, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **104**, 9994-9999.
18. Malnasi-Csizmadia, A., Toth, J., Pearson, D. S., Hetenyi, C., Nyitray, L., Geeves, M. A., Bagshaw, C. R., and Kovacs, M. (2007) Selective Perturbation of the Myosin Recovery Stroke by Point Mutations at

- the Base of the Lever Arm Affects ATP Hydrolysis and Phosphate Release, *J. Biol. Chem.* **282**, 17658-17664.
19. Toth, J., Varga, B., Kovacs, M., Malnasi-Csizmadia, A., and Vertessy, B. G. (2007) Kinetic mechanism of human dUTPase, an essential nucleotide pyrophosphatase enzyme, *J. Biol. Chem.*
 - 20. Takagi, Y., Yang, Y., Fujiwara, I., Jacobs, D., Cheney, R. E., Sellers, J. R., and Kovacs, M. (2008) Human myosin Vc is a low duty ratio, nonprocessive molecular motor, *J. Biol. Chem.* **283**, 8527-8537.**
 21. Forgacs, E., Sakamoto, T., Cartwright, S., Belknap, B., Kovacs, M., Toth, J., Webb, M. R., Sellers, J. R., and White, H. D. (2009) Switch 1 mutation S217A converts myosin V into a low duty ratio motor, *J. Biol. Chem.* **284**, 2138-2149.
 - 22. Gyimesi, M., Sarlos, K., Derenyi, I., and Kovacs, M. (2010) Streamlined determination of processive run length and mechanochemical coupling of nucleic acid motor activities, *Nucleic Acids Res.* **38**, e102.**
 - 23. Takacs, B., Billington, N., Gyimesi, M., Kintszes, B., Malnasi-Csizmadia, A., Knight, P. J., and Kovacs, M. (2010) Myosin complexed with ADP and blebbistatin reversibly adopts a conformation resembling the start point of the working stroke, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 6799-6804.**
 - 24. Gyimesi, M., Sarlos, K., and Kovacs, M. (2010) Processive translocation mechanism of the human Bloom's syndrome helicase along single-stranded DNA, *Nucleic Acids Res.* **38**, 4404-4414.**
 - 25. Nagy, N. T., Sakamoto, T., Takacs, B., Gyimesi, M., Hazai, E., Bikadi, Z., Sellers, J. R., and Kovacs, M. (2010) Functional adaptation of the switch-2 nucleotide sensor enables rapid processive translocation by myosin-5, *FASEB J.* **2010 Jul 14**. [Epub ahead of print]**
 - 26. Malnasi-Csizmadia, A. and Kovacs, M. (2010) Emerging complex pathways of the actomyosin powerstroke, *Trends Biochem. Sci.* **2010 Aug 26**. [Epub ahead of print]**
 - 27. Takacs, B., O'Neill-Hennessey, E., Hetenyi, C., Kardos, J., Szent-Gyorgyi, A. G., and Kovacs, M. (2010) Myosin cleft closure determines the energetics of the actomyosin interaction, *FASEB J.* **2010 Sep 13**. [Epub ahead of print]**

7.2 A Ph.D. fokozat megszerzése előtti saját nemzetközi közlemények

28. Malnasi-Csizmadia, A., Kovacs, M., Woolley, R. J., Botchway, S. W., and Bagshaw, C. R. (2001) The dynamics of the relay loop tryptophan residue in the Dictyostelium myosin motor domain and the origin of spectroscopic signals, *J. Biol. Chem.* **276**, 19483-19490.
29. Malnasi-Csizmadia, A., Pearson, D. S., Kovacs, M., Woolley, R. J., Geeves, M. A., and Bagshaw, C. R. (2001) Kinetic resolution of a conformational transition and the ATP hydrolysis step using relaxation methods with a Dictyostelium myosin II mutant containing a single tryptophan residue, *Biochemistry* **40**, 12727-12737.
30. Wakelin, S., Conibear, P. B., Woolley, R. J., Floyd, D. N., Bagshaw, C. R., Kovacs, M., and Malnasi-Csizmadia, A. (2002) Engineering Dictyostelium discoideum myosin II for the introduction of site-specific fluorescence probes, *J. Muscle Res. Cell Motil.* **23**, 673-683.
31. Kovacs, M., Malnasi-Csizmadia, A., Woolley, R. J., and Bagshaw, C. R. (2002) Analysis of nucleotide binding to Dictyostelium myosin II motor domains containing a single tryptophan near the active site, *J. Biol. Chem.* **277**, 28459-28467.

7.3 Magyar nyelvű saját közlemények

32. Kovacs, M. (2008) Lassan járj, tovább érsz: a sejtosztódás és differenciáció motorjainak mechanikai szabályozása, *Biokémia* **2008. december**.
33. Sarlos, K., Gyimesi, M., Kovacs, M. (2009) Anyagmozgatás és információ-továbbítás a sejtben: biológiai motorok sokfélesége, *Természet Világa* **2009. május**.
34. Takacs, B., Kovacs, M. (2009) Motorok a sejtben - Mi hajt bennünket?, *Élet és Tudomány* **LXIV/6**.
35. Gyimesi, M., Vellai, T., Kovacs, M. (2010) A genetikai állomány stabilitása: helikáz enzimek szerepe a DNS-hibajavításban, *Természet Világa* **2010. március**.
36. Nagy, N., Takacs, B., Kovacs, M. (2010) Motorenzimek működési alapelvei és egyedi finomhangolása, *Biokémia* **2010. június**.