MOTORENZIMEK MŰKÖDÉSÉNEK SOKFÉLESÉGE

MTA doktori értekezés



Kovács Mihály

Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar Biológiai Intézet Biokémiai Tanszék

2010

Tartalomjegyzék

1.	Összefoglalás 4
2.	Kérdések és célkitűzések 4
3.	A munka körülményei és előzményei, szakmai hozzájárulások 6
4.	Tudományterületi háttér 7
	4.1 Az energia-átalakítás az élővilágban megfigyelhető mozgások alapja 7
	4.2 A téma tudományos jelentősége és újszerűsége 7
	4.3 A téma alkalmazási jelentősége 8
	4.4 Hidrolitikus hajtóerő munkára fogása NTPáz enzimekben 9
	4.5 Az izom-biokémia és a miozinológia klasszikus mérföldkövei 10
	4.6 A miozin szerkezeti elemei 12
	4.7 A miozin mechanokémiai ciklusa 13
	4.8 A miozinok szerkezeti és funkcionális sokfélesége 15
	4.9 A nukleinsavak szerkezet-átalakító motorjai 18
	4.10 A DNS-helikázok központi szerepe a hibajavításban 19
	4.11 Közös elvek az aktomiozin és helikáz motorok működésében 21
5.	Módszertan 22
	5.1 A motorkutatás úttörő szerepe a modern enzimológiai és molekuláris biofizikai technikákfejlődésében22
	5.2 A jelölt hozzájárulása a módszertani fejlesztésekhez 23
	5.3 Géntechnológia, fehérjék előállítása 23
	5.4 Fehérjék helyspecifikus jelölése 24
	5.5 Alkalmazott fluoreszcens jelek 24
	5.6 Fluoreszcencia-spektroszkópia 25
	5.7 <i>Steady-state</i> enzimkinetika 25
	5.8 Gyorskeveréses tranziens kinetikai technikák (stopped-flow, quenched-flow) 25
	5.9 Relaxációs tranziens kinetikai kísérletek (hőmérsékletugrás, nyomásugrás) 26
	5.10 Motilitási tesztek, egyedimolekula-fluoreszcencia mérések 27
	5.11 Kinetikai modellezés 28
	5.12 Szerkezet-meghatározó módszerek, szerkezeti modellezés 28
6.	Kutatási eredmények és megbeszélésük 29
	6.1 Miozinok működésmódjainak sokfélesége296.1.1 Erőtartó miozinok: lassan járj, tovább érsz296.1.2 Processzív szállítás motormolekulák csapatmunkájával396.1.3 Membrán-asszociált motorműködés41

6.1.4 A miozin 7 mint új pro	cesszív objektum	4	42		
6.1.5 Motor-működésmódo	k elvi lehetőségei	és azok ki	használtsága	43	
6.2 Az erőgenerálás útvona 6.2.1 A hatékony erőgenerá 6.2.2 Lencsevégen az erőka	lai a miozinban : lás útvonalai rlecsapás kezdőáll	: általáno 45 Iapota 4	<mark>s alapelvek és</mark> ¹⁷	speciális adap	tációk 45
 6.2.3 Az aktinkötéssel járó e 6.2.4 Terhelésfüggő nukleot 6.2.5 Nukleotidcsere szabál 6.2.6 Az erőkarmozgás vissz 	nergia-változások idcsere szabályoz yozza a miozin 5a ahatása az aktívh	k és a mioz zza a nem- haladási s elyen zajló	in torziós rugója izom miozin 2 üz ebességét) katalízisre	50 emmód-váltásá 57 59	t 53
6.3 Az NTPáz működés spec 6.3.1 Energiatermelés helye	c ializációja az in tt specificitás: a d	formáció IUTPáz kat	-anyagcsere er alitikus működés	n zimeiben se 61	61
6.3.2 Általánosan használha 6.3.3 A BLM-helikáz mint tra 6.3.4 Miozinok és helikázok	tó módszer a nuk anszlokációs moto energia-átalakító	leinsav-mo or működé mechaniz	otorok működés se 65 musainak összeł	ének vizsgálatára nasonlítása	a 61 70
7. Új tudományos eredmény	vek tézises össz	zefoglalá	isa 71		
8. Tervek, perspektívák	72				
9. Köszönetnyilvánítás	73				
10. Irodalomjegyzék	74				
10.1 Az értekezés alapjául s	zolgáló saját ne	emzetközi	i közlemények	74	
10.2 A Ph.D. fokozat megsz	erzése előtti saj	át nemze	tközi közlemé	nyek 75	
10.3 Magyar nyelvű saját kö	özlemények	75			

10.4 Felhasznált irodalom 75

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: kiderítettük, hogy ezek a molekuláris mechanizmusok hogyan határozzák meg a miozinok sokrétű élettani hatásait. Megváltoztattunk az aktomiozin-működéssel kapcsolatos számos paradigmatikus 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 gátlószerrel stabilizáltuk a miozin erőkifejtő 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-érzékenyégének detektálásával hozzájárultunk az allosztérikus szabályozás új formájának megismeréséhez, amelyben a fehérjemolekulára kifejtett mechanikai erőhatás befolyásolja az enzimműködést. 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 sejtváz- és nukleinsavmotorműködések általános elveire illetve a működéstípusok közötti legfontosabb különbségekre.

2. Kérdések és célkitűzések

Hogyan hasznosítják a motor- és jelátvivő enzimek a nukleotid-hidrolízisből származó szabadenergiát mechanikai vagy információ-továbbító működésükhöz? Hogyan járulnak hozzá az egyes enzimek szerkezeti adaptációi a komplex és specializált biológiai szerepek ellátásához?

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 a kémiai energia mechanikai munkává történő átalakítását végző máig legismertebb enzimcsoport, az izom aktomiozin-rendszere állt. A tudománytörténet e területen a törzsfejlődéssel mintegy ellentétes útvonalat járt be: a régóta egyedüliként vizsgált izom aktomiozin motorenzim-rendszerről a molekuláris sejtbiológiai ismeretek bővülése révén kiderült, hogy az az eukarióta világban mindenütt előforduló általános mozgatórendszer szélsőségesen specializált formája. Doktori (Ph.D.) munkám elvégzését követően egyre inkább az kezdett érdekelni, hogy a rendkívül sokoldalú sejtműködéseket és élettani funkciókat ellátó miozin izoformák 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 sajátságai? 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? 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 sajátságait? Mire lehet 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 jöhessen létre?

A fenti kérdések az aktomiozin rendszer sokféleségének szerepére világítanak rá. E rendszeren túlmenően azonban érdeklődésem homlokterébe került e motorenzimek jóval tágabb holdudvara is. Az aktomiozinhoz hasonlóan sok más sejtváz-motor, nukleinsav-módosító fehérje és jelátvivő enzimrendszer is nukleozid-trifoszfátok (NTP) hidrolízisét hasznosítja élettani funkciója megvalósításához. Milyen általános elvek fedezhetők fel e rendkívül sokféle NTPáz enzim működésében? Az NTPázokban az NTP és a makromolekula-partner ("sínfehérje", nukleinsav) kötőhelye között mindig történik allosztérikus kommunikáció? E kommunikáció mennyiben szükséges az enzimek hatékony működéséhez? Az NTP-hidrolízisből származó szabadenergia a soklépéses enzimmechanizmusok mely részfolyamata(i)ban szabadul fel? Az egyes lépések energetikájának mintázata összefüggésben áll-e az egyes enzimek funkciójával?

Az élet kémiája mellett egyetemi hallgató korom óta a genetika, a biológiai folyamatai felé fordultam információfeldolgozás а legnagyobb érdeklődéssel. Kutatócsoportommal ezért a közelmúltban a két érdeklődés összekötésével kívánjuk megvalósítani hosszú távú terveinket. A molekuláris genetikai folyamatok többségét hajtó enzimek többsége nukleinsav mentén mozgó motorfehérje. Ezért ésszerű azt feltételezni, hogy ezen enzimek biokémiai-biofizikai sajátságai nagymértékben meghatározhatják az információ-feldolgozási folyamatok kimenetelét. Az összetett genetikai folyamatok számos enzim együttműködéséből illetve "kötélhúzásából" (antagonisztikus viselkedéséből) adódó sztochasztikus jelenségekként foghatók fel. Azt szeretnénk felderíteni, hogy milyen összefüggés áll fenn az egyes enzimek haladási sebessége, processzivitása (egy lépéssorozat során várható úthossza), erőkifejtése, energetikai hatékonysága illetve a makroszkóposan megfigyelhető genetikai és evolúciós folyamatok, sajátságok (adaptáció, mutációk keletkezése és stabilizálódása, genomépség fenntartása, új változatok elterjedése) között. Ismertetett és jelenlegi munkáinkban a DNS-hibajavításban és rekombinációs folyamatokban szerepet játszó, valamennyi élő szervezetben megtalálható helikáz motorenzimek (RecQcsalád helikázok) működési mechanizmusát vizsgáljuk, és azt igyekszünk felderíteni, hogy e molekuláris folyamatok hogyan járulnak hozzá egyrészről a genom épségének fenntartásához, másrészről az új génváltozatok elterjedéséhez.

3. A munka körülményei és előzményei, szakmai hozzájárulások

Jelen értekezés alapjául a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése óta a molekuláris motorok témakörében megjelent saját közlemények szolgálnak, amelyek az irodalomjegyzékben az (1-27) számok alatt szerepelnek. Ezek közül az (1;3;5-13;20;21) számú cikkek abból a munkából születtek, amelyet az USA-beli National Institutes of Health-ben, James R. Sellers kutatócsoportjában végeztem vendégkutatóként. A többi 14 publikáció az ELTE Biokémiai Tanszékén kutatócsoportommal végzett munka eredménye.

Az ismertetett munkák közül hét cikkben szerepelek első, nem-levelező szerzőként ((1;3;5;6;8;11;12) – ezek közül az (1;3;8;11;12) cikkek megosztott első szerzősek). E munkák esetében elsősorban a koncepció részleteinek kidolgozásában, a kísérleti munka tervezésében és kivitelezésében, az adatok feldolgozásában és a cikkírásban játszottam meghatározó szerepet. További három elsőszerzős cikkben (4;7;17) levelező szerző is vagyok: e munkák esetében az alapkoncepció megszületése és kidolgozása is hozzám köthető. A (18;20;22-27) számok alatt szereplő nyolc dolgozatban utolsó és levelező szerzőként szerepelek: e cikkek a kutatócsoportom tagjai által végzett, témavezetőként elnyert pályázataimból finanszírozott munkákból születtek. A dolgozatban elsősorban a felsorolt első- illetve utolsószerzős közleményekben ismertetett eredményekre igyekszem hangsúlyt fektetni.

Az ismertetett kutatások előzményét képező Ph.D. fokozatot az ELTE Gráf László professzor által vezetett Szerkezeti Biokémia Doktori Iskolában szereztem. A Ph.D. dolgozat alapjául szolgáló munkák (28-31) részben az ELTE Biokémiai Tanszékén Nyitray László témavezetésével, részben a Leicesteri Egyetemen Clive R. Bagshaw professzor és Málnási-Csizmadia András témavezetésével készültek. Ph.D. munkám során a miozin ATPáz enzimatikus mechanizmusának addig megoldatlan alapvető kérdéseit vizsgáltam: tisztáztuk a miozin nukleotid-kötési folyamatának részlépéseit, illetve meghatároztuk az ATP-hidrolízis lépés kapcsoltságát az erőkar mozgásával. Bagshaw professzor a tranziens enzimkinetika és fluoreszcencia-spektroszkópia egyik legismertebb mestere a molekuláris motorok tudományterületén, így a doktori munka során alkalmam nyílt e technikák részletes elsajátítására.

A nemzetközi tudományos vérkeringésben való részvétel mellett fontosnak érzem a magyar nyelvű szakmai és ismeretterjesztő irodalomban történő rendszeres publikálást, ezért az irodalomjegyzékben (32-36) számok alatt felsoroltam az utóbbi években magyar nyelven megjelent cikkeinket is.

4. Tudományterületi háttér

4.1 Az energia-átalakítás az élővilágban megfigyelhető mozgások alapja

A kémiai reakciókból származó szabadenergiát számos enzim erőkifejtésre, a sejtalkotók és sejtek szerkezetének átalakítására használja fel. Ezek az enzimek minden életfolyamatban nélkülözhetetlen szerepet játszanak.

Az irányított és szabályozott, aktív mozgásra való képesség (*spiritus animalis*, mai kifejezéssel 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 mozgatást végző eukarióta sejtváz-fehérjék (tubulin-kinezin, tubulin-dinein illetve aktomiozin rendszer), a baktériumok forgómozgást végző flagelláris motorjai, a mitokondriális ATP-szintáz (az oxidatív foszforiláció kulcsenzime), valamint a nukleinsav "síneken" mozgó DNS- és RNS-polimerázok, illetve számos egyéb, nukleinsavakat módosító enzim (pl. helikázok, transzlokázok, rekombinázok) is.

Ahogyan nincs anyag mozgás nélkül, úgy működőképes élő sejt sem képzelhető el motorfehérjék hiányában. A sejtváz motorjai közül például az aktomiozin rendszer olyan alapvető sejtfolyamatokban játszik szerepet, mint a sejtalak és -polaritás meghatározása, a sejtosztódás, az exo- és endocitózis, a különböző sejtnyúlványok (lamellipódiumok, filopódiumok) létrehozása és mozgatása, az irányított sejtmozgás illetve a kemotaxis (*37*). A nukleinsav síneken mozgó és azokat módosító motorenzimek közé tartoznak a DNS- és RNS-polimerázokon, rekombinázokon és különböző transzlokázokon kívül a DNS-helikázok is. Ezek az enzimek a kettősszálú DNS szálainak elválasztását végzik, miáltal hozzáférhetővé és változtathatóvá válik a DNS-molekula információ-tartalma. Valamennyi élőlény sokféle helikáz enzimet használ (az emberi gének 1 %-a helikázt kódol), amelyek elengedhetetlen szereplői a replikáció, rekombináció, transzkripció és hibajavítás folyamatainak (*38-41*).

4.2 A téma tudományos jelentősége és újszerűsége

A kemomechanikai energia-átalakítás a modern biológia egyik legérdekesebb, kihívásokat kínáló kulcsproblémája.

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 (*38;42-44*).

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 biológiai makromolekulák szerkezetére és működésére gyakorolt hatását leíró tudományág, a mechanobiokémia azonban még gyermekcipőben jár. A téma fontosságát egyre növekvő számú megfigyelés jelzi, amelyek azt igazolják, hogy a külső erőhatások egyes

enzimek specifikus konformáció-változásait idézik elő, és így a sejtbeli működések rövid és hosszú távú szabályozásához járulnak hozzá (45;46). Természetéből adódóan a motorenzimek világa kínálja a legalkalmasabb kísérleti rendszereket, amelyekben a mechanobiokémiai effektusok vizsgálhatók (47).

A sokféleség (diverzitás), mint az élővilág alapvető aspektusa, a motorenzimek szerkezeti, működésbeli és funkcionális változatosságában is megmutatkozik (*37;38;44;48*). Könnyű elképzelnünk, hogy egy olyan motornak, mint a vázizom miozin 2, amely a vastag filamentum, egy több száz molekulából felépülő egység részeként fejti ki működését és gyors izom-összehúzódást produkál, alapvetően más mechanikai teljesítményre és ehhez szorosan kapcsolt enzimmechanizmusra van szüksége, mint például a miozin 5-nek, amely egyedi molekulaként lépeget az aktinszálon, és vezikulumok transzportját végzi. Ezt a funkcionális sokféleséget eltérő enzimmechanizmusok teszik lehetővé, amelyek közül számosat részletesen felderítettünk munkánk során.

A DNS-helikáz motorok működési mechanizmusairól lényegesen kevesebbet tudunk, mint a sejtváz-motorokéról. Az információ-anyagcserében működő molekuláris komponensek oroszlánrészét a genomikai kutatások mára azonosították – e molekulák közül soknak a szerkezete és sejtbeli funkciója is ismert –, részletes működési mechanizmusaik viszont legnagyobbrészt még felderítetlenek (*38;39;44*). A következő áttörések így vélhetőleg azokon a tudományterületeken várhatók, amelyek ezeket a működési elveket kvantitatív módon vizsgálják. Kutatócsoportom egy részével ezért a RecQ-családba tartozó DNShelikázok molekuláris mechanizmusát vizsgáljuk az aktomiozin motorokon részletesen kidolgozott biokémiai, enzimkinetikai, molekuláris biofizikai és egyedimolekula-kísérletes arzenál felhasználásával és továbbfejlesztésével.

4.3 A téma alkalmazási jelentősége

A motorkutatás eredményeit az orvostudomány és a nanotechnológia hasznosítja.

A molekuláris motorok kutatása kettős jelentőséggel bír az alkalmazás szempontjából. Egyrészt, mivel a motorok rendkívül sokféle élettani folyamatban játszanak központi szerepet, az egészséges és hibás molekuláris működések ismerete betegségek kialakulási mechanizmusainak megértését, illetve specifikus modulátorok, gátlószerek tervezését és gyógyszerként történő alkalmazását teszi lehetővé. Ilyen betegségek és folyamatok pl. miozinok esetén a különböző kardiomiopátiák, az asztma, az idegszövet-regenerációs folyamatok és érzékszervi betegségek (*37*); DNS-helikázok esetén a rákos és vírusos megbetegedések (*40*). A monastrolt, amely egy, a mitózisban szerepet játszó kinezin inhibitora, ígéretes gyógyszerjelölt molekulaként tartják számon (*49;50*). A szívizom miozin egy nemrég előállított mesterséges aktivátora különböző kardiomiopátiák, míg az általunk is behatóan vizsgált blebbistatin – a sejtosztódás motorjaként működő nem-izom miozin 2 gátlása révén – szolid tumorok kezelésének válhat hatékony eszközévé (*51;52*). Számos DNS-helikáz-inhibitor bizonyult hatékony antivirális szernek klinikai vizsgálatokban (*40*).

Az orvosbiológia mellett a nanotechnológia a motortudomány másik jelentős alkalmazási területe. A motor-mechanizmusok ismeretében saját céljainkra tervezett motorok állíthatók elő, amelyek *chipek*, nanokapcsolók gyártására és más nanofabrikációs célokra hasznosíthatók (53).

4.4 Hidrolitikus hajtóerő munkára fogása NTPáz enzimekben

A motor és jelátvivő NTPázok nukleotidokkal és makromolekula-partnerekkel kölcsönhatva töltik be élettani szerepüket. A szabadenergia-felszabadító NTPáz ciklus részlépéseinek energetikai és kinetikai hangolása döntő jelentőségű a biológiai aktivitások megvalósulásában.

A nukleotidok és fehérjék közötti kölcsönhatás az élet kémiájának alapvető, ősi jelensége. A nukleotid-hidrolízis enzimatikus 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 az 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 – az NTP-molekula hidrolízisén, illetve a hidrolízis-termékek új NTP-szubsztrátra történő kicserélésén alapuló – mechanizmusok olyan szerkezeti (allosztérikus) kommunikációs útvonalakat hasznosítanak, amelyek evolúciós konzerváltsága még egészen különböző élettani folyamatokban szereplő enzimek esetében is nyilvánvaló (*54-56*). A G-fehérjék, miozinok és kinezinek nukleotidkötő helyének három legfontosabb konzervált szerkezeti eleme a *switch* 1 és *switch* 2, illetve a P-hurok. Ezek az elemek a katalízis mellett az enzimek és a partnerek közötti allosztérikus kapcsolásban is kulcsszerepet játszanak (*43*). Az ezen elemekben mutatkozó – némely esetben csupán egyetlen aminosavat érintő – természetes változatosság ugyanakkor teret enged az enzimműködés specializációjának, finomhangolási mechanizmust biztosítva az enzimek számára.

A kölcsönható partnerekkel megvalósított együttműködés az enzimek hatásának további hangolását teszi lehetővé. G-fehérjék esetében az allosztérikus aktivátorok (*GAP*: *GTPase activating protein*) illetve nukleotid-cserefaktorok (*GEF*: *guanine nucleotide exchange factor*), kinezinek illetve miozinok esetében pedig a sínként szolgáló mikrotubulus, illetve aktinszál elengedhetetlen kelléke a hatékony enzimműködésnek¹.

A teljes NTP-hidrolízis reakcióciklusban felszabaduló igen jelentős szabadenergiamennyiségnek az egyes enzimatikus 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 kapcsoltság 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. A fenti mechanizmusok látványos példájaként említhető, hogy sín illetve templát kötőpartner

¹ A biológiai aktivitásokhoz természetesen a sínek molekuláris dinamikája is lényegesen hozzájárul. Ez a hatás azonban mind a sejtváz- (aktin, tubulin), mind a nukleinsav-sínek esetén még mindig a kevésbé felderített területek közé tartozik – annak ellenére, hogy számos magyar kutató (többek között a Pécsi Egyetem több csoportja, illetve az ELTE-s Hegyi György professzor) jelentős hozzájárulásokat tett a területen. A kérdéskört a dolgozatban nem tárgyalom, mivel nem tartozik az ismertetett munkák látókörébe.

távollétében a legtöbb motorfehérje csak igen alacsony (ún. bazális) NTPáz aktivitással rendelkezik, és ezen aktivitásnak a partner általi aktivációja kulcsfontosságú a hatékony működésben és az energiapazarló "felesleges" hidrolízis-ciklusok elkerülésében (26). Az aktiváció mértéke és az aktivált enzimatikus részlépés kiléte igen széles változatosságot mutat az egyes enzimcsaládok között és gyakran családokon belül is. A fenti allosztérikus hatás gyakran a hidrolízislépés megtörténte után bekövetkező nukleotidcserét (pl. egy NDP-termék disszociációját és egy új NTP-szubsztrátmolekula kötését) érinti. Egyre több megerősítést nyer az a szemlélet, amely szerint a nukleotidcsere a metabolikus, jelátviteli és erőgeneráló folyamatokat működtető enzimek széles skálájának univerzális, ám egyedileg finomhangolt szabályozója (54;57). E kép alapján az aktin például a miozin allosztérikus nukleotid-cserefaktorának (*GEF*-jének) tekinthető. A közeljövőben a területen zajló kutatás vezérfonalát alighanem e szabályozási mechanizmus szerkezeti és dinamikai részleteinek, elveinek felderítése fogja képezni, ami tovább gazdagítja majd az életfolyamatok fizikai-kémiai alapjairól alkotott képünket.

4.5 Az izom-biokémia és a miozinológia klasszikus mérföldkövei

Az izomműködés vizsgálata a biokémia és a molekuláris biológia születésétől kezdve e tudományok gyújtópontjában állt. Az izom ATPázával, az aktomiozinnal kapcsolatos alapvető felfedezések jelentős része magyar szellemi műhelyekben született.

A "spiritus animalis", azaz az élőlényeket mozgató erő mibenléte már évezredekkel ezelőtt is foglalkoztatta a gondolkodókat. Eraszisztratosz (alexandriai iskola, i. e. 3. sz.) már utal arra, hogy az erő az izmokban rejtőzik. A következő hosszú időszak során többek között Galenus, Leonardo da Vinci, Vesalius és Descartes műveiben találjuk meg az Eraszisztratosztól eredeztethető *pneuma*-elmélet különböző válfajainak kifejtését, amely szerint a pneumát az idegek szállítják az izmokba, ahol az duzzadást okozva fejti ki hatását (58). Az elmélet cáfolatát Swammerdam felfedezése adta, amely szerint az izom térfogata állandó marad az összehúzódás során. Az izom kémiai energiát mechanikai munkává alakító gépezetként való termodinamikai leírását végül von Helmholtz adta meg a 19. században.

Az izom fehérjekomponenseinek leírásában Kühne vizsgálatai (59) jelentették az első áttörést, a mai fogalmaink szerinti miozin azonosítása azonban Szent-Györgyi Albert szegedi kutatócsoportjához, az aktin izolálása pedig Straub F. Brúnó nevéhez fűződik (60;61). Az ATP-ről, amelyet Lohmann egy évtizeddel korábban fedezett fel (62), Engelhardt és Ljubimova mutatták ki, hogy az a miozin szubsztrátja és az izom "üzemanyaga" (63). Szent-Györgyi Albert csoportjához fűződik annak felfedezése is, hogy az ATP emellett az aktomiozin disszociációját idézi elő, amit a mechanokémiai ciklus modelljeinek megjelenéséig nehezen megmagyarázható jelenségként tartottak számon (60). Néhány évvel később Szent-Györgyi András és Bíró Endre fedezte fel, hogy az aktin jelentősen aktiválja a miozin ATPáz aktivitását (64).

A váz- és szívizom polarizált fénymikroszkópos struktúrájában szembeötlő harántcsíkolt szerkezet az ún. vékony, illetve vastag szálak (filamentumok) periodikus, részben átfedő elhelyezkedéséből adódik. A. F. Huxley és Niedergerke, valamint H. E. Huxley és Hanson egyidejűleg végzett munkái révén alakult ki a csúszó szál (*sliding filament*) elmélet, amely szerint a vastag szálakról lelógó "kereszthidak" ciklikusan lépnek kölcsönhatásba a vékony szálakkal, és az összehúzódás a két szál egymáshoz képest történő elcsúszásából adódik

(65;66). A vékony szálak fő alkotóeleme az aktin, míg a miozin-molekulák a vastag szálakat, illetve az azokból kiinduló kereszthidakat alkotják. A kereszthíd, amelyet később a miozin feji részével azonosítottak, tartalmazza az aktin és az ATP kötőhelyeit (67-69). A kilendülő kereszthíd (*swinging cross-bridge*) modell alapja a miozin fej aktinhoz képest elfoglalt orientációjának megváltozása a működési ciklus során (70;71).

Az aktomiozin ATPáz biokémiai ciklusát a mechanikai erőgeneráló ciklussal Lymn és Taylor építette össze átfogó kinetikai modellé az 1970-es évek elején (72-74). A "négyütemű" modellben a miozinfej (jelölése: *M*) ATP-kötése az aktinszálról (*A*) való leválással jár együtt (1. ábra, 1. lépés). Az ATP-hidrolízishez kapcsoltan a miozinfej "felhúzott" állapotba kerül (2. lépés), és így kötődik vissza az aktinszálhoz (3. lépés). Az erőkifejtő lépés (munkaütem, *powerstroke*, 4. lépés) során az aktinhoz kötött miozinfej a felhúzott állapotból a lecsapott konformációba tér vissza, ezzel elhúzva a vékony szálat a vastag szálhoz képest. Az erőkifejtő lépés a hidrolízis-termékek (foszfát (P_i) és ADP) aktin-aktivált felszabadulásához kapcsolt.



1. ábra: A Lymn-Taylor modell (75). A négylépéses modellben az erőgenerálás a miozinfejben az ATP-kötés, -hidrolízis és termék-felszabadulás során végbemenő szerkezeti változásoknak az aktin-kölcsönhatáshoz való kapcsoltsága révén jön létre. A lépések magyarázatát lásd a szövegben.

A miozin ATPáz ciklus fontos részleteiben tovább finomított kinetikai modelljét Bagshaw és Trentham közölte röviddel a Lymn-Taylor modell megjelenése után (76-78). A modell szerint az ATP-szubsztrát kötése kétlépéses, egy másodrendű ütközési lépésből (2. ábra, 1. lépés) és az azt követő elsőrendű izomerizációból (szerkezet-változásból) (2. lépés) álló folyamat. Ez utóbbi lépéshez kapcsolódik a vázizom-miozinban az ATP-vel történő kölcsönhatás során bekövetkező fluoreszcencia-emelkedés első fázisa (M*.ATP). A reverzibilis hidrolízis-lépést (3. lépés) további fluoreszcencia-emelkedés kíséri (M**.ADP.P_i). A miozin termékkomplexe ekkor visszatér az ATP-hidrolízist megelőző konformációba (4. lépés), majd a foszfát felszabadul (5. lépés). A 4. és 5. lépésből álló folyamat a ciklus sebesség-meghatározó része. Az ADP disszociációja az ATP-kötéshez hasonlóan két lépésben megy végbe (6-7. lépés).

$$M + ATP \xrightarrow{1} M.ATP \xrightarrow{2} M^{\bullet}.ATP \xrightarrow{3} M^{\bullet \bullet}.ADP.Pi$$

$$\downarrow 4$$

$$M + ADP \xrightarrow{7} MADP \xrightarrow{6} M^{\bullet}.ADP + Pi \xleftarrow{5} M^{\bullet}.ADP.Pi$$

2. ábra: A Bagshaw-Trentham kinetikai modell. A csillagok a miozinfej triptofánfluoreszcenciájának emelkedését jelzik. A lépések magyarázatát lásd a szövegben.

4.6 A miozin szerkezeti elemei

A miozin-molekula feji része az aktin- és ATP-kötőhelyeket tartalmazó motordoménből és annak erőkarjából áll, míg a farokrégió a szupramolekuláris egységek kialakításáért felelős. A funkcionális egységek közötti allosztérikus kommunikáció a motorműködés alapjelensége.

A konvencionális miozin (miozin 2) több alegységből álló fehérje, amely "fej" és "farok" részekre osztható (3a ábra). A fej a katalitikus aktivitású motordoménből, illetve az erőkarként működő nyaki régióból tevődik össze. A motordomén tartalmazza az aktin és az ATP kötőhelyeit, illetve az erőkar csuklópontját és kiinduló részét (3b ábra). Az erőkar a nehézlánc hosszú α-helikális szegmenséből és az ehhez kötődő könnyűláncokból áll. A farok szuperhelikális (*coiled-coil*) szerkezetet képezve nehézlánc-dimereket hoz létre. A konvencionális miozin fiziológiás ionerősségnél szálakat képez, ami megnehezíti az oldatbeli vizsgálatokat. Az ilyen vizsgálatokhoz ezért legtöbbször oldható proteolitikus illetve rekombináns fragmentumait használják. A miozin limitált proteolitikus emésztéssel nehéz (*HMM*: ez az oldatba vihető, kétfejű fragmentum a fejeket és a farok egy proximális darabját tartalmazza) és könnyű (*LMM*: a farok fennmaradó része) meromiozinokra hasítható (*67;79*). A HMM tovább hasítható az ún. szubfragmentum-1-re (miozinfej, S1) és -2-re (S2). Az S1 önmagában is aktin-aktivált ATPáz aktivitást és *in vitro* mozgatóképességet (motilitást) mutat (*80*).

Az aktomiozin rendszer központi eleme a miozin motordoménje, amelynek fent ismertetett funkcionális részei – az aktin illetve a nukleotid kötőhelye, valamint az erőkar kiindulópontja – közötti kommunikáció a motorműködés kulcsjelensége (43). A nukleotidkötőzseb szerkezeti elemei konzerváltak a miozinokat is magába foglaló P-hurok NTPázok nagy családjában. A nukleotid kötésében a P-hurok mellett a *switch* 1 és *switch* 2 hurkok vesznek részt (3b ábra). A *switch* 1 a nukleotid-zseb és az aktin-kötőhely, a *switch* 2 pedig a nukleotid-zseb és a *transducer*-relé-konverter elem (és ezen keresztül az erőkar) közötti kommunikációt biztosítja. A relé egy hosszú α -hélix, amely a konverter régión keresztül az erőkar mozgását irányítja (3b ábra). A *transducer*t hétszálú β -lemez alkotja, amely torziós rugóként járul hozzá a motordoménen belül zajló allosztérikus kommunikációhoz. Az aktinkötő régiót hosszú és mély árok osztja "felső" és "alsó" részre (3b ábra).



3. ábra: A miozin szerkezete (26). A: A miozin holoenzim alegység- és doménszerkezete. B: A motordomén legfontosabb szerkezeti elemei.

4.7 A miozin mechanokémiai ciklusa

Az ATP-hidrolízisből származó szabadenergia a miozinnak az aktin mentén történő egyirányú elmozdulását hajtja. Az elmozdulás a miozin erőkar-lecsapása révén jön létre.

A miozin az ATP-ben tárolt kémiai energiát – szerkezeti átalakulásokon keresztül – mechanikai energiává alakítva az aktinsínen történő egyirányú elmozduláshoz hasznosítja. Az energia-átalakítás megértéséhez elengedhetetlenül szükséges a ciklus során bekövetkező szerkezeti átalakulásokat a kinetikai-energetikai aspektusokkal integráló komplex modell megalkotása és finomítása.

A Lymn-Taylor modellben – a kilendülő kereszthíd elméletnek megfelelően – a miozinfej (kereszthíd) egésze elfordul az aktinszálhoz képest a felhúzási illetve lecsapási lépések során (1. ábra). A kereszthíd mozgását azonban csak nehezen lehetett kimutatni (*81;82*). Ennek oka sokáig tisztázatlan maradt. Később fény derült arra, hogy a miozinfejnek csak az erőkarja végez jelentős elmozdulást az aktinhoz képest. A kilendülő erőkar (*swinging lever arm*) elmélet szerint az aktin és a miozin közötti kölcsönhatási felületnek nem szükséges megváltoznia a munkaütem során. A miozinfejnek az 1990-es évek elején meghatározott atomi szerkezetei igazolták az erőkar-elméletet (3b ábra). A fej ADP-vel illetve ATP-(prehidrolitikus) analógokkal alkotott komplexeiben az erőkar lecsapott, míg ADP.P_i-(poszthidrolitikus) analógokkal alkotott komplexekben felhúzott állapotban mutatkozott meg (*83-86*). A lecsapott illetve felhúzott erőkarú állapotokat Málnási-Csizmadia András és

munkatársai kinetikai és spektroszkópiai vizsgálatokban a Bagshaw-Trentham modell (2. ábra) M* illetve M** állapotaival azonosították (87).

Az atomi szerkezetek azt is megmutatták, hogy kapcsoltság áll fenn a *switch* 2 hurok és az erőkar konformációja között: a hurok a felhúzott szerkezetben ún. zárt, míg a lecsapottban nyitott konformációt vett fel (*84*). A két szerkezeti elem közötti csatolást a relé-konverter elem biztosítja (3b ábra). Az ATP-hidrolízis katalíziséhez szükséges – a *switch* 2 és a kötött nukleotid γ-foszfátja közötti – kölcsönhatások csak a hurok zárt (vagyis az erőkar felhúzott) állapotában vannak jelen, ami kapcsolatot teremt az enzim katalitikus képessége és az erőkifejtés között. Doktori (Ph.D.) munkám során kimutattuk, hogy az ATP-kötést követő erőkar-felhúzás gyors és reverzibilis lépés, amelyet követően a felhúzott állapot a hidrolízislépés révén stabilizálódik (*28;29;31*).

Gyimesi Máté és Málnási-Csizmadia András vizsgálatai derítettek fényt arra, hogy az ATPhidrolízist követően a miozin-termék (M.ADP.P_i) komplexben bekövetkező erőkar-lecsapási lépés aktin távollétében az ATPáz ciklus sebesség-meghatározó lépése (*88*). Ha azonban a felhúzott állapotú termék-komplexnek lehetősége van visszakötni az aktinszálhoz, akkor a kötés után gyorsan megtörténik az erőkifejtéshez vezető erőkar-lecsapási lépés. Az aktinszál mentén történő elmozdulás döntő részben az erőkarlecsapásból származik, az erőkar hossza így meghatározza a miozin lépéshosszát (*89*). Újabb eredmények szerint az aktinkötött állapotban lezajló erőkifejtés nem a felhúzás ellentéteként fogható fel, hanem más szerkezeti útvonalon zajlik: a *switch* 2 hurok mindvégig zárva marad az erőkar lecsapása során (*43*). A lecsapáshoz kapcsoltan a hidrolízis-termékek eltávoznak a miozinról; a termékfelszabadulás szerkezeti útvonala és a pontos csatolási mechanizmus azonban még erősen vitatott.

Szintén a megoldatlan kulcsproblémák között szerepel az erősen kötött aktomiozin komplex szerkezete. A komplexet eddig senkinek sem sikerült kristályosítani, ezért a legpontosabb (1,4 nm felbontású) rendelkezésre álló szerkezet az aktin és a miozinfej röntgenkrisztallográfiás szerkezetének a nukleotidmentes (*rigor*) aktomiozin komplex krioelektronmikroszkópos képéhez történő dokkolásával állították elő (*90*). A dokkolás eredménye azt sugallta, hogy a miozinfej aktinkötő árkának az erős aktinkötés létrejöttekor be kell záródnia. A jelenlegi elképzelés szerint az aktinkötés során először a miozinfej "alsó" aktinkötő régiója (3b ábra) kezdeményez ún. gyenge kölcsönhatást az aktinnal, majd az árokzáródást követően a felső aktinkötő régió közreműködésével jön létre az erős aktomiozin kölcsönhatás (*91*). A kölcsönhatás létrejöttekor a motordomén belsejében elhelyezkedő *transducer* β -lemez torziós szöge megváltozik, aminek alapján feltételezik, hogy ez a régió erőátvivő rugóként működik az erőgenerálási folyamat során.

A 4. ábra mutatja be a mechanokémiai ciklus legfontosabb szerkezeti állapotait, azok leggyakrabban használt angol neveinek feltüntetésével².

² A kissé erőltetettnek tűnő elnevezések a kristályszerkezetek és a dinamikus folyamatok közötti megfeleltetés erőfeszítéseit tükrözik.

Az 1., 4. és 6. ábrákon az aktomiozin működési ciklus három különböző módon került ábrázolásra. Reményeim szerint ez nem okoz értelmezési nehézségeket az olvasó számára: a különböző szerkezeti illetve kinetikai aspektusokat jobbnak láttam külön ábrákon hangsúlyozva feltüntetni.



4. ábra: Az aktomiozin működési ciklusa a legfontosabb – azonosított vagy feltételezett – konformációs állapotok (narancs) feltüntetésével. Az aktinról levált post-rigor és prepowerstroke állapotok atomi szerkezete ismert, míg az erőkifejtés kezdőállapotát képviselő start-of-powerstroke állapot ábrázolt szerkezeti tulajdonságai (zárt árok, felhúzott erőkar) feltételezettek (vö. 6.2.2 fejezet), a végállapotot jelentő rigor-szerkezet pedig csak alacsony felbontásban ismert.

4.8 A miozinok szerkezeti és funkcionális sokfélesége

A miozin szupercsalád képviselőinek sokrétű sejtbeli és élettani aktivitásait e motorenzimek nagyfokú szerkezeti és kinetikai változatossága teszi lehetővé.

A fenti ismeretek elsősorban a gerinces vázizom miozint is magába foglaló konvencionális miozinok (miozin 2 osztály) vizsgálatának eredményeként keletkeztek. Több évtizede ismert azonban, hogy a miozinok minden eukarióta sejtben jelen vannak: e motorok teszik lehetővé számos sejtalkotó, sejt, szerv és szervezet mozgását. A miozinok kulcsenzimei 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 (*37*). A miozin szupercsalád – rendkívüli formagazdagságának és univerzális előfordulásának köszönhetően – mára az eukarióta életfa filogenetikai kutatásának egyik legfontosabb objektumává nőtte ki magát (*92;93*).

Valamennyi miozin tartalmaz motordomént, amely általában a fehérjék N-terminális részét képezi (5. ábra). A motordoménből kiinduló erőkart a kalmodulin családba tartozó könnyűláncok stabilizálják. Újabb eredmények – köztük Nyitray László csoportjának adatai – szerint magányos egyszálú α-hélix motívumok is betölthetik az erőkar funkcióját (*94;95*). Az erőkar hossza nagy változatosságot mutat a különböző miozin osztályok között (5. ábra). A C-terminális farokrégió egyes osztályokban a nehézláncok dimerizációjáért illetve szálképzéséért felelős *coiled-coil* szakaszokat, illetve egyéb effektor (pl. szállítmány- vagy membránkötő) doméneket tartalmazhat (*37*).



5. ábra: A miozin szupercsalád törzsfája az egyes családokra jellemző domén- és alegységszerkezet sematikus ábrázolásával (96). A bemutatott áttekintő ábrán 17 osztály szerepel; ma már több mint 35 osztályt különböztetnek meg (93). Az ábrán az egyes osztályokat római számokkal jelölték, azonban újabban elterjedt az arab számos jelölés, amelyet a dolgozatban is alkalmaztam.

A szerkezeti változatosság mellett a sokféle sejtbeli és élettani funkció ellátásához a miozin enzimciklus egyedi kinetikai adaptációi is létfontosságúak. Valamennyi ismert miozin működése a fent leírt Lymn-Taylor-féle kinetikai alapmechanizmust követi; az egyes részlépések kinetikájában és energetikájában azonban az egyedi funkcióknak megfelelő, gyakran drasztikus különbségek tapasztalhatók (48).

A teljes ATPáz ciklusidő mellett a legfontosabb funkcionális paraméterek egyike a terhelési arány (*duty ratio*), amely kifejezi, hogy a *steady-state* működés során egy miozinfej a ciklusidő mekkora hányadát tölti erősen aktinkötött állapotban. Másfelől nézve a terhelési arány azt mutatja meg, hogy egy adott időpillanatban a miozinfej-populáció mekkora hányada kötődik erősen az aktinhoz. A miozinfej ATPáz ciklusa során erős illetve gyenge aktinkötő állapotok váltják egymást. A fejben működő allosztérikus csatolásoknak köszönhetően az aktinkötő sajátságot az aktívhely nukleotid-állapota határozza meg: a fej nukleotidmentes illetve ADP-kötött állapotban erős aktinkötésre, míg ATP- illetve ADP.P_i-kötött állapotban gyenge aktinkötésre képes (6. ábra). A terhelési arányt ennélfogva az egyes részlépések kinetikája határozza meg. Például, ha a 6. ábrán bemutatott ciklusban a foszfát-felszabadulás ((A)M.ADP.Pi -> AM.ADP átmenet) a sebesség-meghatározó, akkor *steady-state*-ben a miozinfejek többsége a gyenge aktinkötő vagy aktinról levált (piros) állapotokat foglalja el, ami alacsony terhelési arányt eredményez; míg ha az ADP-felszabaduás (Zöld) AM.ADP állapotban időzik, magas terhelési arányt eredményezve. A

terhelési arány a legtöbb esetben nem mérhető közvetlenül, viszont az adott miozin izoforma részletes kinetikai sajátságainak ismeretében modellezéssel meghatározható.



6. ábra: Erős (zöld) és gyenge (piros) aktinkötő állapotok váltakozása az aktomiozin működési ciklus során ((97) alapján)

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 processzivitás pontosabb kvantitatív értelmezéséről a 6.3.2 fejezetben részletesen lesz szó.) Megkülönböztethetünk "processzív" illetve "nem-processzív" miozinokat aszerint, hogy "egyedi molekulaként" (ez az elterjedt kifejezés valójában több alegységes holoenzimkomplexet takar) képesek-e többlépéses futás elvégzésére. Valójában a maga funkcionális komplexében – ami az egyes esetekben szélsőségesen különböző számú motoregységet (fejet) tartalmazhat – minden miozinnak processzív miozinok esetében lehet kétfejű "egyedi molekula" (holoenzim komplex), nem-processzív miozinok esetében magasabbrendű szupramolekuláris szerveződés (szál, membránkötött motorcsoport).

A funkcionális komplex felépítésében részt vevő motoregységek száma meghatározza az adott motor számára megfelelő terhelési arányt is. A legfontosabb szempont egyrészről 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); másrészről annak elkerülése, hogy az egyes fejek akadályozzák egymás működését (ami túl magas terhelési aránynál következhet be). Kétfejű egyedi molekulaként mozgó miozinok (pl. a miozin 5a vezikulum-transzporter) esetén így magas (50 % feletti), míg a gerinces vázizom több száz miozinfejet tartalmazó vastag szálaiban működő miozin 2 izoforma esetén alacsony (1 % körüli) terhelési arány a legmegfelelőbb.

4.9 A nukleinsavak szerkezet-átalakító motorjai

A sejtváz-motorokhoz hasonlóan a nukleinsavakon haladó motorenzimek is a nukleotid-hidrolízis során felszabaduló szabadenergiát hasznosítják az egyirányú tovahaladáshoz. A DNS-helikázok a haladást a kétszálú DNS szálainak szétválasztásához kapcsolják.

Az NTP-hidrolízis reakciót hasznosító motorok nemcsak a citoplazmában, hanem a sejtmagban is nagy változatossággal fordulnak elő. Az ún. "nukleinsav-motorok" (valójában a nukleinsavak mentén mozgó motorfehérjék) egyik legnagyobb csoportját a DNS- és RNShelikázok alkotják. E fehérjék aktivitásának alapja az egyszálú nukleinsav-lánc mentén történő egyirányú transzlokáció (7. ábra) (44). Ez az aktivitás szolgál alapul a nukleinsavszálhoz kapcsolódó molekulák (pl. fehérjék, vagy szálszétválasztó aktivitás esetén a komplementer nukleinsav-szál) eltávolításához. A szálszétválasztó aktivitás módozatainak két elvi végletét az ún. aktív és passzív mechanizmusok képviselik (44). Az aktív helikáz a haladási iránya szerint előtte elhelyezkedő kétszálú DNS-szakaszt – elektrosztatikusan vagy más módon – destabilizálja, így a szétválasztás sebessége elvben megközelítheti az egyszálú DNS-en történő akadálytalan transzlokációét. Passzív mechanizmus esetén a helikáz "megvárja" az egyszálú és kétszálú DNS-szakaszok találkozásánál lévő bázispár hőmozgás általi szétválását, majd előrelépéssel megakadályozza annak újraképződését. Passzív mechanizmus esetén ezért a szálszétválasztás sebessége várhatóan jóval alacsonyabb lesz, mint az akadálytalan transzlokációé. Fontos megjegyezni, hogy - mivel mindkét aktivitás egyirányú tovahaladáson alapul – passzív mechanizmus esetén is szükség van energiaforrásra (ATP-hidrolízisre) az enzim működéséhez.



7. ábra: DNS-helikáz működés közben

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 az RNS-molekulák másodlagos szerkezetének átrendezését, illetve DNS- és RNS-kötő fehérjék eltávolítását végzik. Ezekben a – sokszor igen összetett – 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.

4.10 A DNS-helikázok központi szerepe a hibajavításban

A rendkívül veszélyes DNS-károsodásnak számító kettős száltörést a sejtbeli fehérjegépezet leggyakrabban homológ rekombinációs mechanizmussal javítja. A folyamat egyik kulcsenzime a Bloom-szindróma (BLM-) helikáz.

Az élő szervezetek fennmaradásának és szaporodásának nélkülözhetetlen feltétele a DNSben kódolt genetikai információ hűséges másolása és utódokba történő átörökítése. Habár a földi élet evolúciójának alapja éppen a DNS-ben kódolt információ változása, a genetikai anyag sérülése és pontatlan másolása rákos folyamatok kialakulásához, illetve a sejtek öregedéséhez és halálához is vezethet. Egyetlen sejtben átlagosan több százezer genetikai sérülés keletkezik egyetlen nap leforgása alatt (*98*). Ezért a DNS-ben folyamatosan keletkező nagyszámú hiba javítására már a törzsfejlődés hajnalán összetett enzimrendszerek alakultak ki, amelyek az evolúció során specializálódtak.

A kettős száltörés (double-strand break, DSB) a DNS-károsodás igen veszélyes formája, amely információ-vesztéshez és súlyos genetikai rendellenességekhez vezethet. DSB létrejöhet DNS-károsító vegyszerek és sugárzások hatására; ám bekövetkezik a normális sejtciklus során is, ha a replikációs fehérjegépezet a DNS-templátszálon a hibajavító enzimek által otthagyott folytonosság-hiányokkal vagy léziókkal találkozik (99). A DSB-k hibamentes kijavításához a sejtek homológ rekombináción (*HR*) alapuló hibajavító mechanizmusokat használnak, amelyek során az ép testvérkromatidon meglévő információt használják fel a károsodott DNS-szál kijavításához (100). A HR ezért alapvető fontosságú a genom épségének fenntartásában. A folyamat azonban kétélű kard szerepét játssza a sejt életében: a túlzott gyakoriságú rekombináció káros ("illegitim"), nem-homológ kromoszóma-régiók közötti kicserélődéssel is járhat. A HR-alapú mechanizmusok ezért szigorú szabályozás alatt állnak a sejtben (100).

A RecQ családba tartozó DNS-helikázok (*RecQ-family helicases, RFH*) a HR hibajavító gépezet központi elemei (*100*). Az *E. coli* baktériumban egyetlen RFH-izoforma található (RecQ), amelynek fő funkciója a káros rekombináció gátlása (*101*). A RecQ további szerepei között szerepel az ún. SOS-válasz beindítása, a timinmentes sejthalál, az elakadt replikációs villák újraindítása és a G-kvadruplex szerkezetű DNS-szakaszok széttekerése (*102-104*). Az emberben öt RFH-izoforma található (RECQL1, BLM, WRN, RECQL4, RECQL5), amelyek közül háromnak a mutációi súlyos klinikai tünetegyütteseket idéznek elő (*105*). A BLM-helikáz mutációi a Bloom-szindrómát okozzák, amelyet bőr-rendellenességek, immunhiány és erős rákhajlam (prediszpozíció) jellemez (*106*). A WRN és RECQL4 fehérjékben bekövetkező mutációk a Werner- illetve Rothmund-Thomson szindrómákat okozzák. E betegségek mindegyikében magas rák-prediszpozíció és felgyorsult öregedés tapasztalható, ami jelzi az RFH-k központi szerepét a genom épségének fenntartásában (*40*).

A DSB javítása az 5'-végek visszavágásával kezdődik (8. ábra) (99;100). Ezt az ún. D-hurok (displacement loop) képződése követi. A D-hurok úgy keletkezik, hogy a károsult kromatid egyik szála "betámad" a testvérkromatid komplementer DNS-szakaszába. A D-hurok létrejötte lehetővé teszi a támadó 3'-végű szál DNS-szintézis révén történő meghosszabbítását. Ha a D-hurok "kihurkolódó" DNS-száláról is történik DNS-szintézis, kettős Holliday szerkezet (double Holliday junction, DHJ) jön létre (8. ábra). A DHJ RuvABC

enzimkomplex általi felbontása (*resolution*) átkereszteződött (*crossover*) termékeket eredményezhet (2B útvonal). Ezzel ellentétben a BLM-helikáz más fehérjékkel (humán topoizomeráz IIIα (hTOPOIIIα), hRMI1, hRMI2) együtt a DHJ-t szálvándorlás révén feloldhatja (*dissolution*), és így nem-kereszteződött termékek jöhetnek létre (2A útvonal) (*99;107*). A BLM-helikáz a szintézisfüggő szálillesztés (*synthesis-dependent strand annealing, SDSA*) folyamatában is fontos szerepet játszik. Az SDSA (1. útvonal a 3. ábrán) nem-kereszteződött termékekhez vezet (*99;108*). A folyamat során a D-hurok a támadó DNS-szál meghosszabbítása után szétbomlik. A BLM-helikáz vélhetőleg szerepet játszik a D-hurok vándorlásában és a rekombináz-nukleoprotein filamentumok szétbontásában. E lépéseket az újonnan szintetizált szálnak a DSB másik végéhez történő visszaillesztése követi, amelyet szintén a BLM-helikáz katalizál (8. ábra).



8. ábra: A homológ rekombináción alapuló DNS-hibajavítás útvonalai (a lépések magyarázatát lásd a szövegben). A piros nyilak a BLM-helikáz közreműködését jelzik.

Az 1. és 2A útvonalak nem-kereszteződött termékeket eredményeznek. Ez azért fontos, mert az átkereszteződés kiküszöbölésével a rákos folyamatokat beindító testvérkromatidkicserélődés elkerülhető. A BLM-helikáz kulcsfontosságú mind a DHJ-feloldás, mind az SDSA folyamataiban; az ezekben játszott pontos szerepe azonban még tisztázásra vár. A 8. ábráról kitűnik, hogy a BLM mind pro-, mind anti-rekombinációs funkciókkal rendelkezik (*109*). Az enzim rekombinációt gátló szerepe abban nyilvánul meg, hogy a HR mozgatórugójaként működő Rad51 nukleoprotein-filamentum képződését gátolja, illetve elősegíti annak szétesését. Másrészről viszont a HR normális lefutását a BLM a DNS-polimeráz haladását biztosító szálszétválasztás, illetve az SDSA folyamatban a D-hurok feloldása és a javított szál párosítása révén segítheti elő.

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

4.11 Közös elvek az aktomiozin és helikáz motorok működésében

A DNS-helikázok a miozinokéhoz hasonló mechanokémiai ciklust és energia-átalakítási elveket alkalmaznak, az előrehaladást azonban más elrendezésben történő doménmozgások révén valósítják meg.

Mivel az ismertetett munkákban az aktomiozin és az RFH DNS-helikáz motorokat vizsgáltuk, ehelyütt fontosnak érzem összefoglalni a két rendszer működésében fellelhető közös elveket.

Mind a miozinok, mind a helikázok lineáris motorok, amelyek az ATP hidrolíziséből származó szabadenergiát hasznosítják a sínjük (aktin filamentumok illetve DNS) mentén történő egyirányú továbbhaladáshoz. A nukleotid-állapotoknak (*apo* (nukleotidmentes), ATP, ADP.P_i és ADP) a sínkötés erősségéhez való kapcsoltsága valamennyi eddig vizsgált motorenzim esetében általános működési elvnek bizonyult. Ez a kapcsoltsági mechanizmus még más enzimek, pl. G-fehérje-partnerkomplexek esetén is megfigyelhető (*55*). A motor konformáció-változása közvetlen kapcsoltságban állhat a sín mentén történő aktív, irányított elmozdulással (pl. erőkart alkalmazó mechanizmusok esetén), illetve iránypreferenciát tehet lehetővé a következő kötőhely diffúzió segítségével történő megkeresése közben ("Brownracsni" mechanizmusok esetén) (*43;44*).

A fenti kapcsoltságot a motor egyes szerkezeti elemei (például az aktívhelyet alkotó, evolúciósan konzervált hurokstruktúrák) a nukleotid- és sínkötő helyek, illetve az erőkar közötti kommunikáció révén teszik lehetővé. Ezek között szerepel a P-hurok (Walker-A motívum) illetve az ún. *switch*-hurkok – amelyek létezését helikázokban még nem azonosították, ám hipotézisem szerint az RFH-k aktívhelyének egyik eleme, amely szekvenciális és térszerkezeti hasonlóságot mutat a miozinok *switch* 1-ével, hasonló kommunikációs szerepet tölthet be.

A sejtváz-motor és helikáz mechanizmusok másik közös sajátsága, hogy a motor aktívhelye és sínkötő felszíne közötti kommunikáció az enzimatikus (ATPáz) aktivitás aktivációjához vezet, például a miozin aktin-aktivált, illetve a helikázok DNS-aktivált ATPáz aktivitása esetében. Ez az aktiváció teszi lehetővé kinetikailag a hatékony erőgenerálást, illetve sín távollétében a motor energia-fogyasztásának minimalizálását (*39;43*).

A sejtváz- és DNS-motor enzimmechanizmusok újabb közös eleme a processzivitás. A processzivitás foka (azaz a sínhez való kötődést követően a lépések várható száma) szélesen változó mind a miozinok, mind a helikázok körében. A nagy egységekben (pl. a vázizom vastag szálaiban) működő miozinok alacsony processzivitása párhuzamba állítható a helikázok körében egyes szerkezet-átalakító kapcsolók (pl. DEAD-box RNS-helikázok) hasonlóan alacsony processzivitásával, míg a DNS-replikációban működő helikázok (pl. a RecBCD komplex) – a kétfejű egyedi molekulaként működő miozin 5a-hoz hasonlóan – nagyfokú processzivitást mutatnak (*48;110;111*). A nagyfokú processzivitást lehetővé tevő eddig leírt mechanizmusok közül a kétfejű miozin 5a gyaloglás-szerű (*hand-over-hand*) lépési mechanizmusával (*112*) analóg alternáló (*rolling*) működési modellt javasoltak a Rep dimer helikáz esetében (*39*), de ez a modell később nem volt igazolható. Hasonlóképpen, a PcrA helikáz araszolva lépegető (*inchworm*) mechanizmusának (*9*. ábra) nincs eddig leírt megfelelője a sejtváz-motorok körében, ahol az ilyen feltevések tévesnek bizonyultak (*112;113*).



9. ábra: DNS-helikáz (PcrA) araszoló mechanizmusa. ATP-mentes állapotban az enzimnek a DNS 3'-vége felé eső része (narancssárga) erősen, míg a másik (kék) rész gyengén köti a DNS-t. ATP kötésekor a két rész kötéserőssége felcserélődik, és a narancssárga rész elmozdul. Az ATP hidrolízise után, a termékek (ADP és P_i) felszabadulásakor a DNS-kötés erőssége ismét megváltozik; ekkor a kék enzimrész tesz egy lépést a DNS-en ((114) alapján).

Az irányultság (amely a sejtváz-sínek (aktin, mikrotubulusok) plusz és mínusz végeihez, illetve a DNS 5'- és 3'-végeihez viszonyítva értelmezhető) szintén fontos jellemzője a motormechanizmusoknak. Az egyes motor-izoformák általában szigorúan az egyik irányba mozognak, ugyanakkor mindkét irányultság képviselteti magát mind a miozinok, mind a DNShelikáz szupercsaládok körében (*38;48*).

Összegzésül megállapíthatjuk, hogy – jóllehet a mechanizmusok megértése a DNSmotorok esetében még jóval korábbi stádiumban tart, mint a sejtváz-motorok esetében – az energia-átalakítás elvei nagyfokú hasonlóságot mutatnak a két motortípusban, míg a processzív haladás megvalósulási módja különböző. A sejtváz-motorok kutatásában felhalmozott elméleti és gyakorlati tudás igen eredményesen hasznosítható a helikáz mechanizmusok vizsgálatában.

5. Módszertan

5.1 A motorkutatás úttörő szerepe a modern enzimológiai és molekuláris biofizikai technikák fejlődésében

A fehérjék és más biológiai makromolekulák működési elveinek felderítését lehetővé tevő számos biokémiai és molekuláris biofizikai technika a molekuláris motorok kutatásában jött létre vagy ott jelentős fejlődésen ment keresztül. Ilyen módszertani előrelépés például számos fluoreszcens próba (fluoreszcens nukleotid-szubsztrátok (115;116), foszfátszenzorok (117), helyspecifikus *intrinsic* és *extrinsic* próbák (30;118)) kifejlesztése, hidrolizálható és nem-hidrolizálható szubsztrátanalógok használata (amelyek különböző enzimatikus köztiállapotokat utánoznak (42)), kapcsolt reakciók enzimaktivitások mérésére (119), tranziens kinetikai módszerek (gyorskeveréses (*stopped-flow* és *quenched-flow*) illetve relaxációs (hőmérsékletugrás (*temperature-jump*), nyomásugrás (*pressure-jump*)) technikák) (120;121), illetve a különböző mikroszkóp-alapú motilitási tesztek, amelyek révén egyedi molekulák vagy molekula-halmazok motilitása és erőgenerálása mérhető (fluoreszcencia-alapú tesztek (TIRF (*total internal reflection fluorescence*), FIONA (*fluorescence imaging with*

one nanometer accuracy)) (122;123), erőmérések (lézercsapda, mágnescsapda, atomerőmikroszkópia) (124;125)). E fejlesztések előrehaladott állapota lehetővé teszi számos más enzim, illetve eddig nem vizsgált motorok kutatását is.

5.2 A jelölt hozzájárulása a módszertani fejlesztésekhez

Az elmúlt másfél évtized során számos különböző motorrendszert vizsgáltam és a fenti technikák legnagyobb részében gyakorlati jártasságot szereztem. A terület módszertani fejlesztéséhez az alábbiakkal járultam hozzá:

1. Fehérjék konformáció-változásainak detektálására alkalmas egyedi-triptofán és *extrinsic* fluoreszcens próbák tervezése és alkalmazása (*2;4;13;18;19;28-31*);

2. Olyan technikák fejlesztése, amelyek segítségével a mechanikai terhelésnek az egyes enzimatikus lépések kinetikájára gyakorolt hatása oldatbeli körülmények között vizsgálható (5;17);

3. Részt vettem egy új tranziens kinetikai mérőapparátus (*temperature-jump/stopped-flow*) kifejlesztésében, amely számos új jelenség vizsgálatát teszi lehetővé (*14*);

4. Kutatócsoportommal a közelmúltban kidolgoztunk egy, a nukleinsavak mentén mozgó motorfehérjék legfontosabb funkcionális paramétereinek meghatározására általánosan alkalmazható, viszonylag könnyen és gyorsan kivitelezhető analitikai eljárást (22), amelyet részletesen a 6.3.2 fejezetben ismertetek.

5.3 Géntechnológia, fehérjék előállítása

A kísérleteinkben vizsgált fehérjék többségét rekombináns úton állítottuk elő. A miozin motordoménje funkcionális formában csak eukarióta expressziós rendszerben termeltethető (a gerinces váz- és szívizom miozinok expressziója sajnos még ilyen rendszerekben sem megoldott) (*37*). A *Dictyostelium discoideum* amőboid nyálkagomba miozinja – rekombináns *Dictyostelium* sejtvonalakban történő könnyű előállíthatósága és a viszonylag könnyű genetikai manipuláció miatt – központi szerepet játszott a miozin mechanizmusának felderítésében (*126*), és számos munkában mi is e miozin rekombináns motordoménjét és annak mutánsait használtuk. Más miozinok (gerinces és *Drosophila* miozin izoformák) előállítására az Sf9 rovarsejt-bakulovírus expressziós rendszert alkalmaztuk. Az affinitás-címkéket tartalmazó rekombináns miozinokat *Dictyostelium* miozin esetében His-címke/Ni-NTA affinitás- (*127*), egyéb miozinok esetében FLAG-címke/antiFLAG ellenanyag affinitás-kromatográfia segítségével tisztítottuk (10. ábra) (*1*).



10. ábra: FLAG-címkés humán nem-izom miozin 2B konstrukció tisztítása. Balra: a FLAG affinitás-oszlopon előzőleg tisztított minta MonoQ anioncserélő kromatográfiás profilja. Jobbra: A bal oldali ábrán számmal jelölt frakciók SDS-gélelektroforetikus képe. Az 5. frakció tartalmazza a miozin konstrukciót tiszta formában (nehézlánc fragmentum: 97 kDa, könnyűláncok: 20 és 17 kDa. Bal oldali sáv: molekulasúly marker kDa értékekkel).

Aktint, illetve vázizom-miozint, valamint az utóbbi proteolitikus fragmentumait klasszikus fehérjetisztítási eljárásokkal állítottuk elő nyúl vázizomból (*68;79;128*).

A BLM-helikáznak a kísérleteinkben használt katalitikus modulját *E. coli* bakteriális expressziós rendszerekben állítottuk elő (*129;130*).

5.4 Fehérjék helyspecifikus jelölése

A tervezett helyeken egyedi ciszteint tartalmazó rekombináns fehérjéket (2), illetve a természetes állapotban szelektíven jelölhető ciszteint tartalmazó nem-rekombináns fehérjéket – ilyen pl. az aktin Cys374 oldallánca (118) – SH-specifikus reaktív csoporthoz konjugált fluorofórokkal (pl. pirén-jódacetamiddal) jelöltük, és a jelölt termékeket klasszikus fehérjekémiai technikákkal tisztítottuk és analizáltuk.

5.5 Alkalmazott fluoreszcens jelek

A fehérjékben található triptofán-oldalláncok kiváló természetes fluoreszcens jelzőcsoportként érzékelik az enzimek szerkezet-változásait (131). Több esetben egytriptofános mutáns fehérjéket állítottunk elő, a triptofánokat a fehérje különböző kulcsrégióiba helyezve (4;18;19): e fehérjékben a fluoreszcens jel egyértelmű helybeli hozzárendelése jelentős többletinformációt hordozott (28). A triptofán- (és az *extrinsic* jelöléshez használt cisztein-) mutáns konstrukciók használatánál fontos szempont, hogy az elkészült variánsok közül csak azokat alkalmaztuk vizsgálatainkban, amelyek a vad típusú fehérjével megegyező enzimaktivitást mutattak. Gondos tervezéssel szerencsére elérhető volt, hogy a mutánsok többsége ilyennek bizonyuljon.

A pirén fluorofórral jelölt aktin kiválóan alkalmas az aktomiozin kölcsönhatás vizsgálatára (118), illetve miozint is jelöltünk pirénnel ugyanezen kötés analíziséhez (2). A pirénnel kettősen jelölt miozinban az ún. excimerek (speciális spektrális sajátságokkal rendelkező, gerjesztett állapot dimerek) fluoreszcenciája értékes többletinformációt szolgáltat (131).

Különböző fluorofórokkal jelölt nukleotidokat (metil-antraniloil- (mant), illetve kumarin-(deac) jelölt ATP-t és ADP-t, illetve ezek dezoxi-variánsait) alkalmaztunk a miozin és helikáz enzimek nukleotid-kölcsönhatásának vizsgálatára (*115;116*).

A foszfátnak az enzimekről történő felszabadulását kumarin-származékkal fluoreszcensen jelölt bakteriális, nagy affinitású foszfátkötő fehérje (MDCC-PBP) segítségével követtük (117).

5.6 Fluoreszcencia-spektroszkópia

A fluoreszcens jelet tartalmazó fehérjék illetve ligandumok *steady-state* (gerjesztési és emissziós) fluoreszcencia-spektrumainak, -intenzitásának és -kvantumhatásfokának a különböző enzimatikus állapotok közötti változásai szerkezeti és dinamikai információt szolgáltatnak (131). A jelváltozások kiválóan alkalmasak az enzimreakciók részlépéseinek tranziens kinetikai módszerekkel történő követésére is (lásd alább) (120;121).

Időfelbontott fluoreszcencia-mérésekkel meghatároztuk az alkalmazott fluorofórok életidejét, ami a molekulák szerkezeti dinamikájáról fontos többletinformációt hordozott (131). A szenzorok fluoreszcencia-jelének analízise révén információt nyertünk az enzimmolekula dinamikájáról, az egyedi oldalláncok rotációjától (10^{-9} - 10^{-8} s időskála) a fluorofór környezetében történő kisebb átrendeződéseken (10^{-7} - 10^{-5} s) keresztül a fehérje globális konformációs átmeneteiig (10^{-4} - 10^2 s) terjedő széles időtartományban. A *steady-state* és időfelbontott fluoreszcencia-anizotrópia-mérésekkel további dinamikus információhoz jutottunk.

A fluorofórok oldószer-kitettségét akrilamiddal és más kioltószerekkel végzett fluoreszcencia-kioltási kísérletekkel vizsgáltuk (131).

5.7 Steady-state enzimkinetika

A miozin, az aktomiozin és a DNS-helikázok ATPáz aktivitását piruvát kináz-laktát dehidrogenáz (PK/LDH) kapcsolt reakción alapuló méréssel határoztuk meg (119). ATPáz aktivitás alatt a dolgozatban mindenütt az élettanilag releváns MgATPáz aktivitást értem.

5.8 Gyorskeveréses tranziens kinetikai technikák (stopped-flow, quenched-flow)

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 enzimmechanizmusról 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 stoppedflow berendezés képes a reagensek (pl. egy enzim és egy szubsztrát) kb. 1 ms idő alatti összekeverésére (11. ábra). A stopped-flow kísérlet során a reagensek a tárolófecskendőkből 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 megszakítását okozza. Egy adott reakciót egy kísérletsorozatban különböző időtartamokig lejátszatva – a komponensek (pl. szubsztrát, termék) utólagos kémiai analízisével – a reakció időbeli lefutása követhető.



11. ábra: Stopped-flow mérőműszer felépítése. A reagensek a lökést követően a keverőkamrán keresztül a mintakamrába (optikai cellába) jutnak, ahol az áramlás megállása után a reakció lefutása követhető.

5.9 Relaxációs tranziens kinetikai kísérletek (hőmérsékletugrás, nyomásugrás)

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 (μs időskálán történő) megváltoztatását követően detektáltuk a reakcióelegy összetételének időbeli változását (pl. optikai jelek használatával) a sebességi állandók meghatározása céljából (12. ábra). A relaxációs kísérletek előnye egyrészt, hogy ezekben igen gyors folyamatok (10⁻⁵ s) is követhetők, másrészt összetett reakciók esetén az egyes lépések szelektív perturbációja révén gyorskeveréses technikákkal nem detektálható folyamatok is "láthatóvá" válhatnak.



12. ábra: A relaxációs kísérletek általános sémája. A külső fizikai paraméter gyors megváltozását a komponensek koncentrációjának a sebességi állandók által meghatározott lefutású megváltozása követi.

A már rendelkezésre álló relaxációs technikák alkalmazása mellett segédkeztem egy új tranziens kinetikai mérőműszer kidolgozásában. E műszer a *stopped-flow* és *temperature-jump* kísérletek lehetőségeit kombinálja (14). A műszerben a reaktánsok gyors összekeverésével egyidejűleg nagy (akár 60°C-os) hőmérséklet-ugrás is előidézhető. A műszer kísérletesen eddig nem vizsgálható folyamatok analízisét is lehetővé teszi. Ilyen új lehetőség például, hogy az enzimreakciók a denaturációs hőmérséklet felett is vizsgálhatók (az enzimek többsége a hőmérsékletugrást követően képes reagálni a szubsztráttal, mielőtt a hő-denaturáció elkezdődne), illetve a műszer az *in vitro* instabil enzimek élettanilag releváns hőmérsékleten történő vizsgálatára, valamint a fehérjék hő-denaturációjának gyorskinetikai követésére is kiváló lehetőséget nyújt.

5.10 Motilitási tesztek, egyedimolekula-fluoreszcencia mérések

Az in vitro motilitási tesztek segítségével közvetlenül vizsgálhatók a motorenzimek által végrehajtott mozgatás paraméterei (sebesség, irányultság stb.). A klasszikus tesztben fluoreszcensen jelölt aktinszálaknak a mikroszkóp-tárgylemezen létrehozott folyadékcella felszínéhez kötött miozinmolekulák általi mozgatását követtük ATP jelenlétében, fluoreszcencia-mikroszkóp segítségével (13. ábra) (8-10;13;20;21;25). Egyedi molekulák vizsgálatára TIRF (total internal reflection fluorescence) és ebből kifejlesztett FIONA (fluorescence imaging with one nanometer accuracy) módszereket alkalmaztunk (12;21;25). 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. evaneszcens 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 normáleloszlás-illesztésével a

fluorofór elhelyezkedése nanométeres pontossággal meghatározható, ami az egyedi motorlépések vizsgálatában döntő jelentőséggel bír (123).



13. ábra: In vitro motilitási teszt fehérjekomponensei. BSA: a miozin felszínhez történő kötése után blokkolószerként alkalmazott marha szérumalbumin.

5.11 Kinetikai modellezés

A kísérletesen meghatározott sebességi és egyensúlyi állandókból az enzimatikus 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* (www.gepasi.org), *KinTek Global Kinetic Explorer* (www.kintek-corp.com/KGExplorer/index.php)) segítségével tudtuk kiszámítani illetve előre jelezni.

5.12 Szerkezet-meghatározó módszerek, szerkezeti modellezés

Számos esetben – szakmai kollaborációk keretében – szerkezet-meghatározó módszereket (röntgen-krisztallográfia (15), elektron-mikroszkópia (17;23), kisszögű röntgenszórás (16)) alkalmaztunk a kinetikai-funkcionális sajátságok szerkezeti alapjainak vizsgálatára. A vizsgált enzimek szerkezet-változásait molekuláris dinamikai és kvantumkémiai módszerekkel (18;25), illetve a ligandumok kötését vak-dokkolásos számításokkal (6) is vizsgáltuk.

6. Kutatási eredmények és megbeszélésük

A dolgozatban ismertetett eredmények átfogó közös témája az élőlényekben működő motorenzimek működésmódjának a biológiai szerepeknek megfelelően kialakult sokfélesége. A 6.1 fejezetben leírt eredményeink arra derítettek fényt, hogy a miozin szupercsaládba tartozó sejtváz-motor izoformák sokrétű élettani funkcióit hogyan biztosítja a biokémiai működés specializációja. A 6.2 fejezetben ismertetett munkákban 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 tükröznek általános elveket, és melyek az egyedi specializáció megnyilvánulásai. Végül a 6.3 fejezet munkáiban azt vizsgáltuk, hogy a hidrolitikus hajtóerőt hogyan hasznosítják az információ-anyagcserében működő enzimek a nukleinsavak szerkezetének átalakítására.

6.1 Miozinok működésmódjainak sokfélesége

Amint korábban említettük, jelenlegi ismereteink szerint valamennyi miozin-izoforma az 1., 4. és 6. ábrákon bemutatott általános mechanokémiai sémának megfelelően fejti ki működését. A különböző funkciók szempontjából rendkívül fontos szerepet játszanak azonban az egyes izoformák kinetikai specializációi, amelyek a mechanizmus részlépéseinek mérhető paramétereiben tükröződnek. Munkánkat megelőzően ismert volt többek között a különböző izom miozin 2 izoformák, valamint a vezikulumok szállítását 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 magas terhelési arány szükséges. Az e fejezetben ismertetett eredményeinkkel hozzájárultunk mindkét paradigmatikus állítás megdöntéséhez: kimutattuk, hogy vannak igen lassú, magas terhelési aránnyal működő, az összehúzódás helyett statikus tehertartásra szakosodott miozin 2 formák is, illetve hogy egyes vezikulum-transzporterek nem az egyedimolekula-processzivitás módozatával, hanem alacsony terhelési arány mellett, nagyobb kötegekben látják el sejtbeli feladatukat. Ismertettük továbbá a processzív működés újabb típusait képviselő miozin 7 és 10 motorok mechanoenzimatikus működésmódját is.

6.1.1 Erőtartó miozinok: lassan járj, tovább érsz

Az izom és nem-izom miozin 2 izoformák változatos enzimaktivitása, aktinkötöttségi hányada és mozgatási sebessége határozza meg az általuk hajtott összehúzódások rendkívül különböző időbeli lefutását. Az aktinkötött nem-izom miozin 2 fejek magas ADP-affinitása – a hosszú távú erőtartás mellett – mechanikai sejtválaszt tesz lehetővé.

A nem-izom miozin 2 izoformák (NM2A, NM2B, NM2C) az izom-miozinokhoz hasonlóan kétfejű, szálakba rendeződő miozinok, amelyek a simaizom-miozinnal mutatnak evolúciós rokonságot (14-15. ábrák). Az izom-miozinokkal ellentétben azonban a gerincesek valamennyi szövetében jelen vannak, és funkciójuk a gyors kontrakció helyett lassabb sejtmozgások (sejtosztódás, amőboid sejtvándorlás, sejtidfferenciáció, adhézió) végrehajtása

(*37;132*). Enzimkinetikai sajátságaik ismeretlenek voltak, ezért részletes kvantitatív méréssorozatokban megvizsgáltuk, hogy ezek a miozinok miként alkalmazkodtak sejtbeli funkcióik ellátásához.



14. ábra: Az NM2 minifilamentum szerkezete (133)



15. ábra: Humán miozin 2 izoformák törzsfája (134)

A következőkben a humán NM2A példáján bemutatom a legfontosabb kísérlet-típusokat, amelyek révén átfogó kinetikai modellt tudtunk alkotni az egyes izoformák mechanokémiai ciklusáról. Az aktomiozin működés modelljeként a 16. ábrán bemutatott sémát használtuk. E sémát, valamint az ismertetett kísérleteket alkalmaztuk a később ismertetésre kerülő miozinok (humán NM2B, különböző miozin 5, 7 és 10 izoformák és mutánsaik; 1-2. táblázatok) esetében is.

$$\mathbf{AM} + \mathbf{ATP} \stackrel{\mathbf{K_{1}'}}{\longleftrightarrow} \mathbf{AM}(\mathbf{ATP}) \stackrel{\mathbf{K_{2}'}}{\longleftrightarrow} \mathbf{AM} \cdot \mathbf{ATP} \stackrel{\mathbf{K_{3}'}}{\longleftrightarrow} \mathbf{AM} \cdot \mathbf{ADP} \cdot \mathbf{P_{i}} \stackrel{\mathbf{K_{4}'}}{\longleftrightarrow} \mathbf{AM} \cdot \mathbf{ADP} \stackrel{\mathbf{K_{5}'}}{\longleftrightarrow} \mathbf{AM}$$
$$\overset{\mathbb{N}K_{6}}{\underset{M + \text{ATP}}{\longleftrightarrow}} \overset{\mathbb{N}K_{7}}{\underset{M(\text{ATP})}{\longleftrightarrow}} \overset{\mathbb{N}K_{8}}{\underset{M + \text{ATP}}{\longleftrightarrow}} \overset{\mathbb{N}K_{9}}{\underset{M + \text{ADP}}{K_{4}}} \overset{\mathbb{N}K_{10}}{\underset{M + \text{ADP}}{K_{5}}} \overset{\mathbb{N}K_{6}}{\underset{M + \text{ADP}}{K_{4}}} \overset{\mathbb{N}K_{7}}{\underset{M + \text{ADP}}{K_{5}}} \mathbf{M}$$

16. ábra: Az aktomiozin működési ciklus átfogó, egyszerűsített sémája (A: aktin, M: miozin). Az aktomiozin kinetikai lépéseinek számozása a dolgozatban mindvégig az itt bemutatott sémát követi. A felső sor az aktinkötött, míg az alsó az aktinról levált miozinfej ATP-hidrolízis-ciklusát mutatja. A reakció legnagyobb fluxust hordozó főútvonalát félkövér szedéssel jeleztem. Az egyensúlyi állandókat mindvégig a sémán jobbra haladás irányában fejeztem ki, az aktinkötött és -disszociált állapotok közötti egyensúlyokat pedig az aktindisszociáció irányában. A sebességi állandók ezen irányokban pozitív indexekkel szerepelnek. Az ATP-kötést kétlépéses reakcióként modelleztük, amely egy másodrendű ütközést (K_1 illetve K_1') követő elsőrendű izomerizációból (K_2 illetve K_2') áll. Az ATPhidrolízislépést (K_3) korábban felbontottuk a miozinfej felhúzásával járó konformációs átmenet és a rákövetkező kémiai lépés együttesére (29), ám az itt bemutatott egyszerűsített sémán egylépéses folyamatként kezeltük. A foszfát (K_4 illetve K_4') illetve az ADP felszabadulása (K_5 illetve K_5') hasonlóképpen több lépésre felbontható, ám a jelen esetben egylépésesként ábrázolt folyamatok. Minden alkalommal gondosan megvizsgáltuk, hogy a legfontosabb globális jellemzők meghatározása érdekében alkalmazott egyszerűsítések hogyan befolyásolják a kapott értékeket. A lépések részletesebb felbontására külön kitérek azokban az esetekben, ahol az jelentőséggel bír.

A részletes kinetikai elemzéseket rekombináns egyfejű (S1) konstrukciókkal végeztük, amelyek alkalmasak az aktin és az izolált miozinfej kölcsönhatásának vizsgálatára (43). Több későbbi kísérletben (6.2.4 és 6.2.5 fejezetek) vizsgáltuk a több fejet tartalmazó egységek emergens sajátságait is.

A miozinfej aktin távollétében lezajló ATP-kötését és a kötött nukleotid hidrolízisét triptofán-fluoreszcenciajelet hasznosító *stopped-flow* (17. ábra), valamint a γ-foszfáton radioaktívan jelölt ATP hidrolízisét követő *quenched-flow* (18. ábra) gyorskeveréses tranziens kinetikai kísérletekben vizsgáltuk.



^{17.} ábra: Az NM2A S1 ATP-kötésének követése stopped-flow kísérletben triptofánfluoreszcencia segítségével. Az A ábra 0,2 μ M NM2A S1 és 25 μ M ATP gyors összekeverését követő fluoreszcencia-emelkedést mutatja. (A stopped-flow kísérletek leírásakor – külön jelzés hiányában – a keverés utáni koncentrációkat említem.) Az adatokhoz illesztett exponenciális lecsengés-függvény 9,3 s⁻¹ megfigyelt sebességi állandót (k_{obs}) eredményezett. A B ábra a k_{obs} értékek ATP-koncentrációfüggését mutatja. A példán bemutatott adatokhoz illesztett hiperbola 16 s⁻¹ maximális sebességi állandót (k_3+k_{-3}) eredményezett 18 μ M ATP-nél bekövetkező féltelítéssel (ebből K₁k₂ kiszámítható).³

³ A grafikonokon több helyütt megjelenő tizedespontok miatt az olvasó megértését kérem. A szövegben és a táblázatokban tizedesvesszőt használok.

A kinetikai állandók elnevezése a 6.1 és 6.2 fejezetek ábraszövegeiben mindenütt a 16. ábra sémáját követi. A legfontosabb kísérleti körülményeket az 1. táblázat szövegében említem. Az adatok értékelésének és az egyes paraméterek számításának részleteitől a dolgozatban – a lényeg hangsúlyozása érdekében – eltekintek; ezek a vonatkozó publikációkban megtalálhatók.



18. ábra: Az ATP-hidrolízis tranziens lefolyásának követése quenched-flow kísérletben. Az A ábrán 2,7 μ M NM2A S1 és 50 μ M ATP reakciója látható (multiple turnover kísérlet). A példaként bemutatott adatokhoz illesztett, exponenciális burst és lineáris steady-state fázisokból álló összetett függvény 0,91 μ M foszfátnak megfelelő burst-amplitúdót (ami 0,34 mol P_i/mol NM2A S1-nek felel meg – ebből K₃ kiszámítható), 20 s⁻¹ burst sebességi állandót és 0,014 s⁻¹ steady-state sebességi állandót eredményezett. A B ábra 2,3 μ M NM2A S1 és 1 μ M ATP reakcióját mutatja (single turnover kísérlet). Az adatokhoz illesztett kettős exponenciális közelítésben a gyors illetve lassú fázisok sebességi állandóit az ATPkötés illetve a foszfát-felszabadulás folyamatai határozták meg. A gyors fázis amplitúdója 0,43 μ M P_i-nak adódott (ami megfelel 0,43 mol P_i/mol ATP-nek; ebből K₃ kiszámítható).

A miozinfej ATP-kötését a fentieken kívül fluoreszcensen jelölt ATP (metiantraniloildezoxiATP, mdATP) jelének felhasználásával, illetve az aktoS1 komplex ATP-indukált disszociációját jelző pirén-aktin fluoreszcencia-változások révén is vizsgáltuk (19. ábra).



19. ábra: Az ATP-kötés követése stopped-flow mérésekben mdATP-fluoreszcencia segítségével (A), és az ATP-indukált aktoS1 disszociáció mérése pirén-aktin fluoreszcenciajellel (B). A: Pszeudo-elsőrendű sebességi állandók (k_{obs}) mdATPkoncentrációfüggése 0,1 µM NM2A S1 (tömör jelek) és 0,05 µM aktoNM2A S1 (üres jelek) mdATP-vel történő gyors keverésekor. A kapott adatokhoz történt egyenesillesztés 0,78 µ $M^{-1}s^{-1}$ (K_1k_2), illetve 0,14 µ $M^{-1}s^{-1}$ ($K_1'k_2'$) másodrendű kötési sebességi állandókat eredményezett. B: A pirén-aktoS1 komplex (10 nM) ATP-indukált disszociációja. A tranziensekhez történt exponenciális illesztésből kapott k_{obs} értékek hiperbolikus ATPkoncentrációfüggést mutattak, amely 190 s⁻¹ maximális sebességi állandót (k_2') és 900 µM ATP-nél bekövetkező féltelítést (1/ K_1') eredményezett a példaként bemutatott kísérletben.

Az ATP-hidrolízist követő foszfát-felszabadulást – és annak aktin-aktivációját – kettős keverést alkalmazó *stopped-flow*-kísérletekben vizsgáltuk. E mérésekben először összekevertük a *stopped-flow*-készülék két mintatartójában lévő S1- és ATP-oldatokat, majd gondosan megtervezett hosszúságú előinkubáció után (jellemzően 1-5 s, ami maximális mennyiségű M.ADP.P_i termékkomplex keletkezését eredményezi) a reakcióelegyet

összekevertük a harmadik mintatartóban lévő aktinoldattal. A foszfát felszabadulását fluoreszcensen jelölt foszfátkötő fehérje (MDCC-PBP) jelével követtük (20. ábra).



20. ábra: Foszfát-felszabadulás tranziens követése single turnover kísérletekben. Az A ábrán bemutatott kísérletben 1,4 μ M NM2A S1 és 1 μ M ATP (első keverés utáni koncentrációk) gyors keverése és 5 másodpercnyi előinkubációja után az elegyet 34 μ M aktinnal kevertük össze a stopped-flow-készülékben. (Aktin esetében a dolgozatban mindenütt a protomer-koncentrációkat tüntettem fel.) A kapott görbe exponenciális illesztése 0,061 s⁻¹ k_{obs} értéket eredményezett. B: A k_{obs} értékek aktinkoncentráció-függése, amelyhez történt egyenesillesztés 0,0013 μ M⁻¹s⁻¹ meredekséget (k₄'/K₉) és 0,019 s⁻¹ tengelymetszetet (k₄) eredményezett. A minták 1,5 μ M MDCC-PBP-t tartalmaztak.

Az ADP felszabadulását az aktinról levált illetve aktinkötött miozinfejről, illetve a funkció szempontjából potenciálisan fontos ADP-kötést fluoreszcens mdADP jelének követésével, illetve a jelöletlen ADP-nek az ATP-indukált pirén-aktoS1-disszociációra gyakorolt kompetitív hatása alapján vizsgáltuk (21. ábra).



21. ábra: A miozinfej ADP-vel történő kölcsönhatásának vizsgálata. A: 0,1 μ M NM2A S1 (tömör jelek) illetve 0,1 μ M aktoNM2A S1 (üres jelek) mdADP-vel történő összekeverésekor kapott stopped-flow-tranziensek k_{obs} értékeinek mdADP-koncentrációfüggése. A bemutatott adatsorhoz történt egyenesillesztés 0,63 μ M⁻¹s⁻¹ (k₋₅) illetve 2,7 μ M⁻¹s⁻¹ (k₋₅')

másodrendű kötési sebességi állandót eredményezett NM2A S1 illetve aktoNM2A S1 esetén. Az ADP-felszabadulás sebességi állandóit jelző tengelymetszetek 0.58 s⁻¹-nak (k_5) illetve 1.7 s⁻¹-nak (k₅') adódtak. B: A mdADP-disszociáció sebességi állandóját "chasing" kísérletekben is vizsgáltuk, amelyekben az M.mdADP illetve AM.mdADP komplexeket feleslegben alkalmazott ATP-vel kevertük össze. 0,05 μM NM2A S1-et és 0,5 μM mdADP-t tartalmazó oldat 200 µM ATP-vel történt gyors keverésekor a disszociációs sebességi állandó (k_5) 1,1 s⁻¹-nak ("M.ADP" görbe), míg 0,1 μ M aktoNM2A S1 és 2 μ M mdADP elegyének 100 μ M ATP-vel való keverésekor ("AM.ADP" görbe) 2,9 s⁻¹-nak (k_5 ') adódott. C: Az akto-NM2A S1 ADP-affinitását úgy vizsgáltuk, hogy 0,04 μM pirén-aktoNM2A S1 komplexet különböző koncentrációjú ADP-vel előinkubáltunk, majd a stopped-flowkészülékben 200 μM ATP-vel kevertük össze. (Ezen a grafikonon keverés előtti koncentrációkat ábrázoltunk, mivel ezek relevánsak az egyensúlyi állandók meghatározása szempontjából.) Az ábrán néhány így kapott pirén-fluoreszcencia-tranziens látható az ADPkoncentrációk feltüntetésével. A kapott tranziensek kétfázisúak voltak: a gyors fázis (k_{obs} = 20 s⁻¹) az ADP-mentes aktoNM2A S1-hányad ATP-indukált disszociációjából, míg a lassú fázis ($k_{obs} = 2 \text{ s}^{-1}$) az ADP-kötött aktoNM2A S1-hányad ADP-disszociáció által limitált reakciójából származott. D: A C ábrán bemutatott tranziensek lassú fázisának amplitúdóhányada (A_{lassú}/(A_{gyors}+A_{lassú})) hiperbolikus ADP-koncentrációfüggést mutatott, amelyből az ADP-kötés egyensúlyi állandója (K_5') 2,0 μ M-nak adódott a bemutatott kísérletben.

A pirén-aktin fluoreszcencia-jelét felhasználtuk a nukleotidmentes illetve ADP-kötött miozinfejek aktinkötési sebességi és egyensúlyi állandóinak meghatározásához is (22. ábra).



22. ábra: A miozinfejek aktin-kölcsönhatásának vizsgálata stopped-flow-kísérletekkel. A: 0,1 μ M NM2A S1 (tömör jelek) illetve NM2A S1.ADP komplex (0,1 μ M NM2A S1 és 15 μ M ADP elegye, üres jelek) pirén-aktinnal történt összekeverésekor kapott tranziensek k_{obs} értékeinek pirén-aktin-koncentrációfüggése. A bemutatott adatokhoz illesztett egyenesek meredekségéből az aktinkötés másodrendű sebességi állandója 0,73 μ M⁻¹s⁻¹-nak (k₋₆) illetve 0,21 μ M⁻¹s⁻¹-nak (k₋₁₀) adódott a bemutatott kísérletekben. A B ábrán példaként bemutatott aktinaffinitás-mérésben (M.ADP komplex, K₁₀) 15 nM pirén-aktin, 30 μ M ADP és különböző koncentrációjú NM2A S1 elegyét a stopped-flow-ban összekevertük 300 μ M ATP-vel (keverés előtti koncentrációk). A pirén-fluoreszcencia-tranziensek amplitúdójának NM2A S1-koncentrációfüggéséhez illesztett másodrendű kötési függvényből az egyensúlyi állandó (K₁₀) 18 nM-nak adódott. A kapott K₁₀ érték megbízhatóságának illusztrálása céljából szaggatott vonallal feltüntettem a 0-ra rögzített K₁₀ érték (minden S1-molekula komplexálódását jellemző szélsőérték) mellett kapott illesztést is.

A miozinfejek aktin-aktivált *steady-state* ATPáz aktivitását az aktin-koncentráció függvényében NADH-kapcsolt enzimteszt segítségével vizsgáltuk (23. ábra).



23. ábra: Az NM2A S1 steady-state aktin-aktivált ATPáz aktivitása. A bemutatott adatokhoz történt hiperbolikus függvényillesztés 0,17 s⁻¹ maximális ATPáz aktivitást (V_{max}) eredményezett 75 μM aktin-koncentrációnál bekövetkező féltelítés (K_{ATPáz}) mellett.

A fentiekben bemutatott módon megvizsgáltuk a humán NM2A és NM2B izoformák kinetikai sajátságait (1;3). A meghatározott legfontosabb paramétereket az 1. táblázat foglalja össze. A kísérletes adatokból megalkottuk a teljes enzimciklus kvantitatív modelljét. A különböző kinetikai paraméterek az enzimek steady-state sajátságaihoz erősen eltérő mértékben járulnak hozzá; az 1. táblázatban ezért kiemeléssel hangsúlyoztam a mechanizmus szempontjából sarkalatos adatokat. E jellemzőket illetőleg rendkívül szembetűnő, nagyságrendeken átívelő sorrendiség figyelhető meg az egyes miozin 2 izoformák között. Az élettani funkciónak – a makroszkopikusan megfigyelhető kontrakció sebességének – megfelelően a szarkomerikus (váz- és szívizom) miozinok ATPáz ciklusa a leggyorsabb, majd a simaizom miozin következik, míg az NM2 izoformák valamennyi izommiozinnál sokkal lassabban működő motorok. Ezt aktin-aktivált ATPáz aktivitásuk és az aktinaktiváció fokának alacsony volta is tükrözi (1. táblázat). A modellezés által meghatározott terhelési arány (steady-state aktinkötöttségi hányad) tekintetében rendkívül érdekes különbség mutatkozik a két vizsgált NM2 izoforma között: az NM2A az izom-miozinokét meghaladó, ám viszonylag alacsony terhelési arányt (10-15 %) mutat, míg az NM2B terhelési aránya jóval magasabb (25-50 %) (24. ábra).

	Paraméter	Mérési jel vagy számítás módja	Vázizom	Szívizom	Simaizom	NM2A	NM2B
Chandu atota	$k_{\text{bazális}}$ (aktin nélkül, s ⁻¹)	NADH-kapcsolt	0,06	0,04	0,06	0,013	0,007
Steady-state	$V_{\max}(s^{-1})$	NADH-kapcsolt	29	4,2	0,7	0,17	0,13
AlPaz	K _{ATPáz} (μM)	NADH-kapcsolt	18	58	59	72	59
aktivitas	aktin-aktiváció	$V_{\rm max}/k_{\rm bazális}$	480	110	12	13	19
	$K_1 k_2 (\mu M^{-1} s^{-1})$	mdATP, triptofán	2,2	0,5	2,7	0,8	0,69
ATP-kötés	$K_1'k_2'$ (μ M ⁻¹ s ⁻¹)	mdATP, pirén- aktin	1,8	4	1,3	0,18	0,32
	$1/K_{1}'$ (μ M)	pirén-aktin	2000			900	>400
	k₂' (s⁻¹)	pirén-aktin	5000	1500	1300	190	>150
	$k_{-5} (\mu M^{-1} s^{-1})$	mdADP	1,6		1,1	0,55	0,81
	$k_5 (s^{-1})$	mdADP	2,0	2,0	1,4	0,82	0,53
	<i>K</i> ₅ (μM)	k₅/k5	2,0	0,33	1,2	1,5	0,65
	$k_{-5}' (\mu M^{-1} s^{-1})$	mdADP				2,7	2,41
ADP-Kotes	<i>k</i> ₅′ (s⁻¹)	mdADP	>500	>150	19	2,2	0,37
	<i>K</i> 5′ (μM)	pirén-aktin	120	6,7	5	1,4	0,13
	kapcsoltsági hányados	K ₅ '/K ₅	60	20	4,2	0,7	0,2
	aktin-aktiváció	k_5'/k_5	250	130	12	2,8	0,7
	$k_3 + k_{-3} (s^{-1})$	triptofán, quenched-flow	130	82	45	16	19
ATP-hidrolízis	K ₃	quenched-flow	9			0,61	0,9
	$k_3 (s^{-1})$	$K_3(k_3+k_{-3})/(1+K_3)$	120			7	9
	k_{-3} (s ⁻¹)	k ₃ / <i>K</i> 3	13			11	10
Foczfát	k_4 (s ⁻¹)	MDCC-PBP				0,016	0,007
folszabadulás	<i>k</i> ₉ (μM ⁻¹ s ⁻¹)	MDCC-PBP		0,08	0,005	0,0013	0,0001
101320000000	<i>K</i> 9 (μM)	$K_{\text{ATPáz}}K_3/(1+K_3)$	16			27	28
	k6 (μΜ⁻¹s⁻¹)	pirén-aktin		12	1,2	0,73	0,36
	<i>K</i> ₆ (μM)	pirén-aktin	0,033	0,0063	0,0035	<0,01	<0,003
	$k_6 (s^{-1})$	$K_6 k_{-6}$				<0,007	<0,001
Aktinkötés	k10 (μM ⁻¹ s ⁻¹)	pirén-aktin			0,23	0,19	0,26
	<i>K</i> ₁₀ (μM)	pirén-aktin	1	0,1	0,024	0,02	<0,001
	$k_{10} (s^{-1})$	$K_{10}k_{-10}$				0,004	<0,0003
	kapcsoltsági hányados	K_{10}/K_{6}	30	15	4,2	2	0,4

1. táblázat: Izom és nem-izom miozin 2 izoformák kinetikai paraméterei⁴. A kinetikai lépések számozása a 16. ábrán bemutatott sémát követi. A humán NM2A és NM2B izoformák adatai saját munkáinkból (1;3), míg a nyúl vázizom (76;77;135-140), sertés és szarvasmarha szívizom (137;141) és csirke simaizom (137;142) miozinok adatai a korábbi irodalomból származnak. A legtöbb kísérletet 25 °C-on, pH 7-en, 125 mM ionerősségnél végeztük; a pontos körülményeket a hivatkozások tartalmazzák. A mechanokémiai mechanizmus fő sajátságait leginkább befolyásoló paramétereket kék háttérrel kiemeltem. A feltüntetett értékek jelentős része különböző független módszerekkel meghatározott paraméterek átlaga; közöttük ezért nem mindig áll fenn aritmetikai következetesség (pl. a K_5' értékek nem pontosan egyeznek a k_5'/k_{-5}' hányadossal). Aktin-aktiváció alatt valamely folyamat aktin jelenlétében illetve távollétében mért sebességi állandóinak hányadosát értem. A kapcsoltsági hányados a miozinfej aktin- és ADP-kötése között fennálló termodinamikai kapcsoltságra vonatkozik, és K_5'/K_5 illetve K_{10}/K_6 hányadosként határozható meg. A két hányadosnak elvben egyeznie kell; közülük – kísérleti okok miatt – az előző határozható meg nagyobb bizonyossággal.

⁴ A feltüntetett paraméterek mindegyike számos kísérletsorozat eredményének átlaga. Az adatok standard hibáját – a lényeg hangsúlyozása érdekében – a jelen dolgozatban általában nem közlöm; ezek a publikációkban megtalálhatók, és jellemzően a 10-30 %-os tartományba estek. Az enzimkinetikai állandók összehasonlításakor a hagyományosan értelmezett statisztikai szignifikancia helyett gyakran inkább a nagyságrendi különbözőséget tekintjük jelentősnek.


24. ábra: Miozin 2 enzimkinetika és motilitás diverzitása. A: Miozin-2 izoenzimek enzimatikus ciklusidejének összehasonlítása, az aktinkötött (szürke) és aktinról levált (fehér) állapotokban töltött időhányad feltüntetésével. B: Miozin-2 izoenzimek in vitro aktin-mozgatási sebessége (az (1;3;8) saját közleményekből).

A terhelési arányt meghatározó legfontosabb folyamat az ADP felszabadulása az aktomiozin.ADP komplexből. Ez a lépés, mivel sokkal lassabban megy végbe, mint a rákövetkező lépések (új ATP-molekula kötődése a miozinfejhez illetve az aktomiozinnak az ATP-kötés által indukált disszociációja), alapvetően meghatározza az erősen aktinkötött miozin állapot életidejét, illetve az aktinkötött miozinfejek *steady-state* részarányát. (Ez a jelenség hangsúlyos szerepet játszott a később, a 6.2.4 és 6.2.5 fejezetben ismertetett munkáinkban is.) A fenti okok miatt az ADP-felszabadulás kinetikai diverzitása a miozinok *in vitro* aktinmozgatási sebességében (motilitásában) is igen látványos különbségeket okoz (24. ábra).

Az ADP-felszabadulás sebességi állandóján kívül (k_5' , 1. táblázat) jól jellemzi a miozinok közti rendkívül jelentős különbségeket az ún. aktin-ADP kapcsoltsági hányados. Ez a paraméter azt fejezi ki, hogy milyen mértékben befolyásolja egymást az aktinnak és az ADPnek a miozinfej két különböző pontján elhelyezkedő helyekhez történő kötődése (1. táblázat). Az alacsony terhelési arányú izom-miozinokban a két ligandum kötődése erősen antagonisztikus, amit számszerűleg az aktin jelenlétében illetve távollétében mért ADPdisszociációs egyensúlyi állandók hányadosának (K_5'/K_5) magas értéke fejez ki. Az NM2 izoformákban – éles ellentétben az izom-miozinokkal – a kapcsoltság pozitív irányú ($K_5'/K_5 <$ 1), vagyis az aktin kötődése nem csökkenti, inkább erősíti az ADP kötődését (és fordítva, az ADP kötődése erősíti az aktinkötést). Ez a felfedezésünk szöges ellentétben állt az aktomiozin működés addigi uralkodó paradigmájával, amely szerint a miozin a nukleotidmentes (*rigor*) állapotban kötődik legerősebben az aktinhoz (42). A jelenség további, a biológiai funkció szempontjából sarkalatos folyománya az, hogy az ADP által okozott termékgátlás biológiailag jelentős szerepet játszhat az NM2 mechanikai működésének szabályozásában (25. ábra). Az NM2 izoformák kinetikai specializációja így lehetővé teszi, hogy a sejtbeli magas ATP:ADP koncentráció-arány ellenére az ADP jelentősen modulálja az aktinkötöttségi hányadot és a motilitás sebességét. Ismeretes, hogy a sejtbeli ADP-koncentráció 10-150 µM között változhat, és különböző stressz-körülmények között jelentősen megnőhet (*143;144*). Az NM2 termékgátlási mechanizmusa így a sejt autonóm mechanikai válaszának lehetőségét vetíti elő.



25. ábra: Az NM2B terhelési arányának ADP- és aktinkoncentráció-függése (1). Az ábra az NM2B ATPáz ciklusának kísérletesen meghatározott kinetikai paraméterei alapján végzett szimuláció eredményét mutatja. Az NM2B terhelési aránya – telítési ATP- és aktinkoncentráció mellett – az ADP távollétében jellemző kb. 25 %-os értékről 50 %-ra nőhet 150 μM-os ADP-koncentráció esetén.

Enzimológiai és *in vitro* motilitási eredményeink arra engedtek következtetni, hogy a sejtben az NM2A izoforma inkább az aktív kontrakciót igénylő folyamatok (pl. sejtosztódás) hajtóerejéül szolgál, míg az NM2B elsősorban hosszú távú, alacsony energiaigényű erőtartásra szakosodott. E megállapítás – egy másik csoport NM2B-n végzett biokémiai munkája mellett (*145*) – látványosan összhangban volt olyan később megjelent munkákkal, amelyek azt mutatták ki, hogy különböző élettani működésekben (pl. idegszövet-regenerációban, simaizom-kontrakcióban) az NM2A mindig a gyorsabb kontrakciót igénylő feladatot végzi, míg az NM2B feladata az erőtartás (*132;146-150*). Élettani munkákból arra is fény derült, hogy a simaizom-összehúzódáshoz az NM2 izoformák gyakran dominánsan hozzájárulnak (*146;150*). A húgyhólyag simaizom-falában például, ahol aktív kontrakcióra van szükség, elsősorban NM2A található, míg az aorta simaizmában, ahol a passzív erőtartás az elsődleges funkció, az NM2B van jelen nagyobb mennyiségben (*146*).

Számos, emberben előforduló NM2 mutáció súlyos betegségeket (May-Hegglinanomáliát, süketséget) okoz (*37*). További munkánk során e mutációkat tartalmazó miozinok enzimatikus sajátságainak és motilitásának jellemzésével kimutattuk, hogy a mutációk részben az aktin-aktiválás, részben a fehérjék stabilitásának megváltozása, részben pedig ez erőkar-működés, és így a mozgatóképesség akadályozása révén fejtik ki hatásukat (*8*).

Az NM2 működése a simaizom miozin 2-höz hasonlóan az egyik könnyűlánc foszforilációja révén szabályozódik (151). A kétfejű, defoszforilált könnnyűláncú miozin aszimmetrikus

szerkezetet vesz fel, amelyben a két fej kölcsönösen akadályozza egymás ATPáz és mozgató aktivitását (152;153). A gátolt állapot biokémiai sajátságai azonban ismeretlenek voltak annak ellenére, hogy ez az állapot élettanilag jelentős lehet az aktin kötésében és a passzív erőtartásban való részvétele miatt (146). Kimutattuk, hogy a blokkolt állapot csak ATP jelenlétében jön létre, más (nukleotidmentes illetve ADP-kötött) állapotokban nem (5). Továbbra is fontos megválaszolatlan kérdés marad, hogy a gátolt állapot milyen aktinkötő sajátságokkal rendelkezik és részt tud-e venni az erőtartásban.

A legkésőbb felfedezett NM2C izoforma *steady-state* ATPáz aktivitását és *in vitro* motilitását vizsgálva azt a rendkívül érdekes felfedezést tettük, hogy ez a miozin még az ismert NM2 izoformáknál is lassabb mozgásformák alapjául szolgálhat (24. ábra) (8). Ezen izoforma mechanokémiai mechanizmusának részletei azonban máig ismeretlenek.

6.1.2 Processzív szállítás motormolekulák csapatmunkájával

Különböző, citoplazmatikus transzportot végző miozin 5 izoformák molekuláris aktivitása arra utal, hogy e motorok szállító aktivitása a szállítmány felszínén jelentős koncentrációban jelen lévő miozinok együttműködésével jön létre.

A melanoszómák, az endoplazmatikus retikulum, vezikulumok és más sejtalkotók transzportját végző miozin 5a processzív motor, amely kétfejű egyedi molekulaként számos enzimciklus és mechanikai lépés elvégzésére képes az aktinról való leválás nélkül (154). Ezt az teszi lehetővé, hogy a miozin 5a fej az ATPáz ciklusidő nagy részét aktinhoz kötve tölti (terhelési aránya magas) (155). E motor – a processzív miozin "prototípus" – mechanokémiai mechanizmusának és sejtbeli funkciójának részletes megismerése azt sugallta, hogy a sejtalkotók aktin-alapú transzportja egyedi molekulaként az aktinszálon lépegetni képes miozinmotorok működése révén valósul meg. Jóllehet az élesztő két miozin 5 izoformáján végzett indirekt vizsgálatok (az *in vitro* motilitás miozinkoncentráció-függése) alapján felmerült, hogy ezek a miozinok nem-processzív módon működnek (156), későbbi egyedimolekula-kísérletek ezt a feltételezést nem igazolták (157), és ezen miozinok pontos működésmódja máig kérdéses maradt.

Két, biokémiai sajátságait tekintve addig felderítetlen miozin 5 izoformán, a *Drosophila melanogaster* miozin 5-ön (*Dm5*), illetve a humán miozin 5c-n is elvégeztük a 6.1.1 fejezetben bemutatott kísérleteket (*10;20*). A 2. táblázatban bemutatott eredményeken alapuló részletes kinetikai elemzés révén kimutattuk, hogy mindkét említett izoforma alacsony terhelési arányú enzimciklust végez, ami nem teszi lehetővé a kétfejű egyedi molekulaként végzett processzív transzportot. Ezen előrejelzéssel összhangban azt találtuk, hogy kétfejű (HMM-szerű) Dm5 konstrukció csak magas felszíni koncentrációban alkalmazva mutatott *in vitro* motilitást, amelynek sebessége 460 nm/s-nak adódott (*10*). Hasonló körülmények között egy kétfejű miozin 5c konstrukció is képes volt mozgatásra (24 nm/s), ám egyedimolekula-motilitás mérésben nem mutatott processzív viselkedést (*20*). A miozin 5c vizsgálatában hasonló eredményekre jutott egy másik csoport is (*158*).

A miozin 5c-re – alacsony terhelési aránya ellenére – az aktoS1 komplex igen magas ADPaffinitása jellemző ($K_5' = 0,25 \mu$ M, 2. táblázat). Globális kinetikai szimulációink azt mutatták, hogy ez a sajátság a miozin 5c terhelési arányának és ATPáz aktivitásának igen jelentős ADPkoncentrációfüggését eredményezi, hasonlóan az NM2 izoformák 6.1.1 fejezetben leírt esetéhez (26. ábra). Az élettani ADP-koncentráció-tartományban (10-150 μ M) a terhelési arány akár 50 % fölé nőhet, ami az egyedi molekula-processzivitás sejtbeli szabályozásának lehetőségét jelenti.



26. ábra: A miozin 5c steady-state aktin-aktivált ATPáz aktivitásának és terhelési arányának ADP-koncentrációfüggése (telítési aktin- és ATP-koncentráció esetén) (20). Az ábra az enzim kísérletesen meghatározott kinetikai paraméterei alapján végzett szimuláció eredményét mutatja.

A miozin 5a, 5c és Dm5 izoformák legfontosabb kinetikai paramétereinek összehasonlításából a miozin 5 enzimmechanizmusok igen látványos sokfélesége bontakozik ki (2. táblázat). A miozin 5a "prototípus" esetén a foszfát-felszabadulás (k_4 , k_4 ') igen jelentős és az ADP-felszabadulás (k_5 , k_5 ') mérsékelt aktin-aktivációja az utóbbi lépés sebességmeghatározó voltát és magas terhelési arányt (70-90 %) eredményez (2. táblázat, vö. 6. ábra). A miozin 5c esetében a foszfát-felszabadulás aktin-aktivációja a miozin 5a-hoz képest igen alacsony, ami alacsony terhelési arányt, lassú ATPáz ciklus és lassú motilitást eredményez (lásd fent). A Dm5 esetében mind a foszfát-, mind az ADP-felszabadulás aktinaktivációja a miozin 5a-hoz hasonló mértékű, ám az ADP-felszabadulás sokkal gyorsabb mind aktinmentes, mind aktinkötött állapotban – ez utóbbi sajátság okozza a Dm5 alacsony terhelési arányát.

Fenti mechanizmus-vizsgálataink megmutatták, hogy az egyedi-molekula processzivitás nem jelenti a miozin 5-alapú transzport egyetlen formáját: a miozin 5c és Dm5 izoformák – a miozin 5a-tól és az ahhoz hasonlóan működő miozin 5b-től (*159*) eltérően – csak nagyobb, sok-molekulás egységekben fejthetik ki szállító működésüket a citoplazmában. A motilitás e típusa a vezikulumok felszínén jelentős koncentrációban jelen lévő motormolekulák együttes aktivitása révén jöhet létre.

	Paraméter	miozin 5a	miozin 5c	Dm5	Dm7a	Dm7b	miozin10	miozin 5a Y439A
Steady-state	k _{bazális} (aktin nélkül, s⁻¹)	0,02	0,05	0,07	0,05	0,02	0,03	0,086
ATPáz	$V_{\rm max}(s^{-1})$	11	1,8	13	1,0	8,4	3,0	1,4
aktivitás _	<i>K</i> _{ATPáz} (μM)	4,8	43	9,9	1,1	39	33	0,36
	aktin-aktiváció	550	36	190	20	420	100	16
ATP-kötés	$K_1 k_2 (\mu M^{-1} s^{-1})$	1,5		1,3		4,0	1,1	2,7
	$K_1'k_2'$ ($\mu M^{-1}s^{-1}$)	1,0	0,82	0,36	1,0	1,3	1,8	1,9
	k_{2}' (s ⁻¹)	210	290	>180	150	>400	630	820
	k_5 (μM ⁻¹ s ⁻¹)	6,9		2,2		2,3	3,1	5,7
	<i>k</i> ₅ (s⁻¹)	2,5		38		9,0	1,2	2,7
ADP-kötés	<i>K</i> ₅ (μM)	0,36		17		3,8	1,4	0,47
	<i>k</i> _5′ (μM ⁻¹ s ⁻¹)	4,9	64	4,7	3,9	2,7	2,1	2,1
	k_{5}' (s ⁻¹)	17	16	150	1,6	12	18	3,7
	<i>K</i> ₅ ′ (μM)	3,5	0,25	32		14	8,4	1,8
	kapcsoltsági hányados	9,7		1,9		3,7	6,0	3,8
	aktin-aktiváció	6,3		3,9		1,3	15	1,4
ATP-	k ₃ +k ₋₃ (s ⁻¹)	210	90	68	11	160	>80	250
hidrolízis	<i>K</i> ₃	0,57	0,54	0,39	>4	2,8	0,3	0,52
	$k_4 (s^{-1})$	0,025	0,16	0,07	0,05	0,027	0,13	0,38
Foszfát-	k_4' (s ⁻¹)	240	1,5	180	61	>40	90	110
felszabadulás	<i>K</i> ₉ (μM)	55	14	70	6,4	>50	130	3,3
	aktin-aktiváció	9600	9,4	2600	1200	>1500	690	290
Aktinkötés 	k ₋₆ (μM ⁻¹ s ⁻¹)	28	0,66	2,5		1,2	2,1	25
	<i>K</i> ₆ (μM)	0,000039	0,029	0,016		0,035	0,20	0,0003
	$k_6 (s^{-1})$	0,0011	0,019	0,04		0,042	0,41	0,0076
	k ₋₁₀ (μM ⁻¹ s ⁻¹)		1,2	2,3		1,0	0,26	
	<i>K</i> ₁₀ (μM)		0,044	0,19		0,034	1,3	
	$k_{10} (s^{-1})$		0,051	0,43		0,034	0,34	
	kapcsoltsági hányados		1,5	12		1,0	6,5	

2. táblázat: Miozin 5, 7 és 10 izoformák kinetikai paraméterei . A bemutatott adatok mindegyike saját munkáinkból származik (egér miozin 5a: (25), humán miozin 5c: (20), Dm5: (10), Dm7a: (12), Dm7b: (11), szarvasmarha miozin 10: (7), egér miozin 5a Y439A mutáns: (25)). Az adatokkal kapcsolatos további információk az 1. táblázat szövegében találhatók.

6.1.3 Membrán-asszociált motorműködés

A filopódiumokban anyagszállítást végző miozin 10 az enzimciklus minden állapotában viszonylag magas aktin-affinitással rendelkezik, ami az aktinkötegen való folyamatos haladást segíti.

A miozin 10 több szempontból is különleges motorenzim (160;161). Egyrészt, farokrégiójában a sejtmembrán foszfolipidjeihez kötődő PH3 domént tartalmaz, és így membránasszociált fehérjeként működik. Másrészt ez a miozin jelentős szerepet játszik a sejtek filopódiumainak létrehozásában és az azokon belüli molekula-transzportban (162;163). A miozin 10 enzimműködésének és motilitásának részletes vizsgálatával (2. táblázat) kimutattuk, hogy ez a miozin – hagyományos kísérleti körülmények között – mérsékelt terhelési aránnyal működő, nem-processzív motor (7). Egy másik csoport későbbi eredményei magasabb terhelési arányt jeleztek, ám az egyedimolekula-processzivitás abban a munkában sem volt kimutatható (164). Érdekes módon azonban azt találtuk, hogy a miozin 10 jelentős aktin-affinitást mutat az ún. gyenge aktinkötő állapotokban is (vö. 6. ábra). A fentiek alapján arra következtettünk, hogy a miozin 10 által képviselt motilitástípus előnyös lehet a filopódiumokban, amelyek egyetlen központi aktinkötege a sejtmembrán tőszomszédságában helyezkedik el: az aktinon történő tovahaladást elősegítheti az a körülmény, hogy a korlátozott térviszonyok miatt a motornak nincs lehetősége diffúzióval eltávozni az aktintól. Évekkel később jelent meg Ronald Rock kutatócsoportjának tanulmánya, amelyben kimutatták, hogy a miozin 10 szelektív módon csak aktinkötegeken – nem pedig egyedi aktinszálakon – képes processzív transzlokációra (*165*).

6.1.4 A miozin 7 mint új processzív objektum

A miozin 7 izoformák – processzív mozgásuk természetes adottságai (hosszú futáshossz és lassú transzlokációs sebesség) révén – az egyedimolekula-vizsgálatok számára előnyös motortípust képviselnek.

A részletesen jellemzett miozin 5 és 6 processzív transzporterek mellett a sejtbiológiai és élettani vizsgálatok azt mutatták, hogy a miozin 7 osztály tagjai is fontos szerepet játszanak az intracelluláris transzportban valamennyi vizsgált szervezetben, az egysejtű eukariótáktól a magasabbrendű állatokig (166-175). A különböző miozin 7 izoformák a fagocitózis, a sejtadhézió, valamint magasabbrendűekben az érzőfunkciók (látás, hallás) sejtfolyamataiban fejtik ki aktivitásukat.

A Drosophila melanogaster miozin 7b-n (Dm7b) végzett részletes kinetikai elemzésünk révén elsőként közöltünk mechanisztikus modellt a miozin 7 működéséről (2. táblázat) (11). Azt találtuk, hogy a Dm7b a gerinces miozin 5a-hoz hasonló enzimatikus sajátságokat és magas (80 % feletti) terhelési arányt mutat, ami lehetővé teszi a kétfejű processzív motorműködést. Hasonló kinetikai mechanizmust derítettünk fel a Dm7a izoforma esetén is, ahol azt találtuk, hogy a mechanokémiai ciklus sebesség-meghatározó lépése az aktomiozin.ADP komplexnek az ADP-felszabadulást megelőző, potenciálisan terhelésérzékeny szerkezetváltozása (12). Röviddel a Dm7b mechanizmusát feltáró munkánk után megjelent cikkében egy másik csoport a gerinces miozin 7b-ről is kimutatta, hogy az magas terhelési aránnyal működik (176).

Egyedimolekula-fluoreszcencia vizsgálatokkal is jellemeztük egy kétfejű miozin Dm7a motorkonstrukció processzív működését (12). E vizsgálatokból kiderült, hogy a Dm7a – a miozin 5-höz hasonló nagy lépéshossza (30 nm), ám annál mintegy 8-szor lassabb mozgási sebessége (70 nm/s) miatt – a jelenleg ismert izoformák közül a legalkalmasabb a processzív működés videomikroszkópos egyedimolekula-biofizikai jellemzésére (27. ábra).



27. ábra: Zöld fluoreszcens fehérjével jelölt kétfejű Dm7a konstrukció (GFP-Dm7a-HMM) egyedimolekula-fluoreszcencia videomikroszkópos lépésnyomai (A-B; lépéshosszak nm-ben feltüntetve) és lépéshossz-eloszlása (C-D). Az A és C ábrák mindkét, míg a B és D ábrák csak egyik fejen GFP-jelölt konstrukcióval kapott adatokat mutatják. A lépéshosszak normáleloszlás-illesztései a kettősen jelölt molekulák esetén 33 nm (C ábra), míg az egyszeresen jelöltek esetén 60 nm (D ábra) középértéket adtak. (A kettősen jelölt molekulákban a két jelet nem bontottuk fel; ez esetben a jel minden egyes lépésre egy lépéshossznyit, míg az egy fejen jelöltek esetén kétlépésenként két lépéshossznyit mozdult.)

6.1.5 Motor-működésmódok elvi lehetőségei és azok kihasználtsága

A mechanokémiai paraméterek által adott elvi lehetőségeket a miozinmotorok divergens evolúciója nagy mértékben kihasználta a változatos mozgásformák kivitelezésére.

A felderített miozin motorműködések sokféleségének áttekintése céljából a 28. ábrán az előző fejezetekben leírt izoformákat – és néhány mások által vizsgált miozint – a sarkalatos működési paraméterek szerinti háromdimenziós ábrázolásban tüntettem fel. A terhelési arány elsősorban a motoregységek szupramolekuláris szerveződésével áll összhangban: a nagy egységekben (szálakban, membránkötötten) működő motorok esetén az alacsony, míg az egyedi molekulaként működő processzív transzporterek esetén a magas terhelési arány előnyös. Az aktinkötött állapot életideje a létrehozott mozgás sebességének fontos

meghatározója. Az aktin-ADP kapcsoltság (vagyis az aktin és ADP miozinfejhez történő kötésének kölcsönhatása, 6.1.1 fejezet, 1-2. táblázat) a kontraktilis (mozgást létrehozó) és statikus (erőtartó) üzemmódok szempontjából jelentős: alacsony kapcsoltság (azaz az aktomiozin komplex magas ADP-affinitása) az erősen aktinkötött állapotban történő hosszabb időzést tesz lehetővé, ami előnyös a hosszú távú, alacsony energiaigényű erőtartás szempontjából. Nagy egységekben gyors kontrakciót végző motorok esetében viszont a magas aktin-ADP kapcsoltsági hányados előnyös: ez ugyanis azt jelzi, hogy az aktinkötés lecsökkenti a miozinfej ADP-affinitását, amely így csak rövid időt tölt az aktinhoz kötve, és nem akadályozza a többi fej által hajtott kontrakciót.

A miozin szupercsaládon belül a motordomének szekvencia-hasonlósága – ami alapján az egyes osztályokat és alosztályokat szokás kijelölni – szoros összefüggésben áll az egyes izoformák nyaki és farok- (effektor) doménjeinek összetételével (5. ábra) (*93;96*). Ez azt jelzi, hogy a domén- és alegység-összetétel evolúciósan konzervált sajátság, és a mai állapot különböző molekularészek koevolúciójának eredménye. A 28. ábráról azonban élesen kitűnik, hogy az egyes miozin osztályok tagjainak funkcionális sajátságait elsősorban az sejtbeli és élettani funkciók diktálják: evolúciósan közeli rokon (egy osztályba tartozó) izoformák működési tulajdonságai igen eltérőek lehetnek, illetve konvergencia figyelhető meg egymással csak távoli rokonságot mutató (különböző osztályokba tartozó) formák esetén. A mechanoenzimatikus sajátságok tehát rugalmasan, viszonylag gyorsan változhatnak az evolúció során: ez a jelenség minden bizonnyal hozzájárul az eukarióta életformák nagyfokú komplexitásához és alkalmazkodó-képességéhez.



28. ábra: Miozin izoformák működési paraméterek szerinti megoszlása. a: humán miozin 1c (177), b: Dictyostelium miozin 1b (178), c: patkány miozin 1b (179), d: nyúl gyors vázizom miozin 2 (138), e: Dictyostelium miozin 2 (138), f: csirke simaizom miozin 2 (142),

g: humán NM2A (3), h: egér NM2C (8), i: humán NM2B (1), j: egér miozin 5a (25), k: Dm5 (10), l: sertés miozin 6 (97), m: Dm7a (12), n: Dm7b (11), o: szarvasmarha miozin 10 (7)

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

A következőkben ismertetendő munkákban azt igyekeztünk részleteiben felderíteni, hogy a 6.1 fejezetben bemutatott 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 a 6.2.1 fejezetben tárgyalom. Az erőgenerálás energetikai megközelítésében kiemelkedő jelentőségű, hogy megismerjük annak kezdő- illetve végállapotát: ezekről a 6.2.2 illetve 6.2.3 fejezetekben lesz szó. A rákövetkező három fejezetben leírt munkákban azt vizsgáltuk, hogy a miozinfej nukleotid-kötőhelye és erőkarja között milyen szerkezeti-kinetikai kapcsoltság áll fenn, és ennek mi a funkcionális jelentősége: az erőkarra gyakorolt hatás szabályozhatja-e az aktívhelyen zajló enzimciklust, illetve az aktívhely befolyásolása kihat-e az erőkarmozgás által megvalósuló mozgatóképességre?

6.2.1 A hatékony erőgenerálás útvonalai

A rendelkezésre álló ismeretek szintézise azt sugallja, hogy az aktomiozin általi erőgenerálás nem-egyensúlyi, párhuzamos reakcióutakat magába foglaló mechanizmus révén valósul meg.

A hatékony erőgenerálás érdekében a miozinfej erőkar-lecsapásának aktinhoz kötött állapotban kell megvalósulnia. Az erőgenerálás azonban – látszólag ellentmondásos módon – az ATPáz ciklus leggyengébb aktin-affinitású állapotából, az M.ADP.P_i termékkomplexből indul (4. ábra). Nemrégiben megjelent összefoglaló cikkünkben (26) Málnási-Csizmadia Andrással azt vizsgáltuk meg, hogy milyen mechanizmusok terelik a mechanokémiai ciklust a hatékony erőgenerálás felé a felesleges, "ATP-pocsékoló" ciklusok helyett. Másrészről azt elemeztük, hogy az erőgenerálás során lezajló három kulcsesemény – az aktinkötés, az erőkar lecsapása és a hidrolízis-termékek felszabadulása – milyen lehetséges kapcsoltsági módokban állhat egymással, és ezek közül melyek valósulnak meg a miozin működési ciklusa során. Az ismertetett fejtegetések jelentős részben a csoportjaink munkájából származó eredményeken alapulnak.

Aktin távollétében a miozin enzimciklus sebesség-meghatározó lépése a miozinfej felhúzását és az ATP-hidrolízist követő erőkar-visszacsapás, amely az M.ADP.P_i termékkomplexben történik (4. lépés a 2. ábrán) (*88*). E visszacsapás megtörténte – mivel visszafordítja a felhúzás során létrejött szerkezetváltozást, de nem jár erőgenerálással – felesleges, energiapocsékoló enzimciklushoz vezet. A hatékony ciklus kulcsjelensége, hogy az aktinhoz való kötődés révén e lépés több nagyságrenddel aktiválódik (sebességi állandója megnő), ami a ciklust az aktinkötött erőkar-lecsapás – így a hatékony erőgenerálás – felé hajtja.

Az erőgenerálás fentebb felsorolt kulcseseményei számos különböző útvonalon hatékonyan megvalósulhatnak. A különböző útvonalak azonban eltérő energetikai profilokat eredményezhetnek, ami nagyban befolyásolhatja a rendszer mechanikai teljesítményét.

Ezért alapvető fontossággal bír az erőgenerálás párhuzamos útvonalain megvalósuló kinetikai fluxusok meghatározása.

A folyamat a miozinfej aktinról levált, felhúzott erőkarú, alacsony aktin-affinitású (nyitott árokkal rendelkező) állapotában kezdődik, és a fej erősen aktinkötött (zárt árkú), lecsapott erőkarú formájában végződik (29. ábra). Különböző laboratóriumokban izomrostokon végzett vizsgálatok eredményei azt sugallják, hogy az erőgenerálás (és az erőkarlecsapás) megelőzi a foszfát felszabadulását, így a 29. ábrán bemutatott részlépések mind a miozinfej ADP.P_i-kötött termékkomplexében történnek (180-183). Mások azonban arra következtetnek, hogy a lecsapás a foszfát-felszabadulás után, ADP-kötött állapotban történik (184;185). A 29. ábrán bemutatott séma általánosan alkalmazható: a miozinfej nukleotidállapotától függetlenül bemutatja azt a három lehetséges útvonalat, amelyeken hatékony (aktinkötött) erőkarlecsapás történhet. A többi útvonal mechanikailag haszontalan ciklushoz vezet. A bemutatott eseményeket a nukleotid-kicserélődés folyamata követi, amely a következő ATP-molekula erős kötéséből kifolyólag gyakorlatilag irreverzibilisnek tekinthető, és a rendszert a következő mechanokémiai ciklus felé tereli.



29. ábra: Az erőgenerálás párhuzamos útvonalai. Az ATP-hidrolízist követően a miozinfej alacsony aktin-affinitású (nyitott árkú), felhúzott erőkarú állapotba kerül (bal alsó sarok). A hatékony erőgeneráláshoz vezető három lehetséges útvonalat narancs, piros és kék nyilakkal ábrázoltuk. A narancs útvonalon az árokzáródást az aktinkötés és a rákövetkező erőkarlecsapás követi. A másik két útvonal az aktinkötéssel indul. A piros úton az árokzáródás megelőzi az erőkarlecsapást. A kék úton a lecsapás akkor történik, amikor az árok még nyitva van, és a folyamatot az árokzáródás zárja. A kísérletes adatok alapján a narancsszínű útvonal csekély fluxust hordoz, míg a piros és kék utak egyaránt jelentős fluxusarányt képviselhetnek. Az ATP-pocsékoló ciklushoz vezető, aktinról levált állapotban bekövetkező erőkarlecsapás lezajlását (szürke nyíl) kinetikai gát akadályozza.

A három hatékony útvonal közös jellemzője, hogy az aktinkötésnek az erőkarlecsapás előtt kell megtörténnie (29. ábra). Az első útvonal (narancsszínnel jelölve a 29. ábrán) a

miozinfej aktinkötő árkának bezáródásával indul. Ekkor a fej nagy aktin-affinitású állapotba kerül, amely az aktin kötése után megvalósíthatja az erőkarlecsapást. Ezen útvonal fluxusa azonban alacsony, mivel a miozin termékkomplexében az árokzáródás kedvezőtlen (186).

A fennmaradó két hatékony útvonal (pirossal és kékkel jelölve a 29. ábrán) az aktinkötéssel indul, amely így egy gyengén kötött, felhúzott erőkarú komplexet eredményez. Ebből az állapotból kiindulva az aktomiozin kölcsönhatás erősödése és az erőkarlecsapás két különböző sorrendben történhet. A piros úton a nyitott és zárt árkú (gyengén és erősen aktinkötött) állapotok közötti gyors egyensúlyt az erőkarlecsapás követi. A lecsapás azonban – amint a kék nyilak mutatják – gyengén aktinkötött állapotban is megtörténhet, amit az aktomiozin kölcsönhatás rákövetkező erősödése stabilizálhat, ha az árokzáródás gyorsabban történik, minta az aktinról való leválás (187). A rendelkezésre álló kinetikai és termodinamikai adatok alapján a piros és kék utak egyaránt jelentős fluxust hordozhatnak (88;183). A hatékony erőgenerálás tehát több párhuzamos útvonalon valósulhat meg. A bemutatott modell fontos sajátsága, hogy – mivel számos részlépés sebességi állandója hasonló – az erőgenerálás köztiállapotai sohasem érik el a belső egyensúlyt.

A gyenge és erős aktinkötő állapotok közötti egyensúly állandóját mechanikailag terheletlen kísérleti körülmények között határozták meg. A jövő kihívásai közé tartozik e paraméter terhelésfüggésének meghatározása. A 6.2.2 fejezetben ismertetendő eredményeink azt mutatták, hogy a magas aktin-affinitású, felhúzott erőkarú állapot (amely a 29. ábrán a narancs és vörös nyilak összefutásánál látható) a blebbistatin nevű miozin-inhibitor segítségével stabilizálható: a gátlószer így egy korábban hozzáférhetetlen köztiállapot vizsgálatát teszi lehetővé.

Láttuk, hogy a miozin ATPáz aktin-aktivációja a hatékony erőgenerálási útvonalak magas fluxusarányát teszi lehetővé. Fontos megjegyezni, hogy az aktiváció 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 (vö. 6.1.5 fejezet). Ezekben ez izoformákban az itt leírt erőgeneráló mechanizmus mellett az ADP-felszabaduláshoz kapcsolt további erőkarlecsapás nagyban hozzájárul a motorfunkció terhelésfüggő szabályozásához, amiről részletesen a 6.2.4 fejezetben ismertetett munkáinknál lesz szó.

6.2.2 Lencsevégen az erőkarlecsapás kezdőállapota

ADP jelenlétében a blebbistatin a miozinfejet egy eddig hozzáférhetetlen – nagy aktinaffinitású, felhúzott erőkarú – köztiállapotban stabilizálja, amely az erőgenerálás kiindulópontját képviseli.

Az erőgenerálás vizsgálatát igencsak megnehezíti az a körülmény, hogy a legfontosabb köztiállapotok (29. ábra) életideje rövid és *steady-state* részaránya nagyon alacsony. A blebbistatin nevű miozin 2 inhibitor azonban – alább ismertetett eredményeink alapján – fontos köztiállapotok stabilizálása révén igen hatékony eszköznek bizonyult a miozin mechanizmusának megértésében.

A blebbistatint (30. ábra) nagy áteresztőképességű inhibitor-keresés során azonosították mint hatékony miozingátlószert (*188*). A molekula szelektíven és nagy affinitással gátolja a miozin 2 izoformák aktivitását (*189*). Részletesen jellemeztük a miozin blebbistatin általi gátlásának kinetikai mechanizmusát (*6*). E munka fő eredményeként kimutattuk, hogy a blebbistatin a miozint aktinról levált termékkomplex (M.ADP.P_i) stabilizálásával gátolja, a foszfát-felszabadulás lassítása révén (31-32. ábrák).



30. ábra: A blebbistatin szerkezete



31. ábra: A blebbistatin stabilizálja a M.ADP.P_i poszthidrolitikus termékkomplexet. Az ábra egy quenched-flow kísérlet eredményét mutatja, amelyben az ATP-hidrolízis tranziens lefutását követtük 5 μ M nyúl vázizom miozin S1 és 50 μ M radioaktívan jelölt ATP összekeverését követően, blebbistatin távollétében (tömör jelek) és jelenlétében (50 μ M inhibitor-koncentrációnál; üres jelek). Az exponenciális lefutású foszfát-burst ($k_{obs} = 40 \text{ s}^{-1}$ blebbistatin nélkül, 20 s⁻¹ blebbistatinnal) után a reakció lineáris steady-state fázisa következett. A burst amplitúdója (n_{Pi}/n_{S1}) 0,31-nak adódott az inhibitor távollétében. A burst-amplitúdó növekedése a hidrolízis egyensúlyi állandójának (K_3 , 16. ábra) megnövekedését, vagyis az M.ADP.P_i komplex stabilizálását jelzi.



32. ábra: A blebbistatin hatása az aktinkötött állapotok részarányára a nyúl vázizom miozin S1 steady-state működése során. A és B: Stopped-flow-kísérletekben kapott pirénaktin fluoreszcencia- és fényszórás-tranziensek, amelyeket 5 μM pírén-aktin és 2 μM S1

elegyének 20 μ M ATP-vel történő összekeverésekor vettünk fel, az inhibitor távollétében (A) és jelenlétében (B; 50 μ M blebbistatin-koncentrációnál). A blebbistatin távollétében az aktoS1 gyors disszociációját (amit a pirén-fluoreszcencia növekedése illetve a fényszórás csökkenése jelez; $k_{obs} = 80 \text{ s}^{-1}$) 10 másodperces steady-state periódus követte. Ezután – az ATP-készlet kimerülése miatt – a jelváltozások megfordultak, ami az aktoS1 komplex újraképződését jelzi. Blebbistatin jelenlétében a gyors disszociációs fázis hasonló volt ($k_{obs} =$ 90 s⁻¹), de a jelek nem tértek vissza az eredeti állapotba, ami aktinról levált S1-állapot stabilizálódását jelzi. A C ábrán aktoS1 ultracentrifugálásos kísérletek eredménye látható. A következő minták felülúszójának (S) és csapadékának (P) SDS-gélelektroforetikus képe (S1-nehézlánc csík) látható (blebbistatin távollétében illetve 50 μ M blebbistatin jelenlétében): M: 20 μ M S1; AM: 20 μ M S1 és 50 μ M aktin; AMT: 20 μ M S1, 50 μ M aktin és 10 mM ATP. Denzitometriás elemzés alapján ATP jelenlétében az S1-molekulák 10 %-a ülepedett az F-aktinnal blebbistatin távollétében, míg az inhibitor jelenlétében ez az arány 4%-ra csökkent.

A kapott eredmények azt sugallták, hogy a blebbistatin rendkívül hasznos eszköz sejtbiológiai és élettani vizsgálatok céljára, hiszen az inhibitor adásával a miozin 2 funkciója szelektíven kiüthető úgy, hogy a sejtben nem jönnek létre nemkívánatos inaktív aktomiozin kölcsönhatások. Ezt az azóta megjelent nagyszámú publikáció igazolta.

Hetényi Csaba közreműködésével, vak-dokkolásos elemzéssel meghatároztuk a blebbistatin kötőhelyét a miozinon (33. ábra) (6). Eredményeink azt mutatták, hogy az inhibitor a miozinfej aktinkötő árkának mélyére köt. Ez az eredmény igazolást nyert egy később megjelent kristályszerkezet révén (190).



33. ábra: A blebbistatin kötőhelye a miozinban

A blebbistatin által ATP hozzáadása után stabilizált miozin köztiállapot – sejtbiológiai kísérletekben rendkívül előnyös tulajdonságai ellenére – szerkezetileg nagyban hasonlított a már korábban ismert, aktinról levált M.ADP.P. állapotra (84;85;190), ezért az erőgenerálás szerkezeti mechanizmusának megértésében nem hordozott jelentős többletinformációt. intermedierek azonosítása céljából ezért spektroszkópiai További kísérletekben részletesebben megvizsgáltuk a blebbistatin által különböző nukleotidok jelenlétében felvett miozin-konformációkat. A szerkezetek spektroszkópiai és gyorskinetikai jellemzéséhez egytriptofános Dictyostelium miozin 2 motordomén konstrukciókat használtunk, amelyek az aktinkötő árok, illetve az erőkar mozgását érzékelték (34a-b ábra) (28;87;186). Nagy meglepetésre azt találtuk, hogy a blebbistatin ADP jelenlétében (az ATP-szennyezés gondos kiküszöbölése mellett) egy aktint erősen kötő, ám felhúzott erőkarú intermediert stabilizál. A miozin.ADP.blebbistatin komplex nagy aktin-affinitását ultracentrifugálásos kísérletekkel (34c ábra), az erőkar felhúzott állapotát pedig elektronmikroszkópos felvételekkel (34d ábra) is igazoltuk. Ez a köztiállapot, jóllehet a miozin mechanizmusában kiemelkedő fontosságú (nagy hasonlóságot mutat a 29. ábrán a piros és narancs nyilak összefutásánál található állapottal), eddig nem volt hozzáférhető, mert inhibitor távollétében igen rövid az életideje. Adataink tehát arra utaltak, hogy a blebbistatin már eddig is ismert széleskörű sejtbiológiai és élettani alkalmazási lehetőségei mellett a miozinmechanizmus szerkezeti alapjainak felderítésében is további hasznokkal kecsegtet.



34. ábra: A blebbistatin stabilizálja az erőgeneráló lépés kezdőállapotát. A-B: Egytriptofános miozin mutáns (W501+, 5 μ M) triptofán fluoreszcencia-emissziós spektrumai különböző nukleotidok (100 μ M ADP, illetve 1 mM ATP) jelenlétében, blebbistatin nélkül (A) illetve a gátlószer jelenlétében (B; 50 μ M blebbistatin). A W501+ az erőkar szenzora: magas fluoreszcenciája blebbistatin és ADP jelenlétében a felhúzott erőkarú állapotot jelzi. C: A blebbistatin nem változtatja meg a miozin-ADP komplex magas aktin-affinitását. Az ábra az ADP-kötött miozinfejek (2 μ M (nagy ábra) illetve 1 μ M (kis ábra) miozin, 100 μ M ADP) aktinkötöttségi hányadának aktinkoncentráció-függését mutatja (K_{d, aktin} < 1 μ M), amelyet ultracentrifugálást követő SDS-PAGE denzitometriás analízis révén határoztunk meg blebbistatin nélkül (teli négyzetek) illetve a gátlószer jelenlétében (üres négyzetek; 100 μ M blebbistatin). D: Elektronmikroszkópos felvételek, amelyek azt igazolták, hogy a blebbistatin erőkar-felhúzást indukál az ADP-kötött miozinfejekben (2 μ M nyúl vázizom S1, 1 mM ADP, 100 μ M blebbistatin).

6.2.3 Az aktinkötéssel járó energia-változások és a miozin torziós rugója

A különböző miozinok aktinkötésének energetikai profilját az árokzáródás folyamata határozza meg. A motordomén torziós rugójaként működő β-lemez megfeszül az erőgenerálás során.

A miozin erőgenerálásának alapvető mozzanata az aktomiozin kölcsönhatás létrejötte és megerősödése. Az erőkifejtő lépés során létrejövő erős aktinkötés fontos energetikai hajtóerőt képvisel (191). Az erősen aktinkötött, nukleotidmentes (*rigor*) állapot az erőkifejtő lépés végállapota (4. ábra) (43;91). E fontos állapot atomi szerkezetét azonban több évtizednyi erőfeszítés ellenére sem sikerült meghatározni (43). A különálló fehérjék (miozin

motordomén, aktin monomer) kristályszerkezeteinek a rigorkomplex elektronmikroszkópos képeibe történő dokkolása arra derített fényt, hogy a motordomén – akkor rendelkezésre álló – aktinmentes szerkezetében (amely gerinces vázizom miozinból származott) megfigyelt aktinkötő ároknak be kell záródnia az erős aktinkötés létrejöttéhez (*90;192*). Ez a feltételezés összhangban volt a klasszikus, Geeves, Goody és Gutfreund által javasolt "3G" kinetikai modellel, amely szerint az erős kötés egy másodrendű gyenge aktinkötési lépés utáni szerkezetváltozás eredményeképpen jön létre indukált illeszkedéses mechanizmus révén (kék nyilakkal jelzett útvonal a 35. ábrán) (*193;194*).



35. ábra: Az aktinkötés és az árokzáródás szerkezeti és kinetikai útvonalai. Aktin távollétében a miozinfej (szürke) nyitott és zárt árkú szerkezeteket vehet fel, amelyek egymásba alakulását a $K_{zárt}$ egyensúlyi állandó jellemzi (felső sor). Azokban a miozin izoformákban, amelyek aktin távollétében a nyitott szerkezetet foglalják el nagy arányban, az aktinhoz (világoskék) való kötődés a "3G" indukált illeszkedéses útvonalat követi (kék nyilak), amely egy kezdeti gyenge kölcsönhatásból (K_{gyenge}) és az ezután következő szerkezet-változásból ($K_{A, zárt}$) áll (193;194). Azok a miozinok, amelyek jelentős arányban felveszik a zárt árkú szerkezetet aktin távollétében is, az aktinhoz jelentősebb konformációváltozás nélkül köthetnek ($K_{erős}$).

Később kiderült, hogy a miozin 5a nukleotidmentes állapotban zárt árkú szerkezetet vesz fel aktin távollétében is, amely jelentősebb módosítás nélkül dokkolható a rigorkomplex elektronmikroszkópos képébe (91;195;196). Carolyn Cohen (Brandeis Egyetem) röntgenkrisztallográfiai munkacsoportjával együttműködésben kiderítettük, hogy különböző puhatestűekből (fésűkagyló (*Placopecten magellanicus*), kalmár (*Loligo pealei*)) származó izom-miozin 2 izoformák szintén zárt árkú szerkezetet vesznek fel aktin és nukleotid távollétében (15). Az aktinkötés kinetikai jellemzésével kimutattuk, hogy az árokzáródási reakció aktivációs energiája összefüggésben áll a miozin árkának aktin távollétében tapasztalt nyitott vagy zárt állapotával. Az aktin távollétében is zárt árokkal rendelkező miozin izoformák – nukleotidmentes állapotban – tehát közvetlenül, szerkezetváltozás nélkül is képesek az erős aktinkötésre (35. ábra).

Fluoreszcencia-spektroszkópiai, gyorskinetikai és Kardos József segítségével végzett kalorimetriás kísérletsorozatok révén kimutattuk, hogy ez a szerkezeti változatosság pontos korrelációt mutat az egyes miozinok aktinkötésének energetikájával: ha az aktinkötési folyamat árokzáródást indukál, akkor endoterm karakterű; ha az árok eleve zárt aktin távollétében, akkor az aktinkötés exoterm (36. ábra) (27). A területen korábban uralkodó nézetekkel ellentétben azt találtuk, hogy az egyes miozinok aktin távollétében megfigyelhető árokzáródási képessége nem közvetlenül az aktinkötés sebességét vagy affinitását, inkább annak szerkezeti-kinetikai útvonalát határozza meg (35. ábra).



36. ábra: Különböző miozinok aktinkötésével járó entalpiaváltozás. Nukleotidmentes (fekete) állapotban egyedül a nyúl vázizom miozin 2 aktinkötése endoterm folyamat. Az ároknyílást indukáló ADP jelenléte (narancs) valamennyi miozin aktinkötését endoterm irányba tolja el. Az ábrán bemutatott oszlopok a fluoreszcencia-spektroszkópiai, gyorskinetikai és kalorimetriás kísérletsorozatok eredményeinek átlagait és standard hibáit tükrözik.

Hetényi Csabával együttműködésben végzett atomi szintű energetikai számításaink azt jelezték, hogy az árokzáródással járó kedvezőtlen entalpia-változás a motordomén magjában elhelyezkedő hétszálú β-lemez (*transducer*, 3. ábra) torziós feszüléséből származik (27). Ez a szerkezeti elem jelenlegi nézetek szerint a nukleotid- és aktin-kötőhelyek közötti allosztérikus kommunikációt belső erőátvivő rugó gyanánt szolgálja (43). A miozinban tehát – ha az aktinkötés nyitott árkú (pl. nukleotidkötött) állapotból indul – belső feszültség ébred az aktinhoz történő precíz térbeli illeszkedés érdekében. Ez a következtetés ellentmond korábbi spekulációknak, amelyek szerint a *transducer*nek a rigor szerkezetben megfigyelhető torziós szöge képviseli az ismert szerkezetek közül a mechanikailag leginkább relaxált formát.

Ismeretes volt, hogy a miozin aktin- és nukleotid-kötése közötti antagonisztikus viszony a motorműködés egyik kulcspontja. Málnási-Csizmadia Andrással együttműködésben ezért megvizsgáltuk, hogy a záródás kinetikája milyen viszonyban áll az aktin illetve a nukleotid kötésével. Az aktinkötő árok két oldalára ciszteineket ültettünk be, amelyeket pirénnel módosítottunk (2). A kapott pirén excimer fluoreszcencia-jelek segítségével mérni tudtuk az árokzáródás kinetikáját, illetve kimutattuk azt, hogy különböző nukleotidok, amelyek az aktin-kölcsönhatás erősségének változásait okozzák, ezt a hatást az aktinkötő árok szerkezetének változtatásán keresztül érik el.

Az aktin-kötést Edward Korn (National Heart, Lung and Blood Institute, USA) csoportjával együttműködésben mutagenezissel is vizsgáltuk. Kimutattuk, hogy olyan természetesen előforduló mutációk, amelyek emberben különböző kardiomiopátiákat okoznak, hatásukat az aktin-kötés kinetikájának megváltoztatásán keresztül fejtik ki (9).

6.2.4 Terhelésfüggő nukleotidcsere szabályozza a nem-izom miozin 2 üzemmód-váltását

A nem-izom miozin 2 motoregységek közötti, mechanikai terheléstől függő allosztérikus koordináció a rendszer kontraktilis és statikus (erőtartó) üzemmódjai közötti váltást tesz lehetővé, amely a sejtmozgások precíz szabályozására szolgál.

Az eddig említett kísérletek az izolált motordomén energia-átalakító működésének megértését célozták. *In vivo* azonban gyakorlatilag minden miozin több motoregységből álló szerveződésben (kétfejű dimerként, illetve szálakba vagy egyéb szupramolekuláris egységekbe kötegelve) fejti ki működését (*37;48*). A mechanikailag és energetikailag hatékony működés megköveteli a motoregységek (fejek) tevékenységének egymásra hatását. Ennek a – magasabb szerveződési szinten zajló – kommunikációnak a megvalósítására a motorenzimek az egyes fejekre a nyak "húzásán" keresztül ható mechanikai terhelést használhatják fel. Ez a kommunikációs forma a klasszikus allosztéria-fogalom kiterjesztésére ad alapot: az egyes motoregységekre ható "külső" mechanikai erő – a motordomén szerkezetének illetve energiatájképének módosításán keresztül – döntően befolyásolhatja az enzimciklus kinetikai-energetikai paramétereit.

Az erőtartó szerep alapján azt feltételeztük, hogy az NM2 izoformák (lásd 6.1.1 fejezet) kinetikai sajátságainak erősen terhelésfüggőnek kell lennie. Ezért kidolgoztunk egy olyan eljárást, amelynek segítségével a nukleotidkötés és az ADP-felszabadulás, az ATPáz ciklus két kulcslépése mechanikailag terhelt állapotban is vizsgálható oldatbeli körülmények között (37-38. ábrák) (17). Azt találtuk, hogy – a nukleotid-kötéssel ellentétben – az ADPfelszabadulás kinetikája erősen terhelésfüggő mind NM2A, mind NM2B esetében (ráadásul NM2B esetében még kifejezettebben, mint NM2A esetén; 3. táblázat). Ez a tulajdonság ellenirányú (a miozin mozgatási irányával ellentétes) erő esetén az ATPáz ciklus drasztikus lelassulását, illetve a terhelési arány növekedését okozza (17). E szabályozófunkció lehetővé teszi, hogy ellenirányú terhelés esetén a nem-izom miozinok aktinkötésük életidejének igen jelentős megnövelésével, amely ebben az állapotban – az izom-miozin milliszekundumos életidejétől drasztikusan eltérve – akár több percet is elérhet, rendkívüli energiahatékonysággal (alacsony ATPáz aktivitás mellett) hosszú távú erőtartásra legyenek képesek. Ugyanezen jelenség azt is biztosítja, hogy "asszisztáló" (a miozin mozgási irányával megegyező) erőhatás érzékelésekor az NM2 ciklusa felgyorsuljon és terhelési aránya csökkenjen; így elkerülve azt, hogy e miozin a gyorsabban mozgó motorok (pl. simaizommiozin) által hajtott kontrakciót fékezze. Az általunk javasolt mechanizmust Ronald Rock csoportjának későbbi egyedimolekula-erőmérései is igazolták (197).



37. ábra: NM2 enzimkinetika terhelésfüggés-mérésének elvi alapja. A: Amikor két független miozinfej (balra, kék) az aktinszálon (világoskék) egymás mellett elhelyezkedő kötőhelyekhez köt, erőkarjaik vége egymástól a kötőhelyek által meghatározott távolságra helyezkedik el. Mindkét fejével aktinkötött kétfejű (HMM) konstrukció esetén azonban az erőkaroknak a közös szárhoz (kék) kell összetartaniuk, így az egyes fejek különböző torzulást szenvednek (nyilak). A torzulás okozta kinetikai változások kísérletesen mérhetők az alábbi módon (vö. 38. ábra). B: Bal oldalon az aktoHMM.mdADP hármas komplex látható (a fluoreszcens dmADP-t csillagozott D jelöli). A hátsó (az aktinszál mínusz-vége felé eső) miozinfejre (mályvaszín) asszisztáló (erőkifejtési irányával megegyező irányú) erő hat, amely az ADP-felszabadulás gyorsulását okozza. Az elülső (az aktinszál plusz-vége felé eső) fejre (zöld) ható ellenerő (amely a fej erőkifejtésével ellentétes irányba hat) viszont lassítja az ADP-felszabadulást. Felső útvonal ("ATP chase" kísérletek, piros nyilak): az aktoHMM.dmADP komplex feleslegben alkalmazott ATP-vel történő gyors keverése után a hátsó fej a dmADP-t ATP-re (T) cseréli, a terhelés által gyorsított k_{+} ADP-disszociációs sebességi állandónak megfelelően. E fej ATP-kötése az aktinról történő gyors leválással jár, aminek eredményeképpen az elülső fejről az mdADP terheletlen állapotban (kék fejek) fog disszociálni, ko sebességi állandóval. Alsó sor ("ADP chase", fekete nyilak): jelöletlen ADPfelesleggel történő gyors keverés után az első nukleotidcsere a hátsó fejen fog megtörténni (k₊). A dmADP ADP-re (D) cserélődése azonban nem okozza a fej aktinról történő disszociációját, így az elülső fejen az ADP-disszociáció a terhelés által lassítva, k_ sebességi állandóval fog megtörténni. C–H: Negatívan festett elektronmikroszkópos felvételek. C–E: NM2A-HMM aktinon: rigor (nukleotidmentes) állapotban (C), 100 μM ADP-ben (D), valamint 123 HMM-molekula átlaga ADP-ben (E). F–H: NM2B-HMM aktinon: rigor állapotban (F), 100 μM ADP-ben (G), és 89 HMM-molekula átlaga ADP-ben (H). A nyilak egyedi, mindkét fejjel aktinkötött HMM-molekulákra mutatnak.



38. ábra: Fluoreszcens mdADP ligandum NM2-fejekről történő disszociációjának stoppedflow-tranziensei. A bemutatott tranzienseket HMM.dmADP vagy aktoHMM.dmADP komplexek nagy feleslegben alkalmazott jelöletlen "chaser" ATP-vel vagy ADP-vel történő gyors keverésekor vettük fel (keverés előtti koncentrációk: 0,4 μ M miozinfej, 10 μ M dmADP, 0 vagy 2 μ M aktin, és 2 mM ATP vagy ADP). A görbéket a jobb láthatóság érdekében az y-skála mentén elcsúsztattuk. A: Aktinmentes NM2A-HMM esetén az ATP illetve ADP chase tranziensek k_{obs} értékei hasonlóak voltak (terheletlen állapot mindkét esetben): 3.3 s⁻¹ illetve 4.1 s⁻¹. B: Hasonlóképpen az aktinmentes NM2B-HMM esetén $k_{obs} =$ 0,27 s⁻¹ illetve 0,33 s⁻¹ értékeket kaptunk a bemutatott kísérletben. C: AktoNM2A-HMM esetén az ATP chase tranziens 2,9 s⁻¹ k_{obs} -t eredményezett (mivel k_+ és k_0 közel estek egymáshoz, így nem váltak szét), míg az ADP chase tranziens kétfázisú volt 11 s⁻¹ (k_+) és 0,86 s⁻¹ (k_-) sebességi állandókkal. D: AktoNM2B-HMM esetén az ATP chase tranziens k_{obs} értéke 0,22 s⁻¹-nak adódott (k_+ , k_0), míg az ADP chase tranziens kétfázisú volt 0,59 s⁻¹ (k_+) és 0,021 s⁻¹ (k_-) sebességi állandókkal a bemutatott kísérletekben (3. táblázat).

Izoforma	Konstrukció	k _{on, ATP} (μM ⁻¹ s ⁻¹)	k _{on, ADP} (μM ⁻¹ s ⁻¹)	ADP-disszociáció		
				k ₀ (s ⁻¹)	<i>k</i> ₊ (s⁻¹)	k _ (s⁻¹)
NM2A	kétfejű (HMM)	0,23	3,4	2,9	11	0,59
	egyfejű (S1)	0,21	2,7	2,7		
NM2B	kétfejű (HMM)	0,25	3,1	0,27	1,1	0,023
	egyfejű (S1)	0,40	2,4	0,38		

3. táblázat: A nukleotidkötés és az ADP-disszociáció sebességi állandói. A feltüntetett értékek fluoreszcens nukleotidok illetve pirén-aktin felhasználásával kapott eredmények átlagai. Az állandók elnevezésének magyarázatát a 37. ábra szövege tartalmazza. A bemutatott eredmények egy olyan – a filamentális miozinok körében addig "elképzelhetetlennek" tartott – mechanizmusra engedtek következtetni, amelyben mechanikai terhelés hatására a kétfejű NM2-mokelulák kettősen aktinkötött állapota is jelentős arányban járulhat hozzá a tehertartáshoz a működési ciklus során (39. ábra). Ez a kontraktilis és tehertartó ciklusok közötti üzemmódváltás modelljéhez vezetett (17).



39. ábra: Az NM2 kontraktilis és tehertartó ciklusai. A bal oldali ábrarészen a jobb oldalán rögzített aktinfilamentum alacsony terhelés mellett működik együtt az NM2-vel. A foszfát (P) és ADP (D) felszabadulása az erősen aktinkötött NM2 fejről a miozinfarok aktin mentén történő transzlokációjával jár: ilyen körülmények között egyszerre csak egy fej kötődik az aktinhoz (sárga: egy fejjel kötött állapotok, fehér: aktinról levált állapot; T = ATP). Ellenerő hatására (amit a miozinfarok végére rajzolt nyíl jelez) az aktinkötött fej szerkezete torzul, ami az ADP-felszabadulás lelassulását és a mindkét fejjel aktinkötött (kék) ADP-ADP állapot kialakulását eredményezi (szürke háttér), amelyet az elektronmikroszkópos képeken ATP távollétében is megfigyeltünk (37e és 37h ábrák). Az NM2-molekula elülső és hátsó fejei ezután úgy folytathatják a működési ciklust, hogy közben a molekula – az ellenerő további fennállása esetén – folyamatosan aktinkötött állapotban marad. Az elülső fej az ADP-t rendkívül lassan engedi el, ezért az elülsőfej-ciklusok ritkábban történnek meg (vékony nyíl), mint a hátsófej-ciklusok (vastag nyíl). A 37. ábrán bemutatott, a hátsó fej ADP-felszabadulására irányuló gyorsító hatás a külső terhelés hatására itt megfordul. Az elülsőfej- és hátsófej-ciklusokat összekötő kék nyíl azt jelzi, hogy a két ciklus a levált fej elmozdulása révén egymásba alakulhat. A működés során az NM2 molekula processzív előre- vagy hátralépése is megtörténhet.

Az ADP-felszabadulás terhelésfüggő mivolta arra is utalt, hogy az ADP-kötött és ADPmentes formák között erőkar-mozgásnak kell történnie. Ezt a feltételezést alátámasztotta egy másik munka, amelyben Hiroyuki Iwamotóval (*JASRI*, Japán) együttműködésben kisszögű röntgenszórás-mérésekkel megállapítottuk, hogy az NM2 izoformák minden eddig vizsgált miozinnál nagyobb, közel 5 nanométeres erőkar-kilengést mutatnak az ADPfelszabaduláshoz kapcsoltan (40. ábra) (*16*). Ez az érték kinetikai-energetikai adataink alapján végzett számításainkkal is összhangban állt (*17*).



40. ábra: Aktinkötött miozin 2 fejek kisszögű röntgenszórással és a fehérjék kristályszerkezeteinek dokkolásával megállapított szerkezete nukleotidmentes (apo) és ADP-kötött állapotban. A vázizom miozin 2-vel (fent) ellentétben az NM2 (lent) jelentős (5 nm-es) erőkar-elmozdulást mutatott ADP-kötés hatására.

6.2.5 Nukleotidcsere szabályozza a miozin 5a haladási sebességét

A miozin 5a processzív haladásának sebességét az ADP-felszabadulás kinetikája határozza meg. A nukleotid-kötőhely tervezett módosításával – az enzimatikus sajátságok befolyásolása révén – a motor sebessége és futáshossza hangolható.

A kétfejű egyedi molekulaként, alternáló (*hand-over-hand*) mechanizmussal lépegető miozin és kinezin izoformák processzív haladásának feltétele, hogy bármely időpillanatban legalább az egyik fej kötődjön a sínhez. Ehhez az enzimciklusok összehangolt, eltolt fázisú működése szükséges. A *steady-state* működés során a miozin 5a egyedi fejei a ciklusidő kb. 70 %-át töltik aktinkötött állapotban. A fejek közti koordináció hiányában egy dimer molekula így átlagosan kb. 10 lépési ciklust végezhetne a sínről való leválást megelőzően. Egyedimolekulamotilitás kísérletek alapján tudjuk viszont, hogy a miozin 5a processzivitása ennél jelentősen magasabb: átlagosan 60 lépés elvégzésére is képes (*154*), ami lehetővé teszi a szállítmány (endoplazmatikus retikulum, melanoszómák, szinaptikus vezikulumok) kb. 2 µm-nyi távolságba való juttatását. Ezt az magyarázza, hogy a két fej között fellépő ellentétes irányú húzóerő a vezető fej – ADP-felszabadulás által limitált – aktin-disszociációjának lassulását (mozgás irányával ellentétes erő hatása), míg a követő fej leválásának gyorsítását (mozgással egyirányú erő hatása) eredményezi (*198-200*). Újabb kísérletek tanúsága szerint a miozin 5a mechanikai koordinációja a processzív haladás energetikai hatékonyságát is növeli a "felesleges", transzlokációhoz nem vezető ATPáz ciklusok elkerülésének elősegítésével (*94*).

A közelmúltban végzett kísérleteinkkel igazoltuk, hogy az ADP-felszabadulás hangolása az élettani funkció betöltését segítő adaptációs mechanizmusként működik a miozinok evolúciója során (25). Miozin 5a esetén a szállítmány célhelyre juttatása mellett a haladás sebességének optimalizálása is fontos lehet egyes folyamatok során, például a fotoreceptorokban és a belsőfül szőrsejtjeiben működő, gyors ingerületvezetést biztosító szinapszisok esetében (201). Kimutattuk, hogy a nukleotid-kötőzsebben található *switch* 2 hurok (amely a G-fehérjék, kinezinek és miozinok konzervált szerkezeti eleme; 41a ábra) (55;56) az NTP-hidrolízis katalízise mellett – kiterjedt kommunikációs kapcsolatai révén – biztosítja az NTP hidrolíziséből származó szabadenergia produktív felhasználását. A *switch* 2 szekvenciája a miozin szupercsaládon belül egyetlen pozícióban mutat változékonyságot (amely egér miozin 5a esetén a 439. pozíció; 41a ábra). E pozícióban a miozin 5 osztály tagjai tirozint tartalmaznak, míg ugyanitt számos más miozinosztályban kisebb oldalláncú aminosavak találhatók (*37*). Vad típusú és pontmutáns miozin 5a konstrukciók kinetikai és egyedimolekula-motilitás vizsgálata alapján megállapítottuk, hogy a switch 2 miozin 5-re jellemző változata teszi lehetővé a szállítófehérje gyors processzív működését (*25*). A Mg²⁺-függő ADP-felszabadulás kinetikája a konstrukciókban pontos korrelációt mutatott az aktinon történő transzlokáció sebességével: ezáltal demonstráltuk, hogy a nukleotidcsere kémiai folyamata közvetlenül meghatározza a motor mechanikai teljesítményét (41b-e ábrák; 2. táblázat). Az eredmények azt is jelzik, hogy a switch 2 génsebészeti módosítása mesterséges motorok sebességének hangolására is felhasználható, a processzivitás képességének érintetlenül hagyása mellett.



41. ábra: A switch 2 hurok szerkezete meghatározza az ADP-felszabadulás kinetikáját és a miozin 5a processzív haladási sebességét. A: A switch 2 aminosav-szekvenciája és konzervált kommunikációs útvonalai különböző NTPázokban. B: Vad típusú és switch 2 pontmutáns miozin 5a konstrukciók (X pozíció: egér miozin 5a-ban 439) ADP-felszabadulási tranziensei stopped-flow gyorskinetikai mérésben. Az ábra egy ADP-felszabadulás által limitált pirén-aktin ATP chase kísérlet eredményét mutatja, amelyet 0,2 μM pirén-aktoS1 és 100 μM ADP elegyének 100 μM ATP-vel történő gyors keverésével kaptunk (k_{obs} értékek: 20 s⁻¹ (vad típus); 3,4 s⁻¹ (Y439A); 3,3 s⁻¹ (Y439S); 1,9 s⁻¹ (Y439E)). C: A konstrukciók steadystate ATPáz aktivitásának aktinkoncentráció-függése (V_{max} értékek: 11 s⁻¹ (vad típus); 1,4 s⁻¹ (Y439A); 1,5 s⁻¹ (Y439S); 1,0 s⁻¹ (Y439E)). D: Kétfejű vad típusú (fekete) illetve Y439A mutáns (piros) miozin 5a konstrukciók aktinon való haladásának sebessége TIRF egyedimolekula-motilitás mérésben (sebesség-középértékek: 440 illetve 98 nm/s). A B-D ábrákon bemutatott eredmények alapján az Y439A switch-2 mutáció az ADP-felszabadulás (nukleotidcsere) kinetikai változásán keresztül az ATPáz aktivitás és a mozgási sebesség arányos lassulását okozta. E: Kétfejű miozin 5a konstrukciók processzív futáshosszeloszlása TIRF kísérletben (átlagos futáshosszak: 1300 nm (vad típus; fekete) illetve 1000 nm (Y439A; piros)). Az eredmények megmutatták, hogy az Y439A mutáns haladási sebességének lassulása ellenére a processzivitás és az energetikai hatékonyság változatlan maradt, e sajátságok tehát egymástól függetlenül szabályozhatók.

A fenti eredményekből kitűnik, hogy az ADP-felszabadulás lelassítása a motor transzlokációs sebességét – nem magát a processzivitást – változtatja meg. Egy másik, Howard D. White (*Eastern Virginia Medical School*, USA) csoportjával együttműködésben végzett munkában – amelyben a miozin 5a aktívhelyében lévő switch 1 hurokba vittünk be pontmutációt (S217A) –, az ATP-hidrolízis és foszfát-felszabadulás folyamatait sikerült szelektíven lelassítanunk (*21*). Ez a változás – mivel a gyenge aktinkötő állapotok életidejét növeli – látványosan (25 %-ra) csökkentette a motor terhelési arányát, és ennek megfelelően mintegy 10-szeresen lecsökkentette a miozin 5a átlagos futáshosszát, míg a futási sebesség változatlan maradt.

6.2.6 Az erőkarmozgás visszahatása az aktívhelyen zajló katalízisre

Az ATP-hidrolízist megelőző erőkarfelhúzás katalitikusan aktív konformációba hozza a miozint. A felhúzást elősegítő szubdomén-kölcsönhatás megváltoztatása allosztérikusan kihat a molekula távolabbi pontján zajló ATP-hidrolízis folyamatára.

Az előző munkák eredményei alapján feltételezhető, hogy ha az erőkar mozgását szelektíven befolyásoljuk (pl. irányított pontmutációk révén), akkor annak vissza kell hatnia az ATP-hidrolízis folyamatára. Ezzel összefüggésben megvizsgáltuk, hogy az erőkar konformációs egyensúlya hogyan befolyásolható a miozin szubdoménjei közötti kölcsönhatási felszín változtatásával, illetve ezen egyensúly megváltoztatása milyen hatással van az ATP-hidrolízis, valamint a foszfát-felszabadulás sebességére. A miozin 2 erőkarjának kiindulópontjánál lévő taszító jellegű szubdomén-kölcsönhatás (42. ábra) pontmutáció-indukált változtatásai révén azt találtuk, hogy az erőkarfelhúzás egyensúlyi állandójának megváltozása – a lépések kapcsoltsága folytán – befolyásolja az ATP-hidrolízis kinetikáját, így kimutattuk, hogy a vizsgált kölcsönhatásnak fontos szerepe van az enzimaktivitás finomhangolásában (43. ábra) (18).

A fenti kölcsönhatásban résztvevő egyik aminosav (nyúl vázizom és *Dictyostelium* miozin 2-ben Lys84) szelektíven és enzimállapottól függően jelölhető, így az erőkar-mozgás fontos konformációs szenzora (202). Egy másik munkában egyértelműen azonosítottuk, hogy valóban ez az aminosav jelölődik a kovalens módosítás során (4).



42. ábra: A miozin 2 erőkarjának kiindulópontjánál található szubdomén-kölcsönhatás. A és B: A 84. (N-terminális szubdomén) és 704. (konverter szubdomén) aminosav-pozíciók elhelyezkedése a Dictyostelium miozin 2 motordomén lecsapott (A) és felhúzott (B) erőkarú szerkezeteiben (PDB kódok: 1FMW és 1VOM). C–E: A 84-704 kölcsönhatás a vad típusú (C) illetve a K84M (D) és R704E (E) mutáns konstrukciók energia-minimalizált szerkezeteiben.



43. ábra: Az ATP-hidrolízis megfigyelt sebességi állandói (k_{obs}) triptofán-fluoreszcencia stopped-flow-kísérletekben 2 μM Dictyostelium miozin 2 motordomén és a feltüntetett ATP-koncentrációk összekeverésekor vad típusú (négyzetek), K84M (körök) és R704E (háromszögek) konstrukciók esetén. A hidrolízis maximális sebességi állandója a három konstrukció esetén (a felsorolás sorrendjében) 32, 17 illetve 12 s⁻¹-nak adódott. Az eredmények azt jelzik, hogy a lecsapott (nem-katalitikus) konformációból a felhúzott (katalitikus) konformációba történő átmenetet a vad típusú enzimben a K84-R704 taszító kölcsönhatás segíti. A mutánsokban a kölcsönhatás megváltoztatásával a lecsapott állapotot stabilizáltuk, ami a kapcsolt ATP-hidrolízislépés lassulását okozta.

6.3 Az NTPáz működés specializációja az információ-anyagcsere enzimeiben

A miozin motorokon végzett kísérletek mellett részletesen megvizsgáltuk azt is, hogy az NTPhidrolízis folyamata hogyan zajlik a nukleinsav-anyagcsere különböző enzimeiben. Együttműködőként részt vettem a Vértessy Beáta csoportja által behatóan vizsgált dUTPáz enzim katalitikus mechanizmusának felderítésében, valamint csoportom újabb kutatási irányaként meghatároztuk a RecQ-családba tartozó humán Bloom-szindróma (BLM) DNShelikáz 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. Céljaink között szerepel, hogy felderítsük a molekuláris események hálózatát, amely a BLM-helikáznak a DNS-hibajavításban betöltött aktivitásait (8. ábra) eredményezi.

6.3.1 Energiatermelés helyett specificitás: a dUTPáz katalitikus működése

A dUTPáz enzim – a motorokkal ellentétben – nem az energetikailag hatékony működésre, hanem a szubsztrát szelektív lebontására szakosodott. Katalitikus mechanizmusában ezért fontos tényező a termékgátlás kiküszöbölése.

A dUTPáz alapvető fontosságú a nukleotid-anyagcserében és a sejthalál szabályozásában, hiszen ez az a kulcsenzim, amely a dUTP hidrolízise révén a sejtbeli dTTP és dUTP szintek közötti arány beállításával képes gátolni az uracil DNS-be épülését és az ebből következő ún. timinhiányos sejthalált (203). Az enzim működésmódjának érdekessége, hogy – a miozinnal ellentétben, amelynek a hidrolízisből származó szabadenergia hatékony felhasználásához aktin távollétében lassan kell működnie (6.2.1 fejezet) –, a dUTPáz esetében – ahol a szubsztrát gyors "eltüntetése" és a lehető leggyengébb termékgátlás a célravezető – a termék-felszabadulás igen gyorsan történik, és a hidrolízis a sebesség-meghatározó lépés (19).

6.3.2 Általánosan használható módszer a nukleinsav-motorok működésének vizsgálatára

Kidolgoztunk egy általánosan használható analitikai módszert, amelynek segítségével – a rendelkezésre álló technikai eszközök felhasználásával – a nukleinsav-kötő motorenzimek legfontosabb működési jellemzői egyetlen kísérletsorozatban meghatározhatók.

Az enzimkinetikai állandók, a processzivitás és a mechanokémiai csatolás (lásd alább) meghatározása kulcsfontosságú a motor NTPáz enzimek mind alapkutatási, mind technológia-fejlesztési célú vizsgálatában. Derényi Imre segítségével ezért kidolgoztuk egy általánosan alkalmazható analitikai eljárást, amellyel a nukleinsavak mentén mozgó motorenzimek (transzlokázok, helikázok, polimerázok stb.) mechanizmusának valamennyi kulcsparamétere meghatározható egyetlen, csekély munkaigényű kísérletsorozatban (22).

A nukleinsav-motorok legfontosabb "makroszkopikus" (*steady-state*) paraméterei közé tartozik a transzlokációs sebesség (*k*_{trans}, amelyet leggyakrabban az egy időegység alatt a

nukleinsav-sínen megtett nukleotid-egységek (nt) száma alapján definiálnak), a mechanokémiai kapcsoltsági állandó (*C*, az egy enzim által egy hosszegység (nt) megtétele alatt hidrolizált NTP-molekulák száma) és a processzivitás, azaz a motor képessége számos mechanokémiai ciklusból álló "futás" elvégzésére a sínről történő disszociáció előtt. Kvantitatív módon a processzivitás (*P*) az éppen következő transzlokációs ciklus megtételének valószínűségeként értelmezhető (az ehelyett esetleg bekövetkező, sínről történő disszociáció valószínűsége így értelemszerűen 1-*P*) (4. táblázat).

Paraméter	Mértékegység	Megnevezés	Kapcsolat más	
	nt	Sínhossz (nt – nuklastidagyság)	parameterekkei	
L	n	Sinnossz (nt = nukleotidegyseg)		
D	nt	Kotonely merete		
С	nt ⁻¹	([hidrolizált NTP]/ [enzim]/megtett nt)	$C = k_a/k_{trans} = c/m$	
S	nt	Lépéshossz (megtett nt/[hidrolizált NTP]/[enzim])	s = 1/C	
k _a	s ⁻¹	<i>Steady-state</i> NTP-hidrolízis sebességi állandó a transzlokáció során ([hidrolizált NTP]/[enzim]/s)	k_a = C k_{trans} = c(k_t + k_d) (k_t + k_d = a kinetikai ciklus kumulált sebességi állandója)	
<i>k</i> _{trans}	nt's ⁻¹	Makroszkopikus transzlokációs sebesség	$k_{trans} = k_a / C = m(k_t + k_d)$	
с	-	Csatolási sztöchiometria ([hidrolizált NTP]/ [enzim]/kinetikai ciklus)	$c = mk_a/k_{trans} = Cm$	
т	nt	Kinetikai lépéshossz (megtett nt/kinetikai ciklus)	$m = ck_{trans}/k_a = c/C$	
P	-	Kinetikai processzivitás (a következő kinetikai ciklus megtételének valószínűsége)	$P = k_t / (k_t + k_d)$	
P _{macr}	-	 Makroszkopikus processzivitás, amelyből kiszámíthatók a következő paraméterek: Egy processzív futás során hidrolizált NTP-molekulák száma (végtelen sínen) = P_{macr}/(1–P_{macr}) Egy processzív futás során megtett nukleotid-egységek száma (végtelen sínen) = P_{macr}/(1–P_{macr})/C 	$P_{\text{macr}} = \frac{cP}{1+cP-P}$ $\frac{1}{C} \frac{P_{\text{macr}}}{1-P_{\text{macr}}} = m \frac{P}{1-P}$	

4. táblázat: Az analízis során használt paraméterek

A fenti makroszkopikus paraméterek soklépéses enzimmechanizmusok eredményeképpen jönnek létre, amelyek részletes vizsgálatának mikéntjére a 6.1 és 6.2, illetve 6.3.3 fejezetek számos példát szolgáltatnak. Az itt bemutatott általános módszer a könnyen hozzáférhető, homogén hosszúságú nukleinsav-sínek (pl. oligonukleotidok) és NTP-hidrolízis-szenzorok felhasználásán alapul – nevezetesen azon, hogy kísérletes módszerekkel viszonylag kis munkaigénnyel megmérhető az egy motor által egy adott hosszúságú sínen egy processzív lépéssorozat (futás, *single-round translocation*, 44a ábra) során átlagosan hidrolizált NTP-molekulák száma. Az ilyen kísérletek leginkább gyorskeveréses (*stopped-flow*

vagy *quenched-flow*) műszerek segítségével végezhetők, amelyek egyik mintatartójában a motorenzim és a sín elegye, míg a másikban telítési koncentrációjú NTP valamint "fehérjecsapda" található: utóbbi a processzív futás után a sínről disszociáló motort kváziirreverzibilis módon megkötve megakadályozza újabb processzív futás elindulását. (A DNSkötő motorok leggyakrabban alkalmazott csapdái a negatívan töltött poliszacharidok közül kerülnek ki (pl. heparin).) A hidrolízis-termékek megjelenésének időbeli lefutása fluoreszcens foszfátszenzor (MDCC-PBP) vagy radioaktívan jelölt (pl. γ-³²P-) NTP segítségével követhető. A kapott időlefutásokban az NTP-hidrolízis kezdeti gyors fázisát – amely a egyszeri futásból származik – lassabb NTP-hidrolízis követi, amely a csapda által megkötött enzimmolekulák alacsony hidrolitikus aktivitásából származik (44b ábra). A transzlokációs NTP-hidrolízisamplitúdó a két fázishoz illesztett egyenesek metszéspontjának *y*-vetületeként határozható meg.



44. ábra: NTP-hidrolízis egyszeri futás során. A: Motorenzim (E) futásának kinetikai modellje, amely – telítési NTP-koncentráció mellett – k_t sebességi állandóval tesz előrelépéseket, és k_d sebességi állandóval disszociál a sínről. Az E_r vel jelölt állapotok i számú transzlokációs lépés megtétele után állnak elő, míg az E_T állapot az enzim csapdakötött (trapped) állapotát jelzi a sínről történt disszociáció után. A bemutatott modellben – az egyszerűség kedvéért – az E_T komplex nem rendelkezik hidrolitikus aktivitással. B: Az A ábrán bemutatott modell alapján szimulált NTP-hidrolízis időgörbék (k_t = 10 s⁻¹, k_d = 0,5 s⁻¹, b = 10 nt; vö. 4. táblázat) sínvégről induló enzimmechanizmus esetén (sínhosszak nt egységekben feltüntetve).

Az NTP-hidrolízis-amplitúdó sínhossz-függésének elméleti kezelését a publikációban (22) részletesen levezettük; jelen dolgozatban – a lényeg kiemelése érdekében – csak a kísérleti adatok illesztéséhez legjobban használható kulcsegyenleteket mutatom be. A levezetésben figyelembe vettük egy adott, *P* processzivitású enzim által végrehajtott lépések várható számát végtelen illetve véges (*N* lépésnyi, illetve *L* nukleotid-egységnyi) sínhossz esetén, a *b* kötőhely-méretet, valamint – random indulási pozíció esetén – a startpozíciók eloszlását (4. táblázat). Figyelembe vettük azt is, hogy egy ún. "kinetikai ciklus" (amely a ciklikusan ismétlődő sebesség-meghatározó lépések közötti eseménysorként definiálható) alatt nem feltétlenül csak egyetlen NTP-molekula hidrolízise történik: egy kinetikai ciklus során *c* számú NTP-molekula hidrolízise révén (csatolási sztöchiometria) az enzim *m* nukleotid-egységet (kinetikai lépéshossz) haladhat (4. táblázat). E paraméterek elnevezése megegyezett a Fischer és Lohman által korábban közölt, a miénknél lényegesen komplikáltabb matematikai modellt alkalmazó analízisben használtakkal (*204*).

Ha P 1-hez közeli értékű (P > 0.9, ami fennáll minden, a gyakorlatban releváns esetre), akkor Fischer és Lohman sok-paraméteres egyenletei nem használhatók hatékonyan a

kísérleti adatok elemzésére, mert a c és m értékeket – azok igen jelentős korrelációja miatt – nem lehet függetlenül meghatározni. Megmutattuk, hogy a hidrolízis-amplitúdó sínhosszfüggését leginkább a C = c/m arány határozza meg, amelyet mechanokémiai csatolási állandóként vezettünk be (C így az egy nt-egység megtétele alatt átlagosan hidrolizált NTPmolekulák száma) (4. táblázat). Gyakorlati okokból a következőkben beállítottuk a c = 1 (és így m = 1/C) értéket. E választást az is indokolta, hogy az enzimek többsége egy NTPmolekula hidrolíziséhez kapcsoltan tesz egy mechanikai lépést. Ekkor az NTP-hidrolízisamplitúdó (A) sínhossz- (L) függésére a következő egyenleteket kapjuk:

$$A_{\rm end}\left(L\right) = \frac{P_{\rm macr}}{1 - P_{\rm macr}} \left(1 - P_{\rm macr}^{C(L-b)}\right)$$

sínvégről induló futás esetén (1. egyenlet), illetve

$$A_{\text{rand}}(L) = \frac{P_{\text{macr}}}{1 - P_{\text{macr}}} \left(1 - \frac{1}{C(L-b) + 1} \frac{1 - P_{\text{macr}}^{C(L-b) + 1}}{1 - P_{\text{macr}}} \right)$$

random pozícióból induló futás esetén (2. egyenlet). Mindkét típusú futás előfordul a biológiai motorok világában, ezért mindkét egyenlet gyakorlati jelentőséggel bír.

Fontos megjegyezni, hogy a fenti egyenletekben szereplő, gyakorlati jelentőségű P_{macr} paraméter (amelyet makroszkopikus processzivitásként vezettünk be) értéke c \neq 1 esetén eltér a "valódi" (kinetikai) processzivitás (*P*) értékétől; a két paraméter közötti összefüggést a 4. táblázatban adtam meg.

A fenti két egyenlet hatékonyan alkalmazható az NTP-hidrolízis-amplitúdó kísérletesen meghatározott hosszfüggésének nemlineáris illesztésére (45. ábra), amelyet alkalmaztunk is a BLM-helikáz esetében (6.3.3 fejezet).



45. ábra: Az NTP-hidrolízis-amplitúdó (mol NTP/mol enzim) sínhossz-függése a sínvégről (A) illetve random pozícióból (B) induló futás esetén. A bemutatott görbéket az 1. és 2. egyenletek alapján szimuláltuk (b = 10 nt, C = 1 nt⁻¹ (kék görbék) vagy 2 nt⁻¹ (piros görbék); P_{macr} értékek feltüntetve). A paraméter-korreláció rendkívül alacsony fokát jelzi, hogy a görbék x-tengelymetszete b értékét, kezdeti meredeksége C (A ábra) illetve C/2 (B ábra) értékét, míg a végtelen sínhosszra extrapolált maximális amplitúdó a $P_{macr}/(1-P_{macr})$ hányadost jól láthatóan eredményezi (vö. 4. táblázat). Az 1. és 2. egyenletek L ≥ b értékekre értelmezhetők.

Az amplitúdó-elemzésen túlmenően a transzlokációs NTP-hidrolízisfázis kezdeti meredekségéből (44b ábra) meghatározható a transzlokáció során zajló *steady-state* NTP-hidrolízis sebességi állandója (k_a , 4. táblázat) illetve a makroszkopikus transzlokációs sebesség ($k_{trans} = k_a/C$) is, amely állandók rendszerint nem függenek a sín hosszától.

A fenti egyenletek alkalmazhatóságát szimulált NTP-hidrolízis-lefutások részletes analízisével validáltuk, illetve meghatároztuk kiterjesztett formáikat is, amelyek akkor is alkalmazhatók, ha az enzim a sínvég elérésekor felesleges NTPáz-ciklusokat végez a sínről történő disszociációt megelőzően (22).

A fentieken kívül a gyakorlatban fontos figyelembe venni az alkalmazott fehérjecsapdának az enzim processzivitására gyakorolt nemkívánatos hatását is. Az ideális csapda – a nukleinsav-sínnel ellentétben – nem (vagy igen gyengén) aktiválja az enzim NTPáz aktivitását, valamint nem befolyásolja a k_t és k_d működési állandókat. Míg az előbbi feltétel általában teljesül, a legtöbb csapda – k_t és/vagy k_d megváltoztatása révén – befolyásolja az enzimek processzivitását. Ahhoz, hogy kiszámítható legyen az enzim valódi, csapdahatástól mentes processzivitása, a következő egyenletet vezettük be (3. egyenlet):

$$P([T]) = \frac{K'_{d} + [T]}{\frac{K'_{d}}{P_{0}} + \frac{[T]}{P_{T}}}$$

amelyben P_0 illetve P_T a csapdamentes illetve végtelen csapda-koncentrációra extrapolált processzivitás, [T] a csapda (*trap*) koncentrációja, és K_d ' a csapda-enzim kölcsönhatás látszólagos disszociációs állandója ([T]-vel azonos egységben kifejezve; $K_d' = K_d(k_{t,0}/k_{t,T})$, amelyben K_d a csapda-enzim kölcsönhatás disszociációs állandója, $k_{t,0}$ illetve $k_{t,T}$ pedig a transzlokációs sebességi állandó csapdamentes illetve csapdakötött állapotban). P értékének különböző csapda-koncentrációk jelenlétében történő meghatározása így lehetővé teszi a csapdahatás-mentes valódi processzivitás (P_0) meghatározását. A 3. egyenlet a kinetikai (P) és makroszkopikus (P_{macr}) processzivitás-értékekre egyaránt alkalmazható. Ezt az egyenletet is felhasználtuk a BLM-helikáznak a következő fejezetben leírt részletes vizsgálatában.

6.3.3 A BLM-helikáz mint transzlokációs motor működése

Az egyszálú DNS mentén "araszoló" mozgást végző BLM-helikáz mechanokémiai működése a miozinokhoz hasonlóan a nukleotid- és sínaffinitások kapcsoltságára épül, a kapcsoltság és a sín-aktiváció módja azonban a miozinokétól eltérő.

Az 5.3-5.8 fejezetekben leírt módszertannak a DNS-fehérje kölcsönhatásokra történt kiszélesítésével meghatároztuk a BLM-helikáz általánosan alkalmazott monomer fragmentumának (katalitikus helikáz-modul) részletes kinetikai mechanizmusát DNS távollétében és egyszálú DNS jelenlétében, valamint meghatároztuk az egyszálú DNS mentén történő transzlokáció mechanokémiai mechanizmusát (46. ábra) (*24*). A transzlokációs mechanizmus meghatározása – a rekombináció során játszott *in vivo* szerepe mellett – azért alapvető fontosságú, mert ez ad kiindulópontot a rá épülő bonyolultabb mechanokémiai aktivitások (szálszétválasztás, szálvándorlás, D-hurok- illetve nukleoprotein-szétbontás) megközelítéséhez (vö. 4.9 - 4.10 fejezet). A mechanizmus fő sajátságait az alábbiakban ismertetem.





szálról illetve annak 5'-végéről $k_{off, int}$ illetve $k_{off, end}$ sebességi állandókkal disszociál. B: Az egyszálú DNS-kötött BLM (D.B) ATPáz ciklusának mechanizmusa (amely k_{trans} steady-state sebességi állandót eredményez). Az ATP-kötést (k_1) az ATP-hidrolízis (k_2) és a foszfátfelszabadulás (k_3) követi. A BLM "zárt" (B^{c}) és "nyitott" (B^{o}) ADP-kötött állapotai közötti szerkezeti átalakulás (k_4) megelőzi az ADP-felszabadulást (k_5). Az 5. táblázat tartalmazza a vizsgálataink során meghatározott legfontosabb kinetikai paramétereket.

A BLM ATP-kötése (1. lépés a 46b ábrán) gyors, reverzibilis, a DNS által nem befolyásolt folyamat. DNS-kötött BLM-ban az ATP-hidrolízis (2. lépés) és a foszfát-felszabadulás (3. lépés) gyorsan és kvázi-irreverzibilis módon történik: e folyamatok megelőzik a sebességmeghatározó lépést, amelyet két különböző ADP-kötött enzimállapot közötti átalakulásként azonosítottunk (4. lépés; 5. táblázat). Ez utóbbi lépést a DNS mintegy 20-szorosan aktiválja.

	Paraméter	Mérési jel vagy számítás módja	Érték
	k ₁ (μM ⁻¹ s ⁻¹)	mdATP	6,9
	$k_{-1} (s^{-1})$	mdATP	120
	$k_2 (s^{-1})$	MDCC-PBP	> 100
ATD 1 1 1 1 1 1	$k_{3} (s^{-1})$	MDCC-PBP	> 100
ATP-hidrolizisciklus	$k_4 (s^{-1})$	mdADP	5,3
	k_{-4} (s ⁻¹)	mdADP	2
	$k_{5} (s^{-1})$	mdADP	190
	k ₋₅ (μM ⁻¹ s ⁻¹)	mdADP	10
	k _{trans} (steady-state ATP-hidrolízis sebességi	NADH-kapcsolt, MDCC-PBP,	30
	állandó a transzlokáció során, s ⁻¹)	modellezés	
	k _{end} (<i>steady-state</i> ATP-hidrolízis sebességi állandó az 5'-végen, s⁻¹)	NADH-kapcsolt, modellezés	5,6
Trancelokáciá	k _{off, int} (disszociáció a DNS-ről a transzlokáció során, s⁻¹)	triptofán	< 1
egyszálú DNS-en	$k_{\rm off, end}$ (disszociáció az 5'-végről, s ⁻¹)	NADH-kapcsolt, triptofán, modellezés	2,7
	P _{macr} (makroszkopikus processzivitás)	modellezés	0,98
	b (kötőhely mérete, nt)	fluoreszcens oligonukleotid, mdADP, NADH-kapcsolt, MDCC-PBP	14
	s (transzlokáció lépéshossza, nt)	MDCC-PBP	1,1
	C (hidrolizált ATP/megtett nt)	MDCC-PBP	0,87

5. táblázat: A BLM-helikáz mechanokémiai ciklusának kinetikai paraméterei. A megadott értékek különböző független kísérletek eredményeinek átlagai. Az eredmények standard hibáját (amely jellemzően a 10-30 % tartományba esett) a publikáció (24) tartalmazza.

A fent bemutatott ATPáz ciklust a BLM az egyszálú DNS mentén történő transzlokációra hasznosítja. Kimutattuk, hogy az enzim helypreferencia nélkül, random helyen köt az egyszálú DNS-hez. A kötőhely mérete (*b*) mintegy 14 nt (4-5. táblázat). Egy ATP-hidrolízis ciklus során (amely $k_{trans} = 30 \text{ s}^{-1}$ steady-state sebességi állandóval zajlik), a BLM 1 nt távolságnyit halad a DNS-en (*s*) (47. ábra, 5. táblázat). Az 5'-vég elérésekor (ahol az ATPáz ciklus $k_{end} = 5,6 \text{ s}^{-1}$ -ra lassul), a BLM viszonylag gyorsan disszociál a DNS-ről ($k_{off, end} = 2,7 \text{ s}^{-1}$), így nem végez jelentős számú felesleges ciklust (48. ábra, 5. táblázat). A transzlokáció során a BLM DNS-ről történő disszociációja viszonylag lassú ($k_{off, int} < 1 \text{ s}^{-1}$, 5. táblázat). Ez az érték összhangban áll a 47c ábrán bemutatott kísérletekben meghatározott mérsékelt processzivtással ($P_{macr} = 0,98$; az egy futás során megtett nt-hossz várható értéke 50).







48. ábra: Steady-state paraméterek egyszálú DNS-hosszfüggése. A: Félmaximális ATPázaktiváláshoz szükséges relatív DNS-koncentráció (K*) különböző oligo-dT hosszaknál. A K* (= [kötőhelyek a DNS-en]/[BLM]) értékeket b = 14 és [BLM] = 35 nM felhasználásával számítottuk. A beillesztett ábra a félmaximális aktiváláshoz szükséges tényleges DNSkoncentrációkat mutatja. B: A maximális DNS-aktivált ATPáz aktivitás (k_{cat}) oligo-dThosszfüggése ([ATP] = 1 mM). A működési paraméterek meghatározásához az alábbi egyenletet dolgoztuk ki (24), amelyet a folytonos vonallal jelzett illesztéshez is használtunk (4. egyenlet):

$$k_{cat} = \left(\frac{\frac{L-b}{2s} \cdot \frac{1}{k_{trans}} + \frac{k_{end}}{k_{off,end}} \cdot \frac{1}{k_{end}}}{\frac{L-b}{2s} + \frac{k_{end}}{k_{off,end}}}\right)^{-1}$$

Az alkalmazott modellben (46a ábra) a BLM DNS-aktivált steady-state ATPáz aktivitását (k_{rat}) kétféle, különböző átviteli számú ATP-hidrolízisciklus határozza meg. Az egyszálú DNS-hez való kötődést követően a BLM által végzett transzlokációs ciklusok várható száma (L–b)/2s (46a ábra, 4. táblázat). E ciklusokat az enzim k_{trans} sebességi állandóval végzi, amíg el nem éri az 5'-véget (46a ábra). A végen az enzim felesleges ATPáz ciklusokat végezhet (k_{end} sebességi állandóval), vagy disszociálhat a DNS-végről (k_{off. end} sebességi állandóval). A felesleges ciklusok várható száma így k_{end}/k_{off, end} lesz. Telítési DNSkoncentrációnál (> 100K*) az új DNS-molekulához való kötődés gyorsan történik és így nem befolyásolja az ATPáz aktivitást. Nincs jelentős hatással a k_{cat}-ra a BLM DNS-ről történő – ritkán bekövetkező – disszociációja sem (koff, int, 5. táblázat). A kötőhely-méretnél (b) hosszabb DNS-hosszak esetén így a nettó ciklusidő (1/k_{cat}) 1/k_{trans}-nak és 1/k_{end}-nek az egyes ciklusok várható számával súlyozott átlagaként alakul. A működési paramétereket az itt bemutatott egyenlet alkalmazásával, illetve a kísérletesen meghatározott sebességi állandók felhasználásával végzett globális kinetikai szimulációkkal is meghatároztuk: a két módszer lényegileg egyező értékeket eredményezett. A bemutatott illesztés (folytonos vonal) megbízhatóságát a szaggatott vonalak jelölik, amelyeket a legjobb illeszkedéshez képest kétszer alacsonyabb illetve magasabb k_{off, end} értékek rögzítésével hoztunk létre.

Más helikázok (UvrD (205;206) RecG (207) és Isw2 (208)) egyszálú DNS-transzlokációs mechanizmusához képest a BLM egyik egyedi sajátsága a gyors *pre-steady-state* foszfáttermelés, ami az ATP-hidrolízis és a foszfát-felszabadulás lépéseinek gyors, nem sebesség-meghatározó voltát jelzi (47. ábra). Más vizsgált helikázokban ez nem volt megfigyelhető, ami azt jelzi, hogy ezekben az enzimekben a sebesség-meghatározó lépés megelőzi a foszfát-felszabadulást, vagy maga a foszfát-felszabadulás a sebesség-meghatározó. A BLM másik fontos működési paramétere a mechanokémiai csatolási állandó: 1 ATP hidrolízise szükséges 1 nukleotid-egységnyi haladáshoz, ami hasonló a PcrA (206) és

UvrD (205) helikázoknál megfigyelt értékekhez. RecG esetén ettől eltérően 1 ATP hidrolízise 3 nt transzlokációt eredményezett (207). Szintén fontos sajátság, hogy a BLM nem végez felesleges ATPáz ciklusokat az 5'-végen, ami különbözik a PcrA helikáz viselkedésétől (206).

A BLM-helikáz általunk azonosított, ADP-kötött állapotban bekövetkező, sebességmeghatározó szerkezet-változása az enzim mechanikai lépésének alapjául szolgálhat. Ez alapján a BLM különbözhet az YxiN és NS3 RNS-helikázoktól, amelyek esetében a sebességmeghatározó foszfát-felszabaduláshoz kapcsolt mechanikai lépést javasoltak (209;210).

A BLM-helikáznak általunk meghatározott egyszálú DNS-transzlokációs sebessége hasonlít ugyanezen konstrukció mások által meghatározott kettősszálú DNS-szálszétválasztási sebességére (211), ami azt jelzi, hogy az enzim aktív mechanizmussal működik (vö. 4.9 fejezet).

6.3.4 Miozinok és helikázok energia-átalakító mechanizmusainak összehasonlítása

Az energia-átalakítás kinetikai és termodinamikai alapelvei valamennyi ismert biológiai motorban közösek, az elmozdulást létrehozó molekuláris mozgások elrendezésében és kapcsoltsági módjában azonban a funkcióknak megfelelő változatosság tapasztalható.

A fentiekben bemutatott eredmények összegzése alkalmat ad az általunk vizsgált két motorrendszer, a miozinok és a BLM-helikáz működési tulajdonságainak összehasonlítására. Miozinok esetében az enzimatikusan aktív egység (a miozinfej) ATPáz működése során ciklikusan váltakoznak a sínhez (aktinhoz) kötött és levált állapotok. Kétfejű processzív miozinok esetében a mozgás két, enzimatikusan különálló miozinfej katalitikus ciklusának összehangolása révén jön létre. Ezzel ellentétben a helikázok katalitikus moduljában az ATP-szubsztrát két, a sínen (DNS-en) egymáshoz képest elmozdulni képes domén közé kötődik. A szubdomének araszoló mozgása révén a helikáz egyetlen aktívhelyet tartalmazó egysége mindvégig a sínhez kötve marad a transzlokáció során.

Az elmozdulás létrehozása érdekében a miozinok esetében az aktívhelyen történt kis szerkezetváltozásokat erőkar erősíti fel, míg a helikázok DNS-en "csúszó" mechanizmusa esetén az erőkarral analóg szerkezeti elem nem található.

A mechanokémiai működés közös sajátságai közé tartozik, hogy egy ATPáz ciklus mindkét motorrendszer esetében egy mechanikai lépéshez kapcsolt. (Elvben elképzelhető a több enzimciklushoz kapcsolt egyetlen mechanikai lépéssel, illetve az egy enzimciklushoz kapcsolt több mechanikai lépéssel jellemezhető kapcsoltság is.) A másik fontos közös sajátság, hogy a sín a motor ATPáz aktivitásának jelentős aktiválását okozza.

Az enzimatikus köztiállapotok sínaffinitás-mintázata jelentősen eltér a miozinok és helikázok esetében. Miozinokban az ATP-nek az erős sínkötő nukleotidmentes állapothoz történő nagy affinitású kötődése a sín-affinitás jelentős csökkenését okozza. A BLM-helikáz esetében az ATP-kötés jóval gyengébb, és nem befolyásolja a motor sín-affinitását. Miozinok esetében a hidrolízislépés a sínről levált állapotban gyorsan történik, míg a BLM-helikáz esetében e lépés sín-aktivációja a működés központi eleme. Közös sajátság viszont, hogy a sín-aktivált termék-felszabadulási folyamatokhoz kapcsoltan történik a transzlokáció mechanikai lépése.

A fentieket összegezve tehát az mondható el, 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.

7. Új tudományos eredmények tézises összefoglalása

- Az aktomiozin sejtmotor számos új motilitás-típusát fedeztünk fel. E mechanizmusok rávilágítanak arra, hogy a változatos időskálán és szerveződésben működő miozinok élettani aktivitásait döntően az egyes izoformák biokémiai, enzimkinetikai sajátságai határozzák meg. A kinetikai változékonyság – a szerkezeti sajátságok többségével szemben – nem a törzsfejlődés szerinti rokonságot követi, hanem az élettani szerepekhez történő gyors, rugalmas adaptáció eredménye.
- 2. Megdöntöttünk, illetve kiszélesítettünk az aktomiozin-működéssel kapcsolatos számos paradigmatikus nézetet. Kimutattuk, hogy a sejtosztódás és -differenciáció motorja, a nem-izom miozin 2 működése során magas aktinkötöttségi hányadot (terhelési arányt) mutat, ami mindkét "fej" által aktinkötött molekulák gyakori előfordulását eredményezi. E miozinokban a hidrolízistermék ADP által okozott termékgátlás a kontraktilis és erőtartó üzemmódok közötti váltást teszi lehetővé, így a sejt autonóm mechanikai válaszképességének alapjául szolgál. A felsorolt sajátságok mindegyike szöges ellentétben áll az izomkutatásban a filamentális motorokról korábban kialakult általános nézetekkel.
- 3. 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. A citoplazmában zajló transzport jelentős része tehát a szállított sejtalkotók (pl. vezikulumok) felszínén jelentős koncentrációban jelenlévő motormolekulák együttes működésének eredménye.
- 4. 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 miozinfejet az erőkifejtő lépés kezdőállapotában stabilizálja: ez a felhúzott erőkarú és magas aktin-affinitású szerkezet korábban nem volt stabilan előállítható.
- Az erőkifejtés során a miozinfej magjában elhelyezkedő β-lemez energiatovábbító rugóként viselkedik az erőgenerálás során. Eredményeink – a korábbi elképzelésekkel ellentétben – arra utaltak, hogy az aktinhoz történő indukált illeszkedés a rugó megfeszülésével jár.
- 6. 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 egyedimolekula- (miozin 5a) motorenzimekben is időzítő szereppel bír: a motor lépésének kinetikai kapujaként szabályozza az aktin mentén történő előrehaladás sebességét. Felderítettük a nem-izom miozin 2-ben történő nukleotidcsere mechanikai terhelés általi szabályozását. E mechanizmus a klasszikus allosztéria-fogalom kiszélesítésével értelmezhető, amelyben nem valamely ligandum kötése, hanem a fehérjemolekulára adott irányban kifejtett mechanikai erőhatás befolyásolja az enzimműködést hajtó szerkezeti egyensúlyokat.
- 7. 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.

8. Meghatároztuk a humán Bloom-szindróma helikáz DNS-en történő transzlokációjának mechanokémiai mechanizmusát. 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.

8. 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 dinamikusan 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 mutagenezissel nagyszámú RecQ-variánst hozunk létre, amelyeket *E. coli* klónokban kifejezve az UV-stresszkörülmények hangolásával valósítjuk meg a szelekciót. A funkcionálisan kiválogatott pontmutánsok izolálása és enzimológiai-biofizikai jellemzése révén kívánjuk meghatározni, hogy a mechanoenzimatikus 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.

Tapasztalataim alapján kialakult személyes álláspontom szerint a motorenzimek vizsgálata – mivel sokrétű összeköttetést teremt az élet fizikai-kémiai alapjai illetve az élőlények változatossága, alkalmazkodó-képessége és evolúciója iránti érdeklődések között – a modern biológia legizgalmasabb területei közé tartozik, amely a kihívást vállaló molekuláris biológus számára élethosszig tartó örömökkel kecsegtet.
9. Köszönetnyilvánítás

A biológiai motoraktivitáshoz hasonlóan az ismertetett munkák is természetesen egy rendkívül kiterjedt kölcsönhatás-rendszer működésének eredményeképpen jöttek létre.

Feleségemnek, Tóth Juditnak szeretnék először köszönetet mondani, aki közel egy évtizede egyben legkedvesebb kollégám is, és kulcsszereplője volt a dolgozatban ismertetett számos munkának.

Szakmai mentoraim szerepét nem lehet túlhangsúlyozni. Egyetemi hallgatóként az ELTE-n Szilágyi Lászlótól és Nyitray Lászlótól kaptam meg a kezdő lökéseket a biokémia irányába. Sokat tanultam Gráf László és Hegyi György professzoroktól is. Doktorandusz koromban Málnási-Csizmadia András és Clive Bagshaw járultak hozzá döntően látásmódom alakulásához, míg későbbi amerikai tartózkodásom során James Sellers és Andrew Szent-Györgyi voltak legfontosabb mentoraim.

A bemutatott munkák nagy része kutatócsoportom tagjainak, végzett és jelenlegi hallgatóimnak a munkájából és a velük való együttes gondolkodásból született. Köszönet illeti ezért Gyimesi Máté és Jelinek Balázs posztdoktorokat; Bibó András, Harami Gábor, Kocsis Zsuzsa, Nagy Nikolett, Sarlós Kata és Takács Balázs doktoranduszokat; valamint Gervai Judit, Molnár Eszter és Sarankó Hajnalka egyetemi hallgatókat.

Az eredmények létrejöttében természetesen kulcsszerepe volt a hazánk és a világ különböző tájain dolgozó együttműködő partnereknek, illetve a kiterjedt, mégis családias "motoros" kutatói közösség folyamatos szellemi hozzájárulásának is.

Köszönöm *alma mater*em, az ELTE Biokémiai Tanszék valamennyi munkatársának mindenre kiterjedő segítségét és támogatását.

A munkák anyagi erőforrásait számos szervezet – OTKA, Norvég Alap, Magyar Tudományos Akadémia, European Molecular Biology Organisation, Human Frontier Science Program, Howard Hughes Medical Institute, National Institutes of Health – pályázati támogatása biztosította.

10. Irodalomjegyzék

10.1 Az értekezés alapjául szolgáló saját nemzetközi közlemények

Az első- illetve utolsó szerzős cikkeket – beleértve a megosztott elsőszerzőseket (*) is – félkövér szedéssel emeltem ki. A levelező szerzős cikkeket aláhúzott sorszám jelöli.

- 1. Wang, F.*, Kovacs, M.*, Hu, A., Limouze, J., Harvey, E. V., and Sellers, J. R. (2003) Kinetic mechanism of nonmuscle 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'Neall-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.
- 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., Kintses, 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'Neall-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]

10.2 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.
- 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.

10.3 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, *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 DNShibajavításban, *Természet Világa 2010. március*.
- 36. Nagy, N., Takacs, B., Kovacs, M. (2010) Motorenzimek működési alapelvei és egyedi finomhangolása, *Biokémia* 2010. június.

10.4 Felhasznált irodalom

- 37. Sellers, J. R. (1999) Myosins Oxford University Press, New York.
- 38. Singleton, M. R., Dillingham, M. S., and Wigley, D. B. (2007) Structure and mechanism of helicases and nucleic acid translocases, *Annu. Rev. Biochem. 76*, 23-50.
- 39. Lohman, T. M. and Bjornson, K. P. (1996) Mechanisms of helicase-catalyzed DNA unwinding, *Annu. Rev. Biochem.* 65, 169-214.
- 40. Xi, X. G. (2007) Helicases as antiviral and anticancer drug targets, Curr. Med. Chem. 14, 883-915.
- 41. Vindigni, A. and Hickson, I. D. (2009) RecQ helicases: multiple structures for multiple functions?, *HFSP. J.* 3, 153-164.
- 42. Geeves, M. A. and Holmes, K. C. (1999) Structural mechanism of muscle contraction, *Annu. Rev. Biochem. 68*, 687-728.
- 43. Geeves, M. A. and Holmes, K. C. (2005) The molecular mechanism of muscle contraction, *Adv. Protein Chem.* 71, 161-193.
- 44. Pyle, A. M. (2008) Translocation and unwinding mechanisms of RNA and DNA helicases, *Annu. Rev. Biophys. 37*, 317-336.
- 45. Johnson, C. P., Tang, H. Y., Carag, C., Speicher, D. W., and Discher, D. E. (2007) Forced unfolding of proteins within cells, *Science 317*, 663-666.

- 46. Epstein, N. D. and Davis, J. S. (2003) Sensing stretch is fundamental, Cell 112, 147-150.
- 47. Howard, J. (2001) Mechanics of Motor Proteins and the Cytoskeleton Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- 48. De La Cruz, E. M. and Ostap, E. M. (2004) Relating biochemistry and function in the myosin superfamily, *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 61-67.
- 49. Klein, E., Debonis, S., Thiede, B., Skoufias, D. A., Kozielski, F., and Lebeau, L. (2007) New chemical tools for investigating human mitotic kinesin Eg5, *Bioorg. Med. Chem.* 15, 6474-6488.
- Marcus, A. I., Peters, U., Thomas, S. L., Garrett, S., Zelnak, A., Kapoor, T. M., and Giannakakou, P. (2005) Mitotic kinesin inhibitors induce mitotic arrest and cell death in Taxol-resistant and -sensitive cancer cells, *J. Biol. Chem.* 280, 11569-11577.
- 51. Beadle, C., Assanah, M. C., Monzo, P., Vallee, R., Rosenfeld, S. S., and Canoll, P. (2008) The role of myosin II in glioma invasion of the brain, *Mol. Biol. Cell* 19, 3357-3368.
- 52. Teerlink, J. R. (2009) A novel approach to improve cardiac performance: cardiac myosin activators, *Heart Fail. Rev.* 14, 289-298.
- 53. van den Heuvel, M. G. and Dekker, C. (2007) Motor proteins at work for nanotechnology, Science 317, 333-336.
- 54. Goody, R. S. and Hofmann-Goody, W. (2002) Exchange factors, effectors, GAPs and motor proteins: common thermodynamic and kinetic principles for different functions, *Eur. Biophys. J.* 31, 268-274.
- 55. Kull, F. J., Vale, R. D., and Fletterick, R. J. (1998) The case for a common ancestor: kinesin and myosin motor proteins and G proteins, *J. Muscle Res. Cell Motil.* 19, 877-886.
- 56. Vale, R. D. (1996) Switches, latches, and amplifiers: common themes of G proteins and molecular motors, *J. Cell Biol.* 135, 291-302.
- 57. Thomas, C., Fricke, I., Scrima, A., Berken, A., and Wittinghofer, A. (2007) Structural evidence for a common intermediate in small G protein-GEF reactions, *Mol. Cell* 25, 141-149.
- 58. Holmes, K. C. (1998) Muscle contraction, Novartis. Found. Symp. 213, 76-89.
- 59. Kühne, W. (1864) Untersuchungen über das Protoplasma und die Contractilitat, Verlag von Wilhelm Engelmann, Leipzig.
- 60. Banga, I., Erdos, T., Gerendas, M., Mommaerts, W. F. H. M., Straub, F. B., and SZENT-GYORGYI, A. (1942) *Studies* from the Institute of Medical Chemistry, University Szeged S. Karger, R. Gergely, Basel, New York, Budapest.
- 61. Straub, F. B. (1943) Actin, Univ. Szeged.
- 62. Lohmann, K. (1931) Darstellung der Adenylpyrophosphatsaure aus Muskulatur, Biochem. Z. 233, 460.
- 63. Engelhardt, W. A. and Lyubimova, M. N. (1939) Myosin and adenosinetriphosphate, Nature 144, 668.
- Biro, N. A. and Szent-Gyorgyi, A. G. (1949) The effect of actin and physico-chemical changes on the myosin ATPase system, and on washed muscle, *Hung. Acta Physiol 2*, 120-133.
- 65. HUXLEY, A. F. and NIEDERGERKE, R. (1954) Structural changes in muscle during contraction; interference microscopy of living muscle fibres, *Nature 173*, 971-973.
- 66. HUXLEY, H. and HANSON, J. (1954) Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation, *Nature 173*, 973-976.
- 67. Szent-Gyorgyi, A. G. (1953) Meromyosins, the subunits of myosin, Arch. Biochem. Biophys. 42, 305-320.
- Margossian, S. S. and Lowey, S. (1973) :Substructure of the myosin molecule. 3. Preparation of single-headed derivatives of myosin, J. Mol. Biol. 74, 301-311.
- 69. Margossian, S. S. and Lowey, S. (1973) Substructure of the myosin molecule. IV. Interactions of myosin and its subfragments with adenosine triphosphate and F-actin, *J. Mol. Biol.* 74, 313-330.
- 70. Huxley, H. E. (1969) The mechanism of muscular contraction, Science 164, 1356-1365.
- 71. HUXLEY, A. F. and Simmons, R. M. (1971) Proposed mechanism of force generation in striated muscle, *Nature 233*, 533-538.
- 72. Lymn, R. W. and Taylor, E. W. (1970) Transient state phosphate production in the hydrolysis of nucleoside triphosphates by myosin, *Biochemistry 9*, 2975-2983.
- 73. Taylor, E. W., Lymn, R. W., and Moll, G. (1970) Myosin-product complex and its effect on the steady-state rate of nucleoside triphosphate hydrolysis, *Biochemistry 9*, 2984-2991.
- 74. Lymn, R. W. and Taylor, E. W. (1971) Mechanism of adenosine triphosphate hydrolysis by actomyosin, *Biochemistry 10*, 4617-4624.
- 75. Szent-Gyorgyi, A. G. (2004) The early history of the biochemistry of muscle contraction, *J. Gen. Physiol* 123, 631-641.
- 76. Bagshaw, C. R. and Trentham, D. R. (1973) The reversibility of adenosine triphosphate cleavage by myosin, *Biochem. J.* 133, 323-328.
- Bagshaw, C. R., Eccleston, J. F., Eckstein, F., Goody, R. S., Gutfreund, H., and Trentham, D. R. (1974) The magnesium ion-dependent adenosine triphosphatase of myosin. Two-step processes of adenosine triphosphate association and adenosine diphosphate dissociation, *Biochem. J.* 141, 351-364.
- Bagshaw, C. R. and Trentham, D. R. (1974) The characterization of myosin-product complexes and of productrelease steps during the magnesium ion-dependent adenosine triphosphatase reaction, *Biochem. J.* 141, 331-349.
- 79. Okamoto, Y. and Sekine, T. (1985) A streamlined method of subfragment one preparation from myosin, J. Biochem. (Tokyo) 98, 1143-1145.
- 80. Anson, M., Geeves, M. A., Kurzawa, S. E., and Manstein, D. J. (1996) Myosin motors with artificial lever arms, *EMBO J.* 15, 6069-6074.

- 81. Huxley, H. E., Simmons, R. M., Faruqi, A. R., Kress, M., Bordas, J., and Koch, M. H. (1981) Millisecond time-resolved changes in x-ray reflections from contracting muscle during rapid mechanical transients, recorded using synchrotron radiation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 78, 2297-2301.
- 82. Irving, M., Lombardi, V., Piazzesi, G., and Ferenczi, M. A. (1992) Myosin head movements are synchronous with the elementary force-generating process in muscle, *Nature 357*, 156-158.
- Rayment, I., Rypniewski, W. R., Schmidt-Base, K., Smith, R., Tomchick, D. R., Benning, M. M., Winkelmann, D. A., Wesenberg, G., and Holden, H. M. (1993) Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor, *Science 261*, 50-58.
- Fisher, A. J., Smith, C. A., Thoden, J. B., Smith, R., Sutoh, K., Holden, H. M., and Rayment, I. (1995) X-ray structures of the myosin motor domain of Dictyostelium discoideum complexed with MgADP.BeFx and MgADP.AlF4-, *Biochemistry 34*, 8960-8972.
- 85. Smith, C. A. and Rayment, I. (1996) X-ray structure of the magnesium(II).ADP.vanadate complex of the Dictyostelium discoideum myosin motor domain to 1.9 A resolution, *Biochemistry* 35, 5404-5417.
- Gulick, A. M., Bauer, C. B., Thoden, J. B., and Rayment, I. (1997) X-ray structures of the MgADP, MgATPgammaS, and MgAMPPNP complexes of the Dictyostelium discoideum myosin motor domain, *Biochemistry 36*, 11619-11628.
- Malnasi-Csizmadia, A., Woolley, R. J., and Bagshaw, C. R. (2000) Resolution of conformational states of Dictyostelium myosin II motor domain using tryptophan (W501) mutants: implications for the open-closed transition identified by crystallography, *Biochemistry 39*, 16135-16146.
- Gyimesi, M., Kintses, B., Bodor, A., Perczel, A., Fischer, S., Bagshaw, C. R., and Malnasi-Csizmadia, A. (2008) The mechanism of the reverse recovery step, phosphate release, and actin activation of Dictyostelium myosin II, J. Biol. Chem. 283, 8153-8163.
- 89. Uyeda, T. Q., Abramson, P. D., and Spudich, J. A. (1996) The neck region of the myosin motor domain acts as a lever arm to generate movement, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 93*, 4459-4464.
- Holmes, K. C., Angert, I., Kull, F. J., Jahn, W., and Schroder, R. R. (2003) Electron cryo-microscopy shows how strong binding of myosin to actin releases nucleotide, *Nature* 425, 423-427.
- 91. Holmes, K. C., Schroder, R. R., Sweeney, H. L., and Houdusse, A. (2004) The structure of the rigor complex and its implications for the power stroke, *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 359, 1819-1828.
- Richards, T. A. and Cavalier-Smith, T. (2005) Myosin domain evolution and the primary divergence of eukaryotes, Nature 436, 1113-1118.
- 93. Odronitz, F. and Kollmar, M. (2007) Drawing the tree of eukaryotic life based on the analysis of 2,269 manually annotated myosins from 328 species, *Genome Biol. 8*, R196.
- Baboolal, T. G., Sakamoto, T., Forgacs, E., White, H. D., Jackson, S. M., Takagi, Y., Farrow, R. E., Molloy, J. E., Knight, P. J., Sellers, J. R., and Peckham, M. (2009) The SAH domain extends the functional length of the myosin lever, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 106*, 22193-22198.
- 95. Suveges, D., Gaspari, Z., Toth, G., and Nyitray, L. (2009) Charged single alpha-helix: a versatile protein structural motif, *Proteins 74*, 905-916.
- 96. Cope, M. J., Whisstock, J., Rayment, I., and Kendrick-Jones, J. (1996) Conservation within the myosin motor domain: implications for structure and function, *Structure.* 4, 969-987.
- 97. De La Cruz, E. M., Ostap, E. M., and Sweeney, H. L. (2001) Kinetic mechanism and regulation of myosin VI, J. Biol. Chem. 276, 32373-32381.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Zipursky, S. L., and Darnell, J. (2004) Molecular Biology of the Cell WH Freeman, New York.
- 99. Wu, L. and Hickson, I. D. (2006) DNA helicases required for homologous recombination and repair of damaged replication forks, *Annu. Rev. Genet.* 40, 279-306.
- 100. Ouyang, K. J., Woo, L. L., and Ellis, N. A. (2008) Homologous recombination and maintenance of genome integrity: Cancer and aging through the prism of human RecQ helicases, *Mech. Ageing Dev.*
- 101. Hanada, K., Ukita, T., Kohno, Y., Saito, K., Kato, J., and Ikeda, H. (1997) RecQ DNA helicase is a suppressor of illegitimate recombination in Escherichia coli, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 94*, 3860-3865.
- 102. Courcelle, J. and Hanawalt, P. C. (1999) RecQ and RecJ process blocked replication forks prior to the resumption of replication in UV-irradiated Escherichia coli, *Mol. Gen. Genet.* 262, 543-551.
- 103. Heyer, W. D. (2004) Damage signaling: RecQ sends an SOS to you, *Curr. Biol.* 14, R895-R897.
- 104. Nakayama, H. (2005) Escherichia coli RecQ helicase: a player in thymineless death, Mutat. Res. 577, 228-236.
- 105. Hanada, K. and Hickson, I. D. (2007) Molecular genetics of RecQ helicase disorders, *Cell Mol. Life Sci.* 64, 2306-2322.
- 106. German, J. (1997) Bloom's syndrome. XX. The first 100 cancers, Cancer Genet. Cytogenet. 93, 100-106.
- 107. Wu, L. and Hickson, I. D. (2003) The Bloom's syndrome helicase suppresses crossing over during homologous recombination, *Nature 426*, 870-874.
- 108. Adams, M. D., McVey, M., and Sekelsky, J. J. (2003) Drosophila BLM in double-strand break repair by synthesisdependent strand annealing, *Science 299*, 265-267.
- 109. Bugreev, D. V., Yu, X., Egelman, E. H., and Mazin, A. V. (2007) Novel pro- and anti-recombination activities of the Bloom's syndrome helicase, *Genes Dev. 21*, 3085-3094.

- 110. Linder, P. and Lasko, P. (2006) Bent out of shape: RNA unwinding by the DEAD-box helicase Vasa, *Cell 125*, 219-221.
- 111. Bianco, P. R., Brewer, L. R., Corzett, M., Balhorn, R., Yeh, Y., Kowalczykowski, S. C., and Baskin, R. J. (2001) Processive translocation and DNA unwinding by individual RecBCD enzyme molecules, *Nature 409*, 374-378.
- 112. Yildiz, A., Forkey, J. N., McKinney, S. A., Ha, T., Goldman, Y. E., and Selvin, P. R. (2003) Myosin V walks hand-overhand: single fluorophore imaging with 1.5-nm localization, *Science 300*, 2061-2065.
- 113. Subramanya, H. S., Bird, L. E., Brannigan, J. A., and Wigley, D. B. (1996) Crystal structure of a DExx box DNA helicase, *Nature 384*, 379-383.
- 114. Berg, J. M., Tymoczko, J. L., and Stryer, L. (2002) Biochemistry WH Freeman and Co., New York.
- 115. Hiratsuka, T. (1983) New ribose-modified fluorescent analogs of adenine and guanine nucleotides available as substrates for various enzymes, *Biochim. Biophys. Acta* 742, 496-508.
- 116. Webb, M. R., Reid, G. P., Munasinghe, V. R., and Corrie, J. E. (2004) A series of related nucleotide analogues that aids optimization of fluorescence signals in probing the mechanism of P-loop ATPases, such as actomyosin, *Biochemistry* 43, 14463-14471.
- 117. Brune, M., Hunter, J. L., Corrie, J. E., and Webb, M. R. (1994) Direct, real-time measurement of rapid inorganic phosphate release using a novel fluorescent probe and its application to actomyosin subfragment 1 ATPase, *Biochemistry 33*, 8262-8271.
- 118. Cooper, J. A., Walker, S. B., and Pollard, T. D. (1983) Pyrene actin: documentation of the validity of a sensitive assay for actin polymerization, *J. Muscle Res. Cell Motil.* 4, 253-262.
- 119. Trentham, D. R., Bardsley, R. G., Eccleston, J. F., and Weeds, A. G. (1972) Elementary processes of the magnesium ion-dependent adenosine triphosphatase activity of heavy meromyosin. A transient kinetic approach to the study of kinases and adenosine triphosphatases and a colorimetric inorganic phosphate assay in situ, *Biochem. J.* 126, 635-644.
- 120. Gutfreund, H. (1995) *Kinetics for the Life Sciences: Receptors, Transmitters and Catalysts* Cambridge University Press.
- 121. Johnson, K. A. (2003) Kinetic Analysis of Macromolecules A Practical Approach Oxford University Press.
- 122. Funatsu, T., Harada, Y., Tokunaga, M., Saito, K., and Yanagida, T. (1995) Imaging of single fluorescent molecules and individual ATP turnovers by single myosin molecules in aqueous solution, *Nature 374*, 555-559.
- 123. Yildiz, A. and Selvin, P. R. (2005) Fluorescence imaging with one nanometer accuracy: application to molecular motors, *Acc. Chem. Res.* 38, 574-582.
- 124. Sellers, J. R. and Veigel, C. (2006) Walking with myosin V, Curr. Opin. Cell Biol. 18, 68-73.
- 125. Kellermayer, M. S., Karsai, A., Kengyel, A., Nagy, A., Bianco, P., Huber, T., Kulcsar, A., Niedetzky, C., Proksch, R., and Grama, L. (2006) Spatially and temporally synchronized atomic force and total internal reflection fluorescence microscopy for imaging and manipulating cells and biomolecules, *Biophys. J.* 91, 2665-2677.
- 126. Manstein, D. J., Ruppel, K. M., and Spudich, J. A. (1989) Expression and characterization of a functional myosin head fragment in Dictyostelium discoideum, *Science 246*, 656-658.
- 127. Manstein, D. J., Schuster, H. P., Morandini, P., and Hunt, D. M. (1995) Cloning vectors for the production of proteins in Dictyostelium discoideum, *Gene 162*, 129-134.
- 128. Spudich, J. A. and Watt, S. (1971) The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin, *J. Biol. Chem.* 246, 4866-4871.
- 129. Janscak, P., Garcia, P. L., Hamburger, F., Makuta, Y., Shiraishi, K., Imai, Y., Ikeda, H., and Bickle, T. A. (2003) Characterization and mutational analysis of the RecQ core of the bloom syndrome protein, *J. Mol. Biol.* 330, 29-42.
- 130. Xu, H. Q., Deprez, E., Zhang, A. H., Tauc, P., Ladjimi, M. M., Brochon, J. C., Auclair, C., and Xi, X. G. (2003) The Escherichia coli RecQ helicase functions as a monomer, *J. Biol. Chem.* 278, 34925-34933.
- 131. Lakowicz, J. R. (1999) *Principles of fluorescence spectroscopy* Kluwer Academic/Plenum Press, New York.
- 132. Conti, M. A. and Adelstein, R. S. (2008) Nonmuscle myosin II moves in new directions, J. Cell Sci. 121, 11-18.
- 133. Niederman, R. and Pollard, T. D. (1975) Human platelet myosin. II. In vitro assembly and structure of myosin filaments, J. Cell Biol. 67, 72-92.
- 134. Golomb, E., Ma, X., Jana, S. S., Preston, Y. A., Kawamoto, S., Shoham, N. G., Goldin, E., Conti, M. A., Sellers, J. R., and Adelstein, R. S. (2004) Identification and characterization of nonmuscle myosin II-C, a new member of the myosin II family, *J. Biol. Chem.* 279, 2800-2808.
- 135. Sleep, J. A. and Taylor, E. W. (1976) Intermediate states of actomyosin adenosine triphosphatase, *Biochemistry* 15, 5813-5817.
- 136. Wagner, P. D. (1981) Formation and characterization of myosin hybrids containing essential light chains and heavy chains from different muscle myosins, *J. Biol. Chem.* 256, 2493-2498.
- Marston, S. B. and Taylor, E. W. (1980) Comparison of the myosin and actomyosin ATPase mechanisms of the four types of vertebrate muscles, *J. Mol. Biol.* 139, 573-600.
- 138. Ritchie, M. D., Geeves, M. A., Woodward, S. K., and Manstein, D. J. (1993) Kinetic characterization of a cytoplasmic myosin motor domain expressed in Dictyostelium discoideum, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 90*, 8619-8623.

- 139. Millar, N. C. and Geeves, M. A. (1983) The limiting rate of the ATP-mediated dissociation of actin from rabbit skeletal muscle myosin subfragment 1, *FEBS Lett. 160*, 141-148.
- 140. Trybus, K. M. and Taylor, E. W. (1982) Transient kinetics of adenosine 5'-diphosphate and adenosine 5'-(beta, gamma-imidotriphosphate) binding to subfragment 1 and actosubfragment 1, *Biochemistry 21*, 1284-1294.
- 141. Siemankowski, R. F. and White, H. D. (1984) Kinetics of the interaction between actin, ADP, and cardiac myosin-S1, J. Biol. Chem. 259, 5045-5053.
- 142. Cremo, C. R. and Geeves, M. A. (1998) Interaction of actin and ADP with the head domain of smooth muscle myosin: implications for strain-dependent ADP release in smooth muscle, *Biochemistry* 37, 1969-1978.
- 143. Krisanda, J. M. and Paul, R. J. (1983) Phosphagen and metabolite content during contraction in porcine carotid artery, *Am. J. Physiol 244*, C385-C390.
- 144. Khromov, A., Somlyo, A. V., and Somlyo, A. P. (1998) MgADP promotes a catch-like state developed through forcecalcium hysteresis in tonic smooth muscle, *Biophys. J.* 75, 1926-1934.
- Rosenfeld, S. S., Xing, J., Chen, L. Q., and Sweeney, H. L. (2003) Myosin IIb is unconventionally conventional, J. Biol. Chem. 278, 27449-27455.
- 146. Rhee, A. Y., Ogut, O., and Brozovich, F. V. (2006) Nonmuscle myosin, force maintenance, and the tonic contractile phenotype in smooth muscle, *Pflugers Arch*.
- 147. Wylie, S. R. and Chantler, P. D. (2001) Separate but linked functions of conventional myosins modulate adhesion and neurite outgrowth, *Nat. Cell Biol.* 3, 88-92.
- 148. Wylie, S. R. and Chantler, P. D. (2003) Myosin IIA drives neurite retraction, Mol. Biol. Cell 14, 4654-4666.
- Wylie, S. R., Wu, P. J., Patel, H., and Chantler, P. D. (1998) A conventional myosin motor drives neurite outgrowth, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 95, 12967-12972.
- 150. Morano, I., Chai, G. X., Baltas, L. G., Lamounier-Zepter, V., Lutsch, G., Kott, M., Haase, H., and Bader, M. (2000) Smooth-muscle contraction without smooth-muscle myosin, *Nat. Cell Biol.* 2, 371-375.
- 151. Sellers, J. R., Pato, M. D., and Adelstein, R. S. (1981) Reversible phosphorylation of smooth muscle myosin, heavy meromyosin, and platelet myosin, *J. Biol. Chem.* 256, 13137-13142.
- 152. Wendt, T., Taylor, D., Messier, T., Trybus, K. M., and Taylor, K. A. (1999) Visualization of head-head interactions in the inhibited state of smooth muscle myosin, *J. Cell Biol.* 147, 1385-1390.
- 153. Wendt, T., Taylor, D., Trybus, K. M., and Taylor, K. (2001) Three-dimensional image reconstruction of dephosphorylated smooth muscle heavy meromyosin reveals asymmetry in the interaction between myosin heads and placement of subfragment 2, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 98*, 4361-4366.
- 154. Mehta, A. D., Rock, R. S., Rief, M., Spudich, J. A., Mooseker, M. S., and Cheney, R. E. (1999) Myosin-V is a processive actin-based motor, *Nature 400*, 590-593.
- De La Cruz, E. M., Wells, A. L., Rosenfeld, S. S., Ostap, E. M., and Sweeney, H. L. (1999) The kinetic mechanism of myosin V, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 96, 13726-13731.
- 156. Reck-Peterson, S. L., Tyska, M. J., Novick, P. J., and Mooseker, M. S. (2001) The yeast class V myosins, Myo2p and Myo4p, are nonprocessive actin-based motors, *J. Cell Biol.* 153, 1121-1126.
- 157. Krementsova, E. B., Hodges, A. R., Lu, H., and Trybus, K. M. (2006) Processivity of chimeric class V myosins, J. Biol. Chem. 281, 6079-6086.
- 158. Watanabe, S., Watanabe, T. M., Sato, O., Awata, J., Homma, K., Umeki, N., Higuchi, H., Ikebe, R., and Ikebe, M. (2008) Human myosin Vc is a low duty ratio nonprocessive motor, *J. Biol. Chem.* 283, 10581-10592.
- 159. Watanabe, S., Mabuchi, K., Ikebe, R., and Ikebe, M. (2006) Mechanoenzymatic characterization of human myosin Vb, *Biochemistry 45*, 2729-2738.
- 160. Berg, J. S. and Cheney, R. E. (2002) Myosin-X is an unconventional myosin that undergoes intrafilopodial motility, *Nat. Cell Biol.* 4, 246-250.
- 161. Berg, J. S., Derfler, B. H., Pennisi, C. M., Corey, D. P., and Cheney, R. E. (2000) Myosin-X, a novel myosin with pleckstrin homology domains, associates with regions of dynamic actin, *J. Cell Sci.* 113 Pt 19, 3439-3451.
- 162. Watanabe, T. M., Tokuo, H., Gonda, K., Higuchi, H., and Ikebe, M. (2010) Myosin-X induces filopodia by multiple elongation mechanism, *J. Biol. Chem.* 285, 19605-19614.
- 163. Tokuo, H. and Ikebe, M. (2004) Myosin X transports Mena/VASP to the tip of filopodia, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 319, 214-220.
- 164. Homma, K. and Ikebe, M. (2005) Myosin X is a high duty ratio motor, J. Biol. Chem. 280, 29381-29391.
- Nagy, S., Ricca, B. L., Norstrom, M. F., Courson, D. S., Brawley, C. M., Smithback, P. A., and Rock, R. S. (2008) A myosin motor that selects bundled actin for motility, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 105*, 9616-9620.
- 166. Baker, J. P. and Titus, M. A. (1997) A family of unconventional myosins from the nematode Caenorhabditis elegans, *J. Mol. Biol.* 272, 523-535.
- Gibson, F., Walsh, J., Mburu, P., Varela, A., Brown, K. A., Antonio, M., Beisel, K. W., Steel, K. P., and Brown, S. D. (1995) A type VII myosin encoded by the mouse deafness gene shaker-1, *Nature 374*, 62-64.
- Hasson, T., Skowron, J. F., Gilbert, D. J., Avraham, K. B., Perry, W. L., Bement, W. M., Anderson, B. L., Sherr, E. H., Chen, Z. Y., Greene, L. A., Ward, D. C., Corey, D. P., Mooseker, M. S., Copeland, N. G., and Jenkins, N. A. (1996) Mapping of unconventional myosins in mouse and human, *Genomics 36*, 431-439.
- 169. Kiehart, D. P., Franke, J. D., Chee, M. K., Montague, R. A., Chen, T. L., Roote, J., and Ashburner, M. (2004) Drosophila crinkled, mutations of which disrupt morphogenesis and cause lethality, encodes fly myosin VIIA, *Genetics* 168, 1337-1352.

- 170. Tuxworth, R. I., Weber, I., Wessels, D., Addicks, G. C., Soll, D. R., Gerisch, G., and Titus, M. A. (2001) A role for myosin VII in dynamic cell adhesion, *Curr. Biol.* 11, 318-329.
- 171. Hasson, T. (1999) Molecular motors: sensing a function for myosin-VIIa, Curr. Biol. 9, R838-R841.
- 172. Titus, M. A. (1999) A class VII unconventional myosin is required for phagocytosis, *Curr. Biol. 9*, 1297-1303.
- 173. Petit, C. (2001) Usher syndrome: from genetics to pathogenesis, Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 2, 271-297.
- 174. Self, T., Mahony, M., Fleming, J., Walsh, J., Brown, S. D., and Steel, K. P. (1998) Shaker-1 mutations reveal roles for myosin VIIA in both development and function of cochlear hair cells, *Development 125*, 557-566.
- 175. Todi, S. V., Franke, J. D., Kiehart, D. P., and Eberl, D. F. (2005) Myosin VIIA Defects, which Underlie the Usher 1B Syndrome in Humans, Lead to Deafness in Drosophila, *Curr. Biol.* 15, 862-868.
- 176. Henn, A. and De La Cruz, E. M. (2005) Vertebrate Myosin VIIb Is a High Duty Ratio Motor Adapted for Generating and Maintaining Tension, *J. Biol. Chem. 280*, 39665-39676.
- 177. El, M. M., Tang, N., Rosenfeld, S. S., and Ostap, E. M. (2002) The kinetic mechanism of Myo1e (human myosin-IC), *J. Biol. Chem.* 277, 21514-21521.
- 178. Nyitrai, M. and Geeves, M. A. (2004) Adenosine diphosphate and strain sensitivity in myosin motors, *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 359, 1867-1877.
- 179. Geeves, M. A., Perreault-Micale, C., and Coluccio, L. M. (2000) Kinetic analyses of a truncated mammalian myosin I suggest a novel isomerization event preceding nucleotide binding, *J. Biol. Chem.* 275, 21624-21630.
- 180. Dantzig, J. A., Goldman, Y. E., Millar, N. C., Lacktis, J., and Homsher, E. (1992) Reversal of the cross-bridge forcegenerating transition by photogeneration of phosphate in rabbit psoas muscle fibres, *J. Physiol* 451, 247-278.
- 181. Kawai, M. and Halvorson, H. R. (1991) Two step mechanism of phosphate release and the mechanism of force generation in chemically skinned fibers of rabbit psoas muscle, *Biophys. J. 59*, 329-342.
- 182. Sleep, J., Irving, M., and Burton, K. (2005) The ATP hydrolysis and phosphate release steps control the time course of force development in rabbit skeletal muscle, *J. Physiol* 563, 671-687.
- 183. Caremani, M., Dantzig, J., Goldman, Y. E., Lombardi, V., and Linari, M. (2008) Effect of inorganic phosphate on the force and number of myosin cross-bridges during the isometric contraction of permeabilized muscle fibers from rabbit psoas, *Biophys. J.* 95, 5798-5808.
- 184. Davis, J. S. and Rodgers, M. E. (1995) Indirect coupling of phosphate release to de novo tension generation during muscle contraction, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 92*, 10482-10486.
- Davis, J. S. and Epstein, N. D. (2009) Mechanistic role of movement and strain sensitivity in muscle contraction, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 106, 6140-6145.
- Kintses, B., Gyimesi, M., Pearson, D. S., Geeves, M. A., Zeng, W., Bagshaw, C. R., and Malnasi-Csizmadia, A. (2007) Reversible movement of switch 1 loop of myosin determines actin interaction, *EMBO J. 26*, 265-274.
- Ferenczi, M. A., Bershitsky, S. Y., Koubassova, N., Siththanandan, V., Helsby, W. I., Panine, P., Roessle, M., Narayanan, T., and Tsaturyan, A. K. (2005) The "roll and lock" mechanism of force generation in muscle, *Structure*. 13, 131-141.
- 188. Straight, A. F., Cheung, A., Limouze, J., Chen, I., Westwood, N. J., Sellers, J. R., and Mitchison, T. J. (2003) Dissecting temporal and spatial control of cytokinesis with a myosin II Inhibitor, *Science 299*, 1743-1747.
- 189. Limouze, J., Straight, A. F., Mitchison, T., and Sellers, J. R. (2004) Specificity of blebbistatin, an inhibitor of myosin II, *J. Muscle Res. Cell Motil.* 25, 337-341.
- 190. Allingham, J. S., Smith, R., and Rayment, I. (2005) The structural basis of blebbistatin inhibition and specificity for myosin II, *Nat. Struct. Mol. Biol.*
- 191. Karatzaferi, C., Chinn, M. K., and Cooke, R. (2004) The force exerted by a muscle cross-bridge depends directly on the strength of the actomyosin bond, *Biophys. J.* 87, 2532-2544.
- 192. Schroder, R. R., Manstein, D. J., Jahn, W., Holden, H., Rayment, I., Holmes, K. C., and Spudich, J. A. (1993) Threedimensional atomic model of F-actin decorated with Dictyostelium myosin S1, *Nature 364*, 171-174.
- 193. Geeves, M. A. and Jeffries, T. E. (1988) The effect of nucleotide upon a specific isomerization of actomyosin subfragment 1, *Biochem. J.* 256, 41-46.
- 194. Geeves, M. A., Goody, R. S., and Gutfreund, H. (1984) Kinetics of acto-S1 interaction as a guide to a model for the crossbridge cycle, *J. Muscle Res. Cell Motil.* 5, 351-361.
- 195. Coureux, P. D., Sweeney, H. L., and Houdusse, A. (2004) Three myosin V structures delineate essential features of chemo-mechanical transduction, *EMBO J.* 23, 4527-4537.
- 196. Coureux, P. D., Wells, A. L., Menetrey, J., Yengo, C. M., Morris, C. A., Sweeney, H. L., and Houdusse, A. (2003) A structural state of the myosin V motor without bound nucleotide, *Nature 425*, 419-423.
- 197. Norstrom, M. F., Smithback, P. A., and Rock, R. S. (2010) Unconventional processive mechanics of non-muscle myosin IIB, J. Biol. Chem. 285, 26326-26334.
- 198. Veigel, C., Schmitz, S., Wang, F., and Sellers, J. R. (2005) Load-dependent kinetics of myosin-V can explain its high processivity, *Nat. Cell Biol.* 7, 861-869.
- 199. Rosenfeld, S. S. and Sweeney, H. L. (2004) A model of myosin V processivity, J. Biol. Chem. 279, 40100-40111.
- Forgacs, E., Cartwright, S., Sakamoto, T., Sellers, J. R., Corrie, J. E., Webb, M. R., and White, H. D. (2008) Kinetics of ADP dissociation from the trail and lead heads of actomyosin V following the power stroke, *J. Biol. Chem. 283*, 766-773.
- 201. Libby, R. T., Lillo, C., Kitamoto, J., Williams, D. S., and Steel, K. P. (2004) Myosin Va is required for normal photoreceptor synaptic activity, *J. Cell Sci.* 117, 4509-4515.

- 202. Ajtai, K., Peyser, Y. M., Park, S., Burghardt, T. P., and Muhlrad, A. (1999) Trinitrophenylated reactive lysine residue in myosin detects lever arm movement during the consecutive steps of ATP hydrolysis, *Biochemistry 38*, 6428-6440.
- 203. Ladner, R. D. (2001) The role of dUTPase and uracil-DNA repair in cancer chemotherapy, *Curr. Protein Pept. Sci. 2*, 361-370.
- 204. Fischer, C. J. and Lohman, T. M. (2004) ATP-dependent translocation of proteins along single-stranded DNA: models and methods of analysis of pre-steady state kinetics, *J. Mol. Biol.* 344, 1265-1286.
- Tomko, E. J., Fischer, C. J., Niedziela-Majka, A., and Lohman, T. M. (2007) A nonuniform stepping mechanism for E. coli UvrD monomer translocation along single-stranded DNA, *Mol. Cell 26*, 335-347.
- 206. Dillingham, M. S., Wigley, D. B., and Webb, M. R. (2000) Demonstration of unidirectional single-stranded DNA translocation by PcrA helicase: measurement of step size and translocation speed, *Biochemistry 39*, 205-212.
- 207. Martinez-Senac, M. M. and Webb, M. R. (2005) Mechanism of translocation and kinetics of DNA unwinding by the helicase RecG, *Biochemistry 44*, 16967-16976.
- 208. Fischer, C. J., Yamada, K., and Fitzgerald, D. J. (2009) Kinetic mechanism for single-stranded DNA binding and translocation by Saccharomyces cerevisiae Isw2, *Biochemistry* 48, 2960-2968.
- 209. Wang, Q., Arnold, J. J., Uchida, A., Raney, K. D., and Cameron, C. E. (2010) Phosphate release contributes to the rate-limiting step for unwinding by an RNA helicase, *Nucleic Acids Res.* 38, 1312-1324.
- Aregger, R. and Klostermeier, D. (2009) The DEAD box helicase YxiN maintains a closed conformation during ATP hydrolysis, *Biochemistry* 48, 10679-10681.
- 211. Yang, Y., Dou, S. X., Xu, Y. N., Bazeille, N., Wang, P. Y., Rigolet, P., Xu, H. Q., and Xi, X. G. (2010) Kinetic mechanism of DNA unwinding by the BLM helicase core and molecular basis for its low processivity, *Biochemistry* 49, 656-668.