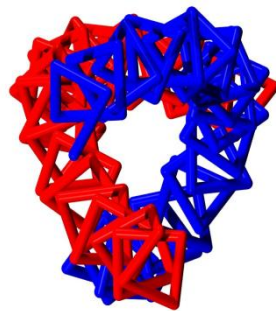


MTA Doktori Pályázat  
Doktori értekezés

Miozin, egy allosztérikus motorfehérje:  
szerkezet-funkció vizsgálatok

*Nyitray László*



Budapest, 2009

## ***Bubusnak***

*A címlap oldalon szereplő molekuláris grafika az általunk meghatározott miozin coiled-coil fragmentum térszerkezetét ábrázolja (PDB: 1nkn)*

# TARTALOMJEGYZÉK

<b>I. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE</b>	<b>5</b>
<b>II. BEVEZETÉS ÉS KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS</b>	<b>6</b>
<b>III. KÍSÉRLETI MEGKÖZELÍTÉS</b>	<b>8</b>
<b>IV. IRODALMI HÁTTÉR</b>	<b>9</b>
<b>IV.1. A miozin szupercsalád</b>	<b>9</b>
<b>IV.2. A miozin, az allosztérikus motorfehérje szerkezete és működése</b>	<b>13</b>
IV.2.1. A miozin fej térszerkezete	13
IV.2.2. Az erőgenerálás „kilendülő erőkar” modellje	15
IV.2.3. Miozin motorfunkciók: csoportos, processzív, erőtartó és reverz motor	17
<b>IV.3. A miozinok szabályozása</b>	<b>18</b>
<b>V. TUDOMÁNYOS KÉRDÉSEK</b>	<b>20</b>
<b>V.1. A miozin reguláció szerkezeti alapjainak tanulmányozása</b>	<b>20</b>
<b>V.2. A miozin motorfunkció molekuláris alapjainak vizsgálata</b>	<b>21</b>
<b>V.3. Vizsgálatok a miozin-V és miozin-VI motorfehérjékkel</b>	<b>21</b>
<b>V.4. A miozin motorokon túlmutató kérdések</b>	<b>21</b>
<b>VI. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK</b>	<b>22</b>
<b>VI.1. Molekuláris biológiai vizsgálatok</b>	<b>22</b>
VI.1.1. A puhatestű miozin nehéz lánc gének szerkezete.	23
VI.1.2. A puhatestű izom MHC gén alternatív terméke, a catchin fehérje	25
VI.1.3. A <i>Physarum polycephalum</i> nyálkagomba miozin nehéz lánc cDNS klónozása	27
<b>VI.2. Miozin-II motor domén (MD): szerkezet-funkció és szerkezeti biológiai vizsgálatok</b>	<b>29</b>
VI.2.1. A <i>Dictyostelium</i> miozin Lys84 érzékeny konformációs szenzor	29
VI.2.2. A miozin ATP-áz aktivitás finomhangolása a Lys84 és Arg704 kölcsönhatás változtatásával	30
VI.2.3. A konvencionális miozin fej „rigor-szerű” állapotának térszerkezete	31
<b>VI.3. Miozin-II regulációs domén: szerkezet-funkció és szerkezeti biológiai vizsgálatok</b>	<b>35</b>
VI.3.1. A kagyló mio2 RD dinamikája. Fluoreszcens spektroszkópiai vizsgálatok.	36
VI.3.2. A kagyló mio2 RD dinamikáját változtatja meg. EPR spektroszkópiai vizsgálatok.	37
VI.3.3. A Ca <sup>2+</sup> kötésen és a foszforiláción alapuló szabályozás összehasonlítása	39
VI.3.4. A <i>Physarum</i> miozin Ca <sup>2+</sup> -kötőhely azonosítása és jellemzése	41
VI.3.5. A <i>Physarum</i> miozin RD térszerkezete	42
<b>VI.4. Miozin-II coiled-coil domén: szerkezet-funkció és szerkezeti biológiai vizsgálatok</b>	<b>46</b>
VI.4.1. A kagyló miozin rúd N-terminális <i>coiled-coil</i> régiója instabil szerkezetű	46
VI.4.2. A legelső miozin rúd fragmentum térszerkezet: egy instabil <i>coiled-coil</i>	47
VI.4.3. A mio2 motorok szabályozása és a proximális S2 stabilitása	50
<b>VI.5. Vizsgálatok az intrecelluláris szállítómotor mio5-tel és a DYNLL könnyű lánccal</b>	<b>52</b>
VI.5.1. A <i>Drosophila</i> mio5 nem processzív motorfehérje	53

VI.5.2. A mio5 fark könnyű lánc (DYNLL) kötőhelyének azonosítása	54
VI.5.3. A LC8 könnyű lánc (DYNLL) egy eukarióta csomóponti fehérje („hub protein”)	58
<b>VI.6. Vizsgálatok miozin-VI-tal: a magányos töltött <math>\alpha</math>-hélixek felfedezése.</b>	<b>63</b>
VI.6.1. A mio6 <i>coiled-coil</i> szerkezetűnek jószolt fark doménje egyszálú $\alpha$ -hélixet alkot	63
VI.6.2. A magányos töltött $\alpha$ -hélix (CSAH) egy eddig fel nem ismert fehérje szerkezeti motívum	64
<b>VII. AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA</b>	<b>68</b>
<b>VIII. HIVATKOZÁSOK</b>	<b>73</b>
<b>IX. KÖZLEMÉNYLISTA</b>	<b>83</b>
IX.1. A disszertáció alapját képező közlemények:	83

## I. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ABRM: anterior bissus retraktor izom

ANS: 8-anilinonaftalén-1-szulfonát

CaM: kalmodulin

cc:  $\alpha$ -helikális *coiled-coil* szerkezet

CSAH: egyszálú, nagy töltéssűrűségű  $\alpha$ -hélix (*charged single  $\alpha$ -helix*)

DYNLL: LC8 dinein könnyű lánc, DLC (*dynein light chain*)

DSC: differenciális pásztázó kalorimetria

ELC: esszenciális könnyű lánc (*light chain*)

EM: elektronmikroszkópia

ESR: elektron spin rezonancia

GTD: globuláris fark doménje (*tail domain*)

HMM: nehéz meromiozin (*heavy meromyosin*)

HSQC: heteronukleáris egyszeres-kvantum koherencia (2-dimenziós NMR spektrum)

IAA: jódacetamid

ITC: izotermális titrációs kalorimetria

kDa: kilodalton

LC: könnyű lánc (*light chain*)

LMM: könnyű meromiozin (*light meromyosin*)

MD: motor (katalitikus) domén

MHC: miozin nehéz lánc (*heavy chain*)

MYO5: miozin-V génje

MYO6: miozin-VI génje

NMR: nukleáris magmágneses rezonancia

pr-S2: proximális S2 (az S2 N-terminális régiója)

RD: regulációs (könnyű lánc-kötő) domén

RLC: regulációs könnyű lánc (*light chain*)

S1: szubfragmentum-1

S2: szubfragmentum-2

SW1: miozin S1 kapcsoló-1 (*switch-1*)

SW2: miozin S1 kapcsoló-2 (*switch-2*)

TEMPO: 2,2,6,6-tetramethylpiperidinoxyl

*„A mozgatók és a mozgók némelyike mármost járulékosan mozgat és mozog, mások pedig önmaguknál fogva. Járulékosan jelesül egyrészt azok, amelyek pusztán csak ott vannak a mozgatókban illetve a mozgókban, ... önmaguknál fogva pedig egyfelől azok, amelyek nem pusztán csak ott vannak a mozgatóban illetve a mozgóban, másfelől azok, amelyeknek nem valamely részlete mozgat vagy mozog.”*

Ἀριστοτέλης: τὰ φυσικά (ford. Bognár László)

## II. BEVEZETÉS ÉS KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Az Arisztotelész által említett „önmaguknál fogva mozgó és mozgató” objektumok nyilvánvaló képviselői az élőlények. De mi az élő rendszerekben az első mozgató? A mikroszkópba pillantó tudósok vették észre a XVII. században, hogy az „önmaguknál fogva” mozgó alkotóelemek a sejteken belül is megtalálhatók. A XIX. század közepére vált világossá, elsősorban Helmholtz munkássága nyomán, hogy az állatokat mozgató izom tulajdonképpen izotermális gép, amely a kémiai energiát mechanikai munkává tudja alakítani. Kühne 1864-ben már nevet is adott az izomkivonat fő fehérjekomponensének, a miozinnak [3] (bár ő valójában aktomiozin komplexet izolált), de hogy az „önmaguknál fogva” mozgásra fehérjemolekulák képesek, ők az ATP üzemanyaggal működő molekuláris motorok, arra csak Szent-György Albert és munkatársai szolgáltatott bizonyítékot Szegeden, 1942-ben [4]. Szent-György Albert budapesti intézetében dolgozott Bíró Endre, aki az ELTE-n a Biokémiai Tanszéket megalapította 1968-ban, ahol jómagam az 1980-as évek elején elkezdtem pályafutásomat diákként, majd kezdő kutatóként. Izom biokémikusként indultam, de a motorfehérjék sejten belül betöltött szerepe mára mintegy paradigmává vált – ezek a molekuláris motorok biztosítják a belső rendet a sejten belüli kaotikus kémiai világban –, ezért ma már „mesterségem címe” a motorfehérjék, a sok képviselőből álló miozin fehérjecsalád vizsgálata. A Biokémiai Tanszéken sikerült a téma jogfolytonosságát biztosítani, s csak remélhetem, hogy eddigi munkámmal talán sikerült, ha kicsiny mértékben is, valamit hozzátennem az evolúció e csodás termékeinek jobb megértéséhez.

A MTA doktori cím elnyerése céljából írt disszertációmban az Egyesült Államokban töltött posztdoktori évek utáni munkásságomat foglalom össze. Az amerikai tanulmányútról hazatérve, – ahol abban a szerencsében lehetett részem, hogy Szent-Györgyi András professzor csoportjában dolgozhattam, akit mentoromként tisztetek – önálló kutatócsoportot alakíthattam ki, az akkor már Gráf László vezette ELTE Biokémiai Tanszéken. Attól kezdve elsősorban diákokkal dolgoztam együtt, akik nélkül az itt bemutatott disszertáció nem születhetett volna meg. Ugyanez igaz a sok magyar és külföldi együttműködő partneremre is.

**Köszönetemet fejezem ki** volt és jelenlegi diákjaimnak, Málnási Csizmadia Andrásnak, Kovács Mihálynak, Farkas Lászlónak, Nagy Attilának, Blazsek Antalnak, Tóth Juditnak, Gyimesi Máténak, Hódi Zsuzsának, Süveges Dánielnek, Kovács Erikának, Radnai Lászlónak, Rapali Péternek, Hóbor Fruzsínának, Molnár Tamásnak, Kiss Bencének. Kiemelem Málnási Csizmadia András és Kovács Mihály tehetségét, akik ma már nemzetközileg is magasan jegyzett kutatók, önálló kutatócsoportokat vezetnek az ELTE Biokémiai Tanszéken. Sokat köszönhetek posztdoktor munkatársaimnak, Ethan Shimonynak és Németh Attilának. Sokat tanultam és sok segítséget

kaptam szenior kollegáimtól, első tanáromtól Bálint Miklóstól, Hegyi Györgytől, Szilágyi Lászlótól – köszönet érte. Köszönöm Gráf Lászlónak, hogy toleráns főökként lehetővé tette számomra, hogy önálló csoportot alakíthassak ki a Biokémiai Tanszéken. Az évek során sok kiváló, önzetlen és segítőkész együttműködő partnerrel dolgozhattam együtt. Hálásan köszönöm a segítséget legelsősorban a „aktomiozinológia” két nagy öregjének, a már említett Szent-Györgyi Andrásnak és első amerikai főnökömnek, Gergely Jánosnak. Rajtuk kívül a külföldi együttműködő partnereknek, Clive Bagshawnak, Jerry Brownnak, Carolyn Cohennek, Michel Espinoza-Fonsecának, Kazuhiro Kohamának, Kazuo Oiwanak, Jim Sellersnek, Peter Vibertnek, Akira Yamadának, valamint a magyaroknak, Belágyi Józsefnek, Bodor Andreának, Debreceni Juditnak, Gáspári Zoltánnak, Harmat Veronikának, Hajdú Istvánnak, Hetényi Csabának, Jancsó Ágnesnek, Kardos Józsefnek, Perczel Andrásnak, Tompa Péternek, Tölgyesi Ferencnek és Závodszy Péternek.

Végül **különleges köszönet** a hosszú türelemért a családomnak, szüleimnek, feleségemnek, három gyermekemnek.

A dolgozat címében az allosztéria említése a motorfehérjék működésének egyik leglényegesebb vonását emeli ki, nevezetesen a molekulán belüli információáramlás, a funkcionális helyek közötti kommunikáció molekuláris mechanizmusát jelzi. Az allosztéria a motorfunkció *sine qua non*-ja. Az elmúlt évtizedben az allosztéria jelentése kiszélesedett, jelentősége növekedett a fehérjeműködés megértése terén – nem csak a „más helyre” kötődő ligandum(ok) kiváltotta diszkrét konformáció változás lehet a kommunikáció alapja, hanem a szerkezeti dinamika megváltozása is [5]. A disszertációmban összefoglalt szerkezet-funkció vizsgálatok többsége a miozin allosztérikus működésének egyes aspektusait taglalja. A miozin szupercsaládba tartozó fehérjék molekuláris anatómiája<sup>1</sup> a következőképpen néz ki: az egy vagy kettő „fej”<sup>2</sup> a „nyak” kapcsolja a változatos modulokat tartalmazó „farok” régióhoz. A három funkcionális régió allosztérikus módon kommunikál egymással. Az eredményeket bemutató első fejezetben molekuláris biológiai vizsgálatokról számolok be, azután végighaladok a miozinon a „főtől a sarokig”,<sup>3</sup> s összefoglalom a fő szerkezeti egységekkel kapcsolatos szerkezet-funkció vizsgálataink eredményeit (1. ábra). Korábban az izom kontrakció motorjával, a konvencionális miozinnal (miozin-II) foglalkoztunk, ma már nem-konvencionális, nevezetesen a V-ös és VI-os osztályba tartozó miozinok is a vizsgálataink tárgyát képezik. Az utóbbiak kapcsán kutatásaim a motorfehérjétől a fehérjetudomány más izgalmas területei felé kanyarodtak: jellemeztünk egy multifunkcionális eukarióta csomóponti fehérjét, valamint leírtunk egy új fehérjeszerkezeti motívumot is. Ezeket az eredményeket is ismertetem a disszertációban.

A disszertáció szerkezetét úgy állítottam össze, hogy a **Kísérleti megközelítés** rövid, csak utalok az igen sokféle alkalmazott módszerre (s az részletekre kíváncsi olvasót kérem, hogy tanulmányozza a függelékben közölt eredeti közleményeket). Az **Irodalmi háttér** fejezetben tömören mutatom be a „miozinológia” legfőbb ismérveit. A **Tudományos kérdések** felvetés után az **Eredmények és megvitatásuk** alfejezetekben kétféle mélységben mutatom be azokat az eredményeket, amelyeket a Szent-Györgyi laboratóriumban végzett posztdoktori munkám után, már

---

<sup>1</sup> A miozin szerkezeti leírására, a „molekuláris anatómia” kifejezést, még a térszerkezet ismerete előtt, Bálint Miklós és munkatársai vezették be.

<sup>2</sup> A miozin „fej” kifejezést nem egyértelműen használja az irodalom. Eredetileg az S1 proteolitikus fragmentumot tekintették fejnek, amely valójában a motor doménből és a „nyak” régiót képviselő regulációs doménből áll, azaz anatómiailag helytelenül a miozinnál a „nyak” a „fej” része. Ennek ellenére én ezt a nevezéktant követem.

<sup>3</sup> Pápai Páriz Ferencet kifejezésével élve (*Pax Corporis, Kolosvár, 1695*)

önálló munkacsoportommal értünk el. Nagyobb hangsúlyt helyezek és valamivel részletesebben tárgyalom a szerkezeti biológiai munkáinkat (öt kiemelt publikáció: [6-10])<sup>1</sup>), de csak tézis jellegűen a többi kutatási eredményt. Néhány olyan eredményt is bevettem a disszertációba, amelyek különböző okokból ezidáig nem kerültek teljes értékű publikálásra, de fontosnak vélek a munkásságom egészét tekintve. Az eredményeket bemutató alfejezeteknél lábjegyzetben jelzem a saját hozzájárulásomat a kollaborációban készült munkákhoz<sup>2</sup>. Először a tárgyalt téma megértése szempontjából fontos előzményeket foglalom össze (**háttér**), majd az **eredmények** következnek. Az alfejezet egy részét **kóda**<sup>3</sup> zárja, amely egy összegző, lezáró megvitatás a szakirodalom tükrében, a ma még hiányzó vagy nem egyértelmű ismeretek felvillantásával.

### III. KÍSÉRLETI MEGKÖZELÍTÉS<sup>4</sup>

„Kedvec” fehérjéim titkainak megértéséhez a biokémia, biofizika, molekuláris biológia, szerkezeti biológia, bioinformatika és sejtbiológia módszertani arzenálját együttesen kellett alkalmazni. Biokémikusként a '90-es években megtanultam, és aktívan használni kezdtem a géntechnológia teljes tárházát, a génkönyvtár készítéstől és molekuláris klónozástól kezdve a fehérje túltermelő rendszerekig. A klasszikus biokémiai módszereken (pl. fehérje tisztítási módszerek, kromatográfiás és elektroforézis technikák, limitált proteolízis, oldalláncok kémiai módosítása és keresztkötő reagensek használata, stb.) kívül számos biofizikai (pl. fluoreszcencia, cirkuláris dikroizmus, infravörös, elektronspin rezonancia spektroszkópia, differenciális pásztázó kalorimetria) és *in silico* bioinformatikai módszert (pl. szekvencia analízisek és jóslások, molekuláris dinamikai szimulációk és dokkolások) alkalmaztunk. A *steady-state* és modern gyorskinetikai (enzim-szubsztrát és fehérje-fehérje, fehérje-ligandum kötés) vizsgálatokhoz kromogén és fluorogén szenzorokat használtunk. Együttműködés keretében alkalmunk nyílt *in vitro* motilitási kísérletek elvégzésére is. Végül a szerkezeti biológia *ultima ratio*-ja: a nagyfelbontású szerkezetek meghatározására röntgen krisztallográfiát és NMR spektroszkópiát alkalmaztunk. Az *in vitro* szerkezeti vizsgálatok mellett eljött az idő, hogy a fehérjék működését *in vivo* rendszerekben is vizsgáljuk. Ezen a téren is megtettük első lépéseinket (pl. konfokális mikroszkópia segítségével kolokalizációs vizsgálatok).

A molekuláris és szerkezeti biológiában általános redukcionista megközelítést használtuk, a kísérletek jó részéhez módszertani okokból nem is használható teljes miozin helyett valamelyik jól definiált szerkezeti/funkcionális doménnel/modullal végeztük a kísérleteket, amelyeket egy-egy kivételtől eltekintve rekombináns fehérjeként valamilyen fehérje túltermeltető rendszerben állítottunk elő.

---

<sup>1</sup> A félkövér kiemelés a saját publikációkra vonatkoznak

<sup>2</sup> A Carolyn Cohen csoportjával közösen publikált munkák egy részében saját megítélésem szerint megosztott „senior co-author” szerepem volt, de ennek feltüntetésének későbbi fontosságára a megírás idején még nem gondoltam.

<sup>3</sup> Zenerajongó amerikai együttműködő partnereim, Szent-Györgyi András és Carolyn Cohen javaslatára több közös publikációnk diszkusszió fejezetét „kóddal” zártuk. Ezt a kifejezést vettem át a disszertációban is.

<sup>4</sup> Az alkalmazott módszereket, amennyiben ez a megértéshez fontos, az *Eredmények* alfejezeteiben felsorolom, a részletek az eredeti közleményekben olvashatók.

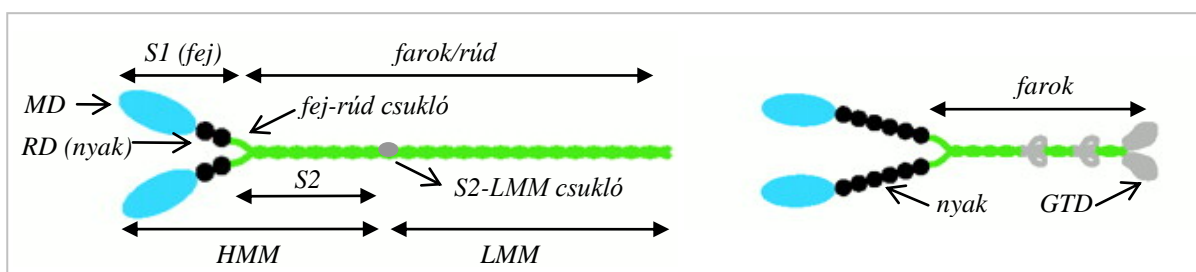


## IV. IRODALMI HÁTTÉR

Az első fejezetben bemutatom az eukarióta proteom egyik legváltozatosabb fehérje családját, a miozin szupercsaládot. A második fejezetben részletesebben jellemzem a miozinok fő szerkezeti elemeit a „főtől a sarokig”, valamint felvázolom a miozin motor működését a ma általánosan elfogadott „kilendülő erőkar” modell alapján. Végül a miozinok szabályozási elveit és mechanizmusait ismertetem.

### IV.1. A miozin szupercsalád

A miozinok ubiquiter eukarióta fehérjék<sup>1</sup> [11-13]. Az izomszövetből ismert konvencionális miozin, a molekuláris motorok „doyen”-je, csak egyik képviselője egy kiterjedt fehérje szupercsaládnak. A jelenleg hozzáférhető legteljesebb leltár (326 fajból 2300 szekvencia) 35 miozin családot tartalmaz.



1. ábra. A konvencionális (b) és a nem-konvencionális miozin-V (j) fő szerkezeti elemei és fragmentumai

MD: motor domén, RD: regulációs domén, S1: szubfragmentum-1, S2: szubfragmentum-2,

HMM: nehéz meromiozin, LMM: könnyű meromiozin, GTD: globuláris farok domén

A **konvencionális miozin** heterohexamer fehérje (1. ábra). Két azonos ún. nehéz láncból (MHC) és két pár ún. könnyű láncból épül fel. Az N-terminális feji régió az ATP- és aktin-kötő motor doménből<sup>2</sup> (MD) és a mechanikai erőkaroként működő, de a motor szabályozásában is szerepet játszó nyaki régióból, a regulációs doménből<sup>3</sup> (RD) áll. A kalmodulin szupercsaládba tartozó könnyű láncok a nyaki régió két IQ motívumához<sup>4</sup> kötődnek. A regulációs (RLC) és esszenciális könnyű lánc (ELC) a szabályozás mellett az erőkar szerkezetét stabilizálják. Az LC-k jellegzetessége, hogy a CaM négy EF-kéz motívuma helyett maximum egy funkcionális  $Me^{2+}$ -kötőhelyük van. A C-terminális „rúd”<sup>5</sup> régió „szuperhelikális” (*coiled-coil*) szerkezetű, amely a két miozin nehéz lánc (MHC) dimerizációjáért és a filamentumképzésért felelős. Limitált proteolízissal és/vagy rekombináns DNS technológiával az *in vitro* szerkezet-funkció vizsgálatokhoz kiválóan felhasználható funkcionális fragmentumokat lehet előállítani.<sup>6</sup> Ezek a motor funkcióval rendelkező

<sup>1</sup>Eddigi ismereteink szerint csak a törzsfajlódás alján elhelyezkedő három fajból hiányoznak: egysejtű vörösmozzatból (*Cyanidioschyzon merolae*), valamint két parazita protozoából (*Giardia intestinalis* és *Trichomonas vaginalis*).

<sup>2</sup>Alternatív elnevezése: katalitikus domén.

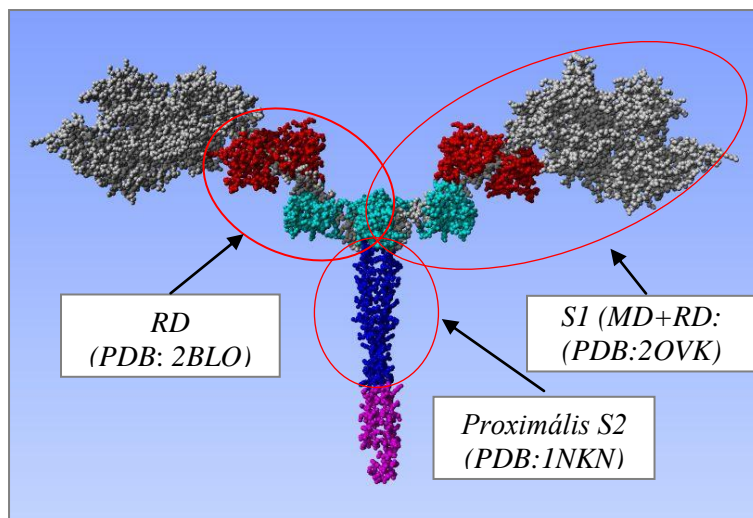
<sup>3</sup>Alternatív elnevezése: könnyű lánc-kötő domén. Szigorúan véve a regulációs domén helytelen elnevezés, mivel a domén fogalom csak egy polipeptidláncban belül értelmezhető, az RD pedig az MHC nyaki régiójából és a két könnyű láncból álló komplex. Ennek ellenére az irodalom használja és a disszertációban én is ezt az elnevezést használom.

<sup>4</sup>Apo-CaM-kötő motívum, amely nevét a konszenzus szekvencia (IQxxxRGxxxR) első két aminosaváról kapta.

<sup>5</sup>A konvencionális miozin hosszú „farok” régióját eredetileg „rúd” névre keresztelték, én is megtartom ezt az elnevezést. A nem-konvencionális miozinoknál viszont a „farok” kifejezést fogom használni.

<sup>6</sup>Spektroszkópiai (kinetikai) mérésekhez a HMM és az S1 alkalmasabbak a teljes miozinnál, mivel fiziológiás ionerősség mellett is szolubilisek.

nehéz meromiozin (HMM) és szubfragmentum-1 (S1), valamint a filamentumokat (illetve parakristályokat) képző miozin rúd és könnyű meromiozin (LMM). A rúd N-terminális harmada a szubfragmentum-2 (S2) (2. ábra).



2. ábra. A konvencionális miozin HMM in silico modellje.

A három bekarikázott molekularészlet térszerkezetének leírása a disszertáció részét képezi

A **nem-konvencionális miozinok** általános felépítése is hasonló (1. és 3. ábra). A miozin szupercsaládba sorolás a konzervatív MD szekvenciákon alapszik. A nyaki régió 1-6 IQ motívumot tartalmaz, amelyekhez általában kalmódulin (CaM) könnyű láncok kötődnek. Az IQ motívum jellegzetessége, hogy a CaM apo-formában kötődik hozzájuk [14]. A fark „szuperdomén” a különböző miozin osztályokban sokféle szerkezeti/funkcionális egységből állhat, tipikus moduláris felépítésű. A kétféjű miozinok mindig tartalmaznak *coiled-coil* modult. Az egyéb modulok/domének fehérje-fehérje illetve fehérje-membrán kölcsönhatással ruházzák fel az adott miozint (SH3, PH, GAP, FERM, cink-ujj stb.). Az intracelluláris transzportban részvevő miozinoknál a fark doménekhez kötődnek a szállítandó kargók<sup>1</sup>.

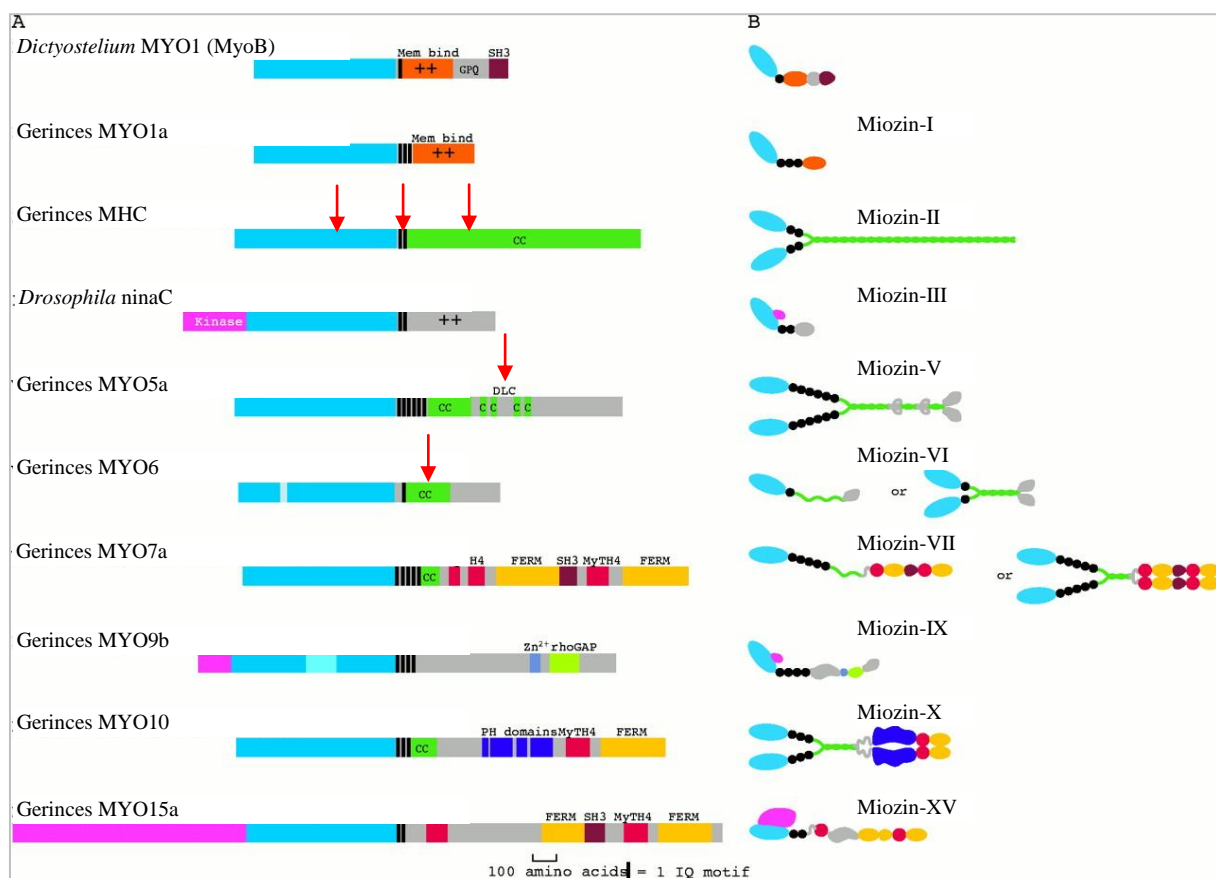
A szupercsaládon belül a konvencionális miozin a miozin-II (mio2) jelölést kapta.<sup>2</sup> Természetesen erről a miozinról rendelkezünk a legtöbb információval, ez a miozin motorok archetípusa. A miozin ortológok és paralógok evolúciós vizsgálata alapján viszont úgy tűnik, hogy az „ösmiozin” az I-es osztályba tartozhatott. Ezt követhette a mio5 és a növény-specifikus mio11 megjelenése. A mio2 az állatokon kívül az összes gombában és az *Amoebosoa* törzsben fordul elő. A mio6 az állatoknál jelent meg. Gerincesekben 14 miozin osztályt írtak le, míg saját genomunk 13 miozin osztályban kb. 40 MHC gént tartalmaz. A humán „miozom” összetétele: 15 mio2, 8 mio1, 2 mio3, 3 mio5, 1 mio6, 2 mio7, 2 mio9, 1 mio10, 2 mio15, 1 mio16, 2 mio18, 1 mio19 és 1 mio35 paralóg. Összehasonlításképpen, a *C. elegans* genom 7 osztályban 17 MHC, a *Drosophila* genom pedig 8 osztályban 13 MHC gént tartalmaz [15, 16].

A konvencionális miozint (**miozin-II**) leginkább az izomkontrakció motorjaként ismerjük. De az izomszöveteken kívül megtalálható szinte az összes állati sejttípusban (ezek a „nem-izom” mio2 paralógok). Különböző mio2 paralógok működtetik a váz-, szív és simaizmot.

<sup>1</sup> A transzport motorhoz tranziténisan kötődő molekula, vezikula vagy organellum általános elnevezése

<sup>2</sup> A miozin-II elnevezés a „kétféjűségre” utal. A másodikkal leírt miozin egyfejű, ezért a miozin-I nevet kapta, míg a további miozin osztályokat felfedezésük sorrendjében nevezték el. Használatban van egy újabb, arab számokat használó nevezéktan is (pl. a miozin-V helyett miozin-5). A disszertációmban a miozinok rövid neveként a kétféle nevezéktant vegyíttem (azaz a miozin-II rövidítése mio2).

Gerincesekben legalább 15 mio2 ortológ fordul elő. Ezeket egy kiterjedt MHC géncsalád kódolja (9 vázizom, 2 szívizom, 1 simaizom és 3 nem-izom MHC), de a diverzitást a simaizom és nem-izom MHC géneknél alternatív *splicing* is növeli. A nem-izom izoformák szerepet játszanak az állati sejtosztódás citokinézisében, sejt migrációban, sejtadhéziókban, a sejt polaritás kialakításában, a sejtalkal dinamikusan változóiban, a citoszkeleton átrendeződésekben, membránstruktúrák (membrán receptorok, lipid tutajok) mozgásában, az idegsejtekben a neuritok kinövésében. A nem-izom izoformák tipikusan hosszú idejű sejtbeli erő kifejtésre és erő tartásra specializálódtak. A mio2 legjellemzőbb szerkezeti tulajdonsága, hogy a hosszú *coiled-coil* szerkezetű rúd régió segítségével filamentumokat képez [17]. A mio2 „csoportos” motor, azaz csak egy szupramolekuláris komplexben, a miozin filamentumban képes erő kifejtésre. A miozin filamentumképzésért felelős, néhány kDa hosszúságú szekvenciát korábbi kutatásaim során a rúd C-terminális régiójában azonosítottuk [18]. Az irodalomban ma erre a motívumra az ACD (*assembly competent domain*) elnevezést használják [19].



### 3. ábra. A miozin nehéz lánc szupercsalád néhány tagja

- A) A miozin nehéz lánc moduláris felépítése (kék: MD, fekete: az RD IQ motívumai, zöld: coiled-coil, további színek: egyéb farok modulok, piros nyilak: saját vizsgálataink tárgya.  
 B) A miozin osztályok sematikus szerkezete (Krendel és Moosaker nyomán [1])

Az összes miozin-I motorfehérje egyfejű miozin. Ezen kívül közös szerkezeti elemük a membránköti bázikus „farok homológia domén”. Egy hosszabb és egy rövidebb farokkal bíró alcsaládra oszthatók. Szerepük van az aktin citoszkeleton szervezésében, a sejt motilitásban, a vezikuláris transzportban, az exo- és endocitózisban, a hallás- és egyensúlyérzékelés adaptációjában, a *Drosophilá*-ban a bal-jobb aszimmetria létrejöttében. A hámsejtek

kefeszegélyében előforduló mio1a az aktin kötegeket rögzíti a sejtmembránhoz. Egyik paralógjuk a sejtmagban a transzkripció szabályozásában játszhat szerepet [20]. A miozin-III érdekessége, hogy tartalmaz egy N-terminális kináz modult is. Egyfejű motorfehérje, amely elsősorban a fotoreceptor sejtekben expresszálódik, ahol szállító és szabályozó szerepet tölthet be [21].

A **miozin-V** a „hattyúnyakú” miozin, amelyet a mikrofilmanetumok mentén mozgó intracelluláris transzport motorok közül a legjobban ismerünk. Az állatokban és gombákban általános elterjedésű. A gerincesekben három paralógja ismert, míg a fark régiót érintő alternatív *splicing* további szövetspecifikus izoformákat eredményez. A gerinces mio5 processzív motorfehérje, azaz az ATP-áz ciklusok során nem disszociál az aktin filamentumról, hanem „lépdel” rajta [22]. Szerkezetét tekintve legfőbb jellegzetessége a hosszú nyak, amely hat IQ motívumot tartalmaz és főként CaM alegységek kötődnek hozzájuk. A szegmentált *coiled-coil* szerkezetű fark régió egy globuláris fark doménben (GTD) végződik, amely a kargó-kötésért felelős. Érdekessége még, hogy a mio5a izoforma fark régiójához is kötődik egy könnyű lánc, amely megegyezik a dinein motorfehérje egyik könnyű lánc alegységével (DYNLL vagy LC8). Szerepükre először a világos szőrszint okozó, nagyon sokat tanulmányozott egér gén, a *dilute* klónozása világított rá – a mio5a a melanocitákban a melanoszómák szállításában vesz részt. Letális változata idegrendszeri problémákat okoz. A mio5a humán ortológja a ritka, 1-es típusú Griscelli-szindróma okozója [23]. A mio5a részt vesz a sejtek membránforgalmában, szinaptikus és más vezikulumok, mRNS-ek szállításban. A mio5b paralóg elsősorban receptorok (transzferrin, acetilkolin, glutamát) intracelluláris szállításában játszik szerepet [24]. A mio5 közeli rokonai a növényekre jellemző miozin-XI. Közülük kerül ki a ma ismert leggyorsabb miozin motorfehérje: a *Chara corallina* mio11 *in vitro* motilitási sebessége meghaladja a 100  $\mu\text{m}/\text{sec}$ -ot [25].

A **miozin-VI** az egyetlen olyan ismert miozin motor, amely az aktin filamentumok negatív vége felé mozog. *In vitro* motilitási vizsgálatokban processzív motorfehérjének bizonyult, ami alapján intracelluláris szállító motornak tekintik, amely a sejtp periféria felől centrális irányba szállít különböző kargókat a kortikális aktin hálózat mentén [26]. Elképzelhető, hogy szerkezeti szerepe is lehet a citoskeleton és a hozzá kapcsolódó membránstruktúrák, fehérjekomplexek szervezésében [27]. Számos kölcsönható partnerét, potenciális kargóját leírták. Szerepet tulajdonítanak neki a vezikuláris membránforgalomban, endocitózisban, a sejtmigrációban, a mitózisban, a Golgi-komplex morfológiai szervezésében, a *Drosophila* embriogenezisében. Mutációi emberben és egérben (*Snell's waltzer* fenotípus) halláskárosodáshoz vezetnek [26]. Több izoformája ismert, amelyek alternatív *splicing*-gal jönnek létre és szövetspecifikusan expresszálódnak. Szerkezeti-funkcionális érdekessége, hogy a „nyaka” csak egy IQ motívumot tartalmaz, mégis  $\sim 36$  nm-t „lép”. Ez a tulajdonság az egyszerű „kilendülő erőkar” modell alapján (ld. később) nem magyarázható. További furcsaság, hogy a fark régióban jóvolt *coiled-coil* szekvencia alapján dimer miozinnak gondolták, viszont a szövetekből izolált mio6 stabil monomert képez (és *in vitro* motilitási tesztben nem-processzív) [28].

A miozin-VII mutációi felelősek (néhány más génnel együtt) a leggyakoribb örökletes sükettség-vakságot okozó betegségért, az 1-es típusú *Usher*-szindrómáért (illetve az egér *shaker-1* fenotípusért). A fül szőrsejtekben a sztereocíliumok integritásában és az érzékelő funkcióban is szerepet játszik, míg általánosabb funkciója a sejtheadhézióban lehet [1]. A miozin-X a filopódiumok elongációjában [29], a miozin-XV, a mio1, mio6, mio7-tel együtt a sztereocíliumok működésében vesz részt. A mio7 és mio10 esetében még kérdéses, hogy monomer, dimer vagy mindkét formában működnek-e a sejten. A mio15 valószínűleg monomer, mivel nem tartalmaz *coiled-coil* domént.

[1]. A miozin-IX különlegessége, hogy bár egyfejű miozinnak tekintik, a működése processzív. Azonkívül elképzelhető, bár egyértelműen nem bizonyított, hogy szabályozott módon az aktin filamentum mindkét vége felé tud haladni. A fark régió egy Rho-GAP domént tartalmaz. Szerepe lehet a citoszkeleton átrendeződésével járó folyamatokban illetve ezek szabályozásában [1].

## IV.2. A miozin, az allosztérikus motorfehérje szerkezete és működése

Mint azt a bevezetőben már említettem, a miozin kontraktilis fehérje tulajdonságát az izomból izolált aktomiozin ún. szuperprecipitáció jelenségén keresztül Szent-Györgyi Albert ismerte fel. Kísérleteik bizonyították, hogy a miozin és az aktin kölcsönhatása és az ATP-ből származó energia szükséges és elégséges feltétele az izomkontrakciónak [4]. A motor protein elnevezést az erőgenerálásra képes ATP-áz enzimekre csak 1989-től használjuk [30], amikorra teljessé vált a klasszikus, azaz a citoszkeletális filamentumok mentén mozgó és mozgató fehérjék „triumvirátusa”<sup>1</sup>. Ma már a motorfehérjék széles tárházát ismerjük, a citoszkeletális motorokon túl a polimeráz és helikáz motorokon keresztül a kromoszóma és víruscsomagoló motorokig [31], amelyek az energáz enzimek [32] kémiai energiát mechanikai munkává átalakító csoportját alkotják.

A citoszkeletális motorfehérjék tipikus allosztérikus fehérjék. Az aktin filamentumok mentén mozgó illetve mozgató miozin ATP-áz allosztérikus aktivátora az aktin. A mikrotubulusok mentén haladó kinezin és a dinein allosztérikus aktivátora a tubulin. A polimer „sínhez” kötődés nélkül a motor enzim aktív helyéről az ATP hidrolízis termékei, a foszfát és az ADP csak nagyon lassan távoznak, ezt a folyamatot gyorsítják fel „távhatással” az allosztérikus effektorok. Mivel a miozin és az aktin közös evolúciós töről fakad a G-fehérjékkel, az ott használatos kifejezéssel az aktin illetve a tubulin a miozin illetve az aktin nukleotid-kicszerélődési faktora (GEF). A miozin ATP-áz kinetikai sémáját Lynn és Taylor 1971-ben írták le [33], akik felismerték, hogy a nukleotid és az aktin kötődése a miozin motorhoz kölcsönösen befolyásolják egymást. A kötőhelyek közötti kommunikáció molekuláris mechanizmusának magyarázatához meg kellett ismernünk a miozin atomi felbontású szerkezetét, amelyet legelőször Rayment és munkatársai közöltek 1993-ban egy csirke vázizomból származó mio2 szubfragmentum-1 (S1; izolált miozin fej) kristályosítása alapján. A szerkezet a miozin erőkar leírásához és a kilendülő erőkar modell megszületéséhez vezetett. Az allosztérikus működés egyik fontos elemére, a nukleotid- és az aktin-kötőhely kölcsönös kommunikációjára is következtetni lehetett a szerkezetből [34]. Az időközben megszületett több tucat szerkezeti modell, többek között a saját munkáink is (ld. 2. ábra és VI.2.3., 3.4., 4.2.), a kemomechanikai energiaátalakulás szerkezeti alapjairól tovább finomították az ismereteinket, bár nyitott kérdések így is maradtak még [35].

### IV.2.1. A miozin fej térszerkezete

A mio2 molekuláris anatómiáját<sup>2</sup> a szerkezet megismerés előtt Bálint Miklós és munkatársai limitált proteolízis és hagyományos fehérjekémiai módszerek segítségével tárták fel [18, 36]. Az S1 három fragmentumát (25, 50 és 20 kDa) a hasítás után is összetartják másodlagos kötőerők, csak a köztük lévő, az nukleotid- és az aktin kötőhelynél lokalizálható felszíni hurok régió (hurok-1,

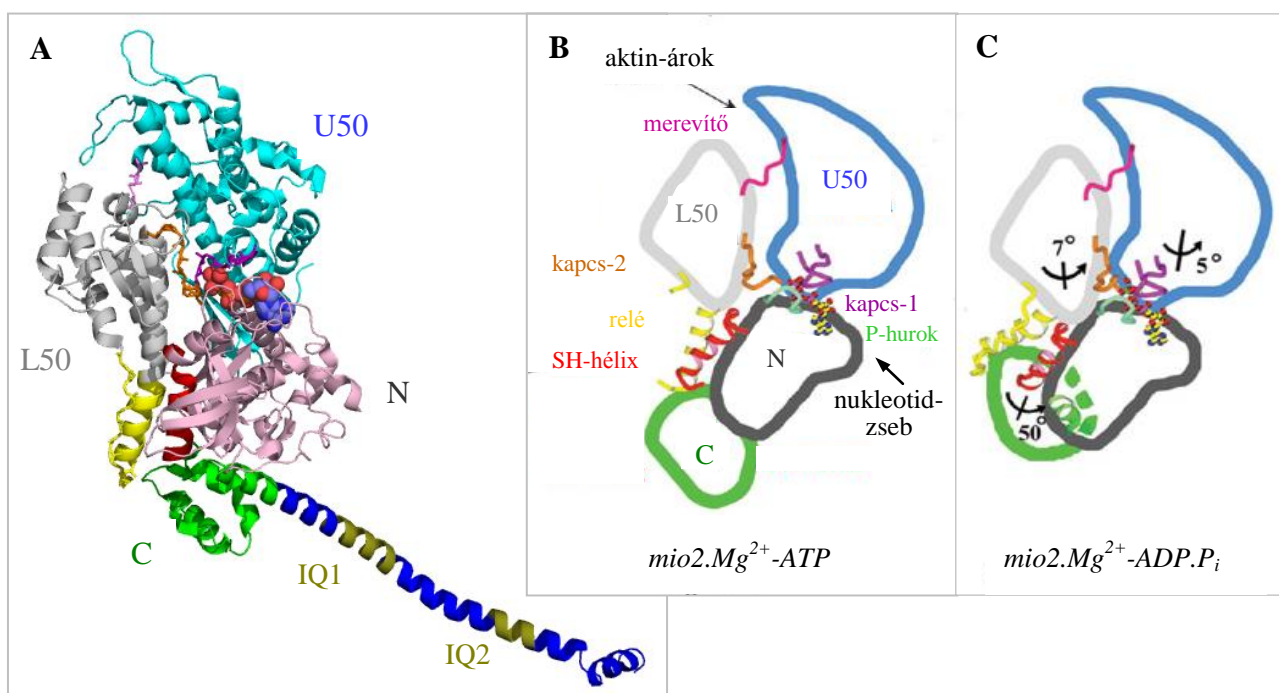
<sup>1</sup> A dineint 1965-ben [24] a kinezint 1985-ben [25] írták le.

<sup>2</sup> Bálint Miklós és mtsi által használt kifejezés.



hurok-2) hasad el. A proteolitikus fragmentumok nem valódi domének, mint azt a térszerkezeti vizsgálatok feltárták, hanem csak az MD szubdoménjei (25 kDa, 50 kDa és 20 kDa), mivel az MD szerkezeti magját alkotó hétláncú vegyes  $\beta$ -lemezhez mind a három fragmentum láncrészele hozzájárul. Ugyanilyen  $\beta$ -lemez alkotja a kinezinék és a G-fehérjék szerkezeti magját is, ami bizonyítja az evolúciós rokonságukat [2]. A  $\beta$ -lemez az összekötő elemekkel, hurkokkal együtt nem csak egyszerű szerkezeti mag, hanem a mechanokémiai történés „lelke” is lehet, s újabban transzduktor-elemnek (*transducer*) nevezik [37] (ld. később és VI.2.3.).

A mio2 fej aszimmetrikus szerkezetű (4 x 6,5 x 16,5 nm; 4. ábra). A globuláris MD négy szubdoménre osztható: N-terminális (N), felső-50 kDa (U50), alsó-50 kDa (L50) és konverter (C). Érdekes, hogy a mio2 MHC N-terminális régióját egy SH3-domén alkotja<sup>1</sup> (szerepét nem igazán ismerjük). Az elongált C-terminális nyak régióban (RD) a nehéz lánc két IQ motívuma egyszálú  $\alpha$ -hélix, amelyet az ELC és RLC stabilizál. A proteolitikusan szenzitív, erősen flexibilis hurok-1 és



**4. ábra. A mio2 fej szubdomének és a kapcsoló régiók**

(A) Kagyló miozin S1 pre-munkáütem állapot (PDB:1qvi). IQ1: ELC kötőhely, IQ2: RLC kötőhely. Az ELC és RLC nem látszik. (B és C) Dictyostelium MD poszt-rigor és pre-munkáütem állapot. N: N-terminális (25 kDa), U50: felső-50 kDa, L50: alsó-50 kDa, C: konverter szubdomének

hurok-2 a térszerkezeti modellekből hiányzik. A nukleotid-kötőzseb és az aktin-kötőhely alatti mély árok az MD két oldalán helyezkedik el, az utóbbi alja közel van a nukleotid-zseb aljához. Az aktin kötésében a hurok-1 régió kívül az L50 szubdomén és aktin-árok melletti több felszíni hurok is részt vesz (az egyik mutációi, több más szívizom miozin mutációval együtt öröklődő hipertrófiás kardiomiopátiát okoznak) [38]. A szubdoméneket erősen konzervatív szekvenciájú, de többségében flexibilis kötőelemek kapcsolják egymáshoz: kapcsoló-1 (*switch-1*), kapcsoló-2 (*switch-2*), P-hurok, relé-hélix és -hurok, SH-hélix és a merevítő (*strut*). A P-hurok az N-szubdomén része, a nukleotid-foszfátját köti (ez a közös elem a P-hurok ATP-áz szupercsaládban). A kapcsoló-1 és -2 a nukleotid-zseb két oldalát alkotják (a kapcsoló-1 az U50, a kapcsoló-2 az L50 szubdomén része). A relé az L50-t kapcsolja a konverterhez. A konverter elnevezés arra utal, hogy ez a szubdomén

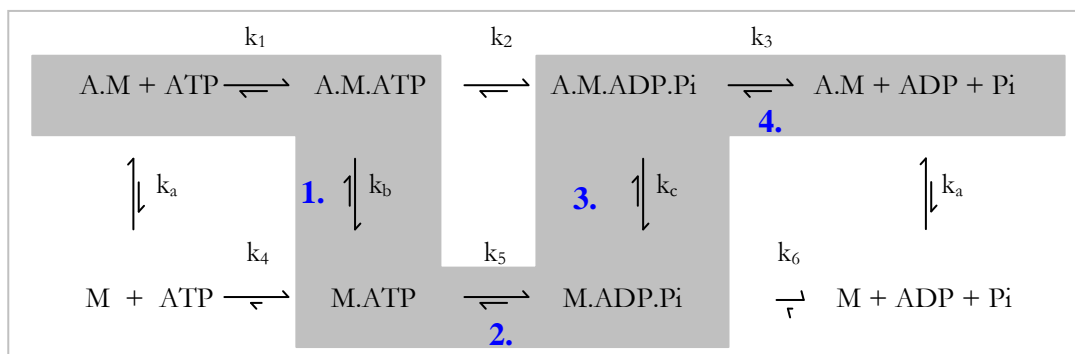
<sup>1</sup> A kis SH3-domént a nagy N-szubdomén részének tekintik, holott a fej az SH3 doménből és a négy szubdoménből áll.

„konvertálja” a hozzá kötött erőkarral együtt az ATP kötés kiváltotta kismértékű konformációváltozást (~0,5 nm) a mio2 munkaütemet jellemző ~10 nm-es „lépéssé” (5. ábra). A konverter doménben található SH-hélix<sup>1</sup> a relével együtt vesz részt az erőkar felhúzásában [39]. Az erőkar alapja az SH-hélixben található konzervatív glicineknél található. A merevítő egy kevésbé flexibilis elem, amely az aktin árok közepén kapcsolja össze az U50 és L50 szubdomént. Megemlítendő még egy fontos szerkezeti elem, az MD és az RD határánál a hajlékony (*pliant*) régió, amely a motor terhelés alatti működése során rugó-elemként működhet [40].

Az RD térszerkezetét csak a Ca<sup>2+</sup>-regulált fésűskagyló mio2-ből ismerjük nagy felbontásban [41]. A két LC körülöleli a két IQ motívumot, amelyek közül a második csak egy „fél-IQ”, a kötőhely C-terminális fele (az MHC Trp-gazdag „kampó” (*hook*) régiója) az RLC N-doménjét a Ca<sup>2+</sup>-CaM-ra jellemző módon köti. Ennek részben az az oka, hogy az RLC egyetlen funkcionális EF-kéz motívuma egy stabilizáló Mg<sup>2+</sup>-ot köt. Az ELC egyetlen funkcionális EF-kéz motívuma eltér a kanonikus Me<sup>2+</sup>-kötőhelyektől, s csak az RLC-vel kölcsönhatásban képes Ca<sup>2+</sup>-kötésre [41, 42] (ld. részletesebben VI.3.3. és VI.3.4.). Az IQ motívum és a CaM komplex kristályszerkezetét egy mio1 és egy mio5 izoformából ismerjük. A HMM térszerkezetét nagy felbontásban még nem sikerült meghatározni, s korábban a fej-rúd csukló régióról is csak egy *in silico* modell készült [43].

#### IV.2.2. Az erőgenerálás „kilendülő erőkar” modellje

A miozin motor működésének megértéséhez az enzimatikus ciklus lépéseit és szerkezeti állapotok összefüggését kell megérteni. Az Lymn-Taylor kinetikai [33] és a Huxley-féle kilendülő-keresztídhid mechanikai modell egyesítése alapján a miozint, bár nyilvánvaló egyszerűsítéssel, „négyütemű” motornak tekinthetjük [44] (5. és 6. ábra). A miozin fejek ATP jelenlétében az aktin



**5. ábra. Az aktomiozin ATP-áz enzimatikus ciklus egyszerűsített sémája**  
A fiziológias fluxus a háttérrel kiemelt útvonalon halad. A számok a motor „négy ütemére” utalnak. Az apo-aktomiozin (*rigor komplex*) nem-fiziológias állapot.

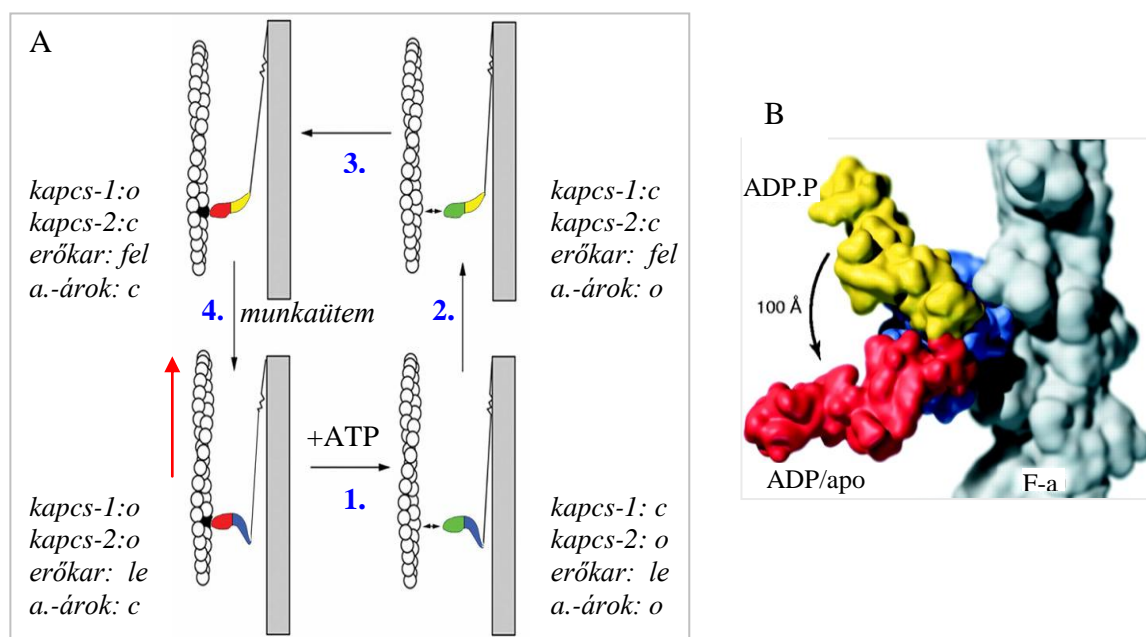
filamentumról leválnak<sup>2</sup> (*detachment*) (1. ütem). Az ATP-kötés és -hidrolízis hatására a miozin fej „felhúzott” állapotba kerül (*recovery* vagy *repriming stroke*; 2. ütem), és így kötődik vissza a vékony filamentumhoz (3. ütem). Az erő kifejtő lépés, a munkaütem (*power stroke*; 4. ütem) során az aktinhoz kötött miozin fej a felhúzott állapotból a lecsapott konformációba tér vissza, ezzel elhúzva a vékony filamentumot a vastag filamentumhoz képest. Ez a lépés a hidrolízis-termékek felszabadulásához kapcsol, amelyek közül először a foszfát-ion majd az ADP távozik.

<sup>1</sup> Az elnevezés a miozin fej legreaktívabb tiol-oldalláncára utal, amely kémiai módosítása gátolja az ATP-áz aktivitást

<sup>2</sup> A aktomiozin disszociációra az irodalom a „leválás” kifejezést használja

A szerkezeti modellek alapján nyilvánvalóvá vált, hogy a felhúzott állapotban a miozin fejnek az aktinhoz képest csak a disztális részén, az erőkar pozíciójában történik nagy konformációváltozás. Innen ered a „kilendülő erőkar” (*swinging lever arm*) elnevezés. A modell feltételezi, hogy a miozinok filamentumba rögzítettsége miatt a molekulán belül elasztikus elemeknek kell közvetíteni az erőkar mozgásakor fellépő erőhatásokat [45]. A miozin fejben a különböző állapotok közötti átmeneteket úgy képzelhetjük el, hogy a többé-kevésbé merev szubdomének egymáshoz képest elmozdulnak a mechanikai csuklóként, csapágyként működő kapcsoló elemek segítségével. A négyütemű motornak megfelelő fő szerkezeti / funkcionális állapotokat legegyszerűbben a kapcsoló-1 és -2, az aktin-árok és a konverter-erőkar helyzetének leírásával jellemezhetjük (6A. ábra) [35, 46-48].

Az aktinhoz erősen kötött aktomiozin szerkezetekről (apo-M és M.ADP) kri-elektronmikroszkópos képrekonstrukció alapján készült modelleket ismerünk (6B. ábra). Az aktin kötés



**6. ábra. A „négyütemű” mechanikai ciklus (A). A miozin erőkar a munkáütem kezdetén és végén (B)**  
A kapcsoló-1 és -2, valamint az aktin-árok az egyes állapotokban „nyitott” (o) vagy „zárt” (c) konformációjú. Az erőkar „lecsapott” vagy „felhúzott”. A munkáütem során történik az erőkiéjtés, aminek a hatására az aktin filamentum a piros nyíl irányában elmozdul.  
Az aktomiozin modellek kristályszerkezeti és krio-EM felvételek alapján készültek [2].

legalább két lépésben történik. A gyengébb kötés elsősorban elektrosztatikus jellegű, a hurok-1 vesz elsősorban részt benne, utána jön létre az erős sztereospecifikus, inkább hidrofób jellegű kötés. Az aktomiozin modellben az aktin-árok zárt. A nukleotid-zsebhez kötődő ligandum és az aktin-árok kölcsönös egymásra hatása ezt feltételezi, hogy ha az aktin-árok zárt, akkor a nukleotid zseb nyitott legyen, míg gyengén-kötött állapotokban fordított a helyzet. A gyenge aktin-kötött állapotokról ( $K_d > 10 \mu\text{M}$ ; M.ATP és M.ADP.P<sub>i</sub>) az S1 (vagy az MD) kristályszerkezeti modelljei tudósítanak. A poszt-rigor állapot az ATP kötés és disszociáció („1. ütem”) utáni konformációhoz állhat közel, míg a pre-munkáütem („2. ütem” után) az átmeneti állapot közeli szerkezet lehet (előállítható pl. ADP.V<sub>i</sub> komplex jelenlétében). Csak a kagyló miozin S1-nél sikerült egy harmadik, az ún. belsőleg szétkapcsolt állapot szerkezetét meghatározni [49, 50], amire az SH-hélix tranziens megolvadása jellemző (amit biokémiai adatok más mio2 ortológoknál is alátámasztanak). Ennek a szerkezetnek a helye a kontrakciós ciklusban még bizonytalan (ld. VI.2.3.). A poszt-rigorból a pre-munkáütem történő átmenet során az ATP kötés hatására a kapcsoló-2 az ún. nyitottból (*open*) az ún. zárt



(*closed*) állapotba kerül<sup>1</sup>. Ezt az elmozdulást a relé-hélix és a relé-hurok közvetíti a konverter szubdoménhez és a hozzá szorosan kapcsolt erőkarhoz, amely ily módon a felhúzott állapotba kerül<sup>2</sup>. Az erőkar felhúzásához a relé-hélix elmozdulásán kívül a merev SH-hélix dugattyú-szerű mozgása is hozzájárul [39, 51]. Az aktin-árok az előző két állapotban nyitott. Zárt aktin-árkot ezidáig csak a processzív mio5 és mio6 fej konstrukciók apo-formában történő kristályosításával sikerült megfigyelni [52-54]. Ebben az ún. rigor-szerű állapotban az aktin-árok zárt, a kapcsoló-1 és kapcsoló-2 pedig nyitott állapotban van. A munkaütem szerkezeti hátteréről a többi szerkezet ismeretében vonhatunk le következtetéseket. Nem tudjuk pontosan, hogy az aktinhoz történő erős kötődés milyen allosztérikus útvonalon vezet az erőkar lecsapásához. Mindenesetre valószínűbb, hogy a foszfát felszabadulást megelőzi az erőgenerálás, azaz a munkaütem az erős aktin-kötött állapot kialakulásával veszi kezdetét, majd ennek hatására a kapcsoló-1 kinyílik [55]. Másrészt úgy tűnik, hogy az aktin kölcsönható felszín és a nukleotid-zseb közti allosztérikus kommunikáció szerkezeti alapját a transzduktor  $\beta$ -lemez szerkezeti torzulásában és relaxációjában kell keresnünk [37] (ld. VI.2.3.).

#### IV.2.3. Miozin motorfunkciók: csoportos, processzív, erőtartó és reverz motor

Ebben a fejezetben a miozin motor domén szerkezete, az ATP-áz kinetikai mechanizmusa és a változatos motorfunkciók közötti viszonyt vázolom fel. A kilendülő erőkar modell valószínűleg a miozin supercslád minden képviselőjére igaz (bár az előfordulhat, hogy egyes miozinok nem működnek motorfehérjeként). A miozinok funkcionális sokfélesége (gyors vagy lassú motilitás, csoportos vagy egyedi működés) ezek szerint elsősorban nem az alapvető szerkezeti különbségekből, hanem az ATP-áz kinetika részleteinek eltéréséből, az egyes kinetika lépések különböző sebességi állandóiból következik [56].

Van arra is példa, hogy az MD-n belüli szerkezeti különbség okoz lényegi különbséget a motor működésében. A mio6 esetében az aktinon történő haladási irány megfordulásáért (reverz motor) egy extra szerkezeti eleme felelős [57, 58]. A konverter domént az erőkar felé meghosszabbító ún. inszert-2 és a hozzá kötődő kalmodulin az erőkar irányát a felhúzott állapotban megfordítja a többi miozinhoz képest. A miozin erőkar hossza az egy ATP hidrolízise hatására bekövetkező „lépéshosszt” határozza meg. A mio2 két IQ motívumot tartalmazó (két LC-t kötő) erőkarja ~10 nm-es lépést tesz lehetővé, míg a „hattyúnyakú”, hat IQ motívum hosszúságú mio5 erőkar az aktin filamentumon egyenes vonalban lépkedhet, lévén a G-aktin hélix menetmagasságának megfelelő, ~36 nm-es lépésekre képes. Az erőkar hossz megváltoztatásával a kilendülő erőkar modell érvényességére lehetett bizonyítékot szolgáltatni [59].

A mio2 „csoportos” (*ensemble*) motor, működésének előfeltétele, hogy filamentumba rendeződjön, míg a nem-konvencionális miozinok egy része magányos motorként működik. Az utóbbi funkció előfeltétele az enzimatis processzivitás, ami igen hasznos tulajdonság például az intracelluláris transzportot végző motoroknál. A processzivitáshoz két fej szükséges,<sup>3</sup> amit a fark régió dimerizációja biztosít, valamint kinetikai feltétel, hogy az ATP-áz ciklus magas terhelési arányú (*duty ratio*) legyen. Az utóbbi érték azt fejezi ki, hogy *steady-state* működés során a

<sup>1</sup> Ez az átmenet az ATP hidrolízis előfeltétele, a kapcsoló-2 közel kerül az ATP  $\gamma$ -foszfáthoz és a direkt hidrolízist végző víz molekula is aktiválódik a nukleofil támadáshoz.

<sup>2</sup> Ez a 2. ütem, a „recovery stroke”.

<sup>3</sup> Kivétel lehet a miozinok között pl. a mio9 (ld. IV.1) illetve a kinezinek között is vannak egyfejtű processzív motorok

ciklusidő hány százalékát töltik a fejek erősen kötve az aktinhoz. Magas terhelési arányt a kinetikai cikluson belül az ADP lassú disszociációjával vagy gyors ADP visszakötődési sebességgel lehet biztosítani. Az alacsony terhelési arány a csoportos motorokra jellemző. Ebben az esetben a mechanikai ciklus sebesség meghatározó lépése a  $P_i$  disszociáció. A magas terhelési arány esetén viszont a sebesség meghatározó lépés az ADP disszociáció lesz. A processzivitás további előfeltétel, hogy a két fej koordináltan, allostérikus módon működjön. Ezt a képességet a két fej terhelés-függő aktin kötődés-lekapcsolódás cikluson keresztül valósíthatja meg. A processzív motor „lépegetése” a mechanikai lépések terhelésfüggő kinetika finomhangolásával, az ún. kézzől-kézre (*hand-over-hand*) mechanizmussal megy végbe [60].

Érdekes módon a csoportos mio2 motorok között is van magas terhelési aránnyal működő. Kovács Mihály és mtsi a nem-izom mio2A és mio2B izoformák összehasonlítása kapcsán azt az eredményt kapták, hogy az utóbbi terhelési aránya magas (50%), motilitása pedig lassú. Ez a sajátosság azt sugallja, hogy az mio2B elsősorban hosszú távú erőtartásra specializálódott [61-63]. A kinetikai paraméterek feszülés érzékelése fontos fiziológiai jelentőséggel bíró tulajdonság lehet több más miozin családnál is (mio1, mio5, mio6) [56, 64]. A terhelés-függő enzimátikus ciklus rendkívül energiahatékony motorműködést tesz lehetővé. A simaizom tónusos kontrakciója (*latch*) is valószínűleg a fenti mechanizmussal valósul meg, ahol a simaizom és nem-izom mio2 izoformák a működés során együttműködhetnek [61, 65]. Elképzelhető az is, hogy egyes miozinok nem is végeznek mozgató, csak erőtartó funkcióval rendelkeznek. Fiziológiás szempontból különleges mio2 funkció a kagyló záróizmokra jellemző „*catch*” kontrakció, ahol gyakorlatilag energiafelhasználás (azaz ATP hidrolízis) nélkül történik erő kifejtés [66] (ld. VI.1.2.)

### IV.3. A miozinok szabályozása

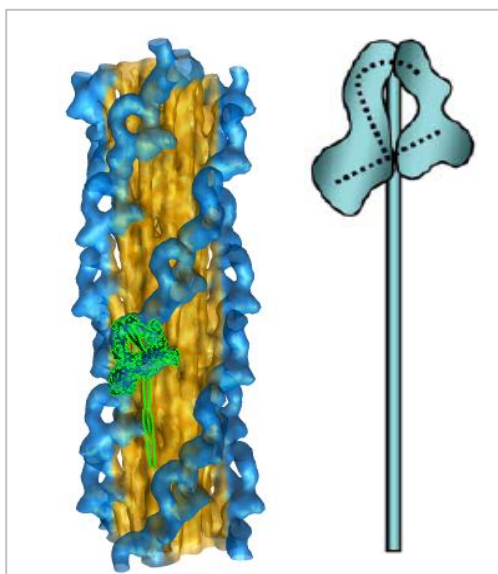
A miozin szupercsalád tagjai között vannak ún. nem-regulált motorfehérjék is, amelyek izolált formában konstitutív módon aktívak. Ide tartozik az összes gerinces vázizom és szívizom mio2 izoforma. Természetesen *in vivo* a „nem-regulált” miozinok is szabályozás alatt állnak, de közvetett módon, az aktin filamentumhoz kötődő szabályozó fehérjék (a troponin-tropomiozin és a kalponin-kaldezmon rendszer) révén [67]. Az intrinszik módon regulált miozinok extra tulajdonsága, hogy van egy „kikapcsolt” állapotuk is, amikor az ATP-áz aktivitásuk és a motilitásuk gátolt. Ide tartozik a gerinces simaizomból és az összes nem-izomsejtből származó mio2, valamint valószínűleg az összes nem-konvencionális miozin is [68].<sup>1</sup> A szabályozásért minden mio2-nél elsődlegesen az RD felelős. Az RD-n keresztül kétféle módon történhet a motor aktivitás „ki-be” kapcsolása: a regulációs könnyű lánc (RLC) reverzibilis foszforilációján, vagy az esszenciális könnyű lánc (ELC) illetve nem-konvencionális miozinoknál a kalmodulin (CaM) alegységek közvetlen  $Ca^{2+}$  kötésén keresztül.

A foszforiláción keresztül történő szabályozásra példa a gerinces simaizom és nem-izom mio2 [69]. Az RLC Ser19 foszforilációját és defoszforilációját elsődlegesen egy dedikált miozin könnyű lánc-kináz (MLCK) és -foszfatáz (MLCP) végzi. Érdekes módon az aktin-filamentum függő szabályozás alatt álló gerinces vázizom mio2 RLC-t is foszforilálja egy MLCK izoforma, de

---

<sup>1</sup> Fontos kiemelni, hogy a szabályozásnak van egy elsődleges szintje, ami az ATP-áz aktivitás „ki-be” kapcsolását jelenti. Ezen felül minden miozin motor aktivitását, a fiziológiás szerepnek megfelelően kisebb-nagyobb számú további allostérikus vagy reverzibilis kovalens mechanizmusok szabályozhatják, amelyeket modulációs szintnek tekintünk. A mio2 családban egyértelmű a két szint különválasztása, a többi miozin regulációját ilyen mélységig még nem ismerjük.

ez csak moduláló, az izomkontrakciót potenciáló szereppel bír, az ATP-áz aktivitás bekapcsolásához nem szükséges [70]. Az előző két mio2 család változatos biológiai szerepe alapján nem meglepő, hogy egy sor protein-kináz szignalizációs útvonal effektor lépése az RLC foszforilációja [69]. Ezekre a szabályozó mechanizmusokra és a különböző útvonalak *crossstalk*-jára nem térek ki. Fiziológias körülmények között természetesen az RLC foszforiláció (és defoszforiláció) is  $Ca^{2+}$ -szabályozás alatt áll. Elég csak az MLCK CaM alegységére utalnom. Az irodalmi összefoglalásban csak a miozin közvetlen szabályozásának a szerkezeti-funkcionális hátterét érintem. A miozinok szabályozásának további lehetősége lehet a nehéz lánc farok vég foszforilációja, ami gátolja vagy elősegíti a nem-izom mio2 „minifilamentumok” kialakulását [71]. Érdekes megjegyezni, hogy a reverzibilis kovalens foszforilációs szabályozás a lassúbb működésű miozinokra jellemző, míg a direkt vagy a troponinon keresztüli  $Ca^{2+}$ -szabályozás gyorsabb választ vált ki.



**7. ábra. A mio2 „kikapcsolt” szerkezete**  
Relaxált tarantula izom relaxált vastag filamentum krio-EM képrekonstrukció. Zöld: egy mio2 molekula (b), és az aszimmetrikus visszahajló fejek vázlatos rajza (j)

A  $Ca^{2+}$ -regulált miozinoknak három típusa ismert. A konvencionális miozinok közül a kagyló izom miozint a  $Ca^{2+}$  a kalmodulin-szerű ELC-hez kötődve aktiválja [72, 73], míg a *Physarum* nyálkagomba miozint, ugyancsak az ELC-hez kötődve gátolja [74] (ld. VI.3.) Érdekes módon sok gerinctelen mio2 kettős szabályozás alatt áll, az RLC foszforilációja és az aktin-filamentumhoz kötött troponin-komplex is szabályozza az aktivitásukat [75, 76]. A nem-konvencionális miozinok többségénél a CaM alegységek  $Ca^{2+}$ -kötése aktiváló és gátló hatást is kifejthet a motor működésére, de a  $Ca^{2+}$  pontos szabályozó szerepe még nincs feltárva.

A  $Ca^{2+}$ -kötésen és a foszforiláción alapuló szabályozásra egyaránt jellemző, hogy csak „kétfejű” miozin fragmentummal figyelhető meg, az S1 ATP-áz aktivitása nem regulált. További közös vonás, hogy a nukleotid-hely és a regulációs-hely allosztérikus viszonyban van, a gátolt állapot csak nukleotid jelenlétében

jön létre. A mio2 kikapcsolt állapotára jellemző az EM képrekonstrukciós vizsgálatok alapján felismert szerkezeti tulajdonság, hogy a fejek aszimmetrikusan kapcsolódnak egymáshoz (a „blokkolt” fej aktin-kötő régiója a „szabad” fej konverter szubdoménhez), s visszahajlanak az S2 *coiled-coil* doménhez, s ezáltal nem képesek a motorfunkcióra (7. ábra) [77-80]. Az első leírt ilyen „off” szerkezet az ún. 10S monomer volt, amelyben egy disztális LMM régió is kapcsolódik a fejekhez [81]. A 10S szerkezet a nem-izom mio2 inaktív „tároló” formája lehet. Az izom mio2 kikapcsolt állapota a szabályos helikális aszimmetrikus miozin fej elrendezést mutató relaxált vastag filamentumokon (pl. tarantula izom defoszforilált állapotban [80]) figyelhető meg. Az aszimmetrikus kikapcsolt állapot nem-konvencionális miozinoknál (mio5, mio6, mio11) úgy is kialakulhat, hogy a GTD kötődik a fejekhez, a kargó kötődése pedig allosztérikusan bekapcsolja a motort [24, 82]. Az egyelőre nem világos, hogy pontosan melyik kinetikai állapotban „fagynak be” az aszimmetrikus fejek, mindenesetre a ciklus leáll, a motor gátlás alá kerül (ld. még VI.2.3., VI.3.4).

## V. TUDOMÁNYOS KÉRDÉSEK

A bevezetőben már említettem, hogy a tudományos érdeklődésem homlokterében a miozin motorfehérjék szerkezet-funkció vizsgálata állt. A miozinok összes fő szerkezeti elemével végeztem kutatásokat. **A miozinok funkcionális elemei, a nukleotid- és aktin- kötőhely, a mechanikai erőkar, a könnyű láncok regulációs helyei, a fej-farok csukló régió és a nem-konvencionális miozinoknál pl. a kargó-kötő domének allosztérikus módon kommunikálnak egymással. A fenti allosztérikus mechanizmusok feltárása lehet a kulcs a miozin motorok működésének megértéséhez.** Kutatásaim fő vonulata a konvencionális miozinok  $\text{Ca}^{2+}$  szabályozásának és a *coiled-coil* szerkezeti elemek szerepének megismerésére irányult.

Az utóbbi években a miozin szupercsalád több más tagját is elkezdtem tanulmányozni. Ezek a munkák, ahogy ez sokszor megesik az alapkutatással foglalkozókkal, az eredeti kérdésselvetésekhez képest új, a motorfehérjéken túlmutató, általánosabb kutatási területekre is elvezettek. A konkrét tudományos problémákat, amelyekre a disszertációban összefoglalt kutatásaim során választ kívántam kapni, az alábbiakban foglalom össze:

### V.1. A miozin reguláció szerkezeti alapjainak tanulmányozása

- A  $\text{Ca}^{2+}$ -szabályozás modelljeként használt fésűskagyló harántcsíktolt izom miozin és a simaizom típusú záróizom miozin eltérő biokémiai tulajdonságainak molekuláris hátterét kívántuk feltárni. Arra is kíváncsiak voltunk, hogy a gerinctelen puhatestű izmokban a miozin izoforma diverzitás milyen módon valósul meg (VI.1.1.).
- Célunk volt, hogy molekuláris biológiai vizsgálatokkal hozzájáruljunk a kagyló záróizom miozin különleges működési mechanizmusának (*catch* kontrakció) felderítéséhez. Azonosítani akartunk egy záróizom specifikus fehérjét, amelynek részleges aminosav szekvenciája az MHC-vel mutatott egyezést. (VI.1.2.).
- A mio2  $\text{Ca}^{2+}$  szabályozással kapcsolatban a rekombináns RD-ben a  $\text{Ca}^{2+}$ -kötésre bekövetkező szerkezetváltozásokat, valamint az RD és MD közötti kommunikációt spektroszkópiai módszerekkel terveztük vizsgálni. A fej-farok csukló és a *coiled-coil* régió regulációs szerepére különböző rekombináns fragmentumok dimerizációjából illetve stabilitásvizsgálatából igyekeztünk következtetéseket levonni (VI.3.1.,VI.3.2.).
- A kagyló és a *Physarum* mio2  $\text{Ca}^{2+}$  reguláció összehasonlítása kapcsán azt a kérdést tettük fel, hogy milyen molekuláris háttere lehet az azonos jel által kiváltott ellentétes szabályozásnak? Célunk volt a *Physarum* MHC klónozása, majd rekombináns RD előállítás és szerkezetvizsgálata volt apo- és  $\text{Ca}^{2+}$ -telített formában (VI.3.4.,VI.3.5.).
- A  $\text{Ca}^{2+}$ -kötésen és az RLC foszforiláción keresztül megvalósuló mio2 szabályozás több közös vonást mutat, ami alapján felvetődött, hogy a reguláció molekuláris mechanizmusa is közös lehet. Ezt a kérdést kívántuk vizsgálni a kétféle szabályozást mutató miozinokból (puhatestű izomból illetve gerinces simaizomból) létrehozott hibrid és kiméra nehéz meromiozin (HMM) fragmentumokkal (VI.3.3.).
- A *coiled-coil* régió atomi felbontású szerkezetének feltárása régi adóssága volt a „miozinológiának”. Célunk volt, hogy egy funkcionális szempontból fontos *coiled-coil* fragmentum kristályosításával próbálkozzunk. A  $\text{Ca}^{2+}$  regulációban betöltött esszenciális szerepe miatt a fejhez legközelebbi régióra (proximális S2) esett a választásunk (VI.3.4.,VI.3.5.).

- A regulált és a nem-regulált miozin proximális S2 szekvenciák összehasonlítása alapján felvetődött, hogy a „kikapcsolt” állapot kialakulásának előfeltétele lehet a proximális *coiled-coil* szerkezet instabilitása. Az elképzelést rekombináns S2 konstrukciók hőstabilitásának *in vitro* vizsgálatával és molekuláris dinamikai szimulációkkal teszteltük (VI.4.3.).

## V.2. A miozin motorfunkció molekuláris alapjainak vizsgálata

- Az MD két szubdoménjének kölcsönható felszínén (az erőkar tövéénél), a fejen belüli allosztérikus kommunikációs útvonal mentén helyezkedik el egy Lys és Arg aminosav pár. Közöttük taszító kölcsönhatás jön létre az ún. poszt-rigor állapotban, amely a munkaütem megelőző (*pre-powerstroke*) állapotban megszűnik. Rekombináns *Dictyostelium* miozin MD hely-specifikus mutánsok segítségével vizsgáltuk, hogy a fenti kölcsönhatás megváltoztatása hogyan befolyásolja az ATP-áz aktivitás egyes kinetikai lépéseit (VI.2.1., VI.2.2.).
- A miozin „négyütemű” motorként működik. Több állapot térszerkezetét korábban csak a kagyló miozin S1 esetében sikerült meghatározni, nevezetesen az aktinhoz nem kapcsolódó fejek „felhúzott” állapotát reprezentáló pre-munkaütem (miozin.ADP.Pi) szerkezetet, valamint a ciklus végét reprezentáló, az aktinról levált poszt-rigor szerkezetet. Nem állt rendelkezésünkre a fejek aktin-kötött két állapotáról (a munkaütem kezdetét és a végét reprezentáló konformációk) kristályszerkezeti modell. Felvetettük, hogy a rigor-szerű állapot esetleg előállítható különböző puhatestű izmokból származó miozin S1 fragmentumok nukleotid-mentes állapotban történő kristályosításával (VI.2.3.).

## V.3. Vizsgálatok a miozin-V és miozin-VI motorfehérjékkel

- A processzivitás a „magányos” motorfehérjékre jellemző, mint amilyen a gerinces mio5 (a mio2 ezzel ellentétben „csoportos” motor, *in vivo* csak filamentumban működik). Együttműködés keretében lehetőségünk nyílt rá, hogy egy gerinctelen mio5 (*Drosophila*) kinetikai vizsgálatával kiderítsük, vajon a processzivitás általános stratégia-e ebben az intracelluláris szállítást végző miozin osztályban (VI.5.1.).
- A gerinces mio5 család egyik izoformájának alegysége az LC8 könnyű lánc (DYNLL), amely megegyezik a dinein motorfehérje egyik könnyű láncával. Korábban kimutatták, hogy a DYNLL a miozin-V *coiled-coil* doméneket is tartalmazó farok régiójához kötődik. Felvetődött, hogy a DYNLL a mio5 ún. kargó-adapter alegysége lehet. Célunk volt a DYNLL kötőhely lokalizációja és a kötődés kiváltotta szerkezeti változások vizsgálata, ami alapján a farok könnyű lánc funkciójára nézve vonhatunk le következtetéseket (VI.5.2.).
- A mio6 motorral korábban minden *in vitro* vizsgálatot Leu-cipzárral stabilizált dimer konstrukciókkal végezték. A farok kétségkívül tartalmaz egy *coiled-coil* szerkezetűnek jósolt régiót, de a szekvencia nagy töltéssűrűsége alapján ez a predikció megkérdőjelezhető. Mivel ezidáig nem vizsgálták, hogy a farok domén ténylegesen képes-e  $\alpha$ -helikális dimereket kialakítani, elsődleges célunk ennek eldöntése volt (VI.6.1.).

## V.4. A miozin motorokon túlmutató kérdések

- A DYNLL-ről kiderült, hogy a dinein és miozin-V motorfehérjén kívül több tucat más fehérjéhez is kötődik. Felmerült a kérdés, hogy mi lehet a közös ezekben a komplexekben. A miozin-V-DYNLL komplex vizsgálata alapján kapott eredményeket felhasználva, a választ bioinformatikai elemzéstől vártuk (VI.5.3.).

- A miozin-VI *coiled-coil* szerkezetének jósló régiójáról kiderítettük, hogy magányos  $\alpha$ -hélix szerkezetű. Megfogalmaztuk a kérdést, hogy az egyszálú, nagy töltéssűrűségű  $\alpha$ -hélix (CSAH) milyen gyakorisággal fordul elő a fehérjék világában. A válaszadáshoz két, lehetőleg alapelveiben is különböző jósló program kidolgozását terveztük. Vizsgálni akartuk a CSAH peptidek stabilitását és flexibilitását, valamint kíváncsiak voltunk, hogy milyen szerepet tölthetnek be a fehérjékben (VI.6.2.).

## VI. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

### VI.1. Molekuláris biológiai vizsgálatok

A szerkezet-funkció vizsgálatokat csak olyan fehérjékkel lehet végezni, amelyeknek legalább az elsődleges szerkezetét ismerjük. Munkásságom kezdeti szakaszában ezért több miozin és a miozin működésével kapcsolatos fehérje szekvenciáját kellett meghatároznunk, molekuláris klónozás segítségével. A '90-es évek elején egy MHC méretű polipeptidlánc (közel 2000 aminosav) klónozása és szekvenálása még komoly molekuláris biológiai teljesítmény volt. Az I. táblázat összefoglalja az e téren elért eredményeinket.

#### I. táblázat

Név	klón	faj	Genbank kód	DNS hossz	UniProt kód	Fehérje hossz
mio2 MHC, harántcsíktolt izom	teljes cDNS	<i>Argopecten irradians</i>	<a href="#">X55714</a>	6751	<a href="#">P24733</a>	1938
mio2 MHC, záróizom	teljes cDNS	<i>A. irradians</i>	<a href="#">U09782</a>	6595	<a href="#">Q17042</a>	1951
mio2 MHC gén	teljes gén	<i>A. irradians</i>	<a href="#">AF183909</a>	12077	<a href="#">Q9NJ23</a>	1938
(harántcsíktolt, záró-, kétféle szívizom izoforma + cathcin)					<a href="#">Q9NJ22</a>	1951
					<a href="#">Q9NJ21</a>	1965
					<a href="#">Q9NJ20</a>	1975
					<a href="#">Q9NJ19</a>	995
minititin (twitchin)	rész cDNS	<i>A. irradians</i>	-	2000	-	368
mio2 ELC <sup>1</sup>	teljes cDNS	<i>A. irradians</i>	<a href="#">M17201</a>	531	<a href="#">P07291</a>	156
mio2 MHC, harántcsíktolt izom	teljes cDNS	<i>Placopecten magellanicus</i>	<a href="#">U59295</a>	5853	<a href="#">Q26080</a>	1950
mio2 MHC, záróizom	teljes cDNS	<i>P. magellanicus</i>	<a href="#">U59294</a>	5826	<a href="#">Q26079</a>	1941
mio2 MHC, anterior bissus retraktor izom (ABRM)	rész cDNS	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	<a href="#">AJ249991</a>	5545	<a href="#">Q9U0S7</a>	1705
mio2 MHC, láb retraktor izom	rész cDNS	<i>M. galloprovincialis</i>	<a href="#">AJ249992</a>	5463	<a href="#">Q9U0S6</a>	1708
catchin (myorod)	teljes cDNS	<i>M. galloprovincialis</i>	<a href="#">AJ249993</a>	3530	<a href="#">Q9U0S5</a>	985
mio2 MHC, ABRM		<i>Mytilus edulis</i>	<a href="#">U40036</a>	1023	<a href="#">Q25458</a>	202
tropomiozin	teljes cDNS	<i>M. edulis</i>	<a href="#">U40035</a>	1208	<a href="#">Q25457</a>	1-284
mio2 MHC, plazmódium (myoP1)	teljes cDNS	<i>Physarum polycephalum</i>	<a href="#">AF335500</a>	6484	<a href="#">Q9BJD3</a>	2148
mio2 RLC	teljes cDNS	<i>P. polycephalum</i>	<a href="#">AB076705</a>	589	<a href="#">Q8WSQ4</a>	157
mio2 MHC plazmódium (myoP2, minor izoforma)	rész cDNS	<i>P. polycephalum</i>	-	2277	-	759
mio7	rész cDNS	<i>P. polycephalum</i>	-	144	-	48
mio11	rész cDNS	<i>P. polycephalum</i>	-	201	-	67
mio1C	rész cDNS	<i>P. polycephalum</i>	-	156	-	52
mio1B	rész cDNS	<i>P. polycephalum</i>	-	153	-	51

<sup>1</sup> Az *A. irradians* miozin ELC cDNS-ét újraklónoztuk, s részben szekvenáltuk a génjét is. Az adatbázisban lévő szekvencia hibáit kijavítottuk.

## VI.1.1. A puhatestű miozin nehéz lánc gének szerkezete.

### Háttér

Az irodalmi bevezetőben már említettem, hogy a puhatestűek modell értékű élőlények a miozin  $\text{Ca}^{2+}$ -szabályozás tanulmányozásában. A *Pectinidae* családba tartozó atlanti sekélyvízi fésűskagyló (*Argopecten irradians*) harántcsíkolt adduktor izomból (8. ábra) származó miozin LC-  
ket Szent-Györgyi András csoportjában mások [83], míg az MHC-t én klónoztam [84, 85]. Az izom miozin diverzitás molekuláris alapjainak feltárása, valamint az eltérő aktivitású (gyors illetve lassú



8. ábra. Élő fésűskagyló (b) és az adduktor izom (j)  
Az adduktor nagy része harántcsíkolt izom, míg a fehérebb régió a periférián (a jobb oldalon) a simaizom típusú záróizom („catch muscle”)

kontrakciós sebesség) harántcsíkolt és simaizom típusú adduktor izmokból származó mio2-k összehasonlítása céljából az óriás atlanti fésűskagyló (*Placopecten magellanicus*) MHC cDNS-eket is klónoztuk, valamint közvetlenül vizsgáltuk Az *Argopecten* MHC gén struktúráját. A két mio2 összehasonlítása biokémiai szempontból azért is érdekes és fontos, mivel csak a záróizomból származó izoforma képes a „legenergiatakarékosabb” működésre, a speciális szabályozás alatt álló *catch* kontrakcióra. Egy záróizom specifikus fehérjét, az MHC gén alternatív transzkripciós egységéről átíródó „fejnélküli” miozint, a catchint is klónozással fedeztük fel (VI.1.2.)

Az izom miozinok diverzitása alapvetően kétféle módon valósul meg. A gerincesekben több mint egy tucatnyi MHC génről szövetspecifikusan írónak át a váz-, szív-, és simaizom miozin izoformák.<sup>1</sup> A simaizom mio2 és a simaizomokban is kifejeződő két nem-izom mio2 génről alternatív *splicing*-gal további izoformák keletkeznek [86]. A gerinctelenek közül a *C. elegans*-ban a négy izomspecifikus MHC gént írtak le [87]. Viszont a *Drosophila* genomában a sokféle harántcsíkolt izomban kizárólag egy izom-típusú MHC génről alternatív *splicing*-gal legalább tizenöt izoforma expresszálódik [88].

### Eredmények [89, 90]<sup>2</sup>

**Kimutattuk, hogy az izom miozin izoformák diverzitása a puhatestűekben (az ízeltlábúakhoz hasonlóan, s ellentétben a gerincesekkel) alternatív *splicing*-gal valósul meg (9A és 11A ábra).** Az izom miozinokat kódoló egyetlen, 30 exonból<sup>3</sup> álló MHC öt specifikus alternatív exon íródik át kölcsönösen kizáródó alapon a harántcsíkolt adduktor izomban, illetve az összes simaizom típusú izomban (többek között a kagylóhéjak összetartásáért felelős záróizomban is). A szívizomban (ami szintén simaizom típusú) megjelenik egy minor izoforma is, ahol különböző a rúd nem-helikális farokvég. Az MD-ben található három alternatív exon kódolta szekvencia közül az ATP-kötőhelynél elhelyezkedő flexibilis felszíni hurok-1 (exon-3) lehet felelős a kétféle izom miozin eltérő ATP-áz aktivitásáért. A gyorsabb harántcsíkolt izom miozinnak nagyobb a  $k_{\text{kat}}$  értéke, az aktin  $K_M$ -ben nincs különbség a két izoforma között. A *Placopecten* nagyobb ATP-áz aktivitásáért is az eltérő hurok-1 lehet felelős. Az S2-LMM csuklónál található

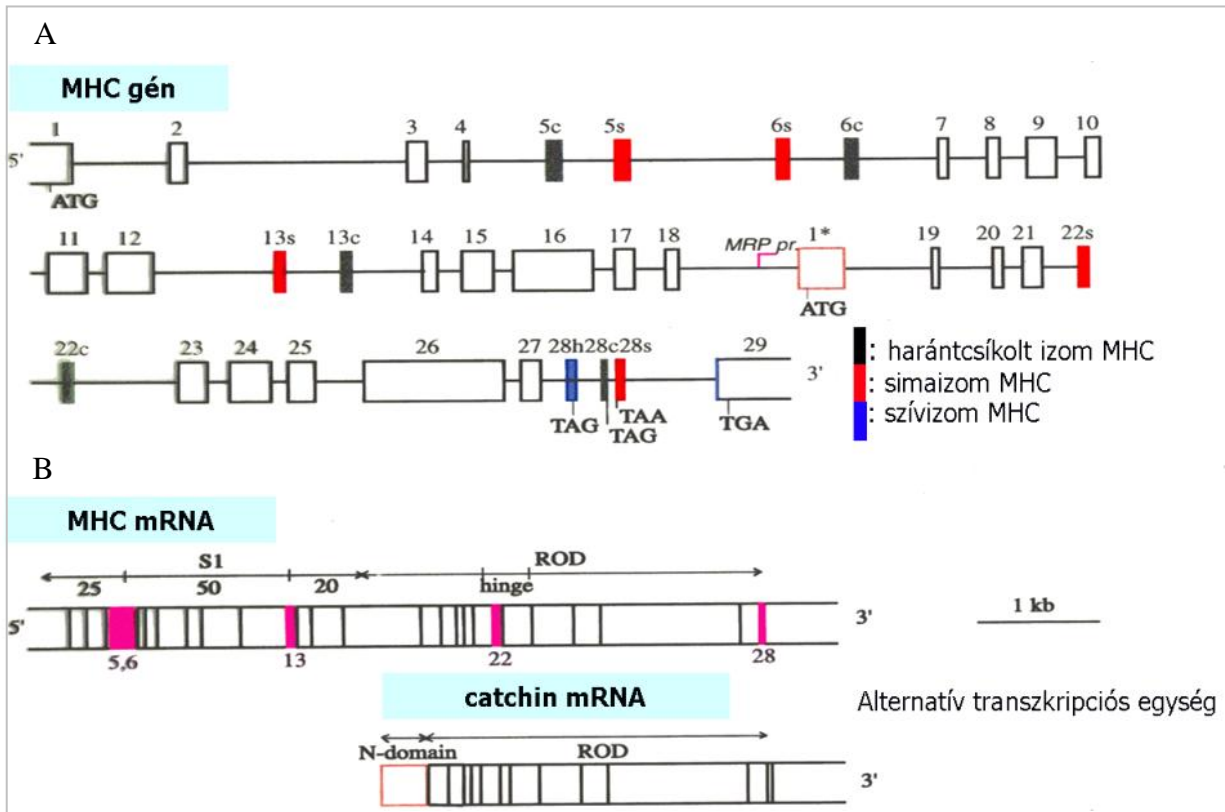
<sup>1</sup> Ugyanez nagyrészt igaz az LC géncsaládra is, amellyel a dolgozatban nem foglalkozom.

<sup>2</sup> A kísérletek tervezése, kivitelezése, értékelése, és cikkírás a [83] publikációban saját teljesítmény, a [84]-es publikációban a kísérletek tervezéséhez és a cikkíráshoz járultam hozzá.

<sup>3</sup> Az *A. irradians* MHC gén teljes szekvenálása után az exonok száma az eredeti publikációban közölt 27 helyett 30-ra változott (ld. Genbank: [AF183909](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AF183909))



alternatív szekvenciának jelentősége lehet az izom specifikus vastag filamentumok kialakításában, de az ATP-áz kinetikát nem befolyásolják. A C-terminális nem-helikális farokvégnek, amely hosszabb a záróizomban, szerepe lehet a *catch* kontrakció szabályozásában (ld. VI.1.2.) A kagyló MHC szekvencia közelebbi rokonságot mutat a regulált mio2 szekvenciákkal (pl. gerinces simaizom), mint a nem-reguláltakkal (pl. gerinces vázizom). A konzervált aminosavaknak (amelyeket „reguláció szenzitív”-nek nevezünk el) szerepe lehet a csak a regulációra jellemző allosztérikus útvonalak kialakításában.



9. ábra. Az fésűskagyló MHC gén (A), valamint az MHC és catchin mRNS szerkezete (B)  
A szövetspecifikus alternatív exonokat szinkód jelzi. A catchin promóter a 18-as intronban található.

### Kóda

Kagylókban, a rovarokhoz hasonlóan az izom miozin diverzitás egyetlen MHC génről alternatív *splicing*-gal valósul meg. Több ilyen állattörzset nem ismerünk. Míg azonban a *Drosophila* összes izom miozin harántcsíkolt izomban működik, a fésűskagylókban azt találtuk, hogy az alternatív MHC géntermékek anatómiailag jelentősen különböző izmokban (harántcsíkolt és simaizom) fejeződnek ki. Megjegyzendő, hogy ez a tény inkább arra nézve bizonyíték, hogy a gerinctelen simaizom és harántcsíkolt izom molekuláris szempontból közelebbi rokonok, mint a gerinces szövetpárjaik. A Szent-Györgyi csoport később egy kalmár (*Loligo pealei*) MHC-t is klónozott, amiben a fent ismertetett alternatív exonokat azonosították [91], azaz a miozin MHC gén alternatív *splicing* a puhatestű törzsre általánosan jellemző. A kalmár ventrális szifon retraktor izomból izolált miozin S1 fragmentumnak<sup>1</sup> a későbbiekben fontos szerkezeti biológiai szerep jutott (ld. VI.2.3.).

<sup>1</sup> Amelynek biokémiai jellemzésében én is résztvettem.

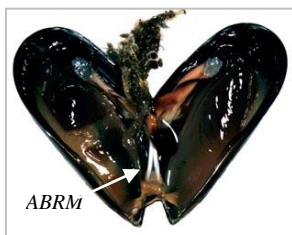


Az alternatív exonok szerepére kiméra, a különböző izoformákból származó exonokat kombináló rekombináns miozin doménekkal izgalmas szerkezet-funkció kérdéseket lehetne feszegetni, miként az a *Drosophila* izom MHC alternatív exonjainak szerepe kapcsán már meg is történt [92]. Ezeket a kísérleteket azonban egyelőre nem tudjuk elvégezni, mivel rekombináns kagyló miozin S1 (vagy HMM) fragmentumokat évtizednyi próbálkozással sem sikerült előállítanunk.<sup>1</sup> Limitált proteolízissel előállított harántcsíkt izom és záróizom miozin S1 gyorskinetikai és motilitás vizsgálatok viszont azt mutatták, hogy a kétféle miozin motor sebességében tapasztalt különbséget az akto-S1 ADP-affinitás és ADP disszociációs sebességi állandó különbözősége okozza, amit az alternatív exon-3 kódolta hurok-1 szekvencia határoz meg [93].

### VI.1.2. A puhatestű izom MHC gén alternatív terméke, a catchin fehérje

#### Háttér

A kagyló záróizom különös működése (*catch* kontrakció) száz éves rejtély [94]. Hogyan képes ez az izom gyakorlatilag energia befektetés nélkül akár napokig erőt kifejteni? A *catch* kontrakcióról tudjuk, hogy a kikapcsolását a szerotonin váltja ki cAMP-függő protein-kináz foszforilációval, amelynek célfehérjéje az MHC mellett egy gerinctelen „minititin”, a twitchin. A normális kontrakciót a  $Ca^{2+}$  koncentráció emelkedése váltja ki, amely a *catch* állapotba akkor kerül, amikor a kalcineurin defoszforilációja a twitchint. Az ATP-áz ciklus ilyenkor gyakorlatilag leáll, de a feszülés fennmarad akár napokig is. A jelenség molekuláris hátterét nem igazán ismerjük [66].



10. ábra *Mytilus*  
ABRM izom

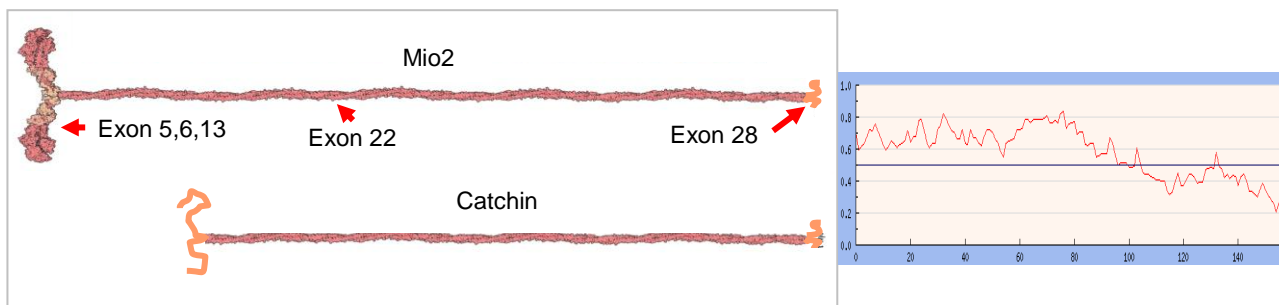
Az előző alfejezetben bemutattam, hogy a simaizom típusú záróizomban kifejeződő mio2 az egyetlen izom MHC génről alternatív *splicing*-gal jön létre, s a  $Ca^{2+}$  szabályozása megegyezik a harántcsíkt izomból származó izoformával. A záróizom vizsgálatokhoz általánosan használt ehető fekete-kagyló (*Mytilus edulis* és *M. galloprovincialis*) anterior bissus retraktor izomból (ABRM, 10. ábra) korábban Cohen és mtsi szekvenáltak két miozin peptidet, amely csak ebben a záróizomban foszforilálódott, más izmokban viszont nem [95]. Az egyik foszforilált Ser-t az MHC nem-helikális farokvégben azonosítottuk, bár a kérdéses szekvencia a záróizom és a harántcsíkt izom izoformában is megtalálható volt [85, 89]. Később feketekagyló ABRM vastag filamentumokban egy ~120 kDa méretű polipeptidet izoláltak, amely a fésűskagyló MHC-val mutatott részleges szekvencia hasonlóságot [96]. Akira Yamadával (Kobe, Japán) fogtunk össze, hogy a foszforilálódó záróizom-specifikus fehérjét molekuláris biológiai eszközökkel azonosítsuk és biokémiaailag jellemezzük.

#### Eredmények [97]

**Kiderítettük, hogy a kagyló záróizmokra specifikus ~120 kDa-os fehérje, a catchin (myorod) az izom MHC gén alternatív terméke,** amely cDNS-ének 5'-vége a rúd régiót kódoló 18-as és 19-e exon közötti intronban található (9B ábra). Az újonnan leírt fehérje azért kapta a catchin elnevezését, mert specifikus a *catch* izmokra, és azt feltételeztük, hogy az energiatakarékos záróizom kontrakció molekuláris mechanizmusában döntő szerepet játszhat. A catchin nagy

<sup>1</sup> Miként más, ezzel próbálkozó csoportoknak sem, lásd pl.[87].

menyiségben (~1:1 MHC:catchin mólarány) expresszálódik az összes vizsgált *catch* típusú puhatestű izomban (*Mytilus*, *Argopecten*, *Pecten*, *Patinopecten*, *Crassostrea*). A 120-150 aminosav hosszú unikális N-terminális régiót az MHC-val megegyező ~800 aminosav követi. Az N-terminális domén sok Pro, Ser, Thr aminosavat tartalmaz, valószínűleg szerkezet nélküli (11. ábra). Az N-doménben és a C-terminális nem-helikális (szerkezet nélküli) farokvégben azonosítottuk a zárízomból korábban izolált két, endogén protein-kináz által foszforilálódó peptidet [95]. A catchin a vastag filamentum komponense, rúd-alakú *coiled-coil* dimert képez. Szerepet játszhat a *catch*



11. ábra. Mio2 és a catchin vázlatos szerkezete (a) A catchin N-domén (1-150) rendezetlen szerkezetű (b) IUPRed predikció. x-tengely: aminosav pozíció, y-tengely: rendezetlenség mértéke

kontrakcióban és/vagy a speciális szerkezetű zárízom vastag filamentumok kialakulásában. Érdekeség még, hogy a catchin egy internális Met tripletről egy 67 aminosavval rövidebb izoformaként is átíródik. Végezetül a nem-*catch*-típusú láb retraktor izomból egy második MHC gén cDNS-ét is azonosítottunk, amely csak 78%-ban azonos az ABRM MHC-vel.

### Kóda

A catchinnel kapcsolatos funkcionális feltételezésünk nem igazolódott, mivel kiderült, hogy a *catch* kontrakcióhoz, legalábbis *in vitro* rendszerben a miozinon kívül egyedül a twitchin (minitin) jelenléte szükséges, és ennek a fehérjének a foszforilációja szabályozza a folyamatot [98]. Ennek ellenére, mivel abundáns fehérjéről van, a fiziológiás szerepét továbbra is fontosnak tartjuk, mivel a *catch* molekuláris mechanizmusának a megértése körül továbbra is számos kérdőjel van [66, 99]. Elképzelhető, hogy a catchin N-domén pályvázó szerepet tölt be a vastag és vékony filamentum között a *catch* kontrakció során (hasonló pályvázó szerepe lehet az N-terminális extenzióval bíró gerinces vázizom ELC izoformának a két filamentum között). A catchin egyedüli rokona a *Drosophila* miozin rúd fehérje (myosin), amely szintén az egyedüli izom-specifikus MHC gén alternatív terméke (de a catchintől eltérően a teljes rúd domént tartalmazza) és egyes rovarizom miofibrillumok szerveződésében játszhat szerepet [100].

Talán érdemes megjegyezni, hogy együttműködésben Peter Vibert-tel (Brandeis Univ., USA) először mi jellemeztünk és részben klónoztuk az eredetileg *C. elegans*-ban leírt twitchint fésűskagyló izmokból. Megállapítottuk, hogy ~750 kDa-os, 250 nm x 3 nm méretű flexibilis rúd-alakú molekula, sok fibronectin-III és Ig-C2 modulból és egy kináz doménből áll, a vastag filamentumban lokalizálható (~1:20 miozin mólarány), ko-filamentumot képez a mio2-vel, valamint a harántcsíkos adduktor és a zárízomban is megtalálható [101]. A *Mytilus* minitin/twitchin teljes klónozását és a *catch* kontrakciót szabályozó foszforilált Ser azonosítását néhány éve mások végezték el [102].

### VI.1.3. A *Physarum polycephalum* nyálkagomba miozin nehéz lánc cDNS klónozása

#### Háttér

A  $\text{Ca}^{2+}$ -reguláció szempontjából különös viselkedést mutató plazmodiális nyálkagomba, a



12. ábra. *Physarum* nyálkagomba plazmódium.

A „vénákban” zajló gyors citoplazma áramlásért a mio2 felelős

*Physarum polycephalum* (12. ábra) mio2, mivel a konvencionális miozinok között egyedülálló módon a  $\text{Ca}^{2+}$  gátolja az aktivitását (ld. VI.3.3.). Szent-Györgyi András közvetítésével Kazuhiro Kohamával kezdtük vizsgálni a fenti szabályozás szerkezeti hátterét. Az RLC-t korábban a japán csoport [103], az ELC-t közösen, az MHC cDNS-t pedig mi klónoztuk.

#### Eredmények [104]<sup>1</sup>

A *Physarum* plazmódiumból származó cDNS-ről, a konzervatív P-hurok és a kapcsoló-1 szekvenciákra tervezett degenerált oligonukleotidokat használva hat miozin paralógot (mio2, mio1, mio7 és mio11 osztályból) részlegesen, majd a két mio2 paralógból a minor izoformának a feji régióját, míg a major izoforma (mio2A) teljes MHC-jét klónoztuk. A két utóbbi szekvencia 92%-ban megegyezik. A minor formáról elképzelhető, hogy azonos a fő amöboid mio2-vel [105]. A mio2A izoforma legközelebbi rokona (46% azonosság, 68% hasonlóság) a *Dictyostelium discoideum* sejtes nyálkagombából származó mio2 szekvencia. Ez a tény további bizonyítékot szolgáltat a *Mycetozoa* törzs illetve a plazmodiális (*Myxogastria*) és sejtes nyálkagombák (*Dictyostelia*) korábban kérdéses monofiletikus voltára [106]. Egyébként a Cavalier-Smith-féle legkorszerűbb filogenetikai rendszerben [107] az *Amoebozoa* regnum, ahova a nyálkagomba törzs is tartozik, az állatok és gombák szétválása előtt ágazott el a monokont élőlényeken belül, s ily módon távoli rokonságban van a zöld növényekkel.

A *Physarum* MHC 2148 aminosav hosszúságú, a mio2 családra jellemző összes elsődleges szerkezeti motívum megtalálható benne. Az MD-n belül, összevetve a *Dictyostelium* szekvenciával (13. ábra) feltűnő, hogy két, az aktin-kötésben résztvevő felszíni hurok is jóval hosszabb a *Physarum* MHC-ben, amelynek funkcionális következményei lehetnek.

#### Kóda

A *Physarum* HMM-et sikerült bakulovírus rendszerben expresszálni, s gyorskinetikai jellemzését már elkezdjük [108]. Remélhetőleg az utóbbi alapján többet megtudhatunk a plazmódium gyors (1,3 mm/sec) citoplazma áramlásért felelős mio2 enzimatiszus működéséről, s összevethetjük a növényi sejt citoplazma áramlásáért felelős mio11 működésével (amely a leggyorsabb motilitású motor, a maga 100  $\mu\text{m}/\text{sec}$  sebességével).

<sup>1</sup> A mio2A szekvenciát elhelyeztük a GenBank adatbázisban, az MHC diverzitással kapcsolatos eredményeket még nem publikáltuk (Nagy A., Kovács M., Kohama, K., Nyitray, L.)



## VI.2. Miozin-II motor domén (MD): szerkezet-funkció és szerkezeti biológiai vizsgálatok

### Háttér

A miozin ATP-áz kinetikai lépései és a motor domén már megismert szerkezeti állapotai közötti megfeleltetésen keresztül remélhetjük, hogy közelebb kerülünk a motorfehérje allosztérikus működésének a megértéséhez. „Lépésről lépésre – egy molekuláris motor működésének kinetikai megközelítése”, ahogy Kovács Mihály, volt doktoranduszom a PhD disszertációjának címében találóan összefoglalta [109]. Az alább ismertetett két munkának kettős előzménye volt. Egyrészt beállítottuk a laboratóriumunkban a „miozinológiában” legegyszerűbben használható miozin expressziós rendszert, a *Dictyostelium* nyálkagomba sejttenyészetet, amely az MD mutánsok homológ expressziójára kiválóan alkalmas [110]. Másrészt felhasználtuk azt a szerkezet-funkció és kinetikai vizsgálatokra kiválóan alkalmas mutáns MD konstrukciót, amely csak egyetlen, konformációs szenzorként használható Trp-t tartalmaz (Trp501+). Ez a Trp az MD relé-hurok régiójában helyezkedik el, s a fluoreszcenciája érzékeny a nukleotid kötés hatására bekövetkező, az ATP hidrolízist megelőző, az erőkar „felhúzásáért” felelős nagy konformációs átmenetet kiváltó kapcsoló-2 nyitott-zárt konformációs izomerizációjára. A Trp501+ mutáns segítségével Bagshaw és Málnási-Csizmadia korábban elegáns kísérletekben pontosították a miozin ATP-áz kinetikai sémáját [111, 112]. A fentiekből kiindulva lehetőség nyílt egy, a miozin kutatás hőskorából már ismert ATP-áz szenzor újszerű felhasználásra, illetve újabb szenzorok tervezésére, amelyekkel a konformációváltozások kinetikáján keresztül a fehérjemolekulán belüli kölcsönhatások dinamikus mivoltukban vizsgálhatók.

### VI.2.1. A *Dictyostelium* miozin Lys84 érzékeny konformációs szenzor

#### Háttér

Egy „klasszikus” szenzor a miozin különösen reaktív Lys oldallánca, amelyet a '60-as években tanulmányoztak először, többek között az ELTE Biokémiai Tanszéken [113]. A Lys84<sup>1</sup> az N-szubdoménben, az MD és az RD interakciós felszínén (15. ábra), a funkcionális helyek kommunikációs útvonala mentén fekszik (reaktivitása nukleotid és aktin jelenlétében is csökken, mintegy „érzi” a funkcionális helyek állapotát [114]). Ezzel a lizinnel és a kémiai környezetével foglalkoztunk, hely-specifikus mutagenézis segítségével, ami az első ilyen jellegű vizsgálat volt.

#### Eredmények [115]

A korábbi, a reaktív lizinnel kapcsolatos kísérletek zömét vázizom mio2-vel végezték, amelyet heterológ expressziós rendszerben (a kagyló izom mio2-höz hasonlóan) gyakorlatilag nem lehet előállítani. A *Dictyostelium* MD-ben a Lys84-et Met-re ill. Glu-ra, míg a reaktív Lys-hez térben közeli Arg704-et szintén Glu-ra cseréltük. A Lys oldalláncot trinitrofenilálással jelöltük, a reakciót spektrofotometriával követtük. Az eredmények egyrészt egyértelműen bizonyítják, hogy az MD 56 Lys oldallánca közül egyedül a Lys84-nek nagy a reaktivitása trinitrofenilálással szemben, másrészt kiemelik az Arg704 és a Lys84 között fennálló taszító kölcsönhatás fontos, bár nem

---

<sup>1</sup> *Dictyostelium* mio2-vel végzett kísérletek leírásánál ennek az MHC-nak a szekvencia számozását (UniProt: P08799) használom, míg a kagyló mio2 munkáknál az *A. irradians* harántcsíktolt izom MHC izoforma számozását (P24733).

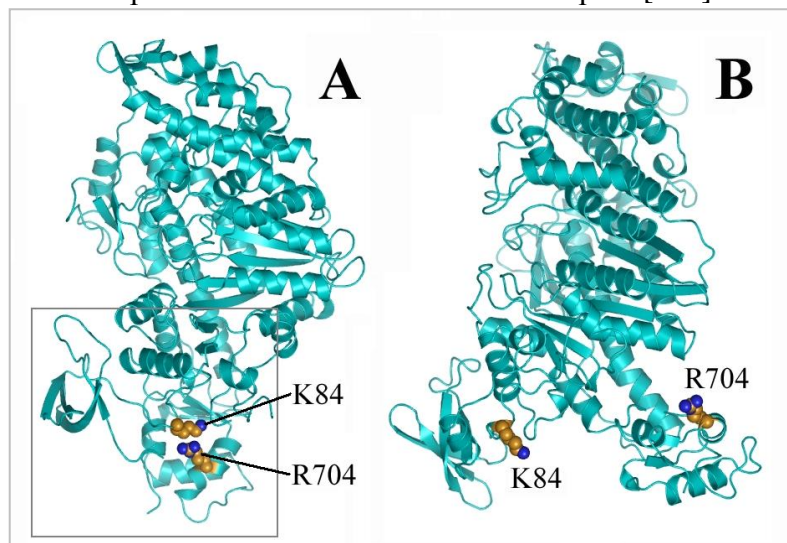


kizárólagos szerepét a Lys84 különleges reaktivitásában. Az Arg704 közeli pozitív töltése csökkentheti a Lys  $\epsilon$ -amino-csoport pK-ját. Tovább fokozhatja a reaktivitást a közeli Tyr705 proton-akceptor szerepe. A taszító interakció az MD-ben az N-szubdomén és a konverter szubdomének kölcsönható felszínén jön létre akkor, amikor a kapcsoló-2 hurok régió nyitott állapotban van. A nyitott-zárt konformációs változás a taszító ionpárt eltávolítja egymástól, ezáltal a Lys reaktivitása is csökken. Összefoglalva megállapíthatjuk, a Lys84 reaktivitása és annak nukleotid-függése az összes konvencionális miozinra egyaránt jellemző, és az ATP-áz ciklus során bekövetkező dinamikus változásokat szenzorként tükrözi. Bár a *Dictyostelium* mio2 Lys84 reaktívabb a nyúl vázizom reaktív Lys-nél, de sajnos ez igaz a lassú reaktivitású többi Lys oldallánra is, következésképpen a különböző nukleotid analógok hatását az erőkar és a nukleotid hely allosztérikus viszonyára a Lys reaktivitásán keresztül nem tudtuk vizsgálni (a nukleotidok a Lys84 reakciósebességét ~60%-kal csökkentik, így azonban a lassú reakcióhátter zavaró lesz). Az allosztérikus útvonal tanulmányozására a relé-hurok Trp501 fluoreszcenciáját lehetett kihasználni, amelynek segítségével a Lys84-Arg704 taszító kölcsönhatás szerepét tudtuk feltárni (ld. következő alfejezet).

## VI.2.2. A miozin ATP-áz aktivitás finomhangolása a Lys84 és Arg704 kölcsönhatás változtatásával

### Háttér

A négyütemű miozin működés második lépése az ATP-kötés kiváltotta, a hidrolízist megelőző erőkar felhúzás (*recovery stroke*), amelyet a kapcsoló-2 nyitott→zárt konformációs átmenete indít el [35]. Az előző alfejezetben bemutatott, az erőkar tövében elhelyezkedő, két bázikus aminosav kölcsönhatása jelentősen változik az erőkar felhúzása előtt és után (14. ábra). Bagshaw és mtsi korábbi, a Trp501 fluoreszcenciáját mint szenzort felhasználó kinetikai vizsgálatai alapján világosan kiderült, hogy az erőkar felhúzás egy reverzibilis ( $\Delta G \approx 0$  kJ/mol) és gyors ( $\sim 1000$  s<sup>-1</sup>) izomerizációs lépés az azt követő hidrolízishez képest [116]<sup>1</sup>. Ebből következik az a



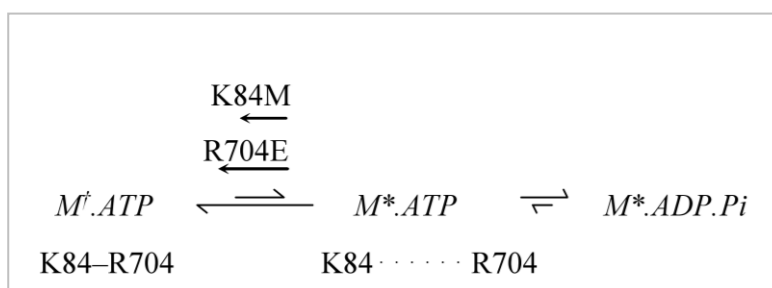
**14. ábra. A konformációs szenzor taszító ionpár Lys84 és Arg704) a motor doménben.**  
(A) *Dictyostelium* MD poszt-rigor állapotban (PDB: 1fwm) és (B) pre-munkaütem állapotban (1vom)

<sup>1</sup>Ebből a tényből következik, hogy ATP-analógok jelenlétében (ADP.Be.F) mindkét fő szerkezeti állapotot kirstályosítani lehetett, míg a felhúzott erőkarú szerkezetet csak a hidrolízis átmeneti állapot analógok (ADP.V<sub>i</sub>) jelenlétében

hipotézis, hogy az erőkar felhúzás egyensúlyának a megváltoztatásával az ATP-áz effektív sebessége és a termék felszabadulás sebessége is befolyásolható, azaz a motor funkció mintegy finomhangolható. Ezt a hipotézist teszteltük az előző alfejezetben bemutatott, *Dictyostelium* expressziós rendszerben előállított hely-specifikus mutánsok kinetikai analizisével.

### Eredmények [117]<sup>1</sup>

Az eredményeink igazolták, hogy a Lys84-Arg704 taszító ionpár részt vehet a miozin ATP-áz „finomhangolásában”. Megállapítottuk, hogy a kölcsönhatás vonzóvá tételével arányosan (Lys84Met, Lys84Glu) nőtt a nyitott állapot részaránya a hidrolízis *steady-state* szakaszában. Gyorskinetikai eredményeink azt mutatták, hogy a hidrolízis lépés sebessége csökken, ha a megelőző konformációs egyensúly (a kapcsoló2- nyitott-zárt izomerizációja) a vonzó kölcsönhatás



15. ábra. Az ATP hidrolízis kinetikai séma és „finomhangolása”.  
*M<sup>·</sup>*: kapcsoló-2 nyitott, erőkar zárt; *M<sup>\*</sup>*: kapcsoló-2 zárt, erőkar felhúzott

következtében balra tolódik, mert csökken a hidrolízisre kész molekulák száma (15. ábra). A steady-state kinetika szerint a nyitott konformáció favorizálásával nő az ATP-áz ciklus sebessége, mert a sebességmeghatározó lépés (a P<sub>i</sub> felszabadulás) a nyitott szerkezethez kötött. Az általunk bevitt mutációkhoz hasonló aminosav cserék az evolúció során is lejátszódtak a motor domén e régiójában. A mio6 osztályban például semleges-semleges (Ser-Met), mio5-ben semleges-pozitív töltésű (Ile-Arg), míg a mio1 és mio10 osztályokban sóhid-képző (Asp/Glu-Arg) aminosav pár található a fentiekkel homológ pozíciókban. A konvencionális miozinokban létrejövő Lys84-Arg704 kölcsönhatásnak más izoformák esetében is szerepe lehet az enzimatismsajátságok meghatározásában, így az a miozin motorok funkcionális diverzitásához járulhat hozzá.

### VI.2.3. A konvencionális miozin fej „rigor-szerű” állapotának térszerkezete

#### Háttér

Az irodalmi bevezetőben bemutattam a miozin működés kilendülő erőkar modelljét, ami legegyszerűbben „négyütemű” motorként írja le a mechanokémiai ciklust. Röviden leírtam az ezidáig krisztallográfiaileg jellemzett két szerkezeti állapotot, amelyek (kísérleti hozzáférhetőségük miatt értelemszerűen) a szabad miozin fej által végzett ütem (erőkar felhúzás, „*recovery stroke*”) két végpontját, az aktinról levált (poszt-rigor) és az aktinhoz visszakötött kész átmeneti állapot (pre-munkaütem, „*pre-power stroke*”) konformációját tették láthatóvá [35]. Fontos megjegyezni, hogy a nukleotid-hely állapotától és a kristályosítási körülményektől függően más-más állapotba „fagyhat

<sup>1</sup> A kísérleti koncepció kidolgozásában, az eredmények értelmezésében és a cikkírásban vettem részt (a munka Kovács M. doktori disszertációjának volt része)

be” a fej szerkezete (pl. bizonyos nukleotid-analógok jelenlétében mindkét említett állapot kristályosodott). Lehetséges-e, hogy atomi felbontású szerkezetekhez jussunk az aktin-kötött miozin fej konformációjáról? A közelmúltban sikerült rekombináns mio5 fej konstrukciók szerkezetét az ún. rigor-szerű állapotban meghatározni, nukleotid és természetesen aktin hiányában [37, 52]. A látszólagos paradoxont az a tény magyarázza, hogy a mio5 processzív motor lévén magas terhelési arányú, amit részben úgy ér el, hogy „rigor-szerű” állapotban van a ciklus nagy részében, az aktinról levált állapotban is [56]. Később a mio6 nukleotid-mentes szerkezetében is a rigor-szerű állapotot sikerült vizualizálni [53]

A puhatestű izom miozinok, mint az értekezésből eddig is kitűnhetett, meglepően „sokoldalú” kísérleti objektumok. Azon túl, hogy a mio2  $\text{Ca}^{2+}$  szabályozásának molekuláris hátterét lehet rajtuk tanulmányozni, az izolált fejeket viszonylag könnyen lehetett kristályosítani, s már az *Argopecten S1* szerkezetét eddig is három állapotban vizualizálta Carolyn Cohen munkacsoportja (a harmadik állapotról később). A fenti szerencsés tényből kiindulva próbálkoztunk további puhatestű izom mio2 S1 fragmentumok kristályosításával, sikerrel.

### Eredmények [10]<sup>1</sup>



**16. ábra. Észak-amerikai kalmár és a „rigor-szerű” mio2 S1 szerkezet a Structure címlapján**

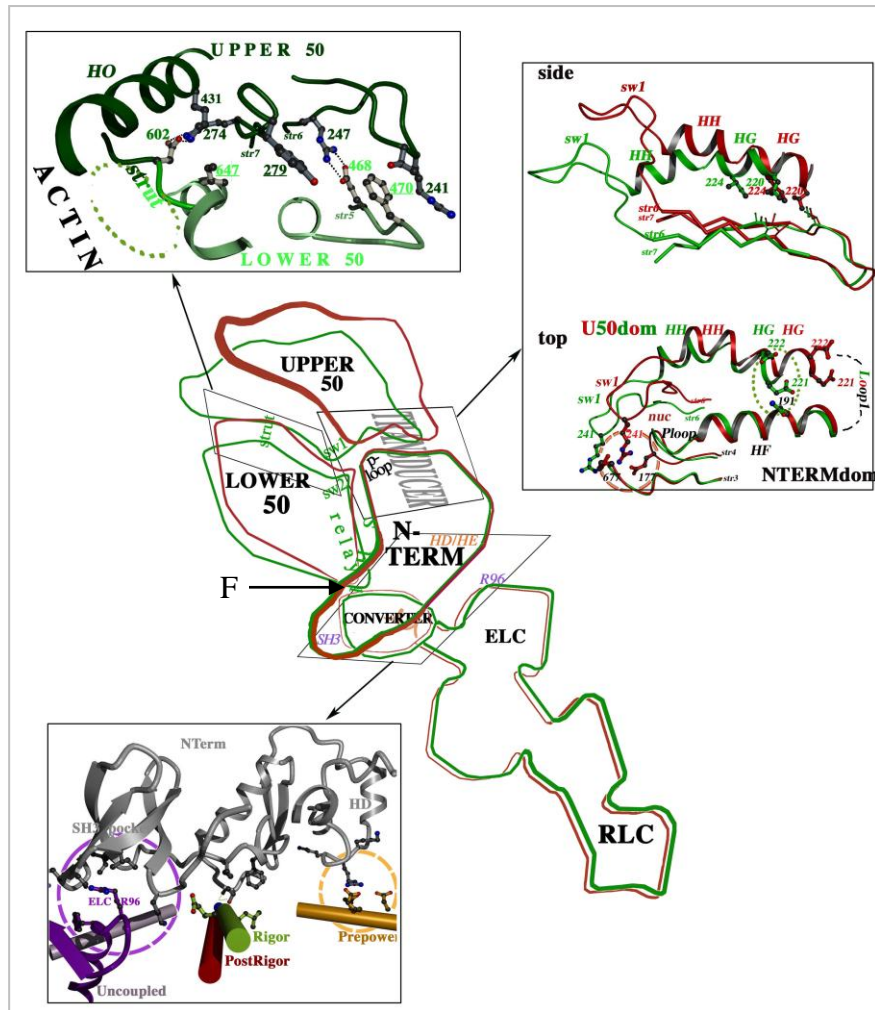
Meghatároztuk a mio2 fejek (S1) „rigor-szerű” állapotának térszerkezetét, amely ezidáig „hiányzó láncszem” volt a kemomechanikai energiaátalakítás molekuláris mechanizmusának megértéséhez (16. ábra). A rigor-szerű szerkezetet egyaránt sikerült megkapnunk a gyors kontrakcióra képes harántcsíktal izom mio2 S1-et (*Placopecten magellanicus* adduktor izom és *Loligo pealei* tölcsér retraktor izom) és a *catch* kontrakcióra képes, eltérő kinetikai paraméterekkel rendelkező *Placopecten* záróizom S1-et kristályosítva (17. ábra).

A nukleotid hiányában (és természetesen aktin nélkül) kristályosított fragmentumok szerkezetében az erős aktin kötött (rigor) állapotra jellemző szerkezeti tulajdonságok a nukleotid kötőhelynél található kapcsoló-1 hurok nyitott, és az ún. aktin-árok teljesen zárt állapota. A kapcsoló-1 elmozdult a P-hurokhoz képest, közelebb kerül a kapcsoló-2-höz, s ezáltal az egész felső 50 kDa szubdomén mint rigid elem elmozdul az óramutató járásával ellentétesen, aminek a következménye lesz az aktin-árok zárt pozíciója (összevetve a poszt-rigor szerkezettel, 17. ábra). Feltételezzük, hogy a munkaütem beindulásához szükséges, az aktin-kötődés indukálta allosztérikus szerkezeti átmenetet visszafelé is a felső 50 kDa szubdomén közvetíti. További igen fontos tulajdonsága a poszt-rigor állapotnak, hogy a transzduktor  $\beta$ -lemez teljesen megcsavarodott és a relé-hélix egyenes (magyarázat ld. később). Az aktin-árok záródásában, elsősorban az aktin affinitást meghatározó, a hurok-2-höz közelebbi részen a merevítő elem felső és alsó 50 kDa szubdoménnal kialakított kölcsönhatásainak lehet kitüntetett szerepe (17. ábra balra fenn). Az aktin-árok zárt állapotát az apo-állapotban oldat kinetikai vizsgálatokkal is megerősítettük. Az aktinhoz kötődés sebességi állandójának (amelyet az aktinra kapcsolt pirén-jel fluoreszcenciája által lehet követni gyorskinetikai módszerekkel) hőmérséklet függése mérsékelt, ami azt mutatja, hogy az aktin-kötés közel diffúzió-kontrollált folyamat, s nem több lépésben

<sup>1</sup> A kísérleti munka kivitelezésében nem volt jelentős szerepem (korábban kinetikai előkísérleteket végeztem az itt használt miozinokkal), de az eredmények interpretálásában és a cikkírásban igen.



(először árok záródás, azután kötés) megy végbe, mint pl. a gerinces vázizom mio2-k esetében. A puhatestű S1-ekre számolt aktivációs entalpia (18-5 kJ/mol) alig nagyobb, mint a mio5-nél mért érték (15 kJ/mol), s de jóval kisebb a nyúl vázizom S1-nél (68 kJ/mol).



**17. ábra. Mio2 fej rigor-szerű (barna) és poszt-rigor (zöld) állapot összehasonlítása.**

A térszerkezet kontúrja látszik, a dobozok a jellemző szerkezeti változásokat emelik ki. Zöld: rigor-szerű szerkezet; barna: poszt-rigor. Balra fenn: a támasztó elem és egyéb interakció a zárt aktin-árokban a felső és alsó 50 kDa szubdomének között. Jobbra fenn: a kapcsoló-1 elmozdulása és a transzduktor elem két állapota (zöld csavart, barna félig kiegyenesedett). Balra lenn: az erőkar négy lehetséges pozíciója és azok stabilizáló kölcsönhatásai az N-szubdoménhez. F: az erőkar alátámasztó pozíciója az SH-hélixnél

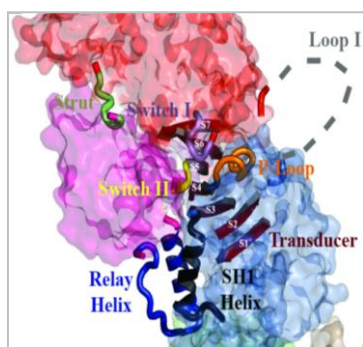
A miozin motor energiaátalakítása szempontjából központi elem a transzduktor [37], amely a mi szerkezeteinkben is, a mio5-höz hasonlóan teljesen jobbménetes csavarodott. Ezzel ellentétben a poszt-rigor szerkezetekben a  $\beta$ -lemez részben, a pre-munkaütem állapotban viszont egészen kiegyenesedik. A transzduktor konformációváltozását elősegítheti a nukleotid-kötőhelynél található flexibilis hurok-1 két oldalát alkotó  $\alpha$ -hélix (HG és HF) elcsúszása a rigor-szerű és poszt-rigor szerkezeteket összevetve (17. ábra jobbra fenn). A transzduktor szerepe kapcsán fontos kiemelni, hogy a csavarodott szerkezet az alapállapot [118] (ellentétben a Geeves és Holmes összefoglalójában leírtakkal [35]), míg a kiegyenesedett a magasabb energiájú állapot, ami legalábbis részben raktározhatja az ATP kötéséből származó, a motor „felhúzott” állapotát biztosító extra energiát.

Érdekes összehasonlítani az erőkar/konverter pozícióit a különböző állapotokban és az N-szubdoménnel csak most leírt kölcsönhatásokat (17. ábra balra lenn). A már korábban említett, csak

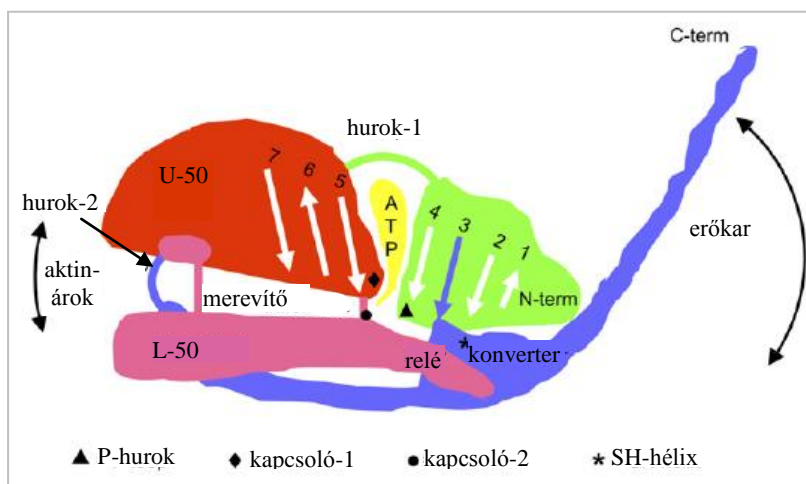
a kagyló S1 szerkezetből ismert negyedik szerkezeti állapotban („belsőleg szétkapcsolt állapot” [50]), amelyre a SH-hélix biokémiaailag alaposan körülírt „felolvadása” jellemző [119], az erőkar az SH3 doménhez kapcsolódik (ennek az állapotnak a jelentőségét ld. kóda). A fenti, a mio2 gyenge-aktin állapotaira jellemző stabilizáló kölcsönhatások a mio5 fej egyetlen állapotában sem figyelhetők meg, ami hozzájárulhat a mio2 alacsony terhelési aránnyal működő kinetikai működésének szerkezeti alapjához. Ezek szerint az erőkar a miozin lépéshossz megszabásán túl a kinetikai finomhangolásban is szerepet tud játszani.

### Kóda

Az új szerkezetek rávilágítottak a miozin fejen belüli allosztérikus kommunikáció több fontos elemére illetve útvonalára, többek között a kapcsoló-1 (*switch-1*) és az aktin-árok viszonyának több részletére, de információt szolgáltatottak a motor kristályszerkezeti megismereten állapotára is, amikor a fej erősen kötődik az aktinhoz és a nukleotid kötőhelyen ADP-t tartalmaz (poszt-munkaütem). A rendelkezésünkre álló szerkezeti és kinetikai adatok birtokában pontosabb képet alkothatunk az aktin- és nukleotid-kötőhely reciprok allosztérikus működésében és ezáltal a kemomechanikai energiatranszdukcióban kulcsszerepet betöltő ún. transzduktor szerkezeti elem működéséről is (20 és 21. ábra).



**20. ábra. *Loligo S1* rigor-szerű szerkezet.**  
Zárt aktin-árok, nyitott kapcsoló-1. Csavarodott transzduktor elem. A hurok-1 flexibilis, nem látszik (PDB: 1qvi)



**21. ábra. *Mio2 MD* vázlatos (torzított) szerkezete**  
Pre-munkaütem állapot. Az összes szubdomént és összekötő elemet feltüntettem. A hétláncú központi  $\beta$ -lánc a transzduktor elem.

Fontos az a megfigyelésünk, hogy az erőkar/konverter modul pozíciója kissé megváltozik és kölcsönhatásai lazulnak az N-szubdoménhez, ami mintegy előkészíti az erőkar kilendüléssel járó mechanikai ütemet. A munkaütem valós kezdetének inkább a rigor-szerű állapotot kellene tekinteni, s ezt figyelembe véve molekuladinamikai számításokat végezni a jövőben. Az erőkar/konverter és az N-szubdomén közti kölcsönhatások (amelyek a processzív mio5-ben hiányoznak) felvetik, hogy miként az aktin- és a nukleotid-hely között, az erőkar/konverter régió és a nukleotid/aktin-hely között is kétirányú lehet az allosztérikus kommunikáció, nevezetesen az előző interakciók is aktívan kiválthatják az erős nukleotid-kötő, gyenge aktin-kötő mio2 állapotot, ami alacsony terhelési arányú motort eredményez.

A motorműködés energetikai leírása szempontjából fontos lehet az, a szerkezetekkel alátámasztott elképzelésünk, miszerint az ATP kötéséből és hidrolíziséből származó szabadentalpia a kiegyenesedő *core*  $\beta$ -lemez (a transzduktor elem) és a relé-hélix megtörésében, mint molekuláris mechanikai feszülésben tárolódik. A munkaütem során részben az erős aktin-kötés energiája

fordítódik munkára [120], de hozzájárulhat ehhez a feszített transzduktor (kiegyenesített  $\beta$ -lemez) relaxációja is (például azzal, hogy a kapcsoló-1 és -2 közti kapcsolatot meglazítja, ami előfeltétel a nyitott konformációba való visszajutásukhoz). A munkaütem és a foszfát felszabadulás viszonyára, illetve az utóbbi és az aktin-kötőhely allosztérikus útvonaláról egyelőre nincs pontos elképzelés.

A transzduktor szerepének a tisztázása termodinamikai értelmet adhat a belsőleg szétkapcsolt intermedier állapotoknak is. Ezek szerint a transzduktor fokozatosan feszül meg a rigor-szerű  $\rightarrow$  poszt-rigor  $\rightarrow$  belsőleg szétkapcsolt  $\rightarrow$  pre-munkaütem állapotok sorrendjében. A legmagasabb energiaszintet éppen az ATP hidrolízis előtt éri el a rendszer, s elképzelhető, hogy a poszt-rigor és pre-munkaütem állapotok közötti átmenet aktivációs energia gátját a belsőleg szétkapcsolt intermedier, mint egy „kuplung” lecsökkenti, azáltal, hogy a motor mechanikai elemei közötti kapcsolatot időlegesen megszünteti (ld. SH-hélix megolvadás; az SH-hélix a relé-hélix támasztóeleme a kapcsoló-2 és az erőkar közti allosztérikus kommunikációs útvonal mentén). Ez a „segítség” kellhet ahhoz, hogy az erőkart felhúzó lépés termodinamikailag reverzibilis legyen [116, 121]. A „kuplungozással” a maradék molekuláris feszülés a transzduktor elembe épülhet be (s nem a relé-hélix megtörésébe, amely csak az SH-hélix visszamerevedése után, a pre-munkaütem állapotban jelenik meg). A „kuplung állapot”, mint fő allosztérikus útvonal egyértelmű bizonyítása további kísérleteket igényel a jövőben. Fontos megjegyezni, hogy a mi munkánkkal párhuzamosan, az ismert mio5 térszerkezetekből kiindulva Karplus és mtsi normál mód analízissel a mi leírásunkat részben kiegészítő, bár a részletekben különbségeket is mutató allosztérikus kommunikációs útvonalakat javasoltak [46]. Az ő elemzésükben az ATP-kötés kiváltotta rigor $\rightarrow$ poszt-rigor átmenet iniciáló lépése a kapcsoló-1 és a P-hurok közti kölcsönhatás, ami a rigid felső 50K szubdoménon keresztül nyitja az aktin-árkot.

Ezen ponton is hangsúlyozni szeretném, hogy a motorfehérjék (de ez a megállapítás természetesen általánosítható is) működésének minél pontosabb leírását, megértését a nagyfelbontású szerkezeteket biztosító krisztallográfiai és az egyre kifinomultabb oldat kinetikai mérések egymáshoz illesztésétől, kölcsönös értelmezésétől várhatjuk. Ezt, a szerkezeti illetve kinetikai módszerek természetéből adódó statikus-dinamikai kettősséget a szerkezeti dinamikai, a fehérjén belüli mechanikai változások leírása „békéltetheti össze”, amely elvezethet bennünket az allosztéria mechanizmusának mélyebb megértéséhez is. Ezen az úton legtöbbit a modern molekuláris dinamikai és mechanikai szimulációs módszerek alkalmazásától várhatjuk, sőt ilyen jellegű publikációkat már olvashatunk is [39, 46, 51, 122].

### **VI.3. Miozin-II regulációs domén: szerkezet-funkció és szerkezeti biológiai vizsgálatok**

Kutatásaim során elsősorban a  $Ca^{2+}$ -aktiválás és gátlás szerkezeti alapjait vizsgáltam, de a kétféle szabályozó mechanizmus, a  $Ca^{2+}$ -kötésen ill. a foszforiláción-alapuló szabályozás összehasonlítása kapcsán is kaptunk új eredményeket.  $Ca^{2+}$  szabályozás alatt álló konvencionális miozinok közül a fésűskagyló (*Argopecten irradians*) izom mio2-t a  $Ca^{2+}$ -kötés aktiválja, míg a plazmodiális nyálkagomba (*Physarum polycephalum*) mio2-t a  $Ca^{2+}$ -kötés gátolja. Ebben a fejezetben a fenti allosztérikus mechanizmus molekuláris hátterének feltárása terén elért eredményeinket mutatom be.

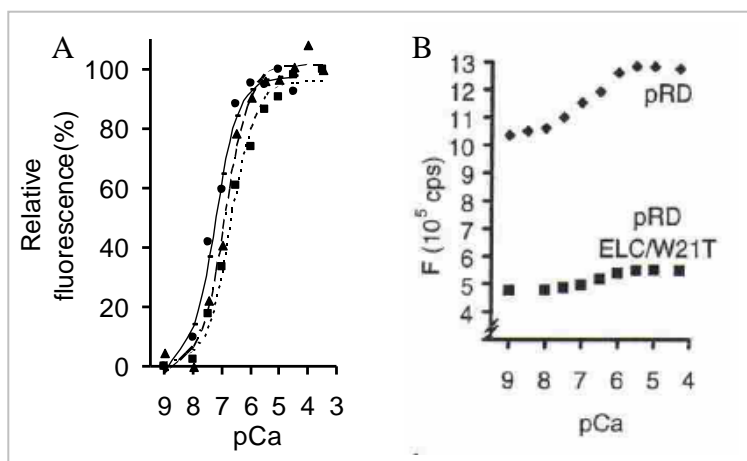
### VI.3.1. A kagyló mio2 RD dinamikája. Fluoreszcencia spektroszkópai vizsgálatok

#### Háttér

A Szent-Györgyi csoportban töltött posztdoktori éveim során először a miozinból limitált proteolízissel előállított RD jellemzésében vettem részt. Kimutattuk, hogy a szabályozásért felelős  $\text{Ca}^{2+}$  az ELC-hez kötődik [42]. A  $\text{Ca}^{2+}$ -kötőhely pontos helyét végül az RD kristályszerkezetének a felderítése fedte fel. A kötőhely az ELC első EF-kéz motívuma, amelyet nem lehetett az aminosav szekvencia alapján megjósolni, mivel a kanonikus hélix-hurok-hélix 12 aminosav hosszúságú hurok része itt csak 9 aminosavból áll. További érdekessége a  $\text{Ca}^{2+}$ -kötőhelynek, hogy a „klasszikus” kalmodulin doménnel ellentétben  $\text{Ca}^{2+}$ -kötött formában is „zárt” konformációban van – amit a nem-kanonikus EF-kéz szekvencia magyarázhat [50, 72, 123]. A térszerkezet alapján a  $\text{Ca}^{2+}$  szabályozásra felállított modellben az RD allosztérikus molekuláris kapcsolóként működik: bekapcsolt állapotban rigid szerkezetű, míg az apo-formában a mobilitása tranziens módon megnövekszik, ami lehetővé teszi, hogy két fej kölcsönhatásba lépjen egymással (és az S2 doménnel) és ezáltal az ATP-áz aktivitás illetve a motorfunkció gátlás alá kerüljön. Ez a mechanizmus tehát kommunikációt tételez fel a nukleotid helyek és az RD, valamint a két fej között is. Az utóbbit kísérleti adatok is alátámasztják (a  $\text{Ca}^{2+}$ -kötés csak nukleotidok jelenlétében és a kétfejű HMM-ben kooperatív [124]). A reguláció molekuláris hátterének feltárását a fluoreszcencia spektroszkópai vizsgálatokkal kezdtük el.

#### Eredmények [125]

RD-t, valamint az S2-vel meghosszabbított dimer RD-eket (ld. még VI.4.1.) a nehéz lánc fragmentum *E. coli* rendszerben történő expressziója és denaturáló körülmények között történő izolálása után, az izomból izolált vagy rekombináns LC-vel történő rekonstitúcióval állítottuk elő. A



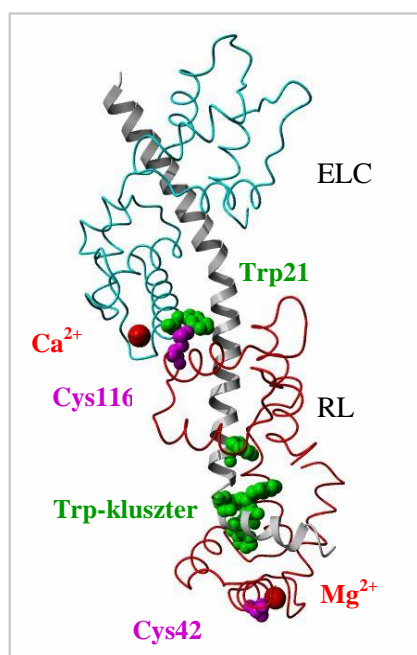
22. ábra. Rekombináns RD-k (A) és Trp21Thr RD  $\text{Ca}^{2+}$ -títrálása (B) Trp fluoreszcencia intenzitás (ext.:295 nm, em.:340 nm). monomer RD (●) és dimer RD-k (■▲)

kísérletekhez szenzorként Trp fluoreszcenciát illetve az RLC Cys-oldalláncaira bevitt extrinusz spin-próbát (ld. következő alfejezet) használtunk. A rekombináns miozin konstrukciók a natív miozinnal (és a proteolízissel előállított RD-vel) összemérhető affinitással és specifitással kötöttek  $\text{Ca}^{2+}$ -ot (22. ábra). Megjegyzendő, hogy a  $\text{Ca}^{2+}$ -kötés, a dimer RD-nél sem kooperatív, igazolván, hogy a regulációhoz szükséges molekulán belüli kommunikációhoz az MD jelenléte szükséges feltétel.

Az intrinusz fluoreszcencia spektroszkópai és anizotrópia vizsgálatok azt mutatták, hogy a  $\text{Ca}^{2+}$ -mentes RD-ben a Trp oldalláncok kevésbé hidrofób és mobilisabb környezetben vannak (az apo-RD anizotrópiája  $0,148 \pm 0,002$ , a  $\text{Ca}^{2+}$ -RD-é  $0,161 \pm 0,001$ ). Az RD öt Trp-ja közül elsősorban az ELC Trp21 (17. ábra) felelős a  $\text{Ca}^{2+}$ -indukálta jelváltozásért, mint azt a Trp21 Thr-ra

cserélésével<sup>1</sup> igazoltuk. A mutáns RD  $\text{Ca}^{2+}$ -títrálása azt is megmutatta, hogy a HC ún. kámpó régiójában (az RLC N-terminális domén kötőhelyénél) található Trp kluszter (Trp818, 824, 826, 827) is, ha kisebb mértékben is, de érzékeli a  $\text{Ca}^{2+}$ -kötőhely állapotát (22. ábra). Az apo-állapot nagyobb belső mobilitása tehát az RD nagy részére kiterjedhet. Egy nem-kovalens extrinusz fluoreszcens próbával, az ANS-sel végzett kísérletek (amely a fej-rúd csukló Pro834-Ala840 régiójához kötődik) azt jelzik, hogy *coiled-coil* rúd kezdeti szakaszának jelentősége lehet a regulációhoz köthető szerkezeti változásokban (ld. VI.4.).

### VI.3.2. A kagyló mio2 RD dinamikáját változtatja meg: ESR spektroszkópai vizsgálatok



23. ábra. Trp-ok és Cys mutáns pozíciók a kagyló RD szerkezetben

#### Háttér

Az ESR spektroszkópiát régóta használják a miozin dinamika vizsgálatára. Többek között a kagyló mio2 RLC-re helyezett spin-próbával is bizonyították, hogy az izomkontrakció során a miozin nyaki régióban történik rotáció (ld. kilendülő erőkar) [126]. Az említett csoport a  $\text{Ca}^{2+}$  hatását akkor még nem vizsgálta, bár korábban történtek erre is, de sikertelen kísérletek [127]. Rekombináns RLC-t mi használtunk először a  $\text{Ca}^{2+}$ -reguláció tanulmányozására.

#### Eredmények [128]<sup>2</sup>

A reguláció molekuláris hátterének feltárását ER spektroszkópai vizsgálatokkal folytattuk, Belágyi Józseffel (Pécsi tudományegyetem) együttműködésben. Spektroszkópai próbaként maleimid-TEMPO spin-próbát építettünk be a fésűskagyló RLC Met116Cys vagy Ala42Cys mutánsba<sup>3</sup> (23. ábra) Chantler és Szent-Györgyi módszerét követve [127]. A spin-jelölt RLC-eket rekonstitúcióval juttattuk RD-be, vagy a teljes miozinban kicseréltük a vad-típusú RLC-vel. A spin-jelölt RD  $\text{Ca}^{2+}$ -kötése és a spin-jelölt miozin ATP-áz  $\text{Ca}^{2+}$  érzékenysége a nem-jelölt fehérjék 80-95%-a volt, azaz a jelölés gyakorlatilag nem változtatta meg a miozin szerkezetét. A konvencionális ESR spektrumokat ESP 300E (Bruker) spektrométerrel vettük fel, 0-30°C-on, fiziológias pufferben.

A szabad RLC spinjel rotációs mozgása igen gyors ( $\tau < 1$  nsec), viszont a miozinhoz kötődés jelentős immobilizálódást okoz ( $\tau = 0,1$   $\mu\text{s}$ ), amely erősebb a Cys116 esetében (24. ábra), ezért a további kísérleteket ezzel a jelölt RLC-vel végeztük. Az izolált RD-ben a jelölt RLC spin mobilitása kevésbé csökkent a szabad RLC-hez képest. Mivel a miozinból limitált proteolízissel előállított S1-en is jelentősen mobilitás növekedést tapasztaltunk, kijelenthetjük, hogy az MD és a rúd domén együttesen szükségesek az RD rigiditásához. Másrészt a fenti tény azt is előrevetíti, hogyha a miozin különböző regulációs állapotokban mobilitás változást tapasztalunk, abból az allosztérikus kommunikáció megnyilvánulására következtethetünk. A spin-jelölt RD-t 50% glicerin

A szabad RLC spinjel rotációs mozgása igen gyors ( $\tau < 1$  nsec), viszont a miozinhoz kötődés jelentős immobilizálódást okoz ( $\tau = 0,1$   $\mu\text{s}$ ), amely erősebb a Cys116 esetében (24. ábra), ezért a további kísérleteket ezzel a jelölt RLC-vel végeztük. Az izolált RD-ben a jelölt RLC spin mobilitása kevésbé csökkent a szabad RLC-hez képest. Mivel a miozinból limitált proteolízissel előállított S1-en is jelentősen mobilitás növekedést tapasztaltunk, kijelenthetjük, hogy az MD és a rúd domén együttesen szükségesek az RD rigiditásához. Másrészt a fenti tény azt is előrevetíti, hogyha a miozin különböző regulációs állapotokban mobilitás változást tapasztalunk, abból az allosztérikus kommunikáció megnyilvánulására következtethetünk. A spin-jelölt RD-t 50% glicerin

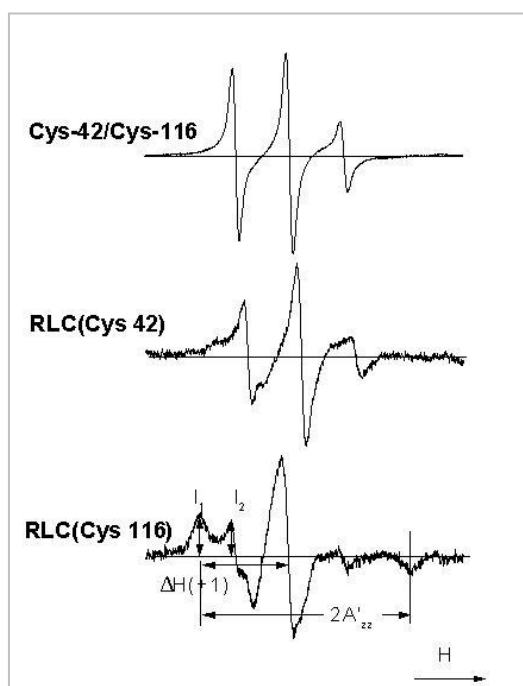
<sup>1</sup>  $\text{Ca}^{2+}$ -ot nem kötő ELC-kben a Trp-vel homológ pozícióban általában Thr van.

<sup>2</sup> Az EPR spektroszkópai eredmények Málnási Csizmidia András PhD disszertációjának részét képezték, folyóiratban nem publikáltuk őket.

<sup>3</sup> A vad-típusú kagyló miozin RLC-ben nincs Cys

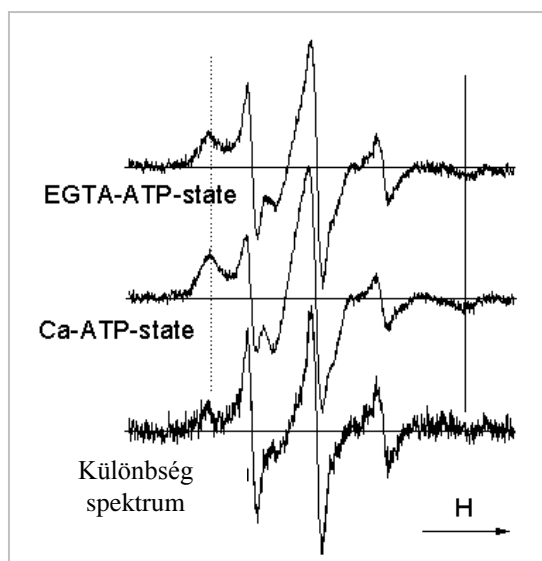


jelenlétében „lelassítottuk”, így a  $\text{Ca}^{2+}$ -kötés mobilitás csökkentő hatása már jelentkezett a spektrumban. A spektrumokban minden esetben egy immobilisabb és egy mobilisabb komponenst



24. ábra. Szabad és miozinhoz kötött RLC EPR spektruma.

A Cys116-spin spektruma két komponensből áll ( $I_1$  és  $I_2$ ).  $2A'_{zz}$ : csatolási állandó



25. ábra. 116C-RLC-miozin EPR spektruma ATP jelenlétében.

$\text{Ca}^{2+}$ -kötés hatására az immobilizált frakció aránya növekszik (pontozott vonal) és immobilizáltabb lesz (folyamatos vonal)

lehet megfigyelni ( $I_1$  és  $I_2$ ), amelyek arányának változása, valamint az ún. csatolási állandó ( $2A'_{zz}$ ) változása diagnosztikus értékű a molekula belső dinamikájának a követése szempontjából. A „kétállapotú” spektrumot korábban spin-jelölt simaizom RLC ESR vizsgálatával is megfigyelték [129]. 116C-RLC-miozin ESR-spektrumában az immobilizáltabb frakció aránya növekszik, de a csatolási állandó változatlan, azaz ez a frakció immobilizáltabb nem lesz. Viszont ATP-jelenlétében az utóbbi is változik, jelezvén, hogy az RD belső mobilitásának megváltozásán keresztül kommunikál a két funkcionális hely (25. ábra). Nukleotid-analógok esetében is érzékelhető az MD és RD kommunikációja, de az ADP csak jelentéktelen hatással van a spektrumra. Az MD reaktív SH1-csoportjának kovalens módosítása jódecetamiddal (a fejen belüli allosztérikus útvonal mentén elhelyezkedő SH-hélix jelentőségére korábban felhívtam a figyelmet) gyakorlatilag szétkapcsolja a rendszert. A miozin ATP-áz  $\text{Ca}^{2+}$ -szenzitivitása megszűnik, bár a  $\text{Ca}^{2+}$ -kötőhely intakt marad (II. táblázat).

## II. táblázat

Miozin (116C-RLC)	$2A'_{zz}$ (mT)	$I_2/I_1$
$\text{Ca}^{2+}$	6.743	1.639
EGTA	6.741	2.591
ATP+ $\text{Ca}^{2+}$	6.554	1.492
ATP+ EGTA	6.739	2.437
IAA+ATP+ $\text{Ca}^{2+}$	6.723	-
IAA+ATP+ EGTA	6.713	-

ESR vizsgálatunk bizonyítják, hogy az RD és a MD aktív hely kommunikál egymással, s minden bizonnyal az RD belső dinamikája változik  $\text{Ca}^{2+}$  hiányában, ami előfeltétele az „off” konformáció kialakulásának. Az RD tranziensen megnövekedett mobilitása lehetővé teszi, hogy a két MD „megtalálja” egymást és az S2 régiót, amely régiók kölcsönhatása a gátolt szerkezethez vezet. Eredményünk bizonyítják azt is, hogy az allosztérikus kapcsolat kétirányú az RD és MD között, és felhívják a figyelmet a szerkezeti dinamika változásának jelentőségére az allosztérikus reguláció molekuláris hátterében.

## Kóda

A mi kísérleteinkkel egy időben spin-jelölt kagyló RLC-vel Thomas és mtsi vizsgálták a kagyló RD mikroszekundumos rotációs dinamikáját szaturációs-transzfer ESR-rel, s bizonyítékot találtak a nyak dinamikai változására a relaxált és kontraháló kagyló izomrostokban.

Mivel gyarapodott a tudásunk a  $\text{Ca}^{2+}$  reguláció mechanizmusának megértése terén az utóbbi évtizedben? Történt előrelépés kinetikai és szerkezeti téren is. Nyitrai Miklós és M. Geeves a szabályozás kinetikai részleteit tárták fel elegáns kísérletsorozatban, gyorskinetikai módszerekkel [130-132]. Ezek szerint a  $\text{Ca}^{2+}$  és az ADP a miozin allosztérikus effektorai, amelyek az „off” és „on” állapot közti egyensúlyt befolyásolják kooperatív módon. A  $\text{Ca}^{2+}$ -kötés a HMM kinetikai sémáján belül egyedül az ADP felszabadulás sebességi állandóját növeli. Kikapcsolt állapotban (M.ADP.P<sub>i</sub>), a kagylóizom HMM nem köt az aktinhoz. Végző soron a szabályozás aktiváló oldalát a  $\text{Ca}^{2+}$ -kötés hatására bekövetkező allosztérikus nukleotid- és aktin-hely kommunikáció biztosítja ( $\text{Ca}^{2+}$  jelenlétében az aktin-affinitás és a nukleotid hely ADP-affinitása kölcsönösen csökkentik egymást). A fej-fej-rúd kölcsönhatással jellemezhető kikapcsolt állapotot pedig (amelyben az ionos kölcsönhatások jelentősége bizonyított), legalábbis részben más allosztérikus útvonalak, elsősorban az RD dinamikájának megváltozása eredményezi. Ebben az állapotban az MD kapcsoló-1, amelynek pozíciója az erőkar helyzetét állítja be (nyitott ↔ zárt, ld. VI.2.), valószínűleg a zárt állapotban marad, ami gátolja az erőkar lecsapását. Szerkezeti téren új eredmény az aszimmetrikus „off” állapot krio-EM jellemzése, amelyről már az irodalmi bevezetőben is említést tettem, s amely szerkezet általánosan jellemzi a regulált mio2 motorokat [78] (ld. még VI.4.)

### VI.3.3. A $\text{Ca}^{2+}$ kötésen és a foszforiláción alapuló szabályozás összehasonlítása

#### Háttér

Mai ismereteink alapján elképzelhető, hogy a két, kémiaailag jelentősen eltérő szignál (pozitív vs. negatív ion) ellenére a motor aktivitás kétféle szabályozása hasonló mechanizmuson keresztül valósul meg. Mindkét esetben csak a kétféjű miozin fragmentumok szabályozhatók, azaz az RD és az S2 domén kölcsönhatása elengedhetetlen a regulációhoz. A kérdés vizsgálatához rovarsejt kultúrában, rekombináns bakulovírusok segítségével Kathy Trybus (Brandeis Univ., USA) laboratóriumában expresszáltunk olyan hibrid és kiméra HMM-eket, amelyek MD-ja az RLC foszforilációjával szabályozott gerinces simaizom mio2-ből származott, míg az RD illetve csak a  $\text{Ca}^{2+}$ -kötő ELC kagylóizom mio2 eredetű volt.

#### Eredmények [133]<sup>1</sup>

A könnyű lánc hibrid-kimérák (ahol az RD nehéz lánc és az ELC alegység kagylóizom mio2-ből, míg az RLC simaizom mio2-ből származott) kettős regulációt mutatott: alapállapotban az ATP-áz aktivitásuk és motilitásuk gátolt, viszont aktiválni lehetett őket mind  $\text{Ca}^{2+}$ -mal, mind az RLC-t foszforiláló MLCK enzimmal (III. táblázat). A kagyló mio2-ből származó RD-t tartalmazó kimérák természetesen „csak”  $\text{Ca}^{2+}$ -kötés hatására mutattak aktivitást. Az eredmények azt sejtetik, hogy az összes regulált mio2 szabályozáshoz szükséges molekulán belüli kommunikációs útvonal

---

<sup>1</sup> Kísérleti eredményeink ebben a publikációban, mint „személyes közlés” jelentek meg (később nem sikerült önálló közleményt írunk, mivel a kollaborátorban hiányzott ehhez a kellő akarat).

az MD és az RD között közös. A RD-n belül a közös elem az lehet, hogy mindkét esetben a belső dinamika befolyásolásán keresztül szabályozódik a motorfunkciót.

**III. táblázat\***

konstrukció		<i>in vitro</i> motilitás ( $\mu\text{m}/\text{sec}$ )	
		-P <sub>i</sub>	+P <sub>i</sub>
simaizom HC/RLC/ kagyló ELC	-Ca	0	1,29±0.28 (30)
	+Ca	0,42 ±0.09 (28)	1,34 ±0.25 (22)
simaizom MD/ kagyló RD (ELC/RLC)	-Ca	0	-
	+Ca	0,40 ±0.18 (12)	-

\*A rekombináns HMM-et rovarsejtekben a három láncot tartalmazó rekombináns vírussal történő együttes fertőzés után anti-FLAG-címke affinitás oszlopon izoláltuk. A motilitási teszthez a motorfehérjét az S2 elleni monoklonális antitestekkel immobilizáltuk [134]. (Zárójelben a mért mozgó aktin filamentum száma.)

### Kóda

A Ca<sup>2+</sup> szabályozás kinetikai hátterét röviden már taglaltam. A foszforiláción alapuló szabályozás kinetikáját is tanulmányozták korábban simaizom miozin HMM-mel [135, 136]. Ezeket a vizsgálatokat kiterjesztettük a hasonló módon szabályozott nem-izom miozin IIB izoformára, ahol a reguláció és az aktin-kötés viszonyát vizsgáltuk (ez a munka Jim Sellers-szel együttműködésben született) [137]<sup>1</sup>. Azt találtuk, hogy mindkét fej erősen kötődik az aktinhoz nem-foszforilált és foszforilált formában is ( $K_d > 10$  nM), függetlenül attól, hogy ADP jelen volt-e. Ez az eredmény ellentétes mind a simaizom, mind a kagylóizom HMM-mel kapott eredményekkel. A simaizomnál a két idézett vizsgálat közül az egyikben csak az egyik fej kötődött ADP jelenlétében – ami közvetlenül alátámasztaná a kikapcsolt állapotra javasolt „aszimmetrikusan kapcsolódó fejek” modellt –, a másikban viszont szimmetrikus aktin kötést találtak a szerzők. A kagylóizom HMM kikapcsolt állapotban viszont nem kötődik az aktinhoz, de az aszimmetrikus állapotban van (és csak az egyik fej köt ADP-t). A nem-izom mio2B-vel kapott eredményeket úgy lehet összebékíteni az aszimmetrikus kikapcsolt állapot modellel, ha feltételezzük, hogy ez az állapot az ATP-áz ciklus egy, az ADP állapotot megelőző intermedier lépésénél alakul ki (pl. M.ADP.Pi állapotban). Összegezve a kétféle regulációval kapcsolatos jelenlegi ismereteinket, hasonlóságokat és különbségeket is felfedezhetünk. A mechanisztikus hasonlóság például a nukleotid-kötőhely, a regulációs domén és a proximális farok domén molekulán belüli kommunikációjának elemiben nyilvánul meg. Bizonyítottnak tekinthető, hogy az *off*-állapot mindkét rendszerben a két fej és a proximális S2 aszimmetrikus kapcsolódásával jár együtt [77] (ld. IV.3 és az előző alfejezet).

A fiziológias különbségek következtében (pl. a kagyló miozin egy gyors harántcsíktolt izomból származik, a simaizom lassú izom, amelynek feszültség fenntartása is feladata) viszont a két illetve három vizsgált rendszer „finomhangolásában”, az aktin-kötőhely és a regulációs elemek kommunikációjában lehetnek különbségek. Ez a különbség többek között a gyors illetve lassú motornál az aktin- és ADP-kötés erősebb és gyengébb termodinamikai (és allosztérikus) kapcsoltságában nyilvánul(hat) meg. A reguláció részletes mechanizmusának feltárása, legyen szó

<sup>1</sup> Ehhez a munkához a hozzájárulásom nem volt jelentős, ezért nem vettem be a disszertáció közleményei közé.



bármelyik módozatról, további kutatásokért kiállt. A „miozinológusok” nagyon várják már a HMM atomi felbontású szerkezetét, amely azonban egyelőre ellenállt a kristályosítási kísérleteknek<sup>1</sup>.

### VI.3.4. A *Physarum* miozin Ca<sup>2+</sup>-kötőhely azonosítása és jellemzése

#### Háttér

*Physarum polycephalum* nyálkagomba plazmódiumban megfigyelhető gyors, oszcillatorikus (2-3 percenként irányt váltó) citoplazma áramlást aktomiozin kontrakció hajtja és az intracelluláris Ca<sup>2+</sup> koncentráció szabályozza [74, 138]. Kohama és mtsi mutatták ki, hogy a mio2-t a Ca<sup>2+</sup> gátolja, s a Ca<sup>2+</sup>-kötő alegység az ELC [139]. Felmerült a kérdés, hogy a Ca<sup>2+</sup>-kötőhely hol található az ELC-ben, s mi lehet a Ca<sup>2+</sup>-gátlás mechanizmusa. Először vad-típusú és mutáns ELC-k és RD-k Ca<sup>2+</sup>-kötését vizsgálatuk, majd sikeresen kristályosítottuk az RD-t Ca<sup>2+</sup> jelenlétében (VI.3.4.).

#### Eredmények [104]

A rekombináns ELC-t és RD-t *E. coli* expressziós rendszerben állítottuk elő. Az utóbbi esetben az RD három láncát ko-expresszáltuk, s a sejtben a komplex összeállt, natív formában lehetett izolálni. A *Physarum* ELC szekvencia analízise alapján az első és harmadik EF-kéz motívumot kanonikus, míg a negyediket ún. ősi motívumként [140] potenciális Ca<sup>2+</sup>-kötőhelynek prediktáltuk (IV. táblázat).

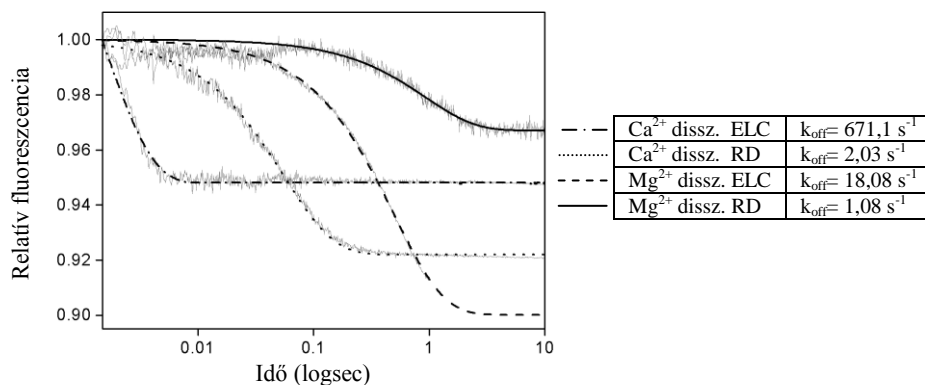
#### IV. táblázat

<i>Physarum</i> ELC												
EF-1 (15-26)	D	K	D	N	D	G	K	V	S	I	E	E
EF-2 (41-52)	A	E	L	N	A	K	E	F	D	L	A	T
EF-3 (86-97)	D	K	E	G	N	G	T	I	Q	E	A	E
EF-4 (111-122)	S	V	S	G	D	G	A	I	N	Y	E	S
<i>Dictyostelium</i> ELC												
EF-1 (16-27)	D	K	D	N	D	G	K	V	S	V	E	D
emlős CaM	D	K	D	G	D	G	T	I	T	T	K	E
EF-1 (19-30)												
<i>A. irradians</i> ELC												
EF-1 (20-30)	D	F	W	-	D	G	R	D	G	A	V	D
<i>A. irradians</i> ELC	D	R	E	G	Q	G	F	I	S	G	A	E
EF-3 (95-106)												
<i>A. irradians</i> RLC												
EF-1 (29-40)	D	V	D	R	D	G	F	V	S	K	E	D
<i>Physarum</i> RLC												
EF-1 (29-40)	D	S	E	R	T	G	F	I	T	K	E	G
konszenzus	D	•	-o-	•	-o-	G	•	h	-o-	•	•	E
	x		y		z		-y		-x			-z

\*: A hélix-hurok-hélix EF-kéz motívumból a Me<sup>2+</sup>-kötő hurok szekvenciák. Az utolsó sor a fém-koordinálásban résztvevő pozíciókat jelöli. Sárga háttérrel a funkcionális helyeket, pirossal az Ala mutációval vizsgált ELC aminosavakat jelöltem. A kagyló funkcionális EF-kéz motívuma NEM kanonikus szekvencia

<sup>1</sup> Tudomásom szerint eddig a legbiztosabb kristályosítási kísérleteket Caroly Cohen laboratóriumában, részben velünk együttműködve, *Loligo* HMM-mel történtek

Korábban a kagyló ELC-ben a harmadik EF-kéz motívumot jóslták funkcionálisnak, de mutagenézis vizsgálatok bizonyították, hogy nem ott van az RD  $\text{Ca}^{2+}$ -kötőhelye [141]. Ugyanez történt a *Physarum* mio2  $\text{Ca}^{2+}$ -kötőhely vizsgálatánál is, nevezetesen a harmadik és negyedik EF-kéz kritikus fém-koordináló helyeinek Ala mutációja nem okozott változást a az ELC és az RD  $\text{Ca}^{2+}$  kötésében. Az első EF-kéz  $\rightarrow$  Glu-Ala csere sem tette tönkre a  $\text{Ca}^{2+}$  kötetést (amellyel elsőként próbálkoztunk), amit végül csak a táblázatban jelzett hármas mutációval sikerült elérnünk. Ez a tény már arra utalt, hogy a *Physarum* ELC  $\text{Ca}^{2+}$ -kötőhelye valószínűleg nem kanonikus szerkezetű a  $\text{Ca}^{2+}$ -kötött formában. Érdekes módon a *Dictyostelium* ELC-ben is találtunk egy funkcionális helyet az első EF-kéz motívumban, ennél a miozinnál azonban az ATP-áz aktivitást nem befolyásolja a  $\text{Ca}^{2+}$ -kötés. A *Physarum* miozin és az rekombináns RD kettő illetve egy  $\text{Ca}^{2+}$ -ot köt (a miozin  $\text{Ca}^{2+}$ -kötésének 2 mM  $\text{Mg}^{2+}$  jelenlétében egyensúlyi dialízissel mért  $K_d$ -je 4,4  $\mu\text{M}$ ). A kötőhely csak részlegesen specifikus  $\text{Ca}^{2+}$ -ra, fiziológias körülmények között  $\text{Mg}^{2+}$ -ot is köthet (ami azonban nem befolyásolja az ATP-áz aktivitást), ezért tranziens kinetikai módszerekkel vizsgáltuk a kétféle kétértékű kation kicserélődési sebességét (26. ábra). Az RD  $\text{Ca}^{2+}$  disszociáció sebességi állandója megegyezik a  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM esetben mért  $k_{\text{on}}$ -nal [142] és  $\sim 10$ -szer lassabb a kagyló RD  $\text{Ca}^{2+}$  disszociációjánál (megjegyzendő, hogy a kagyló izomkontrakció sokkal gyorsabb folyamat, mint a citoplazma áramlás). A  $\text{Mg}^{2+}$   $k_{\text{off}}$  értéke jóval gyorsabb, mint pl. a csak szerkezeti szerepet betöltő  $\text{Mg}^{2+}$  disszociáció a kagyló RLC-ről. Az eredményekből azt a következtetést vontuk le, hogy a  $\text{Ca}^{2+}$  a regulációhoz szükséges időskálán kötődni tud, s a miozin gátlásán keresztül leállítja a plazmódium citoplazma áramlását (amely gátlás a másodperces időskálán mozog [138]).



26. ábra. Kétértékű kationok disszociációja ELC-ről és RD-ről „Stopped-flow” tranziensekhez exponenciális függvény illesztve. Szignál: IAEDANS-jelölt ELC, Quin-2 (RD  $\text{Ca}^{2+}$ -dissz.), Calcium Green 5N (RD  $\text{Mg}^{2+}$ )

### VI.3.5. A *Physarum* miozin RD térszerkezete

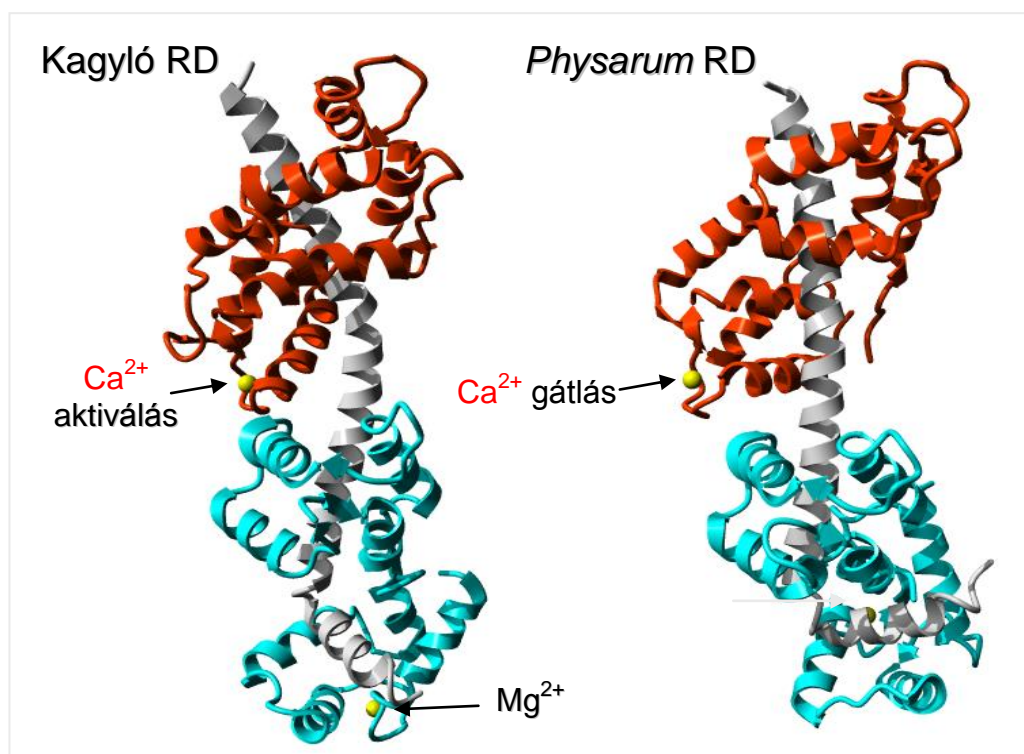
#### Háttér

A *Physarum* RD kristályszerkezeti modell elkészülte előtt egyedül a kagyló RD nagyfelbontású szerkezete (2,0 Å, PDB: 1WDC) volt ismert [41]. Ezenkívül két mio5 IQ-CaM (illetve CaM-szerű LC) komplex szerkezetét határozták meg, az utóbbiakat azonban csak apo-formában [143, 144]. A kagyló RD szerkezet különlegessége, hogy az ELC N-doménben nem történt meg a CaM szupercsaládra általánosan, bár nem kizárólagosan jellemző ún. zárt  $\rightarrow$  nyitott konformációs átmenet a  $\text{Ca}^{2+}$ -kötés hatására [140]. Ennek az okát Houdusse és Cohen abban látták, hogy a kagyló ELC első EF-kéz motívuma nem-kanonikus szekvenciájú (a  $\text{Ca}^{2+}$ -kötő hurok nem

12, csak 11 aminosavból hosszú, ld. III. táblázat), s ezáltal a  $\text{Ca}^{2+}$ -koordináció is egyedi. A *Physarum* ELC mutagenézis vizsgálata előrevetítette, hogy ebben az RD-ben is zárt konformációjú lehet az ELC  $\text{Ca}^{2+}$ -kötött N-doménje. Az RD kristályosítását és a röntgendiffrakciós munkát az ELTE-MTA krisztallográfiai csoportjával együttműködve végeztük.

### Eredmények [7]

A *Physarum* miozin ELC  $\text{Ca}^{2+}$ -kötésének nem-kanonikus viselkedésére szerkezeti magyarázatot a  $\text{Ca}^{2+}$ -telített RD térszerkezeti modellje adott, amelyet 1,8 Å-ös felbontásban sikerült meghatározni (PDB kód: 2BLO). Ez a második, de a legjobb felbontású szerkezet bármely miozin teljes nyaki régiójáról. A *Physarum* RD első pillantásra nagy hasonlóságot mutat a kagyló RD szerkezettel (27. ábra). Az LC-k antiparallel módon ölelik körül az  $\alpha$ -helikális HC

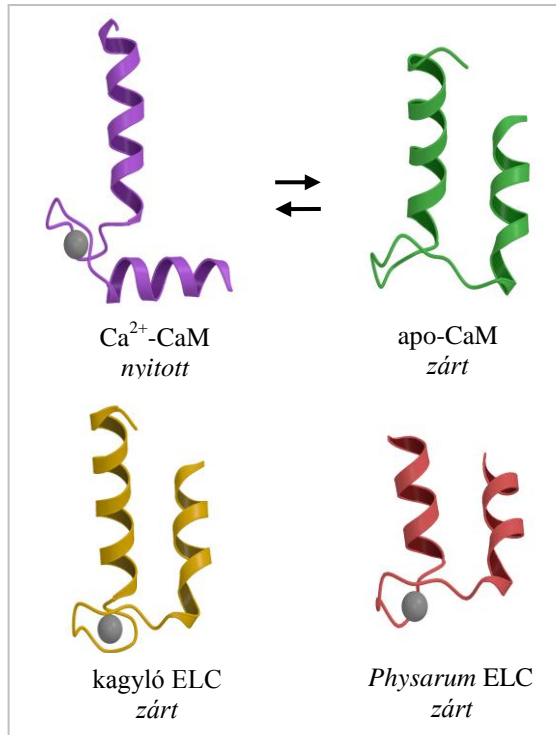


27. ábra. A *Physarum* és kagyló mio2 RD térszerkezetének összehasonlítása  
 HC: szürke, ELC: piros, RLC: cián. PDB: 1wdc (kagyló) és 1nkn (*Physarum*)

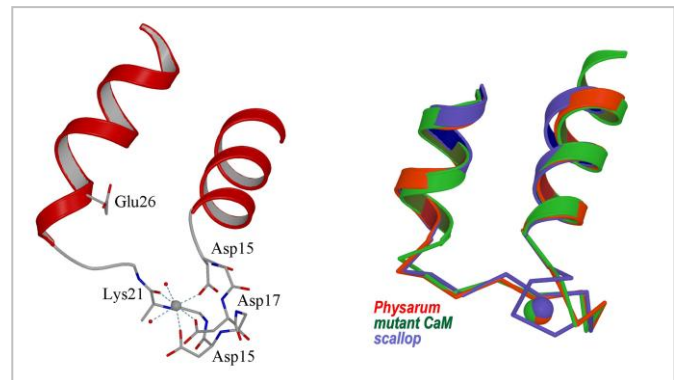
fragmentumot. Az RLC N-terminális doménje a fej-rúd csuklónál, a HC fragmentum C-terminális régiójához kötődik. Mindkét LC C-terminális doménje az IQ motívumok első felével lép erős kölcsönhatásra, ami a domének ún. félig-nyitott konformációjához vezet (hasonlóan az ismert IQ-CaM komplexekhez). Az ELC N-terminális domén, a kagyló RD-hez hasonlóan zárt állapotban van, annak ellenére, hogy az első EF-kéz motívum a CaM szupercsaládra jellemző kanonikus szekvenciájú (28. ábra és IV. táblázat).

A szerkezetből kitűnik, hogy az ELC N-doménjében azért nem történt meg a zárt→nyitott konformációs átmenet, mivel a  $\text{Ca}^{2+}$ -kötő EF-kéz hurokrészének 12. aminosava, egy Glu (amely a kanonikus  $\text{Ca}^{2+}$  kötőhelyeknél két oxigén ligandummal vesz részt az ion koordinációs kötésében) térben túl messze van a kötött  $\text{Ca}^{2+}$ -tól (29. ábra). A  $\text{Ca}^{2+}$  csak a hurok első felével alakít ki kötést, oktaéderes geometriával (az általánosabb heptagonális bipiramis koordinációval szemben). A „kiesett” Glu szerepét egy vízmolekula veszi át. Ez a kevésbé rögzített víz, az oktaéderes ligandum térével együtt megmagyarázhatja a kötőhely kevésbé specifikus voltát (VI.3.2.). A zárt szerkezet

stabilizálását egyrészt az ELC-nek az RLC-vel és a nehéz láncsal kialakított kölcsönhatásai járulhatnak hozzá, másrészt az a tény, hogy az ELC N-terminális doménje a kanonikus CaM doméntól eltérően csak egy funkcionális EF-kéz motívumot tartalmaz. Szintén hozzájárulhat a zárt szerkezethez, hogy hiányoznak a *Physarum* ELC N-doménből a nyitott konformációt stabilizáló Met aminosavak [145]. Úgy gondoljuk, hogy ez a szerkezet a domén zárt → nyitott izomerizációjának mintegy az átmeneti állapotában „fagyott be”. A következtetésünket alátámasztja

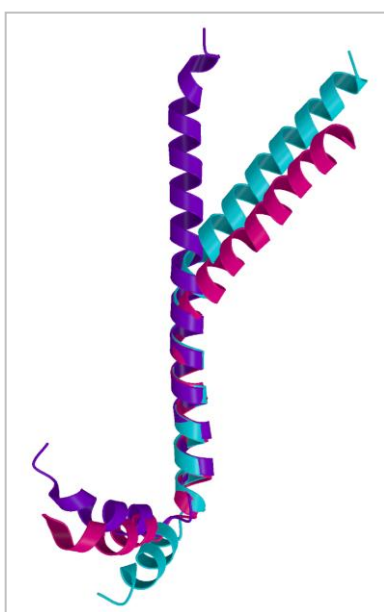


28. ábra. EF-kéz motívumok nyitott és zárt szerkezete



29. ábra. A *Physarum mio2 RD*  $\text{Ca}^{2+}$ -kötőhelye (bal) Az ELC első EF-kéz motívuma, kiemelve a  $\text{Ca}^{2+}$ -koordinációban résztvevő oldalláncokat; (jobb) A *Physarum RD* összehasonlítása egy mutáns CaM és a kagyló RD  $\text{Ca}^{2+}$ -kötőhelyével

egy mostanában meghatározott CaM mutáns térszerkezete (PDB: 1Y6W), ahol a zárt állapotot egy diszulfid-híd stabilizálja és ahol a  $\text{Ca}^{2+}$  a mi szerkezetünkkel megegyező módon kötődik az N-terminális doménhez [146] (29. ábra).



30. ábra. Az RD nehéz láncok összehasonlítása. *Physarum*: lila, *kagyló*: magenta, *csirke*: cian

Az *Physarum RD* szerkezet további érdekessége, hogy az RLC N-terminális domén nem köt kétértékű kationt, ennek ellenére nyitott konformációban van. Ennek az az oka, hogy a nehéz lánc triptofán-gazdag kampó régiója (egyébként az amfipatikus CaM célszekvenciákhoz hasonlóan) stabilizálja a nyitott domén szerkezetet. A nehéz lánc fragmentumok az ismert szerkezetekből egymásra illetve azt látjuk (30. ábra), hogy az  $\alpha$ -hélix egyrészt a két IQ motívum között, másrészt a kampó régióban hajlékony. Ebből következően a különböző *mio2* motorokban a fej és a rúd orientációja egymáshoz képest jelentősen eltérhet, aminek funkcionális következményei is lehetnek.

Megpróbáltuk az apo-RD szerkezetét is meghatározni, de a kristályok EDTA-val történő

kezelése tönkretette azokat, illetve  $\text{Ca}^{2+}$  hiányában nem kaptunk jól diffraktáló kristályokat. Ennek egyik oka lehet, hogy az RD belső mobilitása nagyobb az apo formában. Ezt a lehetőséget hidrogén-deutérium kicserélődési és molekuláris dinamikai szimulációs kísérletekkel vizsgáltuk. Mind az *in vitro*, mind az *in silico* módszer azt mutatta, hogy a globális flexibilitás megnövekszik a  $\text{Ca}^{2+}$ -mentes RD-ben. A dinamikai szimuláció alapján azt is feltételezhetjük, hogy az apo-komplexben a két RLC kapcsolata meglazul (csökken a kölcsönhatásban lévő felszíni hurkok közti H-hidak száma), ami az egész miozin esetén hozzájárulhat a domének közötti szegmentális flexibilitás növekedéséhez, ami részben „szétkapcsolhatja” az MD és az RD kommunikációját, s az aktivitás gátlásához vezet.

Összefoglalva, eredményeinkből az következik, hogy (1) ha a egy mio2 könnyű lánc  $\text{Ca}^{2+}$ -ot köt, függetlenül az EF-kéz motívum szekvenciájától (konszenzus szekvencia a *Physarum* ELC-ben illetve nem-konszenzus szekvencia a kagyló ELC-ben) és a kötés kiváltotta konformációváltás funkcionális következményétől (aktiválás vagy gátlás), a kötőhelyet tartalmazó domén zárt konformációban marad; (2) a „klasszikus” zárt-nyitott konformációs átmenet nélkül is képes a  $\text{Ca}^{2+}$ -kötés szabályozó szerepet betölteni. A *Physarum* RD szerkezet alapján levont legfontosabb következtetésünk tehát, hogy miozinokban található kanonikus EF-kéz motívumhoz a  $\text{Ca}^{2+}$  nem-kanonikus módon is tud kötődni [140, 147]. Miozinhoz kötött  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM szerkezetet egyelőre még nem ismerünk. Lehet, hogy ebben az esetben is a  $\text{Ca}^{2+}$  kötés hatására zárt konformációban marad a CaM domén. Elképzelhető az is, hogy a  $\text{Ca}^{2+}$ -kötés hatására bekövetkező izomerizáció miatt a CaM disszociál a miozin nyak régióból, mint azt például a mio5 esetében meg is figyelték [148]. Alternatív lehetőség, hogy csak a CaM egyik doménje válik le az MHC-ről, s ez a domén esetleg kapcsolódni tud egy másik IQ motívumhoz [144].

### Kóda

Mit tudunk meg az eddigi kutatások alapján a kétféle konvencionális miozin  $\text{Ca}^{2+}$ -szabályozásáról? A *Physarum* miozin  $\text{Ca}^{2+}$ -gátlásának molekuláris hátterét úgy magyarázzuk, hogy az ELC  $\text{Ca}^{2+}$ -kötésének hatására az RD flexibilitása csökken, aminek következtében a motor domén és az RD kapcsolata is „feszültté” válik, és ezáltal csökken a motorfehérje aktivitása. A kagyló izom miozinban  $\text{Ca}^{2+}$ -kötés hatására pontosan az ellenkező változás történik: az RD merevebbé válása az *off* szerkezetet stabilizáló kölcsönhatások megszűnéséhez és a motor aktiválásához vezet. Bizonyítottuk, hogy mindkét esetben az RD szerkezeti dinamikájának megváltozása lehet az allostérikus szabályozás egyik, ha nem a legfontosabb kulcsmozzanata. Míg a kagyló miozin motorfunkcióját és ezáltal az izomkontrakciót az ELC  $\text{Ca}^{2+}$ -kötése molekuláris kapcsolóként szabályozhatja, addig a *Physarum* mio2 ELC  $\text{Ca}^{2+}$ -kötése inkább csak moduláló szerepet tölt be a motor szabályozásában (hiszen az ATP-áz aktivitás csak ~60%-kal csökken [74]), de ez az aktivitáscsökkenés a citoplazma áramlás oszcillációját szabályozni tudja.

A *Physarum* mio2  $\text{Ca}^{2+}$  reguláció mechanizmusának további részletei szerkezeti és kinetikai vizsgálatok tárhatják fel. A  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivált kagyló mio2-nél már taglaltam az aszimmetrikusan immobilizált fejek szerepét [149], s hivatkozom az nukleotid- és  $\text{Ca}^{2+}$ -kötőhely kooperatív működésén alapuló kinetikai modellben feltárt mechanizmusra [131]. Hasonló kinetikai vizsgálatokat tervezünk az általunk sikeresen előállított rekombináns *Physarum* HMM fragmentummal [108].

## VI.4. Miozin-II *coiled-coil* domén: szerkezet-funkció és szerkezeti biológiai vizsgálatok

A *coiled-coil* a fehérjék világának leggyakoribb dimerizációs motívuma (de léteznek három, négy, sőt ötláncú superhélixek is). A kétfejű mio2-t is a hosszú rúd régió *coiled-coil* szerkezete tartja össze, amely szerkezeti elem biztosítja a nem-processzív mio2 motor filamentummá szerveződését, közvetíti a fejekben az erőgenerálás során fellépő feszülést, és részt kell, hogy vegyen a miozinok utóbbi időben felismert mechanikai szabályozásában. Végül a disszertációban közölt eredmények szempontjából legfontosabb szerepe, hogy esszenciális a mio2 szabályozásában. Az alábbi fejezetben a fej-rúd csukló régió (a proximális S2) *coiled-coil* szerkezetével és a mio2 szabályozásában betöltött szerepével foglalkozom.

### VI.4.1. A kagyló miozin rúd N-terminális *coiled-coil* régiója instabil szerkezetű

#### Háttér

Az *coiled-coil* superhélix két (vagy több) olyan  $\alpha$ -hélixek között alakul ki, amelyben az egymást követő heptádok első és negyedik aminosav oldallánca hidrofób természetű. A két láncot az így létrejövő hidrofób felszín, mintegy varrat tartja össze<sup>1</sup>, amit aztán az  $\alpha$ -hélixek felszínén elhelyezkedő töltéssel rendelkező oldalláncok között létrejövő sóhidak tovább stabilizálnak [150]. A legszabályosabb *cc* szekvencia az elsősorban DNS-kötő fehérjékben előforduló Leu-cipzár motívum, míg a hosszú *cc* szekvenciákra kevésbé jellemző a szabályosság. Az utóbbi kategóriába tartoznak a miozinok is. A miozin S2, LMM és rövidebb fragmentumival könyvtárnyi irodalom foglalkozott, amiből csak annyit jegyeznek meg, hogy a legtöbbet tanulmányozott vázizom mio2 S2 régióból származó, még stabil proteolitikus fragmentumok mérete saját vizsgálataink szerint ~20 kDa [151]. A kagyló miozin S2 különböző hosszúságú fragmentumait, valamint az RD-nek az előző konstrukciókkal meghosszabbított változatait rekombináns fehérjeként állítottuk elő és biokémiai módszerekkel, CD spektroszkópiával és elektronmikroszkópiával vizsgáltuk a dimerizációs képességüket.

#### Eredmények [152]

Meglepetésünkre azt találtuk, hogy a többi konvencionális miozintól eltérően, a kagyló S2 domén önmagában alig asszociál ( $K_d > 1$  mM), viszont ha a fej-rúd régió intakt (RD+S2), a *cc* dimer kialakul, tehát az RLC stabilizálja a fej-rúd csukló régiót. Igaz, hogy a ~350 aminosav hosszúságú konstrukció dimer-monomer egyensúlya is ( $K_d \sim 10$   $\mu$ M) instabil molekulára utal. Érdekes módon, bizonyos nehéz lánc hosszúságnál a fiziológias parallel dimerek helyett antiparallel *coiled-coil* molekulák alakultak ki. Ezt a jelenséget, hogy ugyanaz a *cc* szekvencia mindkét orientációban stabil dimert képez, eddig csak tropomiozin fragmentumoknál figyelték meg [153]. A rövidebb kagyló rekombináns S2 *cc* dimert alkotott, amennyiben mindkét végére diszulfid-hidat építettünk (CD spektroszkópiával mérve ~100% hélix-tartalmat mértünk<sup>2</sup>). Eredményink kísérleti bizonyítékot szolgáltatottak a regulált kagyló mio2 fej-rúd régió instabil voltára, alátámasztván azt az elképélést, hogy a *cc* szerkezet dinamikus viselkedése funkcionálisan fontos szereppel bírhat.

<sup>1</sup> A heptád pozíciókat kisbetűvel, a-tól h-ig jelöljük. Ennek megfelelően a hidrofób varrat az „a” és „d” pozíció között jön létre

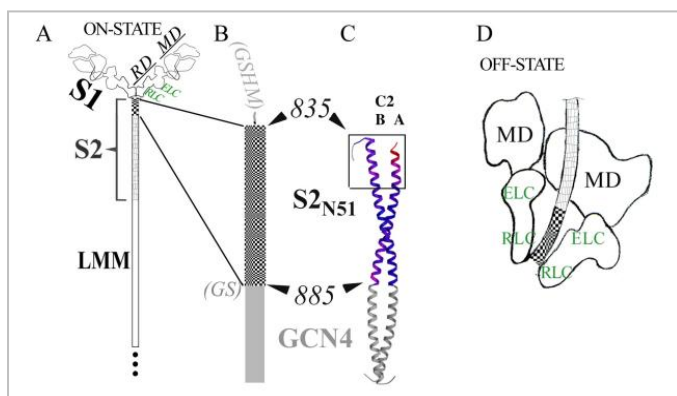
<sup>2</sup> Megjegyzendő, hogy nem dimerizálódó S2 konstrukciók szerkezet nélküliek láncok, azaz a dimerizáció kétállapotú rendszernek tekinthető, egyszálú  $\alpha$ -hélixek nincsenek (de ld. VI.6.)



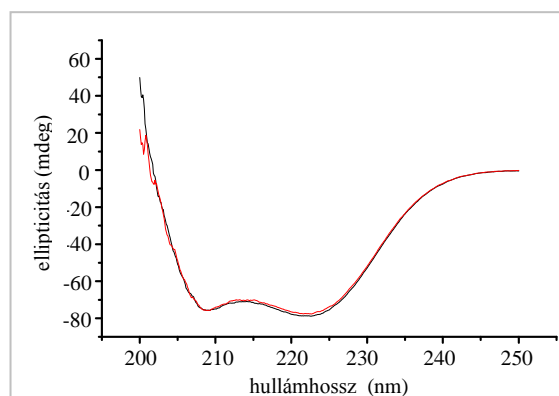
## VI.4.2. A legelső miozin rúd fragmentum térszerkezet: egy instabil *coiled-coil*

### Háttér

Bár *coiled-coil* dimer szerkezetet Francis Crick már 1952-ban megjósolta [154], az első nagyfelbontású szerkezeti kép csak a múlt század kilencvenes éveiben, a GCN4 transzkripciósi faktor Leu-cipzár motívumának kristályosítása után született meg [155]. A fibrózus  $\alpha$ -helikális *cc* fehérjék kristályosítása sokáig megoldhatatlan feladatnak tűnt, hiszen ezek általában nem tökéletes *cc*-k, azaz rövidebb fragmentumaik nem dimerizálnak, a hosszabb molekulák viszont parakristályokat képeznek (korábban mi is vizsgáltuk a vázizom mio2 LMM fragmentumok parakristályait [156]). Ezért a miozin rúd fragmentumok, illetve a fej/rúd régió szerkezetvizsgálata is sokat késett. A szerkezeti elvek alapján készült ugyan egy *ab initio* modell a mio2 fej-rúd csuklóról, ez azonban a valós szerkezet stabilitásáról és dinamikájáról keveset árult el [43].



31. ábra. A kristályosításhoz használt konstrukció (B), a pozíciója az „on” és „off” szerkezetű mio2-ben (A,D) és az egyik S2 szerkezet (C)



32. ábra. Az S2 kiméra CD spektruma  
Tipikus reverzibilis  $\alpha$ -helikális *coiled-coil*  
( $mdeg_{222}/mdeg_{205} > 1$ ); piros: hődenaturáció után

### Eredmények [6, 9]<sup>1</sup>

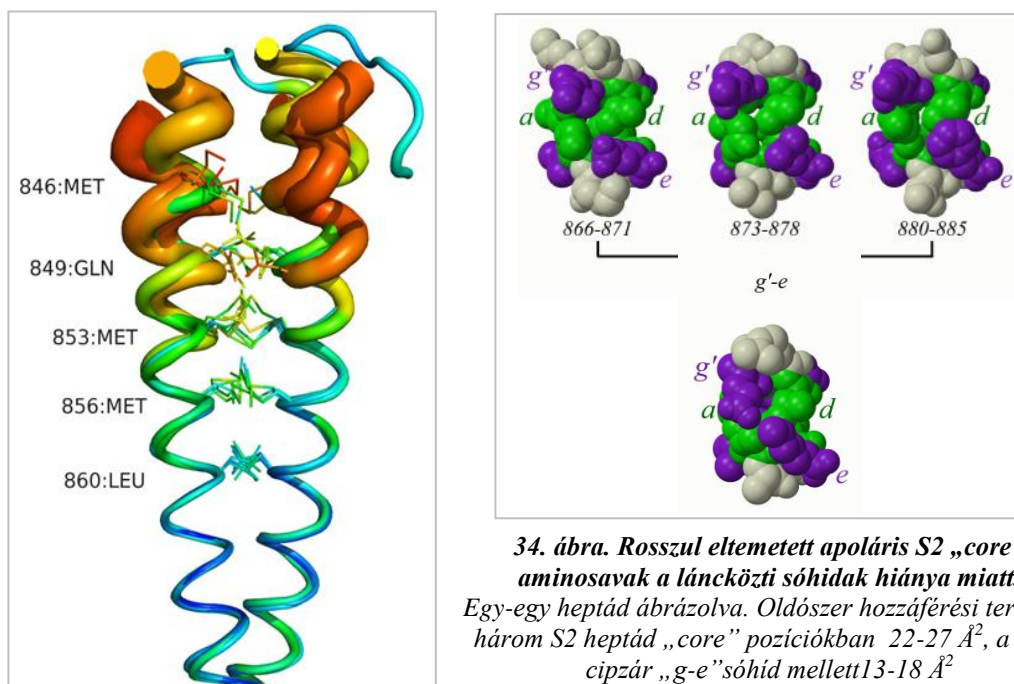
Egy egyszerű „trükkal” sikerült a kagyló (*A. irradians*) harántcsíkt izom miozin proximális farok doménjét (pr-S2) kristályosításra alkalmas dimer formában előállítanunk. Feltételeztük, hogy az egyébként instabil pr-S2 szekvenciát dimerizálásra készíthetjük, ha egy Leu-cipzárral kiméra fehérjét hozunk létre. A farok domén tradicionális határát jelentő konzervatív Pro835 utáni 51 aminosav C-terminális végéhez (7 heptád ismétlődés), egy Gly-Ser linkeren keresztül az élesztő GCN4-ből származó Leu-cipzár (4 heptád) fuzionáltunk, úgy hogy a heptád regiszter megmaradjon (31. ábra). A kiméra S2 CD spektruma reverzibilis *coiled-coil* szerkezetet mutat (32. ábra)

Az így kialakított kiméra *E. coli* expressziós rendszerben könnyűszerrel előállítható volt, szobahőmérsékleten stabil dimert alkot (CD spektroszkópiával követett hődenaturáció alapján:  $T_m = 51,3^\circ\text{C}$ , ld. 39. ábra), és szerencsénkre röntgendiffrakciós vizsgálatokra alkalmas kristályokat képzett. A szerkezeti munkát Carolyn Cohen csoportjával együttműködve (Brandeis Univ., USA) végeztük. Két különböző hőmérsékleten, három kristályformában összesen öt S2 dimer szerkezetét

<sup>1</sup> A kísérleti koncepció kidolgozása, a fehérje munka teljesen, a szerkezetek kiértékelése és a cikkírás részben a csoportunk hozzájárulása.

határoztuk meg (33. ábra), ami tény már önmagában igazolja, hogy a fej-rúd csukló régióban a *cc* szerkezet flexibilis.

A proximális S2 kristályosításával, paradox módon, egy instabil *cc* szerkezetet sikerült vizualizálnunk. A szerkezetek számos olyan tulajdonságot mutatnak, ami a flexibilitás illetve instabilitás fizikai alapját képezi. Az N-terminális 14 aminosava rendezetlen szerkezetű. A Leucipzártól az N-terminális irányában fokozatosan válik instabillá a *cc*, amit többek-között a szuperhélix átmérőjének növekedése (9-10 Å-ről 11 Å-re) és számos „core”, azaz az intermolekuláris hidrofób varratot alkotó *a* és *d* pozíciókban lévő oldallánc elégtelen „csomagolódásából” adódik (34. ábra). Feltűnő, hogy a meghatározott szerkezetben nincs egyetlen



**33. ábra. Proximális S2 szerkezetek egymásra illesztve**  
PDB: *Inkn*, *3bat*, *3bas*. Néhány „*a*” és „*d*” pozícióban lévő, aszimmetrikus vagy rosszul „csomagolódo” aminosav pár kiemelve; a hélix vastagsága a kristallográfiai B-faktorral növekszik

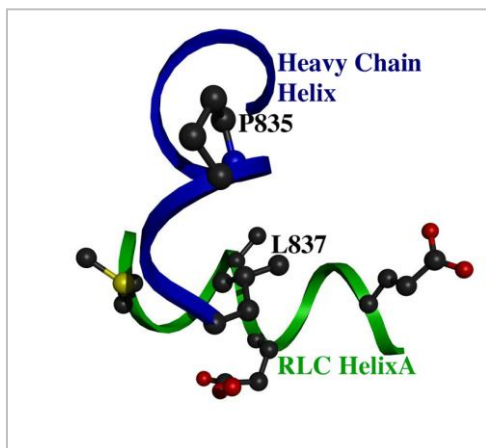
**34. ábra. Rosszul eltemetett apoláris S2 „core” aminosavak a láncközi sóhidak hiánya miatt.**  
Egy-egy heptád ábrázolva. Oldószer hozzáférési terület a három S2 heptád „core” pozíciókban 22-27 Å<sup>2</sup>, a Leucipzár „*g-e*” sóhid mellett 13-18 Å<sup>2</sup>

lánccok közötti só-híd sem (elsősorban a *g-e'* ionpároknak van fontos *cc* stabilizáló szerepük), aminek következtében több apoláros „core” oldallánc is kitetté válik a vizes fázis felé. Kimondottan instabilizáló szerepe van az *a* pozícióban elhelyezkedő két Lys oldalláncnak és a kanonikus *coiled-coil* szekvenciáknál nagyobb számú *a* és *d* pozíciójú poláros oldalláncnak. Ilyen pl. a Gln849, amelyek ráadásul aszimmetrikusan helyezkednek el dimer két lánc között. Számos oldallánc különböző konformációt vesz fel a két szerkezetben, s nem alakítja ki a kanonikus „büttyök-alukakban” (*knobs-in-the-holes*) illeszkedést a két lánc között. Lys 867-es pozíciónál az S2 dimerekben a *cc* hajlása különbözik. Ezen régió funkcionális jelentőségére utal, hogy a β-szívizom MHC-ban egy pontmutáció örökletes hipertrófiás kardiomiopátiához vezet.

A 16 °C-on kristályosított S2 fragmentum N-terminális 14 aminosava rendezetlen szerkezetű volt, ellenben a 4 °C-on kapott kristályformákból készült modellekben az összesen hat lánc közül kettőben a teljes proximális S2 szerkezet, beleértve a fej-rúd csuklót (Pro835- Leu837) láthatóvá vált (x. ábra). Az utóbbi nem-helikális (nyújtott *coil*) szerkezetű s elfelé néz a *cc* tengelytől. A korábban meghatározott kagyló mio2 RD (és S1) valamint az általunk meghatározott *Physarum*



mio2 RD [7] szerkezetekben ez a régió, annak ellenére, hogy egy hélix-törő Pro-t tartalmaz, majdnem szabályos  $\alpha$ -helikális szerkezetű volt, köszönhetően egy érdekes, az RLC Leu17 hidrofób

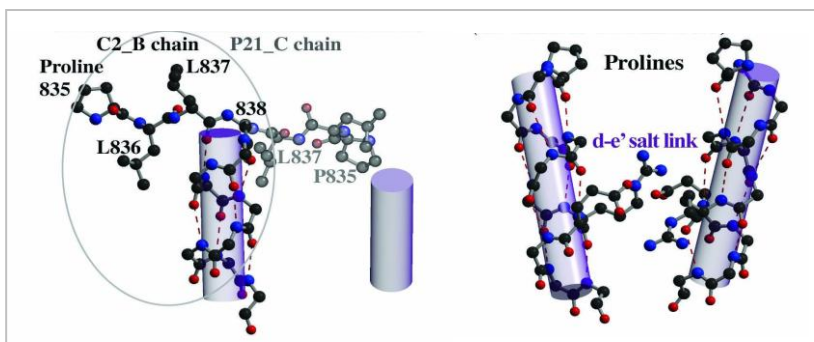


35. ábra. Az RLC stabilizálja a fej-rúd csukló (Pro835-Leu837)  $\alpha$ -helikális szerkezetét  
Physarum RD (PDF: 2bl0)

*knobs-in-the-holes* stabilizáló kölcsönhatásnak (azaz egy tipikus *cc* lánc összetartó motívumnak) (x. ábra). Következtetésünk, hogy valószínűleg a fej-nyak csukló az „on” állapotban folyamatos  $\alpha$ -hélix, viszont a  $\text{Ca}^{2+}$ -mentes „off” állapotban az RLC elmozdulása következtében destabilizálódik, s a proximális S2 minimálisan néhány aminosava is random *coil* szerkezetű lesz, ami elengedhetetlen feltétele az aszimmetrikus fej-fej-farok gátolt konformáció kialakulásához. Másik következtetésünk, hogy a tényleges fej-farok határ NEM az eddig valószínűsített konzervatív prolin, hanem valójában a Leu836 és Leu837 közötti peptidkötésnél van (mio2 szekvenciák összehasonlítása is azt mutatja, hogy a Pro835-Leu837 tripeptid invariáns, míg az utána következő aminosavak konzerváltsága jóval kisebb. Az alacsony

hőmérsékleten kristályosított S2 N-terminális *cc* szerkezete kimondottan instabil – a *cc* átmérője 12 Å-re növekedett, szintén nagyobb lett a lokális szuperhélix menetmagasság –, mindez tovább valószínűsíti, hogy egy dinamikus, a működés során *coiled-coil*  $\leftrightarrow$  random *coil* átmenetre képes szerkezetet vizualizáltunk.

A *Nature*-ben közölt legelső miozin *cc* szerkezeti munkánk [9] után közöltek egy szívizom mio2 S2 fragmentum (126 aminosav) kristályszerkezeti modellt [157]. Ez a fragmentum önmagában is stabil dimert képez, s a *cc* is stabilabb térszerkezetű, mint a kagyló pr-S2 (36. ábra).



36. ábra. A kagyló és szívizom proximális S2 szerkezet összehasonlítása az N-terminális régióban.

A két teljesen legstabilabb kagyló S2 lánc (PDB: 3bas, 3bat) és a szívizom S2 szerkezet két lánc (PDB: 2fxo), egy sóhid kiemelve

Itt is található nem-kanonikus „a” és „d” pozícióban lévő aminosavak, amelyek aszimmetrikusan helyezkednek el, s a két lánc egymáshoz képest kissé eltolt helyzetét (*stagger*) okozzák az N-terminális közelében. A szerzők szerint ez az eltolás lehet a szerkezeti oka a mio2 két fejének alapvető (tehát a bekapcsolt állapotban is fennálló) aszimmetriáját. Ezt az állítást cáfolja, hogy a sokkalta aszimmetrikusabb „off” állapotot felvenni képes kagyló mio2 egyetlen S2 modelljében sem látunk jelentős axiális eltolódást a két lánc között. A kristályosított szívizom S2 fragmentum hosszabb volta viszont lehetővé tette, hogy láthatóvá vált annak a negatív töltésű „gyűrűnek” (Glu894-Asp906) a szerkezete, amely a regulált mio2 kikapcsolt szerkezetekben ionosan kapcsolódhat a blokkolt fejhez.

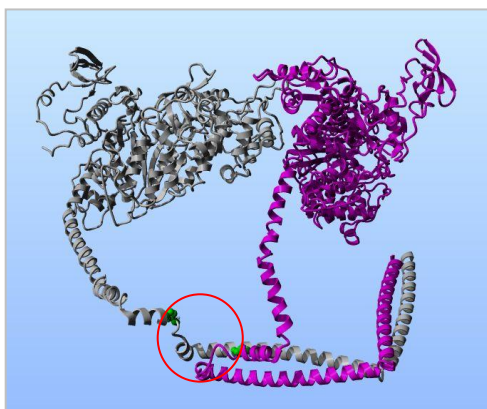
## Kóda

A Leu-cipzár ötletem alapján a Carolyn Cohen csoportja, másokkal együttműködve a tropomiozin atomi felbontású szerkezetvizsgálata terén is áttörést hajtott végre [20, 158, 159]<sup>1</sup>. Az általunk meghatározott miozin rúd fragmentum szerkezettel egy funkcionálisan minden bizonnyal instabil fehérje superhélixet sikerült vizualizálnunk. Ez a tulajdonság a miozin szupercsaládon belüli nagyfokú funkcionális változatosság egyik szerkezeti megnyilvánulása lehet. A dinamikus proximális S2 szerkezet egyrészt a fej és a rúd közötti allostérikus kommunikáció egyik szerkezeti alapját biztosítja – a  $\text{Ca}^{2+}$  disszociáció az ELC-ből a miozin nyaktól „lefelé és fölfelé” is érzékelhető dinamikus szerkezeti változást indukálhat (lásd még [104]), ami a fej-rúd csuklónál lévő  $\alpha$ -hélix és *coiled-coil* lokális „letekeredését” okozhatja, ami lehetővé teszi az aszimmetrikus fej-fej és fej-rúd kölcsönhatásokat, azaz a kikapcsolt szerkezet kialakulását okozza, persze csak ha nukleotid-hely is kommunikál az RD-vel (ld. még [128]). Másrészt viszont ennek az instabil szerkezetnek elég stabilnak kell lennie, hogy biztosítsa a motorfunkció során az optimális erőátvitelt [160], illetve az erőgeneráláshoz szükséges elasztikusítást [161]. Erre a kettős szerepre a természet elegáns és optimális megoldása ezek szerint a „csökkentett stabilitású” *coiled-coil*.

### VI.4.3. A mio2 motorok szabályozása és a proximális S2 stabilitása

#### Háttér

Már többször említettem, hogy a regulált miozinok szabályozhatóságához előfeltétel a fej-rúd csukló intakt volta („kétfejűség”), s a proximális S2 minimum hossza [162]. A regulált mio2-k kikapcsolt állapotában az aszimmetrikus fej-fej kapcsolódás valószínűleg csak a proximális *cc* részleges letekeredésével jöhet létre [79, 163] (37. ábra). Bár ezen a téren az irodalmi adatok egyébként ellentmondásosak, nem minden eredmény támasztja alá az ábrán bemutatott modellt [164]. De vajon a mio2 S2 szekvenciák illetve szerkezetek összehasonlítása alapján meg tudjuk-e különböztetni a regulált- és nem-regulált miozinokat? Más szóval a szabályozás szerkezeti alapjához hozzájárul-e a proximális S2 dinamikai „finomhangolása”? Erre a kérdésre különböző mio2 proximális S2 fragmentumok szekvencia analízise és stabilitásvizsgálata adta meg a pozitív választ.



37. ábra. Simaizom HMM „off” szerkezet. Krio-EM képrekonstrukció (PDB:1i84). Piros kör: letekeredett S2, zöld: Pro835

<sup>1</sup> A tropomiozin kristályosítás gyorsabban haladt, a szerkezetek előbb elkészültek.

## Eredmények

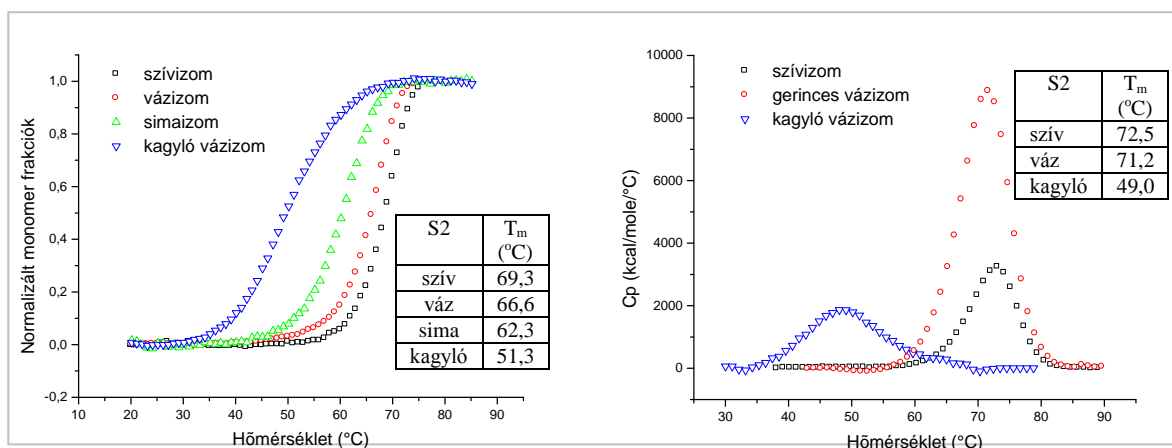
Rekombináns regulált (kagyló és simaizom mio2) és nem-regulált (szívizom és gerinces mio2) miozin proximális S2 fragmentumok (51 aminosav hosszúság + Leu-cipzár minden esetben) szekvenciáit illesztve kitűnik, hogy a regulált mio2 esetében jóval több „a” és „d” pozícióban találunk nem-kanonikus (poláros) aminosavat, illetve feltűnik a sóhidak hiánya (38. ábra).

kagyló váz	PLLSIARQEEEMKEQKLQMDKMKEDLAKTERIKKELEEQNVTLLEQKNDLF
sima	PLLQVTRQEEEMQAKDEELQRTKERQQKAEELKELEQKHTQLCEEKNNLLQ
szív (rat)	PLLKSAETEKEMANMKEEFGRVKDALEKSEARRKELEEKMVSLLEQKNDLQ
szív (hum)	PLLKSAERREKEMASMKEEFTRLKEALEKSEARRKELEEKMVSLLEQKNDLQ
gerinces váz	PLLKSAETEKEMANMKEDFEKAKEDLAKSEAKRKELEEKMVSLLEQKNDLQ
<b>regiszter</b>	defgabcde fgabcde fgabcde fgabcde fgabcde fgabcde fgabcde

38. ábra. Proximális S2 szekvenciák illesztése.

Piros: „a” és „d” pozícióban nem-kanonikus aminosav; kék: láncközötti sóhidak; félkövér fekete: a tényleges fej-rúd határ

Ebből a tényből már valószínűsítettük, amit a CD spektroszkópiás és kalorimetriás vizsgálatok megerősítettek, nevezetesen, hogy a közvetlenül szabályozott miozinoknál az aszimmetrikus „visszahajlott fejű” kikapcsolt állapot előfeltétele az alacsonyabb hőstabilitású, flexibilis(ebb) proximális cc szerkezet (39. ábra).

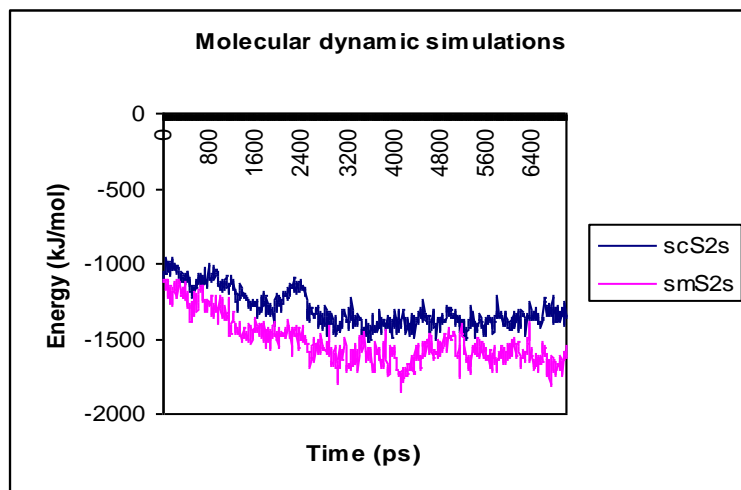


39. ábra. Regulált és nem-regulált mio2 proximális S2 fragmentumok hőstabilitás mérése CD spektroszkópiával (b) és DSC módszerrel (j).

A 222 nm-n mért ellipticitás változását követtük. T<sub>m</sub>: olvadási hőmérséklet (50% cc dimer, 50% random monomer, kétállapotú modellel számolva)

A Leu-cipzár nélküli szívizom mio2 pr-S2, ellentétben a kagyló és simaizom hasonló fragmentumokkal, dimert képez. A simaizom pr-S2 relatíve nagyobb stabilitását a kagyló pr-S2-höz képest (T<sub>m</sub>= 62°C vs. 51°C) magyarázhatja az a tény, hogy a fej-rúd csuklótól két heptád egységre az előbbiben található egy-egy g-e' és d-e' sóhid. Ugyanakkor a nem-regulált mio2 szekvenciákban már az első heptádban is vannak láncközötti ionpárok. A simaizom S2 sóhid stabilizáló hatását hely-specifikus mutációs kísérleteink is megerősítették. A simaizom S2 nagyobb stabilitását

molekuláris dinamikai szimulációkkal is megerősítettük (40. ábra)<sup>1</sup>. Mi lehet a kagyló pr-S2



40. ábra. Proximális S2 molekuláris dinamikai szimuláció.  
scS2s: kagyló pr-S2, smS2s: simaizom pr-S2

különösen instabil szerkezetének a fiziológiai oka? Talán az a tény, hogy ez az élőlény jóval alacsonyabb hőmérsékleten él [165], mint az emlősök belső hőmérséklete. Alternatív magyarázat lehet, hogy a  $\text{Ca}^{2+}$ -kötésen és a foszforiláción alapuló szabályozás, bár azonos részben azonos mechanizmuson keresztül valósítják meg a kikapcsolt szerkezetet (ld. VI.3.3.), de a fej-rúd csuklóval történő allosztérikus szabályozás különböző dinamikai tulajdonságú cc szerkezetet kíván.

#### Kóda

Egyelőre nem véglegesen eldöntött kérdés, hogy a fej-rúd csuklónak szerkezet nélkülinek kell-e lennie az aktív állapotban [166], avagy az RD  $\alpha$ -hélix folyamatosan megy át a *coiled-coil*  $\alpha$ -hélixbe. Eredményeink alapján a proximális S2 dinamikus hélix  $\leftrightarrow$  *coil* átmenetre képes flexibilis  $\alpha$ -hélix, azaz mindkét elképzelés elemeit magába foglalja. Úgy gondoljuk, hogy a csukló régióra jellemző „finomhangolható” dinamikájú *coiled-coil* a legalkalmasabb szerkezeti elem arra, hogy a különböző funkcionális állapotokban és funkcionális igényű miozinokban a nagyfokú flexibilitás és a motorfunkcióhoz megkívánt hajlékonysági merevség illetve rugalmasság egyaránt megvalósulhasson.

## VI.5. Vizsgálatok az intracelluláris szállítómotor mio5-tel és a DYNLL könnyű láncsal

Az V-ös osztályba tartozó miozin a legtöbbet vizsgált, aktin filamentumok mentén mozgó processzív transzport motor. A fark régió szegmentál *coiled-coil* szerkezetű és a kargó-kötésben szerepet játszó GTD-ben végződik. A három gerinces paralóg közül a mio5a az egyetlen miozin, amely egy fark könnyű láncot is tartalmaz (DYNLL). A DYNLL kötőhelye és szerepét eddig nem volt ismert, ezért kezdtünk a vizsgálatába. A gerinctelenekben a mio5 motorokat sejtbiológiai szempontból sokat tanulmányozták, de az nem volt világos, hogy vajon az emlős mio5a motor processzivitása kiterjeszhető-e pl. a *Drosophila* mio5 ortológára?

<sup>1</sup> Hetényi Cs. eddig nem közölt eredménye (kagyló 1nkn szerkezet alapján készült simaizom S2 energiainimalizált modell, GROMACS programcsomag, explicit víz, GROMOS erőter)

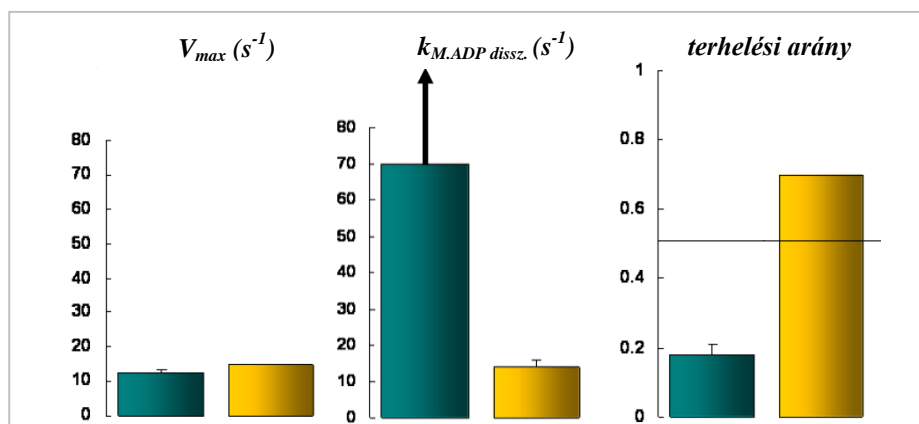
## VI.5.1. A *Drosophila* mio5 nem processzív motorfehérje

### Háttér

A mio5 az aktin filamentumon kézzől-kézre (*hand-over-hand*) mechanizmussal, processzíven halad 36 nm-es lépésekben az aktin filamentum mentén. A processzivitás a két fej feszülés-érzékeny allosztérikus együttműködését kívánja meg (az aktin-kötőhely és a nukleotid-hely itt a két fej között is kommunikál, amit kinetikai „kapuzás”-nak neveznek) [60]. A fenti következtetéseket gerinces mio5 fragmentumokkal végzett kísérletekből szűrték le. Élesztő mio5 paralógokkal végzett indirekt vizsgálatok ugyan utaltak arra, hogy ezek alacsony terhelési aránnyal dolgoznak [167], de eddig a mio5 motorok processzivitás általános tulajdonságnak tűnt. *Drosophila* mio5 fragmentumok *steady-state* és tranziens kinetikai analízistől reméltük azt, hogy az összes mio5 enzimatis tulajdonságaira általánosítható következtetéseket tudunk levonni. „Egyfejű” (S1) és „kétfejű” (HMM) fragmentumait bakulovírus rendszerben expresszáltuk (könnyű láncként *Drosophila* CaM-t és egy citoplazmatikus mio2 könnyű láncot koexpresszáltunk a nehéz láncsal együtt).

### Eredmények [168]<sup>1</sup>

Kísérleteink alapján arra a kissé meglepő eredményre jutottunk, hogy a *Drosophila* mio5 a gerinces mio5 paralógoktól és ortológoktól eltérően nem processzív, azaz csak a mio2-höz hasonlóan, „csoportosan” képes motorként működni. Ennek az az oka, hogy a mechanokémiai ciklus nagyobb részét a miozin fej az aktinról levált állapotban tölti (a „*duty cycle*” ~0,1, míg a processzivitáshoz szükséges érték min. 0,5). A meghatározott kinetikai séma (amely alapvonásaiban nem különbözik a konvencionális ill. a gerinces miozin V kinetikájától, ld. 5. ábra) két elemét érdemes kiemelni, amelyek közösnek tűnnek az összes transzport motor esetén: az erős aktin affinitás, valamint a gyenge termodinamikai kapcsolat az aktin- és ADP-kötés között. A *Drosophila*



41. ábra. *Drosophila* és gerinces (csírke) mio5 kinetikai paraméterek összehasonlítása a processzivitás szempontjából.

Zöld: *Drosophila* mio5; sárga: csírke mio5; a nyíl arra utal, hogy a valós érték ~150  $s^{-1}$ ; a vízszintes vonal a terhelési aránynál a processzivitási küszöböt jelzi.

mio5-nél mért ADP disszociáció sebessége állandó (aktin hiányában) a leggyorsabb (~40  $s^{-1}$ ) az eddig jellemzett miozinok között. Az erős aktin-kötött állapotból történő kilépés (ADP disszociáció) is gyors (~150  $s^{-1}$ ). A kinetikai analízist összefoglalva ki lehet jelenteni, hogy az ATP-áz ciklust

<sup>1</sup> Ez a munka együttműködés eredménye, Tóth Judit doktoranduszom Jim Sellers laboratóriumában (NIH) végezte a kísérleteket. Szerepem az eredmények értelmezésére és részben a cikkírásra szorított.

(*steady-state*-ben) a gyenge-aktin kötött állapotok (M.ATP, M.ADP.P<sub>i</sub>) dominálják, következésképpen a terhelési arány alacsony lesz, a motor nem-processzív (41. ábra). Összehasonlítottunk két *Drosophila* mio5 alternatív *splicing* izoformát, amelyek csak az aktin-kötőhelynél elhelyezkedő hurok-2 régió hosszában (és nettó töltésében) különböznek. Eredményeink megerősítik a más miozinoknál (pl. gerinces simaizom mio2) vizsgált hasonló izoformák közötti különbséget, nevezetesen különbség az aktin-affinitásban (aminek a következménye végső soron valamivel nagyobb motilitási sebesség lesz), de csak kis különbségek az ATP-áz kinetikai paramétereiben. *In vitro* motilitási kísérletben csak nagy felszíni sűrűség esetén volt képes a mio5 HMM mozgatni aktin filamentumokat (0,4 – 0,6 μm/s), ami alátámasztja a „csoportos” motor következtetést. A motor szabályozása szempontjából megjegyzendő, hogy Ca<sup>2+</sup> jelenlétében nem volt mérhető motilitás, a „hattyúnyakhoz” kötött CaM alegységek részleges disszociációja miatt). Felmerült a kérdés, hogy egyáltalán képes-e a *Drosophila* mio5 intracelluláris transzportra? Még nem publikált kísérleteink (*live cell imaging*) azt mutatták, hogy transzfektált sejtekben képes vezikulákat szállítani ez a motorfehérje is. Összehasonlítva a gerinces és a *Drosophila* mio5 kinetikáját, levonhatjuk azt a következtetést, hogy ezek a miozinok az evolúciósan konzervatív transzport motor funkciót legalább kétféle molekuláris mechanizmussal (processzív ill. nem-processzív) is meg tudják oldani.

### Kóda

Elsőnek bizonyítottuk kinetikai és motilitási vizsgálatokkal, hogy mio5 osztályban a processzivitás nem általános tulajdonság, s miozinok funkcióira és a működési mechanizmusokra oly jellemző variabilitás itt is tetten érhető. Ebből a szempontból azóta kiderült, hogy a gerinces mio5c paralóg sem processzív motor [169]. Az élesztő mio5 egyik formája (myo2) nem processzív (egyedi molekuláris tesztben gyengén processzív). Míg a másik izoforma (myo4) egyrészt „egyfejú” monomer, s mint ilyen nem processzív, viszont kisebb csoportban már processzivitást mutatott [170]. Az egyik *Dictyostelium* mio5 paralóg (MyoJ) processzivitását a Mg<sup>2+</sup> koncentráció szabályozza [171]. A processzivitás szerkezeti hátterében egyrészt szerepet tulajdonítottak az aktin-kötő hurok-2 régió pozitív töltéseinek [172], másrészt a kapcsoló-1 hurok mutációjával is, a motorfunkció tönkretétele nélkül, a gerinces mio5a processzivitása megszűnt [173]. A miozinok, köztük a mio5 család processzivitásának vizsgálata további érdekességeket rejthet még.

## VI.5.2. A mio5 fark könnyű lánc (DYNLL) kötőhelyének azonosítása

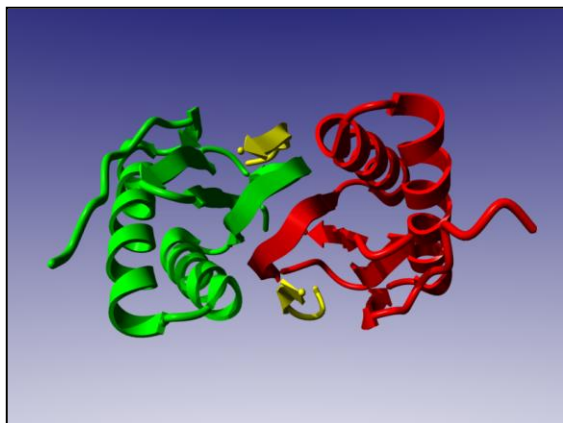
### Háttér

A dinein könnyű láncot (DYNLL<sup>1</sup>), egy 10 kDa-os, igen konzervatív (bármely két ortológ között >90% a hasonlóság) eukarióta fehérjét, nevének megfelelően a dinein motorfehérje alegységeként írták le [174]. Később kiderült, hogy a három emlős paralóg közül a mio5a motorfehérjének is alegysége a DYNLL és a fark régióhoz kötődik [175]. A mio5 fark régió szegmentális *coiled-coil* doméneket tartalmaz, s a kargó-kötő GTD-ben végződik [176]. Egy korábbi összefoglaló munka azt sejtette, hogy a DYNLL a GTD-hez kötődik, s kargó adapter szerepet tölthet be [177]. Az utóbbi feltételezés azon a tényen alapult, hogy számos esetben kolokalizációt figyeltek meg a motorfehérje, valamelyik DYNLL izoforma és egy harmadik, a

<sup>1</sup> Eredeti nevén DLC vagy LC8. A három dinein könnyű lánc osztály egyértelmű elnevezése érdekében kapott új nevet.



feltételezett kargó fehérje között [178]. Később derült fény rá, hogy a mio5a farok alegysége a két gerinces paralóg közül a DYNLL2-es izoforma [179]. Érdekes módon úgy tűnik, hogy *in vivo* a DYNLL1 és DYNLL2, nagyfokú hasonlóságuk ellenére (6 aminosav csere a 89 aminosavból álló láncban), preferáltan a dinein illetve a mio5 motorfehérjékhez kötődik [180]. Fontos kiemelni, hogy a DYNLL-t egyrészt számos más fehérje kötőpartnereként is azonosították (pl. neuronális NO-



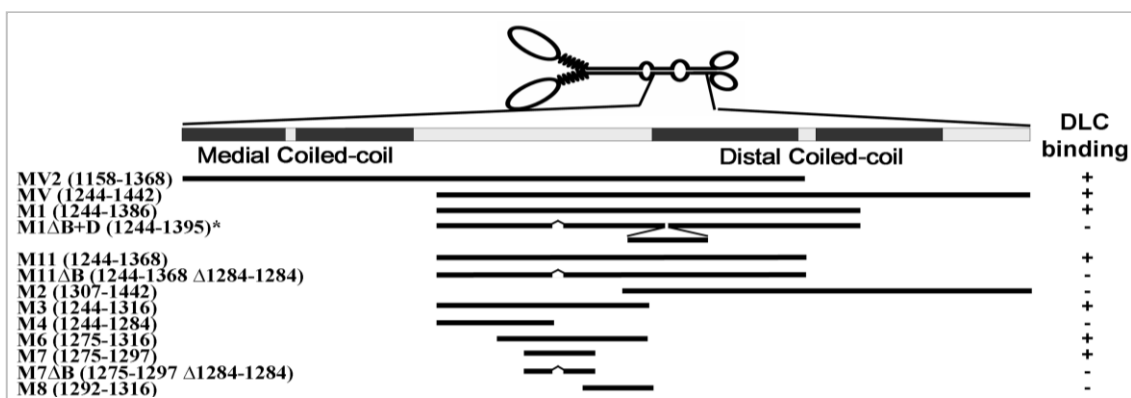
42. ábra. A DYNLL1 és nNOS kötőpeptid szerkezete.

PDB:1cmi; sárga: nNOS kötőpeptid

szintáz enzim [181]), másrészt a DYNLL jó része a citoplazmában szabad formában van jelen [182] (ld. a következő alfejezet). A homodimer DYNLL térszerkezetét ismerjük apo- és egy-két partner kötőpeptiddel alkotott komplex formában is [180, 183, 184]. Az unikális DYNLL-fold (amely a TcTex dinein könnyű láncokra is jellemző) kettős öt-láncú  $\beta$ -lemezből és két-két  $\alpha$ -hélixből áll. A  $\beta$ -lemezekből egy-egy lánc a másik alegységből származik, s ez a kettős  $\beta$ -lemez alkotja a dimer kölcsönható felszínét. A  $\beta$ -lemezek szélén két árok alakul ki, ez a ligandumkötő régió, amihez a partner peptidek antiparallel láncként kötődnek (42. ábra).

A mio5a nehéz lánc génjéről alternatív *splicing*-gal hat, részben szövetspecifikus izoforma íródik át. A melanocita-specifikus forma farok régiójában található alternatív szekvenciához (exon F) kötődő adapter fehérje, a melanofilin segítségével, a Rab27a fehérjén keresztül köti a legjobban ismert kargót, a melanoszómat [24]. A másik két farok alternatív exon (B és D) szerepéről eddig keveset tudunk. A kargó kötésében, a melanocita-specifikus forma esetében is, a globuláris farokdoménnek (GTD) meghatározó szerepe van. Az egyik élesztő mio5 GTD kristályszerkezetét nem rég sikerült meghatározni [185]. A kargók, kargó adapterek listája és a kargókötés mechanizmusa(i)ról szerzett ismereteink még eléggé hiányosak [24].

A DYNLL kötőhelyét akartuk azonosítani, s a kötés molekuláris hatását feltárni. Rekombináns humán mio5a fragmentumokat és a DYNLL2 izoformát expresszáltuk, majd a komplex kialakulását és a DYNLL hatását a mio5 farok régióra „pull-down” módszerrel, gélfiltrációval, natív elektroforézissel, limitált proteolízissel, spektroszkópai és *in silico* módszerekkel, valamint transzfekciós kísérletekkel tanulmányoztuk.

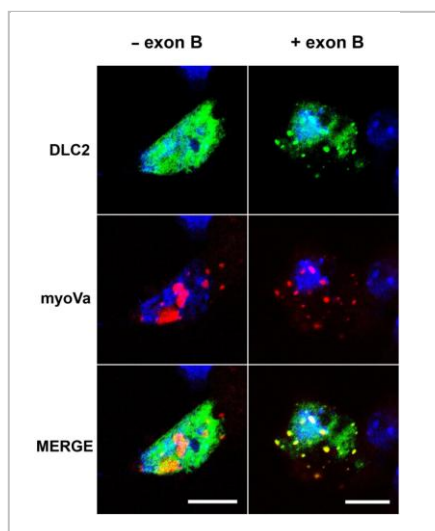


43. ábra. A DYNLL kötőhely azonosítása a mio5a farok doménen belül.

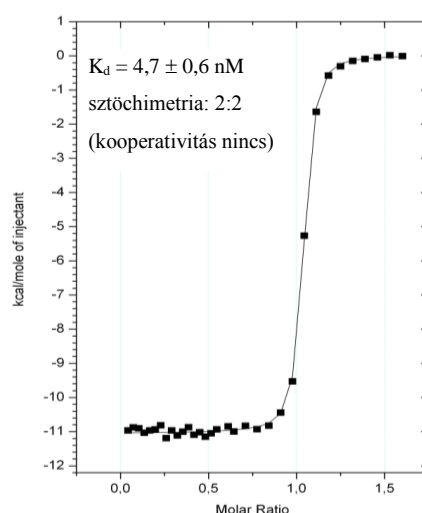
Humán agy-specifikus mio5a izoforma számozás (Uniprot: (Q9Y4I1-2). DLC-kötés mérése „GST pull-down” módszerrel és/vagy gélszűréssel. A farok régió szerkezetét PairCoil és IUPred programokkal jósoltuk; fekete: coiled-coil, világos szürke: rendezetlen régió

## Eredmények

A DYNLL kötőhelyét a fark régió belül a mediális és disztális *coiled-coil* domén között, egy szerkezet nélküli doménben lokalizáltuk (Pro1282-Thr1293) (43. ábra). Megállapítottuk, hogy a kötőhely kialakításában egy 3 aminosavat kódoló alternatív exon (exon-B: Asp1284-Lys1286) esszenciális szerepet tölt be, ugyanis az eltávolítása a kötést megszünteti. Ez utóbbi eredményt ko-transzfektált emlős sejtekkel is igazoltuk (44. ábra). A DYNLL kötés sztöchiometriáját és erősségét többek között ITC módszerrel határoztuk meg ( $K_d = 4,7$  nM, 2:2 sztöchiometria; 45. ábra).

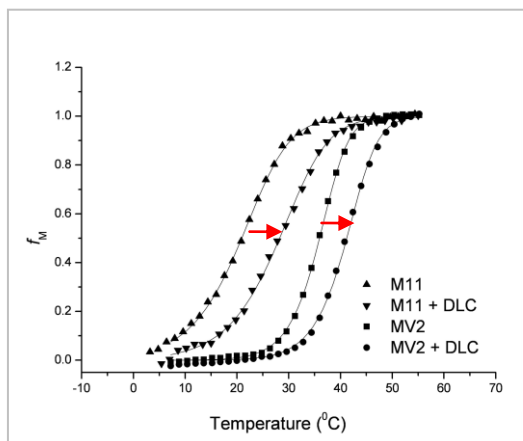


44. ábra *Mio5a* fark és *DYNLI* ko-transzfektáció. NE-4C sejtvonala, GFP-DLC és DsRed-mio5a.



45. ábra. *Mio5a* DYNLL kötésének jellemezése ITC módszerrel

A DYNLL dimer kötése a dimer mio5a fark fragmentumhoz (MV2) nem mutatott kooperativitást. CD-spektroszkópiai és limitált proteolízis vizsgálatok alapján a DYNLL kötés jelentősen hozzájárul

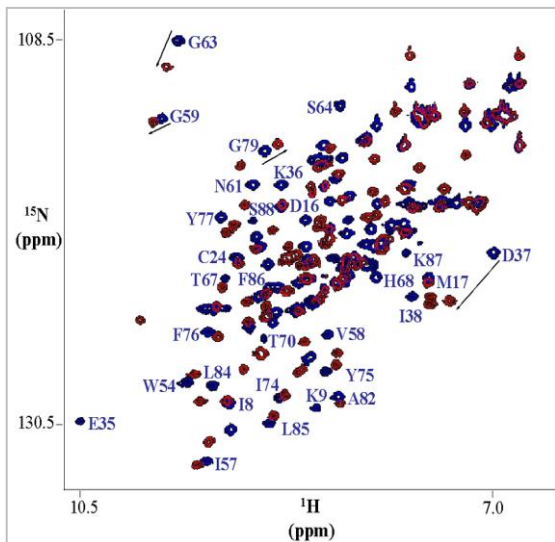


46. ábra. *Mio5a* fark fragmentumok CD-spektrumának hőstabilitása.

A moláris ellipticitás hőprofilja 222 nm-en mérve. Piros nyilak: a DYNLL hatására megnövekedett *coiled-coil* stabilitás. A DYNLL olvadáspontja  $\sim 75^\circ\text{C}$

a mio5a fark stabilitásához. A CD spektrumok analízise alapján valamennyire növekszik kötőrégió  $\alpha$ -hélix tartalma, viszont jelentősen növekszik a határoló *cc* domének hőstabilitása ( $\sim 7^\circ\text{C}$ -kal; 46. ábra). Ezek szerint a DYNLL kötődése elősegíti a két nehéz lánc dimerizációját (azaz a *coiled-coil* kialakulását). A DYNLL kötő domén másik alternatív exonjának (exon D) nincs szerepe a DYNLL kötésben. NMR vizsgálatokkal és molekuláris dokkolással (47. és 48. ábra) kimutattuk, hogy a miozin fark DYNLL-kötő doménjéből egy kb. 8 aminosavból álló szakasz köt a DYNLL dimer kötőárákba, ugyanoda, ahova az eddig ismert partnerei kapcsolódnak. A kötőpeptid szerkezete valószínűleg különbözik az eddig ismert DYNLL-peptid komplexektől. A

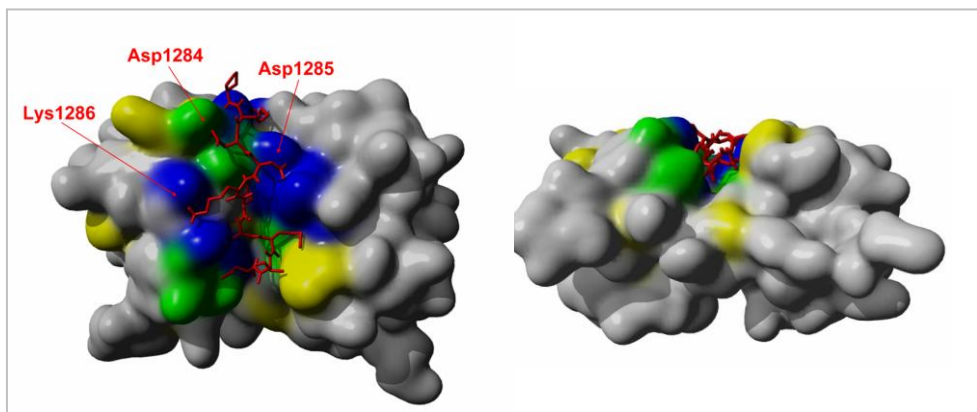
peptidgerinc ugyan nyújtott, de csak az N-terminális régióban (az exon-B kódolta tripeptid) szabályos  $\beta$ -lánc szerkezetű. Az Asp-Asp-Lys oldalláncok specifikus H-híd és ionos kötések alakítanak ki a DYNLL ligandum-kötő árok szélével (49. ábra)



47. ábra. A DYNLL és a mio5a kötőpeptid (Ile1280-Ile1294) HSQC spektruma.

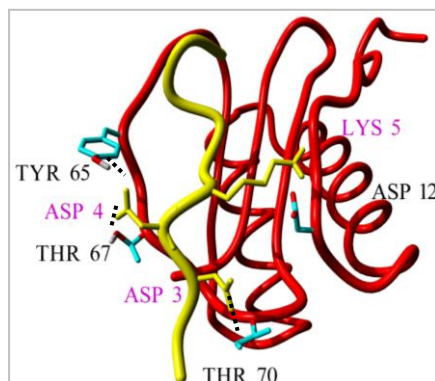
$N^{15}$ -jelölt DLC-t titrálunk jelöletlen peptiddel. Néhány spektrális eltolódás kiemelve (a szabad és komplexben lévő Gly63 spektrális eltolódás alapján

Eredményink alapján nem bizonyítható, sőt kevéssé valószínű, hogy a mio5a DYNLL alegysége kargó adapter szerepet tölt be, mivel szimmetrikusan köt az MHC két láncra a DYNLL két kötőárákába (a szállítandó fehérje kötése elképzelhető volna pl. a két kötőhely közötti negatív kooperativitással, de ilyen jelenséget nem figyeltünk meg). Két partnerfehérje egyidejű jelenléte kompetitív kötődést eredményez. Mi akkor a DYNLL szerepe a miozin működésében? Egy biztos, a DYNLL allosztérikus módon megváltoztatja a mio5a farok régió szerkezetét, stabilizálja a kötőhely mindkét oldalán található cc szegmenseket, „molekuláris ragasztóként” elősegíti a két MHC dimerizációját. Ezzel új kargó-kötő platformot (kötőhelyet) alakíthat ki, de allosztérikusan szabályozhatja a motor aktivitását is (ld. alább).



48. ábra. A miozin Va peptid (piros) -DYNLL dokkolt komplexe.

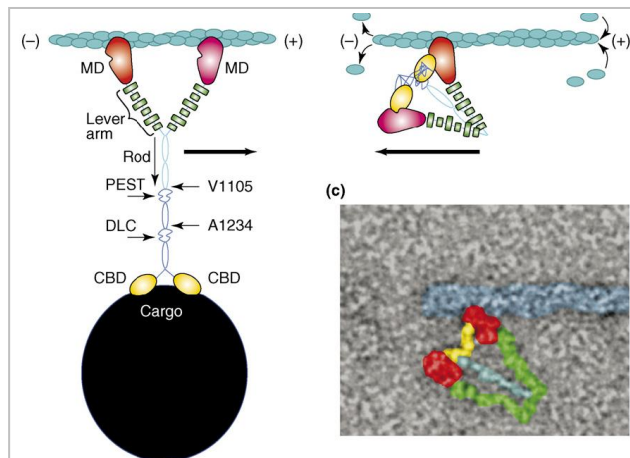
Kék: a kötésben résztvevő aminosavak; sárga: kémiai eltolódás NMR vizsgálatok alapján; zöld: kötőfelszín mindkét módszerrel azonosítva. Az exon B kódolta három aminosav kiemelve. Jobbra a szerkezet 90°-kal elforgatva



49. ábra. Az exon-B tripeptid és a DYNLL közötti kölcsönhatások. Piros lánc, fekete jelölés: DYNLL; sárga lánc, magenta jelölés: mioVa

## Kóda

A mi vizsgálatainkkal párhuzamosan egy másik csoport azonos eredményeket ért el a DYNLL-kötőhely azonosítása és a kötés kiváltotta hatást tekintve [186]. A DYNLL kötés hasonló szerepe játszik a dinein nehéz láncnál is, azaz dimer stabilizáló szerepe van [187]. A *Drosophila* bicoid mRNS szállításban szerepet játszó Swallow fehérje *coiled-coil* dimerizációját is elősegíti a DYNLL kötődése [188]. Bizonyíték egyelőre arra nézve nincs, hogy a mio5a farokhoz kötődő DYNLL szerepet játszik a neuronális mio5a izomotor működésében és szabályozásában. A reguláció legvalószínűbb mechanizmusa, hogy a mio5 „kikapcsolt” állapota a GTD és a fejek kölcsönhatása révén, allosztérikus módon jön létre [189] (50. ábra). Mivel a GTD visszahajlásával a DYNLL-t kötő farokdomén is a fejek (vagy a nyak) közelébe kerülhet, s ezáltal a DYNLL jelenléte és/vagy a stabilabb határoló *cc* domének befolyásolhatják a GTD-fej kapcsolódást és a motor működését. A motor bekapcsolása a GTD kargókötésén keresztül valósulhat meg, amennyiben a kargó és a fej vetélkednek a GTD kötésben [78, 82, 189]. Amennyiben a feltételezésünk igaz, s a DYNLL jelenlétében stabilizálódott mediális és disztális *cc* domén interakciós-platformként is szolgálhat, az ide kötődő kargó fehérje is aktiválhatja a transzport motort. Ebből a szempontból érdemes megjegyezni, hogy a Rab10 adapter G-protein az exon-D kódolta régióhoz kötve szabályozhatja a mio5a és mio5b motort [190]. Az itt említett allosztérikus szabályozás, azaz a GTD „távhatása” a MD működésére, úgy tűnik, hogy széleskörűen elterjedt mechanizmus lehet a motoroknál, mivel így szabályozódhat a mio6 [191] és a kinzin-1 motor is [192]. Végül azt is érdemes kiemelni, hogy intrinszik szerkezet nélküli domének is jelentős szerepet játszhatnak az motor-kargó kapcsolat kialakításában – a melanofilin mio5a-hoz kötődő motívuma is szerkezet nélküli régióban lokalizálható [193].



50. ábra. A mio5 motor aktív és inaktív szerkezete (Taylor, COCB 2007); CBD = GTD; c: EM képrekonstrukció

### VI.5.3. A LC8 könnyű lánc (DYNLL) egy eukarióta csomóponti fehérje („hub protein”)

#### Háttér

Az LC8 könnyű láncról kiderült, hogy a két motorfehérjén kívül több tucat (>60) fehérjéhez kötődik<sup>1</sup>. Néhány részletesebben jellemzett példa: neuronális NO-szintáz enzim<sup>2</sup>, Bim és Bmf „BH-

<sup>1</sup> Többségüket nagy átteresztőképességű módszerrel, pl. élesztő két-hibrid módszer fedezték fel.

<sup>2</sup> A DLC-től függetlenül fedezték fel és nevezték el PIN-nek („protein inhibitor of nNOS”).

3-only” proapoptózis fehérjék, GKAP és gefirin posztzinaptikus denzitás fehérjék, I $\kappa$ B $\alpha$  (NF $\kappa$ B inhibitor), p53 binding protein 1, p21-aktivált kináz-1, Swallow és Egalitarian *Drosophila* fehérjék, transzkripciósi faktorok, mint a TRPS1, NRF-1, ösztrogén receptor- $\alpha$ , számos vírus burokfehérje (P protein, p54), a nukleáris transzport komplex protein Nup159. Ezek közül, mint már említettem, több fehérjét együtt lokalizáltak vagy a dinein vagy a mio5 motorral, innen eredt a kargó adapter hipotézis (amely az előző alfejezetben bemutatott kísérletek alapján kevésbé valószínű). Az bizonyos, hogy a motoroktól független szerepe is van a DYNLL fehérjéknek. Ezt bizonyítja az a tény is, hogy a dinein és mio5 motorral nem rendelkező növényekben is jelen vannak DYNLL ortológok [194]. Mi lehet a közös tulajdonság a sokféle funkciót betöltő DYNLL kötőpartnerben? A választ a DYNLL-hez kötődő fehérjék szekvencia-analízisétől vártuk.

Hálózatelméleti szempontból az interaktom (a fehérje-fehérje interakciós hálózatok) skála-független, nagy konnektivitású, robusztus rendszerek. Az ilyen rendszerekben a sok partnerhez kapcsolódó fehérjéket csomóponti („hub”) protein elnevezéssel illetik, s kiemelt szerepet tulajdonítanak nekik [195, 196]. A nagyszámú interakciós partner alapján a DYNLL-t csomóponti fehérjének tekinthetjük.

### *Eredmények [197, 198]<sup>1</sup>*

A DYNLL-mio5a komplex vizsgálatokból kiindulva a DYNLL kölcsönható partnereit egyrészt rendezetlenséget jósoló, másrészt *cc* szerkezet jósoló programokkal analizáltuk. Első lépésben irodalmi adatokra alapozott DYNLL kötőpartnereket gyűjtöttük össze (62), ehhez kapcsoltuk hozzá az interaktom adatbázisokban fellelt további potenciális partnereket (~200). Az előbbi kategóriába a kötődés tényét több független módszerrel bizonyított partnerfehérjék kerültek, ezeket egészítettük ki a második csoport azon fehérjével, amelyekben az első kategóriára összeállított konszenzus szekvenciának (ld. alább) megfelelő kötőmotívumot jósoltunk. Így összesen 85 szekvencia került az adatbázisunka. A rendezetlenség predikciót két módszerrel is megvizsgáltuk (IUPred és PONDR VSL2). Mindkét módszerrel azt kaptuk, hogy a DYNLL-kötő régió a vizsgált partnerek többségében rendezetlen régióban található. A predikciós módszerek viszont olykor nem mutatják ki a tényleges rendezetlen fehérjéket, szakaszokat, jóllehet, bizonyos esetekben ez már bizonyított (például ER $\alpha$ ). Saját kísérleti eredményeink igazolják a fenti jóslatot a mio5-ön kívül a Bmf, nNOS és PAK1 esetében is. Elmondható tehát, hogy a kötőpartnerek vagy rendezetlen fehérjék, vagy a DYNLL-kötő régiójuk rendezetlen doménbe, esetleg rendezett domén szerkezet nélküli régiójába esik. A legalább két módszerrel igazolt fehérjékre vonatkozó eredményeket az V. táblázat foglalja össze (az 51. ábrán néhány fehérjét grafikusán ábrázoltunk).

Megvizsgáltuk a rendezetlenség mellett a kötőpartnerek *coiled coil*-képző tulajdonságát is (V. táblázat). Az összes, 85 vizsgált szekvencia közel felében, 38 szekvenciában jósoltunk a COILS program segítségével *cc* régiókat (összesen 92-t). A prediktált *cc* régiók a szekvenciák közel felében 200, míg majdnem 80%-ában 300 aminosav-pozíciónál nem távolabb helyezkednek el a kötőregiótól. Fontos megjegyezni, hogy a vizsgált fehérjék átlagos hossza kb. 1000 aminosav volt. A kötőregiók lokális szerkezetét PHD és GOR másodlagos szerkezet predikciós programokkal vizsgáltuk. Arra voltunk kíváncsiak, hogy a rendezetlen szakaszokban, amelyek a kötőregiók tágabb környezetét jellemzik (rendezetlen fehérje, vagy rendezetlen domén) vajon a DYNLL-t közvetlenül kötő kb. 10 aminosav hosszúságú motívum lokálisan mutat-e hajlandóságot valamilyen másodlagos

---

<sup>1</sup> Köszönöm Tompa Péter szakmai támogatását. Az analízisek egy részét Szenes Áron doktorandusz végezte. A teljes publikáció megírás alatt áll.



szerkezeti típus kialakítására. Az eddig vizsgált molekuláris felismerő elemekhez (MoRFs, [199]) képest jóval nagyobb arányban jósoltunk rendezetlen illetve  $\beta$ -struktúrájú szakaszokat (52. ábra).

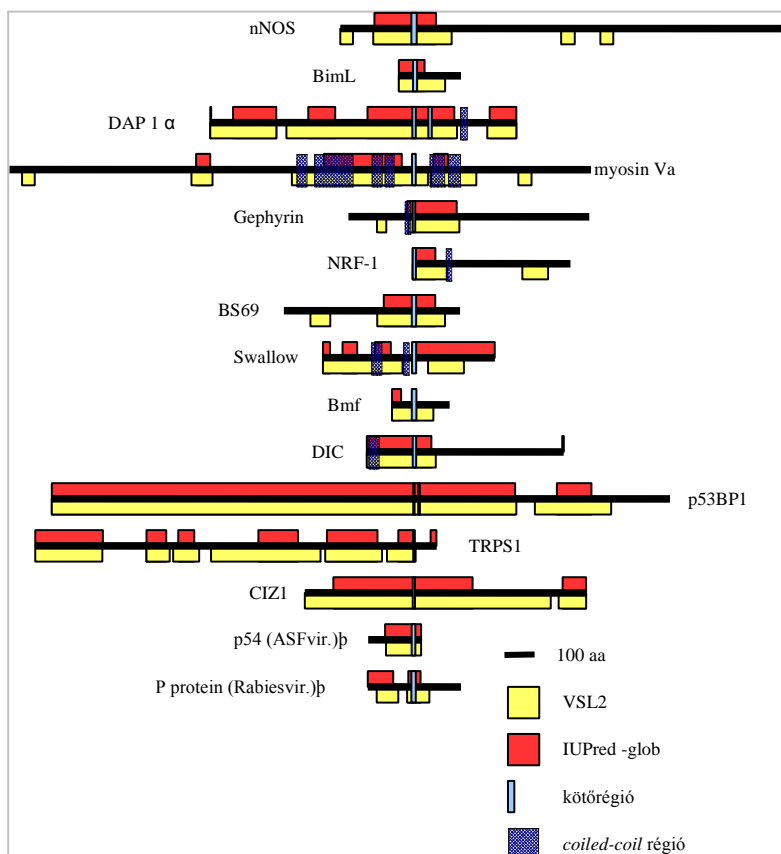
## V. Táblázat<sup>1</sup>

Uniprot ID	DYNLL partner	hossz	kötőhely	rendezetlen régió		megj.	cc
				IUPred	VSL2		
O14490	GKAP (DAP1 $\alpha$ ) Dlgap1	977	653-657 672-683	502-779	243-787	*	1
O43521	BimL (BimEL)	198	47-60	1-82	1-147	**	
O75363	AIBC1 (BCAS1)	584	565-584	1-584	1-584	*	
O88485	DIC (DYNI1) (mouse)	628	151-185	1-206	1-222	**	2*
P03372	ER $\alpha$ (ESR1)	595	1-180			**	
P12759	RSP3	516	30-35 61-68 116-121	1-145	1-147	*	3
P15198	P protein (rabiesv.)	297	139-153	130-196	126-197	*	
P29476	nNOS	1429	227-244	109-305	105-355	***	
P40688	Swallow (Dros.)	548	284-297	296-548	283-297	**	2*
P92030	Egalitarian	993	947-60		780-993	*	
Q03555	Gephyrin	768	205-213	187-345	192-354	*	1
Q109L4	Gag (sirevirus)	2112	467-477		457-585	*	2
Q12888	p53BP1	1972	1153-57	1-1478	1-1484	*	
Q13153	PAK1	545	200 - 240	1-267	107-282	***	
Q16656	NRF-1	503	1-10	1-72	1-111	*	1
Q3ZB98	PMES-2 (BCAS1)	555	615-634	1-555	18-555	*	
Q61751	Kid-1	572	92-103				
Q81X03	KIBRA	1113	279-285				
Q8IV61	RasGRP3	690	610-20	592-690	545-690	*	
Q8TD19	Nek9	979	940-953	925-979	735-979	*	1
Q96LC9	Bmf	184	63-78		1-132	**	
Q9ULV3	CIZ1	898	344-350	92-536	1-786	*	2
Q9Y4I1	miozin Va	1855	1282-1294	1279-1287	901-1335	***	6*
043313	ASCIZ <sup>2</sup>	823	410-416 669-675 737-743 762-768	731-760		*	

<sup>1</sup> \*: DYNLL kötőpeptid ID régióban; \*\*: kísérletesen igazolt ID; \*\*\*: kísérletesen igazolt ID, saját eredmény; cc: prediktált coiled-coil régiók száma; cc\*: kísérletesen igazolt cc

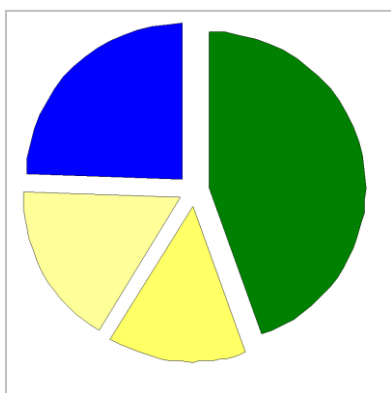
<sup>2</sup> Általunk azonosított, még nem publikált új kötőpartner (kollaboráció I. Rodriguez-Crespo-val, Madrid, Spain)



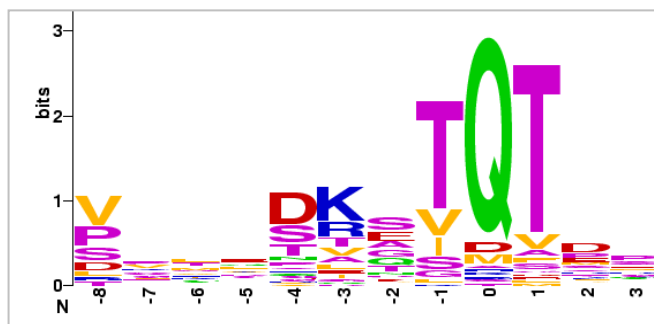


51. ábra. Néhány DYNLL kötőpartner szekvencia analízise. Rendetlenség (VSL2 és IUPred) és coiled-coil (COIL) predikció

Összességében elmondható, hogy a DYNLL kötő motívumok a kötés helyén hajlamosak  $\beta$ -szerkezetet kialakítani, a kötőmotívum egy  $\beta$ -MoRF. Ez a megállapítás egybecseng az eddig vizsgált DYNLL-kötőpeptid szerkezetekkel, amelyek mindegyike  $\beta$ -lánc szerkezetet mutatott, az egy mio5 kötőpeptid kivételével (ld. VI.5.2.). Az általunk összegyűjtött kötőpeptid szekvenciák logó ábrázolása (53. ábra) egyrészt azt mutatja, hogy a DYNLL ligandum kötéshelye eléggé promiszkuus természetű, másrészt magyarázatot adhat a mio5 szerkezet nem-kanonikus voltára is (a közel invariáns Gln helyett Met).



52. ábra. A DYNLL kötő lineáris motívumok prediktált másodlagos szerkezete  
kék:  $\alpha$ -hélix, zöld:  $\beta$ -lánc; sárga: coil és turn



53. ábra. DYNLL kötőmotívumok logo-ábrázolása.

## Kóda

A többségében esszenciális funkciójú csomóponti fehérjéket alapvetően két csoportra osztják: „*date hub*” és „*party hub*”. Az előbbieknek inkább proteom szervező szerepe van, biológiai modulokat kapcsol össze (időben és térben szeparáltan), míg az utóbbi kategóriába tartozó fehérjék egy-egy modulon belül töltenek be organizáló szerepet (szimultán kötődve a partnerekhez) [196]. A DYNLL mindkét csoportba beleillik. A heterogén funkciókat betöltő kapcsolatrendszerük alapján, ha igaz lenne a motor kargó adapter funkciójuk, akkor inkább a *date hub*, míg a fehérje komplex organizáló (és feltehetően szimultán kötődő) tulajdonságuk alapján inkább *party hub* kategóriába tartozhatnak. A DYNLL esszenciális voltát korábban *Drosophila*-ban bizonyították [200], míg saját, eddig nem közölt eredményink ugyanezt igazolják *C. elegans*-ban<sup>1</sup>. A *Dlc-1* gént RNS-interferenciával csendesítve embrionális letalitást, illetve a túlélő egyedekben pleiotróp fenotípust tapasztaltunk.

Összefoglalva a DYNLL szerepéről eddig kialakult képet, azt mondhatjuk, hogy egy olyan ubiquiter eukarióta *hub* protein, amely a partnereiben chaperon-szerű hatással („molekuláris ragasztóként”) kötődve dimerizációt és/vagy fehérjekomplexek kialakulását segíti elő és/vagy szabályozza a kölcsönható partnert. A DYNLL kötőmotívum szinte kizárólag intrinszik szerkezet nélküli fehérjékhez (IDP) illetve rendezetlen fehérjerégiókban lokalizálható, valamint számos esetben a komplex kialakulása a kötőpartnerekben allosztérikus módon („távhatással”) dimerizációt okozó *coiled-coil* domének stabilizálásához vezet. Ugyanerre a konklúzióra jutott (már a mi előzetes munkánk publikálása után) egy amerikai kutató is [201]. A kötőpartner(ek) illetve a *hub* protein rendezetlenség egyértelműen kedvező tulajdonság a fehérje interakciós hálózatok, szabályozási hálózatok, protein gépezetek kialakulása és hatékonysága szempontjából [195, 202, 203]. A szerkezet nélküli csomóponti fehérjék gyakoribbak, de van több példa a fordított esetre is (pl. CaM, 14-3-3 proteinek). Az utóbbi családhoz csatlakoznak mostantól a DYNLL fehérjék is. Végezetül megjegyzem, hogy több szerző felvetett a DYNLL esetleges terápiás célfehérjeként történő felhasználását jövőbeni gyógyszerfejlesztések terén, mivel például több ráktípusnál is emelkedett DYNLL szintet tapasztaltak [204].

A DYNLL fehérjékkel kapcsolatos kísérleteinket tovább folytattuk/folytatjuk. Összehasonlítottuk részletesen a DYNLL1 és -2 ligandum kötését, jellemeztük a dimer partnerek kötésének aviditását (a monomer partnerhez képest egy dimer  $\sim 10^2$ - $10^3$  kisebb makroszkopikus  $K_d$ -vel kötődik), leírtunk egy, a dimer  $\rightarrow$  monomer egyensúly megváltoztatásán alapuló foszforilációs szabályozó mechanizmust (tőlünk függetlenül mások is hasonló eredményt publikáltak: [205]), valamint további, elsősorban NMR dinamikai vizsgálatokat folytattunk a mio5 szerkezet nélküli doménnel és a DYNLL komplexszel. Ezeket az eredményeket konferenciákon már bemutattuk [206, 207], s a közeljövőben fogjuk publikálni. A DYNLL kötőmotívum természetét, optimális voltát *in vitro* evolúciós módszerrel (fág-bemutató) is elkezdjük tanulmányozni<sup>2</sup>.

---

<sup>1</sup> Vellai Tibort (ELTE, Genetikai Tanszék) csoportjával együttműködésben

<sup>2</sup> Együttműködés Pál Gáborral (ELTE, Biokémiai Tanszék)

## VI.6. Vizsgálatok miozin-VI-tal: a magányos töltött $\alpha$ -hélixek felfedezése.

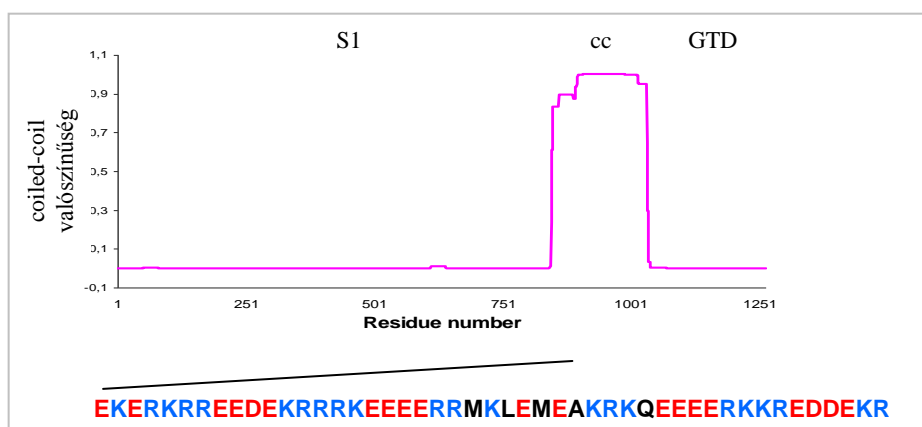
### VI.6.1. A mio6 *coiled-coil* szerkezetűnek jóslott farok doménje egyszálú $\alpha$ -hélixet alkot

#### Háttér

Az irodalmi bevezetőben már említettem, hogy a „hátrameneti” motor mio6-tal korábban végzett *in vitro* kísérleteket mesterségesen dimerizált (pl. mio2 S2-vel) HMM-mel végezték [208], ami a feltétele a processzív motor funkciónak, viszont a natív mio6-ot csak monomer formában sikerült izolálni [28]. A mio6 farok tartalmaz *coiled-coil*-nak jóslott régiót, de eddig nem vizsgálták, hogy valójában képes-e ez a szekvencia dimert képezni. Az ellentmondás feloldására rekombináns mio6 fragmentumokkal szerkezeti vizsgálatokat kezdtünk.

#### Eredmények [209, 210]

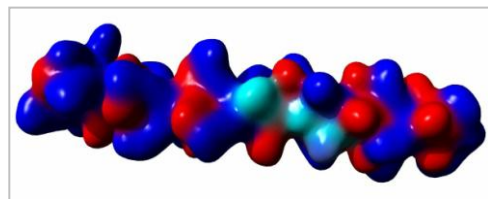
A mio6 MHC farok régió szekvenciája, bármelyik jósló programot használjuk (COIL, PairCoil, PCOIL, Marcoil), úgy tűnik, hogy a 850-1030 közti aminosav régióban *coiled-coil* szerkezetű (54. ábra). A farok régiót három szubdoménre osztottuk, mivel a mediális régió



54. ábra. Mio6 MHC szekvencia jóslás COIL programmal és a farok mediális régió (S2) szekvenciája.  
cc: coiled-coil-nak prediktált domén

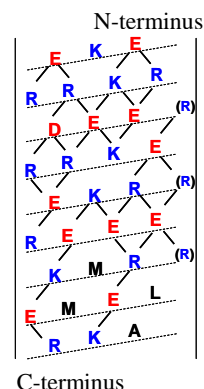
meglepően magas töltéssűrűséget mutat (86%). Erről a szekvenciáról nehéz elképzelni, hogy paralel dimer coiled-coil szerkezetet tud kialakítani.

A kémiai keresztkötés és CD spektroszkópiai eredményeink is azt mutatták, hogy a mio6 farok régió szubdoménjei sem külön-külön, sem együttesen nem képeznek dimert, kivéve, ha Leucipzárral stabilizáljuk őket (kiméraként, hasonlóképpen a proximális S2 konstrukcióinkhoz) (ld. 57. ábra). A cc2-nek elnevezett konstrukció (Glu916-Arg981) ennek ellenére tipikus  $\alpha$ -helikális CD spektrumot mutatott. A spektrum hőmérsékletfüggése nem mutat kooperativitást, ellentétben a *coiled-coil* szerkezetek jelentős kooperativitást mutató letekeredésével (ld. VI.6.2. és 56. ábra). Eredményeink azt mutatják, hogy a mio6 mediális farok régió a hármas-négyes ismétlődéseket mutató ellentétes töltések között kialakuló, só-hidakkal stabilizált egyszálú  $\alpha$ -hélixet konformációt vesz fel fiziológias körülmények között (55. ábra). Az eredményeket molekuláris dinamikai szimulációkkal és modellezéssel is megerősítettük.



55. ábra. A cc2 szubdomén *in silico* modellje (b) és hélix-háló ábrázolása.

Piros: – töltés, kék: + töltés. A hélix-háló folyamatos vonalai potenciális sóhidakat jelölnek



### Kóda

A *cc* predikációs programok kidolgozói korábban is lejezték, hogy a nagy töltéssűrűségű szekvenciák (különösen a *cc* heptádok "a" és „d” pozícióiban) általában fals pozitív eredményeket jeleznek [211], de az irodalomban ennek ellenére sokáig tartotta magát az a hamis kép, hogy a mio6 farok *cc* dimert alkot. A mi munkánk már folyt, amikor megjelent egy közlemény a mio10 farok régiójában szintén *cc*-nak prediktált ~30 tagú peptidről, amelyet a szerzők szintén stabil, egyszálú  $\alpha$ -hélikális szerkezetűnek találtak [212]. Ha nem a farok *cc* szerkezet, akkor mi dimerizálja a mio6-ot, ha egyáltalán képes dimert motorként működni? A közelmúltban Spudich és mtsi elegáns kísérletekkel mutatták ki, hogy a mio6 a GTD-n keresztül képez dimert, illetve monomer formában a GTD képes a fejekhez kapcsolódni (a mio5-höz hasonlóan) és a motort kikapcsolt állapotba hozni. Ugyanez a munka a mediális farok szubdoménról hozzánk hasonlóan bizonyította, hogy stabil egyszálú  $\alpha$ -hélixet alkot [191].

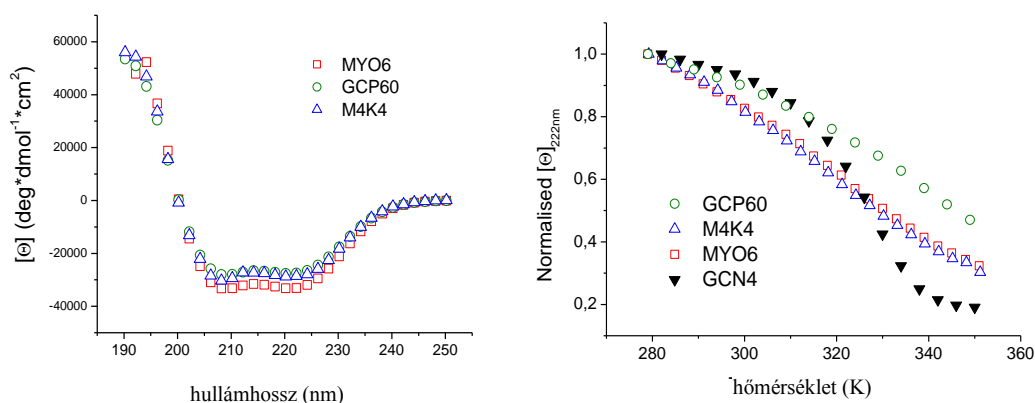
## VI.6.2. A magányos töltött $\alpha$ -hélix (CSAH) egy eddig fel nem ismert fehérje szerkezeti motívum

### Háttér

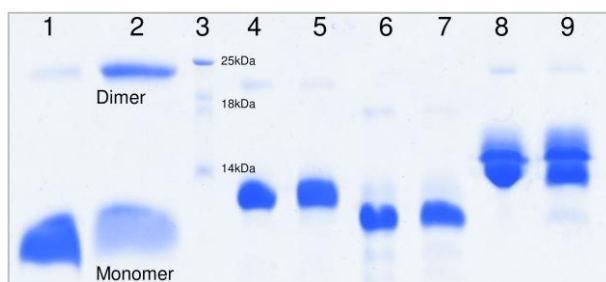
Korábban általánosan elterjedt volt az a nézet, miszerint az  $\alpha$ -hélix csak a fehérjék harmadlagos szerkezetének védelmében lehet stabil, hiszen a szerkezet fenntartását biztosító, karbonil oxigén, és amid nitrogén közti hidrogén-híd a környező vízmolekulák támadásának nem képes ellenállni. A nyolcvanas években bizonyították, hogy egyes szintetikus peptidok képesek vizes oldatban is stabil egyszálú  $\alpha$ -hélix kialakítására [213, 214]. Ezek  $\alpha$ -hélixek jellegzetes aminosav mintázatot mutattak, ahol ellentétesen töltött oldalláncok helyezkedtek el négy aminosav távolságra, így az  $\alpha$ -hélix menetemelkedése során egymás fölé kerülve a köztük kialakuló sóhidak stabilizálhatták a szerkezetet. A kilencvenes években egy aktív fehérje, a kaldezmón centrális, szakaszáról derült ki, hogy magányos  $\alpha$ -hélixet képez [215, 216]. Fentebb bemutattam, hogy ugyanilyen egyszálú nagy töltéssűrűséggel bíró  $\alpha$ -hélix motívum (CSAH) található a mio6 (valamint a mio10) farok régiójában. Felvetődött, hogy hasonló töltésmintázatot követő szekvenciák előfordulnak-e más fehérjékben is?

## Eredmények [217]

Kettő, alapjaiban különböző predikciós programot készítettünk. Az egyik program a szekvencia mentén összegzi a CSAH szerkezetekre jellemző stabilizáló és destabilizáló hatásokat (az ellentétesen/azonosan töltött aminosavak számát és egymástól való távolságát, az ionpár csoportok kooperatív hatását, a hélix dipólmomentumának stabilizálása okán a kialakuló sóhidak relatív orientációját, a nem töltött oldalláncok számát és helyét). A másik program a töltött aminosav mintázatok periodicitásán alapul. A pozitív és negatív aminosavak elhelyezkedéséből egy töltés korrelációs függvényt számol, majd ennek a függvénynek a Fourier transzformáltja árulkodik arról, hogy a szekvenciában megtalálható-e a CSAH motívumokra jellemző 8 aminosav. A mio6 és mio10, valamint a kaldezmon mellett további 140 fehérjében talált mindkét program CSAH motívumot. A jóslatok kísérletes alátámasztására további két fehérje (Golgi protein GCP60 és MAP-kináz M4K4) magányos  $\alpha$ -hélixnek jóslt régióját klónoztuk, expresszáltuk, majd CD spektroszkópiai módszerekkel vizsgáltuk a kialakuló másodlagos szerkezetet és annak stabilitását (56. ábra). Magas  $\alpha$ -hélix tartalmat mértünk ezeknél is, amely a hőmérséklet növelés hatására, a cc szerkezettel ellentétben nem kooperatív módon denaturálódott, de még 80°C-on is ~30% hélix



**56. ábra. CSAH szekvenciák CD-spektruma (b) és hőstabilitása (j).**  
A 222 nm-en mért moláris ellipticitás változása a hőmérséklet függvényében.  
Mio6, GCP60, M4K4: monomerek, GCN4: coiled-coil dimer



**57. ábra. CSAH motívumok és egy coiled-coil fragmentum keresztükötése.**  
keresztükötő: amino specifikus DPM; 1,2: szívizom pr-S2; 4,5 mio6; 6,7: M4K4; 8,9: GCP60; 0' és 60' keresztükötési idő

tartalommal bírt. A CSAH motívumok monomer voltát kémiai keresztükötési kísérletek is megerősítették (57. ábra).

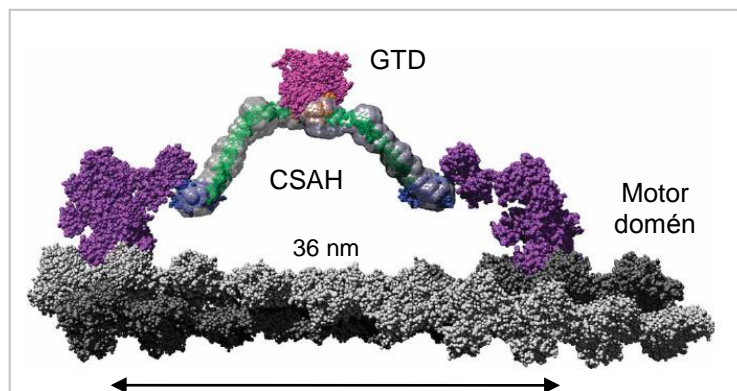
A CSAH motívumot tartalmazó fehérjék között a sejt működésének szinte minden fontosabb aspektusa képviselve van, a metabolikus enzimektől, motorfehérjéken át transzlációs iniciációs





### Kóda

A CSAH általános fehérje szerkezeti motívum szerepét tőlünk függetlenül egy amerikai csoport is felismerte [218]. A CSAH motívum funkciójáról csak néhány esetben van kísérletes adatunk. A mio10 és mio6 esetében bizonyított, hogy meg tudja hosszabbítani a motor lépéshosszát az erőkar meghosszabbításán keresztül [191, 212] (60. ábra). A kaldezmon és néhány további fehérje esetében azt valószínűsíthetjük, hogy a CSAH szegmens két domén közé ékelődve mintegy távtartó szerepet tölt be. A CSAH motívumok *in silico* és *in vitro* vizsgálatát tovább folytatjuk. Legújabb molekuláris dinamikai szimulációs kísérleteink meglepő módon az sejtetik, hogy a CSAH motívum flexibilitását illetve merevségét az Arg és Lys oldalláncok befolyásolják (még hozzá az nagyobb Lys/Glu vagy Asp aránnyal rendelkező CSAH motívumok a merevebb szerkezetűek) [219]. A magányos nagy töltéssűrűségű  $\alpha$ -hélix, a CSAH motívum tehát csatlakozott a kétszálú  $\alpha$ -hélix *coiled-coil*-hoz, s együtt alkotják a fehérjék világának talán két legegyszerűbb, de változatos szereppel bíró szerkezeti elemét.



**60. ábra.** Mio6 CSAH motívum erőkar meghosszabbító szerepe.  
A mio6 motor lépéshossza 36 nm, bár csak 1 IQ-t tartalmaz.  
(Spink et al Nat. Struct.Mol.Biol., 2008 nyomán)

## VII. AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

### Molekuláris biológiai vizsgálatok

- 1. Kimutattuk, hogy az izom miozin izoformák diverzitása a puhatestűekben (az ízeltlábúakhoz hasonlóan, s ellentétben a gerincesekkel) alternatív *splicing*-gal valósul meg.** Az izom miozinokat kódoló egyetlen, 30 exonból álló MHC négy vagy öt specifikus alternatív exon íródik át kölcsönösen kizáródó alapon a harántcsíkos adduktor izomban, illetve az összes simaizom típusú izomban (többek között a kagylóhéjak összetartásáért felelős záróizomban is). Az MD-ben található három alternatív exon kódolta szekvencia közül az ATP-kötőhelynél elhelyezkedő flexibilis felszíni hurok felelős elsősorban a kétféle izom miozin eltérő ATP-áz aktivitásáért. A *coiled-coil* rúdban található alternatív flexibilis csukló szekvenciának szerepe lehet az izom specifikus vastag filamentumok kialakításában. A C-terminális nem-helikális farok vég hosszabb a záróizomban és szerepe lehet a *catch* kontrakcióban.
- 2. Azonosítottunk egy, a kagylóizom MHC génen belüli alternatív transzkripciós egységről kifejeződő „fejnélküli” miozin fehérjét, a catchint.** A kb. 120 kDa méretű catchin nagy mennyiségben expresszálódik a *catch* típusú puhatestű izmokban. A 120-150 aminosav hosszú egyedi N-terminális domént (amelyet egy MHC intron kódol) az MHC-val megegyező ~800 aminosav követi. Az N- és C-terminális szerkezet nélküli doménekben azonosítottunk egy-egy endogén protein-kináz által foszforilálódó peptidet. A catchin a vastag filamentum komponense, rúd-alakú *coiled-coil* dimert képez. Szerepet játszhat a *catch* kontrakcióban és/vagy a speciális szerkezetű záróizom vastag filamentumok kialakulásában.
- 3. Klónoztuk a *Physarum* plazmódiumos nyálkagomba gyors citoplazma áramlásáért felelős miozin-II MHC génjét.** A 6,5 kbp méretű cDNS 2148 aminosavat kódol. Megállapítottuk, hogy a szekvencia a *Dictyostelium* sejtes nyálkagomba MHC-val közeli rokonságot mutat (46% azonosság), ami tény alátámasztja a *Mycetozoa* törzs monofiletikus eredetét.

### Miozin-II motor domén: szerkezet-funkció és szerkezeti biológiai vizsgálatok

- 4. Mutáns *Dictyostelium* MD konstrukciók segítségével bizonyítottuk, hogy a vázizom miozinból régóta ismert reaktív Lys oldallánc érzékeny konformációs szenzorként jelzi az erőkar pozícióját ebben a miozin-II ortológban is.** Kiderült az is, hogy a Lys84 nagyfokú reaktivitás nem csak az Arg704-gyel kialakított kölcsönhatásból ered.
- 5. A Lys84 és Arg704 mutációs vizsgálatai alapján rámutattunk, hogy az a miozin fejek egy allosztérikus útvonala mentén elhelyezkedő két oldallánc kölcsönhatása befolyásolja a motor erőkarjának felhúzott (pre-munkaütem) és lecsapott (poszt-rigor) állapota közti egyensúlyt, s ezáltal hozzájárul a miozin ATP-áz aktivitás finomhangolásához.** A taszító kölcsönhatás megváltoztatása a kölcsönhatás vonzó jellegének erősödésével stabilizálja a lecsapott konformációt. A konformációs egyensúly ilyen irányú megváltoztatása a csak felhúzott állapotban megtörténő ATP-hidrolízis lassulását, illetve a csak a lecsapott erőkar állapotban bekövetkező foszfát-ion felszabadulás gyorsulását eredményezi.

6. **Meghatároztuk a miozin-II fejek (S1) ún. rigor-szerű állapotának térszerkezetét, amely ez idáig „hiányzó láncszem” volt a kemomechanikai energiaátalakítás molekuláris mechanizmusának megértésében.** A nukleotid hiányában és aktin nélkül kristályosított miozin fejek (amelyeket egy kalmár tölcser retraktor, valamint fésűskagyló harántcsíktolt és záró adduktor izom miozinokból limitált proteolízissel állítottunk elő) szerkezetében az erős aktin-kötött (rigor) állapotra jellemző szerkezeti tulajdonságok a nukleotid kötőhelyénél található kapcsoló-1 hurok nyitott (nukleotid-kötő zsebtől távoli), és az aktin-árok teljesen zárt állapota. Az utóbbi tulajdonságot aktin-kötés kinetikai vizsgálatok is megerősítették. A szerkezetek rávilágítottak a kapcsoló-1 és az aktin-árok allosztérikus viszonyának több részletére. A rendelkezésünkre álló szerkezeti és kinetikai adatok birtokában pontosabb képet alkothatunk az aktin- és nukleotid-kötőhely reciprok allosztérikus működésében kulcsszerepet betöltő transzduktor szerkezeti elem működéséről is (az MD szerkezeti magját alkotó  $\beta$ -lemez az alapállapotban megcsavarodott, az erőkar „energiadús” felhúzott állapotában viszont kiegyenesedik). Ezen kívül értelmet nyert egy további szerkezeti/energetikai állapot (a kagyló szerkezetekből korábról ismert ún. belsőleg szétkapcsolt állapot), amely valószínűleg termodinamikailag kedvezőbbé teszi a poszt-rigorból a pre-munkaütembe történő átmenetet.

### **Miozin-II regulációs domén: szerkezet-funkció és szerkezeti biológiai vizsgálatok.**

7. **A  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivált kagyló rekombináns RD-ről megállapítottuk, hogy apo-formában nagyobb a konformációs flexibilitása, mint  $\text{Ca}^{2+}$ -kötött állapotban.** Az RD intrinszik fluoreszcencia intenzitása és anizotrópiája is alacsonyabb  $\text{Ca}^{2+}$  hiányában. A változásért elsősorban az ELC Trp21 környezetének a megváltozása felelős, de a fej-rúd csukló közelében is „érezhető” a mobilitás növekedés az apo-komplexben.
8. **Elektron spin rezonancia spektroszkópiai vizsgálatok bizonyították, hogy ATP- és  $\text{Ca}^{2+}$ -kötőhely között allosztérikus kommunikáció zajlik.** Az RLC Cys116 oldalláncra (Met116Cys mutáns) helyezett spin-próba a  $\text{Ca}^{2+}$ -kötőhely környékének lokális és az RD globális mobilitásáról is információt szolgáltatott. A kísérletek megmutatták, hogy egyrészt nem csak a  $\text{Ca}^{2+}$ , de az MD és az S2 is csökkentik az RD belső mobilitását, másrészt az MD csak ATP jelenlétében kommunikál az RD-vel:  $\text{Ca}^{2+}$  jelenlétében növeli az RD globális mobilitását („bekapcsolt” állapot). Nukleotid hiányában (és az ATP-áz aktivitás kémiai módosítással történő gátlásával) az MD és RD közötti kommunikáció szétkapcsolódik.
9. **A  $\text{Ca}^{2+}$ -gátolt *Physarum* miozin RD  $\text{Ca}^{2+}$ -kötőhelyét az esszenciális könnyű lánc (ELC) első „EF-kéz” motívumában azonosítottuk.** Érdekes módon ebben a miozinban, a többsejtűekből származó ortológokkal ellentétben, az RLC nem köt  $\text{Mg}^{2+}$ -ot. Kimutattuk, hogy az ELC  $\text{Ca}^{2+}$ -szelektivitása nem túl nagy. Kinetikai vizsgálataink viszont azt mutatták, hogy a  $\text{Mg}^{2+} \rightarrow \text{Ca}^{2+}$  csere elég gyors, ily módon a  $\text{Ca}^{2+}$  fiziológiás körülmények között ki tudja fejteni a gátló hatását.
10. **Meghatároztuk a *Physarum* miozin RD kristályszerkezetét. A szerkezet érdekessége, hogy az ELC kanonikus (kalmodulin-szerű) első „EF-kéz” motívumához a  $\text{Ca}^{2+}$  nem kanonikus módon kötődik, azaz nem történik meg az ún. zárt  $\rightarrow$  nyitott konformációs átmenet.** Ennek oka, hogy az EF-kéz hurok 12. aminosava (amely bidentát ligandumként koordinálja a  $\text{Ca}^{2+}$ -ot a

kanonikus szerkezetben), túl messze van a koordinálandó iontól. Az apo- és  $\text{Ca}^{2+}$ -telített RD hidrogén-deutérium kicserélődési sebességének összehasonlítása és molekuláris dinamikai szimulációk alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a plazmodiális nyálkagomba jellegzetes oszcilláló citoplazma áramlásáért felelős miozin-II  $\text{Ca}^{2+}$ -gátlása, a  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivált kagylóizom rendszerhez hasonlóan, az RD belső mobilitásának megváltozásán keresztül valósul meg. A  $\text{Ca}^{2+}$ -kötés kiváltotta allosztérikus változás az RD flexibilitásának csökkentésén keresztül tehát a motor aktiválásához (kagyló izom kontrakció) és gátlásához (nyálkagomba citoplazma áramlás) is vezethet.

11. **A  $\text{Ca}^{2+}$ -kötésen illetve a foszforiláción alapuló szabályozást könnyű lánc hibrid és kiméra HMM-ekkel összehasonlítva arra a következtetésre jutottunk, hogy mindkét szabályozás hasonló allosztérikus mechanizmuson keresztül valósul meg.** Kagyló LC-eket tartalmazó simaizom HMM ATP-áz aktivitása  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenyvé vált, míg a csak kagyló ELC-t tartalmazó simaizom HMM hibrid kettős szabályozás alá került,  $\text{Ca}^{2+}$ -kötés és foszforiláció is aktiválta.

### **Miozin-II *coiled-coil*: szerkezet-funkció és szerkezeti biológiai vizsgálatok**

12. **Azt találtuk, hogy a kagyló proximális S2 régió instabil szerkezetű.** Rekombináns kagyló miozin N-terminális *coiled-coil* fragmentumok (S2), valamint a regulációs domént is tartalmazó konstrukciók (RD+S2) vizsgálata azt mutatta, hogy többi konvencionális miozintól eltérően a kagyló fej-rúd csukló régió jóval instabilabb szerkezetű.
13. **Elsőként sikerült atomi felbontású miozin *coiled-coil* szerkezetet meghatározni.** A kagyló proximális S2 (amely tartalmazza a fej-farok csukló régiót) szerkezet számos olyan tulajdonságot mutat, ami megmagyarázza a nagyfokú flexibilitását (a *coiled-coil* varrat több ponton rosszul „csomagolódik”, a lánc-közötti sóhidak hiánya miatt több hidrofób oldallánc vízmolekulákkal kerül kölcsönhatásba). Az eredendően instabil proximális S2-t (7 heptád egység) a C-terminális végéhez fuzionált élesztő GCN4-ből származó Leu-cipzárral (4 heptád) sikerült stabilizálnunk. Az S2 flexibilis szerkezetét alátámasztja az a tény is, hogy három kristályformából öt szerkezeti modellt tudtunk előállítani, amelyek egy részében az N-terminális 10-14 aminosav rendezetlen szerkezetű. Pontosítottuk a miozin fej és a rúd határát jelző peptidkötést is (Leu809-Leu810).
14. **Megállapítottuk, hogy a közvetlenül szabályozott miozinokban (kagyló és gerinces simaizom) a fej-rúd csukló régiónál a *coiled-coil* szerkezet kisebb stabilitású (flexibilisebb) mint az indirekt módon szabályozottakban (gerinces váz- és szívizom).** Az eltérő stabilitások szerkezeti okait mutagenézis vizsgálatok részben megmagyarázzák. A nagyfokú flexibilitás és szerkezeti dinamika előfeltétele lehet a regulált miozinokra jellemző aszimmetrikus „*off*” szerkezet kialakulásának.

### **Vizsgálatok az intracelluláris szállítómotor miozin-V-tel és a DYNLL könnyű láncsal**

15. **Kimutattuk, hogy a *Drosophila* miozin-V a gerinces miozin-V motoroktól gyökeresen eltérő mechanizmussal működik, nevezetesen egy nem-processzív citoplazmatikus**

**transzport motor.** Rekombináns S1-gyel és HMM-mel végzett *steady-state*, tranziens kinetikai, valamint *in vitro* motilitási vizsgálatokból kiderült, hogy a *Drosophila* miozin-V a gerinces ortológoktól eltérően alacsony terhelési arányú (*duty ratio*) motorfehérje (az ATP-áz ciklusidejének nagyobb részét tölti az aktinról levált állapotban), amely *in vitro* tesztben csak nagy felszíni koncentráció mellett volt képes mozgatni az aktin filamentumokat.

16. **Meghatároztuk az emlős miozin-V farok könnyű lánc (DYNLL vagy LC8) pontos kötőhelyét a farok domén egy szerkezet nélküli régiójában.** A két emlős könnyű lánc paralóg közül a DYNLL2 izoforma a három miozin-V paralóg közül csak a miozin-Va izoformának egy ~8 aminosavból álló lineáris motívumhoz köt, amely tartalmaz egy mindössze három aminosavat kódoló, főleg ideg- és immunsejtekben expresszálandó exont. Az DYNLL kötődés hatására allosztérikus módon a kötőhelytől N- és C-terminálisan elhelyezkedő *coiled-coil* domének szerkezete stabilizálódik. NMR spektroszkópiai vizsgálatok és molekuláris dokkolás segítségével szerkezeti modellt készítettünk a DYNLL2-miozin-Va kötőpeptid komplexről. A két miozin peptid szimmetrikusan és kooperativitás nélkül kötődik a homodimer DYNLL-hez a két alegység kölcsönható felszínénél elhelyezkedő két árokba. Ezek alapján kicsi a valószínűsége, hogy a DYNLL az intracelluláris szállító motor kargó-kötő alegysége lenne, mint az korábban feltételezték. Ezzel szemben „molekuláris ragasztóként” szerepe lehet a miozin-V farok domének, ily módon valószínűleg a kargó-kötő domén stabilizálásában, s beleszólhat a motorfehérje szabályozásába is.
17. **A DYNLL könnyű láncokról megmutattuk, hogy az egyik legkonzervatívabb eukarióta fehérjék, amelyek a proteomban csomóponti („hub protein”) szerepet töltenek be és gyakorlatilag csak rendezetlen fehérjékhez illetve fehérjerégiókhoz kötődnek.** Jelenleg már több mint 60 kötőpartnerüket ismerjük. A lineáris motívum (7 aminosav) kötődése a DYNLL-hez sok esetben a kötőpartnernek dimerizációjához, illetve a dimerizációt okozó *coiled-coil* domének stabilizálásához vezet. A stabilizált partner nagyobb fehérjekomplexek számára szolgálhat platformként. Más esetekben a DYNLL-hez kötődés szekvesztrálhatja a kölcsönható fehérjét. A DYNLL „szerkezet összeszerelő”, szerkezet stabilizáló, valamint szekvesztráló képességével változatos biológiai folyamatokban vehet részt, úgymint az apoptózis, sejtciklus, transzkripció, DNS javító folyamatok és a neuronális NO-szintáz enzim szabályozása, a posztzinaptikus denzitás, nukleopórus és RNS szállító komplex kialakítása, esetleg motorfehérjék kargó szállítás.

## Vizsgálatok a reverz motor miozin-VI-tal és a magányos $\alpha$ -hélixek felfedezése

18. **A miozin-VI farok doménen belül található, korábban *coiled-coil* szerkezetűnek jósolt, mintegy 60 aminosav hosszúságú, nagy töltéssűrűségű régióról kimutattuk, hogy egyszálú  $\alpha$ -hélix szerkezetű.** Cirkuláris dikroizmus spektroszkópiai és kémiai keresztkötés vizsgálatok azt mutatták, hogy ezek a miozin-VI farok domének nem képesek dimerizálni, ellenben igen stabil magányos  $\alpha$ -héliset alkotnak. A szerkezetet az  $i$  és  $i+3$ , valamint  $i$  és  $i+4$  pozíciókban elhelyezkedő nagyszámú (83%) Glu és Lys/Arg oldallánc között kialakuló sóhidak stabilizálhatják.

19. **Két, elvi alapon is különböző szerkezetjősítő programot hoztunk létre, amelyek segítségével megmutattuk, hogy a töltött magányos  $\alpha$ -hélix (CSAH) egy eddig fel nem ismert fehérje szerkezeti motívum, amely több tucat fehérjében, többek között több miozin osztályban (mio6, mio10) is megtalálható.** Néhány kiválasztott CSAH domént előállítottunk rekombináns fehérjeként, s kísérletesen bizonyítottuk, hogy magányos  $\alpha$ -hélixet alkotnak. Csak a minimum 40 aminosav hosszúságú CSAH motívumokat azonosítottuk eddig (maximális hosszuk 150 aminosav, ~20 nm). Változatos szereppel bírhatnak: a miozinok esetén meghosszabbítják a motor erőkarját, máshol domének közötti többé-kevésbé merev összekötő kapocsként működhetnek.

A tézisekben bemutatott eredmények alap kutatások, közvetlen gyakorlati hasznosításuk a közeljövőben nem valószínű. Ez alól kivételt jelenthet a 18. és a 19.-21. pontban összefoglalt kutatásaink folytatása. Egyrészt a DYNLL, többek felvetése szerint egyes kórképek esetén gyógyszer célmolekulaként szerepelhet (megjegyzendő, hogy ezzel kapcsolatban *in vitro* evolúciós eljárással, kollaborációban Pál Gáborral, ígéretes eredményeink vannak nagy affinitással DYNLL kötőpeptidek előállítására terén), másrészt elképzelhető a jövőben a magányos egyszálú peptidek nanobiotechnológiai felhasználása is.



## VIII. HIVATKOZÁSOK

1. Krendel, M. and M.S. Mooseker, *Myosins: tails (and heads) of functional diversity*. Physiology (Bethesda), 2005. **20**: p. 239-51.
2. Vale, R.D. and R.A. Milligan, *The way things move: looking under the hood of molecular motor proteins*. Science, 2000. **288**(5463): p. 88-95.
3. Kühne, W., *Untersuchungen über das Protoplasma und die Contractilität*. 1864.
4. Szent-Györgyi, A., *The contraction of myosin threads*. Stud. Inst. Med.Chem. Univ. Szeged., 1942. **1**: p. 17-26.
5. Kuriyan, J. and D. Eisenberg, *The origin of protein interactions and allostery in colocalization*. Nature, 2007. **450**(7172): p. 983-90.
6. Brown, J.H., et al., *An unstable head-rod junction may promote folding into the compact off-state conformation of regulated myosins*. J Mol Biol, 2008. **375**(5): p. 1434-43.
7. Debreczeni, J.E., et al., *Structural evidence for non-canonical binding of Ca<sup>2+</sup> to a canonical EF-hand of a conventional myosin*. J Biol Chem, 2005. **280**(50): p. 41458-64.
8. Hodi, Z., et al., *Alternatively spliced exon B of myosin Va is essential for binding the tail-associated light chain shared by dynein*. Biochemistry, 2006. **45**(41): p. 12582-95.
9. Li, Y., et al., *Visualization of an unstable coiled coil from the scallop myosin rod*. Nature, 2003. **424**(6946): p. 341-5.
10. Yang, Y., et al., *Rigor-like structures from muscle myosins reveal key mechanical elements in the transduction pathways of this allosteric motor*. Structure, 2007. **15**(5): p. 553-64.
11. Odrionitz, F. and M. Kollmar, *Comparative genomic analysis of the arthropod muscle myosin heavy chain genes allows ancestral gene reconstruction and reveals a new type of 'partially' processed pseudogene*. BMC Mol Biol, 2008. **9**: p. 21.
12. Richards, T.A. and T. Cavalier-Smith, *Myosin domain evolution and the primary divergence of eukaryotes*. Nature, 2005. **436**(7054): p. 1113-8.
13. Foth, B.J., M.C. Goedecke, and D. Soldati, *New insights into myosin evolution and classification*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(10): p. 3681-6.
14. Bahler, M. and A. Rhoads, *Calmodulin signaling via the IQ motif*. FEBS Lett, 2002. **513**(1): p. 107-13.
15. Kendrick-Jones, J., Hodge, T.P., Lister, I.M.B., Roberts, R.C., Buss, F., *Myosin superfamily*. Encyclopedia of Life Sciences, 2001.
16. Berg, J.S., B.C. Powell, and R.E. Cheney, *A millennial myosin census*. Mol Biol Cell, 2001. **12**(4): p. 780-94.
17. Craig, R. and J.L. Woodhead, *Structure and function of myosin filaments*. Curr Opin Struct Biol, 2006. **16**(2): p. 204-12.
18. Nyitrai, L., et al., *The proteolytic substructure of light meromyosin. Localization of a region responsible for the low ionic strength insolubility of myosin*. J Biol Chem, 1983. **258**(21): p. 13213-20.
19. Sohn, R.L., et al., *A 29 residue region of the sarcomeric myosin rod is necessary for filament formation*. J Mol Biol, 1997. **266**(2): p. 317-30.
20. Kim, S.V. and R.A. Flavell, *Myosin I: from yeast to human*. Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(14): p. 2128-37.
21. Dose, A.C., et al., *The kinase domain alters the kinetic properties of the myosin IIIA motor*. Biochemistry, 2008. **47**(8): p. 2485-96.
22. Vale, R.D., *Myosin V motor proteins: marching stepwise towards a mechanism*. J Cell Biol, 2003. **163**(3): p. 445-50.
23. Reck-Peterson, S.L., et al., *Class V myosins*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1496**(1): p. 36-51.
24. Li, J.F. and A. Nebenfuhr, *The tail that wags the dog: the globular tail domain defines the function of myosin V/XI*. Traffic, 2008. **9**(3): p. 290-8.

25. Shimmen, T. and E. Yokota, *Cytoplasmic streaming in plants*. *Curr Opin Cell Biol*, 2004. **16**(1): p. 68-72.
26. Buss, F., G. Spudich, and J. Kendrick-Jones, *Myosin VI: cellular functions and motor properties*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2004. **20**: p. 649-76.
27. Frank, D.J., T. Noguchi, and K.G. Miller, *Myosin VI: a structural role in actin organization important for protein and organelle localization and trafficking*. *Curr Opin Cell Biol*, 2004. **16**(2): p. 189-94.
28. Lister, I., et al., *A monomeric myosin VI with a large working stroke*. *Embo J*, 2004. **23**(8): p. 1729-38.
29. Sousa, A.D. and R.E. Cheney, *Myosin-X: a molecular motor at the cell's fingertips*. *Trends Cell Biol*, 2005. **15**(10): p. 533-9.
30. McCaffrey, G. and R.D. Vale, *Identification of a kinesin-like microtubule-based motor protein in Dictyostelium discoideum*. *Embo J*, 1989. **8**(11): p. 3229-34.
31. Vale, R.D., *Millennial musings on molecular motors*. *Trends Cell Biol*, 1999. **9**(12): p. M38-42.
32. Purich, D.L., *Enzyme catalysis: a new definition accounting for noncovalent substrate- and product-like states*. *Trends Biochem Sci*, 2001. **26**(7): p. 417-21.
33. Lymn, R.W. and E.W. Taylor, *Mechanism of adenosine triphosphate hydrolysis by actomyosin*. *Biochemistry*, 1971. **10**(25): p. 4617-24.
34. Rayment, I., et al., *Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor*. *Science*, 1993. **261**(5117): p. 50-8.
35. Geeves, M.A. and K.C. Holmes, *The molecular mechanism of muscle contraction*. *Adv Protein Chem*, 2005. **71**: p. 161-93.
36. Balint, M., et al., *The substructure of heavy meromyosin. The effect of Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> on the tryptic fragmentation of heavy meromyosin*. *J Biol Chem*, 1975. **250**(15): p. 6168-77.
37. Coureux, P.D., H.L. Sweeney, and A. Houdusse, *Three myosin V structures delineate essential features of chemo-mechanical transduction*. *Embo J*, 2004. **23**(23): p. 4527-37.
38. Milligan, R.A., *Protein-protein interactions in the rigor actomyosin complex*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(1): p. 21-6.
39. Koppole, S., J.C. Smith, and S. Fischer, *The structural coupling between ATPase activation and recovery stroke in the myosin II motor*. *Structure*, 2007. **15**(7): p. 825-37.
40. Houdusse, A. and H.L. Sweeney, *Myosin motors: missing structures and hidden springs*. *Curr Opin Struct Biol*, 2001. **11**(2): p. 182-94.
41. Houdusse, A. and C. Cohen, *Structure of the regulatory domain of scallop myosin at 2 Å resolution: implications for regulation*. *Structure*, 1996. **4**(1): p. 21-32.
42. Kwon, H., et al., *Isolation of the regulatory domain of scallop myosin: role of the essential light chain in calcium binding*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. **87**(12): p. 4771-5.
43. Offer, G. and P. Knight, *The structure of the head-tail junction of the myosin molecule*. *J Mol Biol*, 1996. **256**(3): p. 407-16.
44. Huxley, H.E., *The mechanism of muscular contraction*. *Science*, 1969. **164**(886): p. 1356-65.
45. Howard, J. and J.A. Spudich, *Is the lever arm of myosin a molecular elastic element?* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(9): p. 4462-4.
46. Cecchini, M., A. Houdusse, and M. Karplus, *Allosteric communication in myosin V: from small conformational changes to large directed movements*. *PLoS Comput Biol*, 2008. **4**(8): p. e1000129.
47. Geeves, M.A. and K.C. Holmes, *Structural mechanism of muscle contraction*. *Annu Rev Biochem*, 1999. **68**: p. 687-728.
48. Malnasi-Csizmadia, A., et al., *Switch movements and the myosin crossbridge stroke*. *J Muscle Res Cell Motil*, 2005. **26**(1): p. 31-7.
49. Gourinath, S., et al., *Crystal structure of scallop Myosin s1 in the pre-power stroke state to 2.6 Å resolution: flexibility and function in the head*. *Structure*, 2003. **11**(12): p. 1621-7.

50. Houdusse, A., et al., *Atomic structure of scallop myosin subfragment S1 complexed with MgADP: a novel conformation of the myosin head*. Cell, 1999. **97**(4): p. 459-70.
51. Koppole, S., J.C. Smith, and S. Fischer, *Simulations of the myosin II motor reveal a nucleotide-state sensing element that controls the recovery stroke*. J Mol Biol, 2006. **361**(3): p. 604-16.
52. Coureux, P.D., et al., *A structural state of the myosin V motor without bound nucleotide*. Nature, 2003. **425**(6956): p. 419-23.
53. Menetrey, J., et al., *The structure of the myosin VI motor reveals the mechanism of directionality reversal*. Nature, 2005. **435**(7043): p. 779-85.
54. Menetrey, J., et al., *The post-rigor structure of myosin VI and implications for the recovery stroke*. Embo J, 2008. **27**(1): p. 244-52.
55. Takagi, Y., H. Shuman, and Y.E. Goldman, *Coupling between phosphate release and force generation in muscle actomyosin*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2004. **359**(1452): p. 1913-20.
56. De La Cruz, E.M. and E.M. Ostap, *Relating biochemistry and function in the myosin superfamily*. Curr Opin Cell Biol, 2004. **16**(1): p. 61-7.
57. Park, H., et al., *The unique insert at the end of the myosin VI motor is the sole determinant of directionality*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(3): p. 778-83.
58. Bryant, Z., D. Altman, and J.A. Spudich, *The power stroke of myosin VI and the basis of reverse directionality*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(3): p. 772-7.
59. Uyeda, T.Q., P.D. Abramson, and J.A. Spudich, *The neck region of the myosin motor domain acts as a lever arm to generate movement*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(9): p. 4459-64.
60. Sellers, J.R. and C. Veigel, *Walking with myosin V*. Curr Opin Cell Biol, 2006. **18**(1): p. 68-73.
61. Kovacs, M., et al., *Load-dependent mechanism of nonmuscle myosin 2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(24): p. 9994-9.
62. Kovacs, M., et al., *Functional divergence of human cytoplasmic myosin II: kinetic characterization of the non-muscle IIA isoform*. J Biol Chem, 2003. **278**(40): p. 38132-40.
63. Wang, F., et al., *Kinetic mechanism of non-muscle myosin IIB: functional adaptations for tension generation and maintenance*. J Biol Chem, 2003. **278**(30): p. 27439-48.
64. Kee, Y.S. and D.N. Robinson, *Motor proteins: myosin mechanosensors*. Curr Biol, 2008. **18**(18): p. R860-2.
65. Rhee, A.Y., O. Ogut, and F.V. Brozovich, *Nonmuscle myosin, force maintenance, and the tonic contractile phenotype in smooth muscle*. Pflugers Arch, 2006. **452**(6): p. 766-74.
66. Galler, S., *Molecular basis of the catch state in molluscan smooth muscles: a catchy challenge*. J Muscle Res Cell Motil, 2008. **29**(2-5): p. 73-99.
67. Gordon, A.M., E. Homsher, and M. Regnier, *Regulation of contraction in striated muscle*. Physiol Rev, 2000. **80**(2): p. 853-924.
68. Adelstein, R.S. and E. Eisenberg, *Regulation and kinetics of the actin-myosin-ATP interaction*. Annu Rev Biochem, 1980. **49**: p. 921-56.
69. Sellers, J.R., *Myosins: a diverse superfamily*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1496**(1): p. 3-22.
70. Zhi, G., et al., *Myosin light chain kinase and myosin phosphorylation effect frequency-dependent potentiation of skeletal muscle contraction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(48): p. 17519-24.
71. Bresnick, A.R., *Molecular mechanisms of nonmuscle myosin-II regulation*. Curr Opin Cell Biol, 1999. **11**(1): p. 26-33.
72. Szent-Györgyi, A.G., Fromherz, S., Jancso, A., Nyitray, L., & Kalabokis, V.N., *Regulation of muscle contraction by a calcium-binding myosin: structural and mutational studies.*, in *Calcium as Cell Signal*, Y.N. K. Maruyama, and K. Kohama, Editor. 1995, Igaku-Shoin Medical Publishers: New York. p. 65-75.

73. Szent-Gyorgyi, A.G., V.N. Kalabokis, and C.L. Perreault-Micale, *Regulation by molluscan myosins*. Mol Cell Biochem, 1999. **190**(1-2): p. 55-62.
74. Nakamura, A. and K. Kohama, *Calcium regulation of the actin-myosin interaction of Physarum polycephalum*. Int Rev Cytol, 1999. **191**: p. 53-98.
75. Lehman, W. and A.G. Szent-Gyorgyi, *Regulation of muscular contraction. Distribution of actin control and myosin control in the animal kingdom*. J Gen Physiol, 1975. **66**(1): p. 1-30.
76. Hooper, S.L., K.H. Hobbs, and J.B. Thuma, *Invertebrate muscles: thin and thick filament structure; molecular basis of contraction and its regulation, catch and asynchronous muscle*. Prog Neurobiol, 2008. **86**(2): p. 72-127.
77. Jung, H.S., et al., *Head-head and head-tail interaction: a general mechanism for switching off myosin II activity in cells*. Mol Biol Cell, 2008. **19**(8): p. 3234-42.
78. Sellers, J.R. and P.J. Knight, *Folding and regulation in myosins II and V*. J Muscle Res Cell Motil, 2007. **28**(7-8): p. 363-70.
79. Wendt, T., et al., *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, 2001. **98**(8): p. 4361-6.
80. Woodhead, J.L., et al., *Atomic model of a myosin filament in the relaxed state*. Nature, 2005. **436**(7054): p. 1195-9.
81. Craig, R., R. Smith, and J. Kendrick-Jones, *Light-chain phosphorylation controls the conformation of vertebrate non-muscle and smooth muscle myosin molecules*. Nature, 1983. **302**(5907): p. 436-9.
82. Taylor, K.A., *Regulation and recycling of myosin V*. Curr Opin Cell Biol, 2007. **19**(1): p. 67-74.
83. Goodwin, E.B., A.G. Szent-Gyorgyi, and L.A. Leinwand, *Cloning and characterization of the scallop essential and regulatory myosin light chain cDNAs*. J Biol Chem, 1987. **262**(23): p. 11052-6.
84. Nyitray, L., E.B. Goodwin, and A.G. Szent-Gyorgyi, *Nucleotide sequence of full length cDNA for a scallop striated muscle myosin heavy chain*. Nucleic Acids Res, 1990. **18**(23): p. 7158.
85. Nyitray, L., E.B. Goodwin, and A.G. Szent-Gyorgyi, *Complete primary structure of a scallop striated muscle myosin heavy chain. Sequence comparison with other heavy chains reveals regions that might be critical for regulation*. J Biol Chem, 1991. **266**(28): p. 18469-76.
86. Morano, I., *Tuning smooth muscle contraction by molecular motors*. J Mol Med, 2003. **81**(8): p. 481-7.
87. Dibb, N.J., et al., *Sequence analysis of the complete Caenorhabditis elegans myosin heavy chain gene family*. J Mol Biol, 1989. **205**(3): p. 603-13.
88. George, E.L., M.B. Ober, and C.P. Emerson, Jr., *Functional domains of the Drosophila melanogaster muscle myosin heavy-chain gene are encoded by alternatively spliced exons*. Mol Cell Biol, 1989. **9**(7): p. 2957-74.
89. Nyitray, L., et al., *Scallop striated and smooth muscle myosin heavy-chain isoforms are produced by alternative RNA splicing from a single gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(26): p. 12686-90.
90. Perreault-Micale, C.L., et al., *Sequence variations in the surface loop near the nucleotide binding site modulate the ATP turnover rates of molluscan myosins*. J Muscle Res Cell Motil, 1996. **17**(5): p. 543-53.
91. Matulef, K., et al., *Amino-acid sequence of squid myosin heavy chain*. J Muscle Res Cell Motil, 1998. **19**(6): p. 705-12.
92. Yang, C., et al., *Alternative versions of the myosin relay domain differentially respond to load to influence Drosophila muscle kinetics*. Biophys J, 2008. **95**(11): p. 5228-37.

93. Kurzawa-Goertz, S.E., et al., *Loop I can modulate ADP affinity, ATPase activity, and motility of different scallop myosins. Transient kinetic analysis of S1 isoforms.* Biochemistry, 1998. **37**(20): p. 7517-25.
94. Uexküll, J.v., *Studien über den Tonus VI. Die Pilgermuschel.* Z Biol, 1912. **58**: p. 305-322.
95. Castellani, L., B.W. Elliott, Jr., and C. Cohen, *Phosphorylatable serine residues are located in a non-helical tailpiece of a catch muscle myosin.* J Muscle Res Cell Motil, 1988. **9**(6): p. 533-40.
96. Yamada, A., M. Yoshio, and H. Nakayama, *Bi-directional movement of actin filaments along long bipolar tracks of oriented rabbit skeletal muscle myosin molecules.* FEBS Lett, 1997. **409**(3): p. 380-4.
97. Yamada, A., et al., *Catchin, a novel protein in molluscan catch muscles, is produced by alternative splicing from the myosin heavy chain gene.* J Mol Biol, 2000. **295**(2): p. 169-78.
98. Yamada, A., et al., *An in vitro assay reveals essential protein components for the "catch" state of invertebrate smooth muscle.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(12): p. 6635-40.
99. Franke, A.S., et al., *Myosin cross-bridge kinetics and the mechanism of catch.* Biophys J, 2007. **93**(2): p. 554-65.
100. Polyak, E., et al., *Contribution of myosin rod protein to the structural organization of adult and embryonic muscles in Drosophila.* J Mol Biol, 2003. **331**(5): p. 1077-91.
101. Vibert, P., et al., *Structure and distribution of mini-titins.* Adv Biophys, 1996. **33**: p. 199-209.
102. Funabara, D., et al., *Twitchin from molluscan catch muscle: primary structure and relationship between site-specific phosphorylation and mechanical function.* J Biol Chem, 2003. **278**(31): p. 29308-16.
103. Kobayashi, T., et al., *Amino acid sequence of the calcium-binding light chain of myosin from the lower eukaryote, Physarum polycephalum.* J Biol Chem, 1988. **263**(1): p. 305-13.
104. Farkas, L., et al., *Localization and characterization of the inhibitory Ca<sup>2+</sup>-binding site of Physarum polycephalum myosin II.* J Biol Chem, 2003. **278**(30): p. 27399-405.
105. Uyeda, T.Q. and K. Kohama, *Myosin switching during amoeba-plasmodial differentiation of slime mold, Physarum polycephalum.* Exp Cell Res, 1987. **169**(1): p. 74-84.
106. Baldauf, S.L. and W.F. Doolittle, *Origin and evolution of the slime molds (Mycetozoa).* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(22): p. 12007-12.
107. Cavalier-Smith, T. and E.E. Chao, *Phylogeny and classification of phylum Cercozoa (Protozoa).* Protist, 2003. **154**(3-4): p. 341-58.
108. Kawamichi, H., et al., *Calcium inhibition of Physarum myosin as examined by the recombinant heavy mero-myosin.* Adv Exp Med Biol, 2007. **592**: p. 265-72.
109. Kovács, M., *Lépésről lépésre – egy molekuláris motor működésének kinetikai megközelítése, in Biokémiai Tanszék.* 2002, Eötvös Loránd Tudományegyetem: Budapest.
110. Manstein, D.J., K.M. Ruppel, and J.A. Spudich, *Expression and characterization of a functional myosin head fragment in Dictyostelium discoideum.* Science, 1989. **246**(4930): p. 656-8.
111. Kovacs, M., et al., *Analysis of nucleotide binding to Dictyostelium myosin II motor domains containing a single tryptophan near the active site.* J Biol Chem, 2002. **277**(32): p. 28459-67.
112. Malnasi-Csizmadia, A., R.J. Woolley, and C.R. Bagshaw, *Resolution of conformational states of Dictyostelium myosin II motor domain using tryptophan (W501) mutants: implications for the open-closed transition identified by crystallography.* Biochemistry, 2000. **39**(51): p. 16135-46.
113. Fabian, F. and A. Muhlrad, *Effect of trinitrophenylation on myosin ATPase.* Biochim Biophys Acta, 1968. **162**(4): p. 596-603.
114. Muhlrad, A., et al., *Chemical decoupling of ATPase activation and force production from the contractile cycle in myosin by steric hindrance of lever-arm movement.* Biophys J, 2003. **84**(2 Pt 1): p. 1047-56.

115. Kovacs, M., et al., *Engineering lysine reactivity as a conformational sensor in the Dictyostelium myosin II motor domain*. J Muscle Res Cell Motil, 2004. **25**(1): p. 95-102.
116. Malnasi-Csizmadia, A., et al., *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, 2001. **40**(42): p. 12727-37.
117. Malnasi-Csizmadia, A., et al., *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, 2007. **282**(24): p. 17658-64.
118. Wang, L., et al., *Molecular simulations of beta-sheet twisting*. J Mol Biol, 1996. **262**(2): p. 283-93.
119. Wells, J.A., et al., *Cross-linking of myosin subfragment 1. Nucleotide-enhanced modification by a variety of bifunctional reagents*. J Biol Chem, 1980. **255**(23): p. 11135-40.
120. Karatzaferi, C., M.K. Chinn, and R. Cooke, *The force exerted by a muscle cross-bridge depends directly on the strength of the actomyosin bond*. Biophys J, 2004. **87**(4): p. 2532-44.
121. Urbanke, C. and J. Wray, *A fluorescence temperature-jump study of conformational transitions in myosin subfragment 1*. Biochem J, 2001. **358**(Pt 1): p. 165-73.
122. Fischer, S., et al., *Structural mechanism of the recovery stroke in the myosin molecular motor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(19): p. 6873-8.
123. Xie, X., et al., *Structure of the regulatory domain of scallop myosin at 2.8 Å resolution*. Nature, 1994. **368**(6469): p. 306-12.
124. Kalabokis, V.N. and A.G. Szent-Gyorgyi, *Cooperativity and regulation of scallop myosin and myosin fragments*. Biochemistry, 1997. **36**(50): p. 15834-40.
125. Malnasi-Csizmadia, A., et al., *Fluorescence measurements detect changes in scallop myosin regulatory domain*. Eur J Biochem, 1999. **261**(2): p. 452-8.
126. Baker, J.E., et al., *A large and distinct rotation of the myosin light chain domain occurs upon muscle contraction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(6): p. 2944-9.
127. Chantler, P.D. and A.G. Szent-Gyorgyi, *Spectroscopic studies on invertebrate myosins and light chains*. Biochemistry, 1978. **17**(25): p. 5440-8.
128. Málnási-Csizmadia, A., *A miozin regulációs domén*, in *Biology PhD School*. 1999, Eötvös Loránd University: Budapest. p. 1-158.
129. Zhao, L., J. Gollub, and R. Cooke, *Orientation of paramagnetic probes attached to gizzard regulatory light chain bound to myosin heads in rabbit skeletal muscle*. Biochemistry, 1996. **35**(31): p. 10158-65.
130. Nyitrai, M., et al., *Ionic interactions play a role in the regulatory mechanism of scallop heavy meromyosin*. Biophys J, 2003. **85**(2): p. 1053-62.
131. Nyitrai, M., A.G. Szent-Gyorgyi, and M.A. Geeves, *A kinetic model of the co-operative binding of calcium and ADP to scallop (Argopecten irradians) heavy meromyosin*. Biochem J, 2002. **365**(Pt 1): p. 19-30.
132. Nyitrai, M., A.G. Szent-Gyorgyi, and M.A. Geeves, *Interactions of the two heads of scallop (Argopecten irradians) heavy meromyosin with actin: influence of calcium and nucleotides*. Biochem J, 2003. **370**(Pt 3): p. 839-48.
133. Trybus, K.M., V. Naroditskaya, and H.L. Sweeney, *The light chain-binding domain of the smooth muscle myosin heavy chain is not the only determinant of regulation*. J Biol Chem, 1998. **273**(29): p. 18423-8.
134. Trybus, K.M. and L. Henry, *Monoclonal antibodies detect and stabilize conformational states of smooth muscle myosin*. J Cell Biol, 1989. **109**(6 Pt 1): p. 2879-86.
135. Berger, C.E., et al., *ADP binding induces an asymmetry between the heads of unphosphorylated myosin*. J Biol Chem, 2001. **276**(26): p. 23240-5.
136. Ellison, P.A., Z.S. DePew, and C.R. Cremo, *Both heads of tissue-derived smooth muscle heavy meromyosin bind to actin in the presence of ADP*. J Biol Chem, 2003. **278**(7): p. 4410-5.



137. Kovacs, M., et al., *Two-headed binding of the unphosphorylated nonmuscle heavy meromyosin-ADP complex to actin*. *Biochemistry*, 2004. **43**(14): p. 4219-26.
138. Kamiya, N., Y. Yoshimoto, and F. Matsumura, *Contraction-relaxation cycle of Physarum cytoplasm: concomitant changes in intraplasmoidal ATP and Ca<sup>++</sup> concentrations*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1982. **46 Pt 1**: p. 77-84.
139. Kohama, K., et al., *Characterization of calcium-binding light chain as a Ca(2+)-receptive subunit of Physarum myosin*. *J Biochem*, 1991. **110**(4): p. 566-70.
140. Gifford, J.L., M.P. Walsh, and H.J. Vogel, *Structures and metal-ion-binding properties of the Ca<sup>2+</sup>-binding helix-loop-helix EF-hand motifs*. *Biochem J*, 2007. **405**(2): p. 199-221.
141. Fromherz, S. and A.G. Szent-Gyorgyi, *Role of essential light chain EF hand domains in calcium binding and regulation of scallop myosin*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(17): p. 7652-6.
142. Brown, S.E., S.R. Martin, and P.M. Bayley, *Kinetic control of the dissociation pathway of calmodulin-peptide complexes*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(6): p. 3389-97.
143. Houdusse, A., et al., *Crystal structure of apo-calmodulin bound to the first two IQ motifs of myosin V reveals essential recognition features*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(51): p. 19326-31.
144. Terrak, M., et al., *Two distinct myosin light chain structures are induced by specific variations within the bound IQ motifs-functional implications*. *Embo J*, 2003. **22**(3): p. 362-71.
145. Nelson, M.R. and W.J. Chazin, *An interaction-based analysis of calcium-induced conformational changes in Ca<sup>2+</sup> sensor proteins*. *Protein Sci*, 1998. **7**(2): p. 270-82.
146. Grabarek, Z., *Structure of a trapped intermediate of calmodulin: calcium regulation of EF-hand proteins from a new perspective*. *J Mol Biol*, 2005. **346**(5): p. 1351-66.
147. Grabarek, Z., *Structural basis for diversity of the EF-hand calcium-binding proteins*. *J Mol Biol*, 2006. **359**(3): p. 509-25.
148. Trybus, K.M., et al., *Effect of calcium on calmodulin bound to the IQ motifs of myosin V*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(32): p. 23316-25.
149. Jung, H.S., et al., *Conservation of the regulated structure of folded myosin 2 in species separated by at least 600 million years of independent evolution*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(16): p. 6022-6.
150. Lupas, A.N. and M. Gruber, *The structure of alpha-helical coiled coils*. *Adv Protein Chem*, 2005. **70**: p. 37-78.
151. Nyitray, L., G. Mocz, and M. Balint, *Localization of a new proteolytic site accessible in oxidized myosin rod*. *FEBS Lett*, 1985. **181**(2): p. 353-6.
152. Malnasi-Csizmadia, A., et al., *Dimerization of the head-rod junction of scallop myosin*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998. **252**(3): p. 595-601.
153. Monera, O.D., et al., *Comparison of antiparallel and parallel two-stranded alpha-helical coiled-coils. Design, synthesis, and characterization*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(26): p. 19218-27.
154. Crick, F.H., *Is alpha-keratin a coiled coil?* *Nature*, 1952. **170**(4334): p. 882-3.
155. O'Shea, E.K., et al., *X-ray structure of the GCN4 leucine zipper, a two-stranded, parallel coiled coil*. *Science*, 1991. **254**(5031): p. 539-44.
156. Strzelecka-Golaszewska, H., L. Nyitray, and M. Balint, *Paracrystalline assemblies of light meromyosins with various chain weights*. *J Muscle Res Cell Motil*, 1985. **6**(5): p. 641-58.
157. Blankenfeldt, W., et al., *Crystal structures of human cardiac beta-myosin II S2-Delta provide insight into the functional role of the S2 subfragment*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(47): p. 17713-7.
158. Brown, J.H., et al., *Deciphering the design of the tropomyosin molecule*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(15): p. 8496-501.

159. Li, Y., et al., *The crystal structure of the C-terminal fragment of striated-muscle alpha-tropomyosin reveals a key troponin T recognition site*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(11): p. 7378-83.
160. Lauzon, A.M., et al., *Coiled-coil unwinding at the smooth muscle myosin head-rod junction is required for optimal mechanical performance*. Biophys J, 2001. **80**(4): p. 1900-4.
161. Root, D.D., et al., *Coiled-coil nanomechanics and uncoiling and unfolding of the superhelix and alpha-helices of myosin*. Biophys J, 2006. **90**(8): p. 2852-66.
162. Trybus, K.M., et al., *Spare the rod, spoil the regulation: necessity for a myosin rod*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(1): p. 48-52.
163. Tama, F., et al., *The requirement for mechanical coupling between head and S2 domains in smooth muscle myosin ATPase regulation and its implications for dimeric motor function*. J Mol Biol, 2005. **345**(4): p. 837-54.
164. Chakrabarty, T., et al., *Holding two heads together: stability of the myosin II rod measured by resonance energy transfer between the heads*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(9): p. 6011-6.
165. Goldstein, R.A., *Amino-acid interactions in psychrophiles, mesophiles, thermophiles, and hyperthermophiles: insights from the quasi-chemical approximation*. Protein Sci, 2007. **16**(9): p. 1887-95.
166. Adamovic, I., S.M. Mijailovich, and M. Karplus, *The elastic properties of the structurally characterized myosin II S2 subdomain: a molecular dynamics and normal mode analysis*. Biophys J, 2008. **94**(10): p. 3779-89.
167. Reck-Peterson, S.L., et al., *The yeast class V myosins, Myo2p and Myo4p, are nonprocessive actin-based motors*. J Cell Biol, 2001. **153**(5): p. 1121-6.
168. Toth, J., et al., *Myosin V from Drosophila reveals diversity of motor mechanisms within the myosin V family*. J Biol Chem, 2005. **280**(34): p. 30594-603.
169. Takagi, Y., et al., *Human myosin Vc is a low duty ratio, nonprocessive molecular motor*. J Biol Chem, 2008. **283**(13): p. 8527-37.
170. Dunn, B.D., et al., *Myo4p is a monomeric myosin with motility uniquely adapted to transport mRNA*. J Cell Biol, 2007. **178**(7): p. 1193-206.
171. Taft, M.H., et al., *Dictyostelium myosin-5b is a conditional processive motor*. J Biol Chem, 2008. **283**(40): p. 26902-10.
172. Kremntsova, E.B., et al., *Processivity of chimeric class V myosins*. J Biol Chem, 2006. **281**(9): p. 6079-86.
173. Forgacs, E., et al., *Switch I Mutation S217A Converts Myosin V into a Low Duty Ratio Motor*. J Biol Chem, 2009. **284**(4): p. 2138-49.
174. King, S.M. and R.S. Patel-King, *The M(r) = 8,000 and 11,000 outer arm dynein light chains from Chlamydomonas flagella have cytoplasmic homologues*. J Biol Chem, 1995. **270**(19): p. 11445-52.
175. Espindola, F.S., et al., *The light chain composition of chicken brain myosin-Va: calmodulin, myosin-II essential light chains, and 8-kDa dynein light chain/PIN*. Cell Motil Cytoskeleton, 2000. **47**(4): p. 269-81.
176. Cheney, R.E., et al., *Brain myosin-V is a two-headed unconventional myosin with motor activity*. Cell, 1993. **75**(1): p. 13-23.
177. Vale, R.D., *The molecular motor toolbox for intracellular transport*. Cell, 2003. **112**(4): p. 467-80.
178. Pfister, K.K., et al., *Genetic analysis of the cytoplasmic dynein subunit families*. PLoS Genet, 2006. **2**(1): p. e1.
179. Naisbitt, S., et al., *Interaction of the postsynaptic density-95/guanylate kinase domain-associated protein complex with a light chain of myosin-V and dynein*. J Neurosci, 2000. **20**(12): p. 4524-34.
180. Day, C.L., et al., *Localization of dynein light chains 1 and 2 and their pro-apoptotic ligands*. Biochem J, 2004. **377**(Pt 3): p. 597-605.

181. Jaffrey, S.R. and S.H. Snyder, *PIN: an associated protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase*. Science, 1996. **274**(5288): p. 774-7.
182. King, S.M., et al., *Brain cytoplasmic and flagellar outer arm dyneins share a highly conserved Mr 8,000 light chain*. J Biol Chem, 1996. **271**(32): p. 19358-66.
183. Fan, J., et al., *Structural basis of diverse sequence-dependent target recognition by the 8 kDa dynein light chain*. J Mol Biol, 2001. **306**(1): p. 97-108.
184. Liang, J., et al., *Structure of the PIN/LC8 dimer with a bound peptide*. Nat Struct Biol, 1999. **6**(8): p. 735-40.
185. Pashkova, N., et al., *Structural basis for myosin V discrimination between distinct cargoes*. Embo J, 2006. **25**(4): p. 693-700.
186. Wagner, W., et al., *The binding of DYNLL2 to myosin Va requires alternatively spliced exon B and stabilizes a portion of the myosin's coiled-coil domain*. Biochemistry, 2006. **45**(38): p. 11564-77.
187. Benison, G., A. Nyarko, and E. Barbar, *Heteronuclear NMR identifies a nascent helix in intrinsically disordered dynein intermediate chain: implications for folding and dimerization*. J Mol Biol, 2006. **362**(5): p. 1082-93.
188. Wang, L., et al., *Dynein light chain LC8 promotes assembly of the coiled-coil domain of swallow protein*. Biochemistry, 2004. **43**(15): p. 4611-20.
189. Wang, F., et al., *Regulated conformation of myosin V*. J Biol Chem, 2004. **279**(4): p. 2333-6.
190. Roland, J.T., L.A. Lapierre, and J.R. Goldenring, *Alternative splicing in class V myosins determines association with Rab10*. J Biol Chem, 2009. **284**(2): p. 1213-23.
191. Spink, B.J., et al., *Long single alpha-helical tail domains bridge the gap between structure and function of myosin VI*. Nat Struct Mol Biol, 2008. **15**(6): p. 591-7.
192. Dietrich, K.A., et al., *The kinesin-I motor protein is regulated by a direct interaction of its head and tail*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(26): p. 8938-43.
193. Geething, N.C. and J.A. Spudich, *Identification of a minimal myosin Va binding site within an intrinsically unstructured domain of melanophilin*. J Biol Chem, 2007. **282**(29): p. 21518-28.
194. Wickstead, B. and K. Gull, *Dyneins across eukaryotes: a comparative genomic analysis*. Traffic, 2007. **8**(12): p. 1708-21.
195. Dunker, A.K., et al., *Flexible nets. The roles of intrinsic disorder in protein interaction networks*. Febs J, 2005. **272**(20): p. 5129-48.
196. Han, J.D., et al., *Evidence for dynamically organized modularity in the yeast protein-protein interaction network*. Nature, 2004. **430**(6995): p. 88-93.
197. Hódi, Z., Rapali, P., Radnai, L., Molnár, T., Szenes, A., Kardos, J., Buday, L., Stafford, W.F., and Nyitray, L., *The LC8 family of dynein light chains: multifunctional chaperon-like proteins*. FEBS J, 2007. **274**: p. 106.
198. Nyitray, L. *DYNLL: a multifunctional protein that binds to intrinsically disordered proteins*. in *4th Central European Conference, Chemistry towards biology*. 2008. Dobogókő, Hungary.
199. Mohan, A., et al., *Analysis of molecular recognition features (MoRFs)*. J Mol Biol, 2006. **362**(5): p. 1043-59.
200. Dick, T., et al., *Cytoplasmic dynein (ddlc1) mutations cause morphogenetic defects and apoptotic cell death in Drosophila melanogaster*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(5): p. 1966-77.
201. Barbar, E., *Dynein light chain LC8 is a dimerization hub essential in diverse protein networks*. Biochemistry, 2008. **47**(2): p. 503-8.
202. Fuxreiter, M., P. Tompa, and I. Simon, *Local structural disorder imparts plasticity on linear motifs*. Bioinformatics, 2007. **23**(8): p. 950-6.
203. Hegyi, H., E. Schadt, and P. Tompa, *Structural disorder promotes assembly of protein complexes*. BMC Struct Biol, 2007. **7**: p. 65.
204. Vadlamudi, R.K., et al., *Dynein light chain 1, a p21-activated kinase 1-interacting substrate, promotes cancerous phenotypes*. Cancer Cell, 2004. **5**(6): p. 575-85.

205. Hall, J., et al., *Differences in dynamic structure of LC8 monomer, dimer, and dimer-peptide complexes*. Biochemistry, 2008. **47**(46): p. 11940-52.
206. Bodor, A., A. Láng, P. Rapali, L. Radnai, L. Nyitray, A. Perczel. *Structural and dynamical characterization of an unstructured myosin fragment (M) upon binding to the dimeric dynein light chain (DLC)*. in *4th Central European Conference, Chemistry towards biology*. 2008. Dobogókő, Hungary.
207. Rapali, P., L. Radnai, J. Kardos, D. Süveges, T. Molnár, B. Kiss, Z. Hódi, L. Nyitray. *Mechanism of DLC binding to multiple protein partners*. in *4th Central European Conference: Chemistry towards Biology*. 2008. Dobogókő, Hungary.
208. Rodriguez, O.C. and R.E. Cheney, *A new direction for myosin*. Trends Cell Biol, 2000. **10**(8): p. 307-11.
209. Süveges, D., Németh, A., Gáspári, Z., Tóth, G., and Nyitray, L., *Helical tail fragments of myosin VI exist as monomeric, highly flexible structures*. J. Muscle Res. Cell Motility, 2005. **26**: p. 74.
210. Suveges, D., et al., *Charged single alpha-helix: A versatile protein structural motif*. Proteins, 2008.
211. Gruber, M., J. Soding, and A.N. Lupas, *Comparative analysis of coiled-coil prediction methods*. J Struct Biol, 2006. **155**(2): p. 140-5.
212. Knight, P.J., et al., *The predicted coiled-coil domain of myosin 10 forms a novel elongated domain that lengthens the head*. J Biol Chem, 2005. **280**(41): p. 34702-8.
213. Marqusee, S. and R.L. Baldwin, *Helix stabilization by Glu-Lys+ salt bridges in short peptides of de novo design*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(24): p. 8898-902.
214. Scholtz, J.M., et al., *The energetics of ion-pair and hydrogen-bonding interactions in a helical peptide*. Biochemistry, 1993. **32**(37): p. 9668-76.
215. Wang, C.L., et al., *A long helix from the central region of smooth muscle caldesmon*. J Biol Chem, 1991. **266**(21): p. 13958-63.
216. Wang, E. and C.L. Wang, *(i, i + 4) Ion pairs stabilize helical peptides derived from smooth muscle caldesmon*. Arch Biochem Biophys, 1996. **329**(2): p. 156-62.
217. Suveges, D., et al., *Charged single alpha-helix: A versatile protein structural motif*. Proteins, 2009. **74**: p. 905–916.
218. Sivaramakrishnan, S., et al., *Dynamic charge interactions create surprising rigidity in the ER/K alpha-helical protein motif*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(36): p. 13356-61.
219. Espinoza-Fonseca, M.L., Süveges, D., and L. Nyitray, *Role of cationic residues in fine tuning flexibility of naturally occurring charged single  $\alpha$ -helices*. Biophys J., 2009. **96**, in press.

## IX. KÖZLEMÉNYLISTA

### IX.1. A disszertáció alapját képező közlemények:

- Nyitrai, L., Jancsó, A., Ochiai, Y., Gráf, L., & Szent-Györgyi, A.G. (1994) Scallop striated and smooth muscle myosin heavy chain isoforms are produced by alternative RNA splicing from a single gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:12686-90.
- Perrault-Micale, C.L., Kalabokis, V.N., Nyitrai, L., & Szent-Györgyi, A.G. (1996): Sequence variations in the surface loop near the nucleotide binding site modulate the ATP turnover rates of molluscan myosins. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 17:543-53.
- Málnási-Csizmadia, A., Shimony, E., Hegyi, G., Szent-Györgyi, A.G., and Nyitrai, L. (1998): Dimerization of the head-rod junction of scallop myosin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 252:595-601.
- Málnási-Csizmadia, A., Hegyi, G., Tölgyesi, F., Szent-Györgyi, A.G., and Nyitrai, L. (1999): Fluorescence measurements detect changes in scallop myosin regulatory domain. *Eur. J. Biochem.*, 261:452-8.
- Yamada, A., Yoshio, M., Oiwa, K., and Nyitrai, L. (2000): Catchin, a novel protein in molluscan catch muscles, is produced by alternative splicing from the myosin heavy chain gene. *J. Mol. Biol.* 295:169-78.
- Li, Y., Brown, J.H., Reshetnikova, L., Blazsek, A., Farkas, L., Nyitrai, L. and Cohen, C. (2003) Visualizing an unstable coiled coil: the crystal structure of an N-terminal segment of the scallop myosin rod. *Nature*, **424**, 341-345.
- Farkas, L., Málnási-Csizmadia, A., Nakamura, A., Kohama, K., and Nyitrai, L. (2003) Localization and characterization of the inhibitory Ca<sup>2+</sup>-binding site of *Physarum polycephalum* myosin II. *J. Biol. Chem.*, **278**, 27399-405.
- Kovács, M., Tóth, J., Málnási-Csizmadia, A., Bagshaw, C.R., and Nyitrai, L. (2004) Engineering lysine reactivity as a conformational sensor in the *Dictyostelium* myosin II motor domain. *J. Muscle Res. Cell Motility*, **25**, 95-102
- Tóth J, Kovács M, Wang F, Nyitrai L, Sellers JR. (2005) Myosin V from *Drosophila* reveals diversity of motor mechanisms within the myosin V family. *J Biol Chem*. **280**, 30594-603.
- Debreczeni, J., Farkas, L., Harmat, V., Hetényi, Cs., Hajdú, I., Závodszy, P., Kohama, K., and Nyitrai, L., (2005) Structural evidence for non-canonical binding of Ca<sup>2+</sup> to a canonical EF-hand of a conventional myosin. *J. Biol. Chem.* **280**, 41458-41464
- Hódi, Zs. Németh, A., Radnai, L., Hetényi, Cs., Schlett, K., Bodor, A., Perczel, A. and Nyitrai, L. (2006) Alternatively spliced exon B of myosin Va is essential for binding of the tail light chain shared by dynein. *Biochemistry*, **45**, 12582-12595
- Málnási-Csizmadia, A., Tóth, J., Pearson, D.S., Hetényi, Cs., Nyitrai, L., Geeves, M.A., Bagshaw, C.R., and Kovács, 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**, 17658-64
- Yang, Y., Gourinath, S., Kovács, M., Nyitrai, L., Reutzel, R., Himmel, D.M., O'Neill-Hennessey, E., Reshetnikova, L., Szent-Györgyi, A.G., Brown, J.H., and Cohen, C. (2007) Rigor-like structures of muscle myosins reveal key mechanical elements in the transduction pathways of this allosteric motor. *Structure*, **15**, 553-64.
- Brown, J.H., Yang, Y., Reshetnikova, L., Gourinath, S., Süveges, D., Kardos, J., Hóbor, F., Reutzel, R., Nyitrai, L., and Cohen, C. (2008) An unstable head-rod junction may promote folding into the compact off-state conformation of regulated myosins. *J. Mol. Biol.*, **375**, 1434-43.
- Süveges, D., Gáspári, Z., Tóth, G., and Nyitrai, L. (2009) Charged single  $\alpha$ -helix: a versatile protein structural motif. *Proteins*, **74**, 905–916 .

**A disszertációban szereplő közlemények száma: 15** (első és utolsó szerző: 10 illetve 12<sup>1</sup>)  
**A disszertációban szereplő közlemények impakt faktora: 100,032** (első és utolsó szerző: 75,721)  
**Az összes közlemény impakt faktora: 142,632**  
**Összes hivatkozások száma: 436 (független: 350)**

## **IX.2. További, a disszertációhoz kapcsolódó közlemények**

- Nyitray, L.**, Mócz, G., Szilágyi, L., Bálint, M., Lu, R.C., Wong, A., and Gergely, J. (1983) Proteolytic substructure of light meromyosin. Localization of a region responsible for the low ionic strength insolubility of myosin. *J. Biol. Chem.* 258:13213-220.
- Nyitray, L.**, Mócz, G., and Bálint, M. (1985) Localization of a new proteolytic site accessible in oxidized myosin rod. *FEBS Lett.* 181:353-56.
- Strzelecka-Golaszewska, H., **Nyitray, L.**, and Bálint, M. (1985) Paracrystalline assemblies of light meromyosin with various chain weights. *J. Muscle Res. Cell Motility* 6:641.
- Kwon, H., Goodwin, E.B., **Nyitray, L.**, Berlinger, E., O'Neill-Hennessey, E., Melandri, F.D., & Szent-Györgyi, A.G. (1990) Isolation of the regulatory domain of scallop myosin: Role of the essential light chain in calcium binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:4771-75.
- Nyitray, L.**, Goodwin, E.B., and Szent-Györgyi, A.G. (1990) Nucleotide sequence of full length cDNA for a scallop striated muscle myosin heavy chain. *Nucl. Acids Res.* 18:7158.
- Nyitray, L.**, Goodwin, E.B., and Szent-Györgyi, A.G. (1991) Complete primary structure of a scallop striated muscle myosin heavy chain. Sequence comparison with other heavy chains reveals regions that might be critical for regulation. *J. Biol. Chem.* 266:18469-76.
- Málnási-Csizmadia, A., Bonet-Kerrache, A., **Nyitray, L.** and Mornet, D. (1994) Purification and properties of caldesmon-like protein from molluscan smooth muscle. *Comp. Biochem. Physiol.* 108B: 59-63.
- Vibert, P., York, M.L., Castellani, L., Edelstein, S., Elliott, B., & **Nyitray, L.** (1996): Structure and distribution of mini-titins. *Adv. Biophys.*, 33:199-209.
- Kovacs M., Toth, J., **Nyitray, L.**, and Sellers, J. (2004) Two-headed binding of the unphosphorylated non-muscle heavy meromyosin-ADP complex to actin. *Biochemistry* 43, 4219-26.
- Horváth, I., Harmat, V., Perczel, A., Pálfi, V., **Nyitray, L.**, Nagy, A., Hlavanda, E., Náráy-Szabó, G., Ovádi, J. (2005) The structure of calmodulin's complex with KAR-2: a novel mode of binding explains the drug's unique pharmacology. *J. Biol. Chem.* 280:8266-74.
- Kawamichi, H., Hino, M., Nakamura, A., Tanaka, H., Farkas, L., **Nyitray, L.**, Kohama, K. (2007) Calcium inhibition of Physarum myosin as examined by the recombinant heavy mero-myosin. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 592:265-72

## **X. FÜGGELEK<sup>2</sup>**

---

<sup>1</sup> A 12. és 13. publikációban az utolsó szerzővel megegyezően „levelező szerzőnek” tekintem magam.

<sup>2</sup> A disszertáció alapját képező eredeti közlemények pdf fájlban, kivéve a mellékletben benyújtott kiemelt közleményeket