

A T043746 NYILVÁNTARTÁSI SZÁMÚ OTKA PÁLYÁZAT SZAKMAI ZÁRÓJELENTÉSE

témavezető: Nyitrai László

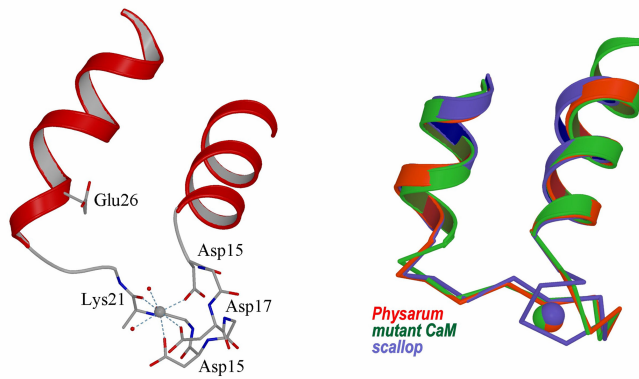
1. A miozin Ca^{2+} -reguláció molekuláris mechanizmusának vizsgálata

A regulált miozinokat vagy az ún. regulációs domén (RD) reverzibilis foszforilációja, vagy közvetlenül Ca^{2+} -ionok kötődése szabályozza. A Ca^{2+} -regulált miozinok három típusa ismert. A konvencionális miozinok (miozin II) közül az általunk már hosszabb ideje tanulmányozott kagyló izom miozint a Ca^{2+} a kalmodulin-szerű (de csak egy funkcionális EF-kéz motívumot tartalmazó) esszenciális könnyű lánchoz (ELC) kötődve aktiválja, míg a *Physarum* plazmodiális nyálkagomba miozint, ugyancsak az ELC-hez kötődve gátolja. A nem-konvencionális miozinok többségénél a könnyű lánc alegységek kalmodulinok (CaM), s a Ca^{2+} -kötődés aktiváló és gátló hatást is kifejtethet a motor aktivitására. A pályázat során elsősorban a Ca^{2+} -gátlás szerkezeti alapjai kapcsán értünk el eredményeket, de történt előrelépés a Ca^{2+} - és a foszforiláción alapuló szabályozás összehasonlítása kapcsán is.

1.1. Egy konvencionális miozin nem-konvencionális Ca^{2+} -kötése. A *Physarum* miozin II RD szerkezeti vizsgálata

Nagyobbreszt korábbi a OTKA pályázatunkból finanszíroztuk azt a munkát, aminek a keretében azonosítottuk a *Physarum* miozin II gátló Ca^{2+} -kötőhelyét az RD-n belül, az ELC első EF-kéz motívumában. A kötőhely nem teljesen specifikus Ca^{2+} -ra, de tranzienst kinetikai módszerekkel bizonyítottuk, hogy a fiziológiásan valószínűleg kötődő Mg^{2+} ionok disszociációs sebességi állandója elég nagy, így a Ca^{2+} a regulációhoz szükséges időskálán kötődni tud, s a miozin gátlásán keresztül leállítja a plazmódium citoplazma áramlását. Mutagenézis kísérleteink előrevetítették, hogy a Ca^{2+} kötődése az ELC-hez nem jár együtt a CaM szupercsaládra általánosan jellemző „zárt-nyitott” konformációs átmenetével (Farkas et al., *JBC*, 2003).

A *Physarum* miozin ELC Ca^{2+} -kötésének nem-kanonikus viselkedésére szerkezeti magyarázatot az Ca^{2+} -telített RD röntgenkristallográfiai vizsgálata adott. A rekombináns RD három polipeptidláncát (a nehéz lánc két IQ motívuma, az ELC és az ún. regulációs könnyű lánc) egy vektorról történő koexpresszióval, *E. coli* rendszerben tudtuk előállítani. A térszerkezetet az ELTE-MTA kristallográfiai csoportjával együttműködve, 1,8 Å-ös felbontásban sikerült meghatároznunk (PDB hozzáférési kód: 2BLO). Ez a második ismert kristályszerkezet a miozin teljes RD-ről, viszont a legjobb felbontású. A szerkezetből kiténik, hogy az ELC N-terminális doménjében azért nem történt meg a „zárt-nyitott” konformációs változás, mivel a Ca^{2+} -kötő EF-kéz hurokrészének 12. aminosava, egy Glu (amely a kanonikus Ca^{2+} kötőhelyeknél két oxigén ligandummal vesz részt az ion koordinációs kötésében) térben túl messze van a kötött Ca^{2+} -tól. A Ca^{2+} csak a hurok első felével alakít ki kötést, oktaédes geometriával (az általánosabb hetes koordinációval szemben). A „kiesett” Glu szerepét egy vízmolekula veszi át. Úgy gondoljuk, hogy ez a szerkezet a domén „zárt-nyitott” izomerizációjának mintegy az átmeneti állapotában „fagyott be”, egyrészt az ELC-nek az RLC-vel és a nehéz lánccal kialakított interakciói miatt, másrészt azért, mivel az ELC N-terminális doménje a kanonikus CaM doméntól eltérően csak egy funkcionális EF-kéz motívumot tartalmaz. A konklúziókat alátámasztja egy mostanában meghatározott CaM mutáns térszerkezete, ahol a zárt állapotot egy diszulfid-híd stabilizálja (PDB: 1Y6W) és amiben a Ca^{2+} a mi szerkezetünkkel megegyező módon kötődik az N-terminális doménhez



1. ábra.
Az RD Ca^{2+} -kötőhelye az ELC első EF-kéz motívumában (bal) és összehasonlítása egy mutáns CaM és a kagyló RD Ca^{2+} -kötőhelyével (jobb)

(1. ábra). Az RD kristály másik 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 ún. kampó régiója (egyébként az amfipatikus CaM célszekvenciákhoz hasonlóan) stabilizálja a nyitott domén szerkezetet. Megjegyzendő, hogy a kristály aszimmetrikus egysége tartalmaz az RLC C-terminális doménjében egy olyan Ca^{2+} -ot, amelyet részben a kristálykontaktusban lévő szomszédos RLC egyik aminosav oldallánca koordinál. Hasonló intermolekuláris Ca^{2+} látható a legjobb felbontású (1 Å) CaM kristályszerkezetben is.

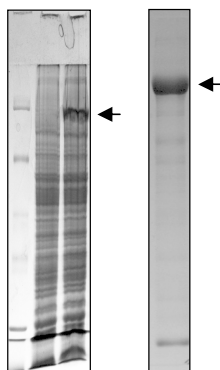
A *Physarum* miozin Ca^{2+} gátlásának molekuláris mechanizmusát úgy magyarázzuk, hogy az ELC Ca^{2+} -kötésének hatására a regulációs domén (RD) flexibilitása csökken, aminek következtében a motor domén és az RD kapcsolata is „feszültté” válik, és ez által csökken a motorfehérje aktivitása. A kagyló izom miozinban Ca^{2+} kötés hatására pontosan az ellenkező változás történik, illetve ott a Ca^{2+} nélküli állapotot egy különleges, de a motorfehérjék világában nem egyedülálló aszimmetrikus fej-fej és fej-farok interakció immobilizálja, és ily módon gátolja. A Ca^{2+} nélküli RD-t ugyan nem sikerült kristályosítanunk (a Ca^{2+} -telített RD kristályok szétestek Ca^{2+} -kelátor hozzáadására), azonban az apo- és a holo-komplex szerkezetét hidrogén-deutérium kicserélődési kísérletekkel és molekuláris dinamikai szimulációkkal össze tudtuk hasonlítani. A Fourier-transzformált infravörös spektroszkópiai mérések azt mutatták, hogy a Ca^{2+} kötés szignifikánsan csökkenti az egész RD konformációs flexibilitását. Az 10 nsec-os dinamikai szimuláció során a Ca^{2+} -mentes RD szignifikánsan nagyobb (2-4 Å) fluktuációt mutatott, mint a Ca^{2+} -telített szerkezet. Elsősorban a két könnyű lánc közötti interakció volt erősebb Ca^{2+} jelenlétében (részben extra hidrogén-hidaknak köszönhetően). Eredményeink arra utalnak, hogy a CaM-kötő és Ca^{2+} -szabályozott nem-konvencionális miozinok aktivitása legalábbis részben a fentebb vázolt mechanizmussal, az RD dinamikai változásán keresztül valósul meg, sok más allosztérikus fehérje regulációjához hasonlóan.

(Debreczeni et al, *JBC*, 2005).

1.2. Rekombináns kiméra regulált miozin II fragmentumok előállítása és vizsgálata

A Ca^{2+} -szabályozott miozin II szerkezet-funkció tanulmányozását nehezíti, hogy ez idáig senkinek sem sikerült aktív fragmentumokat előállítani rekombináns úton. E pályázat témavezetője (és még néhány laboratórium a világban) sok éve próbálkozik ezzel, de sajnos kevés sikerrel. Ebből a szempontból fontos eredmény, hogy elő tudunk állítani olyan kiméra nehéz meromiozinokat (HMM), amelyek nem csak a Ca^{2+} -reguláció, de a Ca^{2+} - és a reverzibilis foszforiláción alapuló szabályozás összehasonlítására is alkalmasak. Rovarsejt kultúrában, rekombináns bakulovírusok segítségével expresszálunk olyan kimérákat, amelyek motor doménje az RLC foszforilációjával szabályozott gerinces simaizom illetve nem-izom miozin II-ből származik, míg az RD, valamint a coiled-coil szerkezetű farok domén

proximális szakasza (S2, ld. 2. fejezet) kagyló miozin eredetű. A kiméra nehéz lánc konstrukcióval (~850 aminosav) koexpresszáljuk a könnyű láncokat, amelyek a kagylóból vagy a simaizom miozinból származnak. Az S2 a konstrukciók egy részében teljes hosszúságú (~250 aminosav), de készítettünk olyan rövid HMM-eket is, ahol a molekula dimerizálását egy, az élesztő GCN4 transzkripciós faktorból származó leucin-cippzár motívummal érjük el. Ez utóbbi molekulák reményeink szerint jobb eséllyel kristályosodhatnak, mint a már több mint tíz éve próbált proteolitikus HMM preparátumok. A jövődő kristályosítás szempontjából fontos, hogy a bakulovírus expressziós rendszer igen jó hatásfokkal termeli a kiméra miozinokat (2. ábra; 100 ml sejt kultúrából 2-5 mg miozint izoláltunk Ni-affinitás oszlopon, ami az irodalmi adatok alapján „rekord közeli” mennyiség). Megjegyzendő, hogy eddig nem sikerült még semmilyen regulált miozin fragmentum kristályszerkezetét meghatározni.



2. ábra
Simaizom miozin MD - kagyló miozin RD-S2 kiméra expressziója rovarsejtekben (bal), Ni-affinitás oszlopon tisztított rekombináns HMM (jobb; nyíl, nehéz lánc fragmentum)

Az eddigi, még csak konferenciára bejelentett eredményeink szerint a könnyű lánc hibrid-kimérák (ahol az RD nehéz lánc és ELC alegysége kagyló miozinból, míg az miozin RLC simaizom miozinból származik) kettős regulációt mutatnak: alapállapotban az ATPáz aktivitásuk és motilitásuk gátolt, viszont aktiválni lehet őket mind Ca^{2+} -mal, mind az RLC-t foszforiláló miozin könnyű lánc kináz (MLCK) enzimmal (ld. táblázat).

HYBRID/CHIMERA CONSTRUCTS		MOTILITY ($\mu\text{m}/\text{sec}$)	
		-P	+P
Smooth HC/RLC/ Scallop ELC	-Ca	0	1.29±0.28 (30)
	+Ca	0.42 ±0.09 (28)	1.34 ±0.25 (22)
Smooth HC/ Scallop ELC/RLC	-Ca	0	-
	+Ca	0.40 ±0.18 (12)	-

A csak kagyló miozinból származó RD-vel bíró kimérák természetesen „csak” Ca^{2+} -kötés hatására mutatnak aktivitást. Az eredmények azt sejtetik, hogy a bekapcsoló jel (pozitív ill. negatív ion) és a szabályozási pozíció (ELC ill. RLC) különbözősége ellenére, az összes regulált miozin II szabályozáshoz szükséges molekulán belüli kommunikációs útvonal közös a motor és regulációs domén között. Bár a nagyfelbontású szerkezetek hiányában csak találgatni lehet, munkahipotézisünk szerint a Ca^{2+} illetve a foszforiláció az RD dinamikájának befolyásolásán keresztül szabályozza a motorfunkciót. A kimérák részletes kinetikai analízisét megkezdtük steady-state és tranzien kinetikai módszerekkel.

(Németh et al., *MBE Vándorgyűlés*, 2006)

2. A miozin fej/rúd régió szerkezetvizsgálata

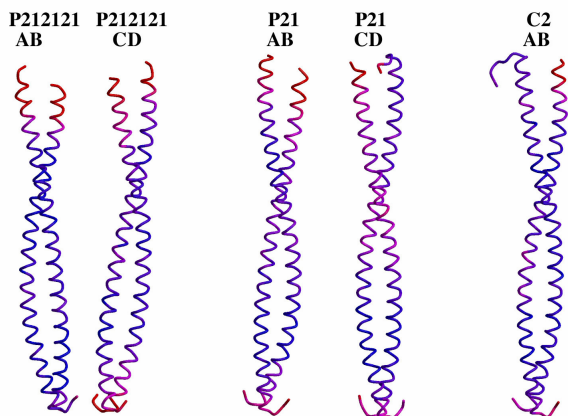
A miozin motorok dimerizációjáért a *coiled-coil* szerkezetű farok domén felelős. Bár ezt a szerkezeti elemet Crick már 1953-ban megjósolta, az első nagyfelbontású szerkezeti kép csak a múlt század kilencvenes éveiben, a GCN4 transzkripció faktor Leu-cippzár motívumának kristályosítása után született meg. A fibrózus *coiled-coil* fehérjék kristályosítása sokáig megoldhatatlan feladatnak tűnt, hiszen ezek általában nem tökéletes *coiled-coil*-ok, azaz rövidebb fragmentumaik nem dimerizálnak, a hosszabb molekulák viszont parakristályokat képeznek. Ezért a miozin farok domén, illetve a fej/rúd régió szerkezetvizsgálata is sokat késett, habár ennek a molekulársznek a miozin funkciójában és regulációjában is fontos szerepet tulajdonítanak. Néhány évvel ezelőtt egy egyszerű „trükkkel” sikerült a kagyló miozin proximális farok doménjét kristályosításra alkalmas dimer formában előállítanunk. Feltételeztük, hogy az egyébként instabil peptid szegmenst (korábbi vizsgálataink azt mutatták, hogy minimum 300 aminosav szükséges a farok doménből, hogy a fragmentum *coiled-coil* dimert képezzen) Leu-cippzárral dimerizálásra készíthetjük. A fej/farok tradicionális határát jelentő konzervatív Pro utáni 50 aminosavhoz (7 heptád ismétlődés) kiméraként a hozzáragasztottuk az élesztő GCN4-ből származó Leu-cippzárt (4 heptád). Az így kialakított kiméra *E. coli* expressziós rendszerben könnyűszerrel előállítható volt, szobahőmérsékleten stabil dimert képzett (CD spektroszkópiával követett hődenaturáció alapján: $T_m = 49,5^\circ\text{C}$), és szerencsénkre röntgendiffrakciós vizsgálatokra alkalmas kristályokat is képzett. A szerkezetet Carolyn Cohen csoportjával együttműködve (Brandeis Univ., USA) 2,5 Å-ös felbontásban sikerült meghatározunk. [Megjegyzem, hogy ezt a munkát kisebb részben a korábbi OTKA pályázatomban finanszírozta.]

Az α -helikális *coiled-coil* a fehérjeevolúció egyszerű, de sok mindenre alkalmas szerkezeti „találmánya”. Az általunk meghatározott szerkezettel egy funkcionálisan minden bizonnyal instabil fehérje szuperhélixet sikerült vizualizálnunk. A proximális S2 flexibilitására és/vagy letekeredésére szükség lehet a miozin erőgenerálása és szabályozása során is. Ennek a régióknak az instabil voltára korábbi, többek-között a mi csoportunktól származó vizsgálatok is rámutattak, de direkt bizonyítékot erre, még ha kissé paradox módon is, a kristályszerkezet szolgáltat. A proximális S2 szerkezete számos olyan tulajdonságot mutat, ami a flexibilitás illetve instabilitás fizikai alapját képez(het)i. Az N-terminális 14 aminosava rendezetlen szerkezetű. A Leu-cippzártól az N-terminális irányában fokozatosan válik instabillá a *coiled-coil*, 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. Feltűnő, hogy a meghatározott szerkezetben nincs egyetlen interhelikális sóhid sem (elsősorban a *g-e'* sóhidaknak van fontos *coiled-coil* 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, amelyik ráadásul aszimmetrikusan „csomagolódik” a dimer két lánc között. Mivel a kristály aszimmetrikus egységében két S2 dimer található, számos, a fentebb említett oldallánc különböző konformációt vesz fel a két szerkezetben. A Lys 867-es pozíciónál a két S2 dimerben a *coiled-coil* hajlása különbözik ($\sim 1^\circ$ ill. $\sim 5^\circ$). Ezen régió funkcionális jelentőségére utal, hogy a β -szívizom miozin nehéz láncban egy pontmutáció örökletes hipertrófiás kardiomiopátiához vezet.

(Li et al., *Nature*, 2003)

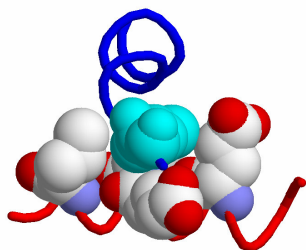
A Leu-cippzárral stabilizált proximális S2-t, a korábbi 16°C -on kívül 4°C -on is sikerült kristályosítani (a korábbtól eltérő két tércsoporttal), s a szerkezetüket meghatározni. Ennek az a jelentősége, hogy egyrészt kivédhetjük a korábbi szerkezetet ért kritikát, hogy a megfigyelt

coiled-coil instabilitást esetleg a magasabb kristályosítási hőmérséklet következménye, másrészt most már összesen öt S2 szerkezetet tudunk összehasonlítani (3. ábra). Az új szerkezetek megerősítik a fentebb összefoglalt, a *coiled-coil* instabilitását okozó tulajdonságokat, így a sóhídak hiánya miatt poláros *a* és *d* pozíciós oldalláncok kitettséget, az *a* pozíciós Lys-ek rossz, a Gln849 aszimmetrikus „csomagolódását”, a *coiled-coil* tovább vastagodását az N-terminális irányába. A leglényegesebb újdonsága a még nem publikált szerkezeteknek, hogy a teljes szekvencia láthatóvá vált: α -helikális a 838-as pozíciótól, *coiled-coil* a 840-es pozíciótól.



3. ábra
A kagyló miozin proximális S2-Leu-cippzár kiméra szerkezete három kristályszerkezetben (két kristály aszimmetrikus egysége két S2 dimert tartalmaz)

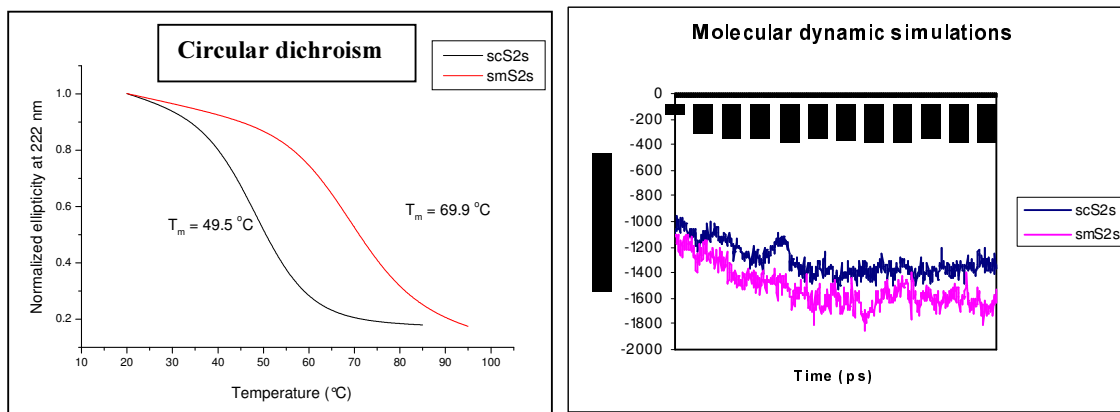
Mivel a korábban meghatározott kagyló RD és teljes fej (S1) szerkezetekben a Pro835 utáni két aminosav α -hélix szerkezetű, bizonyítottá vált, hogy a miozin fej/rúd régióban a nehéz lánc (beleértve a korábban feltételezett „határ” Pro-t is) folyamatos α -hélixet is tud képezni. A korábban Cohen és mtsi által publikált miozin és az új S2 szerkezeteket egybeépítve elkészíthetjük az első, kísérleti adatokra épülő „kétfejű” HMM modellt (amelyet még finomítás alatt áll). A fent említett „teljes α -hélix” konformáció a modelljeinkben csak egy láncra terjed ki, míg a többiben (összesen 5 dimer, azaz 10 lánc szerkezetéről van információnk, ld. ábra) több-kevesebb N-terminális aminosav kinyújtott coil szerkezetet mutat. Ez alapján feltételezhetjük, hogy az utóbbiak azt az állapotot reprezentálhatják, amikor a fej/rúd régió nem α -helikális szerkezetű, mivel azt nem stabilizálja a közeli RLC A-hélice (azt jelenleg nem tudjuk, hogy ez a motor „kikapcsolt”, „bekapcsolt”, vagy valamilyen intermedier állapotára lehet jellemző). További következtetésünk, hogy a fej/farok tényleges határa nem a Pro835, hanem a Leu836 és Leu837 közötti kötés lehet, mivel a Leu836 oldallánca alakít ki egy, a konzervatív KPLL α -hélixet stabilizáló interakciót az RLC A-hélixével (4. ábra).



4. ábra
„Knobs-into-hole” interakció a miozin nehéz lánc Leu836 (kék) és az RLC A-hélix négy aminosav oldallánca között

Ez utóbbi egy tipikus, a *coiled-coil* „core”-ra jellemző „knobs-into-hole” interakció a Leu oldallánc és a szomszédos lánc négy oldallánca által kialakított „lyuk” között (íme egy, a sok tanulságos példa közül, amelyet az „egyszerű” *coiled-coil* szerkezetektől tanulhatunk). Az új szerkezeteket összevetve az irodalomban a miozin II regulációról rendelkezésünkre álló

adatokkal (ld. részben a zárójelentés 1. fejezete), az „on-off” átmenetről azt mondhatjuk, hogy abban a fej/rúd régió dinamikus voltának nagy valószínűséggel fontos szerepe van. Amennyiben azt feltételezzük, hogy a „kikapcsoló” jel (a regulációs típustól függően a Ca^{2+} disszociációja vagy az RLC defoszforilációja) „lefelé” hat, azaz nem közvetlenül az RD felől a motor felé, hanem az RLC dinamikáját, s ezen keresztül a fej/rúd régió mobilitását változtatja meg, akkor a szerkezeti eredményeink a fizikai alapján mutatják ennek a regulációs mechanizmusnak.



5. ábra. A kagyló és simaizom proximális S2 stabilitásának összehasonlítása CD spektroszkópiával (bal) és molekuláris dinamikai szimulációval (jobb)

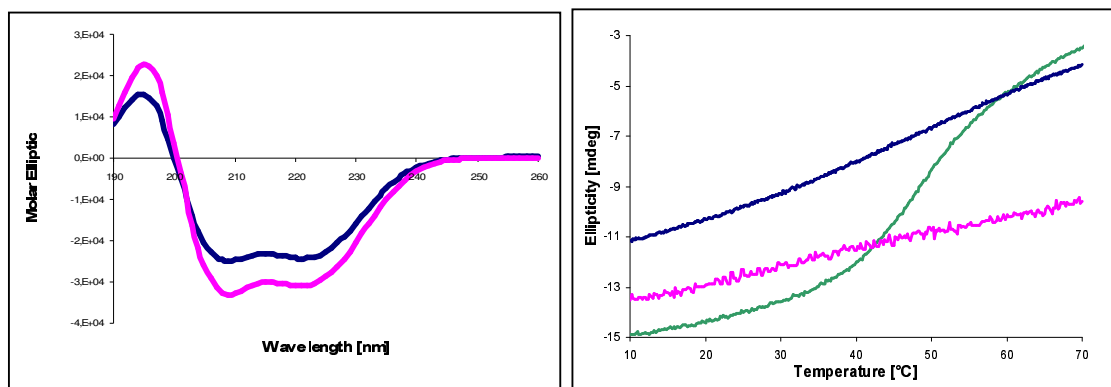
A *Nature*-ben publikált munkánkban összevetettük az instabilnak talált kagyló S2 szekvenciát más miozin II proximális rúd szekvenciákkal, s azt a következtetést vontuk le, hogy azok stabilabb *coiled-coil* szerkezettel rendelkeznek, mint a kagyló izom miozin. Ennek magyarázata lehet, hogy a harántcsíkolt izom sokkal gyorsabb szabályozást kíván, mint pl. a gerincesek simaizom avagy nem-izom miozin II motorjai, s ez lehet a magyarázata a jóval flexibilisebb szerkezetnek. Kísérleti bizonyítékot a fenti predikciókra CD spektroszkópiával és molekuláris dinamikai szimulációkkal szereztünk. A simaizom S2 hődenaturációjának T_m értéke 20°C -kal magasabb a kagyló S2-nél. Az általunk meghatározott S2 térszerkezetekből mint kiindulási modellekből, illetve a simaizom proximális S2 homológia modelljéből (a simaizom S2-Leu-cippzár konstrukciót is sikerült kristályosítanunk, de azok nem adtak értékelhető diffrakciós mintázatot) kiindulva egy 10 ns-os szimuláció is szignifikánsan nagyobb konformációs fluktuációt mutat az instabil kagyló proximális S2-nél mint a simaizom S2-nél (5. ábra).

(Brown, J., Resetnyikova, L., Süveges, D., Kardos, J., Hetényi, Cs., Cohen, C., Nyitray, L., *kézirat megírás alatt*)

3. Miozin VI dimerizáció vizsgálata fark doménekkal. Egyszálú, sok töltéssel rendelkező stabil α -hélix (SAH), mint fehérjeszerkezeti elem?

A miozin VI egyedülálló a miozin szupercsaládban abból a szempontból, hogy az egyedüli „hátrameneti” motor, amely az aktin filamentum negatív vége felé képes mozogni processzív módon (ráadásul ~ 36 nm-t lép, annak ellenére, hogy a „nyaka” csak egy IQ motívumot tartalmaz). A fark régiója szekvencia predikció alapján *coiled-coil* dimert képez, amelyet a globuláris kargó kötő domén követ. Az *in vitro* kísérleteket mesterségesen dimerizált (pl. miozin II S2-vel) HMM-mel végezték, ami a feltétele a processzív motor funkciónak, viszont a natív miozin VI-ot csak monomer formában sikerült izolálni. Az

ellentmondás feloldására rekombináns, *coiled-coil*-nak prediktált konstrukciókkal (amelyeket *E. coli* expressziós rendszerben állítottunk elő) szerkezeti vizsgálatokat kezdtünk. Kémiai kereszkötés (zeró-hosszúságú karbodiimid kereszkötőkkel), limitált proteolízis és főként spektroszkópai eredményeink azt mutatják, hogy a miozin VI farok régió szubdoménjei sem külön-külön, sem együttesen NEM képeznek dimert, kivéve, ha Leu-cippzárral stabilizáljuk őket (kiméraként, hasonlóképpen a proximális S2 konstrukcióinkhoz; ld. 2. fejezet). A cc2-nek elnevezett konstrukció (Glu916-Arg981) ennek ellenére tipikus α -helikális CD spektrumot mutatott. A spektrum hőmérsékletfüggése nem mutat kooperativitást, ellentétben a *coiled-coil* szerkezetek jelentős kooperativitást mutató letekeredésével (6. ábra). A trifluoretanolban felvett spektrumot referencia α -helikális spektrumnak tekintve, a cc2 α -hélix tartalma ~70%.

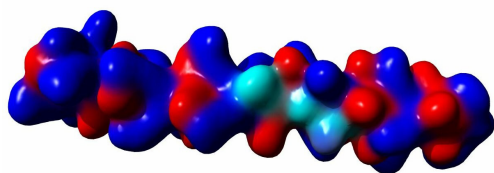


6. ábra. A natív cc2 (fekete) és cc2+50% TFE (magenta) CD spektruma (bal), valamint a 222 nm-nél ellipticitás hőmérsékletfüggése (jobb). A kooperatív letekeredést a *coiled-coil* kagyló S2 mutatja (zöld)

A cc2 szekvenciája meglepően magas töltéssűrűséget mutat (0,86):

EKERKRREEDEKRRRKEEEEERRMKLEMEAKRKQEEEERKKREDEK

Eredményeink azt sejtetik, hogy a cc2 a hármast négyes ismétlődéseket mutató ellentétes töltések között kialakuló, só-hidakkal stabilizált stabil egyszálú α -hélixet konformációt vesz fel fiziológiás körülmények között. Modellépítés és molekuláris dinamikai szimulációk megerősítik, hogy a cc2 konstrukció egyszálú stabil α -hélixet (SAH) alkot (7. ábra).



7. ábra
A cc2 szubdomén *in silico* modellje (- töltés, piros; + töltés, kék)

A mi munkánk már folyt, amikor megjelent egy közlemény a miozin X farok régiójában szintén *coiled-coil*-nak prediktált ~30 tagú peptidről, amelyet a szerzők szintén stabil, egyszálú α -helikális szerkezetűnek találtak (Peckham et al, *JBC*, 2005). Megkíséreltük a cc2 fragmentum kristályosítását önmagában és fúziós fehérjékként is (cc2-Leu-cippzár, cc2-GFP), eddig siker nélkül. NMR spektroszkópai vizsgálataink azonban, legalábbis részleges sikerrel kecsegtetnek (^{15}N és ^{13}C -jelölt mintákkal).

Felvetődött bennünk, hogy hasonló töltésmintázatot követő szekvenciák előfordulnak-e más fehérjékben? Egy kereső algoritmust írtunk, amelyet a Swissprot adatbázison lefuttatva, kb. 50 találatunk volt, köztük a két nem-konvencionális miozin szekvencia és a kaldezmon egy korábban már szintén egyszálú α -hélixnek talált doménje. Nagyrészt átfedő találatokat

adott az aminosav szekvencia adatbázisok tesztelése töltésmintázat frekvenciák Fourier-analízisével is. Közös ezekben a szekvenciákban, hogy egyikük térszerkezete sem ismert. Jelenleg néhány kiválasztott szekvencia rekombináns konstrukcióként történő előállításán dolgozunk, hogy igazolhassuk a SAH domén, mint szerkezeti motívum általános elterjedését a fehérjék világában.

(Süveges et al *JMRCM*, 2005)

4. Egy motor domén konformációs szenzor vizsgálata *Dictyostelium* miozinon

A miozin motor domén (MD) egy különösen reaktív Lys oldalláncot tartalmaz, amelyet a 60-as évek óta használnak konformációs szenzorként, mivel az MD és az RD interakciós felszínén, azaz a funkcionális domének kommunikációs útvonala mentén fekszik. Az itt ismertetett munka ezzel a lizinnel és a kémiai környezetével foglalkozik, helyspecifikus mutagenézis segítségével, ami az első ilyen jellegű vizsgálat ezzel a reaktív aminosavval. A korábbi, a reaktív lizinnel kapcsolatos kísérletek zömét vázizom miozin II-vel végezték, amelyet heterológ expressziós rendszerben (a kagyló izom miozinhoz hasonlóan) gyakorlatilag nem lehet előállítani. A laboratóriumunknak azonban rendelkezésre áll a „miozinológiában” legegyszerűbben használható rekombináns miozin rendszer, a *Dictyostelium* sejtes nyálkagomba, amely az MD mutánsok homológ expressziójára kiválóan alkalmas. 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 kiindulási konstrukció egy olyan mutáns MD volt, amelyből Málnási Csizmadia A. eltávolított három Trp-t, ezáltal csak egyetlen, szintén konformációs szenzorként használható Trp-t tartalmaz (Trp501+). 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 egyedüli szerepét a Lys84 különleges reaktivitásában. A közeli pozitív töltés csökkentheti a Lys ϵ -amino pK-ját. A taszító interakció az MD két szubdoménje (az N-terminális „25 kDa” és az ún. konverter szubdomének) között jön létre akkor, amikor a nukleotid kötőhely közelében levő „switch-2” hurok régió (a G-fehérjékkel homológ, konformációs kapcsolóként működő egyik szerkezeti elem) nyitott állapotban van. A nukleotid kötés hatására bekövetkező, a motor „felhúzásáért” felelős nagy konformációs átmenetet kiváltó „switch-2” nyitott-zárt konformációs változás a taszító ionpárt eltávolítja egymástól, ezáltal a Lys reaktivitása is csökken. A rendszer érdekessége, hogy a reaktív Lys trinitrofenilálását a közeli Trp501 fluoreszcenciájának Förster-energiatranszferral történő kioltásával is követni lehetett. Összefoglalva megállapíthatjuk, a Lys84 reaktivitása és annak nukleotid-függése az összes konvencionális miozinra egyaránt jellemző, és az ATPáz ciklus során bekövetkező dinamikus változásokat szenzorként tükrözi.

(Kovács et al, *JMRCM*, 2004)

5. Vizsgálatok egy kalmodulin-kötő vinblasztin származékkal (KAR-2).

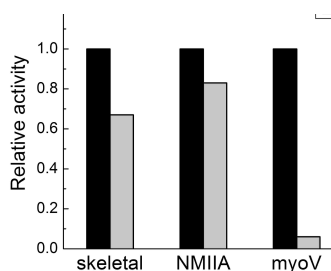
5.1. A KAR-2 kalmodulin kötésének szerkezeti alapjai.

A KAR-2 egy antimikrotubuláris hatású, potenciális rákellenes szer, amely kötődik a CaM-hoz is, méghozzá – mint azt Ovádi Judit munkacsoportja kiderítette –, különleges módon. Ebbe a munkába együttműködő partnerként kapcsolódtunk be. A CaM-KAR-2 komplex kristályszerkezeti és NMR vizsgálata azt mutatta, hogy a CaM KAR-2 kötőhelyéhez a fehérje N- és C-terminális doménje is hozzájárul, és a kismolekula kötődése nem befolyásolja a CaM célfehérjékhez kötődését. Ez utóbbi tény megmagyarázhatja a KAR-2

sejtbiológiai kísérletekben tapasztalt, a vinblasztinnál alacsony toxicitását. Érdekes módon, a KAR-2 komplex erősen hasonlít a trifluoroperazin-CaM komplex térszerkezetéhez, annak ellenére, hogy különböző CaM oldalláncokkal lépnek interakcióba, és a trifluoroperazin gátolja a CaM célfehérje kötését. Az NMR vizsgálatokhoz szükséges stabil izotóp jelölt kalmodulint rekombináns fehérjeként állítottuk elő, minimál táptalajon, $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ jelenlétében. (Horváth et al., *JBC*, 2005)

5.2. A KAR-2 hatása miozin II és miozin V aktivitására

A fenti munka felvetette a kérdést, hogy a nem-konvencionális miozinokhoz kötött apo-CaM-hoz, illetve a CaM családba tartozó konvencionális miozin könnyű láncokhoz kötődik-e a KAR-2 molekula és befolyásolja-e a miozinok aktivitását. A kérdés azért is időszerű, mert a miozinok csak kevés kismolekula inhibitora ismert (a trifluoroperazin az RLC-hez kötődve kis koncentrációban gátló hatású, nagyobb koncentrációban az RLC-t disszociáltatja). Eddig csak előkísérletekig jutottunk, de azt kijelenthetjük, hogy a KAR-2 kötődik a miozin nyaki régiójához (RD) és gátolja az ATPáz aktivitást (8. ábra).



8. ábra
KAR-2 hatása a vázizom miozin (skeletal), nem-izom miozin IIA (NMIIA) és miozin-V (myoV) steady-state ATPáz aktivitására.

A vázizom miozin II és a nem-izom IIA izoforma *steady-state* aktivitását a KAR-2 10 μM -os koncentrációnál 20-30%-kal csökkent, viszont miozin V aktivitása 90%-kal csökkent. Az utóbbi gátlás valószínűleg a 6 IQ motívumhoz kötődő CaM közül egy vagy kettő disszociációjának következménye, mivel szabad CaM jelenlétében a gátló hatás kivédhető. Érdekes, hogy hasonló módon fejt ki gátló hatását a Ca^{2+} , amikor telíti a miozin V CaM EF-kéz mőtőhelyeit. A disszociáló CaM azonosítására most indítottunk kísérletsorozatot.

6. Miozin V kinetikai és a kargó-kötő domének szerkezet-funkció vizsgálata

A miozin V a legtöbbet vizsgált, aktin filamentumok mentén mozgó transzport motor. Gerincesekben három paralógja van, amelyek közül a miozin Va génjéről alternatív splicing-gal több szövetspecifikus izoforma íródik át. Mutációja egerekben a *dilute* fenotípust, emberben a ritka recesszív betegséget, a Griscelli-szindróma egyik válfaját okozza. A melanocita-specifikus forma farok régiójában található exon F-hez kötődő adaptor fehérje, a melanofilin segítségével köti a legjobban ismert kargóját, a melanoszómákat. A másik két farok alternatív exon (B és D) szerepéről eddig keveset tudunk. A kargókötésben, a melanocita-forma esetében is, a globuláris farokdoménnek (GTD) meghatározó szerepe van. Ennek ellenére, mivel eddig rekombináns formában nem tudták előállítani, szerkezetéről keveset tudunk. Ugyanígy hiányos a kargók, kargó-adapterek listája és a kargókötés mechanizmusa(i)ról szerzett ismereteink is. A gerinctelenekben a miozin V motorokat sejtbiológiai szempontból sokat vizsgálták, de biokémiailag eddig nem, így az sem volt világos, hogy mennyire általánosíthatók a tulajdonságai, pl. a processzivitása.

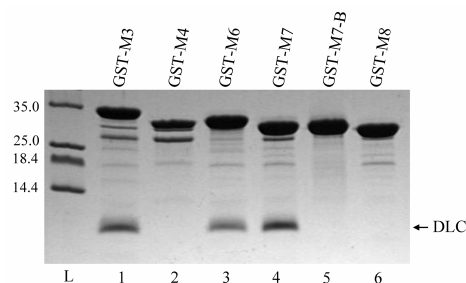
6.1 *Drosophila* miozin V kinetikai jellemzése

A *Drosophila* miozin V „egyfejű” (S1) és „kétfejű” (HMM) fragmentumait bakulovírus rendszerben expresszáltuk (könnyű láncként *Drosophila* CaM-t és a miozin könnyű lánc c-t koexpresszáltunk a nehéz lánccal együtt). A steady-state és tranzienst kinetikai mérésektől azt reméltük, hogy az összes miozin V enzimatis tulajdonságaira általánosítható következtetéseket tudunk levonni. Ezzel szemben arra a meglepő eredményre jutottunk, hogy *Drosophila* miozin V a gerinces miozin V-tól eltérően nem processzív, azaz csak a miozin II-höz hasonlóan, „csoportosan” képes motorként működni. Ennek az az oka, hogy a mechanokémiai ciklus nagyobb részét a miozin fej az aktintól levált állapotban tölti (a „duty cycle” ~0,1; a processzivitáshoz szükséges érték min. 0,5). Az *in vitro* motilitási tesztekben, a fentieknek megfelelően a *Drosophila* HMM csak magas felszíni sűrűség mellett volt képes a rodamin-falloidinnal jelölt aktin filamentumokat folyamatosan mozgatni. A motor domén aktin-kötő hurok motívumát kódoló két alternatív forma aktin affinitása a pozitív töltések számának különbözősége miatt (+3 ill. +5) eltér, de a kinetikájuk általános vonásaiban megegyezik. A meghatározott kinetikai séma (amely alapvonásaiban nem különbözik a konvencionális ill. a gerinces miozin V kinetikájától) 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 kötése között. Összehasonlítva a gerinces és a *Drosophila* miozin V kinetikáját, levonhatjuk azt a következtetést, hogy a miozin evolúciósan konzervatív transzport motor funkcióját legalább kétféle molekuláris mechanizmussal (processzív ill. nem-processzív) is meg tudják oldani ezek a motorfehérjék.

(Tóth et al, *JBC*, 2005)

6.2. A miozin Va dinein könnyű lánc (DLC) kötőhelyének azonosítása és a komplex szerkezeti-funkcionális jellemzése

A dinein könnyű láncot, egy 10 kDa-os, igen konzervatív eukarióta fehérjét, nevének megfelelően a dinein motorfehérje alegységeként írták le. Később kiderült hogy a DLC a miozin V-nek is alegysége és több tucat más citoplazmatikus fehérjéhez is kötődik. Szerepe a motorfehérjék kargókötése és/vagy regulációja lehet, egyéb funkcióiról még keveset tudunk. Sok rákos szövetben megemelkedik az expressziója, ami a proapoptotikus „BH3-only” fehérjék szekvesztrálásával és/vagy a p21-függő kináz megkötésével hozható kapcsolatba.

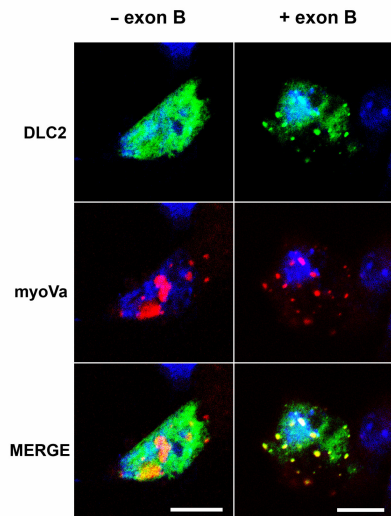


9. ábra

Miozin Va fragmentumok „pull-down”-ja GST-DLC-vel. Az exon B nélküli konstrukció = GST-M=-B nem kötődik a DLC-hez

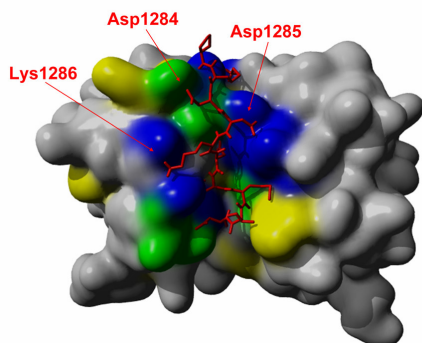
A humán miozin Va és a DLC kölcsönhatását vizsgáltuk az OTKA pályázat keretében. Rekombináns miozin Va fragmentumokat és a DLC2 izoformát expresszáltuk, majd a komplex kialakulását „pull-down” módszerrel, gélfiltrációval, natív elektroforézissel, limitált proteolízissel és spektroszkópiai módszerekkel tanulmányoztuk. A kötőhelyét a farok régió belül a mediális és disztális *coiled-coil* domén között, egy szerkezet nélküli doménben lokalizáltuk (Pro1282-Thr1293). Megállapítottuk, hogy a kötőhely kialakításában egy 3 aminosavat kódoló alternatív exon (exon B) esszenciális szerepet tölt be, ugyanis az

eltávolítása a kötést megszünteti (9. ábra). Ez utóbbi eredményt ko-transzfectált emlős sejtekkel is igazoltuk (10 ábra).

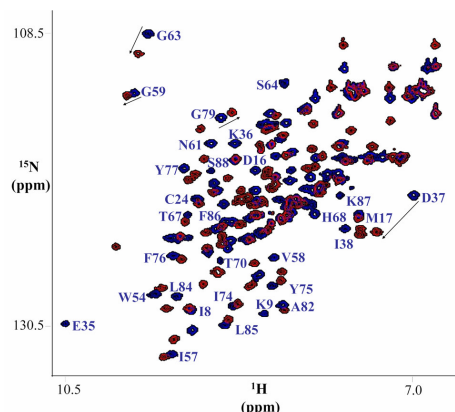


10. ábra
GFP-DLC és DsRed-miozin Va(+exon B) kolokalizációja NE4C neuroektodermális sejtvonalban (bal); az exon B nélküli miozin Va nem kötődik a DLC-hez (jobb)

A DLC kötő domén másik alternatív exonjának (exon D) nincs szerepe a DLC kötésben. NMR vizsgálatokkal és molekuláris dokkolással kimutattuk, hogy a miozin farok DLC kötő doménjéből egy kb. 8 aminosavból álló szakasz köt a DLC dimer kötőárkába, ugyanoda, ahova az eddig ismert partnerei kapcsolódnak (11. és 12 ábra).

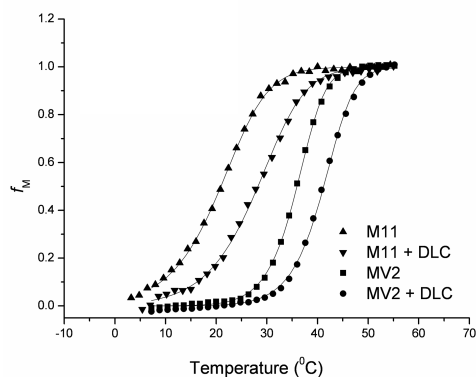
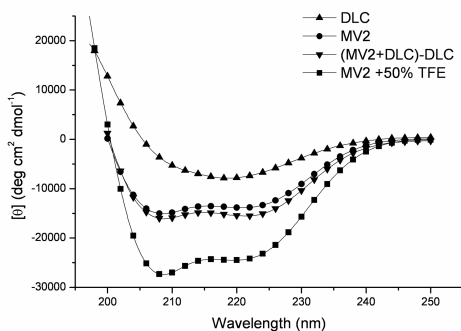


11. ábra. A miozin Va peptid (piros) -DLC dokkolt komplexe. Kék: a kötésben résztvevő aminosavak; sárga: kémiai eltolódás a HSQC spektrum alapján; zöld: kötőfelszín mindkét módszerrel azonosítva



12. ábra. Humán DLC2 HSQC spektruma (kék) és tütrálása a miozin kötőpeptiddel (piros)

CD-spektroszkópiái és limitált proteolízis vizsgálatok alapján a DLC kötés jelentősen hozzájárul a miozin Va farok stabilitásához. A CD spektrumok analízise alapján valamennyire növekszik kötőrégió α -hélix tartalma, viszont jelentősen növekszik a határoló *coiled-coil* domének hőstabilitása ($\sim 7^\circ\text{C}$ -kal; 12. ábra). Ezek szerint a DLC kötődése elősegíti a két nehéz lánc dimerizációját (azaz a *coiled-coil* kialakulását). A munkahipotézi-sünk szerint a DLC dimer-miozin Va dimer interakció aszimmetrikus, az egyik nehéz lánc kötődik csak a kanonikus DLC kötőárokba, a másik topológiai kényszerből nem éri el a szimmetrikus kötőárkot, hanem exohely(ek)hez köthet a DLC felszínén. Egyedül a fenti mechanizmus adhat



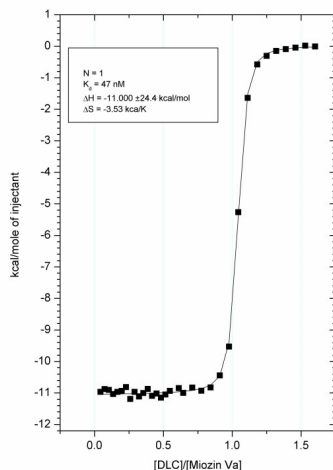
13. ábra. DLC és egy miozin farok konstrukció (MV2) CD spektrum. Az α -hélix tartalom növekedése 222 nm-nél látszik (bal). Egy rövidebb (M11) és egy hosszabb farok konstrukció hődenaturációja DLC nélkül és jelenlétében (jobb)

magyarázatot a DLC kargóköti szerepére, amikor is a két kötőhely közül az egyiket a motorfehérjének, a másikat a kargó fehérjének kell elfoglalnia.

(Hódi et al, *JMRCM*, 2005; *FEBS J.*, 2005; *Biochemistry*, 2006, bíráló alatt)

A DLC-vel kapcsolatos legújabb eredményünk, hogy a miozinhoz ill. a kargóhoz való kötődést a C-terminális aminosav előtti Ser foszforilációja szabályozhatja. Legalábbis a Ser-Glu-ra cserélve, a mutáns DLC fiziológiás körülmények között monomert képez, amely nem kötődik sem a miozinhoz, sem a potenciális kargókhoz. A DLC- miozin Va komplex, további jellemzését izotermális kalorimetriával (13. ábra), felszíni plazmon rezonancia és fluoreszcencia mérésekkel folytatjuk, s kiterjesztjük a hármas komplexek vizsgálatára, hogy a fentebb vázolt munkahipotézisünket igazolni tudjuk.

(Hódi Zs. és mtsi, *A MBK 2006. évi konferenciájára bejelentett poszter*)



14. ábra
Miozin Va farok konstrukció (MV2)-DLC komplex képződés vizsgálata izotermális kalorimetriával. Sztoichiometria: 1:1, $K_d = 47 \mu\text{M}$

6.3. A miozin Va globuláris farokdomén (GTD) vizsgálata és „kargóvadászat”

A humán miozin Va GTD expresszióját *E.coli* rendszerben próbáltuk megoldani, irodalmi előzményekből kiindulva. Azonban, másokkal egyetemben (pl. Langford et al) beleütköztünk a GTD szolubilitás problémájába. Az eddigi, több mint két éves erőfeszítéseink során csak odáig jutottunk, hogy a GST fúziós-fehérjeként előállított rekombináns GTD

renaturációját minor mennyiségben (~10 µg/l) meg tudtuk oldani (több tucat „csodareceptet” bevetve). Hasonló kitermelést tudott elérni Hammer et al. (NIH, USA) is (személyes közlés). Amit mi ezzel a mennyiséggel nem tudtunk bizonyítani, azt sikerült az említett csoportnak, miszerint a GTD a miozin V regulációjában esszenciális szerepet játszik úgy, hogy kargó jelenléte nélkül és alacsony Ca^{2+} koncentráció mellett a „kikapcsolt” állapotban visszabicsaklik és interakcióba lép a motor doménnel. Időközben a gerinces miozin V-től sokban eltérő tulajdonságokkal bíró élesztő miozin V egyik paralógjából származó GTD kristályszerkezetét megoldották. Mivel a GTD-nek csak egy szubdoménja mutat szekvencia hasonlóságot a gerincesek GTD-jével (*dilute* „core” domén), a kargókötés mechanizmusának megismerése érdekében továbbra is érdeklődésre tarthat számot a rekombináns GTD előállítása kristályosításra alkalmas mennyiségben.

A fenti „részsiker” nem volt elegendő ahhoz, hogy a GTD-vel az eredetileg tervezett „partnervadászatokat” elvégezzük. Ugyan a TAP-cimkével ellátott GTD-t Jurkat T-sejtvonalba transzfektáltuk, de nem sikerült MS-vizsgálatokra alkalmas mennyiségű kötődő fehérjéhez jutni a sejtlizátum CaM- és IgG-affinitás oszlopokon történő tisztítása után.

[Megjegyzendő, hogy ezzel a témával, a támogatás kétszeri megnyirbálása miatt kevesebbet tudtunk foglalkozni]

7. Miozin V funkcionális vizsgálata immunsejtekben

Terveink között szerepelt, hogy a miozin Va és a DLC szerepét vizsgáljuk az immunrendszer sejtjeiben. Modellrendszerként humán Jurkat-sejteket és egy patkány hízósejtvonalat használtunk. A miozin Va és a DLC T-sejt aktivációban illetve a T-sejtek apoptózisában betöltött szerepét potenciális domináns-negatív (csak a miozin Va GTD-t illetve csak a teljes disztális farok régiót tartalmazó konstrukciók) és „full-length” konstrukciók transzfekciójával vizsgáltuk. Bár irodalmi előzmények alapján úgy tűnt, hogy a miozin V-nek szerepe van/lehet a raft-mozgatások, a szinapszis-összeszerelés egyes lépéseiben, az eddigi kísérleti megközelítéssel sem a túltermeléssel, sem a domináns-negatív konstrukciókkal nem tapasztaltunk szignifikáns változásokat. Azt vélelmeztük, hogy a miozin Va kargóköti domén konstrukciók (a GTD és/vagy a disztális farokdomének valamelyike) „kititrálják” a potenciális kargókat, ily módon azok a funkciók, amelyben a transzport motornak szerepe van, gátlódnak. A negatív eredmény magyarázata lehet a miozin V paralógok redundanciája, vagyis az miozin Vb és/vagy Vc izoforma átvehette a kiesett Va funkcióját. A DLC túltermeléstől azt vártuk, hogy pl. a sejt apoptózis szignálra adott válasza csökken, azon oknál fogva, hogy a DLC szekvesztrálja a sejt teljes „BH3-only” proapoptózis fehérjekészletét (Bim, Bmf), s ezáltal a túlélés szignálok kerülnek túlsúlyba (pl. Bcl-2, Bcl-XL). Az itt kapott negatív eredmény szintén lehet redundancia következménye, mivel a két humán DLC paralóg közül csak a DLC2-vel próbálkoztunk (mivel irodalmi adatok alapján ez kolokalizál specifikusan az aktin citoskeletonhoz). Érdekes módon, a miozin V izoformák expressziós szint emelkedését sem tudtuk igazolni T-sejt aktiváció során. A kotranszfektált GFP-vel és/vagy DsRed fehérjével fuzionált miozin Va és DLC2 sejtben belüli lokalizálását konfokális mikroszkópiával végeztük el. A DLC, az irodalmi adatoknak megfelelően diffúz, főként citolazmatikus, de gyengébb maglokalizációt is mutatott. A miozin Va fragmentumok viszont feltehetőleg aggrózómákban lokalizálódtak. Ugyan felvetődött az irodalomban centroszóma lokalizáció is, de ezt centroszóma specifikus markerrel történő kolokalizációval nem sikerült megerősíteni. A sejtaktiváció során a miozin V GTD-hez kötődő molekulák „halászata” jelenleg is folyik.

[További megjegyzés, hogy a fentebb említett kényszerű forráshiány a 6.3. témán túl ezt a munkaterv pontot érintette.]

Összefoglalva a zárójelentést, a projekt lezárásáig elért eredményeinket 8 folyóirat közleményben (összesített impakt faktor 69,52), 1 bíráló alatt álló közleményben és 3 konferencia absztraktban publikáltuk. Az eddig csak konferenciákon bemutatott és a fentebb részletesen ismertetett (lásd 2.2) eredményekből 3 teljes közlemény megírása elkezdődött vagy már előkészítés alatt áll.