

A K61784 OTKA pályázat zárójelentése

A zárójelentés tárgyát képező kutatási program során a korábbi, miozinok szerkezet-funkció összefüggéseit és szabályozását tanulmányozó kutatásaimat kívántam folytatni munkatársaimmal és együttműködő partnereimmel együtt. Bár az eredeti munkatervben egyértelműen ezt a célt tűztük ki magunk elé, kiegészítve a munkacsoportom számára új területnek számító sejt szintű vizsgálatokkal, a pályázat futamideje során a kutatás tárgyában hangsúlyeltolódás történt. Ennek részben személyi részben pedig a tudományos kutatásokat rendszeresen kísérő, a „serendipity” kifejezéssel magyarázható okai voltak. Az első ok, hogy a tervezésnél az idegsejteken elvégzendő, az V-ös típusú intracelluláris szállító miozin motorfehérje funkcionális vizsgálatát megcélzó munka Tóth Judit szakértelmére (elsősorban a miozin V-tel kapcsolatos „live cell imaging” kísérletek) épült, ő azonban a pályázati futamidő kezdetekor elhagyta a munkacsoportom. A második ok, hogy egyrészt a miozinok *coiled-coil* szerkezeti elemeinek (ld. 2. kutatási téma), másrészt a miozin V egyik könnyű láncának vizsgálata során (ld. 3. kutatási téma) olyan új eredményeket értünk el, amelyek a miozin motorfehérjéken túlmutató, általánosabb fehérjetudományos jelentőséggel bírtak, s mintegy „kikövetelték”, hogy az eredeti terveinkhez képest más kutatási területekre is kitekintsünk. Szerencsére eredményeket is sikerült elérnünk, s ez utóbbi kutatási területen folytatjuk a munkát az időközben elnyert NK81950 OTKA pályázat keretében.

1. Miozin II szerkezet-funkció vizsgálatok: enzimatis ciklus és reguláció

Folytattuk olyan rekombináns HMM (nehéz meromiozin) és S1 (szubfragmentum-1) konstrukciók előállítását, amelyek alkalmasak lehetnek nagyfelbontású szerkezetvizsgálatra. A *Pecten maximus* és *Argopecten irradians* kagylóizom/ emlős simaizom kiméra HMM-ek mellett más puhatestűekből származó, szintén közvetlenül Ca^{2+} -ionok által szabályozott miozin-II HMM-ek előállításával is próbálkoztunk, amelyek alkalmasak lehetnek nagyfelbontású szerkezeti munkára. A *Placopecten magellanicus* fésűskagyló harántcsíkt és simaizmából, valamint a *Loligo paelei* (közönséges kalmár) limitált proteolízissal S1 fragmentumokat (miozin „fej”) preparáltunk. A puhatestű S1-ek aktin kötésének nukleotid hiányában kicsi a hőmérsékletfüggése (az aktin pirén fluoreszcenciájával követve), hasonlóan a miozin V-höz. Ebből a tulajdonságból következik, hogy a miozin fej szerkezete nukleotid és aktin nélkül is a rigor állapotnak megfelelő szerkezethez lehet nagyon hasonló, többek-között az aktin-árok részben bezáródik (ellentétben a pre-munkaütem és a poszt-rigor állapotokban korábban megfigyelt nyitott aktin-árokkal). Mindhárom forrásból származó S1 kristályszerkezetét sikerült meghatározni (együttműködés C. Cohen munkacsoportjával, Brandeis Egyetem, USA). Érvelésünk szerint ezzel elsőnek sikerült atomi felbontású modellt alkotni a konvencionális miozinok „rigor-szerű” állapotáról. Ezzel bizonyítottuk azt is, hogy az ún. aktin-árok részbeni záródásával együtt járó szerkezet nem csak a V-ös és VI-os osztályba tartozó miozinnál, hanem a konvencionális miozin esetében is kialakul. A szerkezeti eredmények tükrében a különböző osztályokba tartozó miozin izoformák funkcionális különbségeit az S1 szubdomének közti kontaktusok különbségeivel tudjuk pontosabban magyarázni. (1. publ., *Yang et al.*, *Structure*).

A miozin izoformák szerkezet-funkció változásával kapcsolatos másik munkánkban a motor „felhúzott” (pre-munkaütem, *recovery stroke*) állapotba kerülését perturbáltuk pont mutációk segítségével, amelyeket két, az erőkar tövével elhelyezkedő szubdomén interakciós felszínére vittünk be. Ezeket a kísérleteket a rekombináns konvencionális miozin fragmentumok előállítására leginkább alkalmas expressziós rendszerben, *Dictyostelium* nyálkagomba

sejtekben állítottuk elő. A Lys84-Arg704 közötti taszító kölcsönhatás megváltoztatásával az erőkar felhúzásának egyensúlya eltolódott az ATP hidrolízis és a foszfát felszabadulás sebességi állandóinak megváltozásán keresztül. Ezzel egy olyan kinetikai „finomhangolási” mechanizmust sikerült feltárnunk, ahol az ATP-áz ciklus *steady-state* intermedierjei közti arányok beállításán keresztül a miozin izoformák optimális erőgenerálása valósulhat meg. Ennek egyik eleme lehet, hogy a fenti mechanizmus a motor terhelési arányát (*duty ratio*) is beállíthatja, ami szintén fontos funkcionális különbség a különböző miozin formák között. Amennyiben így van (ezt további vizsgálatoknak kell eldöntenie, amelyek jelenleg folynak Kovács Mihály kollégám munkacsoportjában), az általunk hely-specifikusan módosított aminosavak a miozinok funkcionális diverzitásához közvetlenül is hozzájárulhatnak. (2. publ., *Málnási Csizmadia et al: J.Biol.Chem.*)

Az *Argopecten* fésűskagyló harántcsíkolt izom miozin és emlős simaizom vagy emlős nem-izom miozin II kiméra HMM-ek közül többet teszteltünk, s a scMD-smRDS2zip konstrukcióval (ahol a két miozin nehéz lánc dimerizációját egy GCN4 transzkripciósz faktorból származó Leu-cípzár szekvenciával stabilizáltuk) részletesebb vizsgálatokat is végeztünk. A kiméra HMM Ca^{2+} -regulációt mutat *steady-state* ATP-áz tesztben, azonkívül az *in vitro* motilitási teszt is egyértelműen mutatta a motorfehérje Ca^{2+} szabályozását. Az eredményeket (önhibánkon kívüli okból) teljes közleményben nem, csak konferencián és egy akadémiai doktori disszertációban publikáltuk (3. publ., *Nyitrai L.: MTA disszertáció*).

A rekombináns *Physarum* HMM-et (ellentétben a szintén közvetlenül Ca^{2+} -regulált puhatestű HMM-mel) elő tudtuk állítani. Ezt a miozin II-t, érdekes módon a Ca^{2+} nem gátolja, hanem aktiválja (a reguláló Ca^{2+} -kötőhelyet korábban mi azonosítottuk az ELC első EF-kéz motívumában), azon kívül az RLC foszforilációja is hozzájárul a szabályozáshoz. Hibrid mutáns könnyű láncokat tartalmazó HMM-eket állítottunk elő különböző szabályozás alatt álló miozin II-kből és vizsgáltuk a rekombináns fehérjék ATP-áz aktivitásának és *in vitro* motilitásának Ca^{2+} -érzékenységét. A teljes miozinra jellemző regulációs tulajdonságo(k)at részben sikerült reprodukálni a rekombináns HMM-mel is, de az adatok interpretálása még további kísérletek elvégzése szükséges. (4. publ. *Kawamichi et al: Adv.Exp.Med.Chem.*)

2. Helikális miozin farok domének vizsgálata: a *coiled-coil* doménektől egy magányos α -hélix fehérje szerkezeti elem felfedezéséig

Az *Argopecten* miozin S2 további öt kristályszerkezeti modelljét sikerült meghatározni a korábban előállított rekombináns kiméra konstrukcióval (a „farok” N-terminális 51 aminosavához DNS szinten egy Gly-Ser linkerrel keresztül egy leucin-cípzárt fuzionáltattunk). A proximális farok régió, mint azt korábbi eredményeink is bizonyították, instabil *coiled-coil* szerkezetű. Az újabb szerkezetek segítségével tovább tudtuk pontosítani a flexibilitás molekuláris alapjait. Pontosabban meghatároztuk a fej-farok határpontot, ami a Leu836 utáni peptidkötés. Kísérleti bizonyítékot szolgáltatottunk, hogy a 835 és 845 közötti peptidszakasz α -helikális és nem-helikális szerkezet is fel tud venni, ami a miozin működéshez elengedhetetlen tulajdonság. A kagyló és a gerinces simaizom miozin II, mint ún. közvetlenül szabályozott miozinok CD spektroszkópiai vizsgálatával és molekuladinamikai szimulációkkal is igazoltuk, hogy az indirekt módon szabályozott miozinokkal (gerinces vázizom és szívizom) ellentétben jelentősen kisebb a proximális *coiled-coil* domén stabilitása. Ez a szerkezeti instabilitás a regulált miozin II „kikapcsolt” állapotához esszenciális, mivel a nagy léptékű konformációs átmenet során (a két fej

egymással lép kölcsönhatásba és visszahajlik a proximális S2 felé) a fej-farok csukló helikális szerkezete minden bizonnyal letekeredik (**5. publ. Brown et al: J.Mol.Biol.**)

A miozin VI farok régió *coiled-coil* szerkezetűnek jósolt, erősen töltött farok doménjéről (mediális farok domén) bizonyítottuk, hogy fiziológiás körülmények között egyszálú, sóhidakkal stabilizált α -hélixet (CSAH: „charged single α -helix”) alkot. Kétféle *in silico* prediktáló programot dolgoztunk ki (SCAN4CSAH és FT_CHARGE), amelyek használatával kimutattuk, hogy a CSAH egy, a fehérjék világában általánosan elterjedt fehérjemotívum lehet. A SwissProt adatbázisban ~100, CSAH motívumot tartalmazó fehérjét jósoltunk, szigorú küszöbfeltételekkel (mindkét prediktáló programmal magas pontértéket elért szekvenciákat tekintünk csak nagy valószínűséggel CSAH-nak). A miozin VI fragmentumon túl több CSAH-nak jósolt rekombináns fehérjéről (GPC60: Golgi-specifikus fehérje; M4K4: MKKK-kináz) CD spektroszkópiával, kémiai keresztkötésekkel és molekuláris dinamikai szimulációkkal igazoltuk, hogy α -helikális szerkezetű. A CSAH motívum jelentősen különbözik mind a *coiled-coil*, mind a szerkezet nélküli fehérjemotívumoktól. A CSAH lehetséges funkciói: a motorfehérjéknél „erőkar” hosszabbítás (pl. miozin X); funkcionális/szerkezeti domének közötti merev „távartó” (pl. kaldezmon); alternatív (nem *coiled coil*) dimerizációs szerep (miozin VI). (**6. publ. Süveges et al: Proteins**)

A dimerizációs szerep bizonyítására (mivel a natív miozin VI számos irodalmi adat alapján processzív motorfehérjeként csak dimer állapotban tud működni) számos kísérletet tettünk (kémiai keresztkötés, pirén excimer fluoreszcencia), de sikertelenül. Ugyanez mondható el a CSAH atomi felontású szerkezeti biológiai vizsgálatáról (kristályosítás és NMR).

A két jósló programunkat egy publikus szerver formájában ingyenesen hozzáférhetővé tettük a kutatói közösség számára (<http://himalia.chem.elte.hu/cgi-bin/csahserver.cgi>). Az ezzel kapcsolatos közlemény publikálás alatt áll (Z. Gáspári, D. Süveges, L. Nyitrai, G. Tóth (2010): *Consensus prediction of charged single α -helices by the CSAH server, Bioinformatics, submitted*)

A CSAH motívumokkal foglalkozó *Proteins* cikkünkben leírtuk, hogy a CSAH, a *coiled-coil* (cc) és a szerkezet nélküli (IDP) fehérjerégiók *in silico* jóslása gyakran átfedést mutat. Alaposabban elemeztük ezt a kérést a cc és IDP prediktáló programok összehasonlító vizsgálatával. Ennek alapján azt mondhatjuk, hogy cc szekvenciákat gyakran IDP-nek lehet prediktálni, ami részben dimer/multimer természetükből adódik (azaz az egyszálú cc-nek nincs stabil térszerkezete). A fordított keresztpredikció sokkal ritkább, valószínűleg a cc szekvenciák jóval nagyobb szabályossága következtében. Konklúzióink, hogy a fehérjeevolúció során egy IDP szekvencia viszonylag könnyen alakulhat cc-vé, azaz jól-definiált szerkezetű fehérjerészletté (**7. publ. Szappanos et al: FEBS L**)

A *coiled coil* szerkezetre vonatkozó kiterjedt irodalom áttanulmányozása, valamint a CSAH és IDP motívumokkal való, predikációs és részben evolúciós hasonlósága alapján egy összefoglaló cikket írtunk, amelyben a *coiled coil*, mint szerkezeti evolúciós modell jelentősége melletti érveket sorakoztatunk fel (**8. publ. Gáspári and Nyitrai: BioMol Concepts**)

A CSAH motívumok klasszikus molekuláris dinamikai szimulációi segítségével magyarázatot tudunk adni az extrém magas stabilitásának több aspektusára. Öt természetes CSAH szekvencia (MYO6, MYO10, GPC60, CAM, M4K4) analízise alapján korrelációt találtunk a bázikus aminosavak (Lys, Arg) aránya és a CSAH flexibilitása között, nevezetesen magasabb Lys/negatív oldallánc arány merevebb, míg a magasabb Arg/negatív oldallánc arány dinamikusabb szerkezetet eredményez. A különböző miozinok (VI-os, X-es osztály) erőkarját hosszabbító CSAH motívumoknak szerepe lehet az adott miozin celluláris

szerepének „finomhangolásában”. Az eredményt konferencián mutattuk be (**9. publ. Espinoza-Fonseca et al: Biophys J**).

Az MD szimulációkat kiterjesztettük két szintetikusan előállított, kizárólag Arg-Glu illetve Lys-Glu ionpárokkal teletűzdelt peptidre (~60 aminosav hossz), amelyek 80°C-on is igen magas α -hélix tartalommal bírnak, s elongált rúd alakú molekulákat képeznek. A korábbi korrelációt nem tudtuk igazolni, de a szimulációs adatok sokkal részletesebb elemzéséből egyrészt további érdekes és fontos következtetéseket vontunk le, másrészt a trajektóriák alapján a CSAH motívumok mechanikai paramétereit (perzisztencia hossz, Young-modulus) is meg tudtuk határozni. A szintetikus és a természetes CSAH motívumok nagyfokú stabilitását is lokális (sóhidak) és hosszú-távú elektrosztatikus kölcsönhatások kombinációjával tudjuk magyarázni. A CSAH domének perzisztencia hosszára két, független módszerrel is 40-80 nm-et kaptunk (megjegyzendő, hogy ez a DNS L_p -jével megegyezik, míg a *coiled coil* szerkezeténél kisebb érték). Mivel a legtöbb CSAH kontúrhossza ennél jóval rövidebb (átlagban 50-60 aminosav), ezért az adataink alátámasztják CSAH motívumok mechanikai szerepére vonatkozó elképzeléseket. Az eredmények publikálása folyamatban van (*L. Michel Espinoza-Fonseca, D. Süveges, I. Derényi and L Nyitray: Structural, dynamic and mechanical properties of charged single α -helices, Biophys J., submitted (10. publ. Süveges D., PhD disszertáció)*

3. Vizsgálatok a miozin V könnyű lánc DYNLL fehérjével: egy „hub protein” jellemzése

A miozin Va paralóg farok régiójához kötődő könnyű lánc alegység a DYNLL2 (ez a ma elfogadott elnevezése a korábban általunk is DLC-nek rövidített LC8 dinein könnyű láncnak). Ez az igen konzervatív kis fehérjét eredetileg a dinein motorfehérje feltételezeten kargó kötést végző adapter alegységeként írták le. A miozin Va esetében a kötődomént a farok régió mediális és disztális *coiled-coil* szerkezetűnek prediktált doménje közé ékelődő, szerkezetnélküli és egy három aminosavból álló alternatív exont tartalmazó régióban azonosítottuk. A DYNLL kötődés hatására a kötődomén kissé, viszont a szomszédos *coiled-coil* domének jelentős mértékben stabilizálódnak, azaz a DYNLL „chaperon-szerű” szerepet tölthet be a miozin V komplex (és a dinein komplex) kialakulásában. A két fehérje közötti interakció disszociációs állandóját ITC-vel 40 nM-nak mértük. A komplex szerkezetét NMR spektroszkópiával és molekuláris dokkolással vizsgáltuk. Azt találtuk, hogy a miozin V-nak egy kb. 10 tagú lineáris peptidszakasza köt a homodimer DYNLL két alegysége kialakította felszíni árokba, de nem teljesen a már korábban meghatározott DYNLL-partner peptid komplexekkel megegyező módon. (**11. publ., Hódi et al, Biochem.**)

A DYNLL két gerinces paralógja (DYNLL1 és DYNLL2) több tucat fehérjéhez kötődik az említett két motorfehérjén kívül. Elsőként vetettük fel, hogy a DYNLL az eukarióta fehérje interakciós hálózat (az interaktom) egy csomóponti fehérjére (hub protein), amely kötőpartnereiről kimutattuk, hogy egy közös tulajdonságuk van – mindannyian szerkezet nélküli fehérjék (IUP), avagy a kötődoménjük szerkezet nélküli (IUD) és a DYNLL-kötőmotívum gyakran *coiled coil* vagy más dimerizációs motívum közelében lokalizálható. Eredményinket konferencián ismertettük, de a teljes publikálás megghiúsult, mivel egy amerikai csoport bennünket megelőzve ugyanezeket az eredményeket leköszölte. (**12. publ. Hódi et al. FEBJ J**).

A DYNLL izoformák monomer és dimer peptidkötésének kinetikai és termodinamikai jellemzését befejeztük. Megállapítottuk, hogy *in vitro* a DYNLL1 és DYNLL2 gyakorlatilag azonos affinitással köt peptideket, azaz az *in vivo* megfigyelt partner specificitás (DYNLL1-

dienin, DYNLL2-miozin Va) oka máshol keresendő. A DYNLL-kötő kétféle konszenzus szekvenciával rendelkező peptidek is közel azonos kötési erősséget mutattak ($K_d \approx \mu\text{M}$), viszont a természetes (myoVa) vagy szintetikus bivalens peptidek nagyfokú affinitás növekedést, azaz aviditást mutattak ($K_d \approx 10 \text{ M}$). Az aviditást a disszociációs sebességi állandó csökkenése okozza. ITC vizsgálatokból megállapítottuk, hogy a KXTQT típusú motívum kötése entalpia-hajtott, míg a I/VQVD és a nem-kanonikus kötőpeptidek (myo5a, Pak1) affinitásához az entalpia és az entrópia is pozitívan járul hozzá. Tranziens kinetikai mérésekből megállapítottuk, hogy a peptidek DYNLL-hez kötése két lépésben játszódik le. Egy gyorsabb kötése és egy lassabb izomerizációs lépést detektáltunk. Különböző megfontolásokból valószínűbb, hogy az izomerizáció a kötés előtt történik, s az apo-DYNLL két állapota közötti egyensúlyt jelzi („konformációs szelektív modell”). A peptid csak a „kötés-kompetens” szerkezettel alakít ki komplexet. A monomer Ser88Glu DYNLL mutánsal végzett kötési vizsgálatok azt mutatták, hogy nagy affinitású peptidek a monomer-dimer egyensúly visszazorításán keresztül képesek kötődni (egy dimer myo5a fragmentum a $K_d \sim 3 \mu\text{M}$). Azt is kimutattuk, hogy a Pak1, az irodalommal ellentétben nem foszforilálja a DYNLL Ser88-at (hanem egy, a rekombináns konstrukciókhoz használt trombin hasítóhelyet) (**13. publ. Radnai et al: J.Biol.Chem**)

A DYNLL2 és a miozin Va kötőpeptid komplexének kristályszerkezetét a projekt végére sikerült meghatározni kb. 2 Å-ös felbontásban (együttműködés Katona Gergellyel, Göteborg University). A szerkezet magyarázatot ad a „nem-kanonikus” miozin peptid kötésére, amely a korábbi dokkolás eredményét megerősítve a DYNLL ligandum-kötő árokban található, viszont a kötőpeptid az N-terminális végénél érdekes módon visszakanyarodik és rövid β -hajtú szerkezetet alakít ki önmagával. Az M7 jelű hosszabb miozin Va fragmentum és a DYNLL2 komplexének NMR vizsgálata egyrészt bizonyította, hogy a kötődőmódon rendezetlen szerkezetű, másrészt azonosítottunk a DLC kötőáron kívüli fehérje-fehérje kontaktusokat is. Jellemeztük a komplex dinamikai tulajdonságait. Végeterül HSQC titrálással enyhe pozitív kooperativitást láttunk a két azonos ligandum kötésének között. Az eredmények közlésre előkészítve. (Radnai, L., Bodor, A., Láng A., Perczel A., Weixao, WW., Katona, G, Nyitray L., in preparation).

A DYNLL kölcsönhatási hálózatának szabályozása kapcsán már említettem a Pak1-gyel kapcsolatos (részben negatív) eredményeinket. Viszont előrelépés, hogy egyrészt igazoltuk a Tyr49-es oldallánc foszforilálásának szabályozó szerepét (monovalens ligandumok kötését gátolja), másrészt a reverzibilis foszforilációban résztvevő potenciális protein-kináz enzimeket azonosítottunk adathalászat útján. Az eredményeket konferencián közöltük, teljes publikáció előkészületben (Molnár T., Rapali P., Radnai L., Nyitray L, in preparation) (**14. publ., Molnár et al.: Biokémia**)

Élesztő két-hibrid módszer segítségével egy új DYNLL1 kötőpartnert azonosítottunk, az ATMIN/ASCIZ-t, amely egy ATM-kinázzal kölcsönhatásba lépő fehérje és szerepe lehet a DNS-sérülések során kialakuló nukleáris fókuszok szabályozásában (együttműködés I. Rodriguez-Crespoval, Complutensa Egyetem, Madrid). Az új kötőpartnert élesztő-kettő hibrid módszerrel azonosítottuk. Sikerült számos biokémiai módszerrel *in vitro* és *in vivo* is igazolni a két fehérje interakcióját. Az ATMIN DYNLL-kötő régiója is egy szerkezet nélküli doménben található. A DYNLL szabályozhatja az ATMIN DNS-hibajavításban betöltött szerepét a sejtmagban, de szerepe lehet az ATMIN sejtmagi importjában is. Az eredmények közlésre előkészítve. (P. Rapali, M. Martínez-Moreno, J. Boskovic, K. Tárnok, K.

Schlett, J. Kardos, L. Nyitray & I. Rodriguez-Crespo: Dynein light chain DYNLL1 binds to the C-terminal domain of ATMinteracting protein (ATMIN/ASCIZ) and regulates its function, in preparation).

A DYNLL fehérjék biológiai szerepét RNSi technikával vizsgáljuk *C. elegans* modellben (együttműködés Vellai T.-vel). Eredmények: pleiotróp fenotípus, többek között a féreg fejlődése során az idegsejt axonok vándorlása (axon guidance) hibás, sejtfúzió defektusok, sterilitás és embrionális letalitás tapasztalható. Publikáció megírás alatt (*Vellai, Rapali et al*)

Azt kérdést tettük fel, hogy *in vitro* evolúció segítségével a természetes szekvenciáknál lehet-e nagyobb affinitású DYNLL kötőpeptidet előállítani illetve új kötőpartnereket jósolni. Fág-bemutató módszerrel hét aminosavas naív peptidkönyvtárat hoztunk létre és majdnem a teljes szekvenciateret lefedtük. A peptideket leucin-cipzár segítségével bivalens formában mutattuk be M13 fágok felszínén. 25 klónt azonosítottunk. A természetes szekvencia mintázattól a leglényegesebb eltérés a -4-es pozícióban lévő Asp hiánya és a -5-ös pozícióban lévő Val magas aránya. A természetes DYNLL kötőpeptideknél (a monovalens ill. bivalens ligandumok Kd-je 1-10 μ M ill. 3-40 nM), az *in vitro* evolúcióval kb. két nagyságrenddel nagyobb affinitású szekvenciát tudtunk előállítani. Érdekes módon a szelektált peptidek konszenzusa megtalálható egyetlen természetes fehérjében, az EML3-ban, ami egy mitózis szabályozásban résztvevő mikrotubulus-kötő fehérje. A minimális EML3 kötőpeptid és a DYNLL komplexének a szerkezetét röntgenkristallográfiával sikerült meghatároznunk, ami részleges magyarázatot ad az affinitás növekedésre. A konszenzus szekvencia alapján új predikciós algoritmust dolgoztunk ki DYNLL kötőfehérjék jóslására. A humán proeomban legalább száz potenciális partnert azonosítottunk, amelyekben a kötőmotívum intrinszik szerkezetnélküli doménben lokalizálható. (**15. publ., Rapali et al: PLoS One**)

A projekt befejezése előtt a DYNLL-lel kapcsolatos irodalmat, beleértve a funkciójával kapcsolatos legújabb saját elképzeléseinket, egy összefoglaló közleményben írtuk meg, amely jelenleg elbírálás alatt áll. A DYNLL egy „molekuláris ragasztóként” működő hub protein, amely igen kiterjedt szub-interakciókkal rendelkezik. (**16. publ. Péter Rapali, Áron Szenes, László Radnai, Anita Bakos, Gábor Pál, László Nyitray: DYNLL/LC8: A Light Chain Subunit of the Dynein Motor Complex and Beyond, FEBS J, submitted**)

4. A miozin-Va és a protein-kináz-D vizsgálata idegsejteken

Differenciálatlan, illetve retinsav (RA) kezeléssel idegsejt-irányba fejlődő NE4C tenyészetekben szemi-kvantitatív RT-PCR technika alkalmazásával vizsgáltuk a DYNLL1 és DYNLL2, valamint a miozin Va kifejeződését. A DLC mRNS mind az indukálatlan, mind a RA-val kezelt tenyészetekben közel azonos szinten volt detektálható. Western blot vizsgálataink ezekkel a megfigyelésekkel összhangban álltak, mivel a DLC izoformák mennyiségében a neuronális elköteleződés során nem tapasztaltunk változást. Egy hetes RA kezelést követően, amikor a tenyészetekben az idegsejtek már nagy számban voltak jelen, a miozin Va expressziója kissé megnőtt. Mindez az irodalmi adatokkal összhangban áll, hiszen a miozin Va az idegrendszerben nagy mennyiségben előforduló miozin izoforma.

Schlett Katalin csoportjának az elmúlt években az embrionális hippokampális idegsejtek tenyésztését, valamint a már érett idegsejtek transzfekcióját is sikerült meghonosítani. Részben németországi kollaborációnknak köszönhetően (Institute of Cell Biology and Immunology, University Stuttgart, Stuttgart) arra is lehetőségünk nyílt, hogy az idegsejtekkel termeltetett, fluoreszcensen jelzett fehérjék intracelluláris transzportját élő sejteken végezzük, gyors *live cell imaging* technika segítségével is nyomon követhessük. A GFP-jelöléssel ellátott, teljes hosszúságú miozin Va fehérjét Lipofectaminos transzfekciót követően sikerült az érett morfológiájú idegsejtekben termeltetni. Az axonokban a GFP-jelet diszkrét „pöttyök” formájában detektáltuk, amelyek a *live cell imaging* felvételeken jól láthatóan mozogtak. Az

axonokban a mozgás iránya elsősorban anterográd volt, sebessége a 0,1 – 0,5 $\mu\text{m}/\text{sec}$ sebességtartományba esett. A mozgási mintázatra jellemző volt, hogy 5-10 másodperces mozgási szakaszok után rövidebb-hosszabb idejű megtorpanásokat is megfigyeltünk. Eredményeink szerint a GFP-vel jelzett miozin Va fehérje a szinaptikus vezikulákhoz asszociált szinaptofizin fehérjével nem kolokalizált, így a miozin Va valószínűleg nem a szinaptikus vezikulák szállításában vesz részt. Live cell imaging felvételeinkkel azt is bizonyítani tudtuk, hogy a hippocampális idegsejtek axonjaiban a miozin Va fehérje a protein kináz D (PKD) enzimmel együtt mozog – megfigyeléseink alapján valószínűsíthető, hogy a miozin Va és a PKD egyazon multiprotein komplexhez kapcsolódik. Érdekes megfigyelésünk volt, hogy a fluoreszcensen jelzett miozin Va és a PKD molekulák között csak akkor figyeltünk meg kolokalizációt, illetve közös transzportot, ha a vad típusú PKD-t termeltettük az idegsejtekkel. Ha a PKD domináns negatív pontmutációját (PKDkd) expresszáltattuk, akkor a PKDkd jel a miozin Va előfordulásával már nem mutatott korrelációt. Mindez arra utal, hogy a PKD aktivitás szükséges ahhoz, hogy az enzim a feltételezett multiprotein komplexhez kapcsolódhasson. Ahhoz, hogy a két fehérje axonokban betöltött szerepéről többet tudhassunk, az axonokban megfigyelhető PKD, illetve miozin transzport elemzését jelenleg is folytatjuk. A fenti, részleges eredményinket még nem publikáltuk.

Embrionális hippocampusz sejtekben magas PKD aktivitást mutattunk ki a Golgi-komplexben és dendritekben, viszont nem volt PKD az érő axonokban. eGFP-fuzionált wt és konstitutívan aktív PKD a transz-Golgi hálózatban alig volt megtalálható, viszont egy domináns-negatív PKD mutáns elsősorban itt volt lokalizálható és gyakorlatilag tönkretette a neuronális Golgi-komplexet. Az inaktív mutáns hatására az idegsejt dendrit hálózata redukálódott, valamint az aktív változat fokozta a dendrit arborációt. Következtetésünk, hogy a PKD szelektíven részt vesz a hippocampusz sejtekben a Golgi-hálózat fenntartásában és a dendrit-hálózat kialakításában. *(17. publ. Czöndör et al: Mol Biol Cell)*