

Funkcióra hangolva: a miozin 5a motordomén kommunikációs útvonalainak feltérképezése

Doktori (PhD) értekezés

Nagy Nikolett

Témavezető: **Dr. Kovács Mihály**

az MTA doktora, habilitált tudományos főmunkatárs

ELTE TTK Biokémiai Tanszék

Biológia Doktori Iskola

Szerkezeti Biokémia Doktori Program

Tanszékvezető: **Prof. Nyitray László**

az MTA doktora, tanszékvezető egyetemi tanár

Iskolavezető: **Prof. Erdei Anna**

az MTA rendes tagja, tanszékvezető egyetemi tanár

Programvezető: **Prof. Nyitray László**

az MTA doktora, tanszékvezető egyetemi tanár



Budapest, 2013.

*„A tudomány nem képes megfejteni a természet alapvető rejtélyeit.
És ez azért van, mert mi magunk is részei vagyunk annak
a rejtélynek, amit szüntelenül próbálunk megfejteni.”*

Max Planck

TARTALOMJEGYZÉK

I.	ÖSSZEFOGLALÁS.....	5
II.	SUMMARY	6
III.	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	7
	Mitől miozin a miozin - szerkezet és funkció.....	7
	A miozin 5 osztály.....	12
	Általános működési elvek és egyedi momentumok a miozinok enzim mechanizmusában .	17
	1. A kezdetektől.....	17
	2. Miozinok szerkezeti egységei és a miozinfaj legfontosabb szerkezeti elemei	20
	3. Aktin kötés.....	24
	4. Terhelési arány (duty-ratio) és processzivitás	31
	5. A terhelés (load) szerepe a miozin motorok működésben.....	36
	6. Az ATP hidrolízise és az erőkar felhúzás.....	38
	7. Erőgenerálás	42
	8. Termék felszabadulási lépések: foszfát (P _i) és MgADP felszabadulás.....	46
	9. A miozin 5a fej enzimműködése (összegzés).....	54
IV.	CÉLKITŰZÉSEK	56
V.	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	58
	Miozin 5a DNS konstrukciók előállítása.....	58
	Miozin 5a <i>bacmid</i> és fehérje konstrukciók előállítása.....	59
	1. Bacmidok készítése	59
	2. Transzfekció, vírus amplifikáció	61
	3. Flag-címkés miozin 5a fehérje konstrukciók termelése és preparálása.....	63
	Aktin preparálás.....	64
	Fluoreszcensen-jelölt fehérjék előállítása.....	65
	Mérési módszerek.....	66
	1. Fluoreszcens spektroszkópia és oldatkinetikai mérések.....	66
	1.) <i>Steady-state</i> és bazális és aktin-aktivált ATP-áz aktivitás.....	67
	2.) <i>Steady-state</i> fluoreszcencia spektroszkópia.....	68
	3.) <i>Steady-state</i> koszedimentáció.....	69

4) Tranziens kinetikai mérések.....	69
i. Nukleotid kötés.....	71
ii. Foszfát felszabadulás.....	71
iii. ADP felszabadulás.....	72
iv. Aktin kötés.....	73
v. Aktomiozin komplex disszociációjának vizsgálata.....	73
vi. ATP hidrolízis.....	74
2. Motilitási mérések.....	75
3. Szerkezeti modellezés.....	76
VI. EREDMÉNYEK.....	77
1. Első témakör: <i>A konzervatív switch-2 hurok egyetlen, miozin osztályonként variábilis elemének szerepe a miozin 5a motor működésében</i>	77
Probléma és megközelítése.....	77
Mérésekhez használt fehérjekonstrukciók.....	79
Az Y439 mutációja nem okoz fennakadást a miozin 5a motor nukleotid-kötési és ATP hidrolizáló képességében, illetve a foszfát felszabadulásában sem okoz jeletős változást.....	79
Az Y439 mutációi az ADP felszabadulás aktin-aktivációjának megszűnését eredményezik.....	83
Az Y439A mutáció lassú, ugyanakkor processzív haladást eredményez.....	85
Az Y439A mutáció Mg^{2+} -függő módon szünteti meg az ADP felszabadulás aktin-aktivációját.....	86
Az Y439 a <i>switch-1</i> hurok közreműködésével befolyásolja a MgADP felszabadulást.....	87
Az Y439 mutáció befolyásolja az aktin-kötés energetikáját.....	89
Az első témakörhöz kapcsolódó táblázatok.....	91
2. Második témakör: <i>Az N-terminális - konverter régió kölcsönható felszín szerepe a miozin 5a motor működésében</i>	93
Probléma és megközelítése.....	93

Mérésekhez használt fehérjekonstrukciók.....	96
Az I67K mutáns megőrzi a vad-típusra jellemző gyors ATP-kötési és hidrolizáló képességet, ugyanakkor stabilizál egy <i>off-pathway</i> ATP-kötött intermediert.....	96
Az I67K mutáns foszfát felszabadulását az aktin sín jelenléte a vad-típushoz hasonlóan, markánsan aktiválja.....	104
Az I67K mutáció megszünteti az ADP felszabadulás aktin-aktivációját.....	105
Az I67K mutáns mérsékeltebb ATP-áz aktivitást mutat, ugyanakkor megőrzi a vad-típusra jellemző magas <i>steady-state</i> aktin-kötöttségi arányt.....	105
Az I67K mutáció befolyásolja a <i>rigor</i> aktin kötést.....	107
Az I67K mutáció hatására a miozin 5a motilitása lelassul, illetve érzékennyé válik az ATP koncentrációra és a mechanikai terhelésre.....	107
Az második témakörhöz kapcsolódó táblázatok.....	110
VII. EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE.....	113
1. Az Első témakör eredményeinek megbeszélése.....	114
2. A Második témakör eredményeinek megbeszélése.....	120
VIII. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS KITEKINTÉS.....	126
IX. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	128
X. PUBLIKÁCIÓK.....	129
XI. ÁBRÁK ÉS TÁBLÁZATOK JEGYZÉKE.....	131
XII. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	133
XIII. FÜGGELÉK.....	136
XIV. IRODALOM.....	140

I. ÖSSZEFOGLALÁS

Az aktomiozin ciklus során megvalósuló mechanokémiai energiaátalakítás számos sejtfolyamat alapja az élővilágban. Az aktomiozin ciklus a legkülönbözőbb működési mintázatot mutató miozinok esetében is hasonló enzimatisus lépésekből áll. A miozin szupercsalád meghökkenítő funkcionális diverzitása azonban, a különböző miozin motorok aktomiozin ciklusának specifikus adaptációját igényli az adott funkcióhoz. A miozin 5a motor a sejten belüli rövidtávú anyagszállítás kulcsszereplője. Egyedi molekulaként részt vesz melanociták szállításában, a *Purkinje*-sejtek dendrittüskéibe történő *SER* transzportjában, illetve fotoreceptor sejtek és *cochlea* érzéksejtek jelátviteli folyamatainak lebonyolításában is. A kétféjű miozin 5a processzív, lépegető mechanizmusa az aktin filamentum mentén számos egyedi, adaptációs mechanizmust feltételez, illetve igényel a miozin 5a egyedi fejeinek aktomiozin ciklusában. Doktori munkámban, ezért a miozin 5a molekula egyedi fejeiben működő, funkcionális adaptációt biztosító mechanizmusok feltérképezését tűztem ki célul. Munkatársaimmal elsőként karakterizáltuk a vad-típusú egér (*Mus musculus*) miozin 5a aktomiozin ciklusának kinetikai sajátosságait, illetve a miozinfej célzott mutációi révén, a vad-típusú miozin 5a motorra jellemző inter - (aktin és miozin közötti) és intramolekuláris kommunikációs útvonalakat bolygattuk meg. Munkánk feltárta, hogy a nukleotid-kötő helyen található konszenzus *switch-2* hurok miozin - osztály specifikus aminosav pozíciójának kulcsfontosságú allosztérikus szabályozó szerepe van az aktin-aktivált, Mg^{2+} - függő ADP-felszabadulás folyamatában. A miozin 5a tirozinja az osztály specifikus pozícióban a *switch-2* egyedi szerkezetét eredményezve biztosítja a motor adaptációját a gyors, processzív működéshez, mely kulcsfontosságú lehet a fentebb már említett gyors ingerület-átvitelt igénylő sejtek működésében. Továbbá azonosítottuk, hogy a tirozinnek köszönhető egyedi *switch-2* szerkezet teszi lehetővé a miozin 5a motor kis aktiválási energiát igénylő, gyors aktin kötését a miozin nukleotid-mentes állapotában. A miozinfej N-terminális szubdoménje és az erőkar bázisának tekinthető *konverter* közötti kommunikáció megbolygatása rámutatott a kölcsönható felszín osztály-specifikus szerepére a miozinok energiaátalakító aktomiozin ciklusában. Miozin 5a esetében a kölcsönható felszín működésének megzavarása az erős aktomiozin kölcsönhatás meggyengülését, továbbá a nukleotid-kötő zseb módosult működését vonta maga után. Ez együtt járt a processzív motilitás lassulásával, illetve az ATP koncentrációra és a mechanikai terhelésre való fokozott érzékenységgel.

II. SUMMARY

The mechanochemical energy transduction realized by actomyosin enzyme cycle is the basis of several intracellular processes in eukaryotic organisms e.g. muscle contraction, tension maintenance and intracellular transport. The actomyosin cycle consists of similar enzymatic steps in different myosins which are performing different functions in cells. However, the fascinating diversity of myosin superfamily requires specific and/or unique adaptation of actomyosin cycle of different myosins to the specific function.

The processive, hand-over-hand stepping mechanism of myosin 5a on the actin filament assumes and requires the presence of several unique adaptation mechanisms in the actomyosin cycle of myosin 5a heads. In my PhD study I aimed at the mapping of functional adaptation mechanisms of the intracellular cargo transporter myosin 5a. These mechanisms may provide specific role of myosin 5a in melanocyte transport, *SER* transport into the dendritic spines of *Purkinje*-cells and in signal transduction of the retina and *cochlea* receptor cells. We performed the first detailed kinetic characterization of wild-type mouse (*Mus Musculus*) actomyosin 5a cycle and we altered the wild-type inter - (between actin and myosin) and intramolecular communication pathways by introducing point mutations into the functional regions of the myosin head. The investigation of myosin-class specific position of *switch-2* loop in the nucleotide-binding site revealed the regulatory role of this amino acid position in the actin-activated, Mg^{2+} - dependent ADP release process. Wild-type myosin 5a contains tyrosine in this class-specific position. In this work we determined that the tyrosine induced unique structure of *switch-2* in myosin 5a provides rapid processive translocation of myosin 5a on the actin which seems to be essential in the above mentioned, rapid signal transduction processes. Furthermore, we elucidated that this tyrosine induced unique structure of *switch-2* promotes the low energy-barrier *rigor* actin binding of myosin 5a as well. Perturbation of the N-terminal subdomain (NTS) - *converter* interface of myosin head revealed central, nevertheless myosin class-specific role of this interface during actomyosin cycle. In myosin 5a the altered communication of NTS-*converter* interface caused weakening of the strong actomyosin interaction and the altered functioning of nucleotide-binding pocket. In two-headed myosin 5a, it was coupled to slower processive motility and higher sensitivity of ATP concentration and mechanical drag.

III. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Mitől miozin a miozin - szerkezet és funkció

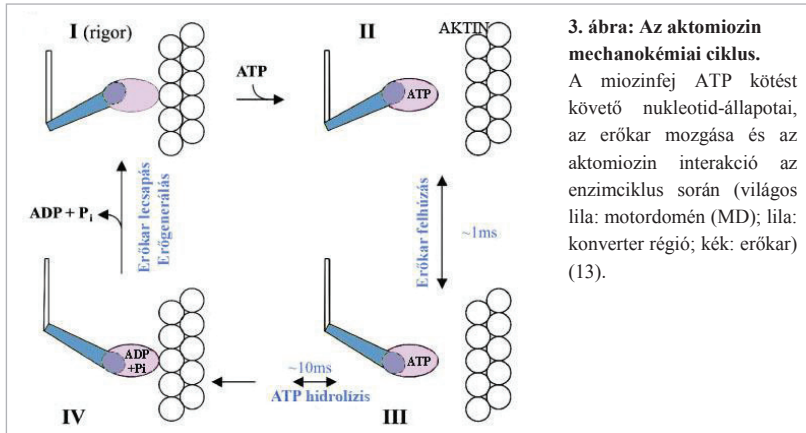
A motorfehérjék a nukleozid-trifoszfátokban (NTP) tárolt kémiai energiát mechanikai energiává alakítva számos, különböző feladat elvégzésére specializálódott mozgatórendszer működését teszik lehetővé prokariótákban és eukariótákban egyaránt (1).

Két nagy csoportjukat a lineáris motorok, illetve a forgómotorok (ATP szintáz, bakteriális flagellum) alkotják. A lineáris motorok közé tartoznak a citoskeletális miozin, kinezin, dinein motorok, a polimer aktin, tubulin motorok (2), illetve a nukleinsav és egyéb motorokhoz tartozó RNS-, DNS-polimerázok, helikázok, transzlokázok.

Az aktin filamentum mentén mozgó miozin motorok megjelenése az eukarióta szervezetek kialakulásával hozható szoros összefüggésbe (3-5). A miozinok nagyfokú diverzitása, mely a napjainkban ismert 35 osztály több száz képviselőjének köszönhető (**1.A, B ábra**), az eukarióta szervezetek evolúciója során teljesedett ki (5, 6). Szinte kivétel nélkül minden eukarióta szervezet működésében képviseltetik magukat és jelentősen hozzájárulnak az eukarióta életformák komplexitásához (**1.C ábra**) (3). Az eukariótákban kifejeződő miozin izoformák száma egyre bővülő tendenciát mutat, ahogy az evolúciós ranglétrán feljebb haladunk. Egyes emlősök esetében a miozin gének száma akár a 40-et is elérheti. A vörös algák és a protista diplomonad csoport képviselői a szabályt erősítő kivételek, melyek miozin motorok nélkül is „képesek élni” (3, 7).

Felépítését tekintve minden miozin egy vagy két nehézláncból és az azokhoz nem kovalensen kapcsolódó könnyűláncokból áll (**2. ábra**) (8). A nehézlánc N-terminálisán helyezkedik el a globuláris motordomén (MD), mely az ATP és aktin-kötő helyet tartalmazza. Ehhez kapcsolódik a nyaki régió mely ún. erőarként funkcionál és a motordoménben az ATP kötés hatására történő szerkezetváltozásokat a motordoménben található *konverter* régió közreműködésével képes felerősíteni (9). A nyaki régió hosszát a könnyűlánc kötő motívumok száma szabályozza, melyhez a fent említett könnyűláncok kötődnek. A legnagyobb diverzitást mutató C-terminális fark régióhoz tartoznak azok a domének, melyek az adott miozin specifikus funkciójában meghatározó szerepet töltenek be (dimerizációért felelős coiled-coil, kargó kötés, membrán kihorgonyzás stb.) (**2. ábra**) (10).

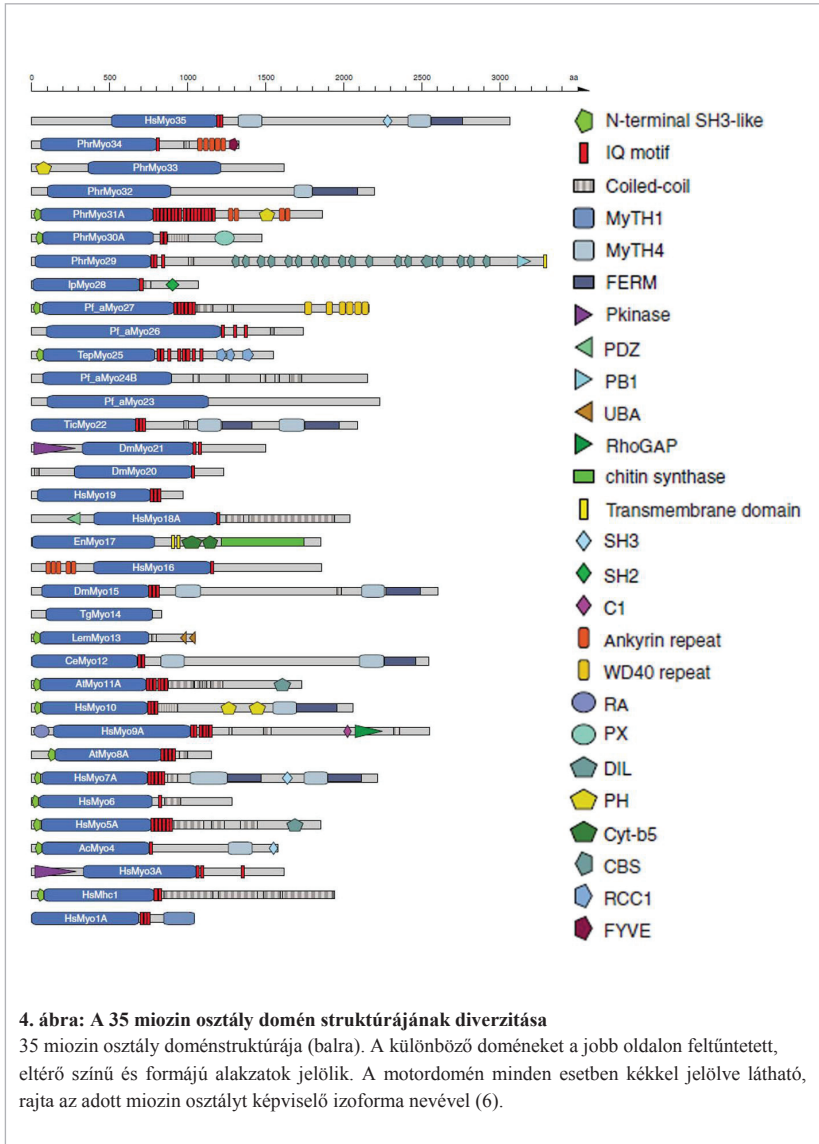
A miozin osztály képviselői az ATP-ben tárolt kémiai energiát az aktinon való elmozdulás révén képesek hasznos mechanikai munkavégzésre fordítani (10-12). Minden miozin esetében ciklikus aktomiozin interakción alapul a kemomechanikai energiaátalakítás (**3. ábra**) (13). Ez az aktinnal való ciklikus kapcsolattartás a nukleotid-tartalom változásával kapcsolt szerkezeti átrendeződéseknek köszönhető (9, 11).



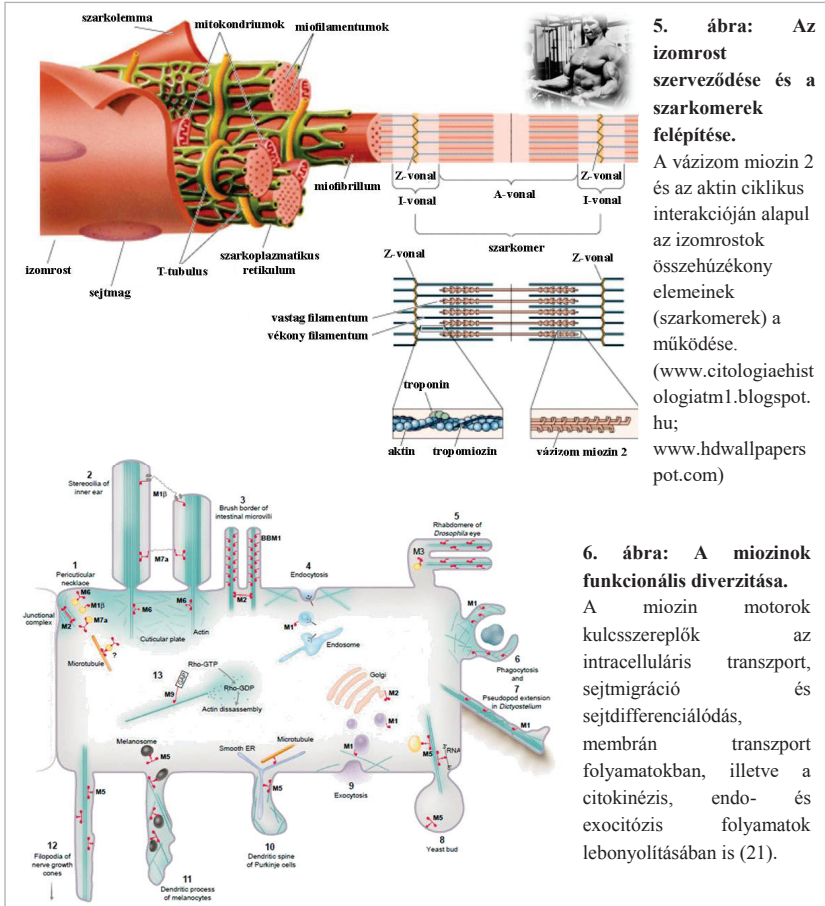
3. ábra: Az aktomiozin mechanokémiai ciklus.

A miozinfaj ATP kötést követő nukleotid-állapotai, az erőkar mozgása és az aktomiozin interakció az enzimeciklus során (világos lila: motordomén (MD); lila: konverter régió; kék: erőkar) (13).

A motordomén szekvenciális eltérései, a nyaki régió eltérő hossza, illetve a domén struktúrában tapasztalható eltérések (**4. ábra**) biztosítják azt a meghökkentő működésbeli és ezáltal funkcionális változatosságot, amely a miozinok szupercsaládját jellemzi (**5 - 6. ábra**) (11). A legújabb eredmények szerint, melyek 328 organizmus mintegy 2269 miozin genomjának összehasonlító analizisén alapulnak, a miozinok megközelítőleg harmincöt különálló osztályba sorolhatók (**1. ábra**) (6). Konvencionális miozinok közé tartoznak a miozin 2 osztály képviselői, melyek nagyfokú szerkezeti és funkcionális hasonlóságot mutatnak az osztály névadójával, mely az elsőként felfedezett kétféjű vázizom miozin 2 volt (**5. ábra**). Ide soroljuk a vázizom mellett, a szívizom, simaizom és a nem-izom miozin 2 (NM2) motorokat (14). A miozin 2 osztályhoz tartozó izoformákra általánosan jellemző, hogy hosszú coiled-coil régiójukon keresztül kisebb-nagyobb kötegekbe képesek rendeződni mini-filamentumokat, illetve filamentumokat alkotva. A nem-konvencionális miozinok csoportja foglalja magába a fennmaradó miozinokat. A mintegy 40 humán miozin közül 14 a konvencionális miozinokhoz tartozik, míg a fennmaradó 26 humán miozin 12 különböző miozin osztályt képviselve a nem konvencionális miozinok közé tartozik (15).



Funkciójukat tekintve a miozin motorok oroslánrészt vállalnak az eukarióta szervezetek legkülönbözőbb „motorizálást” igénylő élettani folyamatainak lebonyolításában. Az izomkontrakcióban betöltött szerepük mellett (5. ábra), kulcsszereplők például az intracelluláris transzport, sejt migráció és sejt differenciálódás, membrán transzport folyamatokban, a citokinézis, endo- és exocitózis folyamatában, illetve a citoskeleton plaszticitás fenntartásában (6. ábra) (10, 11, 15-21).



5. ábra: Az izomrost szerveződése és a szarkomerek felépítése.

A vázizom miozin 2 és az aktin ciklikus interakcióján alapul az izomrostok összehúzóköny elemeinek (szarkomerek) a működése. (www.citologiahistologiattm1.blogspot.hu; www.hdwallpaperspot.com)

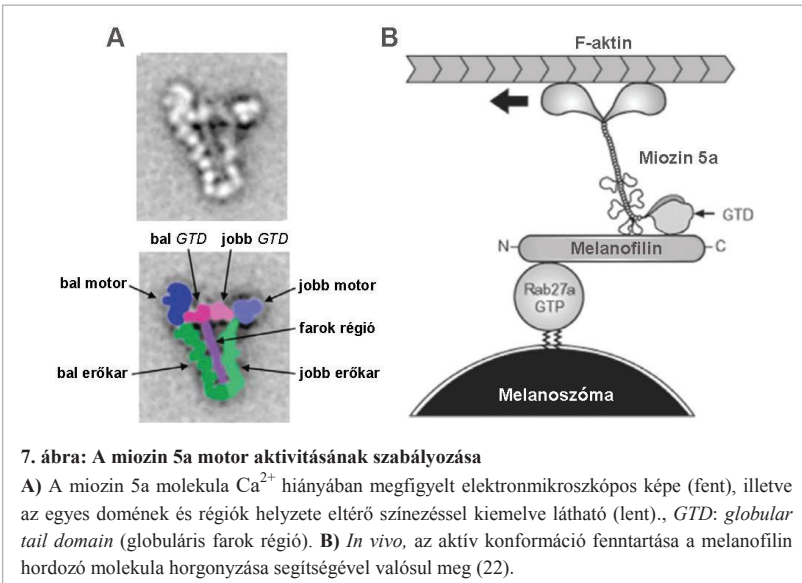
6. ábra: A miozinok funkcionális diverzitása.

A miozin motorok kulcsszereplők az intracelluláris transzport, sejt migráció és sejt differenciálódás, membrán transzport folyamatokban, illetve a citokinézis, endo- és exocitózis folyamatok lebonyolításában is (21).

A miozinok aktivitásának szabályozása külső és úgynevezett „beépített” (belső) szabályozási mechanizmus(ok) révén valósul meg. A vázizom-miozin 2 esetében a kalcium (Ca^{2+}) - érzékeny troponin - tropomiozin komplex szabályozza az aktomiozin interakciót külső szabályozási tényezőként (5. ábra) (22). A vázizom miozin-2 „beépített” szabályozása, a simaizom és nem-izom miozin 2 motorok aktivitásának szabályozásához hasonlóan, az erőkarhoz kapcsolódó könnyűláncok (regulációs könnyű lánc (*regulatory light chain* (RLC)) foszforilálódásán alapul, mely könnyű-lánc kinázok közreműködésével valósul meg (23) (24).

Miozin 1 és 6 motorok esetében a motordomén egy felszíni régiójának foszforilálódása (Ser, Thr) felelős az aktin-aktivált ATP-áz aktivitás ki - be kapcsolásáért, illetve modulálásáért az aktinnal való kölcsönhatás befolyásolása révén (24).

A miozin 5a és 7a motorok aktivitását, a miozinok többségéhez hasonlóan, „beépített” szabályozási mechanizmus befolyásolja. Mindkét motor esetében az enzimatis aktivitás szabályozása intramolekuláris feltekeredésén alapul (22) (24, 25). Miozin 5a esetében *in vitro* körülmények között figyelték meg, hogy Ca^{2+} - függő konformáció változáson alapul az aktivitás szabályozása. Ca^{2+} hiányában a motordomének visszahajlanak és kapcsolatba lépnek a globuláris fark régióval (7.A ábra) (22).



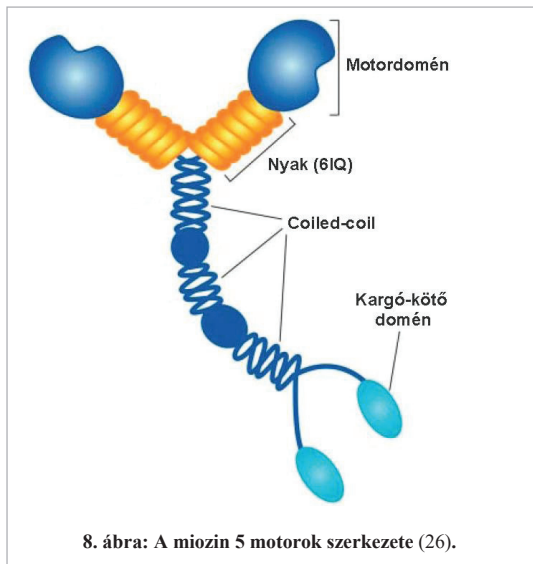
Az allosztérikus szabályozás a motordomén egy, az aktin-kötő helytől távol eső, olyan felszíni régiója segítségével valósul meg, mely Ca^{2+} hiányában kapcsolatba képes lépni a globuláris farok régióval (C-terminális farok régió) és ezáltal modulálja az aktin-aktivált ATP-áz aktivitást. Fiziológias körülmények között azonban a Ca^{2+} - alapú szabályozás nem valószínű (24). A magas Ca^{2+} koncentráció az erőkar IQ motívumai és az azokhoz kapcsolódó kalmodulin könnyűláncok közötti kölcsönhatás gyengülését eredményezi. Ez a miozin 5 erőkar - erőgeneráló - szerkezetének megbomlásához és erőkifejtő képességének csökkenéséhez vezet (24). Fiziológiásan, a Ca^{2+} koncentráción alapuló szabályozás mellett, egyéb eszközök is rendelkezésre állnak az aktív konformáció fenntartására. Melanocitákban a melanofilin hordozó molekula C-terminálisával kötődik a miozin 5a globuláris farok régiójához, illetve N-terminálisával a Rab27a GTP-áz fehérjéhez. Utóbbi közvetlen kapcsolatban áll a szállítandó melanoszómával (**7.B ábra**). A melanofilin hordozó molekula C-terminálisa és a miozin 5a globuláris farok régiója között kialakuló kapcsolat biztosítja a kedvezőtlen feltekeredést biztosító aminosavak elfedését a farok-régióban, ezáltal fenntartva az „aktív” konformációt (**7.B ábra**).

A miozin 5 osztály

Az értekezés alapjául szolgáló doktori munkám vizsgálatainak tárgya a miozin 5a motor, ezért az alábbiakban a miozin 5 osztály általános sajátosságait részletezem.

A miozin 5 osztály a nem-konvencionális miozinok közé tartozik. Gerincesekben három izoformája (miozin 5a, 5b, 5c) fordul elő (26).

Az osztály egyes képviselői egyedi molekulaként az aktin filamentum mentén lépegetve szállítják célhelyükre a különböző sejtalkotókat (17, 27-31), míg más miozin 5 izoformák sok - molekulás egységekben működve vesznek részt sejtalkotók transzportjában (26, 32, 33).



Felépítésüket tekintve a miozin 5 osztály képviselőit két dimerizált nehézlánc és két könnyűlánc építi fel (8. ábra). A nehézláncok N-terminális „feji” régióját egy-egy motordomén, illetve az ahhoz C-terminálisan kapcsolódó egy-egy erőkar alkotja. Az erőkarok IQ motívumaihoz kapcsolódnak a szabályozó funkciójú (kaldmodulin, sárgával jelölve a 8. ábrán) könnyűláncok. Az erőkar C-terminálisán

helyezkedik el a dimerizációért felelős *coiled-coil* formáló régió és az azt követő kargó-kötő domén.

A nagyfokú szerkezeti egyezés ellenére a különböző izformák enzimeciklusa karakteres kinetikai különbségeket mutat (11, 26, 32, 34-39). A miozin 5a és 5b izoformák *processzív*¹ enzimatis mechanizmust mutatnak, valamint enzimeciklusukban az erős aktinkötött állapotok dominálnak (*magas terhelési arány, high duty ratio*) (9.A ábra) (40).

¹ processzív: számos enzimeciklus és azzal járó mechanikai lépés teljesítésére képes a sínről történő leválás nélkül egyszeri sínre kötés alkalmával

Enzimciklusuk sebesség-meghatározó lépése az ADP felszabadulás az aktomiozin komplexről (**9.A ábra**) (35-37, 41).

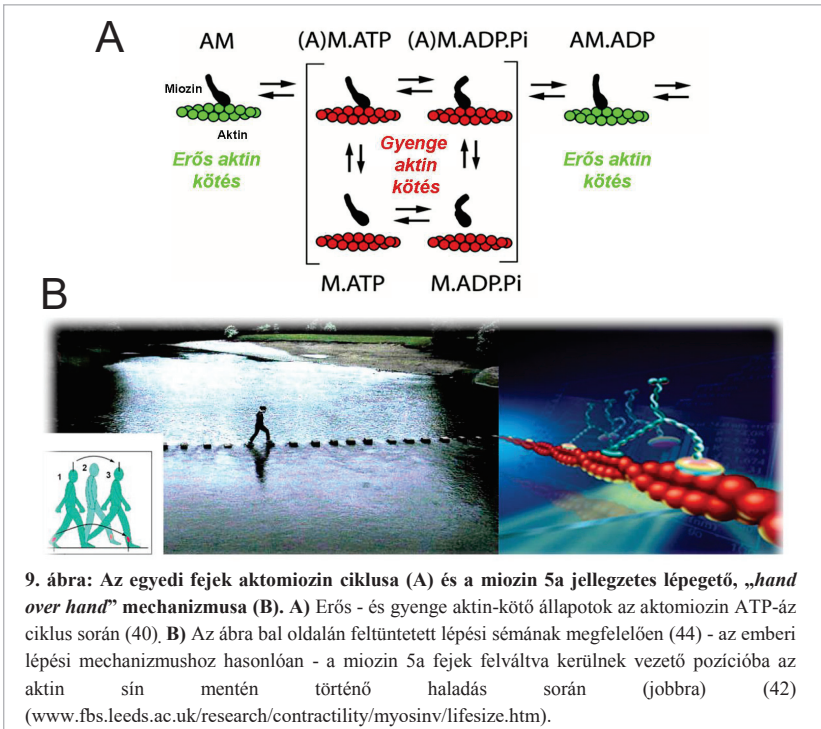
A miozin 5c izoforma nem mutat *processzív* működési mechanizmust, enzimciklusában a gyenge aktinkötött állapotok dominálnak (*alacsony terhelési arány, low duty ratio*), enzimciklusának sebesség-meghatározó lépése a P_i felszabadulás az aktomiozin-ADP komplexről (**9.A ábra**) (26, 32). Ezen sajátságok alapján biokémiailag a nagy sokaságban működő miozinokkal (pl. izom miozin 2) mutat hasonlóságot. Ezeket a speciális kinetikai különbségeket a „*Terhelési arány (duty ratio) és processzivitás*” fejezetben részletesen tárgyalom.

Enzim mechanizmusuk markáns eltéréseinek ellenére (pl.: miozin 5a és 5c) – körvonalazódnak látszik a miozin 5 osztály általános szerepe a sejten belüli szállítási folyamatokban. Eltérő biokémiai sajátságaiknak megfelelően a különböző miozin 5 izoformák eltérő stratégiákat alkalmazva teljesítik szállító feladatukat. A miozin 5a és 5b motorok egyedi molekulaként működnek (17, 27-30), míg a miozin 5c és egyes miozin 5 izoformák, például a *Drosophila melanogaster* miozin 5 valószínűleg a fentebb már említett sokmolekulás egységekben működve tölthet be szállító funkciót (26, 32, 33).

Az egyedi molekulaként működő miozin 5a motorok sejtservecskék, vezikulák, melanoszómak sejten belüli, rövidtávú szállításáért felelősek (42). Megfelelő működésük kulcsfontosságú a gyors ingerület átvitel igénylő sejtek működésében (17, 30, 31, 43). *Purkinje*-sejtekben a sima-felszíni endopalazmatikus retikulum (*SER*) dendritűskékbe történő transzportját biztosítják. Ezáltal lehetővé teszik a sejtek - *SER* által közvetített IP_3 , Ca^{2+} - függő - hatékony ingerület átvitelét (30). Idegsejtek és fotoreceptor sejtek *pre*-és *poszt-szinaptikus* jelátviteli folyamataitban is részt vesznek (17). A retina fotoreceptor sejtjeiben például a *szinaptikus* végződések úgynevezett „*ribbon*” struktúráiba halmozódnak a *szinaptikus* vezikulák. Ezzel biztosítják, hogy a sejtek azonnali „tüzeléséhez” szükséges ingerület átvívó anyagkészlet mindig rendelkezésre álljon. Napjaink kutatási eredményei igazolták, hogy túltermelésük a tumoros sejtek metasztatizálásának is fontos jelzője lehet (15).

A miozin 5a motorok jellegzetes lépegető („*hand over hand*”) mozgással (**9.B ábra**) haladva szállítják kargójukat általában a sejtcentrumtól a sejtp periféria felé. Az aktin filamentum pozitív vége felé mozogva akár mikrométeres távolság teljesítésre is képesek az aktin sínről történő leválás nélkül (*processzív* motorok) (28, 29, 44). A lépegető mozgás során a fejek felváltva kerülnek vezető pozícióba (42) (**9.B ábra**).

Az aktin filamentum helikális ismétlődéseit átívelő, 36 nm-es lépéshossz teljesítéséhez 1 ATP molekulát hasznosítanak az egyes enzimeciklusok során (29, 42, 45).



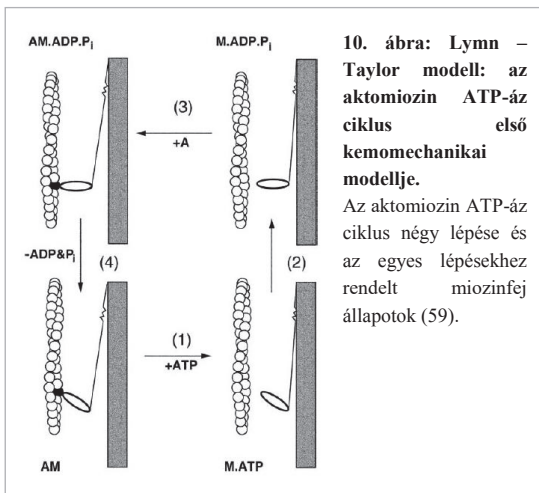
A két fej összehangolt működése biztosítja a **9.B ábrán** bemutatott, jellegzetes lépegető mozgást. Továbbá a miozin 5 processzív mozgásának kinetikai feltétele, hogy az egyedi miozin fejek az ATP-áz ciklusidő nagy részét aktinhoz kötött állapotban töltsék (**9.A ábra**). Az egyedi molekulaként működő miozin 5a egyedi fejek enzim mechanizmusa, így jelentősen eltér a nagy sokaságban működő izom miozin 2 fejek mechanizmusától (11, 41). Kiemelten a termék-felszabadulási lépések kinetikája mutat markáns eltéréseket a két motor esetében. Miozin 5a esetén a sebesség-meghatározó lépés a fentebb már említett ADP felszabadulása az erős aktin-kötő aktomiozinról (**9.A ábra**) (41). Az aktomiozin-ADP komplex hosszú életidejének köszönhetően a tartó fej elegendő időt biztosíthat az éppen lépő fej számára a lépés elvégzéséhez.

Általános működési elvek és egyedi momentumok a miozinok enzim mechanizmusában

1. A kezdetektől

A napjainkban ismert számos aktomiozin alapú mozgatórendszer megismerése és működési mechanizmusuk feltérképezése Kühne vizsgálatai nyomán a 19. század elején indult útnak. Kühne munkássága jelentette az első lépcsőt az izom fehérjekomponenseinek azonosítása során (46). A miozin és aktin fehérjék izolálása és azonosítása Szent-Györgyi Albert kutatócsoportjának munkásságához köthető (47). Szent-Györgyi Albert csoportjának azonban további mérföldköveket is köszönhetünk az aktomiozin rendszer működésének megértésében (48). A két fehérje ciklikus kölcsönhatását és az ezzel kapcsolt ATP hidrolitikus ciklust ők azonosították. Továbbá Szent-Györgyi Albert, Biró Endre munkatársával figyelte meg elsőként az aktinnak a miozin ATP-áz aktivitásra gyakorolt, fokozó hatását (49).

Huxley H. E. és Huxley A. F. párhuzamos munkássága nyomán született meg az úgynevezett „csúszó filamentum” modell, mely szerint a vastag filamentumok keresztthidakon (melyet később miozinfeként azonosítottak (50-52)) keresztül kapcsolódnak a vékony filamentumokhoz és ezeknek a keresztthidnak a ciklikus kötődésén alapszik a vastag és vékony szálak egymáshoz képest történő elcsúszása (53, 54).



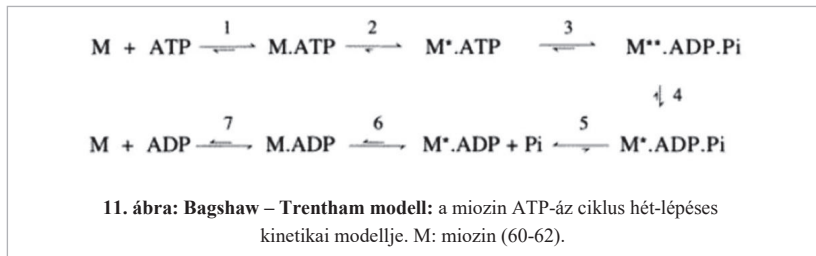
Az elcsúszást a „kilendülő keresztthid” modell alapján képelték el. A modell szerint, a vastag filamentumokhoz csatlakozó keresztthidnak a vékony filamentumokkal bezárt szöge változik valamiféle ciklikusság szerint és ez okozza a szarkomerek rövidülését (55, 56).

A tényleges erőgeneráló mechanizmus lépéseinek

leírása elsőként Lymn és Taylor nevéhez fűződik (**10. ábra**) (57-59). A modell az ATP-áz ciklus egyes lépéseit a kereszthíd különböző állapotaihoz rendelte az aktomiozin ciklus során.

A négyütemű „kilendülő kereszthíd” modell alapján a kereszthíd aktin hiányában 45°-os szöget zár be az aktin filamentummal. Az ATP kötése indukálja az aktomiozin komplex disszociációját. Ezt követi az ATP hidrolízise a miozin aktinról levált állapotában, mely a kereszthíd felhúzását és a szomszédos kötőhelyre való bekötését eredményezi az aktin filamentumon. A visszakötések a kereszthíd és az aktin 90°-os szöget zárnak be egymással. Az aktin kötést követő, kereszthídban végbemenő szerkezetváltozások vezetnek a kereszthíd lecsapásához, ezáltal az aktin filamentumok megközelítőleg 10 nm-es elmozdításához (erőgenerálás). Szintén az aktinhoz kötődés hatására, az erőgenerálással kapcsoltan mennek végbe a termék-felszabadulási lépések (foszfát (P_i) és ADP felszabadulás), mellyel a ciklus végéhez ér, illetve újra indul ATP jelenlétében.

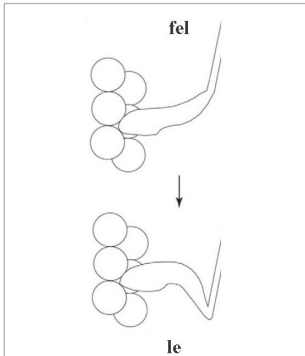
A Lymn-Taylor modellt követően, Bagshaw és Trentham nevéhez fűződik a miozinok ATP-áz ciklusának, nyúl vázizom miozin 2 motordomén triptofán fluoescencia változásai alapján megalkotott, már sokkal részletesebb, hét-lépéses kinetikai modellje (**11. ábra**) (60-62).



Eddig ismeretlen szerkezeti állapotokat, illetve az azok közötti átalakulásokat azonosítottak a miozin ATP-áz ciklusa során a molekula összfluoescenciáját (triptofán jel alapján) követve gyorskinetikai módszerekkel. A modell első lépése az ATP kötése a miozinhoz, melyet az utközési komplex (M.ATP) izomerizációja követ (2. lépés). Az izomerizációt követően alakul ki a magasabb fluoescenciájú M*.ATP állapot (**11. ábra**). Az ATP hidrolízisével egy, az előzőnél még magasabb fluoescenciájú M**.ADP.P_i állapot alakul ki (3. lépés). Ezt követően a M**.ADP.P_i komplex visszatér a hidrolízist megelező állapottal egyező fluoescenciájú, illetve konformációjú állapotba (M*.ADP.P_i) (4. lépés).

Ezt követi a foszfát (P_i) felszabadulás (5. lépés), majd a kétlépéses ADP felszabadulás (a

M*.ADP - M.ADP izomerizáció és az azt követő ADP felszabadulás a M.ADP komplexből, 6. és 7. lépés a **11. ábrán**). A modell alapján a ciklus sebesség-meghatározó lépése a P_i felszabadulása a M*.ADP. P_i komplexről, vagy az azt közvetlenül megelőző izomerizációja a M**.ADP. P_i komplexnek (5., illetve 4. lépések). A sémán a nyilak hosszai a sebességi-állandók egymáshoz viszonyított nagyságát szemléltetik.



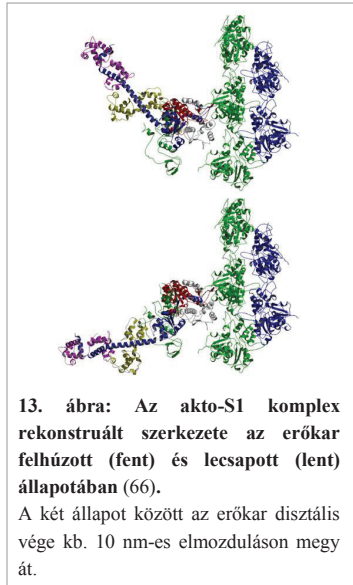
12. ábra: A keresztléd és az erőgenerálás.

Az erőkar orientációja változik az erőgenerálás során, míg a keresztléd (miozinfaj) orientációja változatlan marad (63).

közvetlenül kapcsolódó erőkar orientációjának megváltozásához vezetnek, ezáltal mintegy erősítőként szolgálva az erőgeneráláshoz. Ezek az egy évtizeddel később megoldott miozin 2 szerkezetek igazolták, hogy valóban az erőkar orientációja különbözik, míg a fej irányultsága változatlan marad különböző nukleotid analógok jelenlétében: ATP - és ADP analógok jelenlétében az miozin erőkar lecsapott, míg ADP. P_i analógokkal felhúzott állapotban van (**13. ábra**) (64-66).

A következő állomást a miozin kutatásban a kilendülő keresztléd modell átgondolása jelentette. Cooke és munkatársai fluoreszcens és paramágneses próbák segítségével kimutatták, hogy a keresztléd orientációja nem változik az erőgenerálás során, csak bizonyos, aktintól távol eső doménekben történik jelentős, az adott domén orientációját is érintő átalakulás (**12. ábra**) (9, 63). Későbbi tanulmányok megerősítették azt az elméletet, mely szerint a motordoménben az ATP-kötés hatására bekövetkező apró szerkezetváltozások a motordomén C-terminálisán elhelyezkedő

konverter régió és így az ahhoz



13. ábra: Az acto-S1 komplex rekonstruált szerkezete az erőkar felhúzott (fent) és lecsapott (lent) állapotában (66).

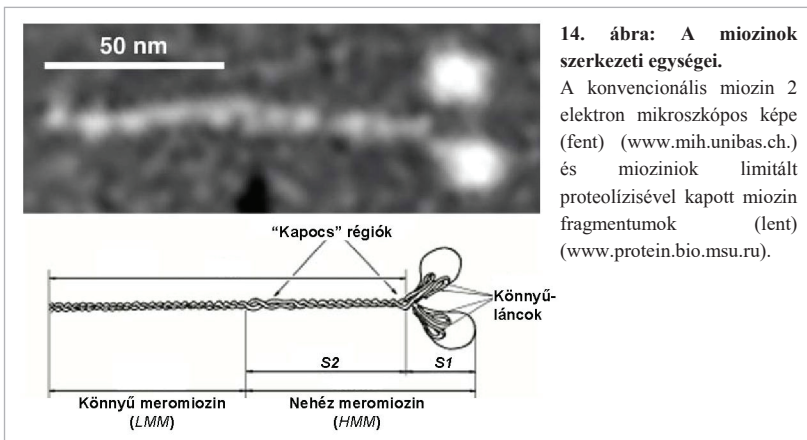
A két állapot között az erőkar disztális vége kb. 10 nm-es elmozduláson megy át.

Az elméletet megerősítették azok a tanulmányok is, melyekben a miozin 2 erőkarjának hosszát módosítva, az aktin filamentumok csúszási sebessége a miozinokon, illetve a munkaütem nagysága (az erőkar disztális végének elmozdulása az aktin filamentumhoz képest az aktomiozin ciklus során) is arányos változását mutatott az erőkar hosszával (9, 67, 68).

A „miozinológia” további mérföldköveinek, illetve az enzimeciklus mindmáig kérdéses pontjainak bemutatását a miozinok szerkezeti sajátságainak (14. ábra) és a miozinfej (MD és a C-terminális szegmense az erőkar) szerkezeti elemeinek (15. ábra) részletes ismeretében érdemes tárgyalni. A következő fejezetben ezért bemutatom a miozinok alapvető szerkezeti sajátságait, illetve kitérek a miozinfej azon szerkezeti elemeire, melyek kulcsfontosságúak a nukleotid-kötő hely, aktin-kötő hely és az erőkar kommunikációjában a kemo-mechanikai energia átalakítás során.

2. Miozinok szerkezeti egységei és a miozinfej legfontosabb szerkezeti elemei

A miozinok limitált proteolízissel történő hasítása segítette a kutatókat az első szerkezeti információk megismeréséhez. Szent-Györgyi András és Gergely János nevéhez fűződik annak a felfedezése, hogy a konvencionális izom miozin-2 molekula tripszines, illetve kimotripszines proteolitikus hasítását követően, egy szolubilis úgynevezett nehéz meromiozinra (*Heavy MeroMyosin* (HMM)) és egy filamentum képző ún. könnyű meromiozinra (*Light MeroMyosin* (LMM)) esik szét (14. ábra) (59).



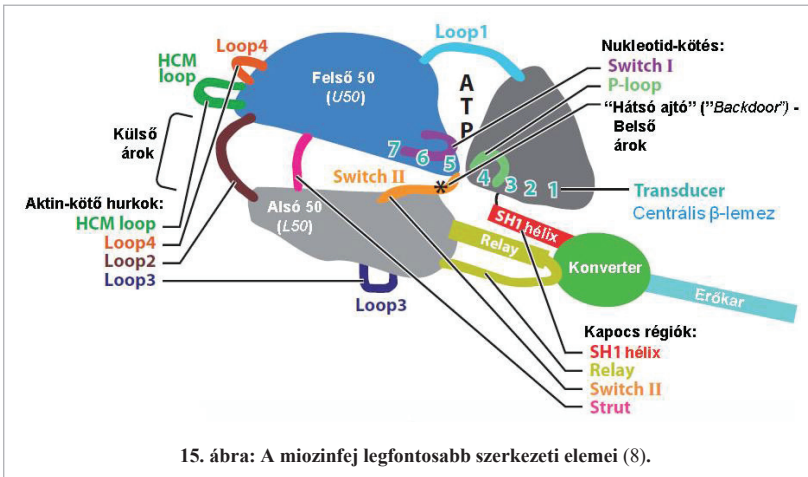
A HMM fragmentumnak tulajdonítható az aktin-kötés, az ATP-áz aktivitás és a könnyüláncok (miozin 2 esetében: esszenciális könnyű lánc (ELC) és regulációs könnyülánc (RLC)) megkötésének képessége, míg az LMM fragmentum a konvencionális miozin 2 motorok nehézláncainak filamentum képzésében vesz részt ionos kölcsönhatások révén. A HMM fragmentum további papain-os emésztésével keletkeznek a szubfragmentum-1-nak (*Subfragment-1* (S1)) és a szubfragmentum-2-nak (*Subfragment-2* (S2)) nevezett szerkezeti egységek. Az S1 fragmentum magába foglalja a teljes motordomént és az azt C-terminálisan követő nyaki régió két könnyülánc kötő motívumát (9, 59). Miozin 2 esetében ez a teljes morfológiai kereszt hídnak felel meg.

A miozinok S1 fragmentumai a kinetikai és az aktin filamentumok mozgásának megfigyelésén alapuló motilitás vizsgálatok kedvelt objektumai. Ennek oka az, hogy megőrzik a teljes miozin molekulára jellemző (aktin-aktivált) enzimatis aktivitásukat és *in vitro* aktin filamentumot mozgató képességüket. Mindezek mellett azonban, leegyszerűsítik a kísérletek értelmezését az egyedű fejek esetére, a két vagy egyes esetekben több fej közötti kooperatív hatások kizárása révén. A HMM fragmentumok vizsgálata azokban a kísérletekben indokolt, ahol a két nehézlánc együttes működésének eredményeként kapott jelenségeket akarjuk megfigyelni (pl: dimer miozin 5a lépegető mechanizmusa). Ezeknek a fragmentumoknak a C-terminálisa a dimerizációért felelős *coiled-coil* régió egy darabját is tartalmazza, amely így összetartja a nehézláncokat.

Az enzimaktivitás és erőgenerálás bázisának tekinthető S1 fragmentum további limitált proteolízisével három eltérő nagyságú fragmentum keletkezik: a 25 kDa-os N-terminális fragmentum, az 50 kDa-os középső, illetve a C-terminális 20 kDa-os fragmentum (69). Ezeket a fragmentumokat felfedezőjük, Bálint Miklós után „*Bálint fragmentumoknak*” is nevezik. A kezdeti elképzelések szerint a három *Bálint fragmentumot* szubdoménnek tekintették, azonban ma már tudjuk, hogy a három fragmentum két rendezetlen hurok helyzetére vezethető vissza. Az egyik az N-terminális és az 50 kDa-os szubdomén határán található, míg a másik az 50 kDa-os felső (*Upper* 50 kDa (U50)) és alsó (*Lower* 50 kDa (L50)) szubdomének közé ékelődik (*loop 1 és loop 2* a **15. ábrán**).

Az első kristályszerkezet megszületésével robbanásszerűen indulhatott útnak a szerkezet - funkció összefüggések feltárása. Rayment és munkatársai csirke vázizom miozin 2 S1 fragmentumát kristályosították nukleotid-mentes (apo) állapotban (8, 9, 70). A szerkezeten jól kivehető volt, hogy a kereszt híd egy fej (nevét alakjáról kapta) formájú régióban végződik,

mely feji régió tartalmaz egy mély árkot, amit egy hét szálú β -lemez (centrális β -lemez) és az ahhoz kapcsolódó α -hélixek alakítanak ki. Ez az árok osztja fel a korábban tévesen szubdoménnek gondolt 50 kDa-os *Bálint fragmentumot* egy felső 50 kDa-os (U50) és egy



alsó 50 kDa-os (L50) szubdoménre (15. ábra). Rayment ezen munkájában már utal arra, hogy a mély árok nyílása-záródása összefüggésben lehet az aktinról való leválással, illetve az aktin megkötésével (71). Később a centrális β -lemez kulcsszerepe is igazolódott az árok záródásában. A mély árok záródásának alapja, a centrális β -lemez és az ahhoz kapcsolódó hurkok és kapocs régiók, együttes nevükön, a *transducer* régió torzulásának feloldása. Az ATP hidrolízist követő árok-záródás feltehetően szükséges ahhoz, hogy az ATP-áz ciklus erőgeneráló lépése megfelelő aktin-affinitású állapotban menjen végbe és ezáltal a ciklus hatékony, erőgeneráló működéshez vezessen (72-74).

Későbbi, kristályszerkezeteken alapuló kutatási eredmények alapján ma már tudjuk, hogy az aktin-kötő árok további két működési egységre osztható fel: a külső árokra és a belső árokra (75). Ezek zártági és nyitottsági foka eltéréseket mutat a különböző miozinok esetében egyes nukleotid állapotokban (75). A külső árok, a mély árok aktin-kötő felszíni része, mely tartalmazza azokat a szerkezeti elemeket, melyek közvetlenül részt vesznek az aktin filamentummal való interakcióban (*HCM-loop*, *loop4*, *loop2*, *loop3*² a 15. ábrán és

² *loop* = hurok, bizonyos *loop*-ok esetében nem használtam a „hurok” kifejezést, mivel ezeknél nem rutinszerű a fordítás használata a szakirodalomban

aktivációs hurok (lásd az „*Aktin kötés*” fejezetben) (15. ábra). A belső árkon a mély árok temetettebb, belső részét értjük, mely a nukleotid-kötő hely *switch-2* régiójának közvetlen szomszédságában helyezkedik el (8).

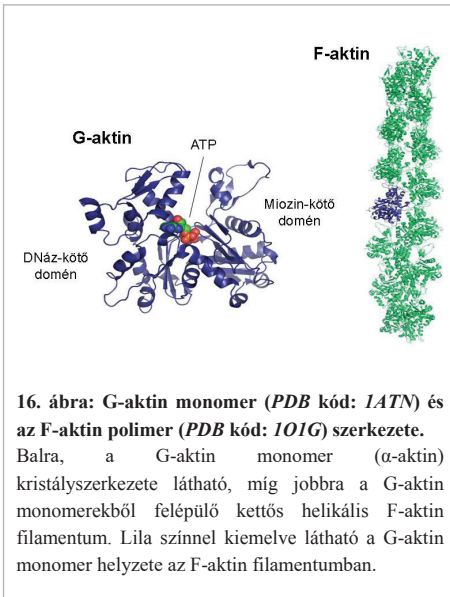
A miozinok nukleotid-kötő helyének jellegzetes, G-fehérjékben is konzerváltan jelen lévő, szerkezeti elemei a *p-loop* és a *switch-1*, *switch-2* hurkok (15. ábra) (9, 10). A nukleotid-kötő hely (aktív hely) az N-terminális és a felső 50 kDa-os szubdomén határán helyezkedik el. Az N-terminális szubdoménhez tartozó *p-loop* treoninja (T170) a Mg^{2+} -ion koordinációjában vesz részt. A vele szomszédos, de már a felső 50 kDa-os szubdoménhez tartozó *switch-1* hurok az aktin-kötő árok és a nukleotid-kötő hely között további információt az enzimműködés során (76, 77). Konzervált *SSR* motívuma révén a *switch-1* hurok részt vesz az ATP γ -foszfátjának (a motívum első szerinjje (S217)) és a Mg^{2+} -ion koordinációjában (a motívum második szerinjje (S218)). A motívum argininje a *switch-2* hurok glutamátjával formál sóhidát, mely sóhid jelenléte a nukleotid-kötő hely zárt állapotának jelzője (*switch-1*: zárt, *switch-2*: zárt) (9). A *switch-2* hurok az alsó 50 kDa-os szubdomén erősen konzervált szerkezeti eleme. Funkcióját tekintve a legkomplexebb szerepkörrel bíró hurok, talán az egész miozin molekulán belül. Részt vesz az MgATP hidrolízisének katalizálásában, a Mg^{2+} -ion koordinációjában. Hidrogén kötések és elektrosztatikus kölcsönhatások révén információt szolgáltat a nukleotid-kötő zseb állapotáról (nukleotid-tartalom függő) az aktin-kötő hely és az erőkar felé (9, 78-80). A *switch-2* hurok sokrétű szerepvállalása éppen annak köszönhető, hogy egyike azoknak a konzervált „kapocs” szerkezeti elemeknek, amelyek a szubdomének határán lokalizálódnak, ezáltal kitértetett szerepet vállalnak a négy szubdomén (25 kDa-os, felső 50 kDa-os, alsó 50 kDa-os és *konverter* szubdomén) közötti kommunikáció megteremtésében (8).

A *konverter* régió a *relay* hélix segítségével létesít kapcsolatot az alsó 50 kDa-os szubdoménnel, az *SH1* hélix pedig az N-terminálissal való kapcsolatát biztosítja a *konverter* szubdoménnek. A két könnyen deformálódó „kapocs” szerkezeti elem (*relay* és *SH1* hélix) révén valósulhat meg a *konverter* nagymértékű elmozdulása a motordomén további három szubdoménjéhez képest. A motordoménben az ATP-kötés hatására végbemenő apró szerkezetváltozások felerősítését és továbbítását az erőkar felé elsődlegesen a *relay* és *SH1* hélix-ek flexibilitása biztosítja. A negyedik „kapocs” a felső és alsó 50 kDa-os szubdoméneket összekapcsoló úgynevezett alátámasztó elem (*strut* a 15. ábrán) (8).

3. Aktin kötés

a) Az aktin sín

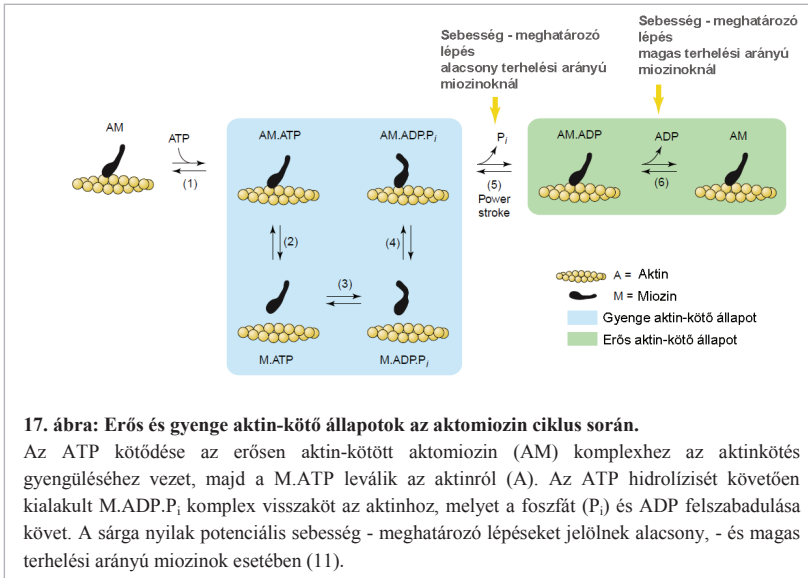
Gerincesekben jellemzően α , - β és γ aktin izoformák fordulnak elő (81). α -aktin az építőeleme a kontraktilis apparatusokban (vázizom, szívizom, simaizom) működő filamentózus aktinnak (F-aktin), míg a β és γ izoformák túlnyomórészt nem-izom sejtekben fordulnak elő (82). A filamentózus aktin 42 kDa molekulásúlyú globuláris aktin monomerekből épül fel (16. ábra) (47). A monomerek két aszimmetrikus doménje a DNáz-kötő domén és miozin-kötő domén (83). A domének között húzódnó mély árokban található az ATP-kötő hely. Fiziológias ionerő mellett, a globuláris monomerek ATP kötés hatására polimerizálni képesek. Az F-aktin polimer struktúrát G-aktin monomerekből szerveződő kettős helikális (13 monomer/ csavarulat) csavarulatok alkotják, melyben - a végektől eltekintve - minden monomer négy szomszédos monomerrel létesít kapcsolatot (84, 85) (16.



ábra). A monomerek asszimetriájának köszönhetően, poláris aktin filamentum alakul ki, mely pozitív végén („*barbed-end*”) folyamatosan polimerizál, negatív végén („*pointed-end*”) pedig az ATP hidrolízisét és a foszfát felszabadulását követően depolimerizál. Ezzel a pozitív vég irányába mutató „*taposómalommal*” (*treadmilling*) összhangban a miozinok haladása is jórészt a pozitív vég irányába történik az aktin mentén. Egyetlen kivételtől eltekintve (miozin 6 - negatív vég motor) a miozin motorok az aktin filamentum pozitív vége felé mozognak.

b) Aktin-kötött állapotok a miozin enzimeciklus során

A miozin motorok működése a ciklikus aktomiozin interakción alapszik. A miozin motorok az aktin sín mentén történő elmozdulás révén hasznosítják az ATP-ben tárolt kémiai energiát hasznos munkavégzésre. Az erős és gyenge aktin-kötő állapotok, valamint az aktinról levált állapotok meghatározott sorrendben követik egymást a ciklus során, melynek célja végeredményben a hatékony erőgeneráló működés kivitelezése. A nukleotid-kötő hely nukleotid tartalmától függően követik egymást ezek a különböző aktin-affinitású miozin állapotok (17. ábra) (11, 40).



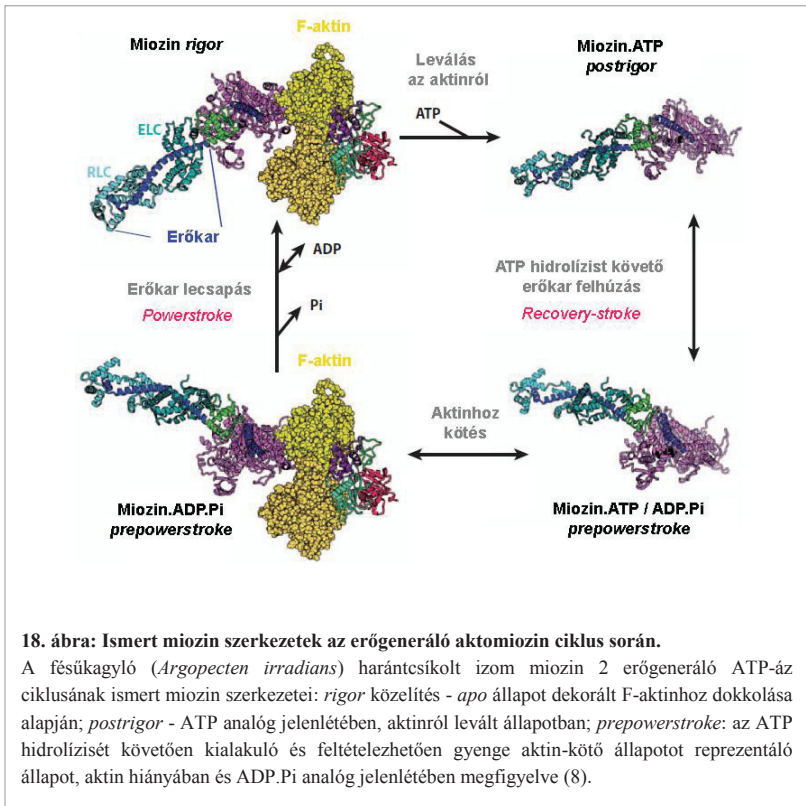
17. ábra: Erős és gyenge aktin-kötő állapotok az aktomiozin ciklus során.

Az ATP kötődése az erősen aktin-kötött aktomiozin (AM) komplexhez az aktinkötés gyengüléséhez vezet, majd a M.ATP leválik az aktinról (A). Az ATP hidrolízisét követően kialakult M.ADP.P_i komplex visszaköt az aktinhoz, melyet a foszfát (P_i) és ADP felszabadulása követ. A sárga nyilak potenciális sebesség - meghatározó lépéseket jelölnek alacsony, - és magas terhelési arányú miozinok esetében (11).

A különböző nukleotid állapotokban meghatározott miozin kristályszerkezetek nagymértékben hozzájárultak az enzimeciklus megértéséhez (18. ábra). Az aktomiozin komplex kristályosítása azonban, a mai napig akadályokba ütközik. A *rigor* aktomiozin szerkezetet, mely az erős aktin-kötő, nukleotid mentes állapota a miozinnak (AM állapot a 17. ábrán), a már megoldott nukleotid - és aktin mentes (apo) miozin kristályszerkezetek dekorált F-aktin³ filamentumokhoz dokkolt formáival közelítik (8, 66).

³ dekorált F-aktin: filamentózus aktin és miozin fejek *rigor* komplexének struktúrája elektron mikroszkópos (EM) felvétel alapján

Jelen eredmények szerint a legjobb *rigor* szerkezeti közelítésnek a miozin 5 apo állapotában kristályosított szerkezete tekinthető („*rigor-szerű*” vagy *rigor-like*) (9, 86, 87). Ennek oka, hogy miozin 5 esetében a kis aktivációs entalpiával jellemezhető *rigor* aktin kötés, az aktin-kötő árok kismértékű szerkezeti átrendeződését feltételezi a *rigor* aktin kötés során (75) (88). Az értekezés Első témakörében („*Erdmények*” és „*Erdmények Megbeszélése*” fejezet (89. és 117. o)) részletesen ismertetem azokat az eredményeinket, melyek nagymértékben hozzájárulnak a miozin 5 esetében tapasztalható *rigor* aktin-kötés szerkezeti hátterének megértéséhez.



18. ábra: Ismert miozin szerkezetek az erőgeneráló aktomiozin ciklus során.

A fésűkagyló (*Argopecten irradians*) harántcsíkolt izom miozin 2 erőgeneráló ATP-áz ciklusának ismert miozin szerkezetei: *rigor* közelítés - apo állapot dekorált F-aktinhoz dokkolása alapján; *postrigor* - ATP analóg jelenlétében, aktinról levált állapotban; *prepowerstroke*: az ATP hidrolízisét követően kialakuló és feltételezhetően gyenge aktin-kötő állapotot reprezentáló állapot, aktin hiányában és ADP.Pi analóg jelenlétében megfigyelve (8).

A **18. ábrán** a fésűkagyló (*Argopecten irradians*) harántcsíkolt izom miozin 2 erőgeneráló ATP-áz ciklusának ismert miozin szerkezetei láthatók (89) (8). Miozin 5 esetében a

prepowerstroke szerkezet sem ismert. Jól látszik, hogy még korántsem sikerült pontos képet kapnunk az erőgeneráló ciklus során a miozin fejben végbemenő szerkezeti változások folyamatáról (**18. ábra**). Az erőkar felhúzásnak (*recovery-stroke*) aktinról levált állapotban kell történnie, melyet az **18. ábra** is jól szemléltet. Az erőgenerálásnak (*powerstroke*) azonban a miozin aktin-kötött állapotában kell végbemennie, ha a miozin molekula el szeretné kerülni a haszontalan, erőkifejtést nem eredményező ATP-áz ciklusokat. A hiányzó lépések szerkezeti feloldása a *prepowerstroke* állapot és az erős aktin kötő *rigor* állapot között - melyek valószínűleg kivétel nélkül a miozin aktin kötött konformációs állapotai - még megoldásra várnak.

c) Amit a miozin az aktinnak köszönhet

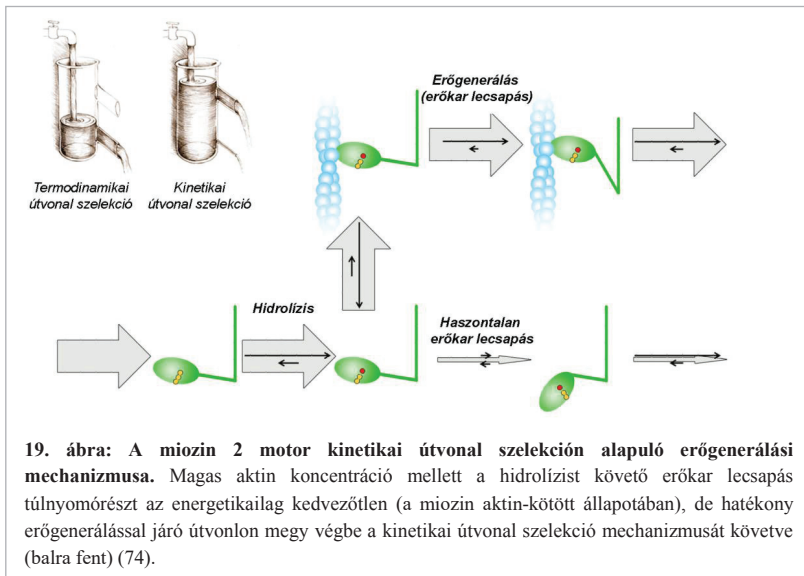
Az aktinnak a miozin ATP-áz ciklust aktiváló hatását már a miozin kutatás hajnalán felfedezték (49). Az aktin jelenléte a termék-felszabadulási lépéseket egyértelműen befolyásolni képes, tehát az aktin a miozin „nukleotid-kicserélő faktorának” tekinthető. A fent említett kristályszerkezetek megoldása hozzájárulhatna az aktin-aktiváció mechanizmusának tisztázásához, azonban a mutációs analízisek, illetve fluoreszcens jelek detektálásán alapuló módszerek (*stopped-flow*, *FRET* (*Fröster Resonance Energy Transfer*)) is jelentős előrelépést hoztak az aktin-aktiváció mechanizmusának és hatásának megértésében (8, 90, 91).

Sun és munkatársai az aktint és a miozin 5 molekula felső 50 kDa-os szubdoménjét (U50, **15. ábra**) jelölve, *FRET* módszerrel követték a jellel ellátott régiók helyzetét az enzimmolekula folyamán. Az aktin kötésének hatására két kinetikai fázist (konformációs változást) figyeltek meg. A gyors fázis a foszfát (P_i) felszabadulásnál is gyorsabbnak adódott, míg a lassú fázis az ADP felszabadulásához hasonló sebességi állandóval volt jellemezhető, így azt az ADP felszabadulásával kialakuló, *rigor* aktomiozin komplex (AM állapot a **17. ábrán**) kialakulásának tulajdonították (91). A legegyszerűbb magyarázata a gyors fázisnak az, hogy az aktin-kötés gyors átrendeződést indukál az aktomiozin elsődleges kölcsönható felszínén (*loop 2*, **15. ábra**) (92-95). A második izgalmas felvetés, melyet kevésbé tart valószínűnek a kutató közösség, hogy még a P_i felszabadulást megelőzően végbemegy egy gyors záródása az aktin-kötő ároknak.

Várkúti és munkatársai újonnan azonosítottak egy, a miozinok körében konzerváltan jelen lévő aktin-kötő régiót („aktivációs hurok” (*activation loop*)) és ennek a régióknak a mutációs analízisével (*Dictyostelium* nyálkagomba miozin 2 és egér miozin 5a vad-típusú és mutans konstrukciókat vizsgálva) jutottak közelebb az aktin-aktiváció molekuláris mechanizmusának és fiziológiás szerepének megértéséhez (90). Ez az aktivációs hurok (az L50 része a **15. ábrán**) az aktin N-terminális szegmensével lép kapcsolatba az enzimmolekula folyamán. A hurok szerepének megértéséhez fontos tudni, hogy miozin 2-ben aktin hiányában az erőkar-lecsapás a sebesség meghatározó, míg aktin jelenlétében a lecsapás sebessége megnő és vélhetően a P_i felszabadulás válik a ciklus sebesség-meghatározó lépésévé (9, 96, 97). Az aktivációs hurok és az aktin N-terminálisának kölcsönhatása gyorsítja a miozin *relay-konverter* régiójának (**15. ábra**) mozgását és az ezzel kapcsolt erőkar lecsapását (erőgenerálás). Ezáltal serkenti a *Dictyostelium* miozin 2 motor ATP-áz aktivitását.

In vitro aktin-csúszási motilitás vizsgálatokban követték az „aktivációs hurok” mutánsok aktin filamentum mozgató képességét. Érdekes módon azt tapasztalták, hogy a megközelítőleg egy - két nagyságrenddel alacsonyabb aktin-aktivált ATP-áz aktivitással rendelkező miozin 2 mutánsok extra terhelés nélküli motilitási sebessége kismértékű mérséklődést sem mutatott. Ezekben az aktin-csúszási motilitás vizsgálatokban kizárólag aktin filamentumokon keresztül, a több motor húzása által fellépő terhelés érvényesült, egyéb extra terhelés nem befolyásolta a motorok működését.

In vivo *C. elegans* testfal miozin aktivációs hurok mutáns állatokon vizsgálták az állatok erő kifejtő képességét *AFM* (*Atomic Force Microscopy*) technika segítségével. Az eredmények azt mutatták, hogy az aktivációs hurok és az aktin interakciója bár a „terheletlen” motilitáshoz nem szükséges, a hatékony erőgenerálásnak viszont elengedhetetlen feltétele.



A jelenség magyarázatát a 19. ábra szemlélteti (74). Az ATP hidrolízisét követő, aktinhoz való visszakötés gyorsítja az erőkar lecsapását (erőgenerálás) a miozin 2 motor esetében (9, 96, 97). Az aktomiozin rendszer erőgeneráló képessége attól függ, hogy a ciklusok mekkora hányadában történik a lecsapás aktin-kötött, illetve aktinról levált állapotban (19. ábra) (9, 74).

Bár az aktinhoz való visszakötés az erőgenerálást megelőzően energetikailag kedvezőtlen folyamat, a kinetikai szelekciónál elképzelés magyarázatot ad arra, hogy milyen módon választja az aktomiozin rendszer ezt, az egyébként erőgenerálás szempontjából messzemenően hatékonyabb útvonalat az enzimműködés során (**19. ábra**).

Miozin 2 esetében a fiziológiásan nagy aktin koncentráció ($> 100 \mu\text{M}$) teszi lehetővé a kinetikai útvonal választását alkalmazását. Magas aktin koncentráció mellett a miozin-ADP- P_i komplex aktin kötési sebessége sokszorosára nő, így gyorsabb lesz, mint az energetikailag kedvezőbb (aktin-kötést nem igénylő), de haszontalan lecsapás sebessége. Az aktomiozin ciklusok aránya tehát az effektív útvonal felé tolódik el a gyors csapódásnak köszönhetően. A továbbiakban az aktivációs hurok biztosítja, hogy ne is térhessen le a miozin az effektív útvonalról. Az aktivációs hurok és az aktin N-terminális régiója közötti interakció hiányában a lecsapás lelassul. Ennek köszönhetően a ciklusok nagyobb hányada térhet vissza az eredménytelen, erőgenerálással nem járó útvonalhoz.

Az aktivációs hurok hiánya miozin 5a esetében is az aktin-aktivált ATP-áz aktivitás drasztikus csökkenésével jár együtt (90). Ebben az esetben azonban alapvetően más mechanizmussal kell magyaráznunk a jelenséget, mivel a miozin 5a enzim mechanizmusa jelentősen eltér a miozin 2 motorétól. Miozin 5a esetében aktin hiányában a P_i felszabadulás a sebesség meghatározó, míg aktin jelenlétében a P_i felszabadulás sebessége megnő és az ADP felszabadulása az erős aktin-kötő aktomiozin komplexről válik a ciklus sebesség-meghatározó lépésévé (41). Mivel kísérleti eredményekkel alátámasztott megoldás még nem született a mechanizmussal kapcsolatban, így két lehetőséget képzelhetünk el. Az aktivációs hurok hiánya az aktin-aktivált foszfát felszabadulás útvonalát gátolja (a hurok helyzetéből adódóan valószínűleg a kommunikációs útvonal kezdeti szakaszán) vagy az ADP felszabadulás aktin-aktivált gyorsítását akadályozza meg. Az értekezés Első témaköre szorosan kapcsolódik az aktin-aktiváció „nukleotid-kicserélő” hatásának megértéséhez a miozin 5a intracelluláris szállítófehérje esetében (lásd „Eredmények” és „Eredmények Megbeszélése” fejezetekben (86. és 114. o)).

Számos kérdés nyitva áll még az aktin-aktiváció folyamatával kapcsolatban. Az aktin-aktivált nukleotid csere lehetséges útvonalai és fiziológiás szerepe a különböző miozin osztályok, illetve izoformák esetében még korántsem teljes. Kérdés az is, hogy milyen mechanizmusok létezhetnek még a kinetikai szelekciónál elképzelés mellett, amelyek az aktomiozin ciklusukat a hatékony, erőgeneráló működés felé terelik.

4. Terhelési arány (*duty-ratio*) és processzivitás

a) Miről árulkodik a terhelési arány

A miozinok enzimeciklusa az **17. ábrán** feltüntetett lépésekből áll (40). Nemcsak az enzimeciklust felépítő állapotok összetételében, de az egyes lépések sorrendjében is nagymértékű egyezést mutat a miozinok enzim mechanizmusa. A különböző aktin-affinitású (erős és gyenge aktin-kötött, illetve az aktinról levált) állapotokban eltöltött életidők azonban eltéréseket mutatnak a különböző (általában az eltérő funkciót betöltő) miozinok esetében (98). A teljes ATP-áz ciklusidő erősen aktin-kötött állapotokban eltöltött hányada adja meg az adott miozin molekula terhelési arányát (*duty-ratio*).

Az erőgenerálási lépésnek (erőkar lecsapás) a miozin aktin-kötött állapotában kell megtörténnie, illetve az azt megelőző erőkar felhúzásnak aktinról levált állapot kell szükségszerűen végbemennie a hatékony erőgeneráló működés érdekében.

A sejtek fiziológiásan magas ATP koncentrációjának (>1 mM) és az aktomiozin gyors ATP-kötésének köszönhetően az erőgenerálást követően kialakuló erős aktin-kötő *rigor* (AM) komplex életideje elhanyagolhatóan rövid (**17. ábra**). Ezért a hidrolízist követően kialakuló, aktin és ADP egyidejű jelenlétében tapasztalható, erős aktinkötő állapot(ok) életidejének a teljes ciklusidőhöz mért aránya határozza meg döntően a miozin molekula terhelési arányát (**17. ábra**).

A terhelési arány szempontjából kulcsfontosságú, hogy az adott miozinak milyen aktin-affinitású az enzimeciklus sebességét meghatározó (leglassabb) lépése. Általánosságban elmondhatjuk, hogy abban az esetben ha az erős aktin-affinitású AM.ADP állapot a sebesség-meghatározó lépése a ciklusnak (a fent említett magas fiziológiás ATP koncentráció miatt a *rigor* AM komplex sebesség-meghatározó szerepe valószínűtlen) akkor magas terhelési arányú motorral állunk szemben (pl.: miozin 5a, 5b és NM2 motorok esetében) (37, 41, 99, 100). Azokat a miozionokat, melyek sebesség-meghatározó lépése a foszfát (P_i) felszabadulás a gyenge aktin-kötő AM.ADP.P_i komplexről (pl.: izom miozin 2), vagy az azt megelőző valamely gyenge aktin-kötő, illetve aktinról levált állapot (*Dictyostelium* miozin 5 (26)), az alacsony terhelési arányú motorok közé sorolhatjuk (**17. ábra**). Nyilvánvalóan az egyéb (nem sebesség-meghatározó) ciklus lépések élettartamától függően, egyes esetekben befolyásoló tényező lehet a ciklus többi lépésének életideje a teljes ciklusidő alakításában, így a terhelési arányt csökkenteni, illetve növelni képes.

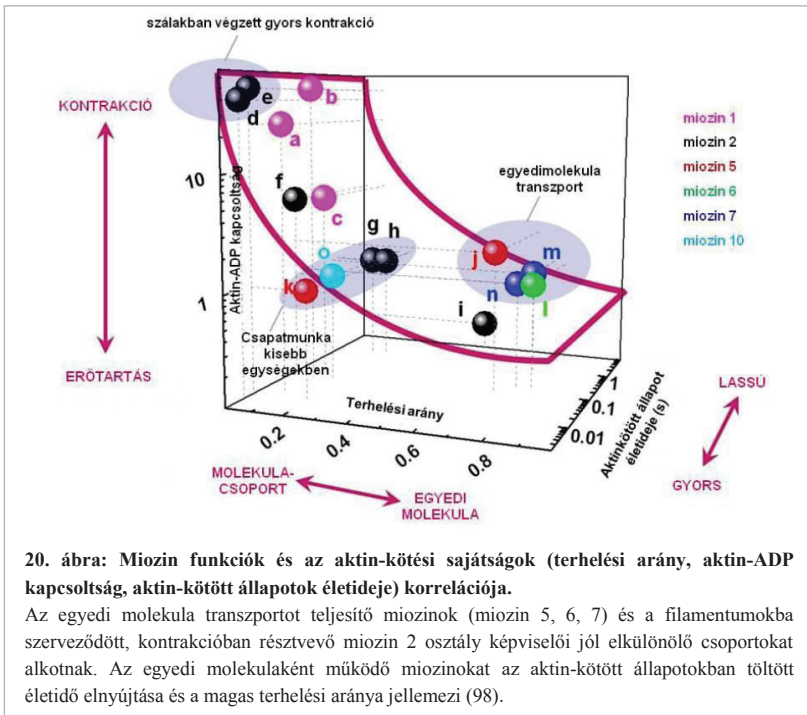
A terhelési arány és az ADP felszabadulás sebességi állandója között megfigyelhető kapcsolat mellett, az aktin kötés - ADP felszabadulás kapcsoltsággal is korrelációt mutat a terhelési arány. Számszerűsítve az aktin - ADP kapcsoltsági hányadost: az ADP felszabadulás aktin jelenlétében és aktin hiányában mért disszociációs állandóinak hányadosa adja meg (98). Az alacsony terhelési arányú izom-miozin 2 esetében az aktin kötődése az aktin-kötő helyre az ADP felszabadulását gyorsítja a távol eső nukleotid-kötő zsebből (az aktin - ADP kapcsoltsági hányados magas értéknek adódik) (9). A magas terhelési arányú nem-izom miozin 2 esetében az aktin kötődése az aktin-kötő helyre az ADP felszabadulását lassítja, ezzel is stabilizálva az erős aktin-kötő állapotot (az aktin - ADP kapcsoltsági hányados alacsony értéknek adódik) (99-101).

Miozin 5a esetében bár az aktin kötéssel az ADP felszabadulás mérsékelten gyorsul, a P_i felszabadulás három - nagyságrenddel történő gyorsítása biztosítja be a terhelési arány növelését (41). A magas terhelési arány a kétféjű, lépegető mechanizmussal működő miozin 5a szállító motorok esetén (**20. ábra**) azért szükséges, hogy az aktin-kötött fej elegendő időt biztosítson a másik, éppen lépő fej számára a következő aktin-kötő hely megtalálásához, ezzel elkerülve a molekula leválását az aktin filamentumról.

A miozin 5b motorok a miozin 5a - hoz hasonlóan magas terhelési aránnyal jellemezhetőek, mely mindkét motor esetében a következő fejezetben tárgyalt, magas processzivitást „alapozza meg” (37). Magas terhelési arányukat a miozin 5b motorok is az aktin-aktiváció hatására történő P_i felszabadulás jelentős gyorsításával érik el. Sebesség - meghatározó lépésük az ADP felszabadulás az erős aktin-kötő aktomiozin-ADP komplexről (37).

A miozin 5 osztály harmadik képviselőjét, a miozin 5c izoformát az alacsony terhelési arány jellemzi. Itt az alacsony terhelési arány arra vezethető vissza, hogy a P_i felszabadulás aktin-aktivációja nem jelentős, így aktin jelenlétében a P_i felszabadulás a ciklus leglassabb lépése (32, 33). A *Dictyostelium* miozin 5 más módszert alkalmaz a terhelési arány csökkentése érdekében. Az aktin-aktiváció termék-felszabadulási lépésekre (P_i és ADP felszabadulás) gyakorolt hatása a miozin 5a izoformához hasonló, viszont az ADP felszabadulás az aktin jelenlététől függetlenül nagyon gyors. A ciklus sebesség-meghatározó lépése aktin jelenlétében a túlnyomórészt aktinról levált állapotban történő hidrolízis (26).

A miozin 5a sebesség-meghatározó ADP-felszabadulási lépésének sebességét több mechanizmus együttes hatása optimalizálja. Miozin 5 esetében ilyen az ADP felszabadulás Mg^{2+} - koordináció általi szabályozása (102), illetve a nyaki régió húzásán keresztül az egyes fejekre ható belső feszültség (*gating*) (8, 95, 103). A mechanizmus részleteit „*A terhelés (load) szerepe a miozin motorok működésében*” (36.o), továbbá az „*Erőgenerálás*” (42. o) fejezetekben és az értekezés „*Első témakörének*” vonatkozó részeiben részletesen tárgyalom.



20. ábra: Miozin funkciók és az aktin-kötési sajátságok (terhelési arány, aktin-ADP kapcsoltság, aktin-kötött állapotok élettideje) korrelációja.

Az egyedi molekula transzportot teljesítő miozinok (miozin 5, 6, 7) és a filamentumokba szerveződött, kontrakcióban résztvevő miozin 2 osztály képviselői jól elkülönülő csoportokat alkotnak. Az egyedi molekulaként működő miozinokat az aktin-kötött állapotokban töltött élettidő elnyújtása és a magas terhelési aránya jellemezi (98).

b) A terhelési arány és a processzivitás

A miozin 5a azok közé a magas terhelési arányú miozin motorok közé tartozik, melyek egyedi molekulaként intracelluláris szállító funkciót töltenek be (9. ábra) (28, 29, 44). Ezek az egyedi molekulák akár 60 enzimciklus és azzal járó mechanikai lépés teljesítésére képesek az aktin filamentumról való leválás nélkül, azaz magas processzivitású motorok.

A processzivitás mérőszám azt adja meg, hogy molekula mekkora valószínűséggel teszi meg a következő lépést a sín mentén (104). Leegyszerűsítve a miozin 5a egyedi fejeinek lehetséges állapotait a mechanokémiai ciklus során aktin-kötött és aktinról levált állapotba, melyek között az átalakulás $k_{\text{köt}}$ és k_{lev} sebességi állandókkal történik, elmondhatjuk, hogy a kétféjű molekula továbblépésének valószínűségét az fogja meghatározni, hogy az egy fejjel kötött molekula másik feje a rendelkezésére álló idő alatt aktin-kötött állapotba kerül-e, vagy sem. Az utóbbi esetben a korábban sint kötő fej leválik és a molekula disszociál a sínről ami a futás végét jelenti. Annak a valószínűsége tehát, hogy mindkét fej aktin-kötött állapotba kerül: $P = k_{\text{köt}} / (k_{\text{köt}} + k_{\text{lev}})$, mely összefüggés azonban egyben a terhelési-arány értéket is definiálja (lásd az „Eredmények Megbeszélése” fejezetben az egy-fejre vonatkozó terhelési-arány becslését: a $k_5 / (k_5 + k_4)$) (114.o), sebességi állandók nevezéktana a 32.C ábra sémája alapján).

A miozin 5a várható lépésszáma, melyet az $\langle n \rangle = P / (1 - P)$ összefüggés ad meg, így a kísérletesen mért adatok alapján jóval alatta marad a motilitási vizsgálatok alapján tapasztalt lépésszámnak (28). Egér miozin 5a esetében az „Első témakör” eredményei alapján, $P = 0,94$ alapján a lépésszám 16 lépésnek adódik, míg csirke miozin 5a esetében $P = 0,7$ alapján ez még alacsonyabb érték, ~ 2 lépés egy futás során (41). A miozin 5a molekula motilitási kísérletekben tapasztalt magasabb lépésszáma (akár 30-60 lépés/futás) és az ennek hátterében álló magasabb processzivitás érték feltehetően különböző processzivitást fokozó hatásoknak köszönhető.

Processzivitás fokozó, illetve processzivitás csökkentő mechanizmusok (pl.: IQ - motívumok száma és flexibilitása, szállítmányért folyó kompetíció, „gating” - mechanizmus) is létezhetnek, melyek a kétféjű miozin 5a lépésszámát *in vitro* illetve *in vivo* körülmények között befolyásolhatják.

c) A processzivitás hangolása

A miozin 5a molekula átlagosan 30, de akár 60 lépést is képes megtenni az aktin filamentumon leválás nélkül (28). A molekula 36 nm-es lépéshossza mellett, így mintegy 1-2 μM -es távolság „bejárására” képes egyszeri sínre kötés alkalmával (45, 105).

Sakamoto és munkatársai mutattak rá, hogy a nyaki régó hossza és flexibilitása is befolyásolja a processzivitást (105). Miozin 5a esetében 2-nél több IQ motívum (a nyaki régió könnyűlánc-kötő motívumai, **2. ábra**) szükséges a processzív mozgáshoz és az IQ motívumok számának (az erőkar hosszának) növelésével egyenesen arányosan változik a munkaütem

nagysága (az erőkar disztális végének elmozdulása az aktin filamentumhoz képest az aktomiozin ciklus során). Az *in vitro* motilitási esszében mért aktin csúszási sebesség is nőtt az IQ motívumok számának növelésével. A 6IQ-HMM konstrukció teljes futáshossz frekvenciája csökkenést mutatott az IQ motívumok számának csökkenésével. Ennek oka az lehet, hogy az IQ motívumok száma a munkaütem nagyságán kívül az eredményes lépések számát is befolyásolja (105). A helikális aktin filamentum 5 nm-es aktin monomerekből épül fel és a helikális struktúra 36 nm-ként van rögzítve a citoskeletonhoz. A 36 nm lépéshossz (kötőhely specifikitás) tehát azért szükséges a molekula számára, hogy az aktin filamentum „tetején” tudjon sétálni (ha egy monomer felszíne kötőhelyként funkcionálna, akkor a miozin 5 spirálisan mozogna az aktin filamentum mentén és 36 nm-ként a citoszol rögzítésekbe ütközne). A vad típusú miozin 5, hat IQ motívuma egymáshoz képest rendre 25-23-25-23-25 aminosav távolságra helyezkedik el (16, 106). Az egyik mutáns esetében a nyaki 3. és 4. IQ motívuma közötti régióba ékeltek két alanint, ezzel megtörve a motívumok közötti mintázatot. A mutáns munkaütemének nagysága, aktin mozgatósi sebessége és processzivitása is jelentősen csökkent. A nyaki régió flexibilitásának változása tehát jelentősen befolyásolja a miozin 5 egyedi lépéseinek kinetikáját és ezáltal processzivitását.

In vitro körülmények között végezték azt a nagyon ötletes kísérletet, ahol egyazon kargóhoz kötve „eresztették össze” a pozitív vég motor miozin 5a-t és az aktin negatív vége felé mozgó miozin 6 motort (107). *In vivo* ilyen kargóért vívott harcot ugyan még nem sikerült megfigyelni, de mivel a szállított objektumok típusai (vezikulák, ER, Golgi) átfedést mutatnak és a sejt ellentétes pólusai felé mozognak (a miozin 5a általában a sejt periferia felé irányuló kargó transzport irányítja, a miozin 6 a sejt belseje felé irányuló szállítást felelős), így mégis valószínűsíthető ez a sejtbeli szituáció (108). Az esetek 80%-ában a szállítmányért vívott küzdelem a miozin 5 győzelmével zárult (a szállítás az aktin filamentum pozitív vége felé indult meg). A megállító erő (*stall force*), amelyet a két molekula képes generálni hasonló értéknek (~ 1,5 - 3 pN) adódik. A jelenség magyarázata az ellenálló erő (*resistive load*) tekintetében mért különbségekben keresendő. A vezető fej ADP-t kötve miozin 5 és miozin 6 esetében is erősen kötődik az aktinhoz. A miozin fej aktinról való leválasztásához ilyen körülmények között miozin 5 esetén ~ 4 pN, miozin 6 esetén ~ 2,6 pN erő szükséges. Az a motor, amely nagyobb ellenálló erőt mutat, így jobban képes ellenállni a mozgásával ellentétes irányú húzásnak és lesz végül a küzdelem nyertese. A nyereség ellenére „hátrányok” is származnak a harcból.

A miozin 5 sebességében és processzivitásában is változást okoz a hátráltató miozin 6 jelenléte. A miozin 5 lépésideje (pozitív vég felé tartó) hosszabbodik, illetve a hátrafelé lépések száma 20%-ra nő az ellenerő hiányában mért 0,3%-hoz képest (107).

5. *A terhelés (load) szerepe a miozin motorok működésben*

Már az előző fejezetben is felmerült a terhelés szerepe a motorműködés hangolásában. Ebben a fejezetben azt szeretném bemutatni, hogy a molekulán belül, a nyaki régió húzásán keresztül az egyes a fejekre nehezedő mechanikai terhelés („gating”), hogyan járulhat hozzá a motorműködés hangolásához.

Túlnyomórészt nem-izom miozin 2 (NM2A és NM2B) és miozin 5a motorokon végzett gyorskinetikai, szerkezeti és egyedi molekula vizsgálatok sorozata alapján kerülhattünk közelebb annak a megértéséhez, hogy a belső feszültség miképpen szabályozza az egyedi miozin fejek terhelési arányát a különböző miozinok esetében (103, 109). Az NM2A motorok az alacsonyabb, míg az NM2B motorok a magasabb terhelési arányú miozinok közé tartoznak. Az előző fejezetben részletesen tárgyaltak szerint, a miozin 5a molekula egyedi fejeit magas terhelési arány jellemzi, mely a szállító funkció szolgálatában áll. A vizsgált NM2 motorokra, az izom miozin 2 motorhoz képest hosszabb ciklusidő jellemző és lassabb ADP felszabadulási lépésüknek köszönhetően jóval hosszabb időt is töltenek erősen az aktinhoz kötve, emiatt hosszabb időtartamú erőkifejtésre képesek. Az ADP felszabadulás terhelés-függésének vizsgálatát célzó kísérletek alapján ma már tudjuk, hogy az NM2B motor ADP felszabadulási sebességének terhelés-érzékenysége nagymértékben segíti a motort a simaizmokkal való együttműködés során (41, 99, 100).

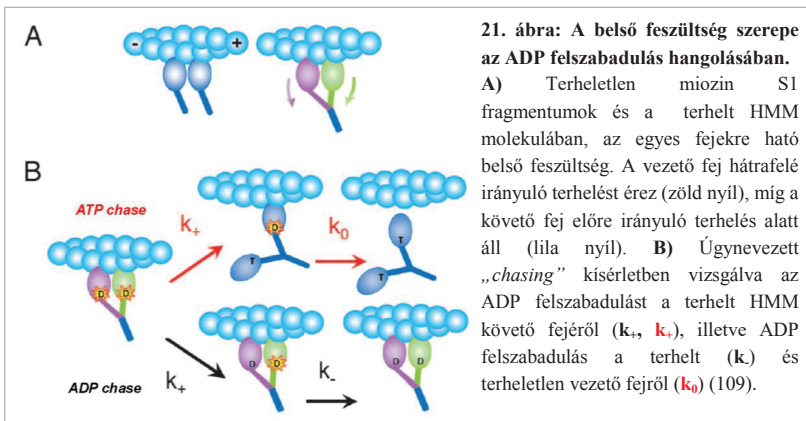
Egyfejtű (terheletlen kontroll) és kétfejtű aktin-kötött (terhelt) (**21.A ábra**) NM2 konstrukciók ADP-felszabadulásának kinetikáját vizsgálva kiderült (**21.B ábra**), hogy az egyes fejek különböző irányú terhelése markánsan, ugyanakkor eltérően befolyásolja ADP felszabadulását az aktomiozin komplexről (109). A molekulán belül fellépő mechanikai feszültség csökkenti a mozgás irányával ellentétes irányú erő hatása alatt lévő fej ADP-felszabadulásának sebességét, míg a mozgás irányába ható erő gyorsítja az ADP-felszabadulást (**21. ábra**).

Az NM2 motorok esetében az ellentétes irányú erő a fent említett hosszútávú erőtartást segítheti, míg a mozgás irányába ható erő - a ciklusidő rövidítésével - a gyorsabb motorok működésével való összehangolódást teszi lehetővé (a fejek nem akadályozzák a gyorsabb motorok (pl. simaizom-miozin) által hajtott kontrakciót) (100, 101, 110, 111).

Miozin 5a motoroknál a fejek egyidejű aktin kötése esetén, a fejek között kialakuló belső feszültség kétségkívül jelentősen hozzájárul az egyedi fejek (vezető fej, követő fej) aktinról való leválásának összehangolásához, ezzel növelve a molekula processzivitását (95, 112-114).

Kérdéses azonban, hogy a processzivitás növelése a mindkét fejre egyidejűleg ható és a vezető és követő fej ADP felszabadulását ellentétesen befolyásoló hatás együttesnek köszönhető, vagy a processzivitás fokozásához elegendő csak a vezető fejről történő ADP felszabadulás modulálása (lassítása). Az első esetben a fejek egyidejű aktin-kötéséből eredő belső feszültség a vezető fejről lassítja, míg a követő fejről gyorsítja az ADP felszabadulását. A legújabb eredmények azonban az utóbbi mechanizmust támasztják alá a miozin 5a motor esetében. E szerint - az NM2 motoroktól eltérően - a belső feszültség jelentősen csak a vezető fej ADP felszabadulására hat és éri el ezáltal, hogy a követő fej váljon le elsőként, ezzel fokozva a molekula processzivitását (113). Miozin 5 esetében a követő fejről történő ADP felszabadulás gyorsítása valószínűleg csak fokozott belső feszültség esetén lép fel.

Ennek fiziológiás jelentősége feltehetően a sejteket átszövő aktin hálózat elágazásaiban van, ahol a követő fej, az ADP felszabadulás gyorsulása révén, gyorsabban képes elhagyni a „rég” aktin filamentumot és ezáltal hatékonyan válthat aktin sint (113).



A jelenség tehát jelentősen hozzájárul, mind a kötegekben működő NM2 motorok, mind a dimer, egyedi miozin 5a molekula processzivitásának növeléséhez.

A mechanikai terhelés azonban többféle kimenetet is eredményezhet a fejek működésének kinetikájában, melyek mindegyike a dimer molekula processzivitásának fokozásához vezet.

Az első ismert kimenet a miozin 5a és NM2 miozinok esetében fent ismertetett, ADP felszabadulás modulálásában nyilvánul meg. A második ismert kimenet, a sok szempontból egyedi mechanizmus szerint működő, negatív vég motor miozin 6 esetében megfigyelhető. A miozin 6 szintén magas terhelési arányú motor, ahol az egyedi fejek enzimeciklusának sebesség-meghatározó lépése az ADP felszabadulás az aktomiozin komplexről. Érdekes módon azonban a dimer molekula fejei között fellépő belső feszültség a vezető fejben az ADP felszabadulás gyorsítását és a gyors ADP felszabadulást követő ATP kötés blokkolását eredményezi, ezzel biztosítva a hátsó (éppen lépő) fej számára elegendő időt a lépés elvégzéséhez (8, 115). Az még kérdéses, hogy a miozin 6 dimer, miért a *rigor* (nukleotidmentes, erős aktin-kötő) állapot életidejét hosszabbítja meg a szintén erős aktin-kötő aktomiozin.ADP állapot helyett (miozin 5a, NM2), illetve az eltérő „gating” kimenetek szerkezeti háttere is nyitott kérdés.

6. Az ATP hidrolízise és az erőkar felhúzás

A különböző miozin osztályok kinetikai és szerkezeti analízise alapján ma már ismerjük annak a jelenségnek az általános érvényét, mely szerint az ATP-kötés hatására a nukleotidkötő helyen zajló apró szerkezetváltozások átterjednek a *konverter* régióra és az aktin kötő régióra is. A *konverter* régió, ATP -kötést követő, újra orientálódása a hozzá C-terminálisan kapcsolódó erőkar felhúzásához (*recovery stroke*) vezet. Azonban azok a - szubdoméneket is átvivő - kommunikációs útvonalak, amelyeken keresztül megvalósulhat ezeknek a kb. 40 Å távolságban lévő szerkezeti elemeknek az összehangolt mozgása, eltéréseket mutatnak a különböző miozinok esetében (116).

A Bagshaw - Trentham kinetikai modell (11. **ábra**) megalkotásakor az egyes lépések azonosításához alapul szolgáló fluoreszcencia jelet adó triptofánokat még nem tudták konkrét szerkezeti elemekhez rendelni (60-62). Az első kristályszerkezetek megjelenésével vált lehetővé azonosításuk. Hamar kiderült, hogy a motordomén nukleotid-kötő zsebének környékén található triptofánok felelősek az első fluoreszcencia emelkedésért – M^* állapot, illetve a *relay* hélixen (15. **ábra**) található 510-es triptofán a második fluoreszcencia emelkedésért – M^{**} állapot (11. **ábra**) (9, 70, 86, 113). Ezeknek az információknak, illetve a háromdimenziós kristályszerkezetek ismeretének birtokában a miozin kutatás alapjául szolgáló kemo-mechanikai (Lynn-Tailor modell) és kinetikai (Bagshaw - Trentham modell) modellek által ekkor még megoldatlan kérdések megválaszolása gyors ütemben indult útnak (57, 58, 60-62, 117).

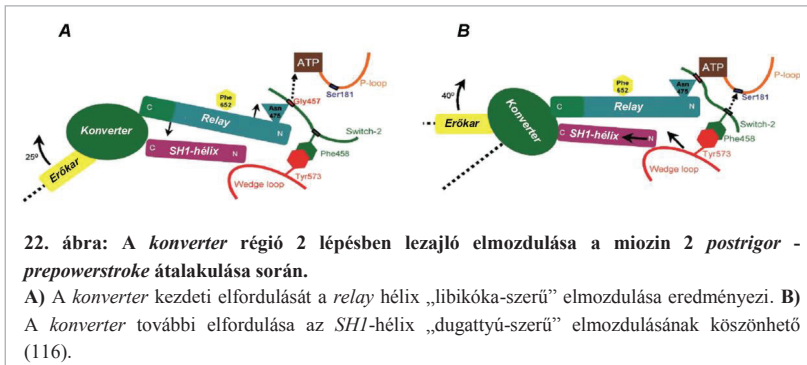
Az ATP hidrolízisét követően kialakuló, M.ADP.P_i állapotot reprezentáló, úgynevezett poszt-hidrolízis analógokkal (ADP.P_i analógok: ADP.AIF₄, ADP.V_i) kapott miozin kristályszerkezetek a nukleotid-kötő hely egy újfajta állapotára világítottak rá, melyben a *switch-2* hurok a P_i analóg felé mozdul el. A kapott szerkezetek további jellegzetessége, hogy a *switch-2*-es hurok felfelé irányuló elmozdulása a *relay* hélix-hez C-terminálisan kapcsolódó *konverter* régió nagymértékű elmozdulásával jár együtt. Mivel az erőkar mozgása a *konverter* régió mozgásával szorosan kapcsol, így a kapott szerkezetek arra utaltak, hogy a *switch-2* fenti pozicionálódása, illetve a hidrolízis és az erőkar felhúzás eseményei között valamiféle kapcsoltság áll fenn (9).

Bagshaw és Trentham modelljében a hidrolízis és erőkar felhúzása egy lépésben jelenik meg (3. lépés, **11. ábra**). Málnási-Csizmadia és munkatársai *Dictyostelium* miozin 2 motordomén egy-triptofános (W501) konstrukcióját alkalmazva több pontosítással is hozzájárultak a hidrolízis, illetve az erőkar mozgás kapcsoltságának megértéséhez (78, 80). A konzervált 501-es triptofán a *relay*-hurok (F466-L516) C-terminális végénél, a *konverter* régió közelében helyezkedik el és az ATP kötődését követően két egymástól független konformációs átalakulást jelez (a kezdeti gyors fluoreszcencia csökkenést, fluoreszcencia emelkedés követi) (80). Gyorskinetikai mérések sorozatában, nyomás-ugrások módszert és lassan, illetve nem hidrolizálható nukleotid analógokat (ATP γ S, AMP.PNP) alkalmazva oldották fel a triptofán fluoreszcencia változások háttérében álló kinetikai lépéseket (**11. ábra**) (78, 80). A kvázi irreverzibilis ATP-kötést, melynek irreverzibilis mivolta az azt követő a gyors izomerizációs lépésnek köszönhető (és fluoreszcencia csökkenéssel jár, 2. lépés a **11. ábrán**), a hidrolízist megelőzve a nukleotid-kötő hely reverzibilis nyitott-zárt átalakulása (fluoreszcencia emelkedés) követi (80). A nukleotid-kötő hely zárt állapotában mehet végbe a szintén reverzibilis ATP hidrolízis, mely a zárt állapot felé tolja el a kötő zseb nyitott-zárt egyensúlyát. Az események sorrendjének meghatározása mellett, a fenti eredményeket a röntgen krisztallográfias tanulmányok eredményeivel összevetve, lehetőség nyílt az események konkrét szerkezeti elemekhez rendelésére (64, 89). Az ATP-kötő hely nyitott-zárt átmenete során a *switch-2* felfelé irányuló elmozdulása (a *switch-2* hurok az ATP γ -foszfátja felé mozdul) teszi lehetővé a *konverter* régió *relay*-hélix körüli elfordulását, mely végső soron a *konverter*hez C-terminálisan kapcsolódó erőkar felhúzásához vezet (9, 116).

Ennek a motordomén tekintélyes régióját érintő, járulékos szerkezetváltozásnak köszönhető, hogy az 501-es *relay* triptofántól 3,5 nm-es távolságban elhelyezkedő ATP-kötő

hely - hidrolízist megelőző - nyitott-zárt reverzibilis átmenete láthatóvá válik az erőkar bázisánál elhelyezkedő 501-es triptofán számára.

Miozin 2 esetében a *konverter* régió katalitikus doménhez képest történő elfordulása két lépésben megy végbe, a *postrigor - prepowerstroke* átalakulás során (**22. ábra**) (116). Az ATP-kötést követően a M.ATP komplex még részlegesen nyitott, katalitikusan inaktív aktív hellyel válik le az aktinról (*postrigor* állapot). Az aktinról való disszociációt követően a *switch-2* hurok, fentebb már részletesen tárgyalt, felfelé irányuló elmozdulása a nukleotid-kötő hely nyitott-zárt átmenetét eredményezi. A nukleotid-kötő hely záródásával indukált katalitikus aktiválással kapcsoltan történik a *konverter* régió elfordulása a *recovery* során.



Az első fázisban a *switch-2* hurok felfelé irányuló elmozdulása a *relay* hélix úgynevezett „libikóka-szerű” (*seesaw motion*) elmozdulását eredményezi (**22.A ábra**). A *relay* hélix elmozdulása váltja ki a *konverter* régió elfordulását. A *konverter* régió további elfordulása a hozzá közvetlenül kapcsolódó *SH1*-hélix (N-terminális – *konverter* domén kapcsoló) „dugattyú-szerű” (*piston-like*) elmozdulásának következménye (**22.B ábra**).

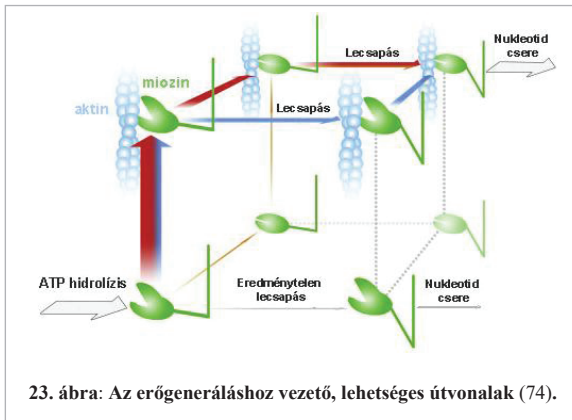
Miozin 5 esetében eltérő szeparálódási mechanizmus figyelhető meg. A *konverter* és a katalitikus régió szeparálódása már „egy lépéssel” korábban, a *rigor - postrigor* átalakulással megtörténik. A megoldott „*rigor-szerű*” és *postrigor* miozin 5 kristályszerkezetek alapján jól látható, hogy a „*rigor-szerű*” állapotban a fejhez társuló *konverter* szubdomén, *postrigor* állapotban már határozottan a nyaki régióhoz társítható (lásd később az „*Eredmények*” fejezet vonatkozó részében (94.o)) (118, 119). Ez alapvetően eltérő mechanizmust feltételez a miozin 2-től, ahol a kétlépéses szeparálódás a katalitikus aktivitás bekapcsolásával (a nukleotid-kötő hely záródásával) párhuzamosan indul meg. A kristályszerkezetek alapján egyértelmű, hogy

miozin 5 esetében a szeparálódás még a katalitikus aktivitás bekapcsolása előtt megtörténik, azonban a *konverter* régió, a nukleotid-kötő hely és ez esetben az aktin-kötő hely közötti kommunikációs útvonalak szerepe és kapcsoltsága kérdéses. Arra a kérdésre, hogy a miozin 5 motorban pontosan milyen szerkezeti elemek hozzájárulásával valósul meg a miozinfaj funkcionális régióinak kommunikációja a szeparálódás során, eddig csak a két érintett állapot („*rigor-szerű*” - *postrigor*) közötti konformációs átmenetre rávilágító molekuladinamikai szimulációk adtak részleges válaszokat (120, 121). Az ATP-kötődéssel meginduló intramolekuláris átalakulások terjedése a nukleotid-kötő helytől a *konverter*, valamint az aktin-kötő régió felé kimutatott, illetve egyes szerkezeti elemek (*switch-2*, *p-loop*, *relay*) konzervált szerepe a folyamatban egyértelműen azonosítható.

Az értekezés „Második témakörében” a miozin 5a specifikus *konverter* – N-terminális szeparálódási mechanizmust vizsgáljuk a miozin 5a mechanokémiai ciklusában (lásd a „*Céltűzések*” fejezetben (56. o)).

7. Erőgenerálás

A mechanikai munkavégzés a miozinfaj aktin filamentumhoz képest történő elmozdulása révén valósul meg az aktomiozin ciklus során (10-12). Bár számos enzimatis lépés és molekuláris esemény készíti elő a miozin molekulát a mechanikai munkavégzésre, mégis a munkavégzés az erőgenerálási lépés(ek)hez vagy másnéven, *powerstroke* esemény(ek)hez köthető közvetlenül (10. és 18. ábra) (74). A jelenleg rendelkezésre álló adatok alapján, az erőkar felhúzását és az ATP hidrolízisét követően, három lehetséges útvonal is vezethet hatékony erőgeneráláshoz (23. ábra). A 23. ábrán pirossal, - és késsel jelzett útvonalak,



hidrolízist követő, első lépése a miozinfaj aktinhoz kötődése. A piros útvonalon ezután történik az aktin-kötő árok záródása (gyenge – erős aktin-kötő állapotok közötti átmenet) és ezt követi az erőkar-lecsapás. A kék útvonalon az erőkar lecsapása az aktin-kötő

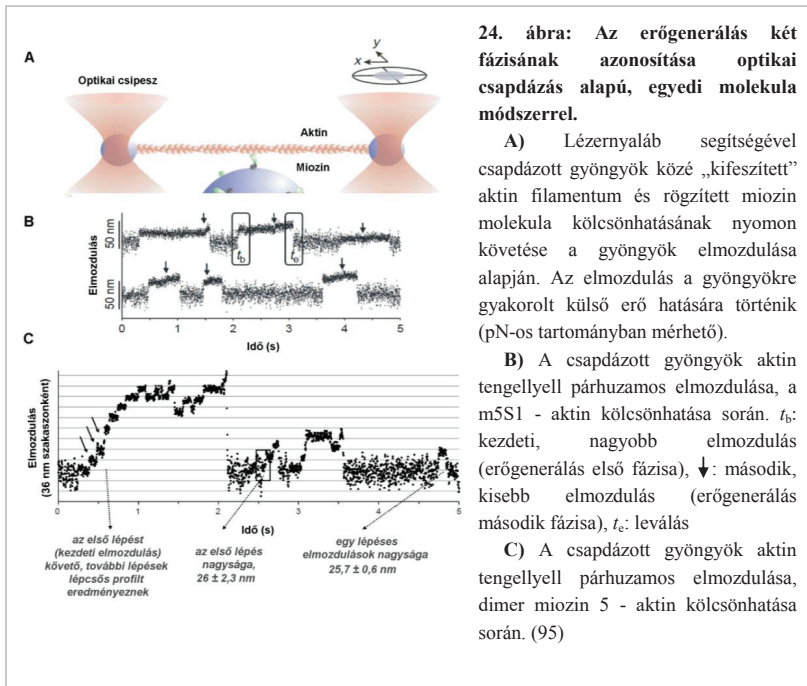
árok nyitott állapotában megy végbe. Kísérletes eredmények alapján a legkevésbé előnyben részesített útvonal a narancssárgával jelölt, ahol az aktin-kötő árok záródását követően történik az aktinhoz kötés és ezt követi az erőgenerálás (74, 97, 122).

A munkaütem kiindulási pontjaként szolgáló miozin szerkezetet, rövid életidejéből és aktin-kötő sajátágaiból adódóan eddig nem sikerült meghatározni. Az egyetlen *powerstroke* kiindulási szerkezetet közelítést, *Dictyostelium* miozin 2 esetében figyelték meg csoportunkban ADP és *blebbistatin* (miozin 2 specifikus inhibitor) jelenlétében (123). Az ADP és a miozin 2 specifikus inhibitor egyidejű kötődése a miozin 2 motort felhúzott erőkarú, erős aktin-kötő állapotában stabilizálja.

a) Az erőgenerálás két fázisa

Miozin 5 esetében az erőgenerálás két egymástól jól elkülönülő mechanikai lépés során valósul meg (95). Optikai csapdázás alapú, egyedi molekula módszer alkalmazásával sikerült

feloldani a munkaütem két lépését. A kísérleti elrendezést az **24.A ábra** mutatja (95). Miozin 5S1-6IQ fragmentummal (m5S1) végzett mérési eredmények szerint 10 ms-os idő intervallumon belül egy ~16 nm-es elmozdulása figyelhető meg a csapdázott aktin filamentumnak a miozin kötését követően. Ezt a kezdeti elmozdulást átlagosan 140 ms-os késéssel követi az aktin filamentum további 5 nm-es elcsúszása (**24.B ábra**). Különböző ATP koncentrációk jelenlétében vizsgálva a két jól elkülönülő mechanikai lépést, az első fázis időtartama függetlennek mutatkozott az ATP koncentrációtól, míg a második fázis időtartama jelentősen rövidült az ATP koncentráció növelésével (az első fázisból való továbbhaladás - megfigyelt sebességi állandója, k_I : 5 s^{-1} ; a második fázisból való továbbhaladás - megfigyelt sebességi állandója ATP-koncentráció függést mutatott, k_{II} : $1 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$). A két fázis esetében mért kinetikai paraméterek jól összhangban voltak a m5S1 ADP felszabadulásának oldatban mért sebességi állandóival (41).



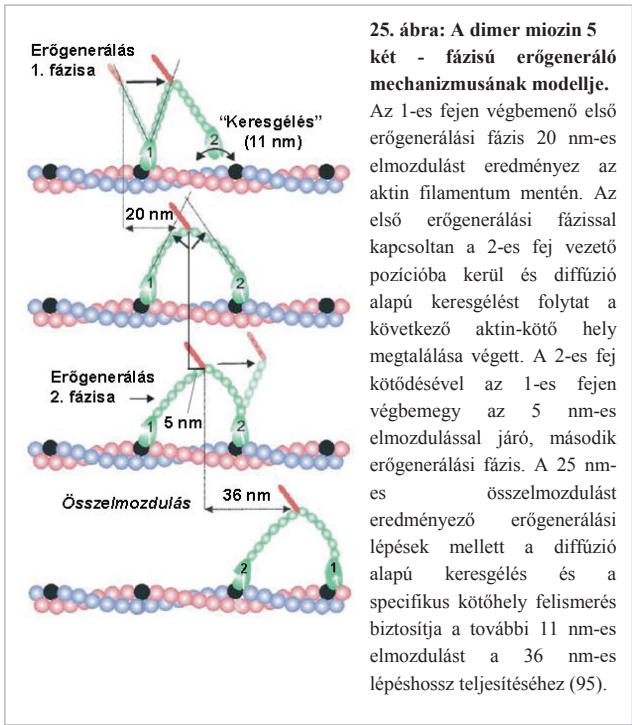
Ezek az eredmények arra engedtek következtetni, hogy az erőgenerálás első fázisa által stabilizált állapot az ADP felszabadulással, míg a második fázis által stabilizált állapot az ATP kötődéssel ér véget. Tehát a miozin 5 molekula két lépésben valósítja meg az erőgenerálást, mely az aktin sínhez képest 21 nm összelmozdulást eredményez.

Dimer miozin 5 molekulával végzett kísérletek rávilágítottak, hogy az erőgenerálás folyamata a kétféjű molekula esetében is jelentősen kisebb mértékű összelmozdulást eredményez, mint a dimer miozin 5 molekula lépés hossza (36nm/lépés (29, 42, 45)). A kétféjű miozin 5 molekula esetében az egyedi, jól elkülönülő interakciók mellett, egymást követő, „lépcsős” interakciók sorozata volt megfigyelhető (**24.C ábra**). Az egyedi interakciókat azoknak az eseteknek tulajdonították, amikor a vezető pozícióban lévő fej a tartó fej leválásáig nem képes visszakötni az aktin filamentumhoz, így a kétféjű molekula leválik az aktin sínről. A kétféjű molekula egyedi interakciói és a lépcsős interakciók első lépése során tapasztalt elmozdulások eloszlása alapján megközelítőleg 25 nm összelmozdulás volt jellemzően detektálható (**24.C ábra**) (m5S1 esetében ez az érték jellemzően 21 nm, mely eltérés valószínűleg a miozin 5S1 és a dimer miozin 5 molekula eltérő nitrocellulóz felszínhez való kötődésének tulajdonítható).

Ez alapján a dimer miozin 5 molekula 36 nm-es lépései, az erőgenerálási lépéseknek köszönhető 25 nm-es elmozdulás mellett, további 11 nm-es elmozdulást igényelnek az aktin filamentum mentén. Az **25. ábrán** szemléltetett mechanizmus alapján képzelhető el a két - lépésben megvalósuló, 25 nm-es összelmozdulással járó erőgenerálás melletti, 36 nm-es lépésmagyság (95).

A nukleotid-kötő zsebében ADP-t és P_i -ot tartalmazó 1-es fej aktin kötését és a P_i felszabadulást követően végbemegy az erőgenerálás megközelítőleg 20 nm-es, első fázisa (a P_i felszabadulás és az erőgenerálás kapcsoltsága kérdéses) (**25. ábra**). Ennek eredményeként a 2-es fej vezető pozícióba kerül. Az 1-es fej ADP kötött állapotában a 2-es fej diffúzió alapú keresést folytat az aktin filamentum felszínén a következő miozin-kötő hely megtalálása érdekében (a következő miozin-kötő hely az aktin filamentumon az 1-es fej kötődési helyétől 36 nm-re található). A modell szerint tehát, a hiányzó 11 nm teljesítése a lépő (2-es) fej diffúziós mozgásának és a specifikus aktomiozin kölcsönhatásnak köszönhető. A 2-es fej kötődése az ilyen módon megtalált kötőhelyre intramolekuláris feszültség kialakulását eredményezi a fejek között.

Ezen a ponton egy a processzivitás fokozás szempontjából igen fontos szinkronizáló mechanizmus mutatkozik meg, mely a két fej kemomechanikai ciklusának összehangolásán alapszik. A nyaki régión keresztül, az 2-es fejre (vezető) ható, az elmozdulás irányával ellentétes irányú terhelés, illetve a miozinfaj enzimeciklus sebesség-meghatározó lépésének érzékenysége erre a terhelésre biztosíthatja, hogy az ADP felszabadulás elsőként a követő fejről (1-es fej) történjen meg (103, 113). Ennek megfelelően, elsőként az 1-es (követő) fejen



zajlik le a miozinfaj enzimeciklusának sebesség meghatározó lépése - erős-gyenge ADP-kötő állapotok közötti átalakulás - és az ezzel kapcsolt második erőgenerálási lépés és ADP felszabadulás (103, 113, 124). Az előző erőgenerálási ciklusban a 2-es fej leválását követően kialakuló

terheletlen állapotában az 1-es fejnek (felső állapot a **25. ábrán**), az 1-es fej erős-aktin kötődését a lassú (sebesség-meghatározó) erős-gyenge ADP-kötő állapotok közötti átmenet biztosítja. Az 1-es fej ezzel a mechanizmussal biztosítja a 2-es fej számára a lépés elvégzését az aktinról való leválás nélkül. Egyes elképzelések szerint - a fejek egyidejű kötődése során - a nyaki régión keresztül, a követő fejre ható, az elmozdulás irányával megegyező irányú terhelés is segíti a második erőgenerálási lépés (5 nm-es elmozdulás) lezárását (103).

Az ATP kötődésével az 1-es fejhez ezután egy újabb két-lépéses erőgenerálási ciklus indulhat útnak (harmadik állapot a **25. ábrán**). Jól ismert, hogy a kétféjű molekula egyedi fejeinek enzimeciklusa egymáshoz képest fázisában eltolva működik. Még kérdéses azonban, hogy a követő fejben végbemenő második erőgenerálási fázis és a vezető pozícióban lévő fejben végbemenő első erőgenerálási fázis megfelelő időzítését milyen mechanizmus(ok) biztosítják. Feltételezhetjük ilyen szinkronizáló mechanizmus(ok) meglétét, mivel a vezető fejben végbemenő első erőgeneráló fázist a követő fej leválásával szinkronizálni kell a hatékony, nem „megakasztott” haladás érdekében.

Az erőgenerálás első fázisának életideje jelentős, míg a második fázis életideje elhanyagolható terhelés-függést mutat (103). Egyedi molekula és oldatban végzett kinetikai kísérletek alapján az ADP felszabadulás sebességi állandója jelentős terhelésfüggést mutat az aktomiozin komplexről a miozin 5 esetében. Az első erőgeneráló fázis terhelés függése abból adódik, hogy ennek az erőgenerálási lépésnek a lezajlásával kialakult állapotból a második erőgenerálási lépést követő állapot felé az ADP felszabadulás vagy valamely azt megelőző izomerizáció vezet. A második erőgenerálási lépés végbemenetelével a *rigor* állapot stabilizálódik és az innen történő továbbhaladás, kizárólag az aktuális ATP koncentrációtól függ (miozin 5 esetében az ATP kötés nem mutat terhelésfüggést).

Fontos megemlíteni, hogy a kétfázisú erőgenerálási mechanizmus nem kizárólagos jellemzője a processzív miozin 5 motornak. Simaizom miozin S1 esetében is két - lépéses erőgenerálási mechanizmus figyelhető meg. Ez esetben is a miozin 5-höz hasonlóan alakul az egyes erőgenerálási fázisok terhelés-függése, azzal a különbséggel, hogy miozin 5 esetében az első fázis terhelés-függése jóval kifejezettebb (103, 125). Valószínűleg a miozin 5 esetében tapasztalt nagyobb terhelés-függés a korábban már részletesen tárgyalt processzivitás fokozás szolgálatában áll a fejek kemomechanikai ciklusának összehangolása révén.

8. Termék-felszabadulási lépések: foszfát (P_i) és $MgADP$ felszabadulás

A termék-felszabadulási lépések során az ATP hidrolízisével képződött ADP és P_i tartalom távozik a nukleotid-kötő helyről (8, 9). A P_i távozik elsőként a nukleotid-kötő helyről, melyet az ADP felszabadulása követ. A termék-felszabadulási lépésekkel kapcsolatosan mennek végbe az a előzőekben tárgyalt erőgenerálási lépések (erőkar lecsapás, mely a miozin aktin sín mentén történő elmozdulását eredményezi). Az így kialakult *rigor* állapot a következő ATP molekula bekötésével szűnik meg és ezzel egy újabb enzimeciklus veszi kezdetét.

a) A P_i felszabadulás és az erőgenerálás kapcsolata

A gyenge aktin-kötő és még mindkét termékkel (ADP és P_i) rendelkező aktomiozin-ADP- P_i komplex kialakulását követő enzimatis lépésekkel kapcsolatban még számos kérdés megválaszolatlan. A gyenge aktin-kötő aktomiozin-ADP- P_i állapotot követően a miozin aktin-affinitás változása, illetve a foszfát felszabadulásnak mechanizmusa és ezek kapcsoltsága illetve az erőgenerálás és a termék-felszabadulási lépések viszonya mindmáig kérdéses pontjai a miozin enzim mechanizmusnak (8, 74).

Sokféle elképzelés született az erőgenerálást (erőkar lecsapást) közvetlenül megelőző, illetve azt közvetlenül követő események sorrendiségéről. A sokáig legvalószínűbbnek tartott elképzelés szerint az ATP hidrolízisét követően kialakuló M-ADP- P_i komplex visszaköt az aktinhoz. Az így kialakult gyenge aktin-kötő AM-ADP- P_i komplex a P_i felszabadulását kísérő szerkezetváltozásoknak köszönhetően kerül erős aktin-kötő AM-ADP állapotba. Ebben az erős aktinkötő AM-ADP állapotban történhet az erőgenerálás. Ezen hipotézis szerint tehát a P_i felszabadulás és az azt kísérő szerkezetváltozások teszik lehetővé, hogy az erőgenerálás a miozin erős aktinkötő állapotban menjen végbe és így hatékony erőgeneráláshoz vezethessen. A hipotézis alapján feltételezhetjük, hogy az erőgenerálást kiváltó szerkezetváltozások a P_i felszabadulás következményei és/vagy közvetve az erős-aktin kötő állapot kialakulásával indukálódnak.

Azonban a P_i felszabadulással kapcsolt erőgenerálás „elképzelése” napjainkban megint látszik. Optikai csapdázás alapú, egyedi molekula módszert (lásd a **24.A ábrán** is) alkalmazva figyelték meg, hogy bizonyos mértékű hátrafelé irányuló terhelést (2-7 pN) gyakorolva a miozin 5S1 (6IQ) fragmentumra az erőgenerálási lépés reverzibilisen végbemelegy (126).

A munka továbbá úttörőnek számít a P_i felszabadulás és erőgenerálás kapcsoltságának megértésében is, illetve a fentiekben bemutatott népszerű hipotézis átgondolására hívja fel a figyelmet. A kutatók egyedi molekula kísérleteiket úgy állították be, hogy a kezdeti munkaütem lezajlását 3 ms - os holtidővel követte a mesterségesen előidézett hátrafelé irányuló terhelés. Gyorskinetikai mérések alapján azonban tudjuk, hogy a P_i felszabadulás sebessége aktin jelenlétében 250 s^{-1} körüli érték, tehát a P_i felszabadulásnak a holtidőben javarészt már meg kell történnie (41).

Így a 3-4 pN hátrafelé irányuló terhelés estén megfigyelt ismételt erőgenerálási eseményeket - melyek a fordított erőgenerálási eseményeket (az aktin filamentum negatív vége felé mutató elmozdulás) követően történnek - nem lehet P_i felszabadulással kapcsolt szerkezetváltozások hatásával magyarázni (az oldatban jelenlévő kevesebb, mint $2 \mu M$ -os P_i koncentráció mellett a P_i visszakötése az AM.ADP komplexhez valószínűtlen az aktomiozin.ADP komplex kis P_i affinitása miatt (41)). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az erőgenerálás feltehetően nem a P_i felszabadulással kapcsoltan fellépő szerkezetváltozásoknak köszönhető.

Ezt az elképzelést támasztja alá Kodera és munkatársainak munkája is (127). A kutatócsoportnak elsőként sikerült közvetlenül megfigyelnie az egyedi miozin 5a molekula lépési mechanizmusát nagy-sebességű atomerő mikroszkóp segítségével. A készített felvételek alapján lehetőség nyílt a kétfejű miozin molekula egyedi fejeinek leválási – és visszakötési eseményeinek karakterizálására, a két fej közötti összhang megfigyelésére egy futás alkalmával. A munka egyik legérdekesebb eredménye, hogy a miozin 5 molekula erős aktinkötő, *rigor* (AM) és a szintén erős aktinkötő AM.ADP állapotában figyelhető meg a legnagyobb gyakorisággal, az úgynevezett „egy helyben topogási” („*foot stamping*”) esemény. Az „egy helyben topogási” mechanizmus szerepe a miozin 5a enzimmolekulában még nem ismert, azonban a jelenség megfigyelése a P_i felszabadulás és az erőgenerálás kapcsolatának tisztázásában sokat segített. Az egyedi lépés során a nukleotid-kötő helyen ADP. P_i -ot tartalmazó és aktuálisan vezető pozícióba kerülő fej az aktinhoz kötődve - a soron következő kötő helyre - az előbbieken már említett $250 s^{-1}$ sebességgel engedi el a foszfátot a nukleotid-kötő helyről már az első kötődést követően (41). A helyben topogási eseményt követő, ismételt aktinkötés esetén, azonban a miozinfaj már csak ADP-t tartalmaz a nukleotid-kötőhelyen, a P_i gyors aktin-aktivált felszabadulásának köszönhetően. Ennek ellenére mégis az első bekötéssel (ADP. P_i állapot) kialakult fej-nyak konformációban történik a második visszakötés (ADP állapot) és a topogási eseményt követően, éppúgy megfigyelhető az erőgenerálás (a vezető fejen) a követő fej leválásával szinkronban, mint a topogási esemény nélküli lépés esetén. Ez a megfigyelés megerősíti azt az elképzelést, mely szerint sem a fokozott aktin-affinitású *prepowerstroke* szerkezet kialakulása, sem az erőgenerálás nem a P_i felszabadulás közvetlen következménye.

b) A P_i felszabadulás mechanizmusa

Az ismert miozin kristályszerkezetek alapján tudjuk, hogy a termék-felszabadulási lépések (P_i, ADP) molekuláris mechanizmusa a két, kitüntetetten sokrétű szerepkörrel bíró *switch-1*-es és *switch-2*-es hurok konformációs állapotával szoros összefüggést mutat (9). A két hurok aktuális konformációs állapota jól jellemzi az enzimmiklus egyes állomásait. Ez a *switch*-régiónak kulcsszerepére utal a miozin funkcionális régiói (aktin-kötő hely, nukleotid-kötő hely, erőkar) közötti kommunikáció lebonyolításában (15. ábra) (8).

Az ATP hidrolízise a miozin aktinról levált állapotában megy végbe. Az aktin-kötő árok nyitott állapota és a nukleotid-kötő hely zárt állapota (*switch-1*: zárt, *switch-2*: zárt) feltétele a hidrolízis végbemenetelének. Az erősen konzervatív *switch-2* hurok (*LDIXGFE*) glicinjének amid nitrogénje a nukleotid-kötő hely zárt állapotban hidrogénkötés kialakítására képes az ATP γ -foszfátjával, mely interakció előfeltétele a víz nukleofil támadásán alapuló enzim katalízisnek (9, 128). A nukleotid-kötő hely zárt állapota (*switch-1*: zárt, *switch-2*: zárt) az erőkar felhúzott állapotával, nyitott konformációja (*switch-1*: zárt, *switch-2*: nyitott) pedig az erőkar lecsapott állapotával jár együtt (64, 65, 70, 129, 130). A *switch-1* hurok, bár nem a nukleotid-kötő hely része szintén részt vesz a nukleotid koordinációjában. Konzervált *SSR* motívumának első szerinje H-kötést alakít ki az ATP γ -foszfátjával, míg a második szerin a Mg²⁺-koordinációjában vesz részt a nukleotid-kötő hely nyitott és zárt állapotában egyaránt. A *switch-1* konzervált argininje a *switch-2* hurok glutamátjával képez sóhidat a nukleotid-kötő hely zárt állapotában, mely interakció a nukleotid-kötő hely nyitott állapotának kialakulásával egyidejűleg megszűnik (130, 131).

A *switch-1* hurok nukleotid-kötő hellyel kialakított interakcióinak köszönhetően a foszfát - kötő régió nagyfokú lefedettsége figyelhető meg még a nukleotid-kötő hely nyitott állapotában is. Nyilvánvaló, hogy a *switch-1* és/vagy *switch-2* hurok valamiféle átrendeződése szükséges a P_i felszabadulás „engedélyezése” végett a nukleotid-kötő hely zárt állapotát követően, az aktinhoz való visszakötés alkalmával (8, 132).

Az aktin - aktiváció a termék felszabadulási lépésekre (P_i, ADP) eltérő módon képes hatni (pl.: nem-izom miozin 2 esetében a P_i felszabadulást jelentősen gyorsítja, míg az ADP felszabadulásra lassító hatást fejt ki) és a különböző miozinok esetében eltérő hatás-mintázatot eredményezhet (pl.: a nem-izom miozin 2-től eltérően a miozin 5a esetében a P_i felszabadulást három nagyságrenddel gyorsítja és az ADP felszabadulásra is két-háromszoros gyorsító hatást fejt ki) (41, 99, 101, 109). Ezek a jelenségek a P_i felszabadulás és az ADP

felszabadulás eltérő szerkezeti útvonalakon történő szabályozására utalhatnak, ezáltal független aktin-aktivációs kimenetek lehetőségét biztosítva.

Feltételezhetően a P_i úgynevezett „hátsó ajtó” („*back-door*”, **15. ábra**) mechanizmust alkalmazva távozik a nukleotid-kötő helyről, a nukleotid-kötő hely nyitott állapotában (8, 132). A nukleotid-kötő hely nyitott állapota azonban már az erőkar lecsapott (*postpowerstroke*) állapotát feltételezi. A modellel kapcsolatban felmerülő problémákat az adja, hogy az aktinhoz visszakötést követően az erőgenerálást (lecsapás) a P_i felszabadulással kapcsoltan valószínűsítették, illetve hogy az aktinhoz való visszakötés sztérikusan gátolhatja a „*back-door*”-on keresztül történő foszfát felszabadulást (9, 128). Azonban ahhoz, hogy például miozin 5a esetében a foszfát felszabadulás aktin-aktivációja az ADP felszabadulás megzavarása nélkül valósuljon meg, mindenképpen szükségszerű egy az ADP felszabadulás útvonalától eltérő mechanizmus feltételezése a foszfát esetében. Ami biztos, hogy a P_i felszabadulás a *switch-1* és/vagy a *switch-2* hurok valamilyen módon történő átrendeződésével jár együtt (8). *Reubold* és munkatársai *Dictyostelium* miozin 2 nukleotidmentes állapotában meghatároztak egy olyan kristályszerkezetet, melyben mind a *switch-1*, mind a *switch-2* hurok egyidejűleg nyitott („új” nyitott állapot) konformációban található (a nukleotid-kötő hely „rég” nyitott állapotának nevezett állapotban a *switch-1* hurok zárt, míg a *switch-2* nyitott konformációt vesz fel) (128). A rendelkezésre álló kristályszerkezetek alapján a nukleotid-kötő hely zárt-nyitott átmenete a *switch-2* hurok nagymértékű elmozdulásával jár együtt, míg a *switch-1* hurok helyzete szinte változatlannak tekinthető az átmenet során. Az „új” nyitott szerkezetben a *switch-1* hurok 8 Å-ös elmozdulása figyelhető meg a megszokott *switch-1* pozícióhoz képest, mely elmozdulás eliminál minden a *switch-1* és a nukleotid között fenálló közvetlen (γ -foszfát) és közvetett (Mg^{2+}) interakciót. Mindez a *switch-2* hurok még nagyobb mértékű elmozdulásával jár együtt és eltérő a miozin és a nukleotid között fennálló összes (közvetlen és közvetett) kapcsolatot. Kizárólag a *p-loop* treoninja koordinálja a Mg^{2+} -iont a továbbiakban. A munka alapján az enzimműködés során - a „zárt” állapotot követően - feltételezhető egy, az „új” nyitott állapotot jellemző *switch-1*, *switch-2* konformációval rendelkező állapot, melyből a P_i felszabadulása már nem gátolt. Ez az úgynevezett „csapóajtó-mechanizmus” („*trap-door*”). Azonban ez az elképzelés is megválaszolatlan kérdéseket hagy maga után.

Például, hogy a Mg^{2+} -ionnal kialakított koordinációs kötések túlnyomó részének megszűnése miatt nincs kihatással az ADP felszabadulásra és hogy az „új” kristályszerkezetben is tapasztalt lecsapott erőkarú (*postpowerstroke*) állapot (mely a *switch-2* hurok nyitott konformációjával szigorúan együtt járn látszik) egyidejű jelenléte a P_i felszabadulás kiinduló pontjának tekinthető – „új” nyitott - állapottal, milyen mechanizmus alapján magyarázható.

Kétféleképpen képzelhetjük el a megoldást. Egyik lehetőség, a *switch-1* hurok egyfajta átrendeződése, mely a hidrolízist követő aktin kötéssel alakul ki és még a *switch-2* zárt és így a miozin felhúzott erőkarú állapotában biztosítja „hátsó ajtót” a P_i kilépés számára, ugyanakkor megőrizve az ADP Mg^{2+} koordinációjához szükséges kölcsönhatásokat. Ezt az elképzelést erősítik azok a tanulmányok, melyekben az aktin-kötés hatására a felső 50 kDa-os szubdoménben (*U50*, **15. ábra**) jelentős átrendeződéseket figyeltek meg (a *switch-1* elmozdulása az *U50* részeként, kapcsolatosan történhet meg az aktinhoz kötéssel) (76, 113, 133). A másik lehetőség, hogy a *switch-2* hurok eddig még nem megfigyelt szerkezetet felvéve nyílik ki, oly módon hogy az szabaddá teszi az utat a P_i felszabadulás előtt, mindeközben megőrizve az ADP Mg^{2+} koordinációjához szükséges kölcsönhatásokat és a felhúzott erőkarú (*prepowerstroke*) állapotot. *Coureux* és munkatársainak munkája az utóbbi elképzelést erősíti. Miozin 5 *rigor* és *postrigor* kristályszerkezeteinek megoldásával rávilágítottak, hogy a *switch-2* hurok nyitott konformációja eltér a miozin két egymást követő állapotában (119). A két eltérő *switch-2* nyitott konformáció a motordomén jelentős átrendeződésével jár együtt, azonban az erőkar pozícióját nem befolyásolja.

Azt hogy, a P_i felszabadulás még a nukleotid-kötő zseb zárt és az erőkar felhúzott állapotában megtörténik, alátámasztják azok az eredmények is, mely szerint a miozin 5a aktomiozin ciklusának sebesség-meghatározó lépése a nukleotid-kötő zseb nyitott-zárt átmenete az ADP felszabadulást megelőzően (a P_i felszabadulás több mint egy nagyságrenddel gyorsabb a nukleotid-kötő zseb sebesség meghatározó nyitott-zárt átalakulásánál) (124).

c) Mg^{2+} - koordináció és $MgADP$ felszabadulás

A miozinok a hatékony erőgeneráló mechanizmus lebonyolításához a kötött nukleotid (ATP, ADP) Mg^{2+} -ion koordinációját igénylik. A miozinok energiaátalakító aktomiozin ciklusa során a Mg^{2+} - koordináció fontos szerepet tölt be a nukleotid-kötő helyen „összefutó” kommunikációs útvonalak összehangolt működésében (8, 9, 102, 128, 134). Sejtes

környezetben az ATP^{4-} MgATP^{2-} (a magnézium ion az ATP β és γ -foszfátjával alakít ki koordinációs kötést) formában fordul elő és ebben a formában kötődik a miozinok nukleotidkötő helyére. A MgATP^{2-} kötődése a nukleotidkötő hely átrendeződését és a miozin aktinról való disszociációját eredményezi. Ebben az ún. *postrigor* állapotban a magnézium ion az ATP β -foszfátjával, a *switch-1*-es hurok konzervált szerinjével (S218, a fejzet során végig a csirke (*Gallus gallus*) miozin 5a aminosav számozását követtem), a *p-loop* treoninjával (T170) és egy víz molekula közreműködésével a *switch-2* hurok konzervált aszpartátjával (D437) alakít ki koordinációs kötést (inaktív a katalitikus hely). Az ATP γ -foszfátja a *postrigor* – *prepowerstroke* átalakulás során a *switch-2* glicin amid csoportjának nitrogénjével alakít ki H-kötést a *switch-2* hurok felfelé irányuló elmozdulása révén (a hidrolízis katalíziséhez létfontosságú interakció). A hidrolízist követő termék-felszabadulási lépések közül - az enzimmiklusban soron következő - a foszfát felszabadulás mechanizmusáról alkotott hipotéziseket fentebb már részletesen ismertettem.

Míg miozin 2 esetében az aktin-aktivált ATP-áz ciklus sebesség-meghatározó lépése a foszfát felszabadulás az aktomiozin.ADP.P_i komplexről, addig miozin 5a esetében az ADP felszabadulása az aktin-aktivált ciklus leglassabb lépése (41, 97).

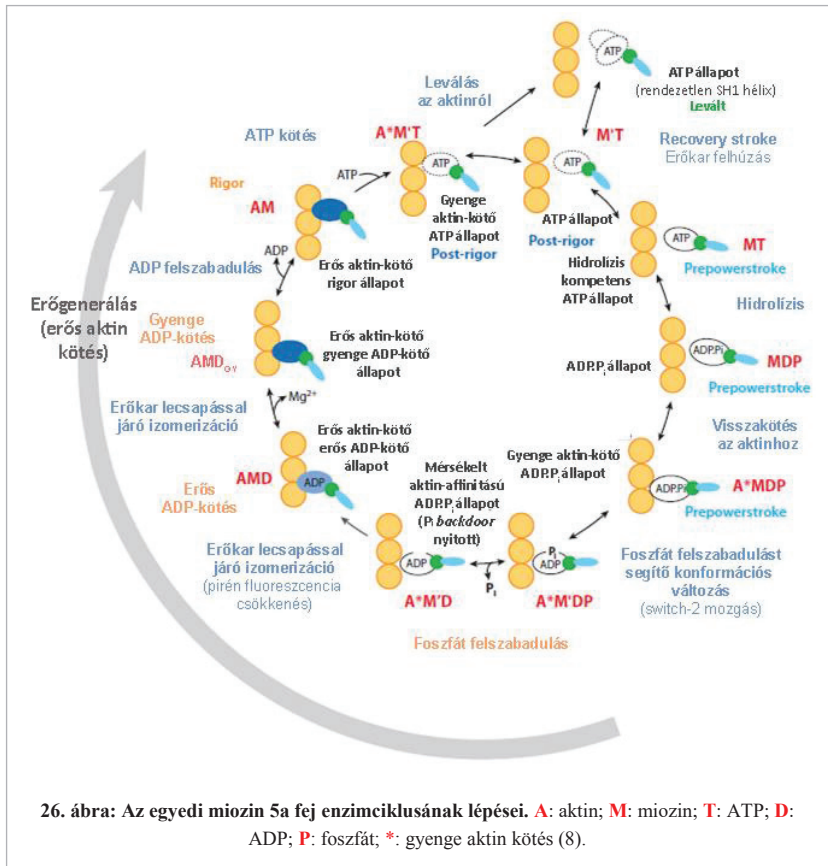
Steady-state és tranziens kinetikai kísérletek alapján tudjuk, hogy a Mg^{2+} jelenléte az ADP felszabadulást szabályozni képes az aktomiozin komplexről (76, 77, 102, 134). Az aktinkötődése a miozin.MgADP.P_i komplexhez gyorsítja az ADP felszabadulást azáltal, hogy csökkenti a miozin.ADP komplex Mg^{2+} - affinitását (102, 119).

Az egyik elképzelés szerint a hidrolízis-termékeket kötő miozin aktinhoz kötődése a fentebb már említett *switch-1* régió elmozdulásával jár együtt. A hurok elmozdulásával a Mg^{2+} - *switch-1* (S218) közötti kölcsönhatás megszűnik, mely első körben gyengíti a miozin és a magnézium-ion között fennálló kapcsolatot (a *switch-1* elmozdulása egyidejűleg lehetővé teszi a foszfát felszabadulását, „hátsó-ajtó” mechanizmus). A foszfát felszabadulást követően kialakuló, még erős ADP-kötő aktomiozin.MgADP állapot az aktin kötés és/vagy a *switch-1* elmozdulása által indukált további átrendeződéseknek köszönhetően alakul a miozin gyenge ADP-kötő állapotává: a *switch-2* hurok és a *p-loop* járulékos elmozdulása a Mg^{2+} -ion és a miozin között még fennálló koordinációs kötések megszűnéséhez vezet. A magnézium felszabadulását követően történhet meg ezután az ADP felszabadulása már a gyenge ADP-kötő aktomiozin ADP állapotból.

A második elképzelés szerint a *switch-2*-es hurok, az aktin-aktiváció hatására eddig nem meghatározott konformációt felvéve teszi lehetővé a foszfát felszabadulást és indítja be azokat a konformációs átrendeződéseket a nukleotid-kötő helyen, melyek a magnézium, miozin és az ADP közötti koordinációs kötések megszűnéséhez vezethetnek (8).

A legújabb eredmények szerint a miozin 5a aktin-aktivált enzimeciklusának sebesség-meghatározó lépése az ADP felszabadulási lépést megelőző szerkezeti átalakulása a nukleotid-kötő zsebnek (zárt-nyitott átmenet), mely az aktomiozin erős-gyenge ADP-kötő állapotai közti átmenettel kapcsolatos (124). Jelen eredmények szerint ezzel az átalakulással kapcsolatos meg végbe az erőgenerálás második fázisa (**25. ábra**, az erőgenerálás első fázisának pontos mechanizmusát még nem ismerjük) (8, 103). Miozin 5a esetében ennek a sebesség-meghatározó átalakulásnak a feszültség-függése biztosíthatja a fejek összehangolt működését a processzív futások alkalmával. Az aktinhoz történő visszakötés eredményeként a vezető miozin fej nyaki régiója visszahajlik és valószínűleg ezzel a konformációval a *switch-1* azon állapota stabilizálódik mely lehetővé teszi a MgADP koordináció fenntartását (erős ADP-kötő állapot) és meggátolja a gyenge ADP-kötő állapot felé történő átalakulást („gating” mechanizmus) (8, 103, 135, 136). A belső feszültség hatására a vezető fej esetében az erős aktin-kötő, erős ADP-kötő állapot válik populálttá. Ilyen módon a „gating” mechanizmus csökkenti annak a valószínűségét, hogy a vezető fej váljon le elsőként. Amint az ADP leválik a követő fejről, az ATP-t köt és az ATP indukált leválással szinkronban a vezető fejben végbemenő erőgenerálás első fázisával a követő fej kerül vezető pozícióba. A újdonsült vezető fej ezután gyors keresgélést folytat a következő kötőhely után az aktin filamentumon (137). A követő fej - ATP kötését követő, aktinról levált – enzimatis lépéseihez a tartó fejben végbemenő sebesség-meghatározó erős-gyenge ADP kötő állapotok közötti átmenet biztosíthatja a szükséges időt (8, 102, 124, 134).

9. A miozin 5a fej enzimeciklusa (összegzés)



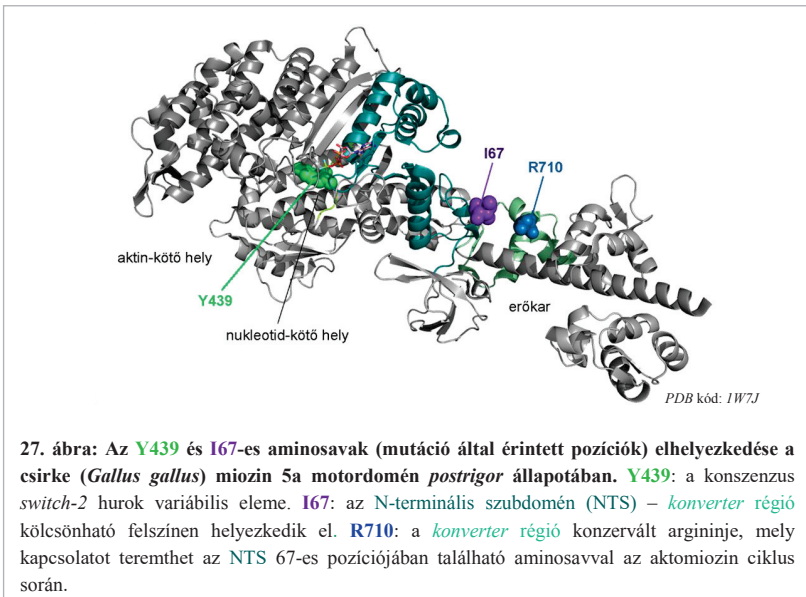
Az ATP kötődése a *rigor* komplexhez (nukleotid-mentes, erős aktinkötő állapot (AM)) az aktomiozin kölcsönhatás meggyengülését, majd a miozin aktinról való leválását eredményezi az úgynevezett *postrigor* állapotban (M^{*}T a 26. ábrán) (8). Ebben az aktinról levált állapotban történik az erőkar felhúzása és az ATP hidrolízise (*prepowerstroke*). Az ATP hidrolízisét követően a miozin.ADP.P_i (MDP a 26. ábrán) komplex aktin affinitása megnő és visszaköt az aktinhoz. Ez a foszfát felszabaduláshoz, majd az első erőkar lecsapási lépéshez (erőgenerálás első fázisa) vezet. Ezt követően történik a sebesség-meghatározó zárt-nyitott

konformációs átalakulása a nukleotid-kötő zsebnek, mely valószínűleg az erős-gyenge ADP kötő állapotok közötti átmenettel kapcsolt folyamat (124). Ezzel kapcsoltan mehet végbe a második erőkar lecsapási lépés (erőgenerálás második fázisa) (**26. ábra**). A Mg^{2+} koordináció megszűnését követően kialakuló, gyengén ADP-kötött és erős aktin-kötő aktomiozin-ADP állapotból (**AMD_{gy}** a **26. ábrán**) történhet az ADP felszabadulása, mely újra a kezdeti *rigor* (**AM**) szerkezet kialakulásához vezet.

IV. CÉLKITŰZÉSEK

Doktori munkám célja a processzív, lépegető mechanizmussal az aktin sín mentén mozgó miozin 5a motor összetett mozgásmintázatának háttérében álló, intra- és intermolekuláris (miozin és az aktin sín közötti) kommunikációs útvonalak részletesebb megismerése.

Az egyedi miozin 5a fejek aktomiozin ciklusának és a miozinfej specifikus adaptációs stratégiáinak részletes feltérképezése alapvető feltétel a kétfejű motor processzív, lépegető mozgásmintázatának pontos megértéséhez. Annak feltérképezése érdekében, hogy a miozin 5a összetett mozgásmintázatát megalapozó enzim mechanizmusa az egyedi miozin fejeknek, milyen kommunikációs útvonalak, mechanizmusok révén valósul meg, pontmutációkkal finomhangoltuk a motordoménen belüli, valamint a motordomén és az erőkar közötti típusú kommunikációs útvonalakat (27. ábra).



Munkám az alábbi két témakör felderítéséhez és a kapcsolódó mechanizmusok megértéséhez járult hozzá:

▪ *ELSŐ TÉMAKÖR*

A nukleotid-kötő helyen található *switch-2* hurok (LDIXGFE) egyetlen, miozin osztályonként variabilitást mutató (X) aminosav pozíciójának jelentőségét vizsgáltuk.⁴

A miozin 5a motor tirozint (Y439) tartalmaz *switch-2* hurok variabilitást mutató pozíciójában (LDIYGFE). A miozin 5a tirozinját alaninra, szerinre és glutaminsavra (Y439A, Y439S, Y439E) cseréltük (a részleteket lásd az „*Anyagok és módszerek*”, illetve „*Eredmények*” fejezetekben), mellyel a vad-típusú miozin 5a *switch-2* hurok által is érintett kommunikációs útvonalait bolygattuk meg.

▪ *MÁSODIK TÉMAKÖR*

Az N-terminális szubdomén (NTS) - *konverter* régió kölcsönható felszín szerepét vizsgáltuk a miozinok energia átalakító aktomiozin ciklusában.

A miozin 5a motor N-terminális szubdoménjének 67-es pozíciójában található izoleucint (I67) cseréltük lizinre (I67K) (27. ábra) (a részleteket lásd az „*Anyagok és módszerek*”, illetve „*Eredmények*” fejezetekben). A mutációval taszító kölcsönhatást idéztünk elő az NTS I67K aminosava és a *konverter* konzervált argininje (R710 a 27. ábrán bemutatott *Gallus gallus* miozin 5a szerkezetben; homológ pozíció *Mus Musculus* miozin 5a esetében: R709) között (27. ábra). Célunk, az NTS – *konverter* régió közötti, módosított kommunikáció miozin 5a mechanokémiai ciklusra gyakorolt hatásának feltárása volt.

Hipotézisünk szerint, a miozin 5a motor összetett mozgásmintázatának háttérben álló eddig ismeretlen mechanizmusok feltérképezése nemcsak a miozin 5a motorműködés pontosabb megértését teszi lehetővé, hanem teljesebb képet adhat arról, hogy az aktomiozin ciklus hasonló enzimatisus lépéseinek háttérben álló, szerkezeti átrendeződések finom eltérései miképpen eredményezhetnek eltérő működési mintázatokat a különböző miozinok esetében. Munkánkkal arra szeretnénk rávilágítani, hogy a különböző funkciót teljesítő miozinok szerkezeti átrendeződéseiket miképp alakítják, illetve finomítják a hatékony működés érdekében az energia átalakító aktomiozin ciklus során.

⁴ A továbbiakban többes szám - első személyben mutatom be doktori munkám azok tiszteletére, akik az egyes módszerekre megtanítottak, illetve gondolataikkal hozzátektek a munkához. Abban az esetben, ha nem én végeztem az adott vizsgálatot, az „*Anyagok és Módszerek*” fejezetben a vizsgálatot végző személy(ek) nevét külön kiemelem.

V. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Az oldat kinetikai és fluoreszcencia spektroszkópiai mérésekhez egyfejtű miozin 5a (S1, lásd **14. ábra**) konstrukciókat hoztunk létre, melyek segítségével az eredetileg kétféjtű miozin 5a egyedi fejeinek kinetikai sajátosságai, a két fej közötti kooperatív hatások eliminálása révén, tisztán vizsgálhatók.

A motilitási vizsgálatokhoz (aktin-csúszási vizsgálat (*actin gliding assay*), egyedi molekula motilitás vizsgálat (*Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF) Microscopy - assay*)) az egyfejtű miozin 5a mutánsok mintájára kétféjtű miozin 5a (HMM, lásd **14. ábra**) konstrukciókat állítottunk elő a két fej közötti együttműködést igénylő paraméterek (processzivitás, futási-sebesség) meghatározása céljából.

Miozin 5a DNS konstrukciók előállítása

Egér (*Mus musculus*) miozin 5a fehérje 820 aminosavnyi N-terminális szakaszának cDNS-ét (miozin 5aS1, tartalmazza a teljes motordomént és az azt C-terminálisan követő első két IQ motívumot) klónoztuk p*FastBac1* bakulovirus transzfer vektor Többszörös Klónozó Helyére (*Multi Cloning Site, MCS*), oly módon hogy a fehérje tisztítását biztosító *Flag* affinitás-címke (*Flag-címke* aminosav szekvenciája: DYKDDDDK) a fehérjetermék C-terminálására kerüljön. A p*FastBac1* bakulovirus transzfer vektor általunk használt, már *Flag*-címkét tartalmazó változatát témavezetőm, Dr. Kovács Mihály készítette posztdoktori éve alatt (*NIH, National Institutes of Health, USA*).

A motilitás kísérletekhez használt kétféjtű egér miozin 5a konstrukciók (miozin 5a HMM, 1091 aminosavból álló N-terminális miozin 5a szegmens, mely tartalmazza a teljes motordomént és az azt C-terminálisan követő hat IQ motívumot, valamint a dimerizációért felelős régió N-terminálisát) vad-típusú formája kollaborátorunk, James R. Sellers laborjában készült. p*FastBac1* bakulovirus transzfer vektorba klónozva kaptuk meg a vad-típusú miozin5a HMM konstrukciót (a miozin 5a N-terminális 1091 aminosavból álló szegmensének cDNS-e), mely a fehérje kódoló régiójához 5' irányban kapcsolva (a fehérjét tekintve N-terminálisan), zöld-fluoreszcens fehérje (*green fluorescent protein (GFP)*) cDNS-ét és a miozin 5a kódoló régiót 3' irányban követő (a fehérjét tekintve C-terminálisan) *Flag*-címkét kódoló régiót is tartalmazta.

QuikChange mutagenézis protokollt (*Stratagene*) alkalmazva komplementer oligonukleotid párok (*Sigma*) segítségével hoztuk létre a miozin 5aS1 és HMM pontmutáns konstrukciókat. Az alábbiakban a kódoló szál szekvenciájával megegyező oligonukleotid szekvenciákban a mutációt kódoló bázishármaszt aláhúzással jelöltem.

Az **Első témakör** mutáns miozin 5a konstrukcióihoz használt kódoló szál oligonukleotidok:

CATCGGCGTGCTGGACATCGCCGGATTGAAACATTTG (Y439A),
 CATCGGCGTGCTGGACATCAGCGGATTGAAACATTTG (Y439S),
 CATCGGCGTGCTGGACATCGAGGGATTGAAACATTTG (Y439E)

A **Második témakör** mutáns miozin 5a konstrukciójához használt kódoló szál oligonukleotid:

CCTCACTTACGGAACCCTGACAAGCTTGTTGGAGAAAATGACC (I67K)

Miozin 5a *bacmid* és fehérje konstrukciók előállítás

A miozin 5aS1 és 5aHMM fehérje konstrukciókat Bakulovírus-*Sf9* (*Spodoptera frugiperda*) expressziós rendszerben állítottuk elő.

1. *Bacmid*ok készítése

A miozin 5aS1 és HMM *bacmid* konstrukciókat a *Life Technologies Bac-to-Bac* Bakulovírus Expressziós Rendszerek Kezelési Útmutató (<http://products.invitrogen.com/ivgn/product/10359016>) alapján készítettem. Az alábbiakban bemutatott munkafolyamatok egyes lépéseinek részletező leírását a fenti *Bac-to-Bac* Expressziós Rendszerek Kezelési Útmutató tartalmazza.

Első lépésként *DH10Bac E. coli* sejtbe (*Sigma*) transzformáltuk az egyes miozin 5aS1 és HMM konstrukciókat tartalmazó *pFastBac1* transzfer vektorokat. A *DH10Bac E. coli* törzs saját genomja mellett tartalmazza a bakulovírus módosított genomját (*bacmid*) és egy úgynevezett „Segítő” (*Helper*) plazmidot is, mely a célgén *bacmid* szekvenciába illesztését végző transzpozíciós fehérjét kódolja. A *pFastBac1* transzfer vektorokon a mini-Tn7 (Tn7R, Tn7L) elemek közé klónozott célgén, ennek a transzpozíciós fehérjének a közreműködésével kerül a mini-attTn7 célszekvencia révén a *bacmid LacZ* génjébe. Az eljárás során a *LacZ* gén alkalmazása teszi lehetővé a későbbiekben a sikeres és sikertelen célgén beépülését

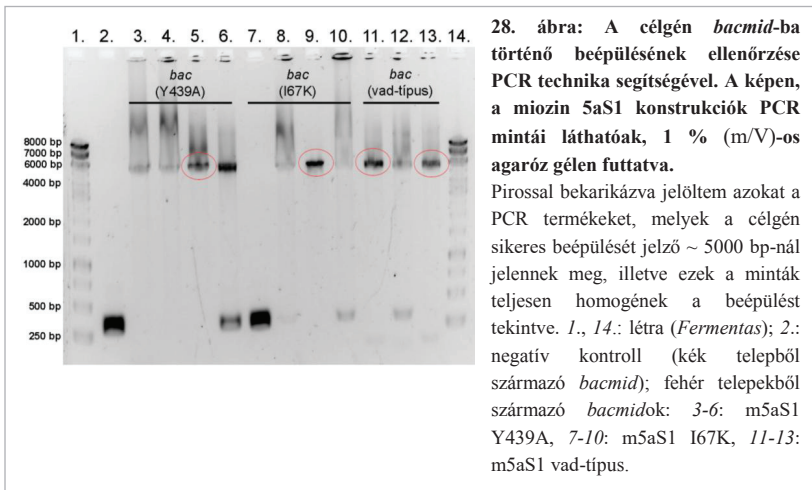
elkülönítését „kék-fehér” szelekció alapján (az ép *LacZ* génről átíródó β -galaktozidáz a táptalajban lévő *Bluo-gal*-t galaktózra és a kék telepszint adó, hidroxí-indolra bontja).

A transzformálást követően a *DH10Bac E.coli* sejteket a kék-fehér szelekciót biztosító összetételű agar-lemezre (Proteose Pepton (*Oxoid*), Yeast Extract (*Oxoid*), NaCl, Agar (*Molar*), 50 μ g/ml kanamycin (*Sigma*), 1 μ g/ml gentamicin (*Sigma*), 10 μ g/ml tetraciklin (*Sigma*), 100 μ g/ml *Bluo-gal* (*Sigma*), 40 μ g/ml IPTG (*Sigma*)) kentük ki, majd 48 órán át inkubáltuk a lemezeket 37°C-on. A fehér telepek megjelenése a célgén sikeres beépülését jelzi a *LacZ* génbe (a táplevesben jelenlévő *Bluo-gal* nem tud lebomlani a bontást végző β -galaktozidáz fehérje hiánya miatt).

A fehér telepekből több párhuzamos (általában három) leoltást végeztünk 5-5 ml antibiotikum tartalmú LB táplevesbe (Proteose Pepton (*Oxoid*), Yeast Extract (*Oxoid*), NaCl, 50 μ g/ml kanamycin (*Sigma*), 7 μ g/ml gentamicin (*Sigma*), 10 μ g/ml tetraciklin (*Sigma*)). A párhuzamos mintákat 24 órán át rázattuk 37°C -on 250 rpm-el.

Az egy napig tartó növesztést követően izoláltuk a rekombináns *bacmid* DNS-t a párhuzamos mintákból.

A célgén sikeres beépülését PCR technika segítségével ellenőriztük (28. ábra).



A PCR-es ellenőrzéshez használt *bacmid* - szekvencia specifikus primerek (M13/pUC *forward* és *reverse* primerek (M13F: GTTTTCCCAGTCACGAC; M13R: CAGGAAACAGCTATGAC (*Sigma*))) jól elkülöníthető méretű termékeket eredményeznek a célgén sikeres és sikertelen beépülése esetén (**28. ábra**). Sikertelen beépülés esetén 283 bázispárnyi *bacmid* DNS szakasz felszaporítását várjuk (negatív kontroll, **28. ábra**), míg sikeres beépülés esetén ehhez még hozzáadódik a *pFastBac1* transzfer vektorból származó 1980 bázispárnyi szakasz, illetve az adott célgénnek megfelelő DNS szakasz (**28. ábra**). A miozin 5aS1-Flag konstrukciók esetében ez a méret 2496 bp, míg a miozin 5a GFP-HMM-Flag konstrukciók esetében 4065 bp.

2. Transzfekeció, vírus amplifikáció

A fenti módon elkészített *bacmid* konstrukciókat transzfekektáltuk *Sy9* rovar sejtbe *Cellfectin* (*Invitrogen*) reagens segítségével. A *Cellfectin* reagens liposzómát képezve bevonja a *bacmid* DNS-t, ami elősegíti a *bacmidok* sejtbe jutását és a fertőzőképes vírusok termelődését. A *Cellfectin* reagensre azért van szükség, mert a módosított bakulovírus DNS (*bacmid*) nem tartalmazza a polihedrin burokfehérje génjét (a bakulovírus éleciklus késői fázisában termelődő fehérje). A polihedrin gén helyén található a kék-fehér szelekeció alapjául szolgáló, *LacZ* gén. A folyamatos célfehérje átírást az erős és konstitutív polihedrin promotér biztosítja a *LacZ* gén előtt. A transzfekeciót követően a rovarsejtekbe bejutó rekombináns *bacmid* DNS nem épül be a rovarsejt genomjába.

A transzfekeció első lépéseként folyamatosan fenntartott *Sy9* sejt kultúrából megfelelő mennyiségű $4,5 \cdot 10^5$ /ml sejt koncentrációjú kultúrát állítottunk elő. Steril, 6-lyukú műanyag edény (1 db 6-lyukú műanyag edény/ *bacmid* konstrukció) minden egyes rekeszébe 2 ml sejt kultúrát pipettáztunk és 1 óráig inkubáltuk 27°C-on. A fenti inkubációs idő alatt konstrukciónként két-két Eppendorf csőbe, csőenként 5 μ l (1 μ g/ μ l) *bacmid* DNS-t tettünk, majd térfogatukat antibiotikum-mentes táptalajjal (*Insect Express*, *Lonza*) 100 μ l-re egészítettük ki. Ezután 6 μ l *Cellfectin* reagenst 94 μ l antibiotikum-mentes táptalajjal mértünk össze (mintánként). Az így készült 100 μ l elegyet mértük az Eppendorf-csővek tartalmához és 45 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten. Ezután a 200 μ l elegyet tartalmazó csövekhez 0,8-0,8 ml antibiotikum-mentes táptalajt adtunk. A 2 ml „mosó” táptalajt óvatosan eltávolítottuk a sejtekről, az 1-1 ml *bacmid* DNS-*Cellfectin* keveréket a sejtekhez pipettáztunk és 5 óráig inkubáltuk 27°C-on. Ezután a transzfekeciós keveréket eltávolítottuk a sejtekről és 2 ml, 5%

penicillin-sztreptomycin (*Sigma*) antibiotikumot tartalmazó táptalajra cseréltük, majd a sejteket 72 óráig 27°C-on inkubáltuk. Az inkubációs idő elteltével a felülúszót eltávolítottuk a sejtekről (a felülúszó az első generációs vírusokat (P1) tartalmazta), és 2% (vol/vol) FBS-t (*Fetal Bovine Serum, Gibco*) hozzákeverve hidegszobában, fénytől védve tároltuk.

A transzfekeiót követően az első generációs vírusokat (P1) az alábbi módszert alkalmazva szaporítottuk tovább harmadik generációs (P3) vírusokig:

T-flaskában 15 ml ($8 \cdot 10^5$ /ml) *Sf9* egyrétegű sejt kultúrát állítottunk elő. A sejtek kitapadását segítő fél óras inkubálást követően, 300 µl P1 vírussal fertőztük az egyrétegű kultúrát, majd 27°C-on inkubáltuk a vírusterfőzés hatékonyságától függően 2-3 napig. Naponta két alkalommal összevetettük a vírusterfőzött kultúrákat a vírust nem tartalmazó negatív kontroll kultúrával. A kitapadt és a táptalajban úszó sejtek arányát és a sejtek morfológiai változását Motic AE31 fénymikroszkóp segítségével követtük nyomon. A P2 kultúrát akkor tekintettük „szüretelésre” alkalmasnak, amikor a sejtek osztódása láthatóan leállt, a sejtek mintegy 40-50 %-a feljött a T-flaska aljáról és morfológiájukat tekintve túlnyomórészt duzzadt, kerek sejtek voltak megfigyelhetők a kultúrában. A „szüretelés” során 50 ml-es Falcon csőben (Janetzki K23 centrifugával, 1000 rpm-en) centrifugáltuk a kultúrát. A felülúszót (második generációs vírus, P2) sterilszűrőn (0.22 µm PES (*Milllex*)) átszűrtük, steril tároló lombikba gyűjtöttük, majd 2% (vol/vol) FBS-t adtunk hozzá. A továbbiakban 4°C-on tároltuk fénytől védve.

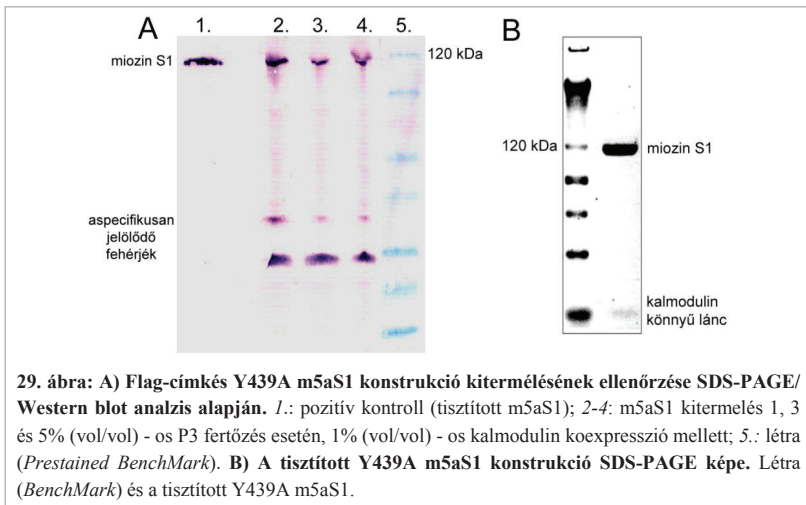
A P3 generáció előállításához, előzetesen a P2 generációval történő fertőzést optimalizáltuk. 50 ml ($1.5 \cdot 10^6$ /ml) rázatott *Sf9* sejt kultúrát 500-, 1000 és 1500-szoros hígításban P2 generációs vírussal fertőztünk és 27°C-on 127 rpm-en rázattunk 3 napon keresztül. Naponta két alkalommal összevetettük a vírusterfőzött kultúrákat a vírust nem tartalmazó negatív kontroll kultúrával. A sejtosztódás ütemét és a sejtek morfológiai változását követtük nyomon.

A továbbiakban a P3 generáció előállításához abban a hígításban alkalmaztuk a P2 generációs vírust, amelynél a második napra a sejtosztódás leállt ($\sim 3 \cdot 10^6$ /ml) és morfológiájukat tekintve túlnyomórészt duzzadt, kerek sejtek voltak megfigyelhetők a kultúrában. 2 nap után 50 ml-es Falcon csőben (K23, 1000 rpm) centrifugáltuk a P3 kultúrát, steril tárolólombikba összegyűjtöttük a felülúszót (P3), majd 2% (vol/vol) FBS-t adtunk hozzá. A továbbiakban 4°C-on tároltuk fénytől óvva.

3. Flag-címkés miozin 5a fehérje konstrukciók termelése és preparálása

A fehérjekonstrukciók expressziója során az SDS-gélelektroforézis/Western blot segítségével meghatározott optimális fertőzési vírus-koncentrációt (általában 1, 3 és 5 % vol/vol) (**29.A ábra**) és termelési időt (48-72 óra) alkalmaztunk. 900 ml 2×10^6 /ml koncentrációjú *Sf9* sejt kultúrát fertőztünk meg 1; 3; 5 % (vol/vol) miozin P3 vírussal, illetve 1 % (vol/vol) P3 generációs könnyűlánc (kalmodulin) vírussal (a P1 generációs vírus kollaborátorunk, James R. Sellers laborjában készült), majd a termelés optimalizálásakor meghatározott ideig rázattuk 27°C -on. Centrifugálással (Beckman L7-65 centrifuga, 5', 3000 rpm, 4°C) összegyűjtöttük a sejt pelletet, majd PBS-sel (10,1 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 18 mM KH_2PO_4 , 1,4 mM NaCl, 27 mM KCl, pH 7,3) mostuk az összegyűjtött sejteket. A PBS eltávolítása után folyékony nitrogénben gyorsfagyasztottuk a sejt pelletet, majd -80°C -on tároltuk.

A fagyasztott sejteket extrakciós pufferben (10 mM MOPS pH 7,3, 200 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 , 1 mM EGTA, 3 mM NaN_3 , 2 mM ATP, 0,1 mM DTT, proteáz inhibitor mix (PMSF, leupeptin (*Sigma*))) olvasztottuk fel (80 ml puffer/2 ml sejt pellet), majd homogenizáltuk. Fénymikroszkóppal (Motic AE31) ellenőriztük az intakt sejtek arányát a lizátumban, majd szonikáltuk a sejteket a tökéletesebb lízis érdekében. Ezután a sejttermelést centrifugálással eltávolítottuk (15', 20000 rpm, Jouan KR22i centrifuga).



Az összegyűjtött felülúszóhoz 1,5 ml FLAG affinitás-gyantát (*Sigma*) adtunk és egy éjszakán át forgatva kevertettük 4°C-on. Ezután a gyantát centrifugáltuk (2', 1000 rpm, K23), majd a felülúszó, gyantát nem tartalmazó részét eltávolítottuk. M-ATP puffert (10 mM HEPES pH 7,2, 0,1 mM EGTA, 3 mM NaN₃, 0,5 M NaCl, 0,1 mM DTT, 1 mM ATP, 5 mM MgCl₂) adtunk a gyantához, óvatosan összekevertük a gyantával, majd az így kapott elegyet centrifugáltuk (5', 1000rpm, K23 centrifuga) és a felülúszót külön edénybe gyűjtöttük. Az összegyűjtött gyantát kromatográfiás oszlopba töltöttük és egy oszloptérfogatnyi M-ATP pufferrel mostuk. Az átfolyót összegyűjtöttük. A gyantát 3 oszloptérfogat HMM pufferrel (10 mM HEPES pH 7,2, 0,1 mM EGTA, 3 mM NaN₃, 0,1 mM DTT) átmostuk, a mosófolyadékot összegyűjtöttük. A rekombináns fehérjét 0,3 mg/ml FLAG-peptidet tartalmazó oldattal eluáltuk. Lassú átfolyási sebesség (<1 ml/perc) mellett 1 ml-es frakciókat gyűjtöttünk. A frakciók fehérjetartalmát Bradford reagenssel ellenőriztük mikrotitráló lemezen (a FLAG-peptid oldatát használtuk fehérjementes kontrollként). A fehérjét tartalmazó frakciókat Q-Sepharose ioncserélő oszlopra kötöttük (100 mM ionerősségnél), majd M-ATP pufferrel eluáltuk (I > 500 mM) koncentrált fehérjefrakciók nyerése érdekében. A fehérjefrakciókat M-ATP pufferben, majd tárolópufferben dializáltuk (10 mM HEPES pH 7,2, 0,1 mM EGTA, 3 mM NaN₃, 50 mM KCl, 1 mM DTT) egy-egy éjszakát és koncentrációjukat Bradford reagenssel meghatároztuk. A gyűjtött mosópufferok fehérjetartalmának SDS-PAGE/Western blot módszerrel végzett analiziséből következtettünk a preparálás során keletkező esetleges fehérjevesztésre, amely 10 %-nál kevesebb volt. A preparálás sikerességét *SDS-PAGE* segítségével ellenőriztük (**29.B ábra**). A tisztított fehérjét folyékony nitrogénben gyorsfagyasztottuk, illetve ebben is tároltuk a továbbiakban.

Aktin preparálás

Az aktin preparálását Straub, valamint Spudich és Watt módszere alapján végeztük (138). A mérésekhez használt α -aktin-t nyúl vázizomból kivont, „aktin szárazporból” tisztítottuk, melyet előzetesen Prof. Hegyi György készített.

Az aktin preparálás során általában 5 g aktin szárazporból indultunk ki. 5 g kiindulási aktin szárazporhoz 100 ml hideg G-puffert (2 mM Tris pH 7,7; 0,1 mM CaCl₂; 0,5 mM ATP, 2,5 mM DTT) adtunk (20 ml/1 g aktin szárazpor) és 40 percig üvegbottal kevertük jégen, majd szűrőpapíron átszűrtük vízlégszivattyú segítségével. Az átszűrt oldathoz 2 mM MgCl₂-t és 50 mM KCl-t adtunk és fél órán át polimerizáltattuk szobahőmérsékleten.

Ezután tropomiozin mentesítés céljából az oldat KCl-tartalmát 0,5 M-ra emeltük (a sötét kis térfogatokban adagolva) jégfürdőben, folyamatos keverés mellett. További egy órán át jégfürdőben kevertettük az oldatot, majd Beckman L7-65 készülékben ultracentrifugáltuk (90°, 40000 rpm, 4°C). A felülúszót eltávolítottuk és a csapadékot 20-25 ml G-pufferben homogenizáltuk majd, 2 körben 2 liter G-pufferben dializáltuk egy-egy éjszakán át. Ezt követően az oldatot ismételt ultracentrifugáltuk (Beckman L7-65, 90°, 40000 rpm, 4°C) és a felülúszót (G-aktin) polimerizáltattuk 2 mM MgCl₂ és 50 mM KCl jelenlétében fél órán át, szobahőmérsékleten. A polimerizálást követően az F-aktin kocsonyát ultracentrifugáltuk (Beckman L7-65, 90°, 40000 rpm, 4°C) és a leülepedett tiszta F-aktin kocsonyát 5-10 ml F-(+DTT) pufferben (4 mM HEPES; 2 mM MgCl₂; 3 mM NaN₃; 1mM DTT), óvatosan homogenizáltuk, majd 2 körben 2-2 liter F-(+DTT) pufferben dializáltuk egy-egy éjszakán át. Ezt követően az F-aktin koncentrációját a 290 nm-es hullámhosszon mért abszorbanciája alapján határoztuk meg (M_r : 42 kDa, ϵ_{290} : $2.65 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (a dialízishez használt F-(+DTT) puffert használtuk fehérjementes kontrollként).

Fluoreszcensen-jelölt fehérjék előállítása

1. Pirén-jelölt aktin (PIA) előállítása

Az aktin Cys³⁷⁴-en N-(1-pirén)jódacetamiddal (a továbbiakban: pirén) történő kovalens jelölését a Cooper és mtsai által kidolgozott protokoll szerint végeztük (139).

Az előző fejezetben bemutatott aktin preparálás utolsó ultracentrifugálását követően, az F-aktin kocsonyát pirén-jelölés esetében F-(-DTT) (4 mM HEPES; 2 mM MgCl₂; 3 mM NaN₃) pufferben 1 mg/ml-es (~24 μM) koncentrációjúra hígítottuk, majd 2 körben 2-2 liter F-(-DTT) pufferben dializáltuk egy-egy éjszakán át. A DTT elhagyása az F-pufferből azért szükséges, mert az F-aktin Cys³⁷⁴-es szulfhidril-csoportjai mellett, a DTT szulfhidril-csoportjai is képesek kovalens kötést létesíteni az N-(1-pirén)jódacetamid-dal, így jelentősen ronthatják a jelölés hatékonyságát. A dialízist követően az aktin térfogatát lemértük és gyors keveréssel 0,5 mM ATP-t, 0,1 mM CaCl₂-t és 0,1 M KCl-t adtunk hozzá.

A pirén-jelöléshez minden esetben DMSO-ba frissen beoldott 50 mM-os pirén-oldatot készítettünk és 10-szeres moláris feleslegben (240 μM), gyors keveréssel adtuk a pirént (*Invitrogene*) az 1 mg/ml-es aktinhoz. A továbbiakban az oldatot fénytől óvva, billegőasztalon inkubáltuk egy éjszakán át szobahőmérsékleten, majd a kicsapódott részt centrifugálással (Janetzi K23, 1000 rpm, 4°C) eltávolítottuk. Ezt követően az oldatot ultracentrifugáltuk

(Beckman L7-65, 90°, 40000 rpm, 4°C) és a pelletet (pirén-jelölt F-aktin) G-(+DTT) pufferben vettük fel, majd 3 körben dializáltuk G-(+DTT) pufferben (24 órán át, 2-2 literben). Ezt követően az oldatot ismét ultracentrifugáltuk (Beckman L7-65, 90°, 40000 rpm, 4°C) és a felülúszót (pirén-jelölt G-aktin) polimerizáltattuk 2 mM MgCl₂ és 50 mM KCl jelenlétében fél órán át, szobahőmérsékleten. A polimerizálást követően a pirén-jelölt F-aktin kocsonyát ultracentrifugáltuk (Beckman L7-65, 90°, 40000 rpm, 4°C) és a leülepedett tiszta pirén-jelölt F-aktin kocsonyát 4-5 ml F-(+DTT) pufferben óvatosan homogenizáltuk, majd 2 körben 2-2 liter F-(+DTT) pufferben dializáltuk egy-egy éjszakán át.

A készített pirén-aktin (PIA) koncentrációját az oldat 290 nm-es (aktin), 320 nm-es (fényszórás) és 344 nm-es (pirén) hullámhosszokon mért abszorbanciája alapján határoztuk meg az alábbi összefüggést alkalmazva:

$$[\text{aktin}] (\mu\text{M}) = [(A_{290}-A_{320})-0.127 \cdot A_{344}] \cdot \text{hígítási faktor} / 0.022$$

$$[\text{pirén-jelölés}] (\mu\text{M}) = A_{344} \cdot \text{hígítási faktor} / 0.022$$

$$\text{Jelölés határfoka (\%)}: [\text{pirén-jelölés}] / [\text{aktin}] \cdot 100$$

2. MDCC-jelölt bakteriális foszfát-kötő fehérje előállítása

Az A197C mutáns bakteriális foszfát-kötő fehérje konstrukció (*Escherichia coli*, phosphate-binding protein (PBP)) előállítását és a Cys¹⁹⁷-en, 7-(diethylamino)-3-(((2-maleimidil)etil)amino)karbonil)kumarin (MDCC) - nal történő fluoreszcens jelölését a Brune és mtsai által kidolgozott protokoll szerint végeztük, Sarlós Kata kollégám segítségével (140, 141). A fluoreszcens-jelölt foszfát-kötő fehérjét a továbbiakban MDCC-PBP-ként fogom említeni.

Mérési módszerek

A Doktori értekezésemben bemutatott, két témakör „körüljárása” során hasonló kísérleti megközelítéseket és módszereket alkalmaztunk, ezért az alábbiakban bemutatottak mindkét témakörre egyaránt vonatkoznak. Az esetleges eltéréseket az adott témakör eredményeinek bemutatásánál („Eredmények” fejezetben) jelzem, illetve ott tárgyalom részletesen.

1. Fluoreszcencia spektroszkópiai és oldat kinetikai mérések

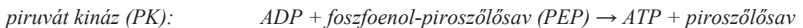
Az oldat kinetikai és fluoreszcencia spektroszkópiai méréseket miozin 5aS1 konstrukciókkal, 25°C-on, SF50-pufferben (20 mM HEPES pH 7,0; 50 mM KCl; 5 mM

MgCl₂; 0.1 mM EGTA; 1 mM DTT) végeztük. A foszfát felszabadulás detektálásán alapuló mérések során az SF50 puffer hozzáadott „P_i mop”-ot (1 mM 7-metil guanozin (*JenaBioscience*), 0.2 egység/ml purin-nukleozid foszforiláz (*Sigma*)) is tartalmazott. Az összes kísérletben, ahol nukleotid-mentes miozin 5aS1-et használtunk, a nukleotid-szennyezés eltávolítására a miozin 5aS1-et 0.02 egység/ml apirázzal (*Sigma*) előinkubáltuk fél órát, szobahőmérsékleten. Az F-aktin filamentumokat az oldat kinetikai és fluoreszcencia spektroszkópiai mérések esetében másfélszeres moláris feleslegben vett falloidin-nel (*Calbiochem*) stabilizáltuk.

A mérési eredmények kiértékelését Microsoft Office Excel 2003, 2008 és OriginLab 7.5, 8.5 (MicroCal Corporation) programok segítségével végeztük. A *stopped-flow* kísérletek kiértékeléséhez a fenti programok mellett a KinTek és Biokine *stopped-flow* készülékekhez tartozó KinTek SF v8.2.6 (KinTek Corporation) és BioKine32 v4.46 (BioLogic) szoftvereket használtuk. Az “Első témakör” esetében a szabad Mg²⁺ koncentráció számítását Maxchelor szoftver (<http://www.stanford.edu/~cpatton/MgATP-NIST.htm>) segítségével végeztük /36. ábra/. A globális illesztéses és *steady-state* kinetikai modellezések esetében KinTek Explorer 3.0 szoftvert alkalmaztunk /41. ábra/.

1) *Steady-state* bazális - és aktin-aktivált ATP-áz aktivitás mérése

A miozin 5aS1 konstrukciók bazális-és aktin-aktivált ATP-áz aktivitást NADH-kapcsolt mérési módszerrel határoztuk meg. Az alábbi kapcsolt reakciósorozatban elbomló NADH 340 nm-es hullámhosszon mért abszorbancia-változásából ($\epsilon_{\text{NADH}, 340} = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) következtettünk az ATP-áz aktivitás mértékére:



A mérést SF50 pufferben, 45 egység/ml PK (*Sigma*), 57 egység/ml LDH (*Sigma*), 200 μM NADH (*Reanal*), 1 mM PEP (*Sigma*) és 1 mM ATP (*Roche*) jelenlétében 0,2-1 μM miozin koncentrációnál, 1 ml térfogatban 25°C-on végeztük. Az A₃₄₀ érték időbeli változását Shimadzu UVPC fotométer kinetikai moduljának segítségével követtük, 1 cm úthosszú kivetta használatával.

Az ATP-áz aktivitást az abszorbancia időbeli változásához illesztett lineáris függvény meredekségéből (dA_{340}/dt) számítottuk az alábbi módon:

$$\text{aktivitás (átviteli szám)} = \text{meredekség } (dA_{340}/dt) / (\epsilon_{NADH,340} * c_{\text{miozin}})$$

/34.C; 36.A; 43.A ábrák/

2) *Steady-state* fluoreszcencia spektroszkópia

A *steady-state* fluoreszcencia spektroszkópia méréseket mikrokvettában, SPEX FluoroMax spektrofluoriméterrel végeztük.

A miozin 5aS1 konstrukciók triptofán-fluoreszcencia emissziós spektrumát nukleotid távollétében (apo állapot), ADP és ATP (*Roche*) jelenlétében, illetve nukleotid-analógok: AMPPNP (adenozin-5'-(β , γ -imidotrifoszfát); ATP γ S (adenozin 5'-O-(3-tio)trifoszfát (*Calbiochem*)) jelenlétében vettük fel. A triptofánoknak a tirozinoktól független szelektív gerjesztését 297 nm-en értük el (gerjesztési sávszélesség: 1 nm) és a fluoreszcencia-emissziós spektrumokat 310 és 430 nm között vettük fel, 4 nm-es emissziós sávszélesség mellett.

A miozin 5aS1 konstrukciók *steady-state* erős aktin-kötési profilját, pirén-aktin emissziós spektrumok alapján határoztuk meg apo állapotban és ATP jelenlétében, a miozin 5aS1 konstrukciók koncentrációját változtatva. A pirén-aktin fluoreszcenciája a gyenge miozin kötésre nem, csak az erős miozin kötésre érzékeny. A pirén-aktint 365 nm-en gerjesztettük és a fluoreszcencia emissziós spektrumokat 380-460 nm-es tartományban vettük fel.

A fehérjementes mérési pufferrel felvett spektrumokat kivontuk a miozin spektrumokból. Az ATP-s méréseknél a szubsztrátot akkora feleslegben adtuk a miozinhoz, hogy az ATP-áz ciklusok a mérési idő alatt folyamatosan kövessék egymást. **/43.B ábra fő panel/**

Az aktin felszabadulás sebességi állandóját az aktomiozin *rigor* komplexből (nukleotid mentes aktomiozin) szintén pirén-aktin fluoreszcencia változás alapján határoztuk meg. 365 nm-es hullámhosszon gerjesztett pirén-aktomiozin *rigor* komplexet - a kötési egyensúly beállítását követően - nagy feleslegben vett „hideg” (nem jelölt) aktinnal kevertük össze és a pirén-aktin fluoreszcencia változásának követésével vizsgáltuk a miozin disszociációját a pirén-aktinról.

3) *Steady-state* koszedimentáció

A miozin 5aS1 konstrukciók *steady-state* aktin kötési arányát ATP jelenlétében ultracentrifugálás alapú kísérletben figyeltük meg. Ez a módszer a gyenge és erős aktin-kötött állapotok együttes nyomon követését teszi lehetővé. A miozin 5aS1 konstrukciókat különböző koncentrációban hozzáadott F-aktinnal előinkubáltuk, 0.02 egység/ml apiráz (*Sigma*) jelenlétében. Az ultracentrifugálás kezdetekor az előinkubált mintákhoz nagy feleslegben vett ATP adtunk (annyit, hogy az ATP-áz ciklus az ultracentrifugálás ideje alatt folyamatos legyen) és 20 percig, Beckman TLA-100.1-es rotort használva 90 000 rpm-en fugáltuk, 4°C-on. Ezt követően a miozint tartalmazó felülúszót és a kialakult aktomiozin komplexet, illetve a miozinnal komplexet nem képző aktint is tartalmazó pelletet elválasztottuk. SDS-PAGE és az azt követő, denzitometriás módszerrel (GelQuant Pro, Bio-Imaging System) határoztuk meg a miozin aktomiozin komplexbe került hányadát az egyes F-aktin koncentrációknál. /**43.B ábra** mellék panel/

4) Tranziens kinetikai mérések

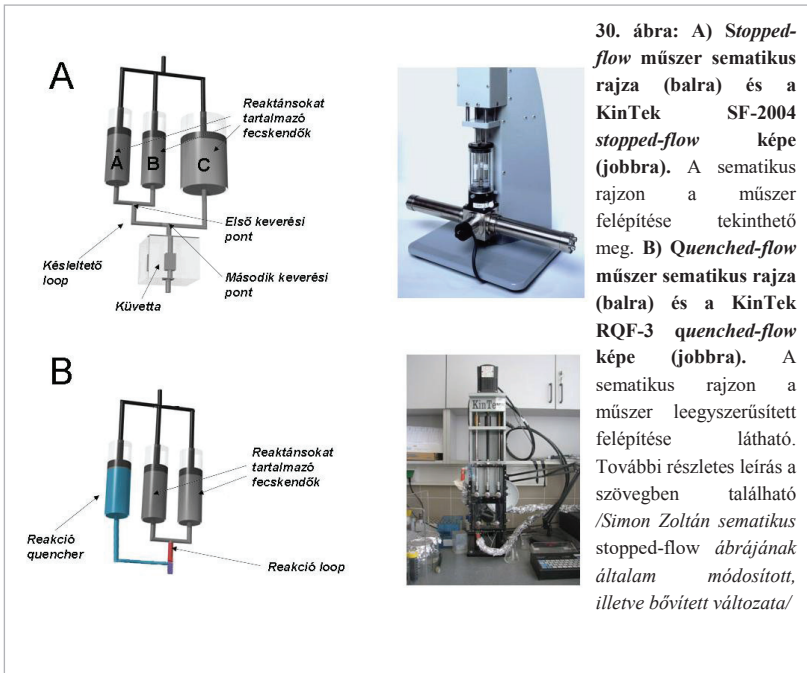
A különböző tranziens folyamatok kinetikájának nyomon követésére KinTek SF-2004 és BioLogic SFM 300 *stopped-flow* tranziens kinetikai műszereket használtunk (**30.A ábra**), mely műszerekkel a reagensek gyorsan összekeverhetők, és a reakció során bekövetkező optikai változások 2-3 ms-os holtidővel követhetők. Az ATP hidrolízis kinetikájának vizsgálata során KinTek RQF-3 *quenched-flow* műszert használtunk (**30.B ábra**).

A műszer felhasználási lehetőségeit és működését az ATP hidrolízis vizsgálatát célzó kísérletek tárgyalásánál részletezem.

Stopped-flow műszer segítségével végzett kísérleteinkben, a készülék úgynevezett „*single mix*” („egyszeri keverés”) és „*double mix*” („kétszeri keverés”) üzemmódját is használtuk. A *stopped-flow* kísérletek során, az úgynevezett „*double mix*” kísérletektől eltérően, 1:1-hez térfogatarányú keverést alkalmaztunk. Az optikai beállítások Wang és mtsai által leírtak szerint történtek (142).

Az **30.A ábrán** látható a KinTek *stopped-flow* sematikus rajza és képe, a lehetséges keverési pontokkal és útvonalakkal.

Single mix üzemmódban A és C fecskendőket használjuk, a keverés utáni holtidő csökkentése céljából (az A és B fecskendők alkalmazása esetén a reakció lezajlana már a küvettaiba érkezés előtt, a reakcióelegy „*késleltető loop*”-ban töltött ideje alatt). *Double mix* üzemmódban az A, C illetve B fecskendőt egyaránt használjuk. A *Double mix* üzemmód lényege, hogy az A és B fecskendőben lévő anyagok összekeverése után beállítható a második keverés (AB mix keverése a C fecskendő tartalmával) előtti reakcióidő hossza. *Double mix* kísérleteinkben 2:1:2 térfogatarányú keverést alkalmaztunk az A:B:C fecskendőkre nézve. /33.C ábra/



30. ábra: A) *Stopped-flow* műszer sematikus rajza (balra) és a KinTek SF-2004 *stopped-flow* képe (jobbra). A sematikus rajzon a műszer felépítése tekinthető meg. B) *Quenched-flow* műszer sematikus rajza (balra) és a KinTek RQF-3 *quenched-flow* képe (jobbra). A sematikus rajzon a műszer leegyszerűsített felépítése látható. További részletes leírás a szövegben található /Simon Zoltán sematikus *stopped-flow* ábrájának általam módosított, illetve bővített változata/

i. Nukleotid kötés

A miozin 5aS1 konstrukciók nukleotid kötési kinetikáját fluoreszcensen jelölt nukleotidokkal (3'-(N-metilnitrilil)-2'-deoxi – nukleotidokkal: md-ATP; md-ADP (*JenaBioScience*), a továbbiakban a fenti rövidítéseket fogom alkalmazni), valamint a miozin 5aS1 konstrukciók saját triptofánjai (Trp) által szolgáltatott fluoreszcencia jelváltozás alapján követtük nyomon. Az md-ADP-t 0,04 μM -os nyúl vázizom miozin 2 segítségével állítottuk elő. Az md-ATP-t nyúl vázizom miozin 2-vel hidrolizáltattunk SF50 pufferben 4,5 órán át 25°C-on (a hidrolízishez szükséges optimális időt, a nyúl vázizom miozin 2 átviteli száma (k_{cat}) (143) és a koncentrációk (miozin 2; hidrolizálandó md-ATP) ismeretében számítottuk).

/33.A; 33.C mellék panel; 40.A-C ábrák /

Az ATP kötődését az aktomiozin komplexhez fluoreszcensen jelölt pirén-aktin (PIA) alkalmazásával is nyomon követtük. /33B; 40.D -F ábrák/

ii. Foszfát felszabadulás

A foszfát felszabadulás kinetikájának meghatározásához az aktomiozin.ADP.P_i komplexről fluoreszcensen jelölt foszfát-kötő fehérjét (MDCC-PBP, a molekula részletes leírását lásd fent, a „*Fluoreszcensen-jelölt fehérjék előállítása*” című alfejezetben) használtunk.

A KinTek *stopped-flow* készülék „kétszeri-keverés” üzemmódját alkalmazva úgynevezett „egyszeri átviteli” (*single turnover*) kísérletben követtük nyomon az aktin hiányában mérhető és az aktin-aktivált foszfát felszabadulást. Az első keverés során a miozint kevertük össze ATP-vel. A második keverés előtti holtidőt úgy optimalizáltuk, hogy a második keverésig a reakció eljusson az ATP hidrolíziséig, de ne jusson el az első termék, a foszfát felszabadulásáig. A második keverés során 0-100 μM -os (keverés előtti koncentrációk) növekvő aktin koncentrációjú oldatokat kevertünk a reakcióelegyhez és az MDCC-PBP fluoreszcencia növekedése alapján a P_i felszabadulás kinetikáját követtük nyomon (144).

/33.D ábra/:

A kísérlet során az első keveréstől a második keverésig lezajló lépései az aktomiozin ATP-áz ciklusnak:



A második keverés után lezajló lépései az aktomiozin ATP-áz ciklusnak:



A KinTek készülék „egyszeri-keverés” üzemmódját alkalmazva úgynevezett „többszöri átviteli” (*multi-turnover*) kísérleteket is végeztünk Harami Gábor munkatársam segítségével.

Ezzel a módszerrel nem közvetlenül a foszfát felszabadulás kinetikájának jellemzésére nyílik lehetőség, hanem a sebesség-meghatározó lépés helyzetének azonosítására a foszfát felszabaduláshoz képest. A mérés során szintén az MDCC-PBP fluoreszcencia változását követtük nyomon. A „többszöri átviteli” kísérletek esetében az ATP-t moláris feleslegben keverjük az enzimhez, így az enzimciklus többszöri lezajlását biztosítjuk a kísérlet során. Ha az enzimciklus sebesség-meghatározó lépése a foszfát felszabadulás előtt zajlik le, vagy az maga a foszfát felszabadulás, akkor a *steady-state* ATP-áz aktivitást tükröző, lineáris függvénnyel jellemezhető tranzienszt kapunk. Ilyenkor egy úgynevezett lag fázist is várunk a lineáris fázis előtt abban az esetben, ha olyan ATP koncentrációt alkalmaztunk ahol az ATP kötés és a sebesség-meghatározó lépés sebességi állandója hasonló érték. Ez a fázis egyes esetekben olyan gyors, hogy nem oldható fel a mérés során. Abban az esetben, ha a sebesség meghatározó-lépés a foszfát felszabadulását követően történik, akkor a *steady-state* ATP-áz aktivitását reprezentáló lineáris fázis előtt, egy úgynevezett gyors „burst” fázis figyelhető meg. Burst fázis megjelenését akkor tapasztalhatjuk, ha a kezdeti jelváltozás sebessége nagyobb, mint a később kialakuló *steady-state* jelváltozási sebessége. Az MDCC-PBP fluoreszcencia értékeket P_i kalibráló egyenes felvétele alapján (145) alakítottuk P_i koncentráció értékekké. /42.B, C/

iii. ADP felszabadulás

Az ADP felszabadulás kinetikáját md-ADP fluoreszcencia változás alapján követtük nyomon úgynevezett „chasing” kísérletben. A „chasing” kísérletek lényege, hogy a fluoreszcens jelet adó molekulát előinkubáljuk a vizsgálni kívánt enzimmel a kötési egyensúly beállításához szükséges ideig. Ezt követően, nagy feleslegben vett, fluoreszcensen nem jelölt - de az enzimhez nagy affinitással kötődő - molekulával keverjük össze, mely a fluoreszcensen jelölt molekula helyére kötve, annak visszakötési valószínűségét csökkenti (ezt a „chaser” molekula nagy feleslegben történő alkalmazása és lehetőség szerint nagy affinitása biztosítja a kötőpartnerhez). Az md-ADP fluoreszcencia csökkenést mutat miozinról

való leválása esetén. Ebben a kísérletben ATP-t alkalmaztunk „*chaser*” molekulaként. /**36.B ábra**/

Az ADP felszabadulás kinetikája pirén-aktin fluoreszcencia változást követve is mérhető (a kísérleti elrendezés az ADP felszabadulás nyomon követése mellett az aktomiozin komplex ADP affinitásának meghatározását is lehetővé teszi). A kísérlet során pirén-aktomiozin komplexét növekvő koncentrációban hozzáadott ADP-vel (*Roche*) előinkubáltunk, majd nagy feleslegben alkalmazott ATP-vel (*Roche*) összekeverve az aktomiozin-ADP komplexet, az aktomiozin komplex disszociációjából származó pirén-aktin fluoreszcencia növekedést követtük. A kapott ATP-indukált aktomiozin-disszociációs tranziensek kétfázisúak voltak: a gyors fázis a nukleotid-mentes pirén-aktomiozin ATP-indukált disszociációját mutatta, míg a lassú fázis esetében az ADP-kötött pirén-aktomiozinról az ADP-nek el kellett távoznia (lassú lépés), hogy az ATP-kötés megtörténhessen. A lassú fázis megfigyelt sebességi állandóinak átlaga, így az ADP felszabadulás sebességi állandóját adta meg (az ATP kötése és az aktomiozin komplex disszociációja minimum egy nagyságrenddel, de inkább nagyságrendekkel gyorsabb az ADP felszabadulásnál). A lassú fázis amplitúdóhányadából az ADP-telítettség mértékére és a pirén-aktomiozin ADP affinitása következtethettünk. /**34.A, B és 42.D ábrák**/

iv. *Aktin kötés*

A miozin 5aS1 konstrukciók aktin-kötési kinetikáját pirén-aktin fluoreszcencia változás (csökkenés) alapján követtük. Az aktin-kötés hőmérséklet-függésének méréséhez a kísérletet 3,4 - 25,4°C közötti hőmérsékleteken végeztük el. /**38. ábra**/

v. *Aktomiozin komplex disszociációjának vizsgálata*

Az aktomiozin komplex ATP kötés hatására történő „szétesését” a komplex fényszórás változása alapján követtük *stopped-flow* műszerben. A fényszórás méréseket úgy is megismételtük, hogy egyidejűleg a pirén-aktin fluoreszcencia változását is nyomon követtük.

A bemutatott tranziens kinetikai kísérletekben, a foszfát felszabadulás kinetikájának vizsgálatát célzó „egyszeri átviteli” kísérletektől eltérően (**33.D ábra**), minden esetben a *stopped-flow* készülék „egyszeri-keverés” üzemmódját használtuk. A fenti tranziens kinetikai mérések további körülményei az **1. Függelékben** tekinthetők meg.

vi. ATP hidrolízis

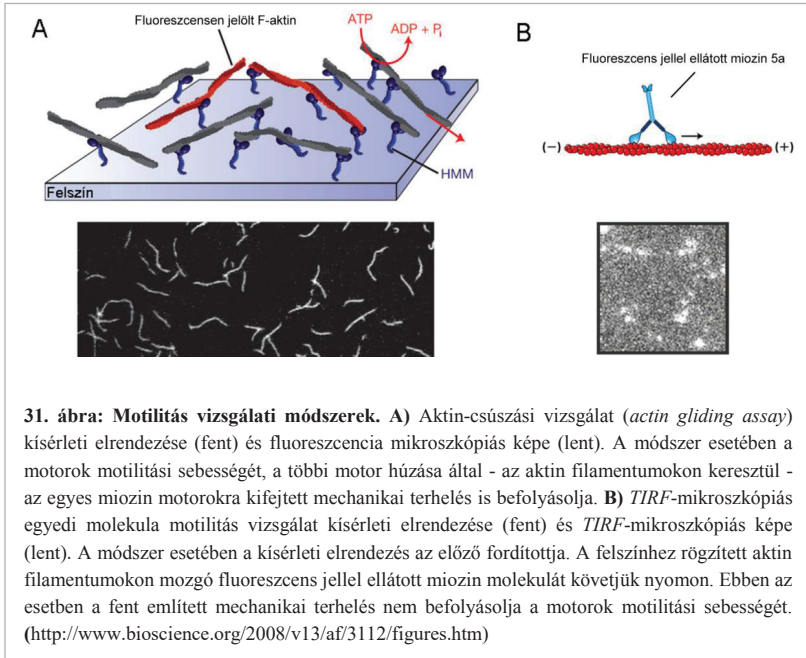
A miozin 5aS1 konstrukciók ATP hidrolízis tranzienseinek lefolyását *quenched-flow* gyors kinetikai mérőműszer segítségével követtük (**30.B ábra**). A készülék segítségével a reagensek 1 ms-os keverési holtidővel összekeverhetők, majd a reakció, különböző időpontokban, kémiai ágens segítségével leállítható (ilyen kémiai ágens („*quencher*”) lehet például: HCl, CCl_3COOH , EDTA). Ezt követően, a különböző időintervallumok alatt képződött termékek mennyisége, illetve minősége különböző módszerek segítségével azonosítható, például izotópos radioaktivitás vizsgálat vagy HPLC.

A módszer kiválóan alkalmas rövid életidejű közti termékek vizsgálatára, így például az ATP hidrolízisét követően kialakuló termékek azonosítására. A miozin 5aS1 konstrukciók ATP hidrolízisének karakterizálása során $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-}]\text{ATP}$ izotópot használtunk és a hidrolízis reakciót különböző inkubálási időket követően 3 M-os hidrogén-kloriddal (HCl) állítottuk le. A reakció leállítását követően, aktív szénrel ülepítettük a hidrolizálatlan $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-}]\text{ATP}$ -t (ezzel együtt az ADP tartalom is ülepedik). A felülülő $\gamma\text{-}^{32}\text{P}_i$ tartalma a hidrolízis lépést követően kialakult M.ADP. $\gamma\text{-}^{32}\text{P}_i$ komplexből és a M.ADP. $\gamma\text{-}^{32}\text{P}_i$ komplexről már felszabadult $\gamma\text{-}^{32}\text{P}_i$ tartalomtól származik. A $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-}]\text{ATP}$ hidrolízisének mértékére a szénrel ülepítés után és előtt, Beckman LS1801 szcintillátor segítségével, meghatározott $\gamma\text{-}^{32}\text{P}_i$ tartalom arányából következtettünk. Az így kapott értékeket, az enzimet nem tartalmazó minta $\gamma\text{-}^{32}\text{P}_i$ tartalmával (tehát, nem az enzim hidrolizáló tevékenységéből származó $\gamma\text{-}^{32}\text{P}_i$ tartalommal), illetve a végtelen időre extrapolált enzimkatalízis során keletkező $\gamma\text{-}^{32}\text{P}_i$ mennyiséggel korrigáltuk.

A hidrolízis egyensúlyi állapotját (K_3 , **1. és 4. táblázat**) egyszeri átviteli kísérletek (miozin 5aS1 : ATP = 2 : 1; 0,07 - 100 s-os időskálán követve az ATP hidrolízisét /**33.C és 42.A ábra** fő panel/) és többszöri átviteli kísérletek (miozin 5aS1 : ATP = 1 : 10 /**42.A ábra** mellék panel/) alapján is meghatároztuk. A hidrolízis – adott ATP koncentrációnál mérhető - látszólagos sebességi állapotjának meghatározása (k_3+k_{-3} , **4. táblázat**) többszöri átviteli kísérletek alapján történt. Ebben az esetben 5 - 600 ms-os időskálán követtük az ATP hidrolízisét /**42.A ábra** mellék panel/.

2. Motilitási mérések

Az aktin-csúszási kísérleteket („*actin gliding assay*”) (31.A ábra), illetve a *TIRF* (*Total Internal Reflection Fluorescence*) mikroszkópiás egyedi molekula motilitási vizsgálatokat (31.B ábra), Takeshi Sakamoto és Saikat Chakraborty együttműködőink végezték.



A motilitás vizsgálatokhoz az N-terminálisán GFP-vel fuzionáltatott miozin 5aHMM (kétféjű) konstrukciókat használtunk. Az aktin-csúszási vizsgálatokat Yildiz és mtsai által leírtak alapján (42), a következő mérési pufferben végeztük: 40 mM KCl, 20 mM MOPS (pH 7.5), 5 mM MgCl₂, 0.1 mM EGTA, 50 mM ditiotritol, 1 mM ATP, “oxigén eltávolító rendszer” (25 mg/mL glükóz, 0.1 mg/mL glükóz-oxidáz, and 2 µg/mL kataláz). Az F-aktin filamentumokat rodamin-falloidinnel jelöltük. Az egyedi aktin filamentumok sebességét a Metamorph szoftver Track Objects funkciójának segítségével számítottuk. Az egyedi molekula miozin 5aHMM motilitás vizsgálatot *TIRF* mikroszkópiás technika segítségével, Sakamoto és mtsai (146) által előzetesen leírtak szerint végeztük. Argon lézerből származó

488-nm hullámhosszúságú fényvel gerjesztettük a m5aHMM molekula N-terminálisára fúzionáltatott GFP molekulát. Az egyedi molekulák sebességét a fluorofór mozgása alapján határoztuk meg Metamorph szoftver segítségével. A motilitási kísérleteket 25°C-on végeztük, melyet az OLYMPUS IX70 (105) készülék termosztáló rendszere biztosított. /35. és 44. ábra/

A fentiekben bemutatott kísérletes eredmények kiértékelése során a “Függelék” fejezet **2. Függelékében** bemutatott függvényeket és egyenleteket alkalmaztuk.

3. Szerkezeti modellezés

Az alábbiakban bemutatott szerkezeti modellezéseket Hazai Eszer és Bikádi Zsolt együttműködőink végezték.

A miozin 5a molekula *postrigor* (1W7J) és gyenge ADP kötött állapotában (1W7I) kristályosított szerkezeteit használtuk fel (119). Az erős ADP kötött állapot modellezése céljából a BeF_x-ot eltávolítottuk az 1W7J szerkezetből és így végeztünk energia minimalizációt. A kapott modellt és az Y439A gyenge-és erős ADP állapotait szemiempirikus kvantummechanikai geometriai optimalizációnak vetettük alá. Az energia minimalizációt MOE (Molecular Operating Environment suite, Chemical Computing Group Inc., Montreal) szoftverrel végeztük AMBER99 erőter alkalmazásával (147). Az ADP és a 4 Å-ös környezetben található aminosavak rögzítve voltak az AMBER99-el történő optimalizálás alatt, majd geometriai optimalizálást végeztünk az AM1 szemiempirikus kvantumkémiai módszerrel (148). Az RHF-AM1 számítás megállítása 0,01 alá eső gradiensértéknél történt. Az erős-gyenge ADP-kötött állapotok közötti minimalizált szerkezeti trajektória kiszámításához a Yale Morph Server-t használtuk. Az átalakulás alatt, a Mg²⁺ translációs vektorának becslése a T170 és S218 koordinációs oxigénjeinek átlagolt translációs vektorai alapján történt. A lokális geometriai illesztések a Profit szoftverrel történtek (Martin, A.C.R. és Porter, C.T., <http://www.bioinf.org.uk/software/profit>), az illesztésekhez a *switch-1*, *switch-2* és *p-loop* régiókat használva.

VI. EREDMÉNYEK

1. ELSŐ TÉMAKÖR

A konzervatív switch-2 hurok (LDIXGFE) egyetlen, miozin osztályonként variábilis elemének (X) szerepe a miozin 5a motor működésében

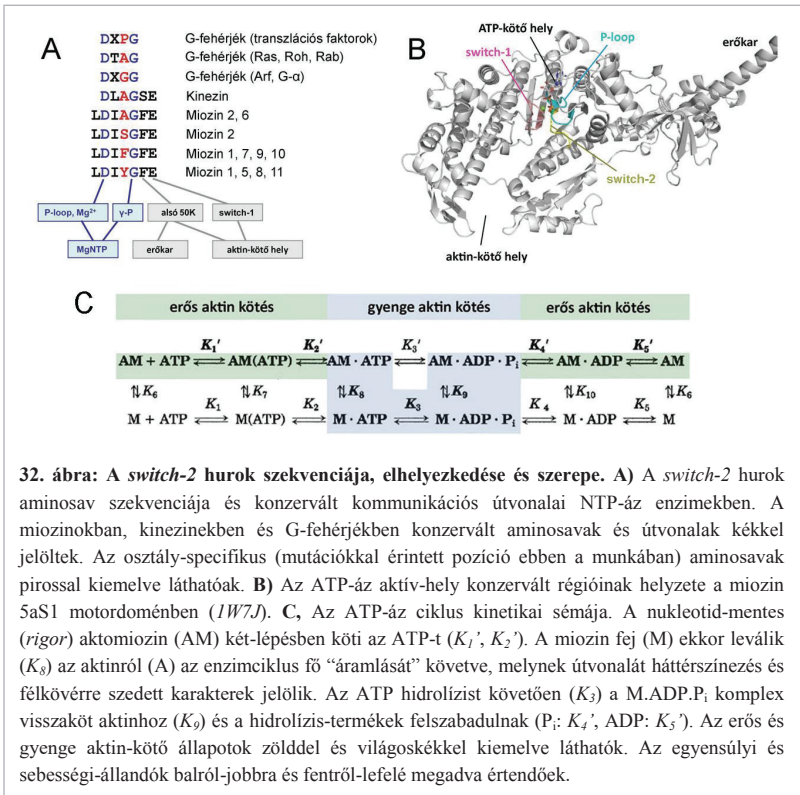
Probléma és megközelítése

Az irodalomban jól ismert, hogy a miozinok, kinezinok, G-fehérjék és a nukleozid-trifoszfát (NTP-áz) enzimekhez tartozó egyéb szupercsaládok hasonló enzim mechanizmus révén, sok esetben homológ szerkezeti elemek bevonásával hasznosítják az NTP-ben tárolt kémiai energiát mechanikai munkavégzésre (sejten belüli transzport, izomkontrakció, biokémiai-folyamatok minőség-ellenőrzése), vagy akár jelátviteli folyamatokban jeltovábbításra. E működések alapja a nukleotid-kötő hely és a partnerfehérje (sín, effektor fehérje) kötőhelyeül szolgáló régió allosztérikus kapcsoltsága (**32. ábra**). Miozinok és kinezinok esetében az egyirányú haladást az aktin, illetve mikrotubulus sín mentén a nukleotid-kötő hely nukleotid tartalmával ciklikusan változó „sín affinitás” változása teszi lehetővé. A nukleotid-kötő hely és a partnerfehérje kötőhelye közötti allosztérikus kapcsoltság kialakításnak legfontosabb, konzervált szekvenciával rendelkező elemei a *p-loop*, a *switch-1* és *switch-2* hurkok (**32.B ábra**) (149, 150).

A *switch-2* hurok G-fehérjék, kinezinok, miozinok nukleotid-kötő helyén található konszenzus szerkezeti elem. A *switch-2* hurok szekvenciájában (*LDIXGFE*) egy pozíció mutat változatosságot (X) a miozinok körében (10). A hurok szekvenciáját alakító konzervált aminosavak kitüntetett szerepét az enzimműködés során korábbi kutatások igazolták (9, 78-80, 151) (lásd az „*Irodalmi Áttekintés*” ide vonatkozó részeiben is (23., 49. és 51. o)) (**32. ábra**), azonban az egyetlen variabilitást mutató pozíció szerepe feltáratlan volt.

A miozin 5 osztály tagjai tirozint tartalmaznak a *switch-2* variábilis pozíciójában (*LDIYGFE*), míg például miozin 2 osztály képviselői esetében, így a nagy tömegben (kötegekben) működő izom miozin 2 motorban is, kisebb oldalláncú aminosavak foglalják el az említett pozíciót (**32.A ábra**).

A miozin 5a *switch-2* tirozinját kisebb oldalláncú aminosavakra (alanin, serin, glutamát) cseréltük. Az Y439A és Y439S mutánsok a miozin 2 izoformák szekvenciáját mimikálták. A vad-típusú miozin 5a (*Gallus gallus*) és miozin 2 (*Dictyostelium discoideum*) izoformák mellett, olyan mesterséges *Dictyostelium* miozin 2 mutánsok szerkezete is elérhető, melyek a miozin 5a Y439-es pozíciójával homológ pozícióban tirozint vagy glutmátot tartalmaznak (S456Y (PDB kód: *1W9I* és *1W9J*); S456E (PDB kód: *1W9K* és *1W9L*)). Ez alapján hoztuk létre a miozin 5a Y439E mutánst, mellyel a mutáció által indukált kinetikai sajátságokról és a kapcsolódó szerkezeti átrendeződésekről akartunk információt szerezni.



Az alábbiakban részletezett kísérleti megközelítéseket alkalmazva azonosítottuk a *switch-2* tirozinjának pontos szerepét a miozin 5a motor működésében.

Mérésekhez használt fehérje konstrukciók

A fluoreszcencia spektroszkópiai és oldat kinetikai mérésekhez vad típusú és mutáns (Y439A, Y439S, Y439E) egyfejú (S1) miozin 5a konstrukciókat használtunk. Ez a motordomént és az ahhoz C-terminálisan kapcsolódó erőkar két-IQ motívumát tartalmazó fragmentuma a molekulának.

Az egyedi-molekula motilitás vizsgálatokhoz a vad-típusú és Y439A mutáns miozin 5a konstrukció N-terminálisán GFP-jelölt, kétfejú (HMM) változatát használtuk. Ez a motordomént és az ahhoz C-terminálisan kapcsolódó erőkar hat-IQ motívumát tartalmazó fragmentuma a molekulának.

Az „Első témakör” során megadott sebességi-és egyensúlyi állandók esetében a **32.C ábra** nevezékτανát követtem.

A feltüntetett koncentrációk minden esetben a keverést követő koncentrációk, a kivételt képező esetekben, a vonatkozó résznél jelzem az eltérést.

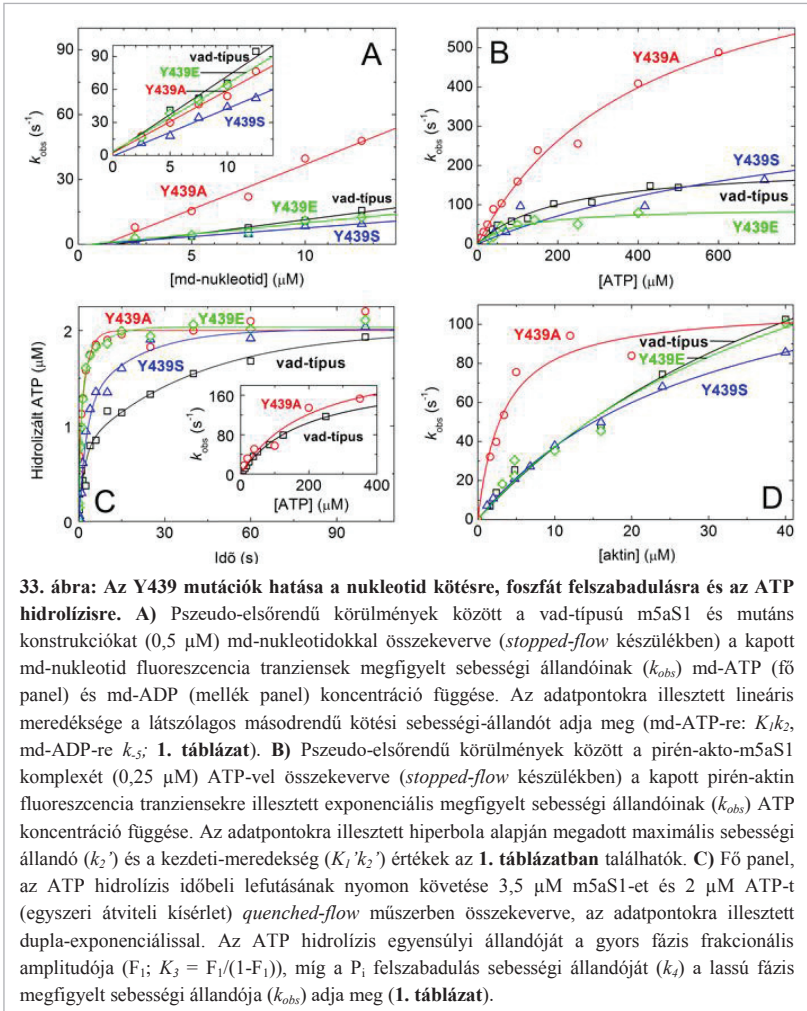
Az Y439 mutációja nem okoz fennakadást a miozin 5a motor nukleotid-kötési és ATP-hidrolizáló képességében, illetve a foszfát felszabadulásában sem okoz jelentős változást

Az ATP ($K_{1/2}$) és ADP (k_{-5}) kötődését a miozin 5aS1-hez fluoreszcensen-jelölt nukleotidok (md-ATP, md-ADP) jelváltozása alapján követtük nyomon gyors-keveréses módszerrel *stopped-flow* műszerben (**33. ábra**). A mutációk nem okoztak jelentős változást a nukleotid-kötés kinetikájában, egyedül az Y439A mutáns esetében volt megfigyelhető gyorsabb md-ATP kötés (**33.A ábra; 1. táblázat**)⁵.

Az ATP indukált „szétesését” az aktomiozin komplexnek pirén-aktin fluoreszcencia változás alapján követtük nyomon szintén gyors-keveréses módszerrel, *stopped-flow* műszerben (**33.B ábra**). Az ATP kötődését követően a miozin erős - gyenge aktin-kötő állapotai követik egymást, majd az aktinról levált állapot. Az ATP kötést követő pirén-aktin fluoreszcencia növekedés az ATP kötés hatására bekövetkező erős-aktin kötő állapotban elfedett pirén fokozottabb hozzáférhetőségének köszönhető. Azonban gyenge aktin-kötő állapotban és aktinról levált állapotban a pirén hasonlóan hozzáférhető, így a két állapot fluoreszcenciája is hasonló, így a pirén-jel nem tud különbséget tenni ezen állapotok között.

⁵ A témakörökhöz tartozó táblázatok, az adott témakörmél az „Eredmények” fejezet végén találhatóak.

A kapott pirén-tranziensek alapján kapott megfigyelt sebességi-állandók (k_{obs}) hiperbolikus ATP-koncentráció függése két-lépéses ATP kötési mechanizmusra (K_1/k_2) utal, mely során a másodrendű kötési lépést (K_1') egy szerkezetváltozási lépés követ (k_2'). A két-lépéses folyamat paraméterei eltérőek voltak a konstrukciók esetében, azonban a megfigyelt sebességi állandók (k_{obs}) maximuma (k_2') minden esetben 80 s^{-1} feletti érték volt (**1. táblázat**).



Mellék panel, pszeudo-elsőrendű körülmények között m5aS1 (0,5 μM vad-típus, illetve Y439A) és ATP gyorskeverésével (*stopped-flow* műszerben) kapott triptofán fluoreszcencia tranziensekre illesztett exponenciálisok megfigyelt sebességi állandóinak (k_{obs}) ATP koncentráció függése. Az adatpontokra illesztett hiperbola alapján kapott kezdeti mereedség (K_1/k_2) és a maximális megfigyelt sebességi állandó ($k_3 + k_{-3}$) értékek az **1. táblázatban** találhatóak. **D)** A m5aS1.ADP.P_i komplexről történő P_i felszabadulás megfigyelt sebességi állandóinak (k_{obs}) aktin koncentráció függése MDCC-PBP (3 μM minden fecskendőben) fluoreszcencia változását nyomon követve, „kétszeri keverés” *stopped-flow* kísérletben. Az első keverés alkalmával 0,7 μM m5aS1-et és 0,3 μM ATP-t (egyszeri átvitel kísérlet; első keverést követő koncentrációk) gyorskevertünk, majd 3 s inkubálási idő után (az ATP megkötéséhez és hidrolíziséhez szükséges idő) a második keverés alkalmával növekvő koncentrációban aktint kevertünk hozzá (a kísérlet részletes leírása az „Anyagok és Módszerek” fejezetben található). Az adatpontokra illesztett hiperbola alapján meghatározott maximális sebességi állandó (k_s') és fél-telítési aktin-koncentráció (K_s) az **1. táblázatban** található. Szimbólumok: \square , vad-típus; \circ , Y439A; Δ , Y439S; \diamond , Y439E. A kísérlet körülményei az **1. táblázat** szerint.

Az összes mutáns megőrizte a vad-típus ATP hidrolízist katalizáló képességét. Továbbá a mutáns konstrukciók magasabb bazális (aktin hiányában mért) ATP-áz aktivitást mutattak a vad-típushoz képest (**1. táblázat**).

ATP kötés hatására a mutáns konstrukciók, a vad-típushoz hasonló triptofán-fluoreszcencia növekedést mutattak, mely fluoreszcencia jelváltozás valószínűleg az erőkar bázisánál található *relay-hurok* (**15. ábra**) 483-as triptofánjának (W483) köszönhető (41, 80). A W483 fluoreszcencia növekedése feltételezhetően a nukleotid-kötő helyen található *switch-2* hurok nyitott-zárt átmenetével jár együtt (38, 78, 152). *Dicyostelium* miozin 2 estében azonosították, hogy a - miozin 5a 483-as triptofánnal homológ - W501-es fluoreszcencia növekedése a *switch-2* nyitott-zárt átmenetével jár együtt. A *relay* hurok triptofán a *switch-2* huroktól való távoli helyzetének ellenére a *switch-2* konformáció-változását is jelzi, mivel ezek a szerkezeti elemek együtt mozognak az ATP-áz ciklus során (lásd részletesen az „Irodalmi Áttekintés, ATP hidrolízis és erőkar felhúzás” alfejezetében). Az ATP hidrolízis a *switch-2* zárt állapotában történhet meg (9, 78), majd a hidrolízist követően a *switch-2* huroknak újra ki kell nyílnia (9, 97), hogy a hidrolízis termékek közül elsőként, a foszfát felszabadulhasson. A modellt eredményeink is megerősítették, mivel az ATP kötés hatására tapasztalható kisebb triptofán fluoreszcencia növekedés nagyobb bazális ATP-áz aktivitással párosult az Y439A és Y439E konstrukciók esetében (miozin 5a esetében a foszfát felszabadulás az enzimmiklus sebesség-meghatározó lépése aktin hiányában) (**1. táblázat**). *Stopped-flow* műszerben, gyors keveréses módszerrel összekeverve az ATP-t a vad-típusú és

Y439A miozin 5a konstrukciókkal a triptofán fluoreszcencia növekedés megfigyelt sebességi állandói (k_{obs}) hiperbolikus ATP koncentráció-függést mutattak (**33.C ábra** mellék panel). A maximális k_{obs} érték, mely az ATP hidrolízis látszólagos sebességi állandóját (k_3+k_{-3}) adja meg, mindkét konstrukció esetében 100 s^{-1} feletti értéknek adódott (**1. táblázat**).

Egyszeri átvitel (*single-turnover*) *quenched-flow* kísérletben az ATP hidrolízis időbeli lefolyása két fázisúnak adódott minden konstrukció esetében. A gyors fázis sebességét az ATP kötődés, míg a lassú fázis sebességét a foszfát felszabadulás határozta meg (az itt kapott értékek megegyeztek az alább bemutatott foszfát-felszabadulási kísérletben mért értékekkel) (**33.C ábra** fő panel). A két fázis frakcionális amplitúdója alapján meghatározott, ATP hidrolízis egyensúlyi állandó (K_3) a különböző konstrukciók esetében nem mutatott jelentős eltérést (**33.C ábra** fő panel; **1. táblázat**).

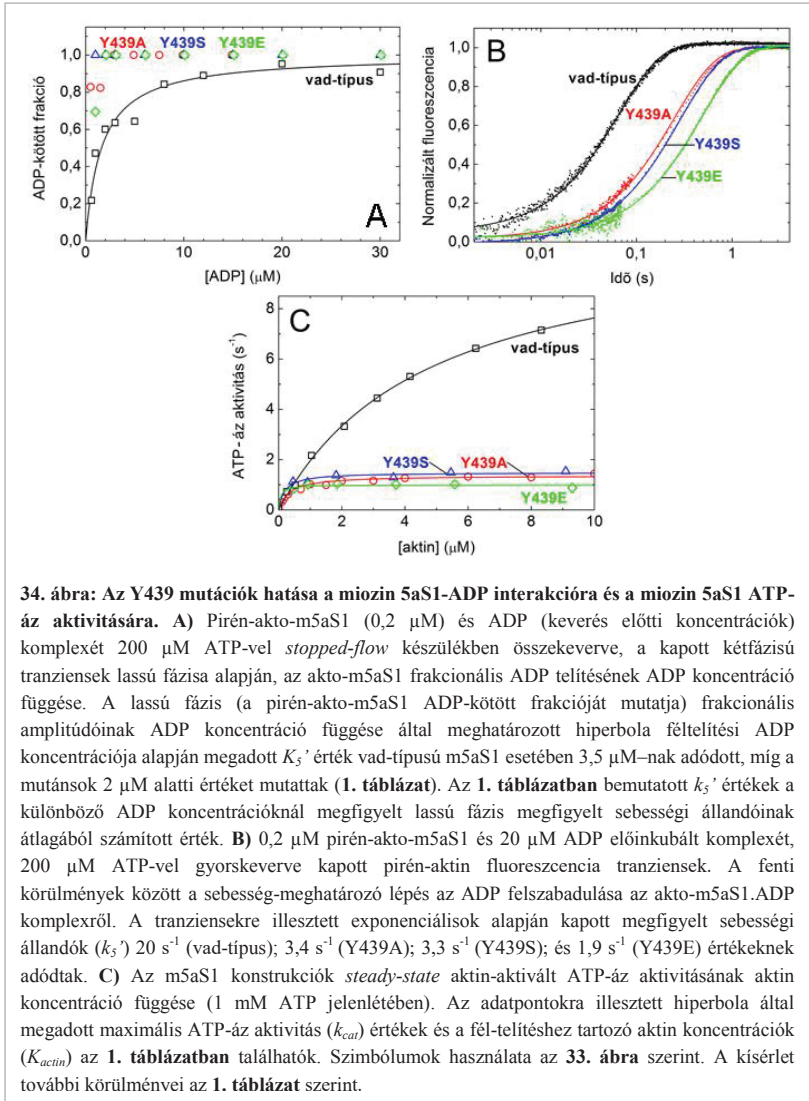
A foszfát (P_i) felszabadulás kinetikáját a $M.ADP.P_i$ és az $AM.ADP.P_i$ komplexről fluoreszcensen jelölt bakteriális foszfát-kötő fehérje (MDCC-PBP) (141) jelváltozása alapján követtük egyszeri átviteli (*single-turnover*) kísérletben a *stopped-flow* műszer kétszeri keverés (*double-mix*) üzemmódját használva. A foszfát felszabadulás aktin hiányában mért sebességi állandója (k_4) jól tükrözte a konstrukciók bazális ATP-áz aktivitását, tehát aktin hiányában a mutáns konstrukciók megőrizték a foszfát felszabadulást, enzimeciklusuk sebesség-meghatározó lépéseként (aktin hiányában a vad-típusú miozin 5a sebesség-meghatározó lépése a foszfát felszabadulás a $M.ADP.P_i$ komplexről) (**1. táblázat**). A foszfát felszabadulás megfigyelt sebességi állandói (k_{obs}) hiperbolikus-függést mutattak az aktin koncentrációtól (**33.D ábra**). Az illesztett hiperbola maximum értékeiből megadott aktin-aktivált foszfát felszabadulás sebességi állandók (k_4') minden konstrukció esetében 100 s^{-1} feletti értéknek adódtak (**33.D ábra**; **1. táblázat**). Aktin jelenlétében egy lassú fázis is megjelenik a foszfát felszabadulása során a miozin 5 konstrukcióknál, melynek jelenlétét miozin 2 esetében az aktin-kötött állapotában végbemenő ATP hidrolízisnek tulajdonították (153).

Összegezve a fenti eredményeket a 439-es tirozin (Y439) mutációi, habár kimutathatóan befolyásolják a nukleotid-kötést, ATP-hidrolízist és a foszfát felszabadulást, a mutáns konstrukciók esetében ezek a lépések mégis megőrzik a vad-típusra jellemző gyors, nem sebesség-meghatározó mivoltukat az aktin-aktivált ATP-áz ciklus során.

Az Y439 mutációi az ADP-felszabadulás aktin-aktivációjának megszűnését eredményezik

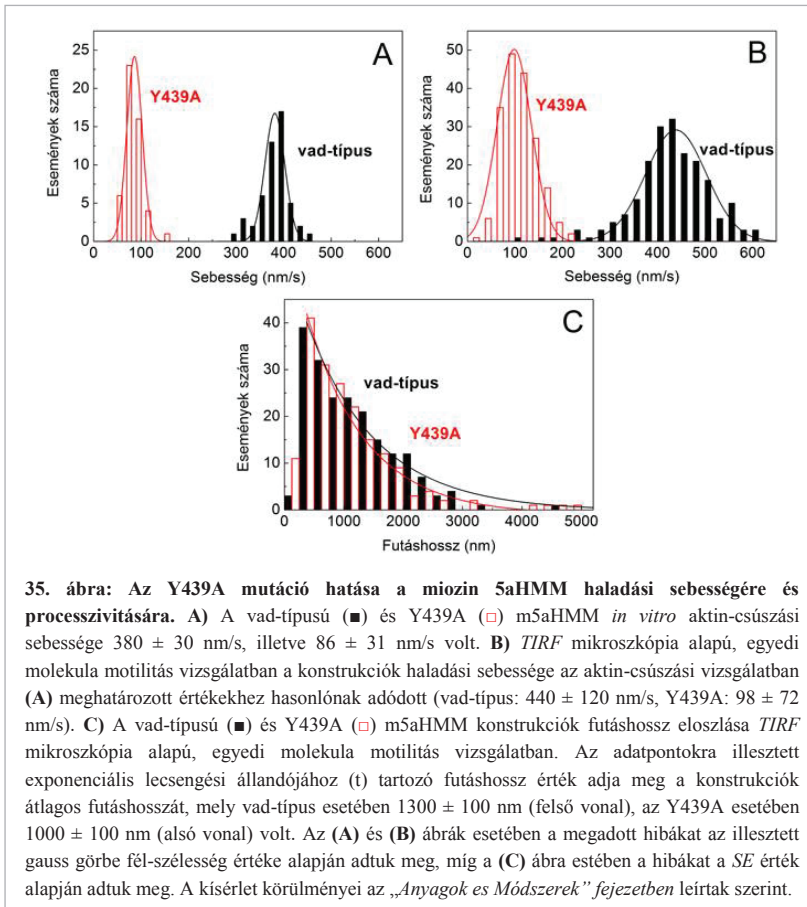
Az ADP kötődése az aktomiozin komplexhez nem eredményez fluoreszcencia-változást a pirén-aktomiozin komplexben, így az ADP affinitás csak közvetetten mérhető. A miozin 5aS1 konstrukciók ADP-affinitását ($1/K_5'$) ATP-indukált pirén-aktomiozin disszociáció alapján követtük nyomon. A pirén-aktomiozin komplexet növekvő koncentrációban ADP-vel inkubáltuk, majd nagy moláris feleslegben vett ATP-vel idéztük elő a pirén-aktomiozin komplex szétesését. A kapott kétfázisú tranziensek gyors fázisa az ADP-mentes aktomiozin disszociációjából ered, míg a lassú fázis az aktomiozin ADP-kötött frakcióját mutatja, mely esetében az aktomiozin disszociációjának sebességét az ADP-felszabadulás sebessége határozta meg. A lassú fázis frakcionális amplitudói alapján kalkulált ADP-affinitás ($1/K_5'$) az aktomiozin komplexhez, a mutáns konstrukciók esetében nagyobbak adódtak, mint a vad-típus esetében (**34.A ábra; 1. táblázat**). Az ADP felszabadulás az aktomiozin komplexről (k_5') a miozin 5a sebesség-meghatározó lépése (41). A fenti kísérletben a lassú fázis sebességi állandóját az ADP felszabadulás sebessége határozza meg az aktomiozin komplexről (k_5'). A mutáns konstrukciók esetében az ADP-felszabadulás sebessége négy-öttször lassabbnak adódott vad-típushoz képest (k_5') (**34.B ábra, 1. táblázat**). A vad-típusú és mutáns konstrukciók esetében kapott ADP felszabadulás sebességi állandók jól összhangban voltak a maximális aktin-aktivált ATPáz aktivitás értékekkel, tehát a mutáns konstrukciók megőrizték az ADP-felszabadulást aktin-aktivált enzimeciklusuk sebesség-meghatározó lépéseként (**34.B, C ábra; 1. táblázat**).

A miozin 5aS1 konstrukciók aktin jelenlétében mért ADP felszabadulásának sebességi állandóját (k_5') összehasonlítva az aktin hiányában meghatározott ADP felszabadulás sebességi állandójával (k_5 , md-ADP fluoreszcencia kioltásos kísérletben meghatározott paraméter, lásd az **1. táblázatban**) kiderült, hogy a Y439 mutációi megszüntették a vad-típusra jellemző megközelítőleg hatszoros aktin-aktivációját (gyorsítását) az ADP-felszabadulásnak (k_5'/k_5 , **1. táblázat**). Ennek megfelelően a termodinamikai kapcsoltág (az aktin jelenlétében és hiányában mért ADP-disszociációs állandók (K_d) hányadosa (K_5'/K_5)) a miozin 5aS1 aktin és ADP-kötése között a mutáns konstrukciók esetében közel egyező, alacsony értéknek adódott (**1. táblázat**) (A termodinamikai-kapcsoltágról bővebben az „Irodalmi Áttekintés, Terhelési arány (*duty ratio*) és processzivitás” alfejezetében írok).



Az Y439A mutáció lassú, ugyanakkor processzív haladást eredményez

Az ADP lassú felszabadulása az aktomiozinról gátolja meg az erős aktin-kötő állapotból való, gyors továbbhaladásban a miozin 5a motort, így feltehetően ez határozza meg az aktin filamentum mentén történő haladás sebességét (10, 124). GFP-jelölt vad-típusú és Y439A miozin 5aHMM konstrukciók segítségével *in vitro* aktin-csúszási kísérletekben és TIRF-mikroszkópián alapuló egyedi molekula motilitási kísérletekben határoztuk meg a konstrukciók aktin filamentum mentén mutatott haladási sebességét és processzivitását.



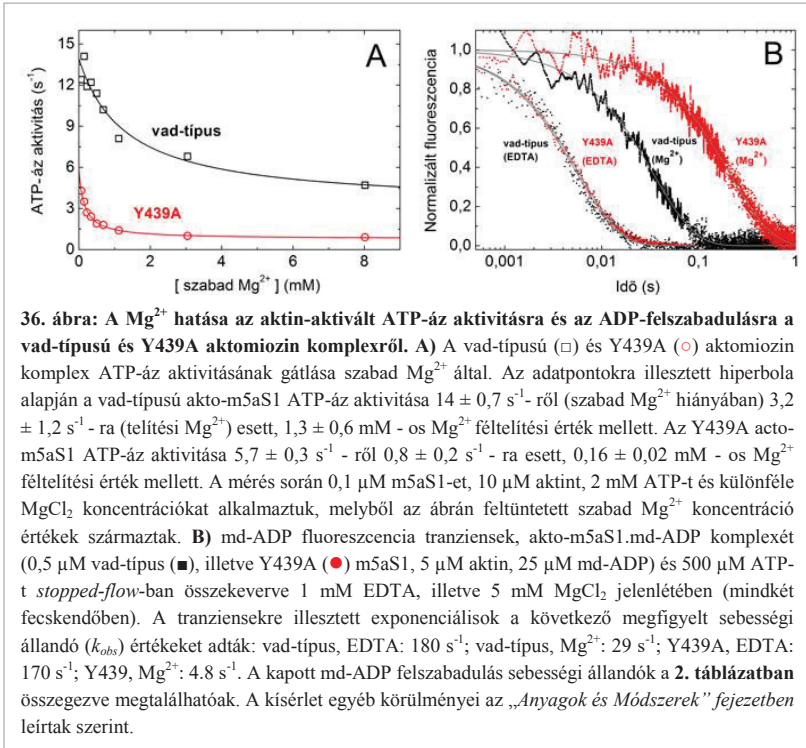
Mindkét típusú esszében az Y439A konstrukció sebessége megközelítőleg negyedére-ötödére csökkent a vad-típushoz képest (**35.A, B ábra**). A csökkenés mértéke pontosan megegyezett, a tranziens kinetikai mérések során meghatározott, ADP felszabadulás sebességében tapasztalt csökkenéssel (**34.A, B ábra**). Ezek az eredmények azt mutatták, hogy a vad-típushoz hasonlóan az ADP felszabadulás az aktomiozin komplexről marad mind az aktin-aktivált ATP-áz ciklus (**34.C ábra**), mind az aktin filamentum mentén történő transzlokáció sebesség-meghatározó lépése (**35.A, B ábra**). Fontos azonban, hogy ez az extrém lassú miozin 5a motor a vad-típushoz hasonló processzivitást mutatott (~1 μ m-es átlagos futáshossz) (**35.C ábra**).

Az Y439 mutáció Mg^{2+} - függő módon szünteti meg az ADP felszabadulás aktin-aktivációját

Kinetikai és szerkezeti vizsgálatok alapján ismert, hogy a $MgADP$ felszabadulás a miozin 5a-ról és miozin 5a aktomiozin komplexéről a Mg^{2+} - ion felszabadulása által kontrollált folyamat (102, 119, 134).

Ez alapján megvizsgáltuk a Mg^{2+} - ion hatását a vad-típusú és Y439A miozin 5aS1 konstrukciók *steady-state* aktin-aktivált ATP-áz aktivitására és az ADP felszabadulásuk tranziens kinetikájára.

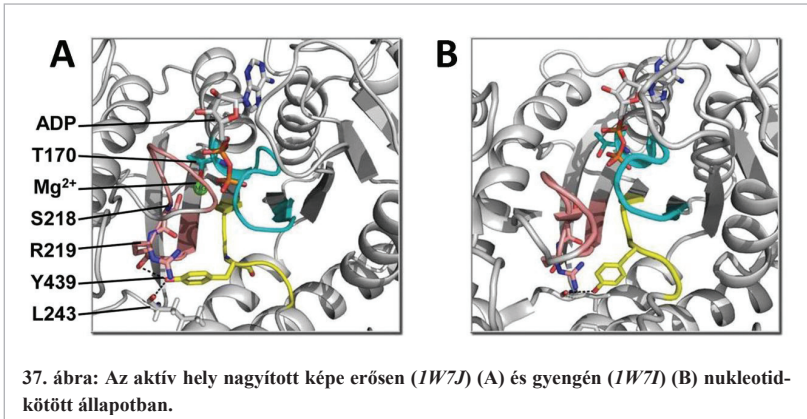
A szabad Mg^{2+} - ion jelenléte egyaránt jelentősen gátolta a vad-típusú és mutáns miozin 5aS1 konstrukció *steady-state* aktin-aktivált ATP-áz aktivitását (**36.A ábra**). 5 mM Mg^{2+} - ion jelenlétében és Mg^{2+} -ion hiányában - tranziens kinetikai md-ADP-fluoreszcencia kilötásos kísérletben - megvizsgáltuk a vad-típusú és Y439A miozin 5aS1 konstrukciók ADP felszabadulást az aktomiozin komplexről (**36.B ábra; 2. táblázat**). Az md-ADP felszabadulás sebességi állandói (**2. táblázat**) azt mutatták, hogy az Y439A mutáció hatása specifikusan az aktin és Mg^{2+} - ion egyidejű jelenlétében mutatkozik meg, tehát az Y439 mutáció Mg^{2+} - függő módon szünteti meg az ADP felszabadulás aktin-aktivációját. Eredményeink jól összhangban voltak a korábban karakterizált csirke miozin 5aS1 konstrukción végzett tanulmányok eredményeivel (**36.B ábra; 2. táblázat**) (102, 134).



Az Y439 a *switch-1* hurok közreműködésével befolyásolja a MgADP-felszabadulását

Abból a célból, hogy felderítsük az Y439 szerepét a Mg^{2+} - függő ADP-felszabadulásban atomi szinten elemeztük az Y439 kölcsönhatásait. A miozin 5a atomi szerkezetét $MgADP \cdot BeF_x$ (PDB kód: *1W7J*) jelenlétében és Mg^{2+} mentes ADP jelenlétében (*1W7I*) ismert. Habár az *1W7J* szerkezet ATP analógot tartalmaz, sok miozin esetében ez az állapot szerkezetileg megegyező az erősen $MgADP$ -kötött (*postrigor*) állapottal (9), míg az *1W7I* állapot feltehetően a „gyenge ADP állapot” szerkezetét közelíti, mely állapot a Mg^{2+} felszabadulás közvetlen kiindulópontja (119). Oldatban a miozin, ADP és különböző ATP analógok jelenlétében veszi fel a *postrigor* állapotra jellemző szerkezetet, mely állapot az ATP indukált aktomiozin disszociációt követően alakul ki az enzimműködés során (9). Annak

ellenére, hogy ez a szerkezet egy aktinról levált állapotot mutat, mégis számos sajátossága hasonlít ahhoz az aktomiozin.ADP állapothoz, amelyből az ADP felszabadulása történik a processzív miozinok mechanokémiai ciklusának sebesség-meghatározó lépése során.



Postigror állapotban az Y439 hidrogén-kötést létesít a konzervált L243 főláncának karbonil-csoportjával, illetve a *switch-1* hurok konzervált argininjével (R219) (37.A ábra). A *switch-1* hurokkal kialakított interakció „gyenge ADP-kötő” állapotban megszűnik (37.B ábra), így az Y439-R219 közötti hidrogén híd feltehetően, nagyban hozzájárul a Mg²⁺-felszabadulásához a *switch-1* és *switch-2* hurkok kapcsolt mozgásának biztosítása révén. Az Y439-R219 hidrogén híd megszűnésével járó konformáció változás a szomszédos, Mg²⁺-ot koordináló - *switch-1* hurokhoz tartozó - konzervált szerin (S218) elmozdulásához vezet.

Azért, hogy megvizsgáljuk a szerkezeti átalakulásokat az erős ADP-kötő MgADP állapot és Mg²⁺- mentes gyenge ADP állapotok között, modelleztük az erős ADP-kötő MgADP állapot energia minimalizált állapotát úgy, hogy a BeF_x-t eltávolítottuk az *IW7J* szerkezetből. Ez a szerkezet nagyon hasonló maradt az *IW7J* szerkezethez (RMSD: 0.72 Å). Az erős ADP-kötő MgADP és Mg²⁺- mentes gyenge ADP állapotok közötti trajektória köztes koordinátáit Yale Morph Server segítségével készítettük (a szerkezeti átalakulást bemutató animáció az „Első témakör” alapjául szolgáló közlemény (154) kiegészítő anyagaiban (*Supplemental Movie 1*) megtekinthető). A számítások rávilágítottak, hogy az Y439-es aminosav 4 Å-ös környezetében található aminosavak oldalláncai változatlan helyzetben maradnak az erős MgADP és gyenge ADP állapotok közötti átalakulás során, ugyanakkor a 439-es tirozin

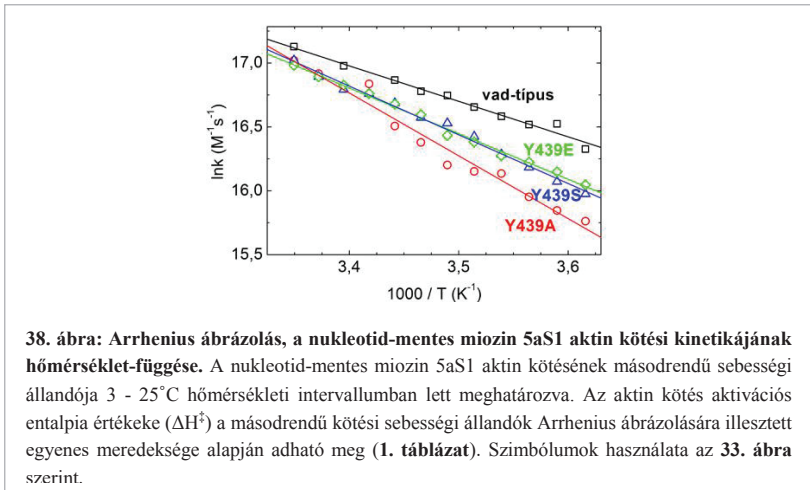
nagymértékű elmozdulása figyelhető meg. RMSD értékeket számoltunk az erős - és gyenge ADP állapotok között annak érdekében, hogy kvantitatívan megvizsgáljuk az egyes aminosavak konformációs változását („Függelék”, **3. Függelék**). Abból a célból, hogy kizárjuk a teljes régió főláncának a translációs mozgását – mely aspecifikus túlbecslésekhez vezetne az RMSD értékek számításánál – lokális illesztéseket és oldallánconkénti RMSD számításokat végeztünk kizárólag a fehérje releváns régiói (*switch-1*, *switch-2* és *p-loop*), nem pedig a teljes fehérjeszerkezet alapján. A legnagyobb RMSD értékeket a *switch-2*-es hurok Y439 és F441-es aminosavai esetében figyeltük meg, míg a *p-loop* (G163-T170) és a *switch-1*-es régió (N214-G221) esetében nem volt jelentős változás a két állapot között („Függelék”, **3. Függelék**). A kapott eredmények tükrében az F441-es aminosavnak fontos szerepe lehet - az alsó 50 kDa-os (L50, **15. ábra**) szubdoménen keresztül - a *switch-2* hurok és az aktin-kötő hely közötti kommunikáció biztosításában (**32.A ábra**) (155). Ez a megfigyelés szintén alátámasztja kísérleti eredményeinket, mely szerint a Y439 mutációja megzavarja az aktin-kötő helytől a nukleotid-kötő helyre érkező szerkezeti-információ áramlását, mely az ADP felszabadulás aktin-aktivációjának eltörléséhez vezet (**34.B és 36 ábra; 1. és 2. táblázat**).

Az energia minimalizáció során az Y439A mutáció nem befolyásolta jelentősen a fehérje szerkezetét: az erős MgADP és gyenge ADP állapotok között 0.76 és 0.8 Å-ös RMSD értéket lehetett megfigyelni a vad-típus és Y439A konstrukció esetében. Az Y439A mutáns esetében, a fent bemutatott – vad-típusra jellemző (R219-Y439) - kommunikációs útvonal a *switch-1* és *switch-2* hurokok között hiányzott a mutáns esetében.

Az Y439 mutáció befolyásolja az aktin-kötés energetikáját

Korábbi kutatások alapján tudtuk, hogy a *switch-2* hurok miozin 5-re jellemző egyedi szerkezete a miozin 5 „*rigor-szerű*” (*rigor-like*) állapotában (nukleotid-mentes, aktin-kötött állapot) a nagy térigényű tirozin oldallánc jelenlétének köszönhető (88). Ennek ismeretében vizsgáltuk meg az Y439 mutációk hatását az aktin és nukleotid-mentes miozin közti interakcióra. *Stopped-flow* módszerben nukleotid-mentes miozint moláris feleslegben vett pirén-aktinnal kevertünk össze pszeudo-elsőrendű körülmények között, majd a nukleotid-mentes miozin másodrendű aktin kötési sebességi állandóját (k_6) a különböző pirén-aktin koncentrációknál kapott fluoreszcencia tranziensek megfigyelt sebességi állandóinak koncentráció függése alapján, az illesztett egyenes meredekségéből határoztuk meg. A nukleotid-mentes miozin 5aS1 disszociációs sebességi állandóját az aktomiozinnál (k_6), pirén-

aktomiozin 5aS1-et moláris feleslegben vett jelöletlen aktinnal összekeverve „chasing” kísérletben határoztuk meg. A mutációk az aktin-kötési és disszociációs sebességi állandókban nem okoztak jelentős változást, ami az aktin-affinitás ($1/K_6$) mérsékelt csökkenését eredményezte a vad-típussal összevetve (**1. táblázat**). Az aktin kötés (k_6) hőmérséklet-függése a mutánsoknál jelentősen nagyobbak adódtak, mint az a vad-típusra jellemző. Ez a mutánsok esetében az aktin-kötés aktivációs entalpia (ΔH^\ddagger) növekedését jelzi, tehát az Y439 a reakció energiagátjának csökkentésével segíti elő a gyors aktinkötést (**38. ábra; 1. táblázat**).



Az első témakörhöz kapcsolódó táblázatok

1. táblázat: Vad-típusú és switch-2 mutáns miozin 5a konstrukciók funkcionális sajátosságai

	vad-típusú egér m5aS1	Y439A	Y439S	Y439E	vad-típusú csirke m5aS1
<i>Steady-state paraméterek</i>					
Bazális ATP-áz aktivitás k_{cat} (s^{-1}) ^a	0,020 ± 0,009	0,086 ± 0,005	0,05 ± 0,01	0,15 ± 0,02	0,03 ^g
Aktin-aktivált ATP-áz aktivitás k_{cat} (s^{-1}) ^a	11 ± 1	1,4 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,0 ± 0,1	15 ^g
Aktin-aktivált ATP-áz aktivitás K_{aktin} (μM) ^a	4,8 ± 0,3	0,36 ± 0,04	0,20 ± 0,08	0,06 ± 0,01	1,4 ^g
Trp fluoreszcencia növekedés ATP hozzáadásra (%) ^b	11 ± 3	8 ± 3	22 ± 4	3 ± 1	13 ^h
<i>Aktin hiányában mért sebességi és egyensúlyi állandók</i>					
<i>ATP kötés és hidrolízis</i>					
K_1k_2 ($\mu M^{-1}s^{-1}$) ^b	1,1	1,2	n.a.	n.a.	1,6 ^g
K_1k_2 ($\mu M^{-1}s^{-1}$) ^c	1,9 ± 0,2	4,1 ± 0,4	1,1 ± 0,1	1,2 ± 0,1	
k_3+k_{-3} (s^{-1}) ^b	210 ± 10	250 ± 60	n.a.	n.a.	750 ^g
K_3 ^d	0,57 ± 0,12	0,52 ± 0,08	1,5 ± 0,5	0,49 ± 0,17	9 ^h
<i>P_i felszabadulás</i>					
k_4 (s^{-1}) ^d	0,025 ± 0,011	0,42 ± 0,06	0,053 ± 0,038	0,41 ± 0,08	
k_4 (s^{-1}) ^e	0,025 ± 0,005	0,34 ± 0,02	0,053 ± 0,006	0,11 ± 0,003	
<i>ADP kötés és felszabadulás</i>					
k_5 (s^{-1}) ^c	2,5 ± 0,3	2,7 ± 0,3	4,0 ± 0,1	1,6 ± 0,1	1,2 ^g
k_{-5} ($\mu M^{-1}s^{-1}$) ^c	6,9 ± 1,2	5,7 ± 0,5	4,3 ± 0,3	6,2 ± 0,6	4,6 ^g
K_5 (= k_5/k_{-5}) (μM)	0,36	0,47	0,93	0,26	0,27 ^g
<i>Aktin jelenlétében mért sebességi és egyensúlyi állandók</i>					
<i>ATP kötés</i>					
$K_1'k_2'$ ($\mu M^{-1}s^{-1}$) ^f	1,0 ± 0,1	1,9 ± 0,2	0,43 ± 0,25	0,87 ± 0,16	0,9 ^g
k_2' (s^{-1}) ^f	210 ± 20	820 ± 80	420 ± 250	94 ± 18	870 ^g
<i>M.ADP.P_i komplex aktin kötése és P_i felszabadulás</i>					
K_6 (μM) ^e	55 ± 19	3,3 ± 0,9	30 ± 2	47 ± 21	9 ⁱ
k_4' (s^{-1}) ^e	240 ± 60	110 ± 10	150 ± 10	210 ± 60	110 ⁱ
<i>ADP kötés és felszabadulás</i>					
k_5' (s^{-1}) ^f	17 ± 3	3,7 ± 0,3	3,7 ± 0,3	2,1 ± 0,2	16 ^g
K_5' (μM) ^f	3,5 ± 1,5	1,8 ± 0,1	< 1	< 1	0,7 ^g
Kapcsoltság (K_5'/K_5)	9,7	3,8	< 1,1	< 3,8	2,6 ^g
Gyorsítás (k_5'/k_5)	6,9	1,4	0,9	1,3	13 ^g
<i>Aktin kötés és felszabadulás</i>					
k_6 (s^{-1}) ^f	1,1*10 ⁻³	7,6*10 ⁻³	2,5*10 ⁻³	3,0*10 ⁻³	3,6*10 ⁻⁴ g
k_{-6} ($\mu M^{-1}s^{-1}$) ^f	28 ± 1	25 ± 6	25 ± 2	24 ± 5	73 ^g
K_6 (= k_6/k_{-6}) (μM)	3,9*10 ⁻⁵	3,0*10 ⁻⁴	1,0*10 ⁻⁴	1,3*10 ⁻⁴	4,9*10 ⁻⁶ g
ΔH^\ddagger (k_{-6}) (kJ/mol) ^f	19 ± 1	38 ± 3	32 ± 1	30 ± 2	

^a NADH-kapcsolt esszé, ^b Triptofán fluoreszcencia, ^c Dezoxi-mant nukleotid fluoreszcencia, ^d Quenched-flow, ^e MDCC-PBP fluoreszcencia, ^f PIA fluoreszcencia, ^g (41), ⁱ (39).

Az átlag \pm SE 2 - 4 párhuzamos kísérlet alapján lett meghatározva. A táblázat sebességi és egyensúlyi állandói a **32.C ábra** nevezékτανát követik. Körülmények: 25°C, 20 mM HEPES (pH 7,0), 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0,1 mM EGTA, 1 mM DTT. *n.a.*, nincs adat.

2. táblázat: Mg²⁺ - függő md-ADP felszabadulás a vad-típusú és Y439A m5aS1-ről aktin hiányában és jelenlétében

	1 mM EDTA	5 mM Mg ²⁺
vad-típus (- aktin)	43 \pm 15	2,5 \pm 0,3
vad-típus (+ aktin)	160 \pm 20	23 \pm 4
Y439A (- aktin)	55 \pm 20	2,7 \pm 0,3
Y439A (+ aktin)	170 \pm 20	3,3 \pm 0,6

Az md-ADP felszabadulás sebességi állandóit (s⁻¹) a **36.B ábrán** bemutatott kísérlet során határoztuk meg. Az átlag \pm SE értékeket 3 - 5 párhuzamos kísérlet alapján adtuk meg. A körülmények az **1. táblázatban** megadottakkal megegyeznek, azzal a különbséggel, hogy a jelzett esetekben 1 mM EDTA volt jelen az 5 mM MgCl₂ helyett.

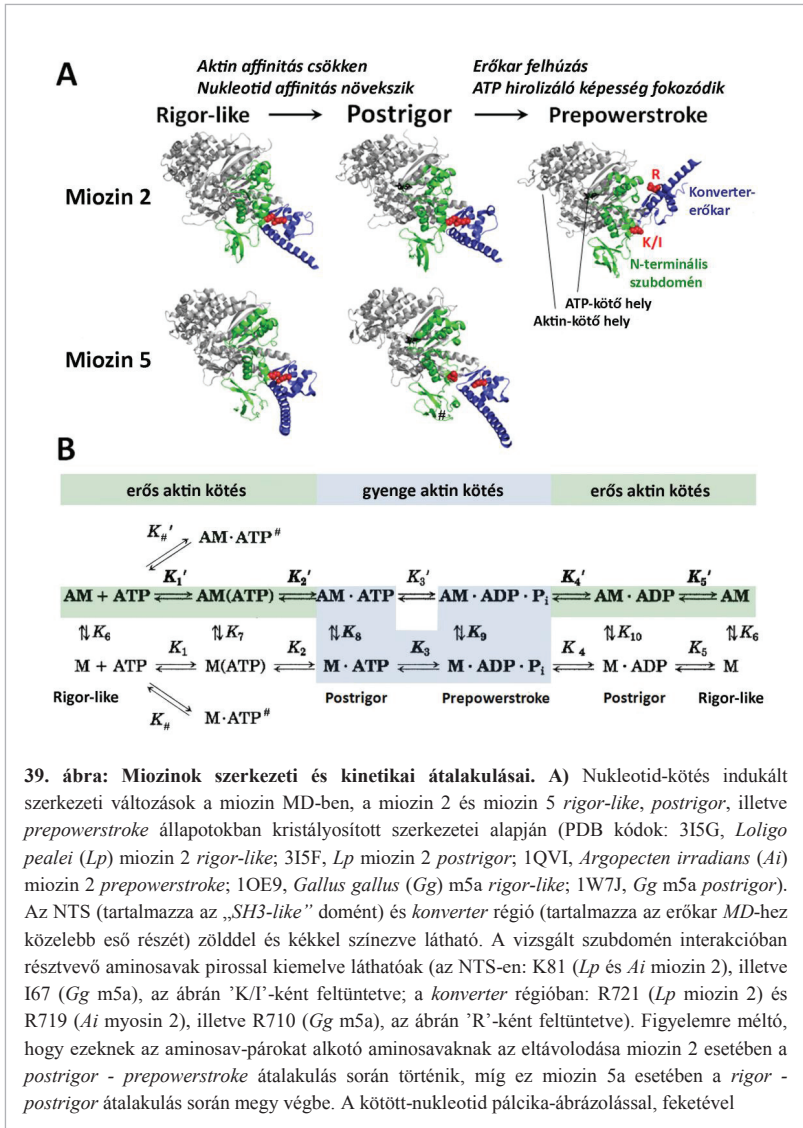
2. MÁSODIK TÉMAKÖR

Az N-terminális - konverter régió kölcsönható felszín szerepe a miozin 5a motor működésében

Probléma és megközelítése

A miozin és az aktin kölcsönhatásán alapuló mechanokémiai ciklus során az ATP kötődése a motordoménhez, a vizsgált miozin osztálytól, illetve izoformától függően 3 - 6 nagyságrenddel csökkenti a miozin aktin-affinitását a kötődés hatására végbemenő allosztérikus átrendeződések révén (38, 41, 153, 156-158). Ez a folyamat az erősen aktin-kötött, nukleotid-mentes (*rigor*) állapotból az erősen nukleotid-kötött, gyenge aktin-kötő állapotba (*postrigor*) történő átalakulást foglalja magába (26. és 39. ábra). Ezt követően az erősen ATP-kötő *prepowerstroke* állapotban történik az erőkar felhúzása (másnéven *recovery stroke*) és az ATP hidrolízishez szükséges aminosavak megfelelő pozicionálása (39. ábra) (64, 89). Az ATP hidrolízist követően a miozin.ADP.P_i komplex újra visszaköt az aktinhoz. Ez a folyamat váltja ki a hidrolízis termékek felszabadulását és a kapcsoltan végbemenő aktomiozin kölcsönhatás erősödését és erőkar lecsapást (*powerstroke*) (26. ábra) (74, 90).

A motordomén komplex szerkezetét négy szubdomén alkotja, melyek sorban az N-terminális, a felső és az alsó 50 kDa-os szubdomének (NTS, U50, L50), valamint a *konverter* (15. ábra) (9, 89). Az enzimciklus során végbemenő szerkezeti változásokat ezeknek a szubdoméneknek a dinamikus mozgása eredményezi. Az NTS-*konverter* kölcsönható felszín az erőkar bázisánál található, távol az aktin és ATP-kötő helyektől (39. ábra). A filamentumokat képző, izomkontrakciót és sejtosztódást bonyolító miozin 2 izoformák túlnyomó többségében az NTS-*konverter* kölcsönható felszínén - az NTS egy konzervált lizinje és a *konverter* konzervált argininje révén - egy konzerváltan megjelenő taszító kölcsönhatás hangolja a motorműködést (39. ábra) (10). A miozin 5 motorok - melyek között számos processzív, intracelluláris szállító motor képviselteti magát - az NTS homológ pozíciójára nézve hidrofób aminosavat, izoleucint tartalmaznak. Így az eger miozin 5a is izoleucint tartalmaz az adott pozícióra nézve (167). A *konverter* argininje konzerváltan fordul elő számos miozin osztály esetében, így a miozin 2 és miozin 5 osztályoknál is. Eger miozin 5a esetében ez a 709-es arginin (R709) (39. ábra).



színezve látható. Az áttekinthetőség kedvéért a könnyű láncokat az ábrán nem tüntettük fel. További, részletes szerkezeti adatok a **3. táblázatban** találhatóak. **B)** Az aktomiozin mechanokémiai enzimeciklus kinetikai sémája, kiegészítve az ismert aktinról-levált miozin konformációs állapotokkal. A felső sor az aktin-kötött (AM) állapotban történő enzimátikus lépéseket, míg az alsó sor az aktinról levált (M) állapotban zajló enzimeciklus lépéseket mutatja. A miozin mechanokémiai ciklus fő áramlási út vonalát háttérszínezéssel és félkövérre szedett karakterekkel jelöltem. Az erős és gyenge aktin-kötött állapotok elkülönítése érdekében az erősen aktin-kötött állapotok hátere zölddel, a gyengén aktin-kötött állapotoké világos kékkel színezett. Az enzimeciklus fő áramlási út vonalát követve látható, hogy az ATP kötés az aktomiozinhoz két lépésben történik (kezdeti ütközési lépés (K_1') és az azt követő izomerizáció (K_2')). A miozin MD ekkor gyorsan leválik az aktinról (K_3). A K_3 lépés foglalja magába a *postrigor-prepowerstroke* konformációs átalakulást és az ATP hidrolízis kémiai lépését, mely lépéseket kinetikailag nem bontottunk fel ebben a munkában. Az ATP hidrolízisét követően az M.ADP.P_i visszaköt az aktinhoz (K_5), és ezt követik a termék felszabadulási lépések (P_i a K_4' lépésben, ADP a K_5' lépésben). Az I67K-m5aS1 és aktó-I67K m5aS1 esetében mért kinetikai adatok (**40. ábra; 5. táblázat**) azt mutatták (lásd az alábbiakban), hogy a mutáns egy „*off-pathway*” ATP kötő intermedier (M.ATP[#], illetve aktin jelenlétében AM.ATP[#]) reverzibilis kialakítására képes. K_4 és K_5' disszociációs állandók. A feltüntetett sebességi és egyensúlyi állandók minden esetben a jobbra és lefelé mutató folyamatokra értendők. A, aktin; M, miozin; P_i, foszfát.

A miozin 2-re jellemző taszító interakció a *postrigor-prepowerstroke* átalakulás során érvényesül, mely átalakulás során ezek az interakciós felszínek eltávolodnak egymástól az erőkar felhúzás folyamatával kapcsolatban. Ezzel összhangban témavezetőm és munkatársai korábban azt találták, hogy a pozitív töltések (az NTS lizinjének vagy a *konverter* argininjének) eltávolítása vagy negatívra cseréje (K84M és R704E mutációk *Dictyostelium* miozin 2-ben) specifikusan az erőkar felhúzást és az azt követő ATP hidrolízist és P_i felszabadulást befolyásolja (118).

A csirke miozin 5a kristályszerkezetei azt mutatják (119), hogy az NTS-*konverter* kölcsönható felszín a miozin 2-től markánsan eltérő átalakulásokon megy át. „*Rigor-szerű*” állapotban (a miozin 5 nukleotid és aktin-mentes állapotában kristályosítva) az I67 és R710 (az egér R709-nek megfelelő aminosav) aminosavak oldalláncjai egymáshoz közel helyezkednek el, hasonlóan a miozin 2 lizin - argininjéhez. Azonban miozin 5a-ban – a miozin 2-től eltérően – ezek a pozíciók jelentősen eltávolodnak egymástól már a *rigor-postrigor* átalakulás során (**39. ábra; 3. táblázat**).

Habár a miozin 5a-t *prepowerstroke* állapotban még nem sikerült kristályosítani, nagy valószínűséggel a miozin 5a NTS és *konverter* régiója - a miozin 2-höz hasonlóan - egymástól

távol helyezkedik el ebben az állapotban. Az a felfedezés, hogy az NTS-konverter szeparálódása a miozin 2 és miozin 5 mechanokémiai ciklus különböző lépéseiben történik, arra utal, hogy ez az kölcsönható felszín eltérő szerepet tölthet be a különböző miozinok energiaátalakító mechanizmusában.

Hipotézisünk tesztelésére, a miozin 5a NTS izoleucinját lizinre cseréltük (I67K), ezzel mimikálva a miozin 2-re jellemző taszító kölcsönhatást a két régió között. A vad-típus és I67K mutáns miozin 5a alábbiakban bemutatott átfogó biokémiai, tranziens kinetikai, tömeges és egyedi molekula motilitás vizsgálataival rávilágítottunk az NTS-konverter kölcsönható felszín fontos és specifikus szerepére a miozin 5a motor kemomechanikai energiaátalakító folyamataiban.

Mérésekhez használt fehérje konstrukciók

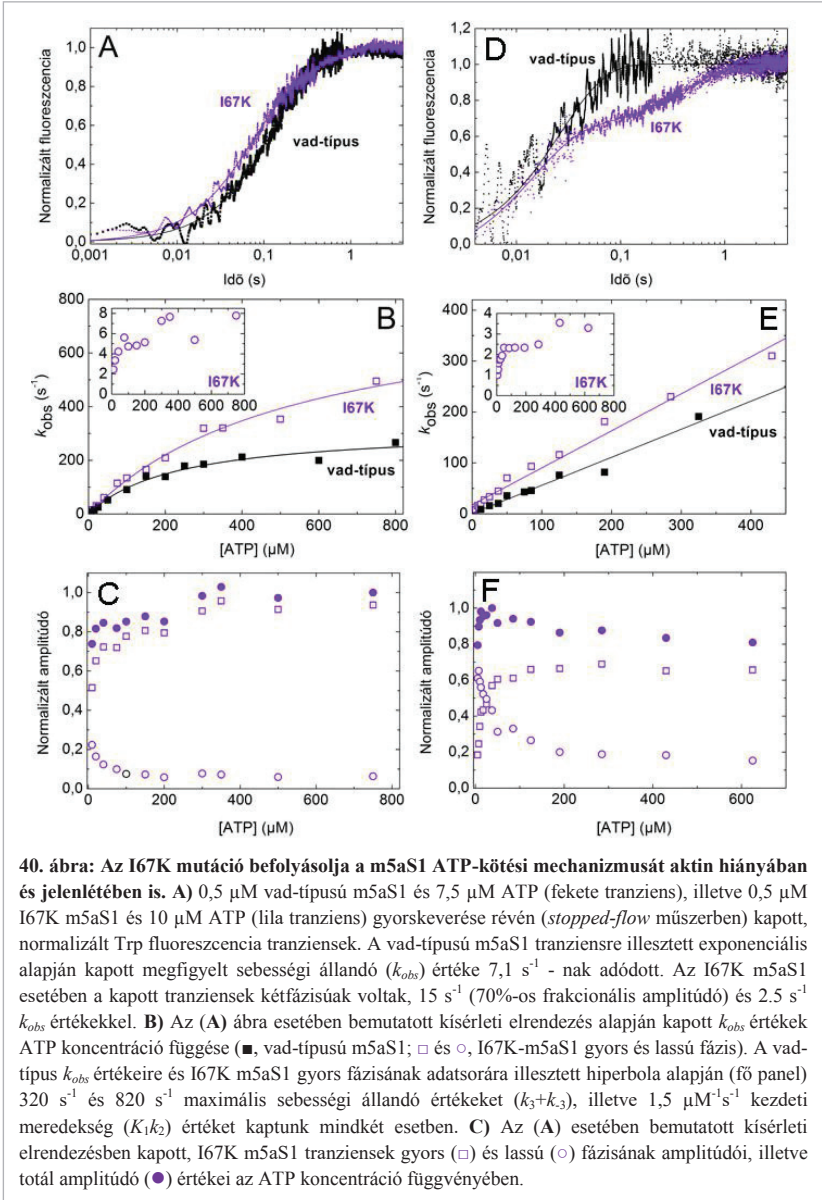
Az NTS-konverter interakciós felszín szerepét a miozin 5a mechanokémiai mechanizmusában egyfejtű és kétfejtű I67K mutáns konstrukciók segítségével vizsgáltuk. Az egyfejtű és kétfejtű, vad-típusú és mutáns konstrukció felépítése az „Eredmények fejezet, *Első témakörénél*” leírtakkal megegyezik (79. o).

Az „*Második témakör*” során megadott sebességi és egyensúlyi állandók esetében a **39.B ábra** nevezéktanát követtem. A feltüntetett koncentrációk az „*Első témakörnél*” megadottak szerint.

Az I67K mutáns megőrzi a vad-típusra jellemző gyors ATP-kötési és ATP-hidrolizáló képességet, ugyanakkor stabilizál egy *off-pathway*⁶ ATP-kötött intermediert

Korábbi kutatási eredményeknek megfelelően (38, 154), kísérleteinkben a vad-típusú m5aS1, ATP és nem-hidrolizálódó ATP-analóg, AMPPNP kötéseire, jelentős *steady-state* triptofán fluoreszcencia emisszió növekedést mutatott (**4. táblázat**). Ezt a jelváltozást korábban az úgynevezett relay-hurok (**15. ábra**) ATP-érzékeny triptofánjának (W483 miozin 5a esetében) tulajdonították, mely az ATP hidrolizist megelőző *postrigor-prepowerstroke* átalakulást mutatja (a két lépés a K_3 paraméterbe ágyazottan, együtt jelenik meg a **39.B ábrán**) (41, 78, 80, 152).

⁶ *off-pathway*: az enzimműködés fő áramlási útvonalán kívül eső enzimátikus lépések útvonala, „mellékvágány”



D) 0,25 μM vad-típusú m5aS1 (fekete tranziens), illetve I67K m5aS1 (lila tranziens) 0,35 μM PIA-al előinkubált komplexét, *stopped-flow* műszerben 50 μM ATP-vel gyorskeverve kapott PIA fluoreszcencia tranziensek normalizált ábrázolása. A vad-típusú m5aS1 tranziensre illesztett exponenciális alapján kapott k_{obs} értéke 37 s^{-1} -nak adódott. Az I67K m5aS1 esetében a kapott PIA tranziensek, a Trp tranziensekhez hasonlóan, kétfázisúak voltak. Az illesztett dupla exponenciális alapján meghatározott gyors és lassú fázis k_{obs} értéke: 71 s^{-1} (62%-os frakcionális amplitúdóval) és 2.3 s^{-1} . **E)** A **(D)** ábránál bemutatott kísérleti elrendezés alapján kapott, k_{obs} értékek ATP koncentráció függése (■, vad-típusú m5aS1; □ és ○, I67K m5aS1 gyors és lassú fázis). A vad-típus k_{obs} értékeire és I67K m5aS1 gyors fázisának adatsorára illesztett lineáris meredeksége alapján (fő panel) 0,55 és 0,73 $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ K_1 ' k_2 ' értékeket kaptunk. A vad-típusú m5aS1 esetében az y-tengelymetszet (k_{-1}) nem mutatott jelentős eltérést a nullától, az I67K-m5aS1 esetében azonban ez 18 s^{-1} körüli értéknek adódott. **F)** A **(D)** **ábra** esetében bemutatott kísérleti elrendezésben kapott, I67K m5aS1 tranziensek gyors (□) és lassú (○) fázisának amplitúdói, illetve totál amplitúdó (●) értékei az ATP koncentráció függvényében.

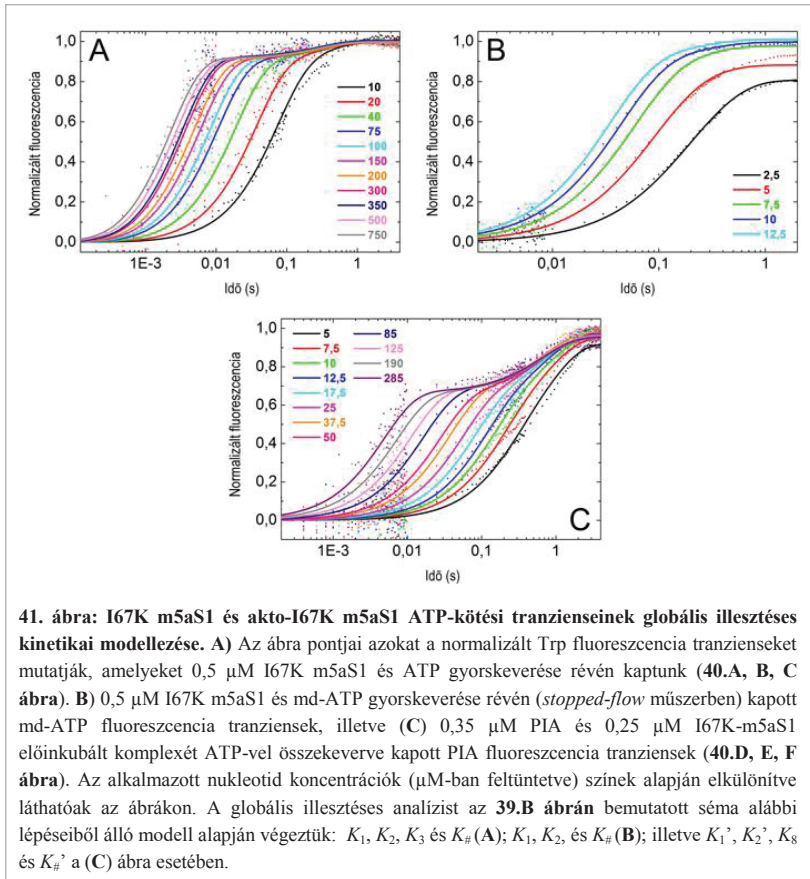
Korábbi eredményekkel (38) szintén összhangban az találtuk, hogy az ADP és az ATP γ S nem képes a fentihez hasonló triptofán (Trp) fluoreszcencia emelkedést indukálni, mely annak köszönhető, hogy ezek a ligandumok mérhetően nem képesek *prepowerstroke* konformációt indukálni (**4. táblázat**).

Az I67K m5aS1 kölcsönhatása a fent említett ligandumokkal a vad-típushoz hasonló Trp fluoreszcencia változásokat eredményezett, mely azt mutatja, hogy a mutáns megőrizte ATP-kötésére és a katalitikusan aktív konformáció kialakítására való képességét (**4. táblázat**).

A m5aS1 konstrukciók ATP-vel való kölcsönhatásának kinetikáját Trp fluoreszcencia változás alapján *stopped-flow* kísérletekben is vizsgáltuk. A m5aS1 Trp fluoreszcenciáját használtuk, aktin távollétében, az ATP kötés és az azzal járó konformációs változások kinetikájának nyomon követésére. Pseudo-elsőrendű körülmények között, vad-típusú m5aS1-et és moláris feleslegben vett ATP-t *stopped-flow*-ban összekeverve a kapott Trp-fluoreszcencia tranziensekre illesztett exponenciálisok alapján kapott megfigyelt sebességi állandók (k_{obs}) hiperbolikus ATP koncentráció-függést mutattak (**40.A, B ábra**). Ez a hiperbolikus jelleg egy többlépéses ATP kötési mechanizmusra utal, mely számos miozin esetében azonosítható (41, 61). A többlépéses ATP kötési mechanizmus során a kezdeti ütközési komplex kialakulását (K_1 a **39.B ábrán**) egy szerkezeti átalakulás követi, mely Trp fluoreszcencia változással jár együtt. M5aS1 esetében a két lépést (K_1 és K_2 a **39.B ábrán**) nem tudjuk kinetikailag feloldani (41, 154), ezért a hiperbola kezdeti meredekség értéke és maximális k_{obs} értéke által meghatározott K_1k_2 (az ATP kötés látszólagos másodrendű kötési

sebességi állandója) és $k_3 + k_{-3}$ (hidrolízis látszólagos sebességi állandója) értékeket adhatjuk meg jó közelítéssel (**4. táblázat**) (41, 154).

A vad-típussal ellentétben az I67K m5aS1 esetben kétfázisú Trp fluoreszcencia tranzienseket figyelhettünk meg az ATP kötés hatására (**40.A, B ábra**). A gyors fázis k_{obs} értékei a mutáns esetében alapvetően magasabbnak adódtak a vad-típushoz képest, mindazonáltal a vad-típushoz hasonló ATP koncentráció függést mutattak (**40.B ábra; 4. táblázat**).



Ahogy már az *“Eredmények megbeszélése”* fejezetben is említettem, a K_1 és K_2 (illetve K_1' és K_2') lépéseket kísérleteink alapján nem tudtuk kinetikailag elkülöníteni. Így, ezek a lépések egybeolvastva jelennek meg, egy egy lépéses kötési mechanizmus során, melyben a k_{on} (**A-B**), illetve k_{on}' (**C**) egyenértékű a $K_1 k_2$, illetve $K_1' k_2'$ másodrendű kötési sebességi állandókkal. A modellezések során a jelváltozás a K_3 (**A**), K_2 (**B**), illetve a K_2' (**C**) lépésekhez köthető. Az egyéb lépéseket, beleértve a $K_{\#}$ és $K_{\#}'$ lépéseket, optikailag “csendesnek” tekintettük. Az (**A**) ábra esetében, a K_3 lépés látszólagos sebességi-állandóját ($k_3 + k_{-3}$) lehetett megközelítőleg meghatározni, míg arányuk (K_3 , **42.A ábrán** bemutatott *quenched-flow* kísérletben meghatározott paraméter) nem befolyásolta a Trp fluoreszcencia tranziens profilokat. A (**C**) ábra esetében, a PIA fluoreszcencia és fényszórás tranziensek profilja alapján, a K_8 lépést gyors és irreverzibilis lépésnek tekintettük. Változó y-tengelymetszetet és totál amplitúdó korrekciós faktorokat engedtünk meg a globális illesztések során, a legjobb illeszkedés érdekében.

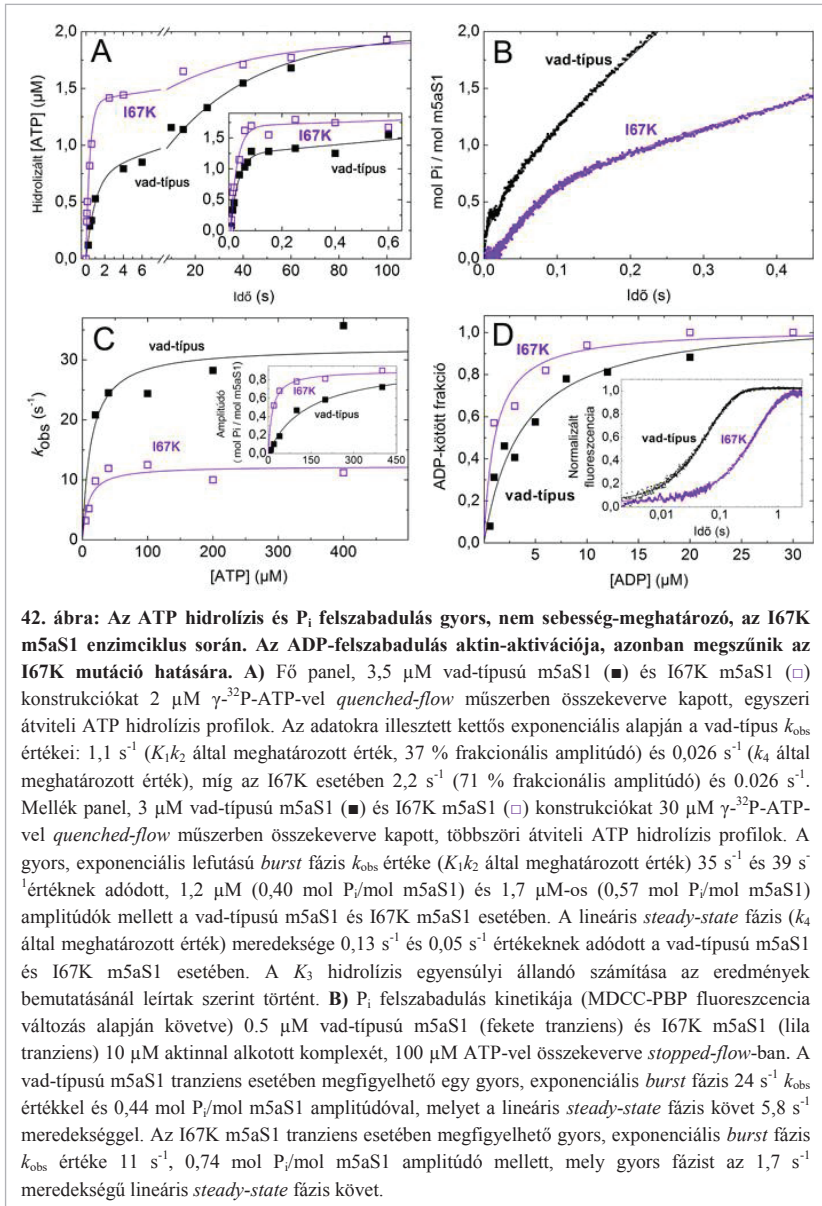
A globális illesztés alapú, kinetikai analízis során kapott legjobban illeszkedő paraméterek által meghatározott szimulációs eredményeket folytonos vonallal jelöltük az ábrákon. A bemutatott adatsorokra legjobban illeszkedő paraméterek a következők: (**A**) $k_{\text{on}} = 1,69 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_3 + k_{-3} = 635 \text{ s}^{-1}$, $k_{\#} = 0,117 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{\#}' = 3,77 \text{ s}^{-1}$; (**B**) $k_{\text{on}} = 2,17 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{\#} = 0,179 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{\#}' = 5,05 \text{ s}^{-1}$; (**C**) $k_{\text{on}}' = 0,511 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_2' = 0,219 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{\#}' = 2,17 \text{ s}^{-1}$. A legjobban illeszkedő k_{-2} (**A-B**), illetve k_{-2}' (**C**) értékek, melyek az *on-pathway* útvonalon az ATP leválás sebességi állandóját mutatják, nem tértek el jelentősen a nulla értéktől a vizsgálatok során. Ez azt jelzi, hogy a produktív (*on-pathway*) ATP kötés ($K_1 k_2$ az **A-B** ábrák esetében, illetve $K_1' k_2'$ a **C** ábrán) kvázi irreverzibilisnek tekinthető. Az **5. táblázat** mutatja a legjobban illeszkedő paraméterek statisztikáját az összes I67K-m5aS1 és akto-I67K m5aS1 ATP kötési kísérletben kapott értékek alapján. A globális illesztés robusztusságát jelzi az a tény, hogy a legjobban illeszkedő paraméterek átlag és *SD* értékei az exponenciális illesztés alapú analízis k_{on} értékeihez hasonlóan adódtak (**40. ábra, 4. táblázat**). A globális illesztéses analízis során kapott parameter értékek jó egyezést mutattak az exponenciális illesztéses analízis (**40. ábra, 4. táblázat**) során kapott értékekkel a vad-típusú m5aS1 és a vad-típusú akto-m5aS1 esetében is.

Az I67K mutáns lassú fázisának k_{obs} értékei mérsékelten emelkedtek ATP koncentráció növelésével (**40.B ábra** mellék panel). A gyors fázis amplitúdója nőtt, míg a lassú fázis amplitúdója csökkent az ATP koncentrációval, míg a totál amplitúdó korai telítődést mutatott jelezve ezzel az I67K mutáns összességében nagy ATP-affinitást (**40.C ábra**). Az I67K mutáns kétfázisú ATP kötésének háttérben álló mechanizmus, általunk javasolt modellje szerint, az I67K m5aS1 kinetikai viselkedését egy reverzibilisen ATP-kötő *off-pathway* intermedier ($\text{M} \cdot \text{ATP}^{\#}$ a **39.B ábrán**) megjelenése magyarázza. A **41. ábrán** bemutatott globális illesztéses kinetikai analízist alkalmazva meghatároztuk az intermedier kialakulásának és széttesésének kinetikáját (**41. ábra, 5. táblázat**).

Az ATP akto-m5aS1-hez történő kötődésével kialakult ütközési komplex, az ütközési lépést (K_1' a **39.B ábrán**) követően olyan szerkezeti átrendeződésen megy keresztül, mely a m5aS1 aktin affinitásának 5-6 nagyságrenddel való gyengüléséhez vezet (K_2') és ez végül az aktinról történő leválását (K_8) vonja maga után (38, 41, 154). Ezeket a folyamatokat az akto-m5aS1 komplex-et feleslegben vett ATP-vel összekeverve, pirén-jelölt aktin (PIA) fluoreszcencia változása és az ATP kötést követő aktomiozin-komplex széteséséből eredő, fényszórás változás alapján követtük nyomon *stopped-flow* készülékben (**40.D - F ábra**). A vad-típusú m5aS1 PIA fluoreszcencia tranziensek k_{obs} értékei közel lineárisan emelkedtek a vizsgált ATP koncentráció tartományban (**40.E ábra**). Mivel a telítést az alkalmazott ATP koncentrációknál nem értük el, így a k_2' paraméter alsó határát tudtuk megadni. Mindazonáltal a különböző ATP koncentrációknál kapott k_{obs} értékekre illesztett lineáris meredeksége, mely az ATP kötés látszólagos sebességi állandóját adja meg az akto-m5aS1-hez, a korábban már meghatározott $K_1'k_2'$ értéket mutatta (**1. és 4. táblázat**) (41, 154). Az akto-I67K m5aS1 konstrukció esetében kétfázisú PIA fluoreszcencia tranzienseket figyelhetünk meg (**40.D ábra**). A gyors fázis k_{obs} értékei kissé gyorsabb ATP kötési kinetikát mutattak a vad-típusú akto-m5aS1-hez képest (**40.E ábra**). A lassú fázis k_{obs} és amplitúdó profilja az I67K m5aS1 Trp tranziensek lassú fázisának esetében tapasztalt tendenciát követte (**40. ábra**).

Hipotézisünk szerint, melyet globális illesztéses kinetikai analízissel támasztottunk alá (**41. ábra**), az I67K akto-m5aS1 esetében megfigyelt ATP-kötési profil egy *off-pathway* ATP-kötő intermedier (AM.ATP[#] a **39.B ábrán**) kialakulását mutatja, mely hasonló kinetikát mutat az aktin hiányában megjelenő M.ATP[#] *off-pathway* ATP-kötő intermedieréhez. Ennek az intermediernek a kialakulása, az I67K akto-m5aS1 amplitúdó profilja alapján mutatott magas ATP-affinitás ellenére (**40.F ábra**), jelentős y-tengelymetszet eredményez a **40.E ábrán** bemutatottaknak megfelelően.

A fényszórás tranziensek esetében a PIA fluoreszcencia tranziensek fordított profilját kaptuk vissza, mely az aktin gyors leválásra (K_8 a **39.B ábrán**) utal a m5aS1-ről, illetve arról is árulkodik, hogy az aktin leválása m5aS1-ről az azt megelőző K_2' lépéssel közel egyidejűleg történik.



C) A (B) ábránál bemutatott kísérleti elrendezés alapján kapott gyors, *burst* fázis k_{obs} értékének (fő panel) és amplitúdójának (mellék panel) ATP koncentráció függése (vad-típusú m5aS1: (■); I67K m5aS1 (□)). A k_{obs} adatokra illesztett hiperbola felső határa ($k_{\text{max}} \leq k_4$) 32 s^{-1} és 12 s^{-1} értéknek adódott, míg a fél-telítéshez szükséges ATP koncentráció 13 és $9,1 \mu\text{M}$ volt a vad-típusú m5aS1 és I67K m5aS1 konstrukciók esetében. Az amplitúdó értékekre illesztett hiperbola alapján a maximális amplitúdó $0,99$ és $0,90 \text{ mol P}_i/\text{mol m5aS1}$ volt, míg a fél-telítéshez tartozó ATP koncentráció $140 \mu\text{M}$ és $14 \mu\text{M}$ -nak adódott a vad-típusú m5aS1 és az I67K m5aS1 konstrukciók esetében. D) ADP felszabadulás kinetikája az akto-m5aS1-ről és az akto-m5aS1 komplex ADP-affinitása PIA fluoreszcencia változás alapján követve. Fő panel: $0,5 \mu\text{M}$ vad-típusú m5aS1 (■) és I67K m5aS1 (□), $0,7 \mu\text{M}$ PIA és ADP (az ábrán feltüntetett ADP koncentrációkat alkalmazva) komplexét $200 \mu\text{M}$ ATP-vel - *stopped-flow* műszerben - összekeverve (keverés előtti koncentrációk) a kapott kétfázisú PIA fluoreszcencia tranziensek lassú fázisának frakcionális amplitúdói az ADP koncentráció függvényében. Ilyen körülmények között a gyors és lassú fázisok az ADP-mentes, illetve a kezdetben ADP kötött PIA-m5aS1 komplex ATP-indukált disszociációját mutatják. A PIA-m5aS1 ADP-kötött hányada esetében, az akto-m5aS1 disszociációt az ADP felszabadulás k_{obs} értéke (k_5') határozza meg. A lassú fázis frakcionális amplitúdóira illesztett hiperbola alapján, a vad-típus és I67K konstrukciók esetében kapott K_5' értékek $3,7 \mu\text{M}$ és $1,0 \mu\text{M}$ -nak adódtak. Mellék panel: kvázi-telítési ADP koncentrációnál ($20 \mu\text{M}$) kapott tranziensek. Az ilyen körülmények között túlsúlyban jelen lévő lassú fázis k_{obs} értékei ($=k_5'$) (39.B ábra) a vad-típus (fekete tranziens) és I67K (lila tranziens) konstrukciók esetében 14 s^{-1} és $2,4 \text{ s}^{-1}$ értékeknek adódtak.

Az ATP-hidrolízis kinetikai profilját aktin hiányában (K_3 az 39.B ábrán), *quenched-flow* műszer segítségével határoztuk meg. A m5aS1-et radioaktívan-jelölt ($\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ -)ATP-vel egyszeri átvitelt (42.A ábra fő panel) és többszöri átvitelt (42.A ábra mellék panel) biztosító körülmények között összekevertük és a radioaktívan-jelölt ($\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ -)ATP hasadását követtük nyomon.

Az egyszeri átviteli kísérletek során kapott kétfázisú profilra illesztett dupla exponenciális gyors fázisának megfigyelt sebességi állandó (k_{obs}) értékét az ATP kötés kinetikája (K_1k_2) határozta meg az alkalmazott ATP és miozin koncentrációknál (42.A ábra fő panel; 40. és 41. ábra; 4. és 5. táblázat), míg a lassú fázis k_{obs} értéke a P_i felszabadulás kinetikáját (k_4 , lásd alább) tükrözte. Az ATP hidrolízis lépés egyensúlyi állandója (K_3 , a két fázis frakcionális amplitúdója alapján ($A_{\text{gyors}}/A_{\text{lassú}}$) számított érték) magasabb értéknek adódott az I67K mutáns esetében (42.A ábra, 4. táblázat).

Többszöri átvitel kísérletben meghatározva a vad-típusú m5aS1 és I67K m5aS1 ATP hidrolízisének kinetikai profilját, a kapott görbe egy gyors, úgynevezett *burst* fázisból és egy lineáris *steady-state* fázisból állt mindkét konstrukció esetében (42.A ábra mellék panel). A *burst* fázis k_{obs} értékét az ATP kötés kinetikája (K_1k_2) határozta meg az alkalmazott ATP

koncentrációnál (30 μM) (**42.A ábra** mellék panel; **40. ábra**; **4. és 5. táblázat**), ezzel az ATP hidrolízis látszólagos sebességi állandójának egy alacsonyabb értéket kölcsönözve ($k_3 + k_{-3}$, **4. táblázat**). A *burst* amplitúdók alapján kalkulált K_3 ($K_3 = B/(1-B)$ ahol B a *burst* fázis amplitúdója mol P_i /mol m5aS1- ben kifejezve) értékek jól összhangban voltak az egyszeri átviteli kísérlet során meghatározott értékkel (**42.A ábra** mellék és fő panel, **4. táblázat**). A lineáris *steady-state* fázis meredeksége a *steady-state* bazális (aktin-mentes) ATP-áz aktivitást tükrözte, bár a P_i felszabadulás - a NADH-kapcsolt *steady-state* kísérletekhez képest sokkal robusztusabb módszernek köszönhetően - itt magasabb értéknek adódott (**42.A ábra** mellék panel; lásd lentebb).

A *quenched-flow* kísérletek eredményeit összefoglalva, az I67K m5aS1 mutáns megőrzi a vad-típus gyors ATP hidrolizáló képességét, továbbá az I67K mutáció elősegíti a hidrolízis lépés lezajlását (növekedés a K_3 egyensúlyi állandó értékében; **4. táblázat**).

Az I67K mutáns P_i felszabadulását az aktin sín jelenléte a vad-típushoz hasonlóan, markánsan aktiválja

A P_i felszabadulás kinetikáját az aktomiozin-ADP. P_i komplexről fluoreszcensen-jelölt foszfát-kötő fehérje (MDCC-PBP) jelváltozása alapján (141) követtük nyomon *stopped-flow* műszerben. 0.5 μM vad-típusú és I67K m5aS1-et 100 μM ATP-vel összekeverve (többszöri átviteli körülmények) nem jelent meg *burst* fázis a lineáris *steady-state* fázist megelőzően. Ez azt mutatta, hogy az I67K mutáns, a vad-típushoz hasonlóan aktin hiányában megőrzi a P_i felszabadulást (k_4) sebesség-meghatározó lépésként (**4. táblázat**).

10 μM aktin jelenlétében a lineáris *steady-state* fázist megelőzően egy exponenciális lefutású *burst* fázis volt megfigyelhető, melynek k_{obs} és amplitúdó értékei telítést mutattak a növekvő ATP koncentrációval (**42.B, C ábra**). A maximális k_{obs} érték az I67K mutáns esetében háromszor lassabbnak adódott a vad-típushoz képest, míg a maximális amplitúdók mindkét mutáns esetében az 1 mol P_i /mol m5aS1 értéket közelítették (**42.B, C ábra**; **4. táblázat**). A kapott adatok alapján, az I67K mutáns P_i felszabadulása (k_4') háromszor lassabb a vad-típushoz képest, azonban az ATP hidrolízise ($k_3 + k_{-3}$) és a P_i felszabadulása (k_4') továbbra is gyors marad, vagyis ezek a lépések nem sebesség-meghatározó lépései az I67K enzimműködésnek aktin jelenlétében sem.

Az I67K mutáció megszünteti az ADP felszabadulás aktin-aktivációját

PIA-m5aS1 és növekvő koncentrációban hozzáadott ADP előinkubált komplexét, moláris feleslegben vett ATP-vel kevertük össze *stopped-flow* műszerben, majd a PIA fluoreszcencia változása alapján követtük nyomon az ADP felszabadulást az aktó-m5aS1-ről (k_5'), illetve az aktó-m5aS1 ADP affinitását ($1/K_5'$) is ezen mérés alapján határoztuk meg (**42.D ábra**). A kapott kétfázisú PIA fluoreszcencia tranziensek gyors fázisa az ADP-mentes PIA-m5aS1 ATP-indukált disszociációját mutatja, míg a lassú fázis az előzetesen ADP-t kötő PIA-m5aS1 ATP-indukált disszociációját mutatja. Az ADP-kötött frakció esetében az PIA-m5aS1 ATP-indukált disszociációjának sebességét ($K_1'k_2'$) az azt megelőző ADP felszabadulás (k_5') határozza meg (lásd az „*Első témakörben*” is). A lassú fázisok k_{obs} értékeinek átlaga adja meg az ADP felszabadulás sebességi állandóját (k_5') aktin jelenlétében (**42.D ábra**). Az ADP felszabadulást aktin hiányában md-ADP fluoreszcencia változás alapján követtünk nyomon, m5aS1.md-ADP komplexét moláris feleslegben vett ATP-vel *stopped-flow* műszerben összekeverve (**4. táblázat**). A kapott adatok azt mutatták, hogy az I67K mutáció megszünteti az ADP-felszabadulás - vad-típusra jellemző - hétszeres aktin aktivációját (**4. táblázat**). Az vad-típusú aktó-m5aS1 nagy ADP affinitása ($1/K_5'$) az I67K mutáció hatására tovább erősödött, melyet a kapott PIA fluoreszcencia tranziensek lassú fázisa alapján, azok frakcionális amplitudó értékének ADP koncentráció függéséből, határoztunk meg (**42.D ábra** fő panel; **4. táblázat**).

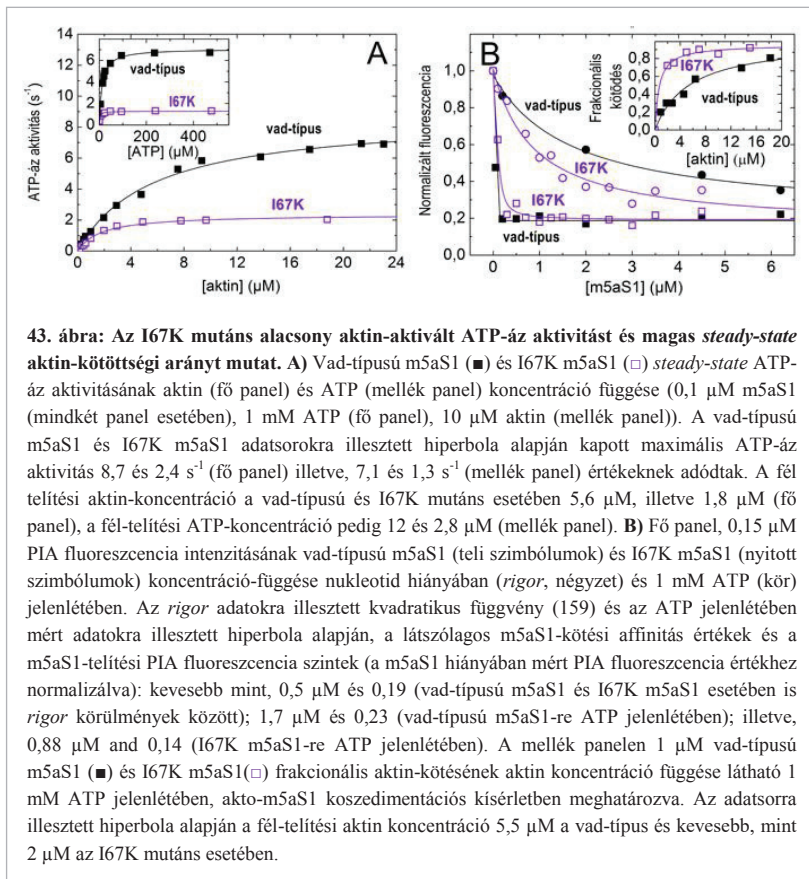
Az I67K mutáns mérsékeltebb ATP-áz aktivitást mutat, ugyanakkor megőrzi a vad-típusra jellemző magas *steady-state* aktin-kötöttségi arányt

NADH-kapcsolt esszében vizsgáltuk a konstrukciók *steady-state* aktin-aktivált ATP-áz aktivitását. Az I67K mutáció hatására a *steady-state* aktin-aktivált ATP-áz aktivitása (k_{cat}) ötszörös csökkenést mutatott a vad-típushoz képest (**43.A ábra**; **4. táblázat**), illetve ezzel párhuzamosan az ADP felszabadulás (k_5') sebessége is csökkent az aktó-I67K m5aS1 komplexről (**42.D ábra** mellék panel; **4. táblázat**).

Ultracentrifugálás alapú aktó-m5aS1 koszedimentációs kísérletekben, 15 mM ATP jelenlétében megállapítottuk, hogy a vad-típusra jellemző magas látszólagos aktin-affinitás (mely az ADP felszabadulás (k_5') sebesség-meghatározó szerepére és az aktó-m5aS1.ADP komplex nagyarányú előfordulására vezethető vissza az enzimmiklus során (**39.B ábra**) (41,

154)) az I67K mutációt hatására tovább emelkedett a *steady-state* ATP-áz ciklusa során (43.B ábra).

Steady-state PIA fluoreszcencia intenzitás alapján, a PIA emissziós spektrumát m5aS1-el titrálva vizsgáltuk meg a konstrukciók ATP hiányában és ATP jelenlétében mért erős-aktin kötési sajátságait. A kapott adatok azt mutatták, hogy a mutáns megőrizte a vad-típusra jellemző erős-aktin kötési sajátságokat, sőt az I67K m5aS1 látszólagos aktin-affinitását mérsékelt növekedést is mutatott *steady-state* ATP-áz ciklusa során (ATP jelenlétében mért) (43.B ábra fő panel).



Az eredmények azt mutatták, hogy a vad-típushoz hasonlóan az I67K m5aS1 motorok is enzimeciklusuk nagyrészét erősen aktin-kötött állapotokban töltik (magas terhelési-árányú motorok).

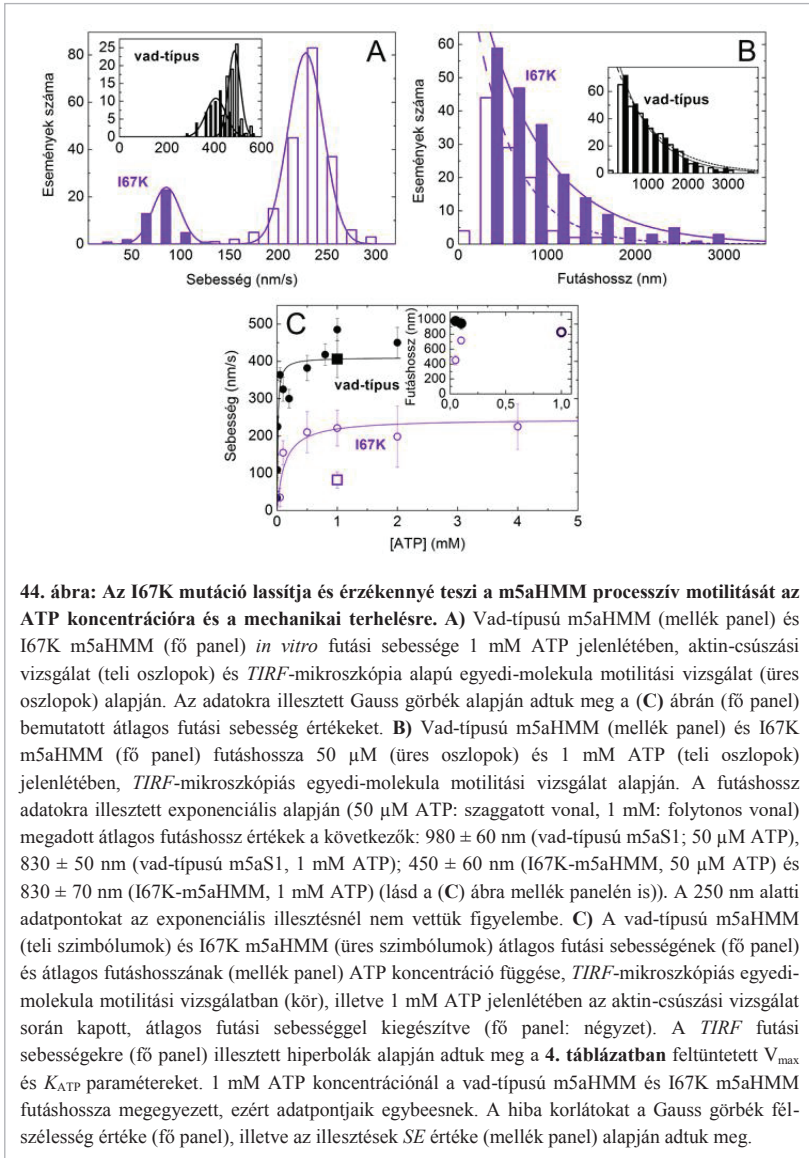
Az I67K mutáció befolyásolja a rigor aktin kötést

M5aS1-et (0,1 - 0,65 μM) ötszörös moláris feleslegben vett PIA-nal, *stopped-flow* műszerben gyorskeverve határoztuk meg a nukleotid-mentes I67K m5aS1 aktin kötési (*rigor* aktin-kötés) kinetikáját (k_{-6}). A kapott PIA tranziensek k_{obs} értékének PIA koncentráció függése alapján, az I67K mutáns aktin-kötési sebességi állandója négyszeres csökkenést mutatott a vad-típushoz képest (k_{-6} , **4. táblázat**).

Fluoreszcencia kioltásos kísérletben, PIA-m5aS1 komplexét nagy moláris feleslegben vett jelöletlen aktinnal összekeverve határoztuk meg a nukleotid-mentes I67K m5aS1 disszociációjának sebességét az aktinról (k_6). Az I67K mutáns disszociációs sebességi állandója az aktinról hétszeres gyorsulást mutatott a vad-típushoz képest, mely összességében az aktin affinitás huszonnyolcszoros csökkenését eredményezte ($1/K_6$; **4. táblázat**).

Az I67K mutáció hatására a miozin 5a motilitása lassul, illetve érzékennyé válik az ATP koncentrációra és a mechanikai terhelésre.

Kétféle kísérleti megközelítést alkalmazva tártuk fel az I67K mutáció hatását a m5aHMM motilitási sajátosságaira. Egyrészt fluoreszcensen jelölt aktin filamentumok segítségével vizsgáltuk az aktin filamentumok csúszását a m5aHMM borított felszínen (aktin-csúszási vizsgálat vagy *actin gliding assay*), másrészt az egyedi GFP-jelölt m5aHMM molekulák mozgását vizsgáltuk rögzített aktin filamentumok mentén *TIRF* (*Total Internal Reflection Fluorescence*) – mikroszkópa segítségével. A csúszási vizsgálat során alkalmazott körülmények között (m5aHMM inkubációs koncentráció: 0,5 - 1 μM), ahol az aktin filamentumokat egyszerre több miozin hajtja, valószínűleg az egyes motorok transzlokációs aktivitását a többi motorral – az aktinon keresztül - kialakított mechanikai kapcsolat is befolyásolja. Ezzel ellentétben, az egyedi molekulákat vizsgáló *TIRF*- mikroszkópiás kísérletben a m5aHMM molekulák motilitása a többi motor működésétől kvázi független (**31. ábra**). Az I67K m5aS1 ADP felszabadulásának (k_5') sebesség csökkenésével és alacsony ATP-áz aktivitásával (k_{cat}) összhangban az I67K m5aHMM futási sebessége - mindkét típusú vizsgálati módszer szerint - csökkenést mutatott (**42.D; 43.A és 44. ábra, 4. táblázat**).



Érdekes módon azonban, az I67K m5aHMM aktin-csúszási vizsgálat során meghatározott futási sebessége háromszor lassabbnak adódott, mint az egyedi molekulákat vizsgáló *TIRF*-kísérletben, míg a vad-típusú m5aHMM esetében nem volt számottevő különbség tapasztalható (**44.A, C ábra**). Ez a felfedezés azt mutatja, hogy az I67K mutáció az m5aHMM molekulát érzékenyebbé teszi a többi aktin-kötött motor által, egyazon aktin filamentumra kifejtett mechanikai terhelésre.

A m5aHMM átlagos futáshosszát az I67K mutáció nem befolyásolta 1 mM-os ATP koncentráció mellett. Alacsony ATP koncentrációknál azonban az I67K m5aHMM futáshossza jelentősen lecsökken, szemben a vad-típus futáshosszával, mely a vizsgált ATP koncentráció tartományban kvázi állandó maradt (**44.B, C ábra**). Emellett az I67K m5aHMM jelentősen magasabb ATP koncentrációnál éri el a futási-sebesség fél-telítési ATP koncentrációját (K_{ATP}) a vad-típushoz képest (**44.C ábra, 4. táblázat**).

A második témakörhöz kapcsolódó táblázatok:

3. táblázat: Az NTS - *konverter* kölcsönhatás (a csirke I67 és R710 aminosavakkal homológ aminosav párok között) távolság jellemzői a miozinok különböző szerkezeteiben

PDB kód	Konstrukció ^a	Nukleotid ligandum	Konformáció	Aminosav pár	Távolság (Å)	Távolság számításához használt atomok
1OE9		nincs	rigor-szerű		3,4	C _δ -C _ε
1W7I	<i>Gg</i> m5a MDE ^a	ADP	gyenge-ADP	I67-R710	3,7	C _δ -C _ε
1W7J		ADP.BeF _x	postrigor		15,6	C _δ -C _ε
1MMD		nincs	rigor-szerű		4,5	N _ζ -C _ε
1Q5G	<i>Dd</i> miozin 2 MD	ADP.BeF _x	postrigor	K84-R704	4,9	N _ζ -C _ε
1VOM		ADP.V _i	prepewerstroke		35,5	N _ζ -C _α
3I5G		nincs	rigor-szerű		6,6	N _ζ -C _ε
3I5F	<i>Lp</i> miozin 2 S1	ADP	postrigor	K81-R721	4,6	N _ζ -C _ε
2O58		nincs	rigor-szerű		5,1	N _ζ -C _ε
2OTG	<i>Pm</i> záróizom miozin 2 S1 ^b	ADP	postrigor	K81-R719	4,1	N _ζ -C _ε
1SR6		nincs	postrigor		3,9	N _ζ -C _ε
1QVI	<i>Ai</i> miozin 2 S1	ADP.V _i	prepewerstroke	K81-R719	27,3	N _ζ -C _ε

^a *Gg*, *Gallus gallus*; MDE, MD és esszenciális könnyű lánc (ELC); *Dd*, *Dictyostelium discoideum*; *Lp*, *Loligo pealei*; *Pm*, *Placopecten magellanicus*; *Ai*, *Argopecten irradians*.

4. táblázat: A vad-típusú és I67K miozin 5a konstrukciók^a mért funkcionális paramétere

Paraméter	Meghatározás módszere	vad-típus	I67K
Steady-state ATP-áz aktivitás			
Bazális aktivitás (s ⁻¹) ^b	NADH-kapcsolt esszé	0,020 ± 0,03	0,015 ± 0,04
Aktin-aktivált k_{cat} (s ⁻¹) ^b		9,9 ± 0,8	1,8 ± 0,4
K_{aktin} (μM) ^c		5,2 ± 0,3	1,0 ± 0,4
K_{ATP} (μM) ^d		12 ± 1	2,5 ± 0,3
Motilitás			
Aktin csúszási sebesség (nm·s ⁻¹) ^e	Aktin-csúszási vizsgálat	410 ± 50	82 ± 22
v_{max} (nm·s ⁻¹)	TIRF vizsgálat	410 ± 30	250 ± 40
K_{ATP} (μM)	TIRF vizsgálat	11 ± 0,4	130 ± 10
Trp fluoreszcencia változás nukleotid kötésre (%)			
	Trp fluoreszcencia		
ATP		17 ± 3	9 ± 1
AMPPNP		12 ± 1	13 ± 3
ATPγS		0 ± 1	-1 ± 1
ADP		-1 ± 1	1 ± 2
ATP kötés és hidrolízis			
$K_1 k_2$ (μM ⁻¹ s ⁻¹) ^f	Trp fluoreszcencia	1,3 ± 0,2	1,3 ± 0,2
$k_3 + k_3'$ (s ⁻¹) ^f	Trp fluoreszcencia	270 ± 60	760 ± 50
$k_3 + k_3'$ (s ⁻¹) ^g	Quenched-flow	> 35	> 39
K_3	Quenched-flow	0,64 ± 0,05	1,8 ± 0,6
$K_1' k_2'$ (μM ⁻¹ s ⁻¹) ^f	PIA fluoreszcencia, fényszórás	0,73 ± 0,08	1,2 ± 0,2
k_2' (s ⁻¹) ^f	PIA fluoreszcencia, fényszórás	> 200	> 300
P_i felszabadulás			
	MDCC-PBP fluoreszcencia		
k_4 (s ⁻¹) ^h		0,029 ± 0,003	0,025 ± 0,002
k_4' (s ⁻¹) ⁱ		≥ 32	≥ 12
A_{max} (mol P/mol m5aS1) ^j		0,99 ± 0,01	0,90 ± 0,02
ADP kölcsönhatás			
k_5 (s ⁻¹)	md-ADP fluoreszcencia	2,4 ± 0,1	4,3 ± 0,6; 1,3 ± 0,1 ^k
k_5' (s ⁻¹)	PIA fluoreszcencia	17 ± 3	2,7 ± 0,1
K_5' (μM)	PIA fluoreszcencia	3,7 ± 0,8	1,0 ± 0,3
Aktin kölcsönhatás			
	PIA fluoreszcencia		
k_6 (μM ⁻¹ s ⁻¹)		28 ± 1	7,3 ± 0,2
k_6 (s ⁻¹)		1,1 × 10 ⁻³	(8,1 ± 0,8) × 10 ⁻³
K_6 (μM)		3,9 × 10 ⁻⁵	1,1 × 10 ⁻³

^a Az oldatkinetikai kísérleteket egér (*Mus musculus*) m5aS1, a motilitás vizsgálatokat m5aHMM konstrukciókon végeztük. A kinetikai állandók nevezéktana az **39.B** ábrára utal. Az összes paramétert 25°C-on határoztuk meg. Az átlag ± SE értékek megadása két független kísérlet alapján történt. ^b 1 mM ATP jelenlétében. ^c Fél-telítési aktin koncentráció (1 mM ATP jelenlétében). ^d Fél-telítési ATP koncentráció (10 μM aktin jelenlétében). ^e 1 mM ATP jelenlétében. ^f Az exponenciális illesztések alapján számított paraméterek (**40. ábra**, az I67K m5aS1 gyors fázisa alapján). Az I67K m5aS1 adatokra kapott, globális illesztés eredményeit lásd az **5. táblázatban**. ^g A gyors, pre *steady-state burst* fázis maximális sebességi állandójának alsó határértéke 30 μM ATP mellett. ^h *Steady-state* meredekség 100 μM ATP mellett. ⁱ A gyors, pre *steady-state burst* fázis maximális sebességi állandójának alsó határértéke 10 μM aktin jelenlétében. ^j A gyors, pre *steady-state burst* fázis maximális amplitúdója 10 μM aktin jelenlétében. ^k A kétfázisú mdADP felszabadulás gyors (40 ± 3 % amplitúdóval) és lassú fázisának sebességi állandói.

5. táblázat: Az I67K m5aS1 és akto-I67K m5aS1 nukleotid-kötési tranziensek globális illesztéses kinetikai analizisének eredményei^a

Paraméter	Meghatározás módszere	Érték
ATP kötés m5aS1-hez		
	Trp fluoreszcencia	
k_{on} ($= K_1 k_2$) ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)		$0,98 \pm 0,33$
$k_3 + k_{-3}$ (s^{-1})		810 ± 110
$k_{\#}$ ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)		$0,17 \pm 0,02$
$k_{\#}$ (s^{-1})		$6,7 \pm 2,0$
md-ATP kötés m5aS1-hez		
	md-ATP fluoreszcencia	
k_{on} ($= K_1 k_2$) ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) ^b		$1,7 \pm 0,5$
$k_{\#}$ ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)		$0,11 \pm 0,07$
$k_{\#}$ (s^{-1})		$3,9 \pm 1,1$
ATP kötés acto-m5aS1-hez		
	PIA fluoreszcencia, fényszórás	
k_{on} ($= K_1' k_2'$) ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)		$1,2 \pm 0,5$
$k_{\#}$ ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)		$0,32 \pm 0,10$
$k_{\#}$ (s^{-1})		$2,3 \pm 0,2$

^a A kinetikai állandók nevezéktana az **39.B ábrára** utal. A legjobban illeszkedő paraméterek átlag $\pm SE$ értékinek megadása két független kísérlet alapján történt. A modellezés és szimuláció részleteiről lásd a **41. ábrát**, illetve az exponenciális illesztés alapján kapott megfigyelt k_{on} , k_{on}' paraméterek a **4. táblázatban** láthatóak. ^b A vad-típusú m5aS1 egyfázisú md-ATP-kötési tranzienseinek globális illesztéses és exponenciális analizise alapján, k_{on} ($= K_1 k_2$) = $1,6 \pm 0,3 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ értéket kaptunk.

VII. EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE

A miozin motordomén (*MD*) a mechanokémiai energia átalakítás központi „vezérlőegysége” minden miozin esetében. Ez a régió tartalmazza az aktin - és ATP-kötő helyet, illetve az erőkar kiindulási pontját képező *konverter*-régiót is (**39. ábra**) (9). Így ez a domén felelős az „üzemanyag” (ATP) megkötéséért, illetve az aktin sinnel történő ciklikus kapcsolattartásért is. Az utóbb említett *konverter* régió, a motordoménben végbemenő apró szerkezeti átrendeződések felerősítéséért, és azoknak az erőkar felé történő továbbításáért felelős, mely az ATP-ben tárolt kémiai energia hatékony mechanikai energiává alakítását biztosítja az ATP-áz ciklus során. Az energiaátalakító aktomiozin ATP-áz ciklus alapja a nukleotid, - és aktin-kötő helynek, valamint a *konverter* régióknak a dinamikus kommunikációja az enzimeciklus során.

A miozinok első látásra nagyfokú hasonlóságot mutató, soklépésből álló enzimeciklusa azonban, olyan működési mintázatokat igénylő feladatok teljesítését teszi lehetővé a miozinok számára, melyek eltérő kinetikai sajátosságokat igényelnek. Ilyen például az izomkontrakció vagy a sejten belüli anyagszállítás (11).

Az Értekezés alapjául szolgáló munkák során a „miozinológia” egyik legérdekesebb kérdéskörében kerestünk válaszokat:

Melyek azok a MD-ben kódolt egyedi mechanizmusok, melyek a működési mintázatok egyediségét biztosítják, illetve a miozinok hogyan hangolják össze az „általános” miozin enzimeciklust az egyedien alkalmazott mechanizmusokkal?

Az alábbiakban részletesen tárgyalom, hogy a *switch-2* hurok miozin osztály-specifikus aminosava (miozin 5a esetében: Y439) (**32. ábra**), milyen szerepet tölt be a miozin 5a processzív, lépegető mechanizmusának megvalósításában (*Első témakör*), illetve hogy az NTS-*konverter* interakciós felszín (**39. ábra**) milyen szerepet tölt be a miozinok mechanokémiai energia-átalakító folyamatában (*Második témakör*).

1. Az Első témakör eredményeinek megbeszélése

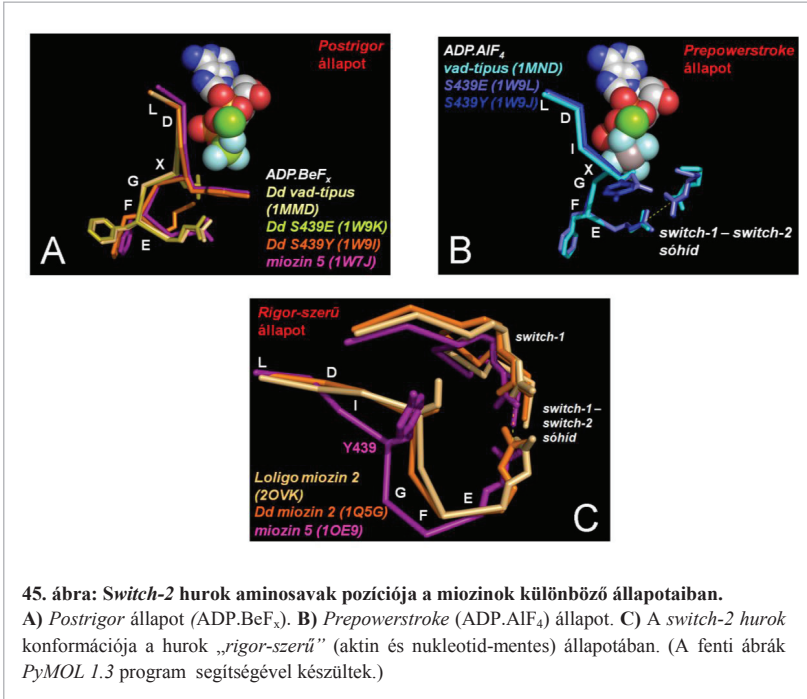
A switch-2 Y439 mutáns konstrukciók segítségével végzett munkánk feltárta, hogy a switch-2 hurok szerkezeti adaptációja biztosítja az miozin 5a motor gyors processzív működését

Az ATP-áz aktív-helyen található, erősen konzervált szekvenciával rendelkező *switch-2* hurok központi aminosav pozíciójának (Y439 az m5a esetében) osztály-specifitása a miozinok és más NTP-áz enzimek érdekes sajátossága, melynek energia-átalakító enzimciklusuk során betöltött szerepe ezidáig kérdéses volt. A miozin 6 és 7 osztály képviselői, valamint egyes miozin 5 izoformák processzív motorműködést mutatnak (26, 28, 32, 160-162). Az Y439-es pozícióval homológ pozíciót elfoglaló aminosav természete a különböző miozinok esetében és azok processzivitása nem mutat közvetlen korrelációt (**32.A ábra**). Ezt mutatják eredményeink is, ahol az Y439 helyettesítése kisebb oldalláncú aminosavakkal (Ala, Ser) nem alakította a miozin 5a motort alacsony terhelési arányú, izom miozin 2 - szerű motorrá. Ellenben, a mutációk legfontosabb funkcionális következménye az volt, hogy az ADP felszabadulás aktin-aktivációjának megszüntetése által csökkentették a motor processzív transzlokációjának sebességét az aktin filamentum mentén (**34.B, C és 35. ábra, 1. és 2. táblázat**). Érdekes módon a miozin 6 esetében, ahol alanin (Ala) foglalja el az érintett (Y439 homológ) pozíciót (**32.A ábra**) az ADP felszabadulást az aktin-jelenléte nem aktiválja (40). Eredményeink alapján a miozin 5-re jellemző osztály-specifikus *switch-2* szerkezet gyorsabb processzív transzlokációt biztosít az aktin mentén. Az ADP felszabadulás lassulása az aktomiozin.ADP komplexről (így az erősen aktin-kötött állapotban töltött idő megnyújtása) azonban nem növeli a motor processzivitását, ami feltehetően a P_i felszabadulási sebességi állandó - az aktomiozin.ADP. P_i komplexről - csökkenésének köszönhető (k_5' és k_4' az **1. táblázatban**). Az egy-fejre vonatkozó terhelési-arányt a $k_5'/(k_5'+k_4')$ összefüggés alapján hasonlóan magas értéknek becsültük, mind a vad-típus, mind az Y439A mutáns esetében (0,94, illetve 0,97; a becsült terhelési-arány értékek magukban hordozzák a sebességi állandók „mérési bizonytalanságát”).

A Mg^{2+} és nukleotid kölcsönhatást befolyásolja a switch-2 szerkezetének módosítása

A vad-típusú (S439) és *switch-2* mutáns (S439Y) *Dictyostelium* miozin 2 (Dm2) MD-ek *postrigor* állapotban kristályosított atomi szerkezeti eltérést mutatnak (az „Első témakör eredményeinek megbeszélése” során a számozás a miozin 5a szerint értendő). A *switch-2* hurok C-terminális része (G440-E442), különösen az F441 oldallánca eltérő konformációt

vesz fel a vad-típusú Dm2 MD (PDB kód *1MMD*) és a vad-típusú m5a (*1W7J*) *postrigor* állapotában. Érdekes módon a Dm2 S439Y mutációja (*1W9I*) miozin 5a-szerű *switch-2* és F441 konformációt indukál. A Dm2 S439E mutációja (*1W9K*) nem indukál miozin 5a-szerű konformációt (**45.A ábra**).



Továbbá az F441, mely az L50 kDa-os szubdoménnel és az aktin-kötő hellyel teremt kommunikációt, mutatja a legnagyobb RMSD értéket (az Y439 mellett) az erős – gyenge ADP kötő állapotok közötti átmenet során (lásd, „*Függelék*” **3. Függelék**). Meglepő módon az Y439A miozin 5a mutáns esetében az ADP felszabadulás a vad-típussal összevetve sokkal kifejezettebb Mg²⁺-függést mutat (**36.B ábra**; **2. táblázat**). Rosenfeld és munkatársai, korábbi munkájuk alapján (102), azt mondják, hogy a vad-típusú miozin 5a esetében az ADP-felszabadulás aktin-aktiváció hatására történő gyorsítása, a *p-loop* és az ATP-kötő hely bizonyos elemei között fenálló Mg²⁺ koordináció megszűnésének köszönhető.

Eredményeink összecsengnek ezzel a modellel, ha az Y439A mutáns esetében az ADP-felszabadulás aktin-aktivációjának megszűnését (**36.B ábra; 2. táblázat**) a megváltozott Mg^{2+} koordinációnak tulajdonítjuk. Coureux és mtsai. azt javasolták (119), hogy az erőgenerálás során, a P_i felszabadulás az aktomiozin.ADP. P_i komplexről elsőként egy erős ADP-kötő aktomiozin.ADP állapotot eredményez, mely a reverzibilis Mg^{2+} felszabadulással kísérve alakul gyenge ADP-kötő aktomiozin.ADP állapototá, melyből az ADP felszabadulása történhet (a **32.B ábra** egyszerűsített sémáján bemutatott AM.ADP állapot foglalja magába ezeket az állapotokat). A modell alapján az Y439A mutáns esetében az ADP felszabadulás sokkal kifejezettebb szabad Mg^{2+} - függése azt mutatja, hogy a vad-típusú miozin 5a Y439 hozzájárul a viszonylagosan gyors ADP felszabaduláshoz, így növelve a motor poszesszív transzlokációs sebességét, azáltal hogy elősegíti a gyenge ADP-kötő aktomiozin.ADP állapotot kialakulását (**36. ábra; 2. táblázat**; a szerkezeti átalakulást bemutató animáció az *Első témakör* alapján szolgáló közlemény (154) kiegészítő anyagában megtekinthető (*Supplemental Movie 1*)). *Dictyostelium discoideum* (*Dd*) miozin 1D és 1E izoformák esetében, melyeknél tirozin található a miozin 5a Y439-el egyenértékű pozícióban, az ADP-felszabadulás és motilitás jelentős szabad Mg^{2+} - koncentráció függést mutat, ellentétben a *Dd* miozin 1B motorral, ami fenilalanint tartalmaz az Y439-el homológ pozícióban és nem mutat szabad Mg^{2+} - koncentráció függést (163-165). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a miozin 1 motorok esetében az Y439 hidroxil-csoportjának interakciói fontos szerepet tölthetnek be a Mg^{2+} - függő ADP felszabadulás folyamatának irányításában. Érdekes módon azonban, eredményeink szerint az Y439A mutáns miozin 5a esetében az ADP felszabadulás Mg^{2+} - függése sokkal kifejezettebb a vad-típussal összevetve (**36.B ábra; 2. táblázat**). A kapott adatok alapján arra következtethetünk, hogy az Y439 jelenléte eltérő módon befolyásolja a Mg^{2+} - koordinációt a miozin 5a és miozin 1 motorok esetében.

Annak ellenére, hogy a mutációk hatására az ATP kötés, az ATP-indukált aktomiozin disszociáció, az ATP hidrolízis és P_i felszabadulás kinetikája mérhető eltéréseket mutatott (az Y439A mutáció az említett lépések mindegyikét jelentősen gyorsította) (**33. ábra; 1. táblázat**), ezek az eltérések csak kis mértékben befolyásolták a miozin 5aS1 átfogó *steady-state* paramétereit. Az, hogy a mutánsok megőrizték ATP-hidrolizáló képességüket összhangban van azokkal a szerkezeti adatokkal, melyek szerint az aktív-hely hurkok azonos konformációt vesznek fel a vad-típusú (*IMND*), S439Y (*IW9J*) és S439E (*IW9L*) *Dd* miozin 2 konstrukciók hidrolízis - kompetens *prepowerstroke* állapotában (**45.B ábra**).

Az ATP-indukált Trp fluoreszcencia növekedés eltérései a miozin 5a mutánsok esetében, az ATP hidrolízist megelőző, *postrigor* - *prepowerstroke* állapotok közötti egyensúly eltolódását mutatják a vad-típushoz képest (**1. táblázat**) (78, 166) (a **32.C ábra** egyszerűsített kinetikai sémáján a konformációs átalakulás és az ATP hidrolízis a K_3 lépésben egyesítve jelenik meg). Ezek az eltérések valószínűleg a mutációk *postrigor* állapot szerkezetre gyakorolt hatásából erednek (lásd fentebb). Érdekes módon az S439L mutáció jelentősen befolyásolja a *Dd* miozin 2 lépésmagyságát és motilitását, feltehetően a *prepowerstroke* szerkezet módosítása révén (167). Másrészt az S439A mutáció nincs jelentős hatással a *Dd* miozin 2 ATP-áz aktivitására és motilitására (155).

A switch-2 szerkezete befolyásolja az aktin-kötést

Ellentétben sok más miozinnal, a miozin 5a aktin és nukleotid hiányában ún. „*rigor*-szerű” (*rigor-like*) szerkezetet vesz fel, melyet zárt aktin-kötő árok és csekély hőmérséklet-függést mutató aktin kötés jellemez (41, 88). Az **1. táblázatban** feltüntetett alacsony aktivációs entalpia érték is ezt tükrözi. A miozin 5a „*rigor*-szerű” szerkezetében a *switch-2* hurok egyedülállóan közvetlen kapcsolatban van a centrális β -lemez 4-es szálával, mely a *rigor*-szerű állapot „védjegyének” tekinthető (88). Ez a közvetlen kapcsolat az izom miozin 2 izoformák „*rigor*-szerű” szerkezetei esetében hiányzik - a *switch-2* eltérő szerkezetet vesz fel (75) - így ez a sajátosság miozin 5a specifikus sajátásnak tűnik. A terjedelmes oldallánccal rendelkező Y439 eltávolítása a *switch-2* hurokból - a helyettesítő oldallánc méretével arányosan - megnöveli a miozin 5a konstrukciók *rigor* aktin - kötésének hőmérséklet-függését, mely magasabb aktivációs entalpia értékeket eredményez a mutánsok esetében (**38. ábra; 1. táblázat**). Emellett az Y439 eltávolítása csökkenti a nukleotid hiányában mért aktin-affinitást is (**1. táblázat**). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a vad-típusú miozin 5a - Y439 jelenlétében felvett - egyedi *switch-2* konformációja (**45.C ábra**), illetve ennek allosztérikus hatásai teszik lehetővé a miozin 5a erős, kis energiagáttal rendelkező aktin-kötését az aktin-kötő árok záródásának elősegítése révén.

A gerinces miozin 5a ortológok funkcionális eltéréseket mutatnak

A legtöbb miozin 5a motorról nyert kinetikai és szerkezeti ismeret a csirke izoforma vizsgálatából származik (38, 39, 41, 88, 119). Munkánk nyomán született meg a vad-típusú egér izoforma első részletes kinetikai vizsgálata (**1. és 2. táblázat**). A két ortológ MD

szekvenciája 95%-os hasonlóságot mutat és hasonlóan processzív, lépegető mechanizmus jellemzi működésüket (10, 28, 29, 103, 105, 146).

Az egér miozin 5a erőkarjának hat IQ motívuma hat kalmodulin (CaM) könnyűláncot köt, míg csirke miozin 5a esetében az erőkar IQ motívumai esszenciális könnyű láncokkal (ELC) is komplexálódhatnak (24, 168). Ennek a könnyűlánc heterogenitásnak az *in vivo* jelentősége még nem tisztázott. Az értekezés alapjául szolgáló eredményeink szerint, a miozin 5a processzív motorműködésre nincs számottevő hatással (169). Az egér és csirke miozin 5a izoformák kalmodulin könnyűláncokkal alkotott komplexei hasonló K_3 , $k_3 + k_{-3}$ és K_{aktin} értékeket mutatnak, míg az esszenciális könnyű láncokkal komplexált csirke m5aS1 izoforma ATP hidrolízise gyorsabb (magasabb k_3+k_{-3}), esetében az hidrolízis preferáltabb (magasabb K_3), illetve fél-telítési aktin koncentrációját alacsonyabb aktin koncentrációnál éri el (K_{aktin}) (169). Ez azt mutatja, hogy a fenti paramétereket a könnyűláncok jellege sokkal inkább befolyásolja, mint a nehézláncoké. Az esszenciális könnyű láncokkal (ELC) komplexált csirke m5aS1 izoforma esetében tapasztalt növekedés a k_3+k_{-3} és K_3 paraméterekben azt jelezheti, hogy az ATP hidrolízisét megelőző gyors egyensúly a *postrigor* és *prepowerstroke* állapotok között (78, 166, 169) jobban eltolódik a hidrolízis kompetens *prepowerstroke* állapot felé, mint a CaM könnyűláncal komplexben működő csirke és egér miozin 5a motorok esetében.

Összoglalva a korábbi és a jelen munka eredményeit elmondhatjuk, hogy minden vizsgált miozin 5a nehézlánc - könnyű lánc komplex megőrzi a processzív motorműködéshez szükséges, kulcsfontosságú kinetikai adaptációkat, míg a gyenge aktin kötő állapotok viszonylagosan magas aktin-affinitása és az ATP hidrolízis magas egyensúlyi állandó értéke nem tűnik a processzív miozin motilitás alapfeltételének (38, 39, 41). Másrészt az erősen kötő aktomiozin állapotok nem mutattak könnyűlánc-függést a csirke miozin 5a esetében (169). Tehát az egér miozin 5a esetében tapasztalt nukleotid-mentes miozin alacsonyabb aktin-affinitása (magasabb K_6), az aktomiozin komplex alacsonyabb ADP-affinitása (magasabb K_5') és a kifejezettebb aktin-ADP kapcsoltág (a miozin aktin és ADP kötésének kölcsönös gyengülése) valószínűleg az egér és csirke miozin 5a nehézláncok funkcionális különbségeinek köszönhető (1. táblázat).

Eredményeinket és Megállapításainkat Összegezve.

- *elsőként karakterizáltuk az egér (Mus musculus) miozin 5a aktomiozin ciklusának kinetikai sajátságait;*
- *rávilágítottunk a nukleotid-kötő helyen található switch-2 hurok miozin - osztály specifikus aminosav pozíciójának kulcsfontosságú allosztérikus szabályozó szerepére az aktin-aktivált, Mg^{2+} -függő ADP-felszabadulás folyamatában;*
- *kísérletes bizonyítékot szolgáltatunk arra, hogy a miozin 5a tirozinja (Y439) a switch-2 egyedi szerkezetét eredményezve biztosítja a motor adaptációját a gyors, processzív működéshez;*
- *megállapítottuk, hogy az ADP felszabadulás közvetlenül meghatározza a miozin5a motor futási-sebességét;*
- *a vad-típusnál jelentősen lassabban haladó, ugyanakkor változatlan processzivitású miozin 5a motorokat hoztunk létre, rámutatva a miozin 5a motorok futási-sebességének célzott hangolhatóságára;*
- *azonosítottuk, hogy a miozin 5a tirozinja, a switch-2 egyedi szerkezetét eredményezve, teszi lehetővé a miozin 5a motor kis aktiválási energiát igénylő, gyors rigor (a miozin nukleotid-mentes erős aktin-kötő állapota) aktin-kötését;*
- *munkánk alátámasztja az NTP-áz enzimekben konzervált switch-2 hurok általános szabályozó szerepét a Mg^{2+} -függő NDP-felszabadulás folyamatában.*

2. A Második témakör eredményeinek megbeszélése

Az I67K mutáció az NTS-konverter kölcsönható felszínen az erős aktomiozin kölcsönhatás perturbációjával jár együtt

Szerkezeti és kinetikai megfigyelések alapján tudjuk, hogy az aktin-és nukleotid mentes (“*rigor-szerű*” (*rigor-like*)) miozin 5a (m5aS1) kristályszerkezet (és ez a szerkezet puhatestű izom miozin 2 izoformák esetében) nagyon hasonló ahhoz a szerkezethez, amelyet a miozin 5a az erős aktin-kötő *rigor* komplexben felvesz (**39.A ábra**) (75, 87, 88). Ez a szerkezet fontos energetikai szerepet tölt be a motilitási mechanizmusban, mivel az erős aktomiozin kölcsönhatás kialakulása irányítja a termékfelszabadulást, illetve a kapcsolt erőgenerálási lépéseket (74). A csirke miozin 5a I67 és R710 oldalláncai (az utóbbi egyenértékű az egér m5a R709-es oldalláncaival) egymáshoz közel helyezkednek el a “*rigor-szerű*” szerkezetben (**39.A ábra; 3. táblázat**). Ez az elrendeződés azt sugallja, hogy az I67K mutáció jelentős, a vad-típusú miozin 2 izoformák esetében is megfigyelhető, töltés tasztítást eredményez az oldallánccok között (**39.A ábra; 3. táblázat**). Ezzel összhangban azt találtuk, hogy az erős aktomiozin interakció (K_6 az **39.B ábrán**) jelentősen megváltozott az I67K miozin 5aS1 mutáns esetében (**4. táblázat**). Érdemes azonban azt is megemlíteni, hogy a krisztallográfiásan azonosított, gyengén ADP-kötő m5a köztitermék esetében az NTS-konverter kölcsönható felszín nagyon hasonló a “*rigor-szerű*” állapot NTS-konverter kölcsönható felszínéhez (**3. táblázat**) (119). Ezen megfontolások alapján, az I67K mutáció valószínűleg destabilizálja a “gyenge-ADP” szerkezetet is, amely magyarázhatja az ADP felszabadulás aktin-aktivációjának megszűnését az I67K mutáns esetében (lásd lentebb).

Az I67K mutáció befolyásolja az ATP-kötés mechanizmusát is

Az ATP kötődése az erősen aktin-kötő *rigor* miozin 5a fejhez az aktomiozin interakció 5-6 nagyságrenddel való meggyengüléséhez és az ezt követően kialakuló aktinról levált, erősen nukleotid-kötő *postrigor* állapot kialakulásához vezet (**39.A ábra; K_1' , K_2' és K_8 lépések a 39.B ábrán**) (38, 41, 154). Munkánk során azonosítottuk, hogy az I67K mutáció az ATP kötés folyamatának fő-kinetikai útvonaltól nem számottevően befolyásolja, azonban segíti egy gyengén ATP-kötő, *off-pathway* köztitermék kialakulását, amely hasonló kinetikai sajátságokkal rendelkezik aktin hiányában és jelenlétében is. (M.ATP[#] és AM.ATP[#] a **39.B ábrán; 40. és 41. ábra.; 5. táblázat**; a kapcsolódó magyarázatot lásd lent). Ezek a tények azt

sugallják, hogy az NTS-konverter kölcsönható felszín működése allosztérikus hatást gyakorol az ATP-kötő zsebre is, és ez a hatás hasonló az aktin mentes (“*rigor-szerű*”) és aktin kötött (*rigor*) miozin 5a esetében is.

Az I67K m5aS1 kísérletesen meghatározott kinetikai paraméterein (**4. és 5. táblázat**) alapuló *steady-state* kinetikai szimulációink azt mutatják, hogy telítési aktin és ATP koncentrációnál (20 μ M és 5 mM) az I67K m5aS1 molekulák 19 %-a esetében populált az AM.ATP[#] állapot a *steady-state* ATP-áz ciklus során, mialatt a M.ATP[#] állapot populáltsága nem jelentős. Az *off-pathway* ATP-kötési folyamat így a *steady-state* ATP-áz aktivitás sebességének kismértékű lassulását (1,3-szoros) eredményezi, azonban az I67K m5aS1 magas aktin-kötöttségi arányára nincs hatással az ATP-áz ciklus során (közel 100%, **43.B ábra** mellék panel).

Témavezetőm és munkatársainak egy korábbi munkája nyomán tudjuk, hogy *Dd* miozin 2 esetében az osztály-specifikus töltés taszítás megszüntetése az NTS-konverter interakción felhőzín (K84-R704) nem befolyásolja a nukleotid-kötés folyamatát (118). Ezzel ellentétben a miozin 5a motor esetében a töltés taszítás megjelenése (egér m5a: R709-I67K) jelentősen módosítja az ATP-kötés folyamatát (**40. ábra**). Ezek a megállapítások jól összecsengnek a szerkezeti adatokkal melyek azt mutatják, hogy az érintett, kölcsönható oldalláncoknak a térbeli elkülönülése (eltávolodása) a *rigor-postrigor* átalakulás során megy végbe a miozin 5a esetében, míg miozin 2-ben ezek eltávolodása később, az erőkar felhúzásával kapcsoltan történik meg (*postrigor-prepowerstroke* átalakulás; **39.A ábra**; **3. táblázat**).

Az ATP-kötés folyamatában megfigyelhető változások, melyeket az I67K mutáció által idéztünk elő, különböznek azoktól az előzetesen már általunk és más csoportok által karakterizált hatásoktól, amelyet az ATP-kötő zseb konzervatív szekvenciájú, *switch-2* régiójának mutációi révén figyelhattunk meg a miozin 5a motor esetében. Az osztály-specifikus Y439 aminosav mutációi az ATP kötés folyamatát számottevően nem befolyásolták (154). míg a G440A mutáció, az ATP-indukált aktomiozin interakción gyengülését gátolta meg (38, 170).

Az I67K m5aS1 és akto-I67K m5aS1 ATP-kötési tranzienseinek háttérében álló mechanizmus értelmezése

A kétfázisú I67K m5aS1 Trp fluoreszcencia (**40.A – C ábra**) és akto-I67K m5aS1 PIA fluoreszcencia tranziensek (**40.D – F ábra**) ATP koncentráción függését alapvetően, egy olyan kétlépéses ATP kölcsönhatási mechanizmus is magyarázhatná, mely nem feltételezi *off-*

pathway ATP-kötő köztitermék megjelenését. E szerint a mechanizmus szerint, a kezdeti kötési lépést (melyet a kétfázisú tranziensek gyors fázisa képvisel) egy lassú lépés követné az ATP-áz ciklus fő útvonalán, melynek eredményeként látunk a tranziensekben egy lassú fázist. Azonban ezt a mechanizmust kizárhatjuk az alábbiak alapján:

(i) Aktin hiányában a Trp fluoreszcencia tranziensek lassú fázisának maximális k_{obs} paramétere 6-8 s^{-1} értékek között volt (**40.B ábra** mellék panel). Azonban a többszöri átviteli (*multi-turnover*) *quenched-flow* kísérletek (**42.A ábra** mellék panel) eredményei azt mutatták, hogy az ATP hidrolízis (k_3+k_{-3}) legalább 39 s^{-1} sebességi állandóval történik, ezzel kizárva, hogy a lassú lépés megelőzi vagy egyenértékű az ATP hidrolízis lépésével (K_3). Az említett *quenched-flow* kísérletben (**42.A ábra** mellék panel) egy második exponenciális fázis hiánya kizárja a lehetőségét egy a reverzibilis ATP hidrolízist ($k_3 + k_{-3} > 39 s^{-1}$) követő, de a sebesség meghatározó P_i felszabadulást ($k_4 = 0,025 s^{-1}$, **4. táblázat**) megelőző lassú (6-8 s^{-1}) lépésnek.

(ii) Aktin jelenlétében a PIA tranziensek lassú fázisának maximális k_{obs} értéke, 3-4 s^{-1} értékek között volt (**40.E ábra** mellék panel). Azonban az MDCC-PBP fluoreszcencia tranziensek, melyeket az akto-I67K m5aS1 és moláris feleslegben vett ATP gyorskeverésével kaptunk rávilágítottak, hogy a P_i felszabadulás (k_4') legkevesebb 12 s^{-1} sebességi állandóval zajlik (**42.C ábra; 4. táblázat**), ami kizárja a lehetőségét bármilyen lassú *on-pathway* folyamatnak az ATP kötés ($K_1'k_2'$) alatt, az akto-m5aS1 disszociációja (K_8) és az ATP hidrolízise (K_3) során. Számos miozin izoforma esetében felmerült az az elképzelés, hogy a nukleotid-mentes akto-S1 reverzibilisen képes két különböző konformációt felvenni, melyek közül az egyik alkalmatlan a nukleotid megkötésére (162, 171-173). Így ezen izoformák esetében az ATP-kötési kinetikáját a nukleotid-mentes akto-S1 konformációs egyensúlya befolyásolja. Azonban ez az elképzelés kizárható, az I67K m5aS1 és akto-I67K m5aS1 esetében is, a gyors és lassú fázis amplitúdók fordított ATP koncentráció függése alapján (**40.C és F ábrák**).

A fenti megfontolásokat figyelembe véve, hipotézisünk szerint az I67K m5aS1 és akto-I67K m5aS1 kinetikai viselkedése mögött (**40. ábra**) egy reverzibilisen kialakuló *off-pathway* köztitermék kialakulása áll (M.ATP[#], illetve aktin jelenlétében AM.ATP[#], **39.B ábra**). Elképzelésünket globális illesztéses kinetikai modellezéssel támasztottuk alá (lásd fentebb **41. ábra; 5. táblázat**).

Az I67K mutáció lelassítja a sebesség-meghatározó ADP felszabadulást

Az aktin filamentum mentén történő, processzív lépegető mechanizmus a kétfejű m5a holoenzim folytonos aktin kötését igényli a lépegetés során. Ez azt jelenti, hogy legalább egy fejnek aktin-kötött állapotban kell lennie a futás alkalmával (egy futás átlagosan 30 lépés a vad-típusú miozin 5a esetében). A fentiek alapján, az hogy a miozinfej enzimeciklusának jelentős hányadát erősen aktin-kötött állapotban töltse előfeltétele a processzivitásnak. A vad-típusú miozin 5a ATP-áz ciklusa során a miozinfej ATP-indukált leválását az aktinról (K_1' , K_2' és K_8 az **39.B ábrán**) a következő gyors lépések követik: az ATP gyors hidrolízise a miozin aktinról levált állapotában (K_3), a hidrolízis termékeket tartalmazó miozin fej visszakötése az aktinhoz (K_9) és az aktin-aktivált P_i felszabadulás (k_4') (41, 154). Így a P_i felszabadulást követő ADP felszabadulás az aktomiozinról (k_5') lesz az enzimeciklus sebesség-meghatározó lépése. Ez a kinetikai mintázat eredményezi az erősen aktin-kötő, aktomiozin.ADP komplex nagyarányú *steady-state* előfordulását, mely alapvetően meghatározza a vad-típusú m5a magas terhelési arányát ($\geq 70\%$ egy fej esetében) (41, 154) (lásd az *“Irodalmi Áttekintés: Terhelési-arány és processzivitás”* alfejezetében is). Az ADP felszabadulása, az átmenetileg kialakuló, nukleotid-mentes *rigor* aktomiozin komplex kialakulásához vezet. A miozin fej ekkor gyorsan, egy újabb ATP-t köt, és leválik az aktinról. Munkánk alapján tudjuk, hogy az ADP felszabadulás (k_5') és az aktin-aktivált *steady-state* ATP-áz aktivitás (k_{cat}) hasonló mértékű lassulást mutat ($\sim 5 - 6$ szoros) az I67K mutáns esetében. Ez azt jelzi, hogy az ADP felszabadulás maradt a mutáns enzimeciklusának sebesség-meghatározó lépése is (**42.D** és **43.A ábra**, **4. táblázat**). Ennek köszönhetően a mutáns megőrzi (illetve még fokozza is) a vad-típusra jellemző magas terhelési arányt (**43.B ábra**). Az ADP felszabadulás lassulását, az ADP felszabadulási lépés aktin-aktivációjának mutáció indukált megszűnése okozhatja.

Korábban azonosították, hogy az aktin-aktivált ADP felszabadulás kinetikáját a nukleotid-kötő zseb szerkezeti átalakulása határozza meg az aktomiozin.ADP állapotban, az ADP felszabadulását megelőzően (124). Ennek a lépésnek a mechanikai terhelés-függése biztosíthatja, hogy a miozin 5a fejről az ADP felszabadulás ne történjen meg, amíg a második munkaütem (második erőgenerálási lépés, **25. ábra**) le nem zajlott. Helyzetéből adódóan erre az átalakulásra hatást gyakorolhat az I67K mutáció bevétele, például az erőkar állapotainak megzavarása és ezáltal a munkaütem hátráltatása révén. Az a megfigyelés, hogy a mutáció megszüntette az ADP felszabadulás aktin-aktivációját jól egybeesik ezzel az elképzeléssel.

Kérdéses, hogy az “Első témakörben” bemutatott *switch-2* hurok osztály-specifikus Y439 aminosavának mutációi által indukált aktin-aktivált ADP felszabadulás megszűnése (154), ennek az útvonalnak az érintésével, vagy egy ettől független kommunikációs útvonal megzavarása révén valósul meg.

Az I67K mutáció processzív, ugyanakkor lassú és a mechanikai terhelésre fokozottan érzékeny motilitást eredményez

Amíg az I67K m5aHMM mutáns megőrzi a processzív mozgás képességét (**44.B, C ábra**) az aktin sín mentén, addig - a mutáció által indukált - az ADP felszabadulás aktin-aktivációjának megszűnése (**42.D ábra; 4. táblázat**) a futási sebesség jelentős lassulását eredményezi az I67K mutáns esetében (**44.A, C ábra**). Érdekes módon azonban, aktin-csúszási vizsgálat (*actin gliding assay*) alapján meghatározva a futási sebességet (ahol az aktin filamentumok mozgását követjük nyomon és egy aktin filamentumot több m5aHMM motor is mozgat, ezáltal mechanikai terhelést gyakorolva egymásra (**31. ábra**)) a lassulás jóval kifejezettebb volt, mint az egyedi molekulák, aktin sín mentén történő mozgását közvetlenül nyomon követő, *TIRF*-alapú egyedi molekula módszer esetében (**44.A, C ábra; 4. táblázat**). Ezek a tények azt mutatják, hogy a terhelés mentes futás során a futási sebesség lassul, a terhelés-érzékenység pedig fokozódott az I67K mutáció által. Azonban egyéb faktorok is befolyásolhatják a megfigyelt jelenséget. Az I67K m5a esetében tapasztalt magasabb látszólagos aktin-affinitás a *steady-state* ATP-áz ciklus során (**43. ábra**) valószínűleg extra terhelést jelent az aktin filamentumokra nézve, amely csökkentheti a motilitás sebességét az aktin-csúszási vizsgálatok során. Ezt a jelenséget, ellenállással terhelt motilitási vizsgálatban aktin-kötő fehérjék segítségével már korábban kimutatták (174-176). Továbbá, az I67K mutáció helyzetéből adódóan (az erőkar bázisánál található R709-es aminosavval kommunikál) befolyásolhatja a miozinfaj merevségét, amely nagyobb ellenálláshoz és alacsonyabb izometrikus erőhöz vezet. Érdekes módon az aktin-csúszási vizsgálat és az egyedi molekulák esetében megfigyelt különbség az Y439A *switch-2* mutáns esetében nem volt megfigyelhető (154), annak ellenére, hogy az ADP felszabadulás aktin-aktivációját mindkét mutáció (I67K, Y439A) megszüntette (**42.D ábra és 4. táblázat; 34.B ábra és 1. táblázat**).

Eredményeinket és Megállapításainkat Összegezve.

- rámutattunk, hogy az NTS-konverter kölcsönható felszín működése miozin osztály-specifikusan hangolja a motorműködést az energiaátalakító aktomiozin ciklust;
- meghatároztuk, hogy a miozin 5a NTS-konverter kölcsönható felszín működésének megbotyogtatása az erős aktomiozin interakciók meggyengülését, továbbá a nukleotid-kötő zseb módosult működését vonja maga után;
- azonosítottuk, hogy az I67K mutáns esetében a nukleotid-kötő zseb módosult működése egy új ATP-kötő off-pathway intermedier megjelenését idézi elő, illetve a termék-felszabadulási lépésekre is jelentős hatást gyakorol;
- felderítettük, hogy az NTS-konverter kölcsönható felszín módosított kommunikációja révén a kétféjű miozin 5a processzív motilitása lassul, illetve több szempontból nézve is sérülékenyebbé válik: a motor processzivitása és motilitása érzékenyebbé válik az ATP koncentrációra, továbbá motilitása a mechanikai terhelésre nézve is fokozott érzékenységet mutat.

VIII. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS KITEKINTÉS

A motordomén nukleotid-kötő helyének (Y439), és az NTS-konverter kölcsönható felszínének (I67) mutációja révén kapott miozin 5a motorok megőrizték ATP-kötési és ATP hidrolizáló képességüket, valamint a vad-típusra jellemző magas terhelési arányú motor jellegüket. Ennek köszönhetően magas processzivitású motor mivoltukat is megtartották. A magas terhelési arány “betonozása” arra vezethető vissza, hogy aktin jelenlétében a mutánsok megőrizték az ADP felszabadulást az egyedi miozinfajok sebesség-meghatározó lépéseként. A kétféjű molekula esetében, a sebesség-meghatározó ADP felszabadulás által fenntartott erős aktin-kötése az egyedi fejeknek biztosítja, hogy a tartó fej az éppen lépő fej számára elegendő időt biztosítson a lépés elvégzéséhez.

Annak ellenére azonban, hogy az Y439 és I67 aminosavak mutációival közvetlenül a miozin 5a eltérő funkcionális régióit érintettük, mégis mindkét mutáció számottevő hatást gyakorolt az ADP termék felszabadulásának sebességére a nukleotid-kötő zsebből. Mindkét mutáció az ADP felszabadulás sebességének lassulását eredményezte, mely a motilitási sebesség párhuzamos lassulásával járt együtt. A nukleotid-kötő zseb mutációja - a *switch-2* variabilis pozíciója révén - az ADP felszabadulás sebességét negyedére-ötödére csökkentette, mely a motilitási sebességet ezzel összhangban negyedére-ötödére lassította. Az NTS-konverter kölcsönható felszín mutációjának hatása esetében azonban kissé eltérő módon alakult ez az összefüggés. Az ADP felszabadulás sebessége ebben az esetben is ötödére-hatodára csökkent, míg a motilitás sebessége csak a felére csökkent az egyedi molekula motilitás vizsgálatok során. Ez feltehetően arra vezethető vissza, hogy az Y439-es mutációval közvetlenül a motordomén nukleotid-kötő helyén, az ADP-t koordináló konzervált *loop*-ok koordináló sajátságait változtattuk meg, mely közvetlenül meghatározza a miozin 5a motor haladási sebességét. Az I67K mutáció esetében azonban, feltehetően a motor terhelésre való fokozott érzékenységéből ered, hogy egyedi molekula motilitási sebessége kevésbé csökken az ADP felszabadulás sebességéhez képest. Az I67K mutáció - helyzetéből adódóan - valószínűleg a követő fej erőkarjának nagyobb ellenállását eredményezi a vezető fej húzásával szemben a molekula fejeinek egyidejű aktin kötése során, ezzel hátráltatva az erőgenerálást és az azzal kapcsolt ADP felszabadulást. Ezt a mechanikai terhelésre való fokozott érzékenységet támasztja alá az is, hogy a többi motor húzása által kifejtett mechanikai terheléssel “terhelt” kísérletben (aktin-csúszási vizsgálat) a motor sebessége

lassabbnak adódik a többi motor működéséből eredő hátráltató hatás révén.

Összegezve munkánkat, a motordomén vad-típusú kommunikációs útvonalainak megbolygatásával olyan mechanizmusokat sikerült feltérképeznünk, melyek a miozin motor specifikus funkcióra hangolódását biztosítják, illetve a miozin mechanokémiai ciklus során működő szabályozási mechanizmusokról is sikerült teljesebb képet kapnunk.

Eredményeink alapján a funkcionális adaptáció háttérében álló szerkezeti átrendeződések számos esetben a funkcionális paraméterek (processzivitás, motilitási sebesség, terhelhetőség) egymástól független hangolódását teszik lehetővé (154, 177), ugyanakkor sok esetben tetten érhető ezeknek a kommunikációs útvonalaknak a találkozása is az energiaátalakító aktomiozin ciklus során.

Az NTP-áz enzimekben konzerváltan jelenlévő *switch-2* hurok vizsgálata rávilágított a hurok allosztérikus szabályozó szerepére a Mg^{2+} -függő NDP-felszabadulás folyamatában, mely mechanizmussal a miozin 5a motor futási sebességét optimalizálja (154). A *switch-2* fent említett folyamatban betöltött, NTP-áz enzimeknél általános szabályozó szerepét alátámasztják más szerkezeti tanulmányok is (178). Az NTS-*konverter* kölcsönható felszín megváltoztatása eltérő változásokat okoz a miozin 5a és miozin 2 motorok enzim mechanizmusában ami arra utal, hogy az NTS-*konverter* kölcsönható felszín központi és miozin osztályonként eltérő, specifikus szerepet tölt be az enzim mechanizmus allosztérikus folyamatainak összehangolásában. A kölcsönható felszín megbolygatása a processzív motorműködés és a motilitási sebesség jelentős ATP koncentráció függését eredményezi, illetve a miozin 5a motor mechanikai terhelésre való érzékenységét is fokozza.

Távolabbra mutatva a processzivitás és/vagy a transzlokációs sebesség manipulálása, funkcionálisan jól karakterizált mutációk révén, lehetőséget adhat a motorenzimek pontos fiziológiás szerepének karakterizálására, például a miozin 5a szerepének azonosítására fotoreceptor sejtek ingerület átviteli folyamataiban (17). A mechanikai terhelés-érzékenységet befolyásoló mutációk a motorműködés terhelés-függő pontjainak azonosítása felé nyithatnak utat, illetve a mechanikai terhelésre való érzékenység manipulálása funkcionálisan jól karakterizált mutációk révén lehetőséget teremthet a molekulák fiziológiás mechanikai terhelés kitétségi vizsgálatára is.

IX. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsőként köszönetet szeretnék mondani témavezetőmnek, Dr. Kovács Mihálynak, akinek szakmai hozzáértése, támogatása és határtalan türelme rengeteget segített doktori munkám során.

Külön köszönettel tartozom Prof. Hegyi György tanár úr szakmai segítségével, illetve Dr. Málnási-Csizmadia Andrásnak a számtalan remek ötletért és hozzászólásért, melyek sokat segítettek a doktori munkám alatt előforduló, tudományos problémák megoldásában.

Elsők között szeretném kiemelni azokat a munkatársaimat, illetve sok esetben inkább barátaimat, akik a doktori munkám alapjául szolgáló tudományos anyag létrehozásában részt vettek. Dr. Gyimesi Mátét, aki a klónozási munkák alapjaival ismertetett meg, illetve számos tudományos probléma megvitatásában is segített. Dr. Sarlós Katát és Várkuti Boglárkát, akik mindig partnerek voltak a tudományos kérdések megvitatásában és a munka utáni kikapcsolódásban is. Dr. Simon Zoltánnak és Harami Gábornak, akikre barátként és a számítástechnikai problémák megoldásában is egyaránt számíthattam. Dr. Takács Balázsnak is köszönettel tartozom a közös munkáért, illetve belföldi és külföldi együttműködőink segítségével is hálás vagyok (Dr. Hazai Eszter, Dr. Bikádi Zsolt, Takeshi Sakamoto PhD, James R. Sellers PhD, Saikat Chakraborty PhD). Ezúton köszönöm továbbá a Kovács labor (Dr. Tóth Judit, Kocsis Zsuzsa, Krajcsi Anikó, Ferenczióvá Veronika, Martina Máté, Hürkecz Enikő) és a Málnási-Csizmadia labor (Dr. Kintses Bálint, Dr. Jelinek Balázs, Képiró Miklós, Szamosvölgyi Kitti, Végner László, Rauscher Anna, Peragovics Ágnes, Imrich Wanda, Ozoróczyné Szász Ilona Lőrincz István, Szegvári Gábor, Zhenhui Yang PhD) minden munkatársának türelmét és barátságát.

Köszönet illeti Prof. Gráf Lászlót, az ELTE TTK Biokémiai Tanszékének korábbi vezetőjét, valamint Prof. Nyitrai Lászlót, a tanszék jelenlegi vezetőjét, akik lehetővé tették számomra a munkát a tanszéken.

Végül, de nem utolsó sorban köszönet völegényemnek, Dr. Buda Sándornak és anyukámnak, Nagy Erzsébetnek akik szeretettel és türelmmel álltak mellettem doktorandusz éveim alatt.

X. PUBLIKÁCIÓK

Az értekezés alapjául szolgáló, külföldi folyóiratban publikált közlemények

Nagy, N. T., Chakraborty, S., Harami, G. M., Sellers, J. R., Sakamoto, T., Kovács, M. (2013): *A subdomain interaction at the base of the lever allosterically tunes the mechanochemical mechanism of myosin 5a*. **PLoS ONE** 2013 May 1;8(5):e62640.

Nagy, N. T., Sakamoto, T., Takács, B., Gyimesi, M., Hazai, E., Bikádi, Z., Sellers, J. R., Kovács, M. (2010): *Functional adaptation of the switch-2 nucleotide sensor enables rapid processive translocation by myosin-5*. **FASEB J.** 2010 Nov;24(11):4480-90.

Külföldi folyóiratban publikált egyéb közlemények

Ujfalusi, Z., Kovács, M., **Nagy, N. T.**, Barkó, S., Hild, G., Lukács, A., Nyitrai, M., Bugyi, B. (2012): *Myosin and tropomyosin stabilize the conformation of formin-nucleated actin filaments*. **J. Biol. Chem.** 2012 Sep 14;287(38):31894-904.

Hazai folyóiratban publikált közlemények

Nagy, N., Takács, B., Kovács, M. (2010): *Motorenzimek működési alapelvei és egyedi finomhangolása*. **Biokémia** (A Magyar Biokémiai Egyesület internetes folyóirata)

Konferencia szereplések (a szerző - előadót aláhúzással jelöltem)

Harami, G., Gyimesi, M., Sarlós, K., Kocsis Z. S, **Nagy, N. T.**, Ferencziová, V., Kovács, M. (2012): *Communication pathways in DNA-binding proteins*. **TAMOP Conference**, Dobogókő, Hungary

Gyimesi, M., Pires, R. H., Sarlós, K., **Nagy, N. T.**, Módos K, Kellermayer, M. Kovács, M. (2012): *Dynamic switch between assembly states of the human BLOOM's syndrome helicase*. 56th Annual Meeting of the Biophysical Society, San Diego, CA, USA

Nagy, N. T., Chakraborty, S., Sakamoto, T., Kovács, M. (2011): *Allosteric tuning of myosin 5a motor activity*. European Muscle Conference, Berlin, Germany

Nagy, N. T., Kovács, M. (2011): *Allosteric tuning of myosin 5a motor activity*. 55th Annual Meeting of the Biophysical Society, Baltimore, MD, USA

Nagy, N., Sakamoto, T., Takács, B., Gyimesi, M., Sellers, J. R., Kovács, M. (2009): *A class-specific structural adaptation of the switch-2 loop enables rapid processive translocation of myosin 5a*. European Muscle Conference, Lille, France

Nagy, N., Sellers, J. R., and Kovács, M. (2008): *Role of the switch-2 active site loop in the processive mechanism of myosin 5*. 52nd Annual Meeting of the Biophysical Society, Long Beach, CA, USA

Nagy, N., Sarlós, K., Takács, B., Tóth, J., Yang, Y., Pearson, D. S., Hetényi, C., Nyitray, L., Málnási-Csizmadia, A., Geeves, M. A., Bagshaw, C. R., Sellers, J. R., Brown, J. H., Szent-Györgyi, A. G., Cohen, C., **Kovács, M.** (2008): *Routes of allosteric communication between functional parts of the myosin motor*. Scientific Meeting of International Research Scholars of the Howard Hughes Medical Institute, Lisbon, Portugal

Nagy, N., Kovács, M. (2007): *Role of the switch-2 active site loop in the processive mechanism of myosin 5*. Molecular Recognition Conference, Pécs, Hungary

Nagy, N., Kovács, M. (2007): *Role of the switch-2 active site loop in the processive mechanism of myosin 5*. Annual Meeting of the Hungarian Biochemical Society, Debrecen, Hungary

XI. ÁBRÁK ÉS TÁBLÁZATOK JEGYZÉKE

Ábrák jegyzéke

1.	A miozin szupercsalád rendszere és előfordulása eukariótákban
2.	A miozinok szerkezeti egységei a miozin 5 motor példáján bemutatva
3.	Az aktomiozin mechanokémiai ciklus
4.	A 35 miozin osztály domén struktúrájának diverzitása
5.	Az izomrost szerveződése és a szarkomerek felépítése
6.	A miozinok funkcionális diverzitása
7.	A miozin 5a motor aktivitásának szabályozása
8.	A miozin 5 motorok szerkezete
9.	Az egyedi fejek aktomiozin ciklusa és a miozin 5a jellegzetes lépegető, „ <i>hand over hand</i> ” mechanizmusa
10.	Lymn – Taylor modell: az aktomiozin ATP-áz ciklus első kemomechanikai modellje
11.	Bagshaw – Trentham modell
12.	A keresztléd és az erőgenerálás
13.	Az aktó-S1 komplex rekonstruált szerkezete az erőkar felhúzott és lecsapott állapotában
14.	A miozinok szerkezeti egységei
15.	A miozinfej legfontosabb szerkezeti elemei
16.	G-aktin monomer és az F-aktin polimer szerkezete
17.	Erős és gyenge aktin-kötő állapotok az aktomiozin ciklus során
18.	A fésűkagyló harántcsíkolt izom miozin 2 erőgeneráló ATP-áz ciklusának ismert miozin szerkezetei
19.	A miozin 2 motor kinetikai útvonal szelekción alapuló erőgenerálási mechanizmusa
20.	Miozin funkciók és az aktin-kötési sajátságok (terhelési arány, aktin-ADP kapcsoltság, aktinkötött állapotok életideje) korrelációja
21.	A belső feszültség szerepe az ADP felszabadulás hangolásában
22.	A <i>konverter</i> régió 2 lépésben lezajló elmozdulása a miozin 2 <i>postrigor</i> - <i>prepowerstroke</i> átalakulása során
23.	Az erőgenerálás felé vezető, lehetséges útvonalak
24.	Az erőgenerálás két fázisának azonosítása optikai csapdázás alapú, egyedi molekula módszerrel
25.	A dimer miozin 5 két - fázisú erőgeneráló mechanizmusának modellje
26.	Az egyedi miozin 5a fej enzimeciklusának lépései
27.	Az Y439 és I67-es aminosavak (mutáció által érintett pozíciók) elhelyezkedése a csirke miozin 5a motordomén <i>postrigor</i> állapotában
28.	A célgén <i>bacmid</i> -ba történő beépülésének ellenőrzése PCR technika segítségével
29.	Flag-címkés Y439A m5aS1 konstrukció kitermelésének ellenőrzése (SDS-

	PAGE/WB) és a tisztított Y439A m5aS1 fehérje SDS-PAGE gélképe
30.	<i>Stopped-flow</i> és <i>quenched-flow</i> műszer sematikus rajza és képe
31.	Motilitás vizsgálati módszerek
32.	A <i>switch-2</i> hurok szekvenciája, elhelyezkedése és szerepe
33.	Az Y439 mutációk hatása a nukleotid kötésre, foszfát felszabadulásra és az ATP hidrolízisre
34.	Az Y439 mutációk hatása a miozin 5aS1-ADP kölcsönhatásra és a miozin 5aS1 ATP-áz aktivitására
35.	Az Y439A mutáció hatása a miozin 5aHMM haladási sebességére és processzivitására
36.	A Mg^{2+} hatása az aktin-aktivált ATP-áz aktivitásra és az ADP-felszabadulásra a vad-típusú és Y439A aktomiozin komplexről
37.	Az aktív hely nagyított képe erősen (<i>IW7J</i>) (A) és gyengén (<i>IW7I</i>) (B) nukleotid-kötött állapotban
38.	Arrhenius ábrázolás, a nukleotid-mentes miozin 5aS1 aktin kötési kinetikájának hőmérséklet-függése
39.	Miozinok szerkezeti és kinetikai átalakulásai
40.	Az I67K mutáció befolyásoló hatása a m5aS1 ATP-kötési mechanizmusára aktin hiányában és jelenlétében
41.	I67K m5aS1 és aktó-I67K m5aS1 ATP-kötési tranzienseinek globális illesztéses kinetikai modellezése
42.	Az I67K mutáció hatása az ATP hidrolízisre, P_i felszabadulásra és az ADP-felszabadulás aktin-aktivációjára
43.	Az I67K mutáció hatása az aktin-aktivált ATP-áz aktivitásra és a <i>steady-state</i> aktin-kötöttségi arányra
44.	Az I67K mutáció hatása a m5aHMM processzív motilitására
45.	<i>Switch-2</i> hurok aminosavak pozíciója a miozinok különböző konformációs állapotaiban

Táblázatok jegyzéke

1.	Vad-típusú és <i>switch-2</i> mutáns miozin 5a konstrukciók funkcionális sajátosságai
2.	Mg^{2+} - függő md-ADP felszabadulás a vad-típusú és Y439A m5aS1-ről aktin hiányában és jelenlétében
3.	Az NTS - <i>konverter</i> kölcsönhatás (a csirke I67 és R710 aminosavakkal homológ aminosav párok között) távolság jellemzői a miozinok különböző szerkezeteiben
4.	A vad-típusú és I67K miozin 5a konstrukciók mért funkcionális paraméterei
5.	A globális illesztéses kinetikai analízis eredményei az I67K m5aS1 és aktó-I67K m5aS1 nukleotid-kötési tranziensei alapján

XII. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

A	adenin, alanin, aktin, amplitúdó
ADP	adenozin-difoszfát
Ai	<i>Argopecten irradians</i>
ADP.AIF₄	adenozin-difoszfát.alumínium-fluorid
ADP.BeF_x	adenozin-difoszfát.berillium-fluorid
ADP.V_i	adenozin-difoszfát.vanadát
AFM	<i>Atomic Force Microscopy</i>
AMD_{GY}	gyenge ADP-kötő aktomiozin-adenozin-difoszfát komplex
AMPPNP	adenozin-5'-(β, γ-imidotrifoszfát)
ATP	adenozin-trifoszfát
ATPγS	adenozin 5'-O-(3-tio)trifoszfát
[γ-³²P]-ATP	adenozin-trifoszfát γ- ³² foszfát izotópja
B	„burst” fázis amplitúdója
Bluo-gal	5-bromo-4-kloro-3-indoil β-D-galaktopiranozid
C	citozin, szénatom
CaM	kalmodulin
C-terminális	karboxi-terminális
Cys	cisztein
D	aszpartát
Da	dalton
Dd	<i>Dictyostelium discoideum</i>
Dm2	<i>Dictyostelium discoideum</i> miozin 2
DMSO	dimetil-szulfoxid
DNS	dezoxi-ribonukleinsav
DTT	ditiotreitól
E	glutaminsav
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
EGTA	etilén-glikol-tetraecetsav
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
ELC	esszenciális könnyűlánc (<i>Essential Light Chain</i>)
ε	moláris extinciókoefficiens
F	fenilalanin, frakcionális amplitúdó
FBS	embrionális marha vérszérum (<i>Fetal Bovine Serum</i>)
F-aktin	filamentózus aktin
FRET	<i>Fröster Resonance Energy Transfer</i>
G	guanin, glicin
G-aktin	globuláris aktin
GFP	zöld fluoreszcens fehérje (<i>Green Fluorescent Protein</i>)
Gg	<i>Gallus gallus</i>

GTD	globuáris fark régió (<i>Globular Tail Domain</i>)
H	hidrogén
HCM	hipertrófiás kardiomiopátia (<i>Hypertropic Cardiomyopathy</i>)
HMM	nehéz meromiozin (<i>Heavy MeroMyosin</i>)
HPLC	Nagynyomású folyadék kromatográfia (<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>)
ΔH^\ddagger	aktivációs entalpia
I	izoleucin
IF	interferencia (<i>Interference</i>)
IQ motívum	izoleucin-glutamin motívum
IP3	inozitol-triszfoszfát
IPTG	izopropil- β -tio-galaktózid
K	lizin
KCl	kálium-klorid
kDa	kilodalton
L	lizin
LacZ	β -galaktózidáz fehérjét kódoló gén
LB	Luria Bertani (agarlemez)
L50	alsó (<i>Lower</i>) 50 kDa-os szubdomén
LDH	laktát-dehidrogenáz
LMM	könnyű meromiozin (<i>Light MeroMyosin</i>)
LP	felül áteresztő (<i>Long Pass</i>)
Lp	<i>Loligo pealei</i>
M	miozin, metionin
m5	miozin 5
Mg²⁺	magnézium ion
MgCl₂	magnézium-klorid
MCS	Többszörös klónozó hely (<i>Multi Cloning Site</i>)
MD	motordomén
MDE	motordomén és esszenciális könnyű lánc
md-ADP	N-metilnitrilil-2'-deoxi-ADP
md-ATP	N-metilnitrilil-2'-deoxi-ATP
MDCC	7-(diethylamino)-3-(((2-maleimid)etil)amino)karbonil)kumarin
MDP	miozin- adenozin-difoszfát-foszfát komplex
n	lépésszám
N	bármely bázis, nitrogén atom
NaCl	nátrium-klorid
NADH	nikotinamid-adenin-dinukleotid (redukált forma)
NaN₃	nátrium-azid
NDP	nukleozid-difoszfát
NM2	nem-izom miozin 2
NTP	nukleozid-trifoszfát

NTS	amino-terminális szubdomén
O	oxigén
P	processzivitás
P1	első generációs vírusnemzedék
P2	második generációs vírusnemzedék
P3	harmadik generációs vírusnemzedék
PBP	foszfát-kötő fehérje (<i>Phosphate Binding Protein</i>)
PCR	polimeráz lánc-reakció (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PDB	fehérje adatbázis (<i>Protein Data Bank</i>)
PEP	foszfo-enol-piruvát
P_i	foszfát
PIA	N-(1-pirén)jódacetamiddel - jelölt aktin, (pirén aktin)
PK	piruvát kináz
Pm	Placopecten magellanicus
PMSF	fenil-metil-szulfonil-fluorid
Q	glutamin
R	arginin
RLC	regulációs könnyűlánc (<i>Regulatory Light Chain</i>)
RMSD	középértéktől való négyzetes eltérés (<i>Root-Mean Square Deviation</i>)
RNáz	ribonukleáz
RNS	ribonukleinsav
rpm	percenkénti fordulatszám (round per minute)
S	szerin
S1	Szubfragment-1
S2	Szubfragment-2
SDS – PAGE	nátrium-dodecil-szulfát (<i>sodium dodecyl sulfate</i>) poliakrilamid gélelektroforézis
SD	szórás (<i>Standard Deviation</i>)
SE	standard hiba (<i>Standard Error</i>)
SER	sima felszínű endoplazmatikus retikulum
Sf9	<i>Spodoptera frugiperda</i> rovarsejt
SH1	<i>SRC</i> homológia domén 1 (<i>SRC Homology 1 Domain</i>)
SH3	<i>SRC</i> homológia domén 3 (<i>SRC Homology 3 Domain</i>)
T	timin, treonin
t	időálló
TIRF	<i>Total Internal Reflection Fluorescence microscopy</i>
Trisz	trisz-(hidroxil-metil)-amino-metán
Trp	triptofán
U	egység (unit)
U50	felső (<i>Upper</i>) 50 kDa-os szubdomén
W	triptofán
X	bármelyik aminosav
Y	tirozin

XIII. FÜGGELÉK

1. Függelék

Az értekezés tranziens kinetikai méréseinek körülményei

Tranziens kinetikai mérés ^a	Spektroszkópiai megközelítés	Jel	Gerjesztés	Detektálás
i	Fluoreszcencia követése	md-ATP, md-ADP	280 nm	420-as felül áteresztő filter (LP, <i>LongPass</i>)
i		Trp	280 nm	340-es interferencia filter (IF, <i>Interference</i>)
i		PIA	365 nm	400 LP filter
ii		MDCC-PBP	436 nm	455 LP filter
iii		md-ADP	280 nm	420 LP filter
iii		PIA	365 nm	400 LP filter
iv		PIA	365 nm	400 LP filter
v		PIA	340 nm	400 LP
v	Fényszórás követése	AM komplex szétesése	340 nm	340 IF filter

^a A mérések megjelölése az *Anyagok és Módszerek* fejezet, *Tranziens kinetikai mérések* alfejezetének felosztása szerint értelmezendő.

2. Függelék

Alkalmazott illesztések és paramétereik

lineáris

$$y = a + bx$$

a: y tengelymetszet

b: meredekség

egyszeres exponenciális

$$y = y_0 + Ae^{-x/t}$$

A: amplitúdó

t: időállandó, $1/t = k_{\text{obs}}$ (megfigyelt sebességi állandó)

y_0 : plató

kétszeres exponenciális

$$y = y_0 + A_1e^{-x/t_1} + A_2e^{-x/t_2}$$

A_1 és A_2 : első és második fázis amplitúdója

t_1 és t_2 : első és második fázis időállandója,

$1/t_1 = k_{\text{obs}1}$, $1/t_2 = k_{\text{obs}2}$

y_0 : plató

hiperbola

$$y = \frac{P_1x}{P_2 + x}$$

P_1 : plató, az a minimális vagy maximális érték ahová k_{obs} értékek tartanak

P_2 : fél-telítéshez tartozó koncentrációja a változó koncentrációjú komponensnek

módosított hiperbola

$$y = \frac{P_1x}{(P_2 + x)} + P_3$$

P_1 : plató, az a minimális vagy maximális érték ahová k_{obs} értékek tartanak

P_2 : fél-telítéshez tartozó koncentrációja a változó koncentrációjú komponensnek

P_3 : y tengelymetszet

másodfokú függvény

$$y = a \left((c + x + k - \frac{(c + x + k)^2 - 4cx^{0.5}}{2c}) + s \right)$$

s: y tengelymetszet

a : amplitúdó

c: konstans értéken tartott komponens koncentrációja

k: a kötés egyensúlyi állandója (K_d)

Gauss-görbe

$$y = y_0 + \frac{A}{w\sqrt{\frac{\pi}{2}}} e^{-\frac{2(x - x_c)^2}{w^2}}$$

y_0 : y tengelymetszet

x_c : center

$\frac{w}{2}$: félszélesség érték

A: terület

Alkalmazott egyenletek

Arrhenius-egyenlet

$$k = A e^{\frac{-E_a}{RT}}$$

k: a reakció sebességi állandója

T : abszolút hőmérséklet

A: preexponenciális tényező

E_a : aktiválási energia

R: egyetemes gázállandó

k_B : Boltzmann állandó

h: Planck állandó

ΔS^\ddagger : aktiválási entrópia

ΔH^\ddagger : aktivációs entalpia

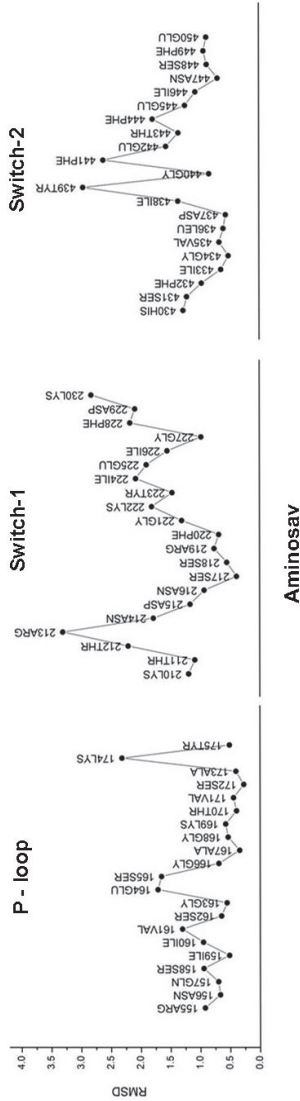
A **38. ábra** esetében az egyenlet linearizált formáját használtuk és $\ln k$ -t ábráztuk $1000/T$ függvényében:

$$\ln k = \frac{-E_a}{R} \frac{1}{T} + \ln A$$

A **38. ábra** esetében megadott és az **1. táblázatban** feltüntetett aktivációs entalpia (ΔH^\ddagger) értékeket az alábbi egyenlet alapján számítottuk:

$$\ln k = \left(\ln \frac{k_B T}{h} + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} \right) - \frac{\Delta H^\ddagger}{RT}$$

3. Függelék



1. függelék: A *p-loop*-ot, a *switch-1* és *switch-2* régiókat alkotó aminosavak RMSD (Å) értékei a miozin SaSI erősen MgADP-kötött és gyengén ADP-kötött állapotai között.

XIV. IRODALOM

1. Purich DL (2001) Enzyme catalysis: a new definition accounting for noncovalent substrate- and product-like states. *Trends Biochem Sci* 26(7):417-421.
2. Tilney LG & Detmers P (1975) Actin in erythrocyte ghosts and its association with spectrin. Evidence for a nonfilamentous form of these two molecules in situ. *J Cell Biol* 66(3):508-520.
3. Foth BJ, Goedecke MC, & Soldati D (2006) New insights into myosin evolution and classification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(10):3681-3686.
4. Thompson RF & Langford GM (2002) Myosin superfamily evolutionary history. *Anat Rec* 268(3):276-289.
5. Richards TA & Cavalier-Smith T (2005) Myosin domain evolution and the primary divergence of eukaryotes. *Nature* 436(7054):1113-1118.
6. Odronitz F & Kollmar M (2007) Drawing the tree of eukaryotic life based on the analysis of 2,269 manually annotated myosins from 328 species. *Genome Biol* 8(9):R196.
7. Vale RD (2003) The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell* 112(4):467-480.
8. Sweeney HL & Houdusse A (2010) Structural and functional insights into the Myosin motor mechanism. *Annu Rev Biophys* 39:539-557.
9. Geeves MA & Holmes KC (2005) The molecular mechanism of muscle contraction. *Adv Protein Chem* 71:161-193.
10. Sellers JR (1999) *Myosins* (Oxford University Press, New York).
11. De La Cruz EM & Ostap EM (2004) Relating biochemistry and function in the myosin superfamily. *Curr Opin Cell Biol* 16(1):61-67.
12. Coluccio LM (2008) *Myosins: A Superfamily of Molecular Motors* (Springer, Dordrecht).
13. Fischer S, Windshugel B, Horak D, Holmes KC, & Smith JC (2005) Structural mechanism of the recovery stroke in the myosin molecular motor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(19):6873-6878.
14. Golomb E, *et al.* (2004) Identification and characterization of nonmuscle myosin II-C, a new member of the myosin II family. *J Biol Chem* 279(4):2800-2808.
15. Redowicz MJ (2007) Unconventional myosins in muscle. *Eur J Cell Biol* 86(9):549-558.
16. Cheney RE, *et al.* (1993) Brain myosin-V is a two-headed unconventional myosin with motor activity. *Cell* 75(1):13-23.
17. Libby RT, Lillo C, Kitamoto J, Williams DS, & Steel KP (2004) Myosin Va is required for normal photoreceptor synaptic activity. *J Cell Sci* 117(Pt 19):4509-4515.
18. Matesic LE, *et al.* (2001) Mutations in *Mlph*, encoding a member of the Rab effector family, cause the melanosome transport defects observed in leaden mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(18):10238-10243.
19. Mercer JA, Seperack PK, Strobel MC, Copeland NG, & Jenkins NA (1991) Novel myosin heavy chain encoded by murine dilute coat colour locus. *Nature* 349(6311):709-713.
20. Wilson SM, *et al.* (2000) A mutation in *Rab27a* causes the vesicle transport defects observed in ashen mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(14):7933-7938.
21. Mermall V, Post PL, & Mooseker MS (1998) Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction. *Science* 279(5350):527-533.

22. Siththanandan VB & Sellers JR (2011) Regulation of myosin 5a and myosin 7a. *Biochem Soc Trans* 39(5):1136-1141.
23. Chadoir BM, Kowalczyk PA, & Chisholm RL (1999) Regulatory light chain mutations affect myosin motor function and kinetics. *J Cell Sci* 112 (Pt 10):1611-1620.
24. Sellers JR & Knight PJ (2007) Folding and regulation in myosins II and V. *J Muscle Res Cell Motil* 28(7-8):363-370.
25. Sellers JR, Thirumurugan K, Sakamoto T, Hammer JA, 3rd, & Knight PJ (2008) Calcium and cargoes as regulators of myosin 5a activity. *Biochem Biophys Res Commun* 369(1):176-181.
26. Toth J, Kovacs M, Wang F, Nyitray L, & Sellers JR (2005) Myosin V from *Drosophila* reveals diversity of motor mechanisms within the myosin V family. *J Biol Chem* 280(34):30594-30603.
27. Lapiere LA, *et al.* (2001) Myosin vb is associated with plasma membrane recycling systems. *Mol Biol Cell* 12(6):1843-1857.
28. Mehta AD, *et al.* (1999) Myosin-V is a processive actin-based motor. *Nature* 400(6744):590-593.
29. Snyder GE, Sakamoto T, Hammer JA, 3rd, Sellers JR, & Selvin PR (2004) Nanometer localization of single green fluorescent proteins: evidence that myosin V walks hand-over-hand via telemark configuration. *Biophys J* 87(3):1776-1783.
30. Wagner W, Brenowitz SD, & Hammer JA, 3rd (2011) Myosin-Va transports the endoplasmic reticulum into the dendritic spines of Purkinje neurons. *Nat Cell Biol* 13(1):40-48.
31. Volpicelli LA, Lah JJ, Fang G, Goldenring JR, & Levey AI (2002) Rab11a and myosin Vb regulate recycling of the M4 muscarinic acetylcholine receptor. *J Neurosci* 22(22):9776-9784.
32. Takagi Y, *et al.* (2008) Human myosin Vc is a low duty ratio, nonprocessive molecular motor. *J Biol Chem* 283(13):8527-8537.
33. Watanabe S, *et al.* (2008) Human myosin Vc is a low duty ratio nonprocessive motor. *J Biol Chem* 283(16):10581-10592.
34. De La Cruz EM, Sweeney HL, & Ostap EM (2000) ADP inhibition of myosin V ATPase activity. *Biophys J* 79(3):1524-1529.
35. Nascimento AA, Cheney RE, Tauhata SB, Larson RE, & Mooseker MS (1996) Enzymatic characterization and functional domain mapping of brain myosin-V. *J Biol Chem* 271(29):17561-17569.
36. Trybus KM, Kremntsova E, & Freyzon Y (1999) Kinetic characterization of a monomeric unconventional myosin V construct. *J Biol Chem* 274(39):27448-27456.
37. Watanabe S, Mabuchi K, Ikebe R, & Ikebe M (2006) Mechanoenzymatic characterization of human myosin Vb. *Biochemistry* 45(8):2729-2738.
38. Yengo CM, De la Cruz EM, Safer D, Ostap EM, & Sweeney HL (2002) Kinetic characterization of the weak binding states of myosin V. *Biochemistry* 41(26):8508-8517.
39. Yengo CM & Sweeney HL (2004) Functional role of loop 2 in myosin V. *Biochemistry* 43(9):2605-2612.
40. De La Cruz EM, Ostap EM, & Sweeney HL (2001) Kinetic mechanism and regulation of myosin VI. *J Biol Chem* 276(34):32373-32381.
41. De La Cruz EM, Wells AL, Rosenfeld SS, Ostap EM, & Sweeney HL (1999) The kinetic mechanism of myosin V. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(24):13726-13731.

42. Yildiz A, *et al.* (2003) Myosin V walks hand-over-hand: single fluorophore imaging with 1.5-nm localization. *Science* 300(5628):2061-2065.
43. Wagner W & Hammer JA, 3rd (2003) Myosin V and the endoplasmic reticulum: the connection grows. *J Cell Biol* 163(6):1193-1196.
44. Molloy JE & Veigel C (2003) Biophysics. Myosin motors walk the walk. *Science* 300(5628):2045-2046.
45. Sakamoto T, Webb MR, Forgacs E, White HD, & Sellers JR (2008) Direct observation of the mechanochemical coupling in myosin Va during processive movement. *Nature* 455(7209):128-132.
46. Kühne W (1864) Untersuchungen über das Protoplasma und die Contractilität. *Verlag von Wilhelm Engelmann, Leipzig*.
47. Straub FB (1943) Actin. *Univ. Szeged*.
48. Banga I, Erdos, T., Gerendas, M., Mommaerts, W. F. H. M., Straub, F. B., and SZENT-GYORGYI, A. (1942) Studies from the Institute of Medical Chemistry, University Szeged.
49. Biro NA & Szent-Gyorgyi AE (1949) The effect of actin and physico-chemical changes on the myosin ATP-ase system, and on washed muscle. *Hung Acta Physiol* 2(1-4):120-133.
50. Szent-Gyorgyi AG (1953) Meromyosins, the subunits of myosin. *Arch Biochem Biophys* 42(2):305-320.
51. Margossian SS & Lowey S (1973) Substructure of the myosin molecule. 3. Preparation of single-headed derivatives of myosin. *J Mol Biol* 74(3):301-311.
52. Margossian SS & Lowey S (1973) Substructure of the myosin molecule. IV. Interactions of myosin and its subfragments with adenosine triphosphate and F-actin. *J Mol Biol* 74(3):313-330.
53. Huxley AF & Niedergerke R (1954) Structural changes in muscle during contraction; interference microscopy of living muscle fibres. *Nature* 173(4412):971-973.
54. Huxley H & Hanson J (1954) Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. *Nature* 173(4412):973-976.
55. Huxley HE (1969) The mechanism of muscular contraction. *Science* 164(3886):1356-1365.
56. Huxley AF & Simmons RM (1971) Proposed mechanism of force generation in striated muscle. *Nature* 233(5321):533-538.
57. Lynn RW & Taylor EW (1970) Transient state phosphate production in the hydrolysis of nucleoside triphosphates by myosin. *Biochemistry* 9(15):2975-2983.
58. Taylor EW, Lynn RW, & Moll G (1970) Myosin-product complex and its effect on the steady-state rate of nucleoside triphosphate hydrolysis. *Biochemistry* 9(15):2984-2991.
59. Szent-Gyorgyi AG (2004) The early history of the biochemistry of muscle contraction. *J Gen Physiol* 123(6):631-641.
60. Bagshaw CR & Trentham DR (1973) The reversibility of adenosine triphosphate cleavage by myosin. *Biochem J* 133(2):323-328.
61. Bagshaw CR, *et al.* (1974) The magnesium ion-dependent adenosine triphosphatase of myosin. Two-step processes of adenosine triphosphate association and adenosine diphosphate dissociation. *Biochem J* 141(2):351-364.
62. Bagshaw CR & Trentham DR (1974) The characterization of myosin-product complexes and of product-release steps during the magnesium ion-dependent adenosine triphosphatase reaction. *Biochem J* 141(2):331-349.

63. Cooke R (1986) The mechanism of muscle contraction. *CRC Crit Rev Biochem* 21(1):53-118.
64. Fisher AJ, *et al.* (1995) X-ray structures of the myosin motor domain of Dictyostelium discoideum complexed with MgADP.BeFx and MgADP.AIF₄. *Biochemistry* 34(28):8960-8972.
65. Smith CA & Rayment I (1996) X-ray structure of the magnesium(II).ADP.vanadate complex of the Dictyostelium discoideum myosin motor domain to 1.9 Å resolution. *Biochemistry* 35(17):5404-5417.
66. Schroder RR, *et al.* (1993) Three-dimensional atomic model of F-actin decorated with Dictyostelium myosin S1. *Nature* 364(6433):171-174.
67. Uyeda TQ, Abramson PD, & Spudich JA (1996) The neck region of the myosin motor domain acts as a lever arm to generate movement. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(9):4459-4464.
68. Warsaw DM, *et al.* (2000) The light chain binding domain of expressed smooth muscle heavy meromyosin acts as a mechanical lever. *J Biol Chem* 275(47):37167-37172.
69. Balint M, Sreter FA, Wolf I, Nagy B, & Gergely J (1975) The substructure of heavy meromyosin. The effect of Ca²⁺ and Mg²⁺ on the tryptic fragmentation of heavy meromyosin. *J Biol Chem* 250(15):6168-6177.
70. Rayment I, *et al.* (1993) Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor. *Science* 261(5117):50-58.
71. Rayment I, *et al.* (1993) Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. *Science* 261(5117):58-65.
72. Volkman N, *et al.* (2000) Evidence for cleft closure in actomyosin upon ADP release. *Nat Struct Biol* 7(12):1147-1155.
73. Yengo CM, Chrin L, Rovner AS, & Berger CL (1999) Intrinsic tryptophan fluorescence identifies specific conformational changes at the actomyosin interface upon actin binding and ADP release. *Biochemistry* 38(44):14515-14523.
74. Malnasi-Csizmadia A & Kovacs M (2010) Emerging complex pathways of the actomyosin powerstroke. *Trends Biochem Sci* 35(12):684-690.
75. Yang Y, *et al.* (2007) Rigor-like structures from muscle myosins reveal key mechanical elements in the transduction pathways of this allosteric motor. *Structure* 15(5):553-564.
76. Kintsés B, *et al.* (2007) Reversible movement of switch 1 loop of myosin determines actin interaction. *Embo J* 26(1):265-274.
77. Holmes KC, Angert I, Kull FJ, Jahn W, & Schroder RR (2003) Electron cryo-microscopy shows how strong binding of myosin to actin releases nucleotide. *Nature* 425(6956):423-427.
78. Malnasi-Csizmadia A, *et al.* (2001) Kinetic resolution of a conformational transition and the ATP hydrolysis step using relaxation methods with a Dictyostelium myosin II mutant containing a single tryptophan residue. *Biochemistry* 40(42):12727-12737.
79. Malnasi-Csizmadia A, Dickens JL, Zeng W, & Bagshaw CR (2005) Switch movements and the myosin crossbridge stroke. *J Muscle Res Cell Motil* 26(1):31-37.
80. Malnasi-Csizmadia A, Woolley RJ, & Bagshaw CR (2000) Resolution of conformational states of Dictyostelium myosin II motor domain using tryptophan (W501) mutants: implications for the open-closed transition identified by crystallography. *Biochemistry* 39(51):16135-16146.

81. Vandekerckhove J & Weber K (1978) At least six different actins are expressed in a higher mammal: an analysis based on the amino acid sequence of the amino-terminal tryptic peptide. *J Mol Biol* 126(4):783-802.
82. Khaitlina SY (2001) Functional specificity of actin isoforms. *Int Rev Cytol* 202:35-98.
83. Kabsch W, Mannherz HG, Suck D, Pai EF, & Holmes KC (1990) Atomic structure of the actin:DNase I complex. *Nature* 347(6288):37-44.
84. Holmes KC, Popp D, Gebhard W, & Kabsch W (1990) Atomic model of the actin filament. *Nature* 347(6288):44-49.
85. Oda T, Iwasa M, Aihara T, Maeda Y, & Narita A (2009) The nature of the globular- to fibrous-actin transition. *Nature* 457(7228):441-445.
86. Holmes KC, Schroder RR, Sweeney HL, & Houdusse A (2004) The structure of the rigor complex and its implications for the power stroke. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 359(1452):1819-1828.
87. Sweeney HL & Houdusse A (2004) The motor mechanism of myosin V: insights for muscle contraction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 359(1452):1829-1841.
88. Coureux PD, *et al.* (2003) A structural state of the myosin V motor without bound nucleotide. *Nature* 425(6956):419-423.
89. Houdusse A, Szent-Gyorgyi AG, & Cohen C (2000) Three conformational states of scallop myosin S1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(21):11238-11243.
90. Varkuti BH, *et al.* (2012) A novel actin binding site of myosin required for effective muscle contraction. *Nat Struct Mol Biol* 19(3):299-306.
91. Sun M, Rose MB, Ananthanarayanan SK, Jacobs DJ, & Yengo CM (2008) Characterization of the pre-force-generation state in the actomyosin cross-bridge cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(25):8631-8636.
92. Joel PB, Sweeney HL, & Trybus KM (2003) Addition of lysines to the 50/20 kDa junction of myosin strengthens weak binding to actin without affecting the maximum ATPase activity. *Biochemistry* 42(30):9160-9166.
93. Joel PB, Trybus KM, & Sweeney HL (2001) Two conserved lysines at the 50/20-kDa junction of myosin are necessary for triggering actin activation. *J Biol Chem* 276(5):2998-3003.
94. Onishi H, Mikhailenko SV, & Morales MF (2006) Toward understanding actin activation of myosin ATPase: the role of myosin surface loops. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(16):6136-6141.
95. Veigel C, Wang F, Bartoo ML, Sellers JR, & Molloy JE (2002) The gated gait of the processive molecular motor, myosin V. *Nat Cell Biol* 4(1):59-65.
96. Bauer CB, Holden HM, Thoden JB, Smith R, & Rayment I (2000) X-ray structures of the apo and MgATP-bound states of Dictyostelium discoideum myosin motor domain. *J Biol Chem* 275(49):38494-38499.
97. Gyimesi M, *et al.* (2008) The mechanism of the reverse recovery step, phosphate release, and actin activation of Dictyostelium myosin II. *J Biol Chem* 283(13):8153-8163.
98. Kovacs M (2010) MTA Doktori Értekezés: Motorenzimek működésének sokfélesége. Budapest.
99. Rosenfeld SS, Xing J, Chen LQ, & Sweeney HL (2003) Myosin IIb is unconventionally conventional. *J Biol Chem* 278(30):27449-27455.
100. Rhee AY, Ogut O, & Brozovich FV (2006) Nonmuscle myosin, force maintenance, and the tonic contractile phenotype in smooth muscle. *Pflugers Arch* 452(6):766-774.
101. Conti MA & Adelstein RS (2008) Nonmuscle myosin II moves in new directions. *J Cell Sci* 121(Pt 1):11-18.

102. Rosenfeld SS, Houdusse A, & Sweeney HL (2005) Magnesium regulates ADP dissociation from myosin V. *J Biol Chem* 280(7):6072-6079.
103. Veigel C, Schmitz S, Wang F, & Sellers JR (2005) Load-dependent kinetics of myosin-V can explain its high processivity. *Nat Cell Biol* 7(9):861-869.
104. Gyimesi M, Sarlos K, Derenyi I, & Kovacs M (2010) Streamlined determination of processive run length and mechanochemical coupling of nucleic acid motor activities. *Nucleic Acids Res* 38(7):e102.
105. Sakamoto T, *et al.* (2003) Neck length and processivity of myosin V. *J Biol Chem* 278(31):29201-29207.
106. Cheney RE & Mooseker MS (1992) Unconventional myosins. *Curr Opin Cell Biol* 4(1):27-35.
107. Ali MY, *et al.* (2011) Myosin Va and myosin VI coordinate their steps while engaged in an in vitro tug of war during cargo transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(34):E535-541.
108. Alper J & Howard J (2011) Hybrid four-headed myosin motor engineered with antagonistic motor domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(38):15663-15664.
109. Kovacs M, Thirumurugan K, Knight PJ, & Sellers JR (2007) Load-dependent mechanism of nonmuscle myosin 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(24):9994-9999.
110. Wylie SR & Chantler PD (2001) Separate but linked functions of conventional myosins modulate adhesion and neurite outgrowth. *Nat Cell Biol* 3(1):88-92.
111. Morano I, *et al.* (2000) Smooth-muscle contraction without smooth-muscle myosin. *Nat Cell Biol* 2(6):371-375.
112. Craig EM & Linke H (2009) Mechanochemical model for myosin V. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(43):18261-18266.
113. Rosenfeld SS & Sweeney HL (2004) A model of myosin V processivity. *J Biol Chem* 279(38):40100-40111.
114. Baboolal TG, *et al.* (2009) The SAH domain extends the functional length of the myosin lever. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(52):22193-22198.
115. Sweeney HL, *et al.* (2007) How myosin VI coordinates its heads during processive movement. *EMBO J* 26(11):2682-2692.
116. Mesentean S, Koppole S, Smith JC, & Fischer S (2007) The principal motions involved in the coupling mechanism of the recovery stroke of the myosin motor. *J Mol Biol* 367(2):591-602.
117. Lynn RW & Taylor EW (1971) Mechanism of adenosine triphosphate hydrolysis by actomyosin. *Biochemistry* 10(25):4617-4624.
118. Malnasi-Csizmadia A, *et al.* (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(24):17658-17664.
119. Coureux PD, Sweeney HL, & Houdusse A (2004) Three myosin V structures delineate essential features of chemo-mechanical transduction. *Embo J* 23(23):4527-4537.
120. Ovchinnikov V, Trout BL, & Karplus M (Mechanical coupling in myosin V: a simulation study. *J Mol Biol* 395(4):815-833.
121. Cecchini M, Houdusse A, & Karplus M (2008) Allosteric communication in myosin V: from small conformational changes to large directed movements. *PLoS Comput Biol* 4(8):e1000129.
122. Caremani M, Dantzig J, Goldman YE, Lombardi V, & Linari M (2008) Effect of inorganic phosphate on the force and number of myosin cross-bridges during the isometric contraction of permeabilized muscle fibers from rabbit psoas. *Biophys J* 95(12):5798-5808.

123. Takacs B, *et al.* (2010) Myosin complexed with ADP and blebbistatin reversibly adopts a conformation resembling the start point of the working stroke. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(15):6799-6804.
124. Jacobs DJ, Trivedi D, David C, & Yengo CM (2011) Kinetics and thermodynamics of the rate-limiting conformational change in the actomyosin V mechanochemical cycle. *J Mol Biol* 407(5):716-730.
125. Veigel C, Molloy JE, Schmitz S, & Kendrick-Jones J (2003) Load-dependent kinetics of force production by smooth muscle myosin measured with optical tweezers. *Nat Cell Biol* 5(11):980-986.
126. Sellers JR & Veigel C (2010) Direct observation of the myosin-Va power stroke and its reversal. *Nat Struct Mol Biol* 17(5):590-595.
127. Kodera N, Yamamoto D, Ishikawa R, & Ando T (2010) Video imaging of walking myosin V by high-speed atomic force microscopy. *Nature* 468(7320):72-76.
128. Reubold TF, Eschenburg S, Becker A, Kull FJ, & Manstein DJ (2003) A structural model for actin-induced nucleotide release in myosin. *Nat Struct Biol* 10(10):826-830.
129. Houdusse A, Kalabokis VN, Himmel D, Szent-Gyorgyi AG, & Cohen C (1999) Atomic structure of scallop myosin subfragment S1 complexed with MgADP: a novel conformation of the myosin head. *Cell* 97(4):459-470.
130. Kollmar M, Durrwang U, Kliche W, Manstein DJ, & Kull FJ (2002) Crystal structure of the motor domain of a class-I myosin. *Embo J* 21(11):2517-2525.
131. Furch M, Fujita-Becker S, Geeves MA, Holmes KC, & Manstein DJ (1999) Role of the salt-bridge between switch-1 and switch-2 of Dictyostelium myosin. *J Mol Biol* 290(3):797-809.
132. Yount RG, Lawson D, & Rayment I (1995) Is myosin a "back door" enzyme? *Biophys J* 68(4 Suppl):44S-47S; discussion 47S-49S.
133. Sun M, *et al.* (2006) Dynamics of the upper 50-kDa domain of myosin V examined with fluorescence resonance energy transfer. *J Biol Chem* 281(9):5711-5717.
134. Hannemann DE, Cao W, Olivares AO, Robblee JP, & De La Cruz EM (2005) Magnesium, ADP, and actin binding linkage of myosin V: evidence for multiple myosin V-ADP and actomyosin V-ADP states. *Biochemistry* 44(24):8826-8840.
135. Burgess S, *et al.* (2002) The prepower stroke conformation of myosin V. *J Cell Biol* 159(6):983-991.
136. Walker ML, *et al.* (2000) Two-headed binding of a processive myosin to F-actin. *Nature* 405(6788):804-807.
137. Dunn AR & Spudich JA (2007) Dynamics of the unbound head during myosin V processive translocation. *Nat Struct Mol Biol* 14(3):246-248.
138. Spudich JA & Watt S (1971) The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin. *J Biol Chem* 246(15):4866-4871.
139. Cooper JA, Walker SB, & Pollard TD (1983) Pyrene actin: documentation of the validity of a sensitive assay for actin polymerization. *J Muscle Res Cell Motil* 4(2):253-262.
140. Hirshberg M, *et al.* (1998) Crystal structure of phosphate binding protein labeled with a coumarin fluorophore, a probe for inorganic phosphate. *Biochemistry* 37(29):10381-10385.
141. Brune M, Hunter JL, Corrie JE, & Webb MR (1994) Direct, real-time measurement of rapid inorganic phosphate release using a novel fluorescent probe and its application to actomyosin subfragment 1 ATPase. *Biochemistry* 33(27):8262-8271.

142. Wang F, *et al.* (2003) Kinetic mechanism of non-muscle myosin IIB: functional adaptations for tension generation and maintenance. *J Biol Chem* 278(30):27439-27448.
143. Kovacs M, Toth J, Hetenyi C, Malnasi-Csizmadia A, & Sellers JR (2004) Mechanism of blebbistatin inhibition of myosin II. *J Biol Chem* 279(34):35557-35563.
144. Brune M, *et al.* (1998) Mechanism of inorganic phosphate interaction with phosphate binding protein from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 37(29):10370-10380.
145. Gyimesi M, Sarlos K, & Kovacs M (2010) Processive translocation mechanism of the human Bloom's syndrome helicase along single-stranded DNA. *Nucleic Acids Res* 38(13):4404-4414.
146. Sakamoto T, Yildez A, Selvin PR, & Sellers JR (2005) Step-size is determined by neck length in myosin V. *Biochemistry* 44(49):16203-16210.
147. Wang J, Cieplak P, & Kollman PA (2000) How well does a restrained electrostatic potential (resp) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules. *J. Comput. Chem.* 21(1049).
148. Dewar MJS, Zebisch EG, Healy EF, & Stewart JJP (1985) AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model. *J. Am. Chem. Soc.* 107(3902).
149. Kull FJ, Vale RD, & Fletterick RJ (1998) The case for a common ancestor: kinesin and myosin motor proteins and G proteins. *J Muscle Res Cell Motil* 19(8):877-886.
150. Vale RD (1996) Switches, latches, and amplifiers: common themes of G proteins and molecular motors. *J Cell Biol* 135(2):291-302.
151. Bourne HR, Sanders DA, & McCormick F (1991) The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 349(6305):117-127.
152. Malnasi-Csizmadia A, Kovacs M, Woolley RJ, Botchway SW, & Bagshaw CR (2001) The dynamics of the relay loop tryptophan residue in the Dictyostelium myosin motor domain and the origin of spectroscopic signals. *J Biol Chem* 276(22):19483-19490.
153. White HD, Belknap B, & Webb MR (1997) Kinetics of nucleoside triphosphate cleavage and phosphate release steps by associated rabbit skeletal actomyosin, measured using a novel fluorescent probe for phosphate. *Biochemistry* 36(39):11828-11836.
154. Nagy NT, *et al.* (2010) Functional adaptation of the switch-2 nucleotide sensor enables rapid processive translocation by myosin-5. *FASEB J* 24(11):4480-4490.
155. Sasaki N, Shimada T, & Sutoh K (1998) Mutational analysis of the switch II loop of Dictyostelium myosin II. *J Biol Chem* 273(32):20334-20340.
156. Konrad M & Goody RS (1982) Kinetic and thermodynamic properties of the ternary complex between F-actin, myosin subfragment 1 and adenosine 5'-[beta, gamma-imido]triphosphate. *Eur J Biochem* 128(2-3):547-555.
157. Takacs B, *et al.* (2011) Myosin cleft closure determines the energetics of the actomyosin interaction. *Faseb J* 25(1):111-121.
158. Taylor EW (1991) Kinetic studies on the association and dissociation of myosin subfragment 1 and actin. *J Biol Chem* 266(1):294-302.
159. Geeves MA & Jeffries TE (1988) The effect of nucleotide upon a specific isomerization of actomyosin subfragment I. *Biochem J* 256(1):41-46.
160. Reck-Peterson SL, Tyska MJ, Novick PJ, & Mooseker MS (2001) The yeast class V myosins, Myo2p and Myo4p, are nonprocessive actin-based motors. *J Cell Biol* 153(5):1121-1126.
161. Rock RS, *et al.* (2001) Myosin VI is a processive motor with a large step size. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(24):13655-13659.

162. Yang Y, *et al.* (2006) Dimerized *Drosophila* myosin VIIa: a processive motor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(15):5746-5751.
163. Durrwang U, *et al.* (2006) Dictyostelium myosin-IE is a fast molecular motor involved in phagocytosis. *J Cell Sci* 119(Pt 3):550-558.
164. Fujita-Becker S, *et al.* (2005) Changes in Mg²⁺ ion concentration and heavy chain phosphorylation regulate the motor activity of a class I myosin. *J Biol Chem* 280(7):6064-6071.
165. Tsiavaliaris G, *et al.* (2008) Mechanism, regulation, and functional properties of Dictyostelium myosin-1B. *J Biol Chem* 283(8):4520-4527.
166. Urbanke C & Wray J (2001) A fluorescence temperature-jump study of conformational transitions in myosin subfragment 1. *Biochem J* 358(Pt 1):165-173.
167. Murphy CT, Rock RS, & Spudich JA (2001) A myosin II mutation uncouples ATPase activity from motility and shortens step size. *Nat Cell Biol* 3(3):311-315.
168. Espindola FS, *et al.* (2000) 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* 47(4):269-281.
169. De La Cruz EM, Wells AL, Sweeney HL, & Ostap EM (2000) Actin and light chain isoform dependence of myosin V kinetics. *Biochemistry* 39(46):14196-14202.
170. Trivedi DV, David C, Jacobs DJ, & Yengo CM (2012) Switch II mutants reveal coupling between the nucleotide- and actin-binding regions in myosin V. *Biophys J* 102(11):2545-2555.
171. Geeves MA, Perreault-Micale C, & Coluccio LM (2000) Kinetic analyses of a truncated mammalian myosin I suggest a novel isomerization event preceding nucleotide binding. *J Biol Chem* 275(28):21624-21630.
172. Jontes JD, Milligan RA, Pollard TD, & Ostap EM (1997) Kinetic characterization of brush border myosin-I ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(26):14332-14337.
173. Yang Y, Kovacs M, Xu Q, Anderson JB, & Sellers JR (2005) Myosin VIIb from *Drosophila* is a high duty ratio motor. *J Biol Chem* 280(37):32061-32068.
174. Bing W, Knott A, & Marston SB (2000) A simple method for measuring the relative force exerted by myosin on actin filaments in the in vitro motility assay: evidence that tropomyosin and troponin increase force in single thin filaments. *Biochem J* 350 Pt 3:693-699.
175. Greenberg MJ & Moore JR (2010) The molecular basis of frictional loads in the in vitro motility assay with applications to the study of the loaded mechanochemistry of molecular motors. *Cytoskeleton (Hoboken)* 67(5):273-285.
176. Warshaw DM, Desrosiers JM, Work SS, & Trybus KM (1990) Smooth muscle myosin cross-bridge interactions modulate actin filament sliding velocity in vitro. *J Cell Biol* 111(2):453-463.
177. Forgacs E, *et al.* (2009) Switch I mutation S217A converts myosin V into a low duty ratio motor. *J Biol Chem* 284(4):2138-2149.
178. Thomas C, Fricke I, Scrima A, Berken A, & Wittinghofer A (2007) Structural evidence for a common intermediate in small G protein-GEF reactions. *Mol Cell* 25(1):141-149.