

**KÉTSZÁLÚ ÉS EGYSZÁLÚ ALFA-HELIKÁLIS
SZERKEZETI ELEMÉK VIZSGÁLATA, KÜLÖNÖS
TEKINTETTEL KÜLÖNBÖZŐ MIOZIN FAROK
DOMÉNEKRE**

Doktori (Ph.D.) értekezés
Süveges Dániel

Eötvös Loránd Tudományegyetem Biológia Doktori Iskola

Doktori Iskola vezetője: Dr. Erdei Anna

Szerkezeti Biokémia Doktori Program

Programvezető: Dr. Gráf László



Témavezető: Dr. Nyitrai László

Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar Biológiai Intézet

Biokémiai Tanszék

Budapest, 2011

Összefoglalás

A miozinok az aktin filamentum mentén mozgó molekuláris motorok, melyek az eukarióta sejt szinte valamennyi mozgással járó életjelenségében szerepet játszanak az endocitózistól, és az organelum transzporttól kezdve, mindenféle izomkontrakción keresztül, az exocitózisig. Ez a funkcionális sokféleség a miozin-szuperfamilia mintegy 35 családjának változatos szerkezetű fark régiójának köszönhető. Dolgozatomban a 2-es osztályba tartozó konvencionális, és a 6-os osztályba tartozó nem-konvencionális miozin fark régiójának kutatása során elért eredményeket ismertem.

Munkám során a konvencionális miozin rúd domén proximális fragmentumának szerkezetét, stabilitását vizsgáltam cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia és differenciális pásztázó kalorimetria (DSC) segítségével. Különböző miozin izotípusból származó fragmentumok vizsgálatával kimutattuk, hogy a proximális rúd stabilitása korrelál a miozin szabályozásával: az úgynevezett regulált miozinok esetén kisebb stabilitást tapasztalunk, ami azzal magyarázható, hogy részt vesz a szabályozás hatására bekövetkező szerkezetváltozásában. A kagyló vázizom miozin proximális rúd fragmentumának, általunk meghatározott atomi szintű szerkezete ugyancsak alátámasztja a biofizikai mérésekből levont következtetéseket.

Bizonyítottuk, hogy a 6-os osztályba tartozó nem-konvencionális miozin *coiled coil*-nak feltételezett mediális fark régiója, mely különleges, négy negatív és négy pozitív aminosavas ismétlődést tartalmaz, a predikciókkal ellentétben nem kétszálú, hanem egyszálú α -hélixet képez, és a neki tulajdonított dimerizációs szerepet nem sikerült kimutatni. Az általunk kifejlesztett, két, elviekben különböző predikciós programmal további több tucat fehérjében találtuk meg ezt a nagy töltéssűrűséggel rendelkező szekvenciamotívumot, és bizonyítottuk, hogy a töltések kedvező eloszlása révén stabil egyszálú α -hélixet (CSAH – charged single α -helix) képeznek. A predikciós programokat egy weboldalon elérhetővé tettük az érdeklődő kutatók számára, így *online* bárki ellenőrizheti a CSAH motívum előfordulását az általa vizsgált fehérje szekvenciájában.

Különböző fehérjékből származó CSAH fragmentumokkal végzett molekuladinamikai szimulációkból származó trajektóriákat felhasználva, az általunk fejlesztett programokkal, meghatároztuk a polimerszál mechanikai paramétereit (perzisztenciahossz, Young modulus), melyek tanúsága szerint a CSAH szerkezetek kellő stabilitással rendelkeznek a nekik tulajdonított távtartó és erőkar szerep betöltésére.

Summary

Myosins are actin-based motor proteins known to play fundamental roles in many forms of eukaryotic motility such as muscle contraction, organelle transport, endo- and exocytosis. The functional diversity of the 35 myosin classes arose mostly from the highly variable domain composition of the tail region. Present work summarizes our research on the tail domain of the conventional myosin-2 and the unconventional myosin-6.

We have investigated the structure and the structural stability of the proximal tail domain of the conventional myosin with circular dichroism (CD) spectroscopy, and differential scanning calorimetry (DSC). Comparing the stability of this domain from different functional types of conventional myosins revealed that the stability correlates with the regulation of the molecule. Regulated myosins that undergo a large scale structural rearrangement upon regulation have a less stable proximal tail, possibly because proximal fragment of the tail domain unfolds in the off state.

Our experiments show that the medial tail of myosin 6, which has a characteristic charge pattern (repeats of four positively and four negatively charged residues), in spite of the predicted coiled coil, forms a stable α -helix in aqueous environment. Furthermore its predicted dimeric nature was unobservable by any methods we have applied. Our two conceptually different, in-house developed prediction programs, have found dozens of proteins with the above mentioned charged pattern. Some of the hits were experimentally tested, verifying the predictions in that the favorable arrangement of the opposite charges stabilizes the helical structure of CSAHs (charged single α -helix). We made both prediction programs available on the internet, so any interested researcher can test whether his/her protein of interest contains a CSAH motif or not.

We used the trajectories of the molecular dynamics simulation of selected CSAH segments were used to compute the persistence length and the Young's modulus of the structure. These mechanical parameters of the CSAH polymer have shown enough rigidity to fulfill the requirements of the proposed mechanical roles as molecular spacer and lever arm.

Tartalomjegyzék

Összefoglalás.....	2
Summary	3
Tartalomjegyzék.....	4
1. Bevezető	6
1.1. Miozinok: egy változatos funkcióval bíró diverz enzimes család.....	6
1.2. A 2-es osztályba tartozó, konvencionális miozinok szerkezete, működése, szabályozása	9
1.3. Az α -helikális <i>coiled coil</i> : univerzális dimerizációs motívum.....	14
1.4. A 6-os osztályba tartozó miozin különleges szerkezete és funkciója	15
1.5. Magányos α -helikális elemek fehérjékben.	18
2. célkitűzések	20
2.1. A proximális S2 fragmentum szerepe a konvencionális miozinok szabályozásában	20
2.2. A miozin 6 mediális rúd doménjének szerkezetvizsgálata	20
2.3. CSAH motívumok keresése a proteomban.....	21
2.4. A CSAH szekvenciák szerepe fehérjékben	21
2.5. CSAH szerkezetek stabilitásának vizsgálata <i>in silico</i> módszerekkel.....	21
3. Anyagok, módszerek	22
3.1. Rekombináns konstrukciók előállítása	22
3.2. Fehérjék expressziója, tisztítása	22
3.2.1. A pET rendszer – heterológ expresszió <i>E. coli</i> gazdasejtben	22
3.2.2. Nikkel affinitás kromatográfia	24
3.2.3. Ioncserés kromatográfia.....	25
3.2.4. Reverz fázisú HPLC.....	25
3.3. Cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópiás mérések	26
3.4. Differenciális pásztázó kalorimetria (DSC)	28
3.5. Kémiai keresztkötés.....	28
3.6. Fluoreszcens jelölés	29
3.7. Fluoreszcencia vizsgálat	29
3.8. CSAH motívumok predikciója	29
3.8.1. <i>scan4charge</i>	30
3.8.2. <i>ft_charge</i>	31
3.9. Molekuladinamikai (MD) szimulációk	33
3.9.1. A szimulációk eredményeinek kiértékelése	33
3.9.2. Mechanikai paraméterek meghatározása.....	34

3.9.3.	A szálelhajlason alapuló perzisztenciahossz meghatározás	36
3.9.4.	Az irányvektorok elhajlása alapján történő L_p meghatározás	38
3.9.5.	A hosszanti rugalmasság meghatározása	39
4.	Eredmények	41
4.1.	Miozin II S2 szerkezetvizsgálata	41
4.1.1.	CD spektroszkópiás, és DSC mérések	41
4.1.2.	Az S2 fragmentum atomi szintű szerkezete	44
4.2.	CSAH szekvenciák keresése a proteomban	48
4.2.1.	A predikciók eredménye	48
4.2.2.	CSAH tartalmú fehérjék a proteomban	49
4.2.3.	Különböző predikációs módszerek egymásnak ellentmondó ítéletei	52
4.2.4.	A predikciók kísérletes ellenőrzése	54
4.3.	CSAH, mint dimerizációs motívum?	58
4.4.	Molekuladinamikai szimulációk eredményei	63
4.4.1.	Mechanikai paraméterek meghatározása	64
4.4.2.	Perzisztenciahossz számolása szálelhajlós módszerrel:	65
4.4.3.	Perzisztenciahossz számolása irányvektoros módszerrel:	67
4.4.4.	A hosszirányú rugalmasság meghatározása	68
5.	Eredmények összefoglalása	71
6.	Köszönetnyilvánítás	73
7.	Publikációs lista	74
7.1.	A doktori dolgozat témájában megjelent közlemények	74
7.2.	Egyéb közlemények	75
8.	Hivatkozások jegyzéke	76
9.	Függelék	83

1. Bevezető

1.1. Miozinok: egy változatos funkcióval bíró diverz enzimes család

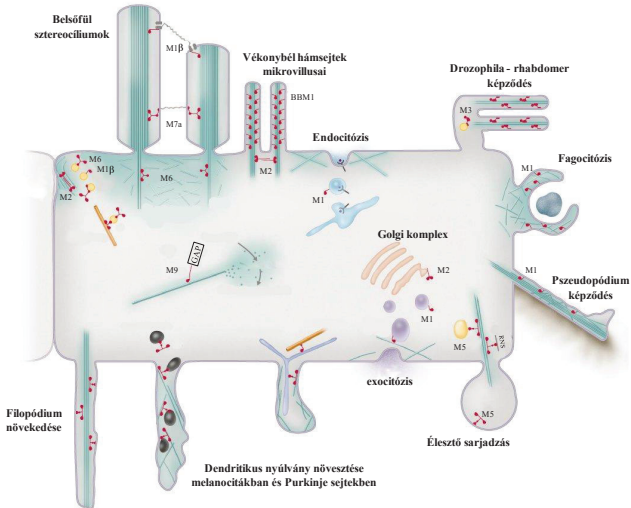
A miozinok motorfehérjék, olyan molekuláris gépezetek, melyek képesek az ATP-ben őrzött kémiai energiát mechanikai energiává alakítani. A motorfehérjék által végzett mechanikai munka biztosítja az élővilágban megfigyelhető mozgás alapját, kezdve a sejten belül történő molekulák, sejtorganellek transzportjától az egész élőlény helyzetét, helyzetét megváltoztató mozgásokig. Ezen fontos szerepük, valamint a különleges energia transzdukciós képességük miatt már régóta a kutatások középpontjában állnak. A motorfehérjék között találunk forgó és lineáris mozgást végző motorokat, utóbbiak valamilyen polimersín mentén végeznek irányított mozgást. A polimersínként nukleinsavak, vagy citoskeletális filamentumok jöhetnek szóba, molekuláris transzport, és a mozgás szempontjából fiziológiásan nyilván csak ez utóbbiak relevánsak. A sinként használt mikrotubulus mentén a kinezinek és dineinek, míg az aktin filamentum mentén a miozin család képviselői mozognak.

Mint nevük utal rá, a miozinok izomkontrakcióban betöltött szerepét ismerte meg először a tudomány, aminek feltárásában Szent-Györgyi Albert ért el úttörő eredményeket, és amivel letette a magyar izomkutatás alapjait. Az izomkontrakció mellett az eltelt évek alatt az intenzív kutatásoknak köszönhetően fény derült a többi nem-izom miozin által végzett sokrétű sejtéletfunkcióira (*1. ábra*). A miozinok kulcsmolekulái a szívizom-, vázizom-, és a simaizom kontrakciónak, emellett a nem izom sejtekben a legfontosabb funkciói a fehérjék, sejtorganellek a sejt felszínéhez közeli, rövidtávú transzportja (2-5); fehérje-RNS komplexek szállítása (6, 7); a szállításon kívül változatos mechanikai szereppel is bírnak (például a belső fül sztereocíliumainak kialakításában (8, 9)); szerepet kapnak a sejtosztódás, az exo- és endocitózis (10-14), a sejtadhézió (15), és sejt migráció során (5, 15, 16); sőt, még a olyan sejttagon belüli mozgásokban is szerepet játszik, mint a transzkripció (6). Jelentőségüket az is bizonyítja, hogy nem megfelelő működésük, mutációik hatására számos rendkívül súlyos megbetegedés alakul ki (3, 4, 8). Mindezek után nem meglepő, hogy milyen sok erőfeszítést tett és tesz a tudomány a miozinok működésének minél pontosabb megértése felé. A mai napig 326 fajból mintegy 2300 miozin szekvenciát találtak, melyek megoszlának az eddig azonosított 35 miozincsalád között.

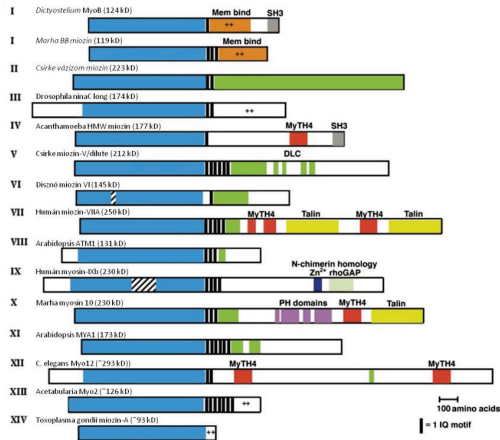
Az előbb említett diverz funkciók ellenére valamennyi mozin család szerkezete hasonló elvekre épül (2. ábra):

- A miozincsaládok túlnyomó többségének N-terminálisán található a konzervált motordomén, mely tartalmazza az aktin kötőhelyet, a nukleotid kötőhelyet, az erőgenerálást végző konverter domént. A motordomén felelős a miozinok enzimatisz aktivitásáért.
- konverter régióban keletkező mozgást a helikális szerkezetű erőkar amplifikálja, mely különböző számú úgynevezett IQ motívumot tartalmaz. Az IQ motívumok jellegzetes aminosav mintázatról kapták a nevüket ([FILV]Qxxx[RK]Gxxx[RK]xx[FILVWY]), hozzájuk kapcsolódnak a kalmodulin családba tartozó könnyűláncok (17-20). Az erőkar a könnyűláncok kötődése révén nagymértékben stabilizálódik, az így létrejövő merev szerkezetnek köszönhetően a konverter régióban bekövetkező szerkezeti változást nagy hatékonysággal tud mozgássá alakulni (18).
- A miozinok erőkart követő részét szokás farkként nevezni, ez a molekuláris rész, a motordoménell ellentétben, nagymértékű változatosságot mutat a családon belül, ennek köszönhetően tölthetik be az előbb megismert változatos funkciókat: biztosítják a sejten belüli lokalizációt, a filament szervezéséhez szükséges asszociációt, a sejten belül szállítandó partnerek kötését (21-24). Az egyes miozincsaládokra jellemző doménösszetételt a 2. ábra mutatja. A lehetséges fark felépítésében résztvevő domének között találunk tipikus fehérjeinterakciós modulokat, melyek segítenek a „fuvar szervezésében”, hogy a miozin csak azokat szállítmányokat, és oda vigyék, amit és ahova kell. De több családnál találunk a miozin nehézláncokat dimerizáló *coiled coil* motívumokat, melynek jelentősége az, hogy a motordoméneket összekötve lehetővé teszi a processzív működést (1.2-es fejezetben a processzivitás fogalmára részletesen kitérek).

Az olyan bonyolult szerkezeti felépítéssel rendelkező élőlényekben, mint például az ember, rengeteg különböző, elhatárolt sejten belüli transzportfolyamatra van szükség, ennek megfelelően, a humán genom ~ 40 miozin gént tartalmaz, melyek mintegy 12 osztályát képviselik a miozinok szupercsaládjának (25).



1. ábra. A miozinok által betöltött sokrétű funkció nem-izom sejtekben. (Mermall 1998) Az ábrán bemutatott lista távolról sem teljes, de segítségével jó képet kaphatunk a különböző sejtípusokban betöltött szerepeikről.



2. ábra. A miozinokra jellemző változatos domén összetétel. (Krendel 2005 nyomán) Jól látható, hogy míg a motordomén és az erőkar jelenléte konzervált, általánosan jellemző minden családra, a funkció specifitását meghatározó farok domén nagyfokú variabilitást mutat.

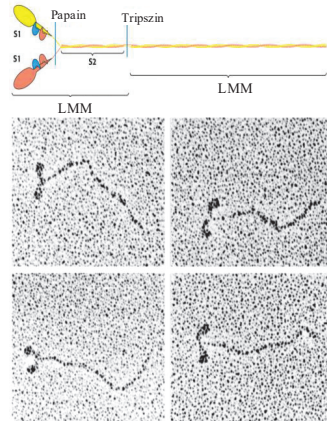
1.2.A 2-es osztályba tartozó, konvencionális miozinok szerkezete, működése, szabályozása

A 2-es osztályba tartozó miozinokat szokás konvencionális miozinoknak is nevezni, mivel hosszú ideig ezek voltak a miozinok egyetlen ismert képviselői, és közülük kerülnek ki a sima -, váz -, és szívizomokban található „izom-miozinok”. A csoport jobb megismerése fényt derített arra, hogy az izmok felépítésében résztvevő fehérjéken túl találhatóunk köztük „nem-izom miozinokat” is, melyek általános, sejten belüli funkciókat látnak el (16, 26, 27). Az emberi genomban legalább 15 konvencionális miozin gén található, melyből 9 vázizom-, 2 szívizom, egy simaizom, és 3 nem-izom miozint kódol (25). Hozzá kell azonban tenni, hogy a megjelenő fehérjék sokféleségét a szövettípusokra jellemző alternatív *splice* formák tovább növelik.

Az izom miozinok fontos, triviális funkciói mellett a nem-izom miozinok működésére, szerepére is érdemes kitérni: fontos szerepet játszanak a sejtostódással járó transzport-folyamatokban (28), a citogenezisben, excitózisban (10), fontos erőtartó szerepüknek köszönhetjük a sejtek alaktartó képességét, a membránok tenzióját.

A konvencionális miozinok jellegzetes felépítését a 3. ábra (29) mutatja. A két 170-240 kDa-os nehézláncból és a két pár könnyűláncból felépülő molekulát a karboxil terminális felé eső, hosszú *coiled coil* motívum dimerizálja. Az így létrejövő merev struktúrára utalva szokás „rúdként” hivatkozni a konvencionális miozin fark régiójára. (Bővebben lásd a *coiled coil*-t bemutató fejezetet)

A *coiled coil* mentén a konvencionális miozinok fiziológiás körülmények között, és *in vitro* alacsony ionerőn asszociálva filamentumot képeznek (30). Különböző izotípusok eltérő méretű filamentumot képeznek (4. ábra), és minél több dimer asszociációjából jön létre a filamentum, annál nagyobb erő kifejtésre lesz képes az aktomiozin rendszer: a vázizom miozinban 300-nál is több, míg a nem izom miozinban csupán 50 körüli az együttműködő fejek száma (31). A filamentum körül nagy a miozinfajok koncentrációja aminek működését

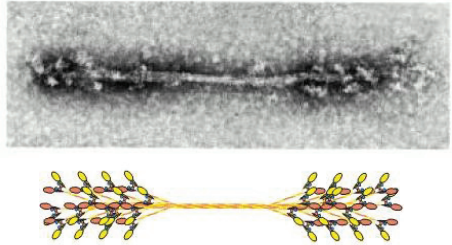


3. ábra. A konvencionális miozinok szerkezetének sematikus bemutatása LMM – könnyű meromiozin, HMM – nehéz meromiozin, S1, S2 – szubfragmentum 1- 2 (Stryer 2002, Fig. 34.3)

már nem független dimerek sokaságaként kell tekintenünk, mivel az összes miozinfej egy rendszerként viselkedik.

Ezzel elérünk a motorfehérjék egy lényeges tulajdonságához, ami közvetve megmutatja, hogy a motor milyen távolságon belül lehet hatékony szállító molekula. Ez a tulajdonság a processzivitás, mely megmutatja, hogy egy motor az aktin filamentumhoz kapcsolódva hány enzimátikus ciklus végrehajtására képes a mielőtt disszociálna a polimer sínről. A miozinok működéséből fakadóan az egyes motoregységek minden ciklusban disszociálnak az aktin felszínéről, emiatt a processzivitás megjelenéséhez minimum két motordoménből álló dimer együttműködésére van szükség. A konvencionális miozinoknál, ahol számos dimer működik egységként, nincs olyan szelektív erő, mely nyomására kialakulna együttműködés a két fej között, helyette a nagy számok törvénye alapján, mindig lesz a sokaságnak olyan tagja, ami aktin kötött állapotával megakadályozza az aktin és a miozin filamentumok disszociációját.

Azoknál a miozinoknál, ahol nem figyelhető meg filament képzés, más módon kell a disszociációt megakadályozni. A szintén *coiled coil*-al dimerizált miozin-5 két fejének működése precízen összehangolt, az egyik fej, mindenképpen aktin kötött állapotban van. Ennek köszönhetően a miozin-5 az egyik legprocesszívabb osztálya a miozinoknak (32). Azoknál a miozinoknál, ahol nincs *coiled coil* képzés, más módon, például a farokdoménhez történő partnerkötődés keresztül valósul meg a miozin fejek toborzása. Azok a miozinok, melyek funkcionális állapotban is monomerek, transzport helyett inkább mechanikai szerepet tölthetnek be.



4. ábra. A konvencionális miozinokból felépülő bipoláris filamentumok a *coiled coil* doménjeik segítségével rendezett módon aggregálódnak. (Stryer L. 2002, 35.4)

A filamentképzésből fakadó szolubilitási problémák elkerülése végett a konvencionális miozinon végzett kísérletek során többnyire nem az egész molekulát vizsgálják a kutatók, hanem a molekula proteolitikus fragmentjeit: a molekulában jelenlévő, funkció szempontjából lényeges doméneket összekötő, flexibilis linkerek proteázoknak való kitettsége alkalmassá teszi, hogy funkcionális egységekre hasíthatassuk.



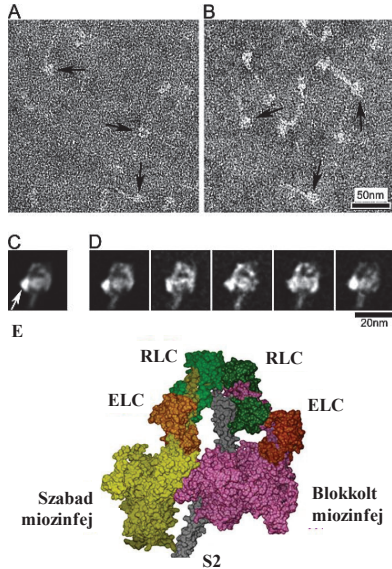
5. ábra. A különböző miozinok komplex szerkezete. A) dimer miozin-5 B) nem-izom miozin-2 minifilamentum ~50 miozinfej C) vázizom miozin > 300 miozinfej (Sarlós Kata 2009)

A filamentumot képző rész határán, az úgynevezett csukló régiójánál, ahol a molekula kihajlik a filamentumból, tripszinnel hasítva kapjuk meg a nehéz-meromiozint (HMM) és könnyű meromiozint (LMM). Az LMM megőrzi a miozinra jellemző filamentképzési hajlamot, míg a HMM tartalmazza motordomént, és a *coiled coil* egy rövidebb darabját. A HMM papinnal tovább emészthető az enzimatis aktivításra képes S1-re (subfragmentum 1), mely tartalmazza a motordomént és az erőkart, szokás miozin fejként is hivatkozni rá; a másik proteolitikus fragment a *coiled coil-t* tartalmazó S2 (subfragmentum 2). Köszönhetően annak, hogy a papain hasítóhelyek a két fej találkozásánál találhatóak, az S1 fragmentumok monomerként viselkednek (3. ábra). A kinetikai, biofizikai vizsgálatok bizonyították, hogy a HMM és az S1 számos fontos tulajdonságukban különböznek, mely arra vezethető vissza, hogy a miozin működése szempontjából rendkívül lényeges, hogy a molekula fiziológiásan dimerként funkcionál.

A konvencionális miozinok aktivitása, mint minden folyamat a sejtben, szabályozott. A működés szabályozásának szempontjából két alapvető típust különböztetünk meg: vannak regulált, és nem-regulált miozinok. Fontos megjegyezni, hogy az úgynevezett nem-regulált miozinok, mint például a gerinces vázizomban található miozin, aktivitásuk természetesen

szabályozás alatt áll, de maga a miozin konstitutívan aktív. Az izom működését a miozin aktinhoz való hozzáférhetősége révén, a Ca^{2+} szenzitív troponin-tropomiozin rendszer szabályozza (33). Ezzel ellentétben az úgynevezett regulált miozinokban az ATPáz aktivitás szabályozása a következő három mód valamelyikén, a miozin molekulához kötve zajlik:

1. Az esszenciális miozin könnyűlánc (ELC) Ca^{2+} kötése révén szabályoz: puhatestűek vázizomzatát (34, 35) aktiválja, míg a *Physarum* nyálkagomba miozint gátolja (36).
2. A gerincesek simaizom -, és nem-izom miozin regulációs könnyűlánc foszforiláció révén (37). A szabályozást egy specifikus könnyűlánc kináz (MLCK) (38) és foszfátáz (MLCP) páros végzi. Mivel nagyon kiterjedt funkciókkal bíró molekuláról van szó, nem meglepő, hogy a MLCK számos jelátviteli út által szabályozott molekula. Megjegyzendő, hogy a szarkoplazmatikus miozinok könnyűláncja is szabályozott foszforiláció révén, bár ennek csak finomhangoló szerepe van (39), és a foszforiláció károsítja a filamentum szerkezetét (40).



6. ábra. A-B) Jung 2008-as cikkében a fent látható EM képeket rögzítette a nem-izom miozin IIa-ról, C,D) az EM képek alapján azonosított konformációs osztályok, melyekhez 20-40 molekula képét átlagolták. E) Ismert miozin szerkezetek és az EM felszín felhasználásával készített model a kikapcsolt állapotról. (Blankenfeldt 2006)

3. A simaizom -,és a nem izom miozin nehézlánc fark régiója közvetlenül foszforilálódik többféle kináz által (37). A foszforiláció a filamentum képzés befolyásolásán keresztül hat a molekula működésére.

A szabályozás hatása a miozin aktivitására több szinten érvényesülhet a filamentumok szétesésétől az enzimatis aktivitás finomhangolásáig. Ugyanakkor kiemelten fontos a szabályozás hatására bekövetkező „kompaktálódással” járó nagyléptékű szerkezetváltozás: a kikapcsolt dimer miozin szedimentációs koefficiense 6 S-ről 10 S-re nő. Ezt a feltekeredett szerkezetet először simaizomban, és a nem-izom miozin esetében írták le (41-43), majd

később a nyúl- (44), és kagyló vázizomnál is (45). A nem izom miozinok valószínűleg ebben a kompakt formában szekvesztrálódnak, míg a kikapcsolt vázizom miozinoknál a filamentális szerkezet megmarad (46). E nagyléptékű átalakulások feltételezhetően a filamentum újraserveződését segítik (47).

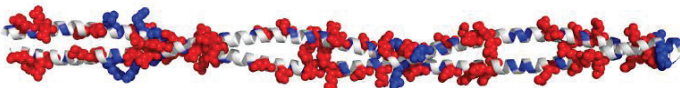
A kikapcsolt állapotú molekulák jellegzetes képet mutattak elektronmikroszkópos felvételeken: a miozinfejek visszahajolnak a rúdrész felé, és aszimmetrikus módon interakcióba lépnek a molekula S2 régiójával (48, 49). A dimert alkotó egyik fej visszahajolva megköti az S2 egy szakaszát, míg a másik fej visszahajolva nem az S2-höz, hanem a másik fejhez kapcsolódik. A feltekeredés során a 3. ábra látható hosszúkás, elnyújtott szerkezet helyett a 6. ábraán látható kompaktabb szerkezetet jön létre. Mint látható a szabályozásnak ez a módja igényli az S2 jelenlétét, így a legkisebb, még szabályozás alatt álló fragmentum a HMM. A simaizom miozin kikapcsolt szerkezetének elektronmikroszkópos vizsgálata, és a kiterjedt képanalízis arra utal, hogy a kikapcsolt állapot kialakításában a miozinfejen és az S2-n kívül résztvesz az LMM is (50). Az így kialakult szerkezettel jól korrelálnak az LMM-ben található „hibák” a *coiled coil* regiszterben (50).

A kikapcsolt állapot atomi szintű szerkezetének meghatározása nagy jelentőséggel bír a konvencionális miozin regulációjának megértésében, ötleteket adhat a szabályozott és a nem regulált miozinok működése közti különbség megértéséhez. Sajnos eddig az ez irányú erőfeszítések nem jártak sikerrel, csupán az elektronmikroszkópos módszerekkel meghatározott molekulafelületben modellezéssel elhelyezett szerkezetek vizsgálhatók (6. ábra). A komplex nagy mérete miatt, a szerkezet megoldásához mindenképpen röntgenkristallográfiás módszert kell alkalmazni, ami jó minőségű kristályokat igényel. Sajnos kristályosításhoz szükséges homogén fehérjepreparátum előállítása nehézségekbe ütközik, mert a HMM proteolitikus előállítása, a csukló régióban található számos proteáz szenzitív helynek köszönhetően heterogén mintát eredményez.

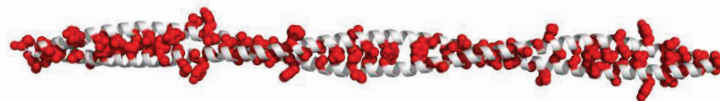
1.3. Az α -helikális *coiled coil*: univerzális dimerizációs motívum

A *coiled coil* két vagy több α -helikális szerkezetből felépülő szuperszekunder szerkezeti elem¹. Az egymás körül feltekeredő hélixeket az interakciós felszínükön található hidrofób aminosavak közti kölcsönhatás stabilizálja. Széleskörűen elterjedt motívumról van szó, becslések szerint a proteom 20%-át *coiled coil* tartalmú fehérjék alkotják. A fehérjék között a már említett miozinokon kívül *coiled coil* található a keratinban és számos fibrózus fehérjében, de a transzkripciósi faktorokon belül külön családot alkotnak a *coiled coil*-t tartalmazó b-ZIP fehérjék, melyek *coiled coil* szekvenciája lehetővé teszi heterodimerek kialakulását, ezzel megsokszorozva a lehetséges transzkripciósi faktorok számát, így téve még kifinomultabbá a génszabályozást.

A) Pozitív és negatív töltéssel rendelkező oldalláncok



A) Hidrofób oldalláncok



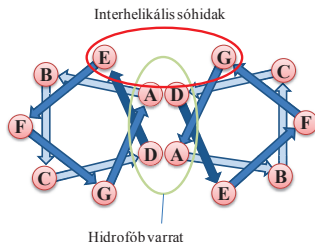
7. ábra. Egy *coiled coil* szerkezet (2EFS) atomi szintű modellje. A) a pozitívan töltött (Arg, Lys) oldalláncok a hélix ek felszínén, míg a B) hidrofób oldalláncok a két hélix interakciós felszínére összpontosulnak.

A szerkezet stabilitást az biztosítja, hogy a hélixek egyik oldalára csoportosulnak a hidrofób aminosavak (7. ábra, 8. ábra), melyek hidrofób varratként tartják össze két hélixet. Ez a hidrofób mintázat az aminosav szekvenciában is megmutatkozik: a *coiled coil* szekvenciák, jellegzetes, 7 aminosavas ismétlődéssel jellemezhetők: „HxxHCxC” (H – hidrofób, C – elektrosztatikusan töltött oldallánc). Az így kapott heptádokban a hidrofób oldalláncokon kívül gyakori elektrosztatikusan töltött oldalláncok között intra-, és interhelikális stabilizáló interakciók is kialakulnak (8. ábra).

¹ Felfedezéséről érdemes egy mondatban megemlékezni: a *coiled coil* szerkezet létét egy évvel az α -helikális modell megalkotása után, csekély kísérletes adatra támaszkodva, elméleti megfontolás alapján javasolta Francis Crick (Crick, F.H.C. (1952). *Nature* 170 (4334): 882–883).

A heptádok jól karakterizálható aminosav mintázatának köszönhetően a *coiled coil*-ok régóta kedvelt „kísérleti nyulai” a biofizikának és a szerkezeti bioinformatikának, ugyanis egyszerű-ségüknek köszönhetően remekül lehet fehérje *folding* és stabilitás vizsgálatokra használni.

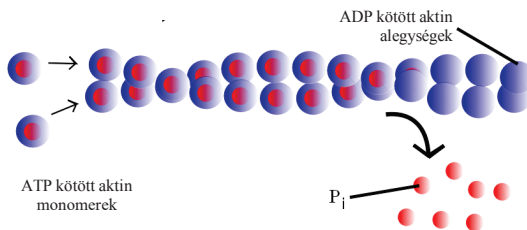
A már említett b-ZIP családba tartozik a GCN4 élesztő transzkripciós faktor (UniProt ID: P03069), melynek rendkívül erős *coiled coil*-t képző szekvenciáját (253-274) széles körben alkalmazzák fehérjefeltékeredési problémák vizsgálatára, nanotechnológiai kutatásokra, valamint fúziós formában kifejezve fehérjék dimerizálására is. Utalva erre a funkcióra, és a motívumot jellemző magas leucin arányra, szokás ezt a motívumot leucin-cipzárnak is nevezik.



8. ábra. A *coiled coil* szerkezetek keresztmetszete. Jól látható, hogy a szerkezet 7 aminosav hosszú periodicitást mutat.

1.4.A 6-os osztályba tartozó miozin különleges szerkezete és funkciója

A 6-os osztályba tartozó nem-konvencionális miozin „kakukktojás” a miozinok világában: a többi család tagjaival ellentétben ugyanis az aktinfilamentum mínusz vége² felé végez processzív mozgást (51, 52).



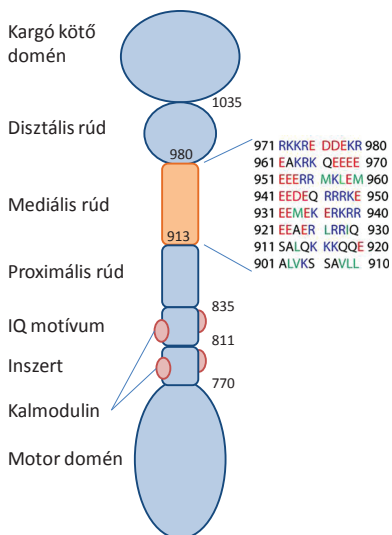
9. ábra. Az aktin filamentum szerkezete: a pozitív végén megtörténik az ATP kötött aktin monomerek beépülése, majd az ATP hidrolízise. A negatív végről disszociálnak az ADP aktin alegységek.

² Az aktin filamentum polarizált, ami azt jelenti, hogy a globuláris alegységekből felépülő aktin filamentum, hasonlóan a fehérjékhez és nukleinsavakhoz, megkülönböztethető végekkel rendelkezik. A konvenció szerint, a pozitív végnél a filament képződése, míg a negatív végnél a disszociáció sebessége nagyobb 9. ábra

Ez a jelenség azért is lényeges, mert a sejt felszínéhez közeli aktin hálózat ugyancsak polarizált: a sejt felszíne felé esik a filamentumok pozitív vége, míg a sejt belseje felé a negatív vég, ebből következően, míg a miozinok többsége a sejtből kifelé történő, addig a miozin-6 az endocitózisban, és a retrográd transzportban játszik fontos szerepet (53-55). Emellett lokalizációs kísérletek kimutatták jelenlétét a Gogli komplexben, ahol vezikulumok rövidtávú transzportjában és a Golgi ciszternák bonyolult szerkezetének fenntartásában lehet szerepe (56-58).

Hasonlóan a miozin szupercsalád többi tagjához, a molekula N-terminálisán található a motordomén, amiben két, csak erre az osztályra jellemző inszert szekvencia található. A kalmodulin kötésre képes második inszert, mely a konverter régió és az erőkar között található, hatására megváltozik az erőkar lecsapásának iránya (59, 60), ennek köszönheti a miozin a fordított haladási irányt. A motordomént az erőkar követi, melynek hossza kevesebb, mint 10 nm, köszönhetően egy szem IQ motívumának. Az erőkart a fark régió követi, melyet Spink *et al* (22) által javasolt terminológiát követve további 4 részre oszthatunk: proximális -, mediális -, disztális fark és a kargó kötő globuláris fark domén (10. ábra, és 1112. ábra).

A proximális és mediális rúd a szekvencijáolás alapján *coiled coil* kialakítására képes. Az egész molekula működésének szempontjából nagy fontossággal bír, hogy valóban képes-e a molekula dimerizálni, hiszen ez szükséges feltétele a processzív mozgásnak, azaz, a hatékony anyagtranszportnak (61, 62).



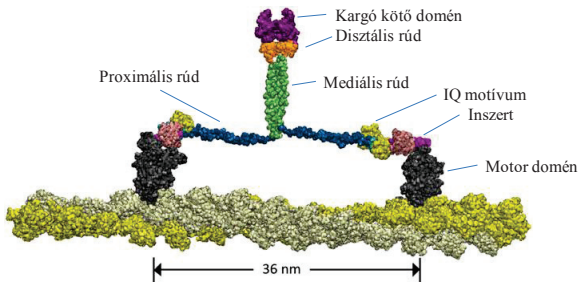
10. ábra.

A miozin-6 szerkezetének sematikus bemutatása. N-terminális felől a motordomén, majd a direkcionális meghatározó inszert-szekvencia a hozzá kötődő kalmodulinnal, amit az IQ motívum követ. A fark régió felosztható proximális- (1), mediális- és disztális szakaszra. A molekula C-terminálisán a kargó kötésért felelős globuláris farkdomén található.

A mediális rúd különleges, nagy töltéssűrűségű szekvenciája is látható.

A kérdéses régió szekvenciája azonban, nagymértékben eltér a konvencionális miozinoknál megismert szokásos *coiled coil*-októl: kiugróan magas az elektrosztatikusan töltött oldalláncok aránya, mely megkérdőjelezi a hidrofób interakció mediált asszociáció lehetőségét. A kezdeti kinetikai kísérletek, mely során leírták, jellemezték a motor aktin filamentumon történő mozgását, processzivitását, a *coiled coil* predikciók eredményeiben bízva a kísérletes rendszerben egyszerűsítés céljából az erőkar után GCN4-ből származó *coiled coil*-lal dimerizálták a molekulát a mediális farok C-terminálisán. Ezekben a kísérletekben állapították meg, hogy az erőkar hosszából következőnél jóval nagyobb lépéseket képes processzív módon megtenni az aktin filamentumon (63-65). Az első tanulmányban, melyben Kendrick-Jones és munkatársai valóban tesztelni kívánták ezt a predikciót, nem jártak sikerrel (66) több kísérlettel is csak monomer molekulákat sikerült kimutatni. Viszont, Lyu és munkatársai 1992-es munkája nyomán (67), elsőként vetik fel annak lehetőségét, hogy a mediális szakasz α -hélixet képez a szerkezetet stabilizáló *i* és *i+4* pozícióban lévő ionos interakciók révén. Továbbá előrelátó módon felvetik, hogy, a szintén prediktált *coiled coil*-t tartalmazó, proximális régió intramolekuláris hélixköteget képez. Ezt később egy másik csoport által meghatározott kristályszerkezet igazolta (1). Miután bizonyítottá vált, hogy a miozin-6 *coiled coil*-t nem képez, látott napvilágot néhány tanulmány, mely ennek ellenére kimutatták a molekula dimer természetét (60, 68, 69). Az újabb modell szerint a konvencionális miozinokkal ellentétben a miozin-6 nem állandó tulajdonsága a dimerség, hanem a partnereihez történő kötődés indukálja azt. De továbbra is kérdés maradt, hogy a molekula melyik része felelős ezért: partnerkötés révén a globuláris farokdomén (68), esetleg a rúd disztális, vagy mediális része. A felvetődő lehetőségek között meglehetősen impozáns ötletnek tűnt, hogy a mediális rúd részből kialakuló α -helikális szerkezetek elektrosztatikus interakciók segítségével dimerizálnak.

A miozin-6-nak a várakozásokat meghaladó lépéshossza okozta rejtélyt ugyancsak sikerült a miozin farokrégiójának segítségével magyarázni. Az egész molekulán és különböző fragmentumain végzett különböző felbontású szerkezetvizsgálatok révén többféle modellt alkottak a kutatók: eleinte úgy gondolták, hogy a proximális rúd gyenge *coiled coil*-ja random *coil*-á letekeredve járul hozzá a nagy lépéshosszhoz, melyet egy diffúziós keresés révén talál meg. Mások az enzimatikus ciklus különböző állapotainál vizsgálták az erőkar pozícióját, ami arra utalt, hogy a megfigyelt nagy szögérték képes lehet kellőképp megnövelni a lépéshosszt.



11. ábra. A miozin-6 működésének, szerkezeti felépítésének 2010 novemberében aktuális modellje. A modell szerint a proximális rúd három hélixes kötegelének letekeredésének köszönhető a 36 nm-es lépéshossz, míg a mediális rúd CSAH motívuma képes a molekulát dimerizálni (Kim 2010).

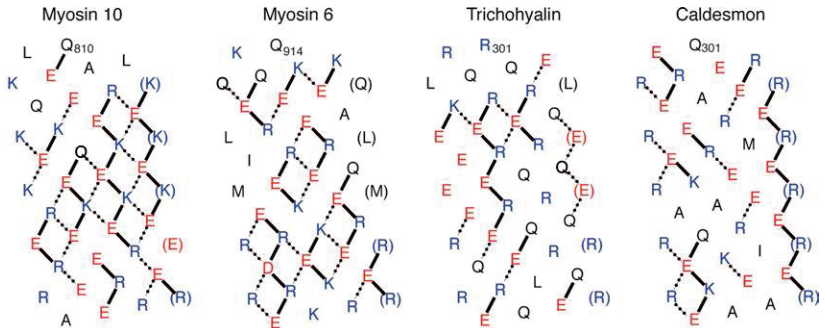
Mindezek az eredmények már önmagukban is nagyon érdekesek, és jól szemléltetik, hogy mekkora tudományos érdeklődés övezi a miozin-6 működését, de ezen kívül számos, jóval általánosabb kérdést is felvetnek. Érdekes a témában megjelent közlemények dátumát megnézni, láthatóvá válik, hogy milyen intenzíven kutatott terület, az új eredmények folyamatosan bővítik/ írják át ismereteinket a molekuláról.

1.5. Magányos α -helikális elemek fehérjékben.

A két legáltalánosabban elterjedt periodikus másodlagos szerkezeti elem (α -hélix, β -redő) valamelyikét, szinte minden fehérje tartalmazza, és rengeteg olyan fehérje is ismert, melyek szinte kizárólag α -helikális struktúrákból állnak. Ezek a fehérjék feltekeredésükkor olyan szerkezetet vesznek fel, ahol az α -hélixek nem önmagukban állnak, hanem kiterjedt kölcsönhatási rendszer védi a peptidkötések között kialakuló hidrogén hidakat a vízmolekulák szerkezetromboló hatásától: globuláris fehérjék hidrofób magja, membránok lipid rétege, fibrózus fehérjéket kialakító hélixek interakciós fesztínén lévő hidrofób varrat.

Habár néhány tanulmány beszámolt egyszerű szintetikus peptidok α -helikális viselkedéséről (67, 70-72), az utóbbi időkhöz kevés fehérje esetén találtak olyan szakaszokat, melyek vizes közegben natívan α -hélixet képeztek volna (73-76). Az említett szintetikus peptidok az ismert hélix kedvelő aminosavak mellett egymástól 4 aminosavra elhelyezkedő ellentétes töltésű aminosavakat tartalmaztak (77). Az ellentétes töltések között kialakuló vonzó elektrosztatikus kölcsönhatáson kívül, a szerkezetek stabilizálásában szerepet játszhat a töltéssel rendelkező aminosavak hosszú oldalláncai között kialakuló hidrofób kölcsönhatás és a szerkezetromboló vizek távoltartása (78-80).

Az első fehérje, melyben olyan szekvenciát azonosítottak, mely önmagában is α -hélixet képez, a simaizom kaldezmón volt. Kaldezmón központi része, különösen nagy töltéssűrűséggel rendelkezik, és a pozitív és negatív töltések 4-es csoportba rendeződnek, lehetővé téve számos hélix mentén ható stabilizáló interakciók sokaságát a hélix palástja mentén (12. ábra). Később a 6-os, 7-es és 10-es nem konvencionális miozin családokban találtak a kaldezmónhoz hasonló aminosav szekvenciát, melyek eredetileg *coiled coil*-nak prediktált szekvenciák voltak.



12. ábra. Négy ismert CSAH motívum kiterített helikális szerkezete. A feltételezett hélix palástján a lehetséges stabilizáló kölcsönhatások folyamatos és szaggatott vonallal vannak jelölve.

2.célkitűzések

2.1.A proximális S2 fragmentum szerepe a konvencionális miozinok szabályozásában

Mint a bevezetőben írtam, a regulált konvencionális miozinok a reguláció hatására nagy szerkezetátrendeződésen mennek keresztül. A kikapcsolt állapotban lévő miozin fejek pozíciója, aszimmetrikus elrendeződése azt valószínűsíti, hogy az rúd proximális része részleges letekeredése révén szerepet játszhat a kikapcsolt állapot kialakításában. Feltételezésünk szerint emiatt a proximális S2 stabilitása korrelációt kellene mutasson a miozin szabályozásával, mivel egy lágyabb, kevésbé stabil *coiled coil* jobban kedvez a kikapcsolt állapot kialakításának.

A stabilitásbeli különbség kimutatásához, különböző regulált és nem regulált konvencionális miozinokból származó S2 fragmentumokat állítunk elő, majd szerkezetvizsgálati módszereknek vetjük alá. A két alkalmazott módszer a cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia és a differenciális pásztázó kalorimetria (DSC) egyaránt alkalmas fehérjestabilitás vizsgálatára. Továbbá a miozinfragmentum atomi szintű szerkezetének meghatározása további részletekkel is szolgáltatathat a két miozinfaj és a proximális fark találkozásáról, ami a fejek közti kommunikáció miatt kiemelt fontossággal bír.

2.2. A miozin 6 mediális rúd doménjének szerkezetvizsgálata

Habár a miozin 6 rúd részének szekvenciája a predikciós programok egyöntetű véleménye szerint *coiled coil* kialakítására alkalmas, a rendelkezésre álló irodalmi adatok alapján feltételezhető, hogy erre mégsem képes, hanem a simaizom kaldezmához hasonlóan stabil egyszálú α -hélixet képez. Amennyiben ez a feltételezés megállja a helyét, megkérdőjeleződik az a munkahipotézis, miszerint a molekulát a kialakuló *coiled coil* dimerizálja. Viszont a fehérjén végzett kinetikai vizsgálatok jó részének érvényessége múlik a fehérje dimer természetén, hiszen a kísérletekhez egy erős *coiled coil* fúziójával dimerizációt indukáltak.

Ennek eldöntéséhez, a miozin 6 mediális rúd fragmentumát klónoztuk, majd előállítottuk bakteriális heterológ expressziós rendszerben. A fragmentummal CD spektroszkópiás méréseket végzünk, melyek segítségével választhatunk a két modell közül.

2.3. CSAH motívumok keresése a proteomban

Mivel az irodalomból már ismert, hogy a kaldezmon mediális régiója a speciális töltésmintázatának köszönhetően, önmagában is stabil egyszálú α -hélixet képez (*charged single α -helix* – CSAH), felmerült a kérdés, hogy a vannak-e további fehérjék hasonló aminosav mintázattal, és, hogy azok szintén hasonlóan viselkednek-e?

Ennek a kérdésnek megválaszolásához predikciós programokat fejlesztettünk, melyek képesek voltak a bevezetőben leírt motívum azonosítására. A programok találati közül néhány kiválasztott fehérje CSAH motívumot tartalmazó szekvenciáját klónoztam, majd az kifejezett fragmentumokat CD spektroszkópiai módszerekkel ellenőriztem a kialakuló szerkezetet és jellemeztem annak stabilitását.

2.4.A CSAH szekvenciák szerepe fehérjékben

A CSAH tartalmú fehérjék szerkezetéről elég keveset lehet tudni, amiből a CSAH motívum funkciójára következtethetnénk. Azon kívül, hogy a 10-es osztályba tartozó nem-konvencionális miozin esetén szerepe az erőkar meghosszabbítása lehet, csak találgathatunk. Miozin-6 esetén ugyan felmerült annak lehetősége, hogy esetleg dimert képezhet, de emellett egyelőre nincs döntő erejű kísérletes bizonyíték.

Munkám során keresztkötéses, CD spektroszkópiás és fluoreszcenciás módszerekkel kísérletem meg a miozin 6-ból származó CSAH motívum dimer természetét kimutatni.

2.5.CSAH szerkezetek stabilitásának vizsgálata *in silico* módszerekkel

A CSAH motívumok molekuladinamikai szimulációk (MD) egyrészt válaszolhatnak a szerkezet alapvető tulajdonságaira vonatkozó kérdésekre: valóban képes-e a kiterjedt elektrosztatikus kölcsönhatás hálózat stabilizálni egy α -helikális szerkezetet? Másrészt a szimulációs idő alatt megfigyelhető viselkedés alapján, a molekulát felépítő aminosavak közötti kölcsönhatások jellege, dinamikája választ adhat arra a kérdésre, hogy minek köszönheti a molekula a megfigyelhető stabilitást, és, hogy valóban képesek-e a nekik tulajdonított mechanikai szerepeknek eleget tenni.

A mechanikai funkciók alátámasztásához, vagy cáfolatához a szimulációk során nyert szerkezeti sokaságból meghatározottak a hélixeket jellemző mechanikai paraméterek: a perszisztenciahossz és a Young modulus. Ezek a paraméterek árulkodnak arról, hogy egy adott hosszúságú polimerlánc merev rúdnak tekinthető, vagy viselkedését inkább a fűregyszerű lánc (worm like chain) modell írja le.

3. Anyagok, módszerek

3.1. Rekombináns konstrukciók előállítása

A rekombináns DNS konstrukciók elkészítésének főbb lépései: 1) Az expresszálni kívánt fehérje fragmentumát tartalmazó DNS szakasz polimeráz láncreakcióval (PCR) történő amplifikációja. 2) A reakciótermék, és a vektor megfelelő restriktációs endonukleázzal történő emésztése, a kohezív végek kialakítása. 3) Az előző lépésben kialakított ragadós végek mentén az inszert és vektor szekvenciák ligálása. 4) A ligátum transzformációja DH5 α sejtekbe, majd szélesztés a vektor szelekciós markerének megfelelő antibiotikumot tartalmazó LB agarlemezre. 5) A felnövő baktériumtelepek ellenőrzése polimeráz láncreakcióval. 6) Az inszertet tartalmazó telepekből folyadékkultúra indítása, majd a sejtekből a rekombináns plazmid izolálása 7) A DNS szekvencia ellenőrzése Sanger féle láncterminációs módszerrel.

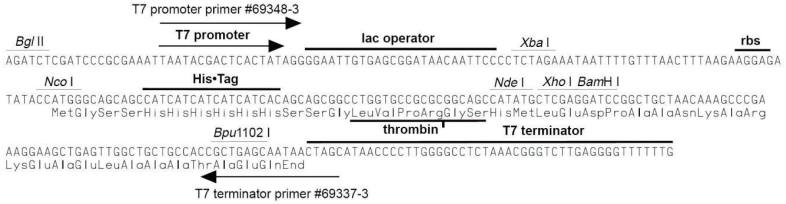
A miozin S2 fragmentumok szerkezetvizsgálatához használt konstrukciókat kiméra fehérjeként (két különböző fehérje fúziós terméke) állítottuk elő: N-terminálisukon a miozin, míg C-terminálisukon a GCN4 élesztő transzkripciósi faktor *coiled coil* szekvenciáját tartalmazták (a dolgozatban erre, az szakirodalomban használatos „leucin cipzárként” hivatkoznak). A két molekula fúzióját DNS szinten PCR reakcióval valósítottuk meg. A fúziós, vagy más néven megaprimeres PCR során egy első reakcióban amplifikáltam a miozin kódoló DNS szakaszt, melynek 3' vége a fuzionálni kívánt GCN4 génszakasz 5' végének 10-15 bázispáros szakaszát tartalmazta. Az így képződő (a GCN4 génhöz anellálni képes) DNS szakaszt használtuk egy hatalmas primerként a második PCR-nél, a leucin cipzár kiegészítése során. A megaprimeres PCR génfúziók megvalósításán kívül helyspecifikus mutációk kialakítására is alkalmas, széles körben alkalmazott eljárás.

3.2. Fehérjék expressziója, tisztítása

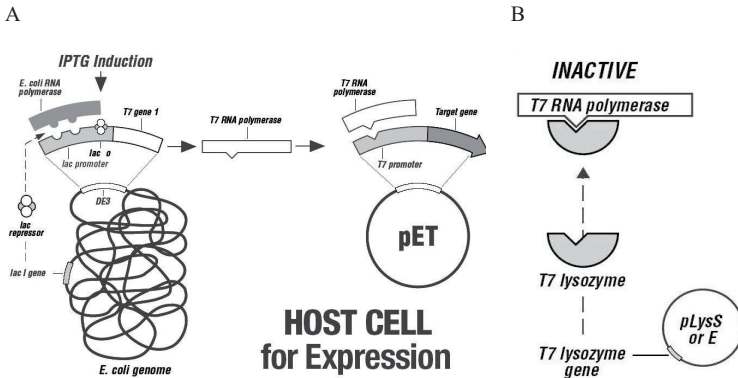
3.2.1. A pET rendszer – heterológ expresszió *E. coli* gazdasejtben

Az expresszálni kívánt fehérjét kódoló génszakaszokat pET-15b expressziós vektorba klónoztam. A vektor tartalmazza a pBR 322 replikációs origót, egy β -laktamáz gént, és a laktóz represszor génjét. A klónozó illetve expressziós régió 1313. ábraán látható részletesen. A klónozó hely előtt található egy trombin hasító hely, a hat hisztidin oldalláncból álló affinitás címke, a riboszóma kötésért felelős Shine Delgarno konszenzus szekvencia, majd a *Lac* operátor. Az átíródo régiót a T7 promóter és terminátor régiók fogják közre. Munkám

során expresszióra a BL-21 (DE3) pLysS sejtvonalat használtam (Invitrogen). Az expresszió mechanizmusa a 1414. ábraán látható.



13. ábra. A rekombináns konstrukciók elkészítéséhez használt pET-15b expressziós vektor klónozó helye. Feltüntetve az expresszáldó fehérjelánc sorrendjét is.



14. ábra. A) BL21 sejtben történő indukált fehérje termelés a pET rendszerű expressziós vektorról. B) a pLysS vektort tartalmazó sejtekben a T7 lizozim konstitutív kifejezése gátolja az indukciónélkül termelő T7 polimerázt.

A pET rendszer indukálható expressziós rendszer, hatalmas előnye, hogy a T7 bakteriofágból származó, rendkívül erős promóterét csak a T7 RNS polimeráz ismeri fel, így csak olyan sejtekben történik meg a rekombináns fehérje kifejezése, ahol a virális polimeráz genje szintén megtalálható. Ezzel lehetőség nyílik az expresszió és a klónozás fázisait teljesen szétválasztani. Az indukciónélkül BL21 sejtek genomjába épült λ -profágról Lac promóter által szabályozott módon T7 RNS polimeráz szintetizálódik, ami felismeri promóterét a plazmidon. Az expressziót a Lac operátorhoz kötődő represszor gátolja, de IPTG-vel (izopropil- β -D-itolgalakto-piranozid) történő indukciónél követően a rekombináns fehérjét kódoló gen „megszólal” (1414. ábra). Abban az esetben, ha az indukciónélkül expresszió még

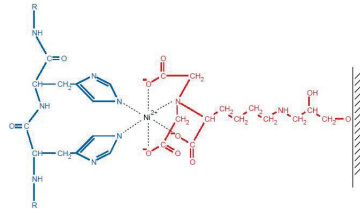
jobban el kell csendesíteni, például a rekombináns fehérje toxicitása miatt, akkor a pLysS vektort tartalmazó sejtek alkalmazása lehet célravezető: a kiegészítő plazmidról konstitutívan T7 lizozim íródik át, melynek feladata a T7 RNS polimeráz blokkolása (1414. ábra), a lizozim további előnye, hogy az expressziót követő sejtfeltárást nagymértékben megkönnyíti sejtlyukasztó hatása révén.

A szekvenálással ellenőrzött plazmidot BL21(DE3) kompetens sejtekbe transfóráltam. A 37 °C-on, egy éjszakán át tartó inkubációt követően, az agarlemezen felnőtt sejteket 2YT folyékony táptalajba oltjuk. A sejteket 37 °C-on növesztjük, míg a 600 nm-en mért optikai denzitás elérte a 0,5-öt (Ekkor a sejtek növekedése még az exponenciális szakaszban van, de már kellően sok sejt tartalmaz az oldat). A rekombináns fehérje expresszióját 0,5 mM IPTG hozzáadásával indukáltam, majd további 3 óra inkubáció következett 37 °C-on. (Egyes fehérjéknél ez a protokoll nem volt megfelelő, esetükben a sejteket OD = 0,8-ig növesztettem, majd az IPTG hozzáadása után 18 °C-on egész éjszakán keresztül inkubáltam.)

3.2.2. Nikkel affinitás kromatográfia

Az expresszálandó fehérje szekvencia N-terminálisán, a hat hisztidinből álló affinitás jel lehetővé teszi, hogy szelektíven, a nikkelionokhoz való kötődése által elválasszuk a sejtuszpenzió többi komponensétől.

Az elválasztáshoz NTA (nitrilo-triacetát) agaróz oszlopot használunk, ami a savas csoportoknak köszönhetően a Ni^{2+} ionokat képesek kelálni. A kötés jellegéből fakadóan a nikkel-ion szabad vegyértékével a hisztidinekhez képes kötődni. (a His címkes fehérje állófázishoz történő adszorpciójának sémáját a 1515. ábra mutatja be részletesen.)



15. ábra. A His₆ affinitáscímkét tartalmazó fehérje (kék) adszorpciója Ni^{2+} -NTA (piros) felszínen

A szennyező fehérjéket eltávolító mosást követően az eluensben 500 mM-ra növeljük az imidazol koncentrációját, ami a nikkel ionokért versengve leszorítja a jóval kisebb koncentrációban jelen lévő rekombináns fehérjét. A kromatográfiát követően a fehérjeoldatunkat olyan pufferben dializáljuk át, ami optimális a trombin működése szempontjából. Az affinitásjel lehasítását SDS poliakrilamid gélen ellenőrizzük.

3.2.3. Ioncserés kromatográfia

Az affinitás kromatográfiával tisztított fehérjeoldat tisztasága többnyire nem megfelelő biokémiai kísérletek végrehajtásához, így egy ioncserés elválasztást is be kell iktatni. Az ioncsere azon alapszik, hogy a fehérjék, az oldalláncain lévő töltések miatt, képesek kötődni az ellentétes töltést hordozó állófázis felszínére. Ez a kötődés az ionkoncentráció növelésével gyengül, ugyanis a mozgófázisban egyre nagyobb koncentrációban lévő ionok leszorítják a fehérjéket az állófázisról. Mivel egy adott pH-n, a fehérjék töltése más és más, a kötődés erőssége is eltérő, ami azt eredményezi, hogy más ionerőn fognak disszociálni. Az ioncserés kromatográfia megkezdése előtt online szekvencia elemző program (81) segítségével meghatározzuk a célfehérje izoelektromos pontját, ami alapján kiválasztjuk az ioncsere típusát, illetve az alkalmazott puffer pH-ját. Ha az alkalmazott pH-n fehérjénk töltése pozitív, akkor kation cserélő, ha negatív, akkor anioncserélő oszlopot használunk. (Fontos figyelembe venni, hogy az elméletileg meghatározott izoelektromos pont a fehérje térszerkezete miatt nem feltétlenül egyezik meg a kísérletesen, például izoelektromos fókuszálással meghatározott értékkel.) A következő eszközöket használtam:

- Amersham HiPrep CM FF kationcserélő, és Amersham HiPTrap Q anioncserélő oszlop
- Amersham Äkta prime rendszer (pumpa és frakció-szedő).

Az elválasztáshoz 50 mM-tól 1 M-ig emelkedő NaCl koncentráció gradienst használtam. A kromatográfias készülékbe (Äkta prime) beépített fotométer 280 nm-en detektálta az átfolyó oldat fényelnyelését. Azoknál a fehérjéknél, ahol az aromás aminosavak hiánya ezt a detektálást nem tette lehetővé, ott a kromatográfiát követően SDS poliakrilamid gélelektroforézissel vizsgáltam az elúciós frakciókat.

3.2.4. Reverz fázisú HPLC

A munkám során vizsgált fehérjék egy része különleges töltésmintázattal rendelkezett, melyek töltéseloszlása nagyon megnehezítette az ioncserevel történő tisztítást. Ezekben az esetekben reverz fázisú nagynyomású folyadékkromatográfias (RP-HPLC) tisztítást végeztem. A módszer lényege, hogy a fehérjék hidrophil mozgófázis mellett, apoláros karakterüknek megfelelően különböző erővel képesek kötődni a 18 tagú oktadecil szénlánc (C18) borított hidrofób állófázisához. A fehérjék elúciójához a mozgófázis apoláris karakterét növeljük, vízben jól oldódó szerves oldószer hozzáadásával. Amikor a mozgófázis polaritása eléri a fehérje elúciójához szükséges értéket, a fehérje kilép az állófázisból és megtörténik az elúció. Mivel az egyes fehérjék aminosav szekvenciájuknak megfelelően eltérő apoláros karakterrel

rendelkeznek, az elúcióhoz szükséges oldószer koncentráció is eltérő lesz. Az elúcióhoz használt apoláris oldószer gradienst acetonitril-víz változó arányú keverékével állítottuk elő. A fehérjék oldódását megkönnyítendő, minkét oldat tartalmazott trifluor-acetátot. Az elúció végeztével az oldószereket fagyaszttva szárítósos módszerrel távolítjuk el a fehérje mellől. A RP-HPLC hátránya, hogy a fehérjék az állófázishoz kötődve denaturálódnak, az oldószer eltávolítását követően meg kell oldani a fehérjék natív szerkezetének visszaállítását. Szerencsére az általam vizsgált egyszerű α -helikális fehérjék szinte „elpusztíthatatlannak” bizonyultak, nem volt probléma a renaturációval.

3.3. Cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópiás mérések

A cirkuláris dikroizmus jelenség neve a jobbra -, és balra cirkulárisan polarizált fény eltérő abszorpciójára utal. Ezt a jelenséget a királis, vagy királis környezetben lévő kromofórok mutatják, a nekik megfelelő adszorpciós tartományban. A CD spektroszkópia, amellett, hogy gyors, és nem igényel nagy mennyiségű mintát, azért is nagyon jól használható fehérjék szerkezetvizsgálatára, mert a peptidkötések a másodlagos szerkezetre jellemző CD jelet adnak. Mivel az egyes peptidkötések egymástól függetlenül járulnak hozzá a spektrumhoz, ezért egy fehérje CD spektrumának rögzítését követően, ismerve az egyes másodlagos szerkezetekre jellemző bázisspektrumokat, visszafejthetjük a fehérjét felépítő másodlagos szerkezetek arányát. Ezen kívül a fehérjét érő hatások (hőmérséklet, ionerő, pH), melyek kihatnak a fehérje másodlagos szerkezetére is, jól követhetők a CD spektrum vizsgálatával.

A CD spektroszkópiás vizsgálatokhoz Jasco J720-as spektropolariméterét használtuk. A méréseket 1 mm-es követtában végeztük, az ellipticitást 190 – 260 nm-es tartományban rögzítettük. A mintában a 10 – 50 μM -os fehérjekoncentráció mellett 50 mM NaCl biztosította a megfelelő ionerőt, és 20 mM nátriumfoszfát tartotta a pH-t konstans 7,5-ös értéken. A hőmérsékletet egy Neslab RTE-111 termosztát tartotta 20 °C-on. Az ellipticitás értékeket a következő összefüggés szerint moláris reziduális ellipticitássá alakítva ábrázoltam:

$$[\Theta] = \frac{\Theta_{\text{obs}} * \text{MRW}}{10 * l * c} \quad 1.$$

Ahol $[\Theta]$ a moláris ellipticitás ($\text{deg cm}^2 \text{ d mol}^{-1}$), Θ_{obs} – mért ellipticitás (deg), MRW – átlagos aminosav tömeg, l – fényút (cm), c – koncentráció (mg/ml)

A CSAH szerkezetek koncentrációfüggő asszociációs képességét, a fehérjekoncentráció 10 – 600 μM -os tartományban történő változtatásával teszteltem. A mérések ugyancsak 20 °C-on

végeztük, 50 mM NaCl, 20 mM Nátrium foszfát mellett pH 7.5-ön. Itt azonban a mérések során a széles tartományban változó fehérjekoncentráció miatt különböző fényúthosszal rendelkező küvetát használtam.

A magas α -hélix tartalommal bíró fehérjék szerszerkezetének stabilitását különbözőképp vizsgálhattuk. Az ionerő szerkezetre gyakorolt hatásának vizsgálatakor növekvő sókoncentráció mellett vettük fel a fehérje CD spektrumát. A puffer ezekben a kísérletekben is 20 mM, pH 7,5-ös Nátrium foszfát volt, a NaCl koncentrációt 0 mM-tól 5 M-ig terjedő skálán változtattuk.

A szerkezet hőmérsékletfüggésének vizsgálatához a termosztált küvetában lévő mintát konstans 1 °C/perc sebességgel fűtöttük 5 °C-tól 80 °C-ig, miközben a hőmérséklet hatására bekövetkező másodlagos szerkezetváltozást az α -hélixekre jellemző 222 nm-es minimumnál detektáltuk. A *coiled coil*-ok denaturációjára jellemző kooperatív átalakulás kiértékeléséhez a Hodi Zsuzsa (82) és Greenfield (83) közleményeiben leírt módszert követtük. A kiértékelésnél a natív dimer (D) denaturált monomerekké disszociál (M). A disszociációra felírható disszociációs konstans: $K_d = [M]^2/[D]$. A K_d megadható a következő egyenlet szerint:

$$K_d = 2C_{tot}f_M^2/(1/f_M^2) \quad 1.$$

Ahol C_{tot} a totál fehérjekoncentráció, f_M a monomer láncok aránya. A mért ellipticitás θ_{obs} a monomer frakció arányától függ következő egyenlet szerint:

$$\theta_{obs} = f_M[\theta_M - \theta_D] + \theta_D \quad 2.$$

Ahol θ_M és θ_D a monomerre és a dimerre vonatkozó reziduális ellipticitás értékek. A θ_D meghatározásánál azt feltételeztük, hogy a hőmérséklettel lineárisan változik: $\theta_D = \theta_{D0} + \alpha T$, ahol θ_{D0} elméleti érték, ami kifejezi, a 0 K-en mérhető ellipticitást. Így kifejezhető minden hőmérsékletre a monomer és a dimer forma közti K_d -t:

$$K_d = C_{tot} \exp \left\{ \Delta H \left(\frac{1}{T_{mobs}} - \frac{1}{T} \right) \right\} / R \quad 3.$$

Ahol ΔH a van't Hoff entalpia a T_{mobs} olvadási hőmérsékleten, ahol $f_M = 0,5$; R gázállandó. Greenfield 1998-as cikke (83) alapján feltételezve, hogy a dimer és a monomer forma közti hőkapacitás különbség elhanyagolható, egyenletek alapján meghatározható a szerkezetek olvadáspontja. Miután meghatároztuk ΔG -t és ΔS -t a $\Delta G = -RT \ln K_d$ -ből és $\Delta G = \Delta H - \Delta S$ -ből meghatározhattuk a T_m -et (ahol $\Delta G = 0$, és $K_d = 1$) (83).

3.4. Differenciális pásztázó kalorimetria (DSC)

Ez a kalorimetriás módszer kifejezetten alkalmas fehérjék hőmérsékletfüggő szerkezetváltozásának követésére: a kaloriméter a referencia cella és a fehérjét tartalmazó cella hőkapacitását hasonlítja össze különböző hőmérsékleten (innen származik a differenciális és a pásztázó jelző). Azon a hőmérsékleten, ahol a fehérje szerkezetváltozása zajlik, a rendszer hőkapacitása megváltozik, köszönhetően annak, hogy a közölt hő részben a szerkezet átalakításához járul hozzá. A módszer alkalmazhatóságának feltétele, hogy a vizsgált fehérje hőmérsékletfüggő átalakulása reverzibilis legyen, és minden hőmérsékleten legyen elég idő a szerkezeti állapotok közötti egyensúly kialakulásához.

A DSC méréshez használt puffer: 20 mM NaCl, 20 mM NaH₂PO₄, pH 7,5. A felfűtéseket 50 - 20 μM-os fehérje koncentráció mellett végeztük, 5 °C-tól 90 °C-ig, 1 °C/perc hőmérsékletemeléssel. A kapott görbékéből, kétállapotú rendszert feltételezve az entalpiaváltozás a van't Hoff törvényből levezethető egyenlet segítségével határoztuk meg:

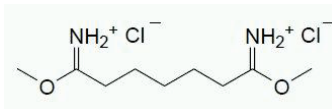
$$\Delta H = \frac{4RT_m^2 * \Delta c_p^{max} * M}{Q_t} \quad 4.$$

$$\frac{\Delta H_{vH}}{\Delta H_{cal}} < 1 \quad 5.$$

Ahol ΔH_{cal} a „kalorimetikus” -, a ΔH_{vH} a van't Hoff entalpiaváltozás, T_m – olvadáspont. Ezen kívül a hőkapacitásváltozás-görbe alapján megkapjuk a szerkezetátalakulásra jellemző T_m olvadáspontokat is.

3.5. Kémiai keresztkötés

A keresztkötésekhez dimetil pimelimidát reagenst (Pierce) használtunk (1616. ábra). Ez az imidoészter homobifunkciós-csoportot tartalmazó keresztkötő a fehérjékben lévő aminocsoportokkal reagál. Ennek megfelelően a reakciópuffer nem tartalmazhatott primer ament, helyette pH = 8-as Na foszfát puffert használtunk. A gyártó ajánlásának megfelelően a vízben feloldott keresztkötőt 30 szoros moláris feleslegben adtuk a fehérjéhez. A szobahőmérsékleten 60 perc inkubációs idő letelte után, a reakciót SDS és TRIS puffer keverékét

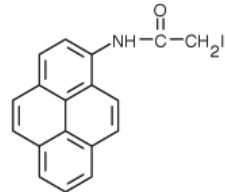


16. ábra. A CSAH szerkezetek dimerizálásának kimutatására használt keresztkötő reagens szerkezeti képe.

tartalmazó oldat hozzáadásával állítottuk le. A reakció eredményét SDS poliakrilamid gélen vizsgáltuk.

3.6. Fluoreszcens jelölés

A CSAH szerkezetek dimerizációra való hajlamát a pirén excimer fluoreszcenciájának megjelenésével szeretnénk volna kimutatni. Ehhez olyan rekombináns konstrukciókat készítettem, amiben a miozin 6-ból származó CSAH motívum N-terminálisára egy ciszteint, míg C' terminálisára a GCN4-ből származó rendkívül stabil *coiled coil*-t fuzionáltattam. A rekombináns fehérje egyetlen cisztein oldalláncára a tiol-reaktív jódoacetamid csoport segítségével kötöttem a pirént (A jelölésre N-(1-pirén) jódoacetamidot (Invitrogen) használtam. 1717. ábra).



17. ábra. A jelölésre N-(1-pirén) jódoacetamidot (Invitrogen) használtam.

A reakció körülményei megfeleltek a gyártó ajánlásának: a reakciót szobahőmérsékleten végeztem, reagenst háromszoros moláris feleslegben adva fél órát zajlott a reakció, amit végül β -merkaptóetanol hozzáadásával zártam.

A jelölést követően a fehérjét reverz fázisú HPLC-n tisztítottam, amit az tett lehetővé, hogy a pirén beépülése az elúcióhoz szükséges acetonitril koncentrációt jelentősen megemelte, illetve a jelölés sikerét jelezte a pirénre jellemző 365 nm-es intenzív fényelnyelés megjelenése.

3.7. Fluoreszcencia vizsgálat

A fluoreszcenciás vizsgálatokat Spex320 FluoroMax fluoriméteren végeztem, melyben egy xenon lámpa biztosította a gerjesztéshez szükséges fényt. A méréskor a pirénre jellemző 365 nm-es hullámhosszon gerjesztettem a fluorofórokat, majd detektáltam az emittált fény intenzitását 370 nm-től 570-nm-ig. A 20 °C-ra termosztált oldat összetétele megfelelt a CD spektroszkópiás kísérleteknél alkalmazottal, 10 μ M fehérjekoncentráció mellett.

3.8. CSAH motívumok predikciója

A motívumot nagyon jól prediktálhatóvá teszi szabályos aminosav mintázata, melyet a kaldezmón központi α -hélixét vizsgáló közleményben már leírtak (75, 76). Közleményünkben két elvileg különböző módszert fejlesztettünk ki a motívum azonosítására. Az első, pontozáson alapuló módszer (*scan4charge*), az egymást követő töltött aminosavak

között kialakuló vonzó, illetve taszító kölcsönhatásokat számolja, és egy másikat, ami a pozitív és negatív töltésű aminosavakban megmutatkozó periodicitáson alapszik (*fit_charge*).

3.8.1. *scan4charge*

Ez a módszer azt használja ki, hogy feltételezett α -helikális szerkezetben hélixfordulatonként egymást követő töltéssel rendelkező aminosavoldallancok között vonzó, vagy taszító elektrosztatikus kölcsönhatások alakulnak ki. A módszer a stabilizáló és destabilizáló hatások súlyozott pontozásán alapszik. A pontozásban figyelembe vett stabilizáló kölcsönhatások:

- Ellentétesen töltött aminosavak három vagy négy aminosavnyi távolságban ($i, i+3$, vagy $i, i+4$ pl.: ExxxK) (73, 76, 84, 85).
- Kooperatív stabilizáló hatás három egymást követő hélixmenet ellentétes töltésű aminosav oldalláncai között ($i, i+4, i+8$ vagy $i, i+4, i+7$ vagy $i, i+3, i+7$; pl ExxxRxxxE). Irodalmi adatok utalnak arra, hogy ilyen elrendezésben a töltéseknek kooperatív hatása lehet (85).
- Ellentétesen töltött aminosavpár relatív orientációja: a hélixek dipólusmomentuma miatt feltételezhetően hatékonyabban képes egy ionpár stabilizálni egy helikális szerkezetet, ha a savas oldalláncú aminosav van az N-terminális felé. (85).

A pontozásban figyelembe vett destabilizáló kölcsönhatások:

- Vonzó kölcsönhatások, melyek nem kedveznek az α -hélix kialakulásának ($i, i+2$ vagy $i, i+1$).
- Taszító kölcsönhatás azonosan töltött aminosav oldallancok között 3 vagy 4 aminosav távolságban ($i, i+3$ vagy $i, i+4$) (84)

A Perl nyelven implementált predikációs program a fenn említett valamennyi lehetséges ionos interakciót figyelembe vette, valamint külön kezelte az egyes ionpárok relatív orientációját is. Egy CSAH motívumnak definíciónk szerint eleget kell tennie a következő feltételeknek: legalább 40 aminosav hosszan, maximum 5 aminosavon keresztül nincs kedvező ionos interakció.

De egy pontozó algoritmusnak szüksége van relatív súlyokra is, ami megmutatja, hogy az egyes feltételek teljesülése mekkora hatást gyakorol az egész rendszerre. Az egyes effektusok hatásának becslésére egy iteratív optimalizációs eljárást alkalmazhatunk. Az eljárás során addig változtatjuk a paramétereket, míg a néhány tagból álló ismert pozitív szett szignifikánsan eltolódik a nem szelektált populáció átlagához képest. A mi esetünkben ez a

„target” szekvencia készlet 7 bizonyítottan, vagy nagy valószínűséggel CSAH szekvenciát tartalmazó fehérjéből állt. (csirke, patkány és humán kaldezmon (UniProt ID : Q05682, Q62736, P12957), egér és humán miozin-6, (UniProt ID :Q9UM54, Q64331), szarvasmarha és human miozin-10 (UniProt ID :Q9HD67, P79114)). A cél szekvenciák mellett használt 2218 tagú „háttér” szekvencia készletet a paraméterek előzetes becslésével kaptuk. Az optimaláshoz egy sokdimenziós hálót jártunk be, ahol a háló csomópontjai az egyes paraméter kombinációnak felelnek meg (háló és nem felület, mert paraméterként csak egész számokat használtunk). Minden paraméterkombinációval végrehajtottuk a szekvenciák pontozását, majd megállapítottuk a fehérjék sorrendjét. Definiálunk egy célfüggvényt, amit a cél szekvenciák helyezéseinek átlagaként kapunk meg. Az optimalást ez előbbi célfüggvény minimalizálása jelentette. Az optimalizált paramétereket az 1. Függelék tartalmazza.

Nagy fehérje adatbázis átvizsgálásakor azt kaptuk, hogy eleve nagyon kevés szekvencia tesz eleget a minimum követelménynek (40 aminosavon keresztül húzódo stabilizáló sóhíd rendszer), ami a randomizált szekvenciákat is használhatatlanná teszi a küszöbérték meghatározásához. Így a tapasztalati *score* értékek eloszlásán alapult, annak megállapítása, hogy egy CSAH szekvenciára kapott *score* érték szignifikáns-e. A *score* értékek eloszlását a extrém érték eloszlással („extreme value distribution”) írhatjuk le.

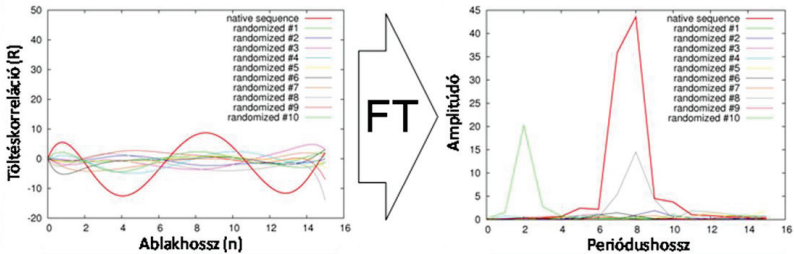
3.8.2. *ft_charge*

A módszer, hasonlóan más Fourier transzformáción alapuló módszerhez, mint például a Spectral Repeat Finder (86), a fehérjék aminosav mintázatában megfigyelhető periodicitáson alapul. Módszertünkben az aminosavakhoz töltésüknek megfelelően számokat rendelünk: a negatívan töltött aszpartát, glutamát aminosavakhoz -1 -et, a pozitívan töltött arginin és lizin aminosavakhoz $+1$ -et, valamint a hisztidinhez $+0,5$ -öt, a többi aminosavakhoz nullát. Az így létrejövő számsort, már lehetne vizsgálni Fourier transzformációval, de a periodicitást felerősíti az alábbi töltéskorrelációs függvény alkalmazása:

$$R_N = \sum_{i=1}^{m-n} q_i * q_{i+n} \quad 6.$$

ahol q_i az i . aminosavhoz rendelt szám, m – a szekvencia hossza, R – az n hosszúságú ablakhoz tartozó töltéskorrelációs függvény értéke. A R -t különböző ablakhosszakra kiszámítva, megtudjuk, hogy milyen távolságok esetén látható korreláció a szekvenciában lévő töltések között. CSAH szekvenciák esetén egy periodikus függvényt kapunk, mely

Fourier transzformáltja karakterisztikus 6-9 aminosav hosszúságú periodicitást mutat, köszönhetően a négy pozitív, 4 negatív aminosav szabályos ismétlődésének (18. ábra).



18. ábra. Az *ft_charge* program működésének bemutatása. A töltéskorrelációs függvény előállítására, és használatára az aminosav szekvenciában látható töltésmintázat periodicitásának meghatározására.

Mivel a töltéskorrelációs függvény, és így annak Fourier transzformáltja függ a szekvenciában található töltött aminosavak számától, továbbá az amplitúdó értéke nem alkalmas szekvenciák közti összehasonlításra, így nincs mód egy egységes küszöbérték meghatározására sem. Hogy megállapíthassuk, hogy a kapott periodicitás mennyire szignifikáns, az aminosav összetételt megtartva randomizált szekvenciákat állítottunk elő, majd a randomizált szekvenciák töltéskorrelációs függvényire kapott Fourier transzformáltak amplitúdóit hasonlítottuk össze (18. ábra). Az így kapott amplitúdó sokaságból már meg lehet becsülni, hogy a natív szekvenciánál megfigyelhető amplitúdó nagysága mennyire szignifikáns. A szignifikancia becsléséhez Z értéket számoltunk:

$$Z = \frac{A_{max}^{nativ} - A_{max}^{(random)}}{\sigma_{random}} \quad 7.$$

A Z érték megmutatja, hogy a natív szekvenciánál található amplitúdó (A_{max}^{nativ}), a standard hiba (σ_{random}) hányszorosával tér el az randomizált szekvenciánál látható amplitúdók átlagától ($A_{max}^{(random)}$). A szekvencia keresés során a szekvenciát nem egészben, hanem rövidebb szakaszokra osztva vizsgáltuk. Az alkalmazott gyors Fourier transzformációs algoritmus (FFT) használata megkövetelte, hogy az egyszerre vizsgált szekvencia hossza (a 6. egyenletben szereplő m) 2 egész kitevőjű hatványa legyen. Ezért a fehérjeszekvenciákat egy 64 aminosav hosszúságú ablak 32 aminosavas eltolásaival dolgoztuk fel. A Z érték számításához használt amplitúdók 9 randomizált, és a natív szekvenciából származtak.

3.9.Molekuladinamikai (MD) szimulációk

A molekuladinamikai szimulációkat a Minnesota Supercomputing Institute szuperszámítógépén, együttműködő partnerünk, L. Michel Espinoza-Fonseca végezte. Az explicit vizes szimulációt az NAMD 2.1 programmal, Charmm 27 erőter alkalmazásával, 2 fs integrációs idővel végeztük. A rendszer előkészítése a szimulációkhoz a következő lépésekkel történt: a 8. táblázatban szereplő fehérjéből szabályos α -helikális szerkezetet építettünk, majd egy „szimulációs dobozt” definiáltunk a molekula körül. A periodikus falakkal határolt dobozt TIP3P vízzel töltöttük fel. Ez a fehérjék szimulációja során széles körben alkalmazott vízmodell, amellet, hogy a víz számos kísérletesen is meghatározható paraméterét remekül visszaadja, hatékonyan számolható. A fehérje környezetében az ionerőt Na^+ és Cl^- ionok hozzáadásával 0,15 M-ra állítottuk be. Az elektrosztatikus kölcsönhatások számításához a Particle Mesh Ewald módszert használtuk. A szimuláció során az 1 atm nyomást, és a 310 K hőmérsékletet a Langewin barosztát és termosztát alkalmazása tartotta konstans értéken. A szimulációt megelőző egyensúlyba hozás lépései: 500 lépésen keresztül a peptidgerincet fixen tartva, majd újabb 500 lépésen keresztül a teljes rendszert minimalizáltuk a legmeredekebb ereszkedés („*Steepest descent*”) algoritmus alkalmazásával. Ezt követte egy 5 ns-ig tartó felmelegítés, minek célja, hogy a szerkezet, az intenzív hőmozgásnak köszönhetően, kijusson az esetleges lokális energiaminimumból. A visszahűtést 5 ns-nyi ekvilibrálás követte, majd kezdetét vette a fehérjénként 160 ns ideig tartó szimuláció.

3.9.1. A szimulációk eredményeinek kiértékelése

A molekuladinamikai szimuláció eredményei, a trajektóriák, azaz a szimulációs idő alatt, a rendszer atomjai által megtett út, árulkodik a rendszer számos tulajdonságáról. Az adatok kinyerése, és a kiértékelés jelentős része a VMD molekulaábrázoló -, és elemző programmal történt (87). A fehérjék által felvett másodlagos szerkezetek azonosítása a VMD programba integrál STRIDE programmal történt (88), az assignáció alapja, többek között, a peptidkötés ϕ , Ψ szögértéke, a peptidgerinc H-híd mintázata.

A CSAH szerkezetek mechanikai paramétereinek (perzisztenciahossz, Young modulus) meghatározására, a probléma specifikussága miatt, nem állt rendelkezésre előre megírt szoftver, azokat Perl nyelven implementáltam (v5.10.1-es verzió), majd a kinyert adatokat Origin 8.0 programmal értékeltem ki (OriginLab, Northampton, MA).

3.9.2. Mechanikai paraméterek meghatározása

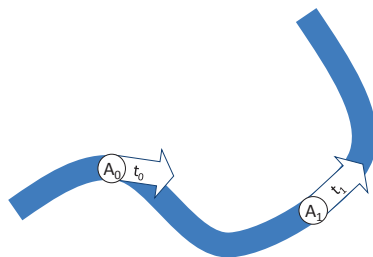
A molekuláris klónozással, vagy a heterológ fehérje expresszióval ellentétben a mechanikai paraméterek MD szimulációkból történő meghatározásának nincsen irodalomban megszilárdult, bevett metodikája. A mi feladatunk volt, hogy kitaláljuk, hogy az rendszer miként hordozza a mechanikai információt, és milyen összefüggésekkel lehet belőlük kinyerni a kérdéses fizikai paramétert. Természetesen a kifejlesztett módszerek implementálása is a mi feladatunk volt. Ezzel magyarázható, hogy ezt a fejezetet kicsit eredménynek is tekintem, ezért a többi módszereket leíró szakasznál bővebb, jobban részletekbe menő.

De milyen paraméterekre vagyunk kíváncsiak, milyen tulajdonságok jellemeznék egy lineáris polimerláncot? Két fő paramétert vizsgáltunk: a) az oldalirányú erőkkel szembeni ellenálló képességet a perzisztenciahosszal (L_p), b) míg a nyújtással szembeni ellenállóképességet a Young modulussal jellemezhetjük.

Empirikusan a perzisztenciahossz (L_p) az a távolság, ami felett a polimerlánc inkább egy random tekeredő láncként, míg a perzisztenciahossz alatt inkább egy merev rúdként viselkedik. A perzisztenciahossz egzakt definíciója:

$$\langle \cos\theta \rangle = e^{-\frac{L}{L_p}} \quad 8.$$

Ahol θ a polimer két, L távolságra lévő, pontjához tartozó irányvektor által bezárt szög, L_p a perzisztenciahossz. A szögletes zárójel az irányvektorok által bezárt szögek koszinuszainak átlagát jelenti (1919. ábra). A fenti definíció azt mutatja meg, hogy a lánc egy pontjához tartozó irányvektor mennyire határozza meg a tőle L távolságra lévő ponthoz tartozó irányvektort. Definíció szerint ez a meghatározottság a perzisztenciahossz esetén 50%-os. A perzisztenciahossz többszörösénél hosszabb L esetén ez a meghatározottság nagyon kicsi, kellően hosszú lánc esetén a két irányvektor független egymástól.



19. ábra. A polimerlánc A_0 és A_1 pontjaihoz tartozó t_0 és t_1 , tengely irányú vektorok

A fenti egyenletben szereplő távolság és irány adatok egy szerkezetből (egy adott, L hosszúságú ablak eltolásával), vagy egy szimulációból származó szerkezeti sokaság

(különböző időpillanatokhoz tartozó szerkezetek), azonos atomjai felhasználásából származhatnak. Ez utóbbit választottuk, mivel a szimulációban résztvevő peptidek meglehetősen rövidek, így túl kevés pontból végezhetnénk az átlagolást. Mivel az MD szimulációk peptidenként 160 ns-ig tartottak, és az elmentett állapotok között 20 ps idő telik el, egy futásból 8000 szerkezetet használhattam az átlagolásra. A mechanikai paraméterek meghatározásához csak a peptidlánc α szénatomjait használtam fel, továbbá a terminálisoknál megfigyelhető szerkezeti fluktuáció miatt, a peptid N-, és C-termináisairól 6-6 aminosavat nem vettem figyelembe.

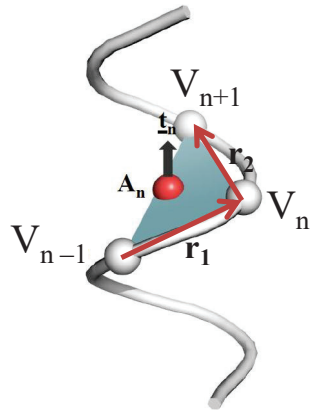
A szerkezetekben három egymást követő α szénatom (V_{n-1} , V_n , V_{n+1}) segítségével kiszámoltam minden V_n α szénatomra jellemző \underline{t}_n tengely irányú egységvektort, és A_n pontot, mely a V_n szénatomhoz legközelebb eső pontja a hélix tengelyének (2020. ábra):

$$A_n = V_n + d \frac{r_2 - r_1}{|r_2 - r_1|^2} \quad 9.$$

$$\underline{t}_n = 2a \frac{r_1 - r_2}{|r_1 - r_2|^2} + \sqrt{1 + \frac{4a^2}{|r_1 - r_2|^2} \frac{r_1 - r_2}{|r_1 - r_2|^2}} \quad 10.$$

Ahol $r_1 = V_n - V_{n-1}$, $r_2 = V_{n+1} - V_n$, $d = 2,31 \text{ \AA}$ az α szénatomok távolsága a hélix tengelyétől, és $a = 1,516 \text{ \AA}$ az egy aminosavra eső emelkedés a hélix tengelye mentén. Előbbi értékeket számos szerkezetekből átlagolva kaptuk, és jó egyezést mutatnak az α -hélixre vonatkozó tankönyvi adatokkal. Ezt követően rendelkezésünkre állt az összes időpillanatban a szerkezet minden atomjához tartozó A_n és \underline{t}_n koordináta.

Ezekből három, koncepcionálisan különböző módon lehet a perzisztenciahosszt meghatározni: a) a szállehajlás alapján (), b) irányvektorok alapján (), c) vég-vég távolságok eloszlása alapján (ez utóbbit használhattuk a lánc hosszanti flexibilitását mutató Young modulus kiszámításához is).



20. ábra A perzisztenciahossz és a Young modulus kiszámításához használt \underline{t}_n vektorok és A_n pontok.

3.9.3. A szálelhajlason alapuló perzisztenciahossz meghatározás

A módszer azon az egyszerű megfontoláson alapszik, hogy minél merevebb egy polimer, adott hossz esetén, annál kisebb lesz az átlagos kitérés az elhajlás nélküli „egyenes” szálhoz képest. Illetve, minél „lágyabb” a polimer, már rövid hossz esetén is nagyobb elhajlást tapasztalunk. Az elhajlást az egyes időpillanatokban az adott A_n pontok térbeli eloszlása alapján számoltam a következő képlet szerint:

$$\langle R_n^2 \rangle = \omega_n - \frac{ref(ref\omega_n)}{ref^2} \quad 11.$$

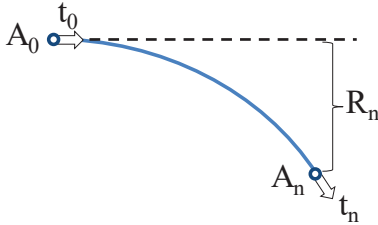
A képletben $\omega_n = A_n - A_0$, és ref egy referencia vektor, melyet kétféleképpen származtathatunk: a) $ref = \langle \omega_n \rangle$ A referencia az adott szimulációs idő ablakra átlagolt ω_n , b) $ref = t_0$ A referencia az adott szimulációs lépéshez tartozó t_0 . A két módszer közti különbség lényege, hogy az előbbi terhelt lesz az egymást követő időpontok közötti erős kapcsoltsággal, míg a második módszer esetén valóban egy ideális egyenes szerkezethez viszonyíthatjuk az elhajlás mértékét. Mindkét módszer esetén úgy járunk el, hogy az összes időpontra kiszámoljuk R_n^2 -t, majd átlagoljuk. Az $\langle R_n^2 \rangle$ és a perzisztenciahossz között az összefüggést a következő egyenlet írja le:

$$\langle R_n^2 \rangle = \frac{2}{3} \frac{L_n^3}{L_p} \quad 12.$$

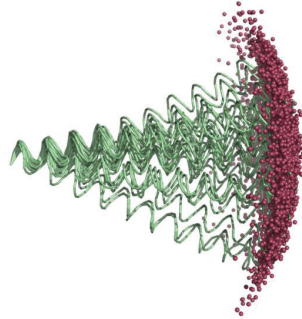
Ahol L_n a polimer kontúrhossza:

$$L_n = \sum_{i=2}^n \langle |A_i - A_{i-1}| \rangle \quad 13.$$

A



B



21. ábra. A rugalmasság meghatározásához felhasznált paraméterek sematikus bemutatása. b) Néhány szimulációval nyert szerkezet bemutatása, a bordó gömbök mutatják egy adott n -hez tartozó A_n pontokat a szimuláció ideje alatt.

A módszer hátránya, hogy alkalmazása során egy átlagot számolunk, amiből a mechanikai paraméterek ugyan meghatározhatóak, de hibájukat nem adja meg. A paraméterek hibájának becsléséhez a rendelkezésre álló 160 ns hosszúságú szimulációt különböző hosszúságú részszimulációkra osztottam, majd az így létrejövő sokaságból az átlag L_p -t, valamint a hozzá tartozó standard hibát számoltam. Ha ezt az eljárást elvégezzük a teljes szimuláció 5, 10, 15, 20, 30, 50, 75 és 100 egyenlő hosszúságú részszimulációjával, akkor extrapolálhatunk egy végtelen hosszú szimulációra, valamint a hibákból következtethetünk a 160 ns-nyi szimulációból számolt L_p hibájára (a felosztásokat az 1. táblázat mutatja).

Csoportok száma	Részszimuláció hossza (ns)	Szerkezetek száma
5	32	1600
10	16	800
15	10,6	533
20	8	400
30	5,3	266
50	3,2	160
75	2,1	106
100	1,6	80

1. táblázat. A mechanikai paraméterek hibájának meghatározására használt felosztás. Egy sorban a részszimulációk száma, ideje, és a részszimulációban lévő szerkezetek száma látható.

A hiba kiszámításához szükséges átlagolásnál figyelembe kell venni a különböző átlagolási módok együttes használatából fakadó hibát. Ez azt jelenti, hogy egy sokaság részsokaságainak harmonikus átlagainak számtani átlaga különbözni fog a teljes sokaság mértani, és számtani átlagától is. A vegyes átlagolás eredménye a részsokaságok számától függ. Ettől a tisztán

matematikai artefaktumtól úgy szabadulhatunk meg, hogy az 12. egyenletből fakadó, harmonikus átlagok harmonikus átlagát képezzük. Vagyis, az egyes részszimulációkból számolt L_p reciprokainak számtani közepét számoljuk ki: $\langle 1/L_p \rangle$. Majd ennek reciprokát, a hozzátartozó standard hibával együtt ábrázoljuk a $\sqrt{\frac{1}{t}}$ függvényében, ahol t a részszimuláció hossza (46. ábra, b és c). A hibák számolásánál, a hibaterjedést figyelembe véve így jártunk el:

$$\langle 1/L_p \rangle \pm b \rightarrow \frac{1}{\langle 1/L_p \rangle} \pm b \frac{1}{\langle 1/L_p \rangle^2} \quad 14.$$

Ahol b az $\langle 1/L_p \rangle$ standard hibája.

3.9.4. Az irányvektorok elhajlása alapján történő L_p meghatározás

A módszer a perzisztenciahossz klasszikus definícióját használja fel (8. egyenlet). Az egyenletben szereplő $\langle \cos\theta \rangle$ a következő képlet segítségével határozható meg:

$$\langle \cos\theta \rangle_n = \langle t_{ref} t_n \rangle = e^{-\frac{L_n}{L_p}} \quad 15.$$

Ahol $\langle \cos\theta \rangle_n$ a t_{ref} referencia vektor és t_n vektor skaláris szorzatainak átlaga az adott szerkezeti sokaságban L_n kontúrhossznál. Számolásainkban a referenciavektort, hasonlóan a szálelhajlásos módszerhez, kétféleképpen származtathatjuk: 1) $t_{ref} = t_0$, azaz a hetedik α szénatomhoz tartozó t_n vektor; b) $t_{ref} = \langle t_n \rangle$, azaz a t_n -ek tálaga az adott sokaságban. A kontúrhosszt a 13. egyenletben megismert módon számoltam ki. Feltételezve egy homogén polimert, melynek minden pontja ugyanolyan rugalmas paraméterekkel rendelkezik, a 15. egyenletből látható, hogy a különböző L_n kontúrhosszaknál megfigyelhető különböző $\langle \cos\theta \rangle_n$ értékek ugyanazt a perzisztenciahosszt adják. Ebből a következő módszerrel egyszerűsítettük az L_p meghatározását:

$$\left. \begin{aligned} \langle \cos\theta \rangle_x &= \langle t_{ref} t_x \rangle = e^{-\frac{L_x}{L_p}} \\ \langle \cos\theta \rangle_y &= \langle t_{ref} t_y \rangle = e^{-\frac{L_y}{L_p}} \end{aligned} \right\} \Rightarrow \frac{\langle \cos\theta \rangle_x}{\langle \cos\theta \rangle_y} = \frac{e^{-\frac{L_x}{L_p}}}{e^{-\frac{L_y}{L_p}}} = e^{\frac{L_x - L_y}{L_p}} \quad 16.$$

Az egyenlet átrendezésével a következő összefüggést kapjuk:

$$\frac{1}{L_p} = \frac{\ln \frac{\langle \cos \theta \rangle_x}{\langle \cos \theta \rangle_y}}{L_y - L_x} \quad 17.$$

Ahol $L_y - L_x$ x és y pont közt lévő kontúrhossz. A szálelhajlason alapuló módszerhez hasonlóan, a hiba meghatározásának céljából, itt is elvégeztük a teljes szimulációs idő részekre osztását, és az átlagolást. A felmerülő átlagolási hibát a 18. egyenletben megadott módszerrel küszöböltük ki: egy adott időablakhoz tartozó összes részszimulációhoz kiszámítjuk, a 17. egyenletben leírt módon a perzisztenciahossz reciprokát, majd ebből kiszámítjuk $e^{\frac{L_y - L_x}{L_p}}$ -ot, kiszámítjuk ezek átlagát, és a hozzá tartozó hibát; majd ebből, a hibaterjedés szabályait figyelembe véve visszaszámoljuk a perzisztenciahosszat (18. egyenlet) (4547. ábra b) és c).

$$\langle e^{\frac{L_y - L_x}{L_p}} \rangle = a \pm b \rightarrow -\frac{L_y - L_x}{\ln(a)} \pm b \frac{L_y - L_x}{(\ln(a))^2} \quad 18.$$

3.9.5. A hosszanti rugalmasság meghatározása

Itt a lánc hosszának időbeli eloszlását határoztuk meg. Két eljárás közül választhattunk: a) a lánc két kiválasztott pontjának távolságát mérjük, és számítjuk ki a szórás négyzetét (19. egyenlet), vagy b) meghatározzuk az egyes A_n pontok közti távolságok összegéből a polimer kontúrhosszát, és e hosszban mérhető különbségek szórásnégyzetét számoljuk (20. egyenlet). (A lánc kontúrhosszát ugyancsak a 13. egyenlet alapján számoltam)

$$\sigma^2 = \langle A_n^2 \rangle - \langle |A_n| \rangle^2 \quad 19.$$

$$\sigma^2 = \langle L_n^2 \rangle - \langle L_n \rangle^2 \quad 20.$$

Az előbbi módszer hátránya (bár bizonyos szempontból előnye), hogy a lánc mentén távolodva, az egyes pontok közti távolságban mérhető különbség már nemcsak a lánc hosszanti megnyúlásából, hanem az oldalirányú elhajlásából is fakad, tehát a vég-vég távolságok tartalmaznak információt a lánc perzisztenciahosszára is (21. egyenlet). A közvetlenül a lánc kontúrhosszát felhasználó módszerben, az L_p -t tartalmazó tag nem lesz jelen, a lánchosszal a szórásnégyzet lineárisan változik (22. egyenlet).

A térszerkezetekből meghatározható szórásnégyzetekre a következő egyenletek illeszthetők:

$$\sigma^2 = \frac{K_B T}{EI} L_n + \frac{1}{90} \frac{L_n^4}{L_p} \quad 21.$$

$$\sigma^2 = \frac{K_B T}{EI} L_n \quad 22.$$

Ahol K_B – Boltzmann állandó, T – hőmérséklet Kelvin fokban, E – Young modulus, rugalmas paraméter, I – alaki tényező (hélixre: $I = \frac{\pi r^4}{4}$), L_p – perzisztenciahossz. Az egyszerű vég-vég távolságmérésen, és a lánchossz mérésen alapuló módszer közötti különbséget az eredményeket bemutató fejezetben található, 4648. ábra mutatja.

4. Eredmények

4.1. Miozin II S2 szerkezetvizsgálata

4.1.1. CD spektroszkópiás, és DSC mérések

Hogy felderítsük, szerepet játszik-e a miozin fejek találkozását követő proximális *coiled coil* stabilitása a miozin nehézláncok regulációjában, a 2. táblázatban látható molekularészletek stabilitását vizsgáltuk meg. A négy konstrukció a fej-rúd találkozását kijelölő PLL motívumtól kezdve 50-50 aminosavas szakaszt tartalmazott a proximális S2 régióból. A kísérletekben szerepelt két regulált, és két nem-regulált miozinból származó fragmentum. A regulált miozinok közül a kagyló vázizomnál Ca^{2+} kötésen keresztül, míg a simaizomnál a RLC foszforilációján keresztül valósul meg a reguláció.

Regulált miozinok

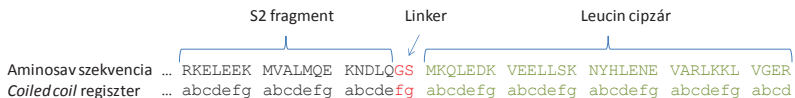
	Uniprot ID	Régió	Szekvencia
Simaizom	P10587	849-899	PLLQVTRQEEEMQAKDEELQRTRKERQQKAEAEELKELEQKHTQLCEEKNDLQ
Kagyló vázizom	P24733	835-885	PLLSIARQEEEMKQLKQMDKMKEDLAKTERIKKELEEQNVTLLEQKNDLF

Nem regulált miozinok

Gerinces vázizom	Q5SX39	842-892	PLLKSAETEKEMANMKEDFEKAKEDLAKSEAKRKELEEKVMALMQEKNDLQ
Szivizom	Q02566	840-890	PLLKSAETEKEMANMKEEFGRVKALEAKSEARKKELEEKVMVSLLEQEKNDLQ
Coiled coil regiszter			defgabcdefgabcdefgabcdefgabcdefgabcdefgabcdefgabcdefgabcde

2. táblázat. A proximális S2 fragmentum szerepére a különböző szabályozás alatt álló miozinokból származó fragmentumok stabilitásnak összehasonlításából következtítettünk. A hidrofób magot alkotó a-d pozíciók félkövérrel jelöltek. Az a-d pozícióban nem kanonikus oldalláncokat pirossal, az e-g pozíciók között kedvező ionos kölcsönhatás kialakítására képes aminosav párokat kék színnel jelöltem.

A kísérletben résztvevő fehérjék C-terminálisára az élesztőből származó GCN4 transzkripciósi faktor Leu-cipzár motívumát fuzionáltattuk. A fúzió célja, hogy az olyan alacsony stabilitással bíró *coiled coil* is, mint a kagylóból származó S2 darab bizonyos mértékben stabilizálódjon. Mivel valamennyi konstrukció felépítése azonos, a vizsgálatok során megjelenő különbségek csak és kizárólag a miozin lánc stabilitásától függenek. A fúziós konstrukció megtervezésénél figyelembe kellett venni, hogy az S2 szakasz heptád regisztere szinkronban legyen a Leu-cipzár regiszterével (2222. ábra). Ellenkező esetben nem alakul ki szabályos szerkezet, a regiszter elcsúszásának helyén egy törés alakul ki az amúgy merev



22. ábra. Fehérje szekvencia és coiled coil heptádregiszter az S2 és a GCN4 leucin cipzár találkozásánál.

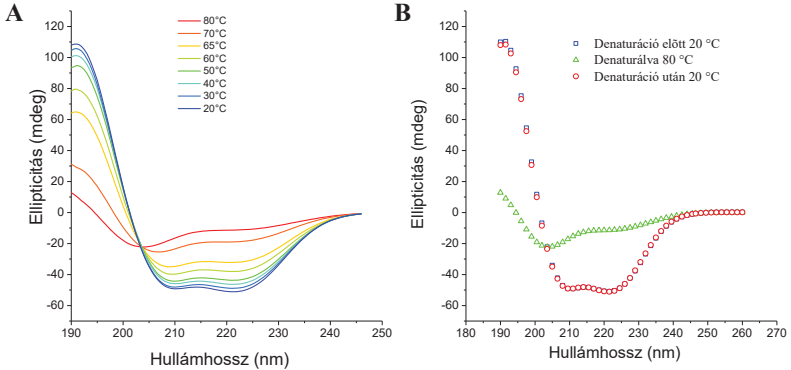
szerkezetben, bár erről egyelőre nincs atomi felbontású ismeretünk. Megjegyzendő hogy bizonyos esetekben, a *coiled coil* regiszter elcsúszásának akár fontos szerepe is lehet (50).

Hipotézisünk szerint azoknál a miozinoknál, ahol a ki- és bekapcsolás a miozin szerkezeti átrendeződésével jár, ott a proximális *coiled coil* szerkezetek gyengébbek lesznek. Stabilitásuk, feltehetőleg azért lesz kisebb, mert a kikapcsoláskor részben letekerednek. Ezt a stabilitásbeli különbséget legkönnyebben cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia, és differenciális pásztázó kalorimetriás (DSC) módszerrel vizsgálhatjuk.

A CD mérések három kérdésre adtak választ:

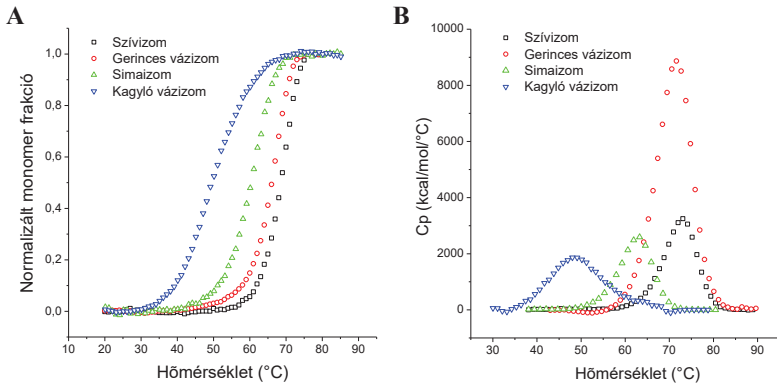
- Egy adott hőmérsékleten meg győződhetünk, hogy a vizsgált fehérje fragmentumok valóban α -helikális *coiled coil* szerkezetet vesznek fel. Erre az α -hélixekre jellemző 208 -, és 222 nm-en látható minimum megléte és aránya utal. Tapasztalatok alapján a *coiled coil*-oknál $\theta_{222}/\theta_{208} > 1$ (89).
- Közvetlen követhető a másodlagos szerkezetek arányának változása a hőmérséklet függvényében, amiből következtethetünk a szerkezetek stabilitására.
- A kalorimetriás módszerek megfelelő alkalmazásához számos feltételnek kell megfelelnie a kísérleti rendszernek: a) hőmérséklet függvényében bekövetkező denaturációnak reverzibilisnek kell lennie. Ez biztosítja, hogy minden hőmérsékleten be tud állni egy egyensúly a natív és denaturált forma között. b) a kapott adatok kiértékeléséhez szükséges, hogy ismerjük, milyen útvonalon zajlik a denaturáció – Ezeket az információkat mind megtudjuk a CD spektroszkópiás mérések eredményéből!

A hőmérséklet hatására bekövetkező szerkezeti változásokat a 2323. ábra mutatja. Az ábra A) részén azt látjuk, hogy az egyre magasabb hőmérsékleteken egyre csökken az hélix tartalom, amit az α -hélixekre jellemző 222 nm-es negatív csúcs fokozatos eltűnése jelez. A különböző hőmérsékletekhez tartozó spektrumok ~203-nm-en metszik egymást. Az ilyen úgynevezett izodikroikus pontok jelenléte arra utal, hogy a szerkezeti átrendeződés α -hélix \rightarrow *random coil* útvonalon zajlik (90). Az ábra B) része a denaturáció reverzibilitását mutatja be: a felfűtés előtti, és utáni spektrum egybeváág, míg a 80 °C-ra felfűtött minta *random coil*-ra jellemző spektrumot mutat.



23. ábra. A hőmérséklet hatása az S2 fragmentumok másodlagos szerkezetére. A) a különböző hőmérsékleteken felvett CD spektrumok. Figyeljük meg a 203 nm-en látható izodikroikus pontot. B) A denaturáció reverzibilitását a felfűtés előtti és a visszahűtött spektrumok átfedése mutatja.

A szerkezetek hőmérsékletfüggésének pontos méréséhez, a hélixekre jellemző, karakterisztikus 222 nm-en követték a CD jel változását 2424. ábra). Mint a spektrumokon látható, az S2 konstrukciók a *coiled coil*-okra jellemző kooperatív szerkezetei átalakulással rendelkeznek, azaz a szerkezet egy meghatározott hőmérsékletig stabil, ezt meghaladva, a szerkezet felbomlik, elveszti hélixtartalmát. Az ilyen átalakulások rendelkeznek egy karakterisztikus hőmérséklettel, ahol a szerkezetek megoszlása a natív és denaturált állapot



24. ábra. Az S2 fragmentumok szerkezetvizsgálata A) CD és B) DSC módszerekkel. Jól látható, hogy az eltérő stabilitású fragmentumok más-más hőmérsékleten bekövetkező kooperatív átalakulása.

között 50-50%. Ezt a hőmérséklet értéket (T_m) a Hodi Zsuzsanna 2006-os cikkében leírt módon határoztam meg (3.3. fejezet), melyeket a 3. táblázat tartalmazza (82).

A 2323. ábra tanulságaként megállapíthatjuk, hogy az S2 szerkezetek átalakulása kooperatív, kétállapotú és reverzibilis ami lehetővé teszi, hogy a stabilitásukat DSC segítségével is hatékonyan megmérjük. A DSC mérésekkel kapott spektrumok a 2424. ábra B) részén láthatóak. Itt is megfigyelhető a kooperatív átmenet, megfelelő kiértékelést követően meghatározható a szerkezetek olvadáspontja, melyet ugyancsak a 3. táblázat foglal össze.

Regulált miozinok

	CD	DSC
Simaizom	60,15	62,10
Kagyló vázizom	50,15	49,04

Nem regulált miozinok

Gerinces vázizom	65,95	71,19
Szívizom	69,15	72,54

3. táblázat. A S2 szerkezetek CD és DSC módszerekkel meghatározott olvadáspont értékei (°C)

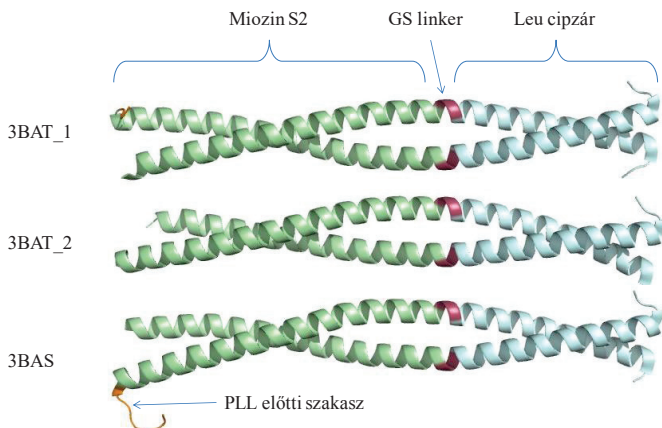
A meghatározott hőmérséklet adatokból jól látszik, hogy a regulált miozinoknál rendre alacsonyabb olvadáspontokat kapunk, mint azoknál a miozinoknál, melyek szabályozása a vékony filamentumhoz kötött. Ez a tulajdonság erősíti azt az elképzelést, miszerint a szabályozott miozinoknál a kikapcsolt szerkezet kialakulását e flexibilis elemek beépítése segíti elő. Persze meg kell említeni azokat az eredményeket is, melyek a klasszikus értelemben vett nem regulált miozinoknál is kimutatja, vagy valószínűsíti a jellegzetes kikapcsolt konformációt (48, 91). Ezekben az esetekben azonban feltételezhetőleg nem fizioiógias szabályozási formáról van szó, hanem a filamentum kialakulását megelőző átmeneti állapotokról.

A táblázatban látható különbségeknek az aminosav szekvenciában is nyomára bukkanhatunk, ha számba vesszük a kedvező és kedvezőtlen ionos intra-, interhelikális interakciókat, valamint a kedvezőtlen aminosavak számát a hidrofób varratban, azt látjuk, a stabilitást csökkentő hatások száma a szabályozott miozinokban feldúsulnak (2. táblázat).

4.1.2. Az S2 fragmentum atomi szintű szerkezete

Bár a vizsgálatban résztvevő, puhatestű vázizom S2 fragmentum kristályszerkezetét is publikáltuk (92), melynek meghatározását bostoni együttműködő partnerünk Carolyn Cohen vezette kutatócsoport végezte, sem a kristály előállításában sem a szerkezet megoldásában nem vettem részt. Szerencsénkre két különböző körülmény között, két eltérő tércsoportba (P2₁, C2) sorolható fehérjekristályok képződtek, melyek segítségével sikeresen meghatároztuk az S2 *coiled coil* 2,3 Å felbontású térszerkezetét. Az elért felbontás mellett, hogy meghaladta a 2006-os Nature-ben közölt térszerkezet felbontását (93), láthatóvá tette a két fejcsoport találkozását jelző „PLL” aminosavak is. A szerkezetek a Protein Data Bank térszerkezet adatbázisba 3BAS és 3BAT kóddal kerültek be.

A meghatározott térszerkezetek alapján a proximális S2 α -helikális *coiled coil*-t képez, a várakozásoknak megfelelően nem látni torzulást a fúziós partnerek határán, ami megerősíti, hogy a *coiled coil* regiszter nem sérült. A két kristályból 3 dimer szerkezet tudtunk meghatározni, ami annak köszönhető, hogy a 3BAS modellben 2 dimert tartalmazott a kristálycella. A szerkezetek szalagábrázolással bemutatott modelljei a 25. ábra láthatóak.

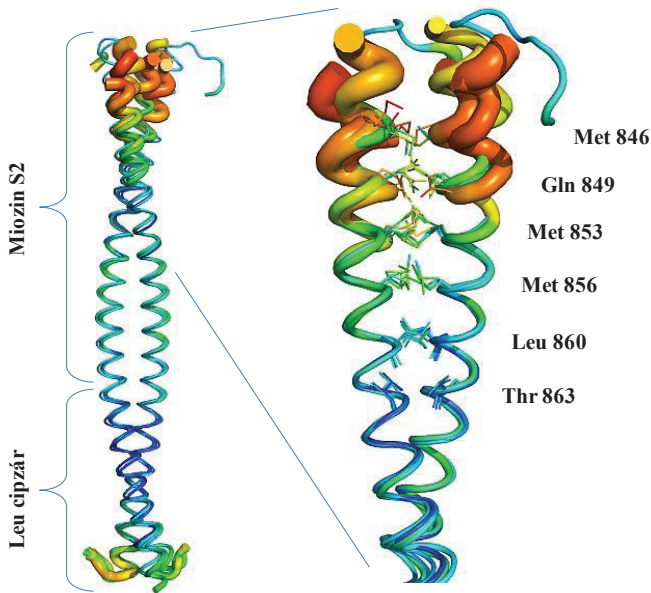


25. ábra. A két kristályból meghatározott 3 dimer szerkezet. A 3BAT kódú szerkezeti file-ban két szerkezetet tartalmazott a kristálycella. A szerkezeteken bejelöltem narancssárgával azokat az aminosavakat, melyek az S2 előtt a miozin fejéhez tartoznak, illetve a Leu-cipzár és az S2 régiót összekötő linkert. (Ezt és a dolgozatban szereplő valamennyi térszerkezeti ábrát az ingyenesen használható PyMol programmal készítettem)

Az irodalomból ismert további miozin S2 szerkezetek is: ugyancsak a laboratóriumunkban végzett munka eredményeként jelent meg az első publikált miozin S2 térszerkezetet (1NKN)

(93), majd a nem szabályozott szívizom miozin S2 darabját is sikerült kristályosítani (2FXO) (91) a Max Planck intézet munkatársainak.

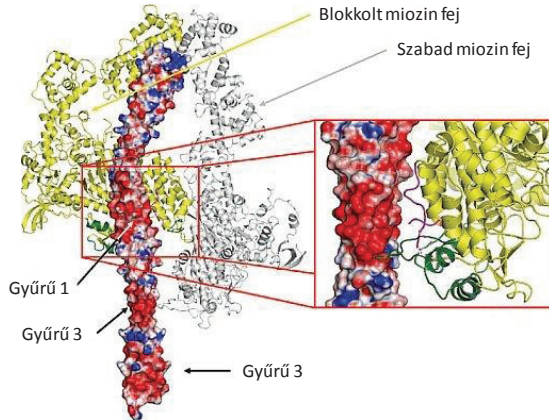
A proximális S2 fragment a miozin kikapcsolt szerkezetének kialakításában betöltött szerepére utal a fragment N-terminálisa felé növekvő flexibilitása a szerkezetnek, amit a növekvő B faktor árul el nekünk, kiegészítve a hidrofób varratot alkotó aminosavak egyre változatosabb szerkezetével. Ezt a 26. ábra láthatjuk, ahol a 1NKN, 3BAS és 3BAT modellekben lévő, összesen 4 S2 dimer szuperponált szerkezete látható. A speciális csőmodell vastagsága és színe arányos az adott szakasz B faktorával.



26. ábra. Az egymásra illesztett szerkezetek árulkodnak az S2 fragmentum flexibilitásáról, melyre a B faktor szerinti színezés és a hidrofób varrat oldalláncainak egyre lazábban megszabott konformációi utalnak.

A szívizomból származó konstrukció az S2 egy jóval nagyobb darabját tartalmazta a molekula N-terminálisának irányába. A szerkezetmegoldás eredményeként kapott szabályos *coiled coil* felszínén elektrosztatikusan töltött sávok figyelhetők meg, melyek, mint Blankenfeldt-ék molekuladokkolációs kísérletekkel bemutatták, képesek lehetnek a

motordoménhez kötődni (27. ábra), ezáltal stabilizálni a miozin kikapcsolt szerkezetét. A mi szerkezeteinkben ezek a „gyűrűk” a konstrukció határán kívül estek, de a szekvencia hasonlóság alapján a miozinokban elég széles körben előforduló motívumról van szó, ami arra utal, hogy a miozin szerkezetátrendeződéssel járó ki és bekapcsolása egy általános módja



4. táblázat. Blankenfeldt által megfigyelt negatívan töltött sávok megtalálhatóak a többi konvencionális miozin S2 régiójában, ami arra utal, hogy a visszahajlott, kikapcsolt szerkezet az egész miozin osztályra általánosan jellemző.

	Fehérje	Szekvencia												
		1849	1860	1870	1880	1890	1900	1910						
Regulált	Simaizom	PLIQVTRQ	EEEMQAK	DEELQRT	KERQQK	ARAELEQ	KHTQL	CEKNNL	QEKLQAE	FTLYAEAE				
	Kagyló vázizom	PLLSIARQ	EEEMKEL	KQMDRM	KEDLAK	TERIKKE	LEEQNVT	LEEKNDL	FLQLQTL	LEDSMGDQE				
Nem regulált	Gerinces vázizom	PLLKSAETE	KEEMANMK	EEFGRV	KDALEK	SEARRK	LEEBER	MVSLLE	QEKNDL	QLQVQAE	QDNLNDAE			
	Szívizom	PLLKSAETE	KEEMANMK	EDFEAK	EDLAKS	EAARRK	LEEBERM	VALMQE	KNDL	QLQVQAE	EADGLADAE			
		konstrukcióink határa								Sáv I				
	Fehérje	Szekvencia												
		1920	1930	1940	1950	1960	1970	1980						
Regulált	Simaizom	EMRVR	LAARKQ	LEEBIL	HEMAR	IEEEER	RSQQL	QAEK	KRM	QQMLD	LEEQLE	EEEAAR	QKQLQE	
	Kagyló vázizom	ERVEK	LIMQK	ADFES	QINLE	EEERL	DEEDAA	ADLEGI	KKFM	EADNAN	LKKD	DIGDLE	NLTLQKAE	QD
Nem regulált	Gerinces vázizom	ERCDQL	IKNKIQ	LEAKV	EMTER	LEDEEE	EMNAEL	TAKR	RRNLE	DECS	ELKK	DIDDL	ETLAK	VEKE
	Szívizom	ERCDQL	IKNKIQ	LEAKV	EMTER	LEDEEE	EMNAEL	TAKR	RRNLE	DECS	ELKK	DIDDL	ETLAK	VEKE
		Sáv II				Sáv III								

lehet a szabályozásnak.

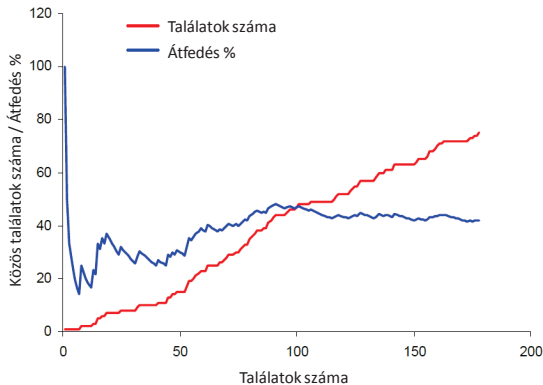
A kagyló vázizomban, ahol a reguláció az RLC Ca^{2+} kötésén keresztül okozza a kikapcsolt állapot kialakulását, irodalmi adatok lapján tudjuk, hogy az RLC kötése kihat a

27. ábra. Blankenfeldt felvetette, hogy az S2 felszínén lévő nagy töltéssűrűségű "gyűrűk" kötőhelyek a miozin fejek számára a kikapcsolt szerkezetben. Ezt dokkolásos kísérletekkel támasztotta alá (Blankenfeldt 2006).

4.2. CSAH szekvenciák keresése a proteomban

4.2.1. A predikciók eredménye

A CSAH szerkezetek kialakítására képes szekvenciák felismerésére két elveiben különböző módszert fejlesztettünk ki. A *scan4csah* egy pontozás alapú program, mely számba vette a hélixet stabilizáló és destabilizáló elektrosztatikus interakciókat. A pontozáshoz szükséges súlyok megállapításához egy ismert szekvencia sokasságot használtunk. Ezzel szemben az *ft_charge* programunk egy *ab initio* módszer, mely a szekvenciák töltött aminosavjainak periodicitását használja ki, így nélkülöz minden ismert szekvencián alapuló előítéletet. Az aminosav mintázattól függően a program eredménye többféle frekvencia érték is lehet, mi elvi megfontolások alapján (lásd 1.5 fejezet) a 7 aminosav hosszúságú periodicitással rendelkező fehérjékre koncentráltunk (mivel az α -hélix egy fordulata 3,6 aminosavból áll, és két fordulatonként váltakozva helyezkednek el a pozitív és negatív aminosavak.).



28. ábra. A grafikonon a két módszer által CSAH képzésre alkalmas fehérjék közötti átfedést mutatja be.

Mindkét módszer számos fehérjében felfedezte a kérdéses töltésmintázatot. A kétféle módszer használata, és a köztük lévő nagyfokú egyezés a predikciók jóságát erősíti. A találatok közül néhány kiválasztott szekvenciát kísérletesen is megvizsgáltunk, hogy a predikciók megbízhatóságát ellenőrizzük. A 28. ábra a két módszer közti átfedést mutatja be: eszerint az első száz találatot figyelembe véve azt kapjuk, hogy az átfedés 47 %-os, és ez az arány a találatok számával csak lassan kezd csökkenni, ahogy egyre több és több fehérjét

veszünk bele az összehasonlításba. Természetesen a két módszer által meghatározott fehérje régiók ugyancsak átfedtek. Mindez, figyelembe véve a két módszer közti elvi különbséget, nagyon jó egyezésnek számít.

4.2.2. CSAH tartalmú fehérjék a proteomban.

A két módszer első 100 találatá között 47 átfedő fehérje volt, melyek közül számos közeli ortológjai egymásnak. A 47 szekvencia reprezentánsait az 5. táblázat tartalmazza. A találatok részletes átvizsgálása után megállapíthattuk, hogy a CSAH motívumok szinte minden rendszertani kategóriában képviselve vannak, és a legváltozatosabb sejten belüli funkciót betöltő fehérjék szekvenciájában találkozhatunk vele. A 5. táblázatban lévő fehérjék doménösszetételét a 29. ábra mutatja, melyen feltüntettük a fehérjékre jóslott *coiled coil* predikció eredményét is. Mint a bejelölt részek mutatják, gyakran átfedést találunk a CSAH régiók és a prdiktált *coiled coil*-ok között. Nem meglepő módon a listában szerepeltek a már ismert miozin 6 és kaldezmon szekvenciák (részletesen e két fehérjéről 1.4 és 1.5 fejezetekben olvashat), de a miozin 10, a benne található CSAH rövid mérete miatt nem teljesítette a predikció hossza vonatkozó minimál követelményét (3.8.1 és 3.8.2 fejezetek)

A legelőkelőbb helyzetű a predikciónak, a mindkét algoritmus szerint első helyezett, élesztőből származó mannoziltranszferáz MNN4 fehérje, mely hosszú és szabályos CSAH motívuma több mint 60 aminosavon keresztül tökéletes szekvencia mintázatot mutat. II-es típusú integráns membránfehérje, azaz a peptidlánc C-terminálisához közel található CSAH motívum a sejt plazmájában lokalizált. Deléciós mutánsokkal bizonyított a CSAH molekularészlet esszenciális (94) szerepe.

A találatok között kiemelkedően nagy számban találhatók translációs faktorok: a 2010. szeptemberi SwissProt release-ből 147 bakteriális IF2-ben, 15 eukarióta eIF3-ban, 10 riboszóma „újrhasználósító” faktorban valamint 3 egyéb iniciációs faktorban találtunk CSAH szekvenciát. A transzkripciós folyamatok intenzív kutatásainak köszönhetően, mint kiderült az irodalomban már felfigyeltek erre a konzervált nagy töltéssűrűségű részre, sőt a translációban betöltött linker funkcióját is leírták (95, 96).

A találatok között volt egy nukleoporin is: GLE1. A GLE1 a nukleáris membrán citoplazmatikus oldalán található, és természetesen a nukleo-citoplazmatikus transzport folyamatait segíti elő. Habár a GLE1 által működtetett transzportfolyamat interakciós hálózata nagyon konzervált (97), CSAH szekvenciát csak az élesztőnél találunk, ortológjainak

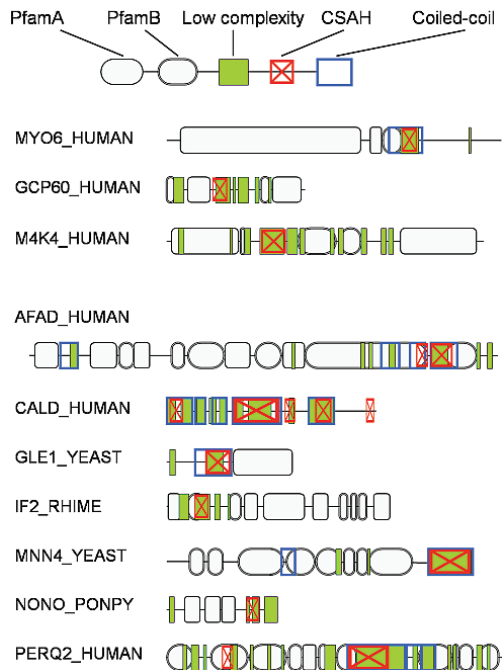
vizsgálata, hasonló moduláris összetétel mellett konvencionális *coiled coil* jelenlétét jelezte elő.

GCP60 egy 60 kDa molekulatömegű Golgi komplex fehérje. A fehérje szerepet játszik a Golgi komplexum szerkezetének kialakításában fenntartásában valamint az endoplazmatikus retikulum és a Golgi komplex közötti rövid távú transzportban (98, 99). (Érdekességgépp érdemes a bevezetőben leírtakat felidézni, miszerint a szintén CSAH-ot tartalmazó, miozin-6 esetében ugyanezeket a funkciókat leírták!) A molekula közepén található, kb 50 aminosav hosszúságú CSAH motívumot N-terminális irányból ACB (Acil-CoA Binding) domén, C-terminális oldalról GOLD domén határolja. Ebben az esetben valószínű, hogy e két funkcionális szerkezeti egység megfelelő térbeli elválasztása CSAH régió feladata.

Az afadin homodimer multidomén fehérje sejtdhéziós kölcsönhatásokban szerepel. Egy rövidebb (S) és egyhosszabb (L), CSAH régiót is tartalmazó, splice formája ismert. (100) Érdekessége a molekulának, hogy annak ellenére, hogy az L-afadin dimert képez, és a CSAH régió közvetlen szomszédságában aktin kötő domén található, még sincs aktin keresztkötő tulajdonsága. Ezt azzal magyarázhatjuk, hogy a CSAH motívum a molekula C-terminálisának dimerizálásával esetleg ezt megakadályozhatja.

A NONO (non-POU domain containing octamer-binding protein), egy nukleáris lokalizációjú fehérje. A splicing folyamatában résztvevő fehérjékkel komplexet képez. RNS kötő doménjei segítségével járul hozzá a mRNS-ek érési folyamatához (101). Hasonlóan a GLE1 nukleoporinhoz, számos ortológjának a CSAH motívummal homológ pozícióban konvencionális *coiled coil* szekvenciát találunk.

A harmadik expresszált fehérje az M4K4 (Mitogen activated protein kinase kinase kinase 4), mint neve is utal rá a sejten belüli jelátviteli folyamatokban játszik szerepet (102). Az M4K4 fehérjében a CSAH motívum minden esetben C-terminális irányban található a kináz doméntól, és N-terminális irányba az interakciós partnerekkel kölcsönható, variábilis szakasztól. Megjegyzendő, hogy CSAH viszonylag kevés M4K4 ortológban található ugyanakkor számos ortológban helyette konvencionális *coiled coil* jelenlétével találkozunk (2. Függelék)

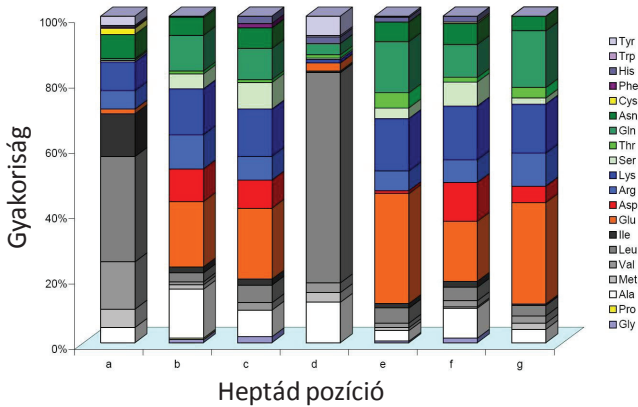


29. ábra. Az 5. táblázatban látható fehérjék domén szerkezete. Feltüntetve, a prediktált CSAH régiókat, megfigyelhető e régiók gyakori átfedése prediktált coiled coil-okkal.

4.2.3. Különböző predikációs módszerek egymásnak ellentmondó ítéletei

Ha *in silico* szerkezetvizsgáló módszerekkel elemezzük a prediktált, és kísérletesen megismert CSAH szekvenciákat, azt kapjuk, hogy ezek a szekvenciák *coiled coil* predikációs programmal *coiled coil*-nak, rendezetlen predikációs programmal rendezetlennek tűnnek. A 5. táblázatban feltüntetett CSAH-nak prediktált aminosavak 88 %-a a COILS programmal (103, 104) *coiled coil*-nak, 67 %-a az IUPred-del (105, 106) rendezetlennek ítéltetett.

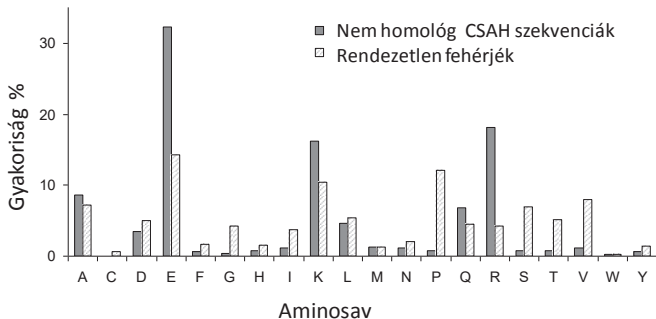
Arra a kérdésre, hogy ezt speciális motívumot miért találják a prediktáló programok alkalmasnak arra, hogy a konvencionális *coiled coil*-okkal megegyező módon, hidrofób varrat segítségével stabil dimert alakítsanak ki, annak ellenére, hogy a CSAH szekvenciákban nyomát sem látjuk az *a* és *d* pozíciókra jellemző hidrofób aminosavaknak, választ adhat, ha megvizsgáljuk a konvencionális *coiled coil*-ok heptád pozíció specifikus aminosav összetételét:



30. ábra. A konvencionális coiled-coil-okra jellemző aminosav összetétel az egyes heptád pozícióban.

Mint látható, a hidrofób varratot alkotó, úgynevezett „core” pozíciók kivételével minden pozícióban nagy a töltött aminosavak aránya, ami akár az 50%-ot is meghaladhatja. A *coiled coil*-ok szuperhelikális szerkezetét ismerve, nem meglepő, hogy a hagyományosan hélix-törőnek tartott aminosavak (Pro, Gly) minden pozícióban nagyon ritkán fordulnak elő. Ehhez az analízishez a COILS *coiled coil* predikációs programmal vizsgáltam 419 fehérje annotáltan *coiled coil*-t képző régióját (104). A két motívum keresztpredikációját az irodalomban utánunk mások is felfedezték (107).

Ezt a szerkezetet a rendezetlenség prediktorok is félre prediktálják. Itt ugyancsak a töltött aminosavak magas aránya lehet, ami a predikációs programokat eltéríti 31. ábra. Ám nagyon fontos különbség, hogy a CSAH szekvenciákból, a rendezetlen fehérjékre jellemző, erős hélix-törő aminosavak (Pro, Gly) teljesen hiányoznak.



31. ábra. A CSAH és rendezetlen fehérjék aminosav kompozíciójának összehasonlítása. A rendezetlen fehérjékre vonatkozó adatok Tompa Péter 2002-es cikkéből származnak (108).

4.2.4. A predikciók kísérletes ellenőrzése

A két predikációs módszer kísérletes ellenőrzésére a konszenzus találatok közül 3 fehérje CSAH-nak prediktált régióját klónoztam és expresszáltam *E. coli* heterológ expressziós rendszerben. A fehérjék kiválasztása során a következő szempontokat vettük figyelembe:

- Jó helyezést ért el a predikciókban.
- Olyan fehérjét kerestünk, melyről van szerkezeti, vagy legalább funkcionális információ. Sajnos általánosan elmondható volt a találatokról, hogy nagyon kevésbé kutatott fehérjék, így többnyire csupán predikciókra kellett támaszkodnunk, amit tovább nehezített, hogy a fehérjékkel végzett kísérletek során gyakran a CSAH szegmenst nem tartalmazó fragmentumot használtak.
- Ahol a CSAH szekvencia lehetőleg konzervált, ezzel biztosítva, hogy az adott fehérjében nagy jelentőséggel bíró szakasról van szó.
- és „érdekesnek” tekinthető, megismerése fontos tudományos hozzájárulás lehet.

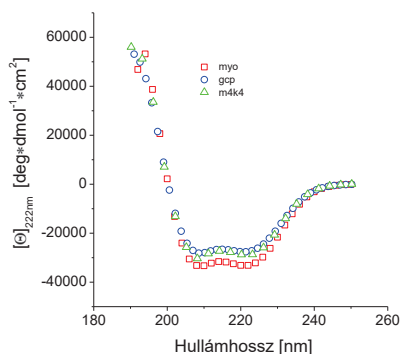
A konzerváltság, és a kísérletes információ azért szükséges, hogy segítségükkel próbáljunk valamiféle funkciót a motívumhoz hozzárendelni. A bevezetőben részletesen ismertetett miozin 6-on kívül a GCP60, és az M4K4 CSAH képzésre prediktált szekvenciáját választottuk kísérletes igazolásra. (Az első helyen végzett MNN4 fehérje CSAH motívumát nem vettük bele a kísérletbe, mert a szekvenciájában megtalálható KKKKEEEE_n ismétlődés α -helikális szerkezetét korábban már igazolták (67, 70, 71)) Az expresszált fehérjék aminosav sorrendjét a 6. táblázat tartalmazza.

Peptid	Uniprot ID	Régió	Szekvencia
GCP60	Q9H3P7	182-235	MEKEEQEKRRKEEEERRRRREBERLQKEEKRRREBERLRRREBERRRRIIEER
M4K4	O95819	361-425	REARRQERERQRREQEEKRRLLELERRRRKEEERRRAEEEKRRVREQEYIRRLQLEER QRHLE
Miozin 6	Q9UM54	933-985	MEKERKRREDEKRRRKEEERRMKLEMEAKRKQEEERKKREDEDEKRIQAEV

6. táblázat. A predikciók ellenőrzésére a táblázatban látható szekvenciákat klónoztam és expresszáltam, majd CD spektroszkópiás módszerrel vizsgáltam a kialakuló másodlagos szerkezetet.

Az expresszált fehérjék tisztítását követően a hélixtartalmat CD spektroszkópiás módszerrel ellenőriztem, ami kifejezetten alkalmas az α -hélixtartalom vizsgálatára, mivel az α -hélixek jellegzetes csúcscsal rendelkeznek a 222 és 208 nm-en.

Mint 32. ábrán látható, valamennyi kísérletesen ellenőrzött szekvencia magas α -hélix tartalommal rendelkezik. A becült α -hélix tartalomakat a 7. táblázatban tüntettem fel. A becsléseket a DICHROWEB (109) weboldalon ingyenesen használható CDSSTR szoftverrel végeztem (110).



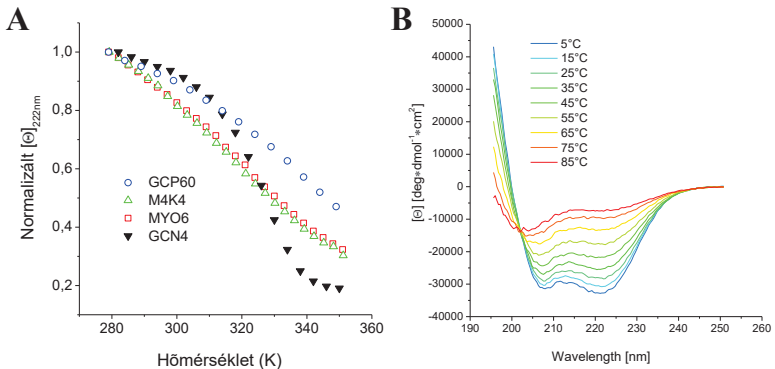
32. ábra. Az expresszált CSAH motívumok CD spektruma natív körülmények között. Mindhárom fehérje esetén nagyfokú α -hélix tartalmat látunk, melyre a 208 és 222 nm-en látható minimumok utalnak

A helikális szerkezet stabilitásának vizsgálatára a CD spektroszkópiás módszerek nagyon hatékonyak: a hélixekre jellemző 222 nm-es minimumon követhetjük valamilyen környezeti változó α -hélix tartalomra kifejtett hatását. Mi a hélixek hőmérséklettel, sókoncentrációval, és pH-val szemben mutatott ellenálóképességét vizsgáltuk.

Protein	Segment	α -helix	β -strand/turn	Random	RMSD
M4K4	417-480	70%	10%	13%	0.008
GCP60	183-238	62%	17%	23%	0.005
MYO6	933-985	75%	13%	12%	0.003

7. táblázat. Az egyes fehérjék CD spektrumaiból dekonvolált másodlagos szerkezet összetétel.

A hődenaturációs kísérletek tanúsága szerint a CSAH hélixek, a *coiled coil*-okkal ellentétben nem kooperatív módon denaturálódnak, hanem a hőmérséklet növelésével fokozatosan vesztik el hélixtartalmukat. Valamint a letékeredés, a szerkezet egyszerűségénél fogva talán nem meglepő módon reverzibilis, a denaturációt követően a rendszert lehűtve a hélixek visszanyerik natív spektrumukat. A spektrumok vizsgálata, hasonlóan az S2 *coiled-coil*-okhoz megmutatta, hogy a denaturáció kétállapotú, melegítés hatására az α -hélix *random coil*-á alakul. Figyelemre méltó, hogy a szerkezetek még 80 °C-on is milyen magas hélixtartalommal bírtak. Mivel a letékeredés nem kooperatív, a miozin S2-nél alkalmazott kiértékelő módszereket nem használtam, de egy ilyen letékeredés nem is jellemezhető egy konkrét olvadásponttal.

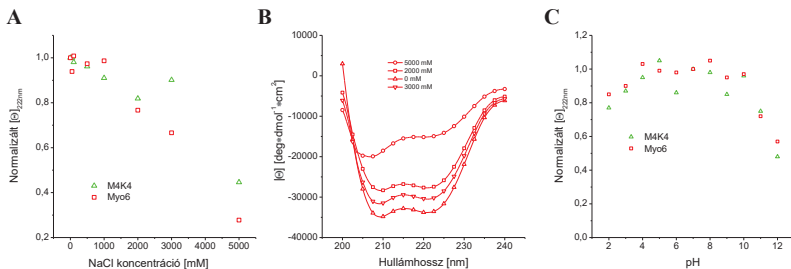


33. ábra. A) a CSAH motívumok szerkezetének megváltozása hőmérséklet növelésének hatására. A bekövetkező nem-kooperatív átmenettel szemben a *coiled-coil*-t képző GCN4 leucin cipzár kooperatív módon vesztik el szerkezetét. B) A MYO6 CSAH motívumának letékeredése során felvett spektrumok, az S2 szerkezetekhez hasonlóan 203 nm-en metszik egymást, ami ugyancsak az kétállapotú α -hélix \rightarrow *random coil* átmenetre utal.

A hődenaturációs görbéket Peter Knight 2005-ös közleményében (73) leírtakat követve normalizáltam:

$$Norm = \frac{M}{N}$$

Ahol a 6 °C-on mért CD-értékeket tekintetem 100%-ban natívnak N , és a 0 CD értéket 100%-ban denaturáltak. M az aktuális hőmérsékleten mért CD érték.



34. ábra. A CSAH szerkezetek ellenállása különböző környezeti hatásokra. A) ionerő hatása a szerkezetre, normalizálás 0 mM NaCl-ra B) Különböző ionerőn felvett spektrumok alakja C) pH hatása a szerkezetre. normalizálás pH 7-re.

A szerkezetek ionerőre érzékenyek, ami nem meglepő, ha a szerkezetek stabilitását az elektrosztatikusan töltött oldalláncok közti ionos kölcsönhatások segítségével magyarázzuk, azonban figyelemre méltó, hogy a szerkezet milyen magas sókoncentráció mellett kezdi elveszíteni hélix tartalmát, és még 5M NaCl jelenléte mellett is jócskán helikális (34/A ábra).

A szerkezet pH függése ugyancsak azt mutatja, hogy a hélixek széles pH tartományban képesek a natív szerkezet megőrzésére, csupán a pH tartomány szélein látható az α -hélix tartalom jelentős csökkenése. Ez ugyancsak nem meglepő, hiszen a szerkezet kialakításáért felelős glutamát, lizin és arginin oldalláncok pK-ja a pH skála távoli végein található (34. ábra). A pH függés jó egyezést mutat a kaldezmion CSAH szegmensén végzett kísérletek eredményével (76).

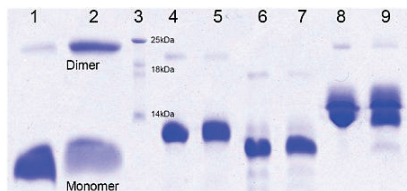
A CSAH szerkezeteket a nanotechnológiai kutatások ígéretes célpontjává teszi a szerkezet ilyen nagyfokú ellenálló képessége különböző környezeti hatásokkal szemben.

4.3.CSAH, mint dimerizációs motívum?

A CSAH motívumok lehetséges szerepei között kezdettől fogva szerepelt a dimerizáció. A szerkezet elektrosztatikus töltésmintázatából adódik annak lehetősége, hogy két α -hélix egy fordulatnyit elcsúsztatva, az ellentétes töltésű felületek egymáshoz közel kerülnek, így stabilizálhatják a dimer szerkezetet (39. ábra). A miozin-6 esetén merült fel, hogy a molekula dimert képezhet, melyben a CSAH motívumnak is szerepe lehet, de ezzel kapcsolatban meglehetősen ellentmondóak az irodalmi adatok (1, 60, 66, 111-113). Továbbá szintén a dimerizáció lehetőségét valószínűsíti, hogy számos CSAH tartalmú fehérje ortológia között konvencionális *coiled coil* tartalmú fehérjéket találunk (2. Függelék).

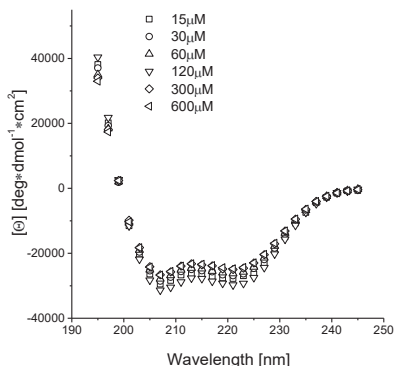
A dimerizáció lehetőségének vizsgálatára három különböző kísérletet végeztünk el: a) kémiai keresztkötéssel próbáltuk kimutatni a dimerek jelenlétét b) CD spektroszkópiás módszerrel a koncentrációtól függő másodlagos szerkezetváltozással járó folyamatokat kerestünk, c) pirénnel jelölt CSAH motívum fluoreszcenciás vizsgálata során excimer fluoreszcencia³ a megjelenése utalt volna dimer képződésre.

Keresztkötéses reakcióban a 6. táblázatban látható szekvenciák vettek részt kiegészítve egy *coiled coil* képzése során dimert képző vázizom-miozinból származó S2 konstrukcióval, melyet a fenti kísérleteknél használtunk. A reakciókat 60 perc inkubációt követően poliakrilamid gélen futtattuk meg, melynek eredménye a 35. ábrán látható. Mint az ábra mutatja, az alkalmazott koncentráció tartományban a CSAH szekvenciák keresztkötése nem volt kimutatható, csupán a biztosan dimerizáló pozitív kontrolnál látunk idővel populálódó dimer frakciót.



35. ábra. CSAH szekvenciák kémiai keresztkötése. Sávok: 1-2) miozin II S2 *coiled coil* 0 és 60 perc 3) molekulásúly marker 4-5) MYO6 0 és 60perc, 6-7) M4K4 0 és 60perc, 8-9) GCP60 0 és 60perc

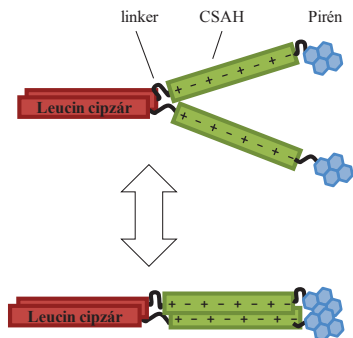
³ Az excimer szó az „excited dimer” azaz a gerjesztett dimer kifejezésből származik. A jelenség lényege, hogy a gerjesztett és alapállapotú fluorofór dimereket képezhet, és az így létrejövő „excimer” állapotban kisugárzott fény tulajdonságai eltérnek a monomer emissziótól. Az excimer állapot nagyon rövid életidejű, kialakulása speciális geometriát igényel, emiatt az excimer fluoreszcencia vizsgálata nagyon érzékeny módja a fehérjék szerkezetváltozásának követésére. A biokémiai vizsgálatokban legelterjedtebb excimer képző fluorofór a pirén (Lehrer, S.S 1997 *Methods Enzymol* 278: 286-295.)



36. ábra. A grafikonon a MYO6 CSAH szerkezetek CD spektrumának koncentrációfüggése látható. Amint látszik, nincs jelentős változás

A CD spektroszkópiás kísérletben egyre növekvő fehérjekoncentráció mellett vettük fel a CSAH fehérjék CD spektrumát. Kísérletünk szerint akkor kellene látni változást a CD spektrumban, ha az alkalmazott koncentrációtartományban bekövetkező asszociációs reakció hatására megváltozna a másodlagos szerkezet. Ez tapasztalható pl *coiled coil*-ok esetében, ahol két rendezetlen fehérje asszociációja vezet a rendezett szuper hélix kialakulásához, ami ennél fogva jelentős változást okoz a CD spektrumban.

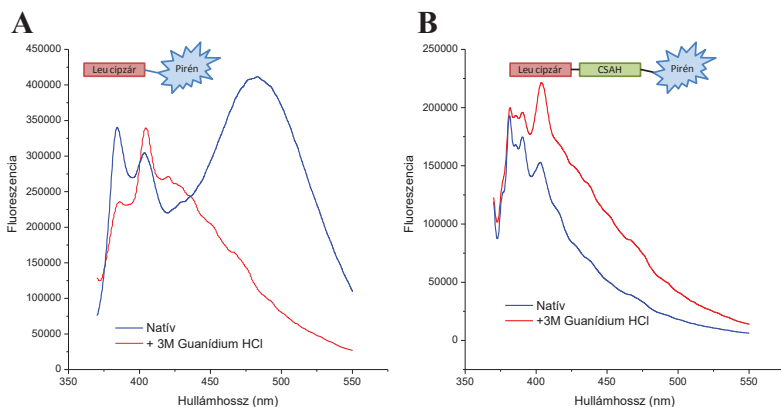
Habár a vizsgált koncentrációtartományban nem tapasztaltunk koncentrációtól függő, a másodlagos szerkezet megváltozásával járó folyamatokat, nem zárható ki, hogy az asszociáció során nem történik ilyen változás, ami detektálhatatlanná teszi a CD spektroszkópiás kimutatást. A bevezetőben ismertetett módon, a CSAH szerkezetek egymáshoz képest egy hélixfordulatnyit elcsúszva alkalmasak lehetnek arra, hogy dimert képezzenek (39. ábra). Ezt a folyamatot próbáltam a következő kísérlettel kimutatni: előállítottam az N-terminálison cisztenint tartalmazó miozin-6-ból származó



37. ábra. A CSAH motívum dimerizációra való hajlamának bizonyítása pirén jelölt konstrukcióval.

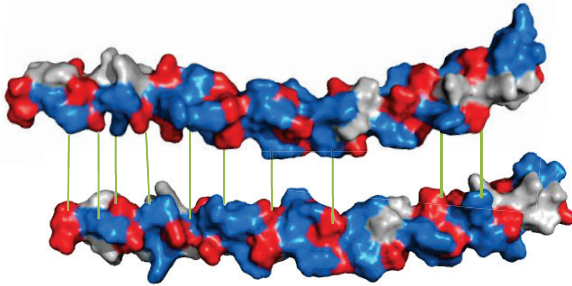
CSAH szegmenst (6. táblázat), pirénnel feljelöltem az anyagok és módszerek fejezetben leírt

módon. Elméletünk szerint, ha a két CSAH dimerizál, a két pirén olyan közel kerülhet egymáshoz, hogy képesek lesznek dimerizálni, ami a pirén dimerekre jellemző excimer fluoreszcencia megjelenését eredményezheti. A dimerizáció kimutatására/ megváltozására, a pirén-excimer fluoreszcencián alapuló vizsgálatoknak nagy hagyománya van (114-116). Mivel a keresztkötéses, és CD mérések kísérletekből úgy tűnt, hogyha képesek is a CSAH motívumok dimerizálni, a kölcsönhatás erőssége nem túl nagy. Hogy erejét megnöveljük, és így detektálhatóvá tegyük a kölcsönhatást, a CSAH motívum C-terminálisára a GCN4-ből származó leucin cipzárt fuzionáltunk a miozin-2 S2-nél ismert módon. A leucin cipzáras fúzió lényege, hogy a CSAH motívumok nagy lokális koncentrációját biztosítva elősegítse a dimerizációt (a kísérleti elrendezést a 37. ábra mutatja be részletesen). Egy ilyen szoros kapcsolat, a kialakuló aviditási effektus révén, akár több nagyságrenddel is megemelheti a kölcsönhatás látszólagos erejét (117). Pozitív kontrollként, a rendszer ellenőrzésére készítettem egy olyan konstrukciót is, ahol a biztosan *coiled coil*-t alkotó GCN4-ből származó szekvenciához fuzionáltam ciszteint, majd jelöltem pirénnel.



38. ábra. A pirén fluoreszcenciája megváltozik, ha a fluoroförök térbeli közelsége pirén dimerek kialakulását teszi lehetővé. A) dimer kontroll: a pirén jelölés a leucin cipzár végén található B) a jelölés a CSAH motívum végén található.

A fluoreszcens vizsgálatok tanúsága szerint csak a biztosan dimer konstrukció esetén láttam excimer fluoreszcenciát, ami guanidiummal megszüntethető volt. Ez utóbbi alátámasztja azt a feltételezést, miszerint az excimer fluoreszcencia a natív körülmények között létrejövő két fehérjéből álló dimernek köszönhető. Sajnos a CSAH szekvenciához kötött pirének esetében nem láttuk a jellegzetes excimer fluoreszcenciát, ami arra utal, hogy a CSAH hélixek nem dimerizálnak.

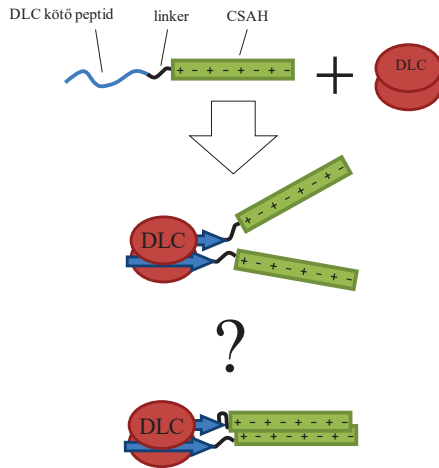


39. ábra. Az M4K4 fehérje CSAH szerkezetéről készült modell, és a lehetséges dimert stabilizáló kölcsönhatások

Ha láttunk volna excimer fluoreszcenciát, az megerősítette volna, hogy a CSAH szerkezetek képesek dimert képezni, ám így nem tudjuk kizárni, hogy esetleg a kísérleti rendszer hibájából zárult a kísérlet negatív eredménnyel. A kísérletet negatívan befolyásoló tényező lehet, hogy a leucin cipzár és a CSAH között nem volt elég hosszú a linker szekvencia, ami biztosította volna az egy hélixemelkedésnyi elcsúszást a két szerkezet között. Ez nem valószínű, mivel a CSAH szekvencia végén lévő miozin-6-ból származó természetes szekvencia már kevésbé szabályos, és a motívumot 4 aminosavnyi, glicint és szerint tartalmazó linker kapcsolja a leucin cipzárhoz. Problémát okozhat továbbá, hogy az egy hélixmenettel eltolt szerkezetben a pirén molekulák már olyan távol vannak egymástól, hogy nem tudnak dimerizálni, így excimer fluoreszcenciát sem láthatunk.

Ez a kísérleti elrendezés nagyon érzékeny a geometriára, ha a molekula orientációja nem kedvez a pirén dimer kialakulására, akkor fals negatív eredményt kapunk akkor is, ha maga a molekula dimerizál. Ennek a problémának a megoldására a következő kísérleti elrendezést találtam ki: az előbb felvázolt aviditás effektust kihasználva a CSAH szekvenciát fuzionáltatnám a laborunkban nagy érdeklődéssel vizsgált 8 kDa-os dinein könnyűlanc (DYNLL2 UniProt ID: Q96FJ2) egy kötőpartnerével. A DYNLL2 natív körülmények között erős dimert képez, és az így létrejövő két kötőárorkba egymással párhuzamosan két 8 aminosav hosszú lineáris motívum kötődhet. A 8 aminosav hosszú kötőpartner, és a fúziós fehérje affinitásának összehasonlítása elárulná, hogy van-e aviditási effektus, ami egyértelműen a CSAH hélixek közti pozitív interakcióra utalna. (40. ábra) Ez a kísérleti elrendezés, ügyelve a kötőpartner és a CSAH szekvenciát összekötő linker hosszára, eldönthetné a kérdést, csupán a CSAH szegmensek antiparallel interakcióját nem zárná ki. Ez a kísérlet egyelőre csak papíron létezik, de laborunk távlati tervei között szerepel.

Itt kell megjegyezni, hogy 2010 novemberében megjelent egy publikáció, melyben a szerzők kísérletes és számítási módszerekkel mutatják ki a miozin 6-ból származó CSAH motívum dimer formáló képességét (112).



40. ábra. A CSAH szekvenciák dimerizálását bizonyító második kísérleti elrendezés. Az aviditásból fakadó affinitásnövekedés jelezne a CSAH motívumok közötti interakciót.

4.4. Molekuladinamikai szimulációk eredményei.

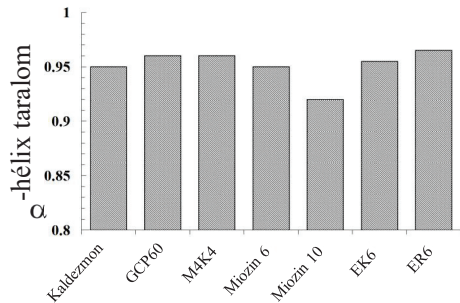
A molekuladinamikai szimulációkban a következő peptideket vizsgáltuk:

Peptid	Uniprot ID	Régió	Szekvencia
Kladezmon	P12957	268-324	EKKAAEEKQKAESEKKAEEERERAKAESEKRAAEERERAKAESEERKAAEERERAKAE
GCP60	Q9H3P7	182-235	MEKEEQEKKKKEEERRRREEEERERLQKEEEKRRREEEERLRRREERERRIEEER
M4K4	O95819	361-425	REARRQQEREQRRREQEKKRLELELERRRKEEEERRAEEKRRVEREQEYIRRQLEEEQRHLE
Miozin 6	Q9UM54	933-985	MEKERKRREDEKRRRKEEEERRMKLEMAKRRQESEERKKREDEKRC
Miozin 10	Q9HD67	814-845	EKRQESEKQKQSESEKRRREERERERERE
EK6	Szintetikus		EEEEKKWEEEEKKEEKEEKKKKEEKEEKKKKEEKEEKKKKEEKEEKKKKEEKEEKKK
ER6	Szintetikus		EEEERRRREEEERRRREEEERRRRREEEERRRREEEERRRREECERRRREEEERRRR

8. táblázat. A Molekuladinamikai szimulációban tanulmányozott peptidek.

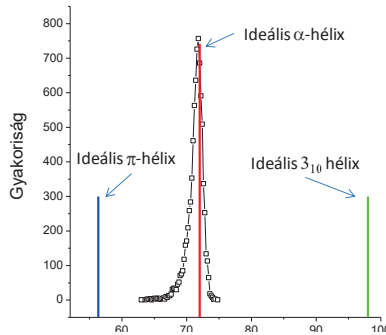
A szimulációk eredményei szerint valamennyi fehérje a szimuláció teljes 160 ns időtartama alatt megőrizte az α -hélikális szerkezetét, csupán a peptidlánc végein látható néhány aminosav letekeredése a hiányzó gerinc-gerinc hidrogénhid partnerek miatt. Mindez jól összhangban van a kísérletesen meghatározott magas hélix tartalommal.

A másodlagos szerkezetek vizsgálata megmutatta, hogy a kaldezmonon végzett munkával ellentétben (85) π -hélix kialakulása nem volt megfigyelhető a szerkezetben, mely eredmény inkább a nem megfelelő erőter alkalmazására utal (41. ábra).



A szerkezetek kísérletesen 42. ábra. A peptidek α -hélix tartalma a szimuláció alatt. megfigyelhető magas hélix tartalma önmagában nem dönti el annak kérdését, hogy a kialakuló szerkezet mechanikai szerep betöltésére alkalmas, kellően alacsony flexibilitással bír-e. Zagovic és munkatársai által publikált közleményben (118) olyan peptidek vizsgálatáról írnak, melyek, habár CD spektroszkópiás módszerrel vizsgálva nagyon magas hélix tartalmat mutatnak, a forgási sugár jóval elmarad az ideális α -hélix-től varttól. Közleményük szerint a vizsgált peptidek nem összefüggő rúdként, hanem inkább random szegmensekkel tagolt hélixként viselkednek, melyek merevsége, perzisztenciahossza, jóval rövidebb („semi-broken rod”). A rendelkezésre

álló szimulációs idő alatt azonban, nálunk nem látszottak nagyobb törések, ami arra utal, hogy a CSAH szerkezetek merev, rúdszerű struktúrát alkotnak. Ezt a viselkedést támasztja alá a forgási sugár („radius of giration”), és a vég-vég távolságok eloszlásának mononodális jellege is (43. ábra). Mindezek alapján a CSAH szerkezetek merev, rúdszerű struktúrának tűnnek, melyek képesek lehetnek az említett molekulán belüli funkciók betöltésére.



43. ábra. Az M4K4 vég-vég távolságainak eloszlása megfelel az ideális α -hélixre jellemző értéknek.

4.4.1. Mechanikai paraméterek meghatározása

A CSAH motívumok lehetséges funkciói között a távtartó és az erőkar szerep a legvalószínűbb, ezek mellett szól a legtöbb kísérletes eredmény (73, 95, 119). Mindkét funkció mechanikai stabilitást követel meg a szerkezettől, hiszen egy „lágy” polimer nem lenne képes a miozin enzimatis ciklusa során bekövetkező szerkezetváltozásból származó erőt hatékonyan mozgássá alakítani, az elnyelődne a polimer flexibilis szerkezetének megváltozása során. Ezért lényeges, hogy az erőkar megfelelő rigiditással rendelkezzen. A miozin családokban ezt a rigiditást az erőkar szekvenciájában megtalálható IQ motívumokhoz kapcsolódó kalmodulinok, vagy kalmodulin szerű könnyüláncok biztosítják (120, 121). Kérdésünk, hogy a 10-es osztályba tartozó miozin esetén, az IQ motívumot közvetlenül követő CSAH motívum rendelkezik az erő átadásához szükséges rigiditással?

A nagyobb méretű lineáris polimer mechanikai tulajdonságainak meghatározása hosszú múltra tekint vissza (DNS (122, 123), *coiled coil* (124-126), aktin filamentum (127)), de ez az egyszerű, többnyire igen rövid motívum kísérletesen nehézkesen, atomi erő mikroszkópia vagy alacsony szögű röntgenszórásos kísérletekkel vizsgálható - talán emiatt csupán egy,

viszonylag új, publikált munkában találunk erre vonatkozó adatot (128). A kísérletes megközelítés helyett, hozzánk hasonlóan más csoportok is molekuladinamikai szimulációkkal kerültek közelebb a kérdés megválaszolásához, amit a magányos hélixek kis mérete, egyszerű aminosav mintázata és szerkezete tesz lehetővé (85, 129).

A kísérletekkel ellentétben az MD szimulációk eredményeiként kapott trajektóriákból, az atomok által, a szimulációs idő alatt megtett útvonalból, közvetlenül meghatározhatók azok a paraméterek, melyek jellemzik egy lineáris polimer mechanikai tulajdonságait. A meghatározott értékek megmutatják, hogy egy adott hosszúságú polimerlánc hatékonyan betölthet-e erőkar vagy távtartó szerepet.

Gyorsasága és pontossága ellenére a szimulációkból származó adatok megbízhatóságát a szimulációhoz használt erők jelentősen befolyásolják. Ezt minden erőtereket alkalmazó modellezési, szimulációs eredmény értelmezésénél figyelembe kell venni (118, 130).

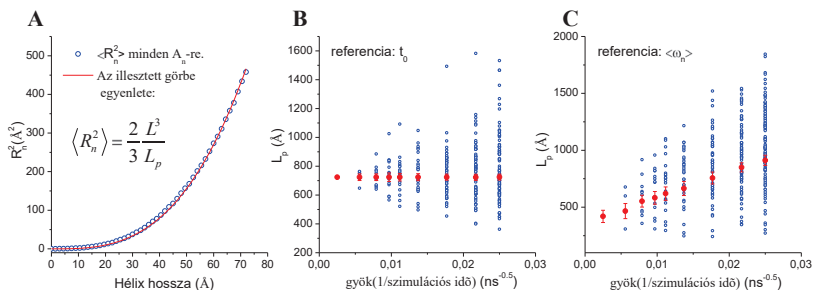
A szimulációk jó egyezést mutatnak a kísérletes eredményekkel, hiszen a szimulációs idő alatt az α -hélikális szerkezet stabil maradt, csupán kisebb fluktuációk fordultak elő a peptid gerinc konformációban. A szimulációk megmutatták, hogy a CSAH rúdszerű szerkezet alkot, de mechanikai tulajdonságait vizsgálat alá kell vetni, hogy igazolhassuk a fehérjeműködésben betöltött mechanikai szerepét.

4.4.2. Perzisztenciahossz számolása szállehajlásos módszerrel:

A 44/A ábrán a kontúrhossz függvényében ábrázolt $\langle R_n^2 \rangle$ pontok lefutása látható, mely jól egyezik azzal az elvárásunkkal, miszerint egy adott perzisztenciával bíró polimer a lánc hosszának növelésével az oldalirányú kitérés is egyre nagyobb lesz. Mint látható a kiszámolt $\langle R_n^2 \rangle$ pontok nagyon jól illeszkednek a 12. egyenletre. Ez azt is jól mutatja, hogy a lánc homogén, teljes hosszában azonos perzisztenciával bír. Ez is erősíti azt a képet, miszerint a CSAH hélixek inkább viselkednek flexibilis rúdként, mint a Zagovic és munkatársai által megfigyelt (118) „félíg törött” rudakként (semibroken rod).

A pontsorra illesztett parabola egyetlen paramétere a perzisztenciahossz, ami az illesztés jóságából láthatóan, gyakorlatilag bármely pont esetén meghatározható az illesztésre használt egyenletbe történő behelyettesítéssel. Az így kapott L_p érték azonban nem ad információt a meghatározás hibájáról. Mivel nincs mód a szimuláció többszöri megismétlésére, a becslés hibáját úgy határoztam meg, hogy a rendelkezésre álló 160 ns-nyi szimulációs időt felosztottam több kisebb részszimulációra, amiből ugyancsak meghatározható az L_p értéke. A

kapott L_p sokaságból már számolható a becslés hibája. A szimulációs időt az 1. táblázatban látható csoportokra osztottam.

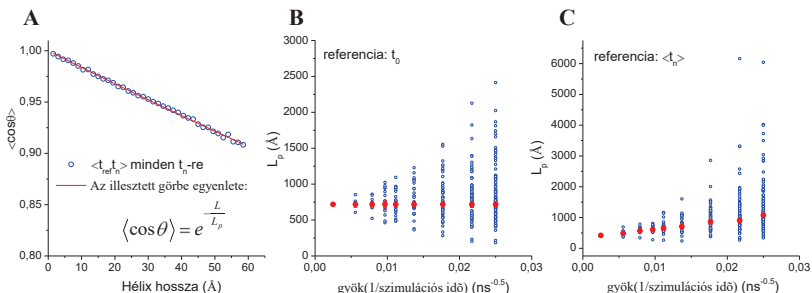


44. ábra Perzisztenciahossz meghatározása a lánc oldalirányú kitérése alapján. A) a hélix minden A_n pontjára meghatározott $\langle R_n^2 \rangle$ az L_n függvényében. B-C) Az L_p hibájának becsléséhez a teljes szimulációs időt rövidebb szakaszokra osztottam és szakaszokból számolt L_p -t (kék körök) átlagoltam az anyagok és módszerek fejezetben leírt módon. (Az átlagolt L_p : piros kör a hozzá tartozó hibával.) Az $\langle R_n^2 \rangle$ kiszámításához használt referencia: B) a 0. atomhoz tartozó tengely irányú t_0 egységvektor C) az n . atomhoz tartozó ω vektorok átlag vektora.

Az anyagok és módszerek fejezetben leírt átlagolási módszert követve ábrázoltam a kapott L_p értékeket a részszimulációs idő reciproka gyökének függvényében. A kapott pontok, az $\langle R_n^2 \rangle$ kiszámításakor alkalmazott referenciavektortól függetlenül, egy egyenesre estek (44. ábra). Az ábrázolásból következően, a pontokra illeszthető egyenes y tengelymetszete megadja a végtelen hosszú szimulációs időhöz tartozó L_p -t. A becslés hibáját a különböző részszimulációkhoz tartozó L_p hibájainak átlagaként kaptam meg. A $\langle R_n^2 \rangle$ számításának módja azonban befolyásolja az adott részszimulációs időhöz tartozó L_p -t. Ennek az az oka, hogy ha referenciaként $\langle \omega_n \rangle$ -t használjuk (44/C ábra), akkor látszólag merevebb polimer szálat kapunk, aminek két oka van: egyrészt az egymást követő szimulációs idők közötti kapcsoltág erős, másrészt a rövidebb idő alatt a szerkezet kevesebb térrészből mintavételez (a szerkezet relaxációs ideje meghaladja az adott szimulációs időt). Minél rövidebb a szimulációs idő, annál hosszabb a prediktált perzisztenciahossz. A t_0 vektort használva referenciaként, a pontok egy olyan egyenesre esnek, melynek meredeksége 0, ennek oka, hogy a részszimuláció hosszától függetlenül egy tökéletesen egyenes hélixhez hasonlítjuk az adott részsokaságot. A két módszer által, a végtelen hosszú szimulációra jóslott L_p -k közti különbség arra utal, hogy a 160 ns-os idő is kevés volt a teljes relaxációhoz, vagy a szerkezetben olyan korrelált mozgások lehetségesek, melyek kissé meghamisítják az eredményeket. Viszont meg kell említeni, hogy a két módszer közti eltérés elég csekély, az esetek többségében a jóslás hibáján

belüli. Az összes szimulációban résztvevő peptid L_p értékeinek meghatározását bemutató grafikonok a 4. Függelékben találhatóak. Az L_p értékeket a 9. táblázatban gyűjtöttem össze.

4.4.3. Perzisztenciahossz számolása irányvektoros módszerrel:



45. ábra. Perzisztenciahossz meghatározása a hélix mentén mért irányvektorok alapján. A) a hélix minden t_n vektorára meghatározott $\langle \cos \theta \rangle$ az L_p függvényében. B-C) Az L_p hibájának becsléséhez a teljes szimulációs időt rövidebb szakaszokra osztottam és szakaszokból számolt L_p -t (kék körök) átlagoltam az anyagok és módszerek fejezetben leírt módon. (Az átlagolt L_p : piros kör a hozzá tartozó hibával.) Az $\langle \cos \theta \rangle$ kiszámításához használt referencia: B) a 0. atomhoz tartozó tengely irányú t_0 egységvektor C) az n . atomhoz tartozó t_n vektorok átlag vektora.

A szálelhajlás mérésén alapuló módszerhez hasonlóan jártam el ebben az esetben is. A perzisztenciahossz hibájának meghatározásához itt is az 1. táblázatban meghatározott szakaszokra osztottam a teljes szimulációs időt, az egyes szerkezeti sokaságokra kiszámolható L_p értékeket az anyagok és módszerek fejezetben leírt módon átlagoltam, és számoltam ki a hibákat (45/B-C ábra). További hasonlóság a referencia vektorok hatása a becült L_p -re: a t_0 referencia használatakor 0 meredekségű, míg a $\langle t_n \rangle$ referencia vektor esetén pozitív meredekségű egyenesre estek az egyes részszimulációhoz tartozó L_p értékek. Az összes szimulációban résztvevő peptid L_p értékeinek meghatározását bemutató grafikon az 5. Függelékben található. Az összeggyűjtött L_p értékek a 9. táblázatban láthatók.

Az α -hélixek mechanikai tulajdonságainak elméleti vizsgálatával már foglalkozott néhány korábbi közlemény, az általuk becült 50-100 nm-es perzisztenciahossz értékkel jó egyezést mutatnak az általunk kifejlesztett módszerrel becült értékek. Ebből az látszik valószínűnek, hogy a CSAH szerkezetet stabilizáló elektrosztatikus interakciók a helikális szerkezetet ugyan stabilizálják, de magának a hélix mechanikai stabilizálásához nem járulnak hozzá. Ez a megfigyelés ellentmondásban áll egy másik közleménnyel (129), ahol a replika cserés molekuladinamikai szimuláció (REMD) tanúsága szerint a nagyfokú stabilitás éppen ezeknek

az interakcióknak köszönhető, melyek kis rugóként hozzájárulnak az egész szerkezet rugalmasságához. A kísérletes munkával is kiegészített közlemény rendkívül stabil struktúrát mutatott, melynek perzisztencia hossza 45 nm körül van⁴. Ugyanaz a kutatócsoport egy 2009-es közleményében, mely jobban támaszkodik kísérletes adatokra, már egy jóval flexibilisebb 15-20 nm-es perzisztenciahosszt határoz meg. Mivel teljes mértékben szimuláción alapuló számolásaink is a 40-50 nm-es tartományba eső L_p -t adnak, felmerül annak lehetősége, hogy az alkalmazott erőkerek a nagy töltéssűrűség miatt, esetleg nem adnak megfelelő eredményt. Mindenesetre, minden eredmény arra utal, hogy a CSAH szerkezetek stabilitása eléri azt a szintet, hogy erőkarként, vagy távtartóként funkcionáljon.

Peptid	Perzisztenciahossz (nm)				
	Szálelhajlós módszer ref: $\langle \omega_n \rangle$ ref: $\langle t_0 \rangle$		Írányvektoros módszer ref: $\langle t_0 \rangle$ ref: $\langle t_n \rangle$		Vég-vég távolság szórása alapján
Kaldezmon	52±3	56±3	44±5	35±5	44
EK6	70±2	72±2	72±4	66±4	69
ER6	40±6	44±5	40±8	30±8	30
GCP60	44±3	41±5	37±6	36±3	36
M4K4	63±4	69±4	49±5	38±5	50
Miozin 10	55±2	56±2	55±4	53±5	50
Miozin 6	36±5	41±4	38±5	33±6	33

9. táblázat. A szimulációban résztvevő peptidek különböző módszerekkel meghatározott perzisztenciahossza.

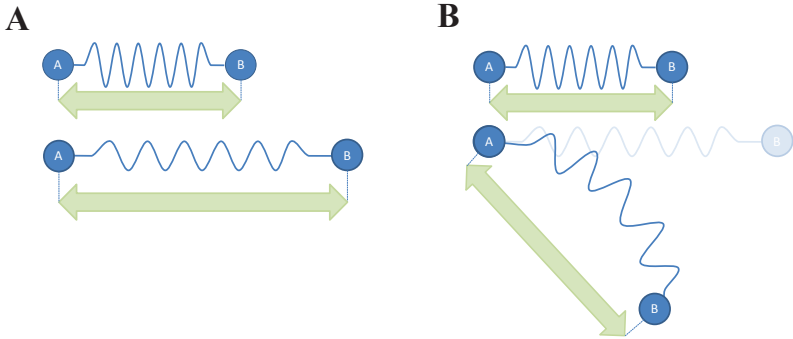
4.4.4. A hosszirányú rugalmasság meghatározása

A lineáris polimer tengelyével megegyező irányú erő hatására, az erőnek és a rugalmas tulajdonságának megfelelő mértékű megnyúlással válaszol. Az egyensúlyi MD szimuláció során az adott hőmérsékletre jellemző hőmozgás fejt ki erőt a polimerre, aminek a szerkezeti fluktuációk során tapasztalható megnyúlásából kiszámolhatjuk a polimer rugalmas paramétereit.

Azonban óvatosan kell eljárni! Nem szabad megelégedezni arról, hogy a MD szimuláció során a megnyúlással párhuzamosan oldalirányú deformációk is fellépnek a szerkezetben. Ennek hatására a vég-vég távolságok terheltek lesznek a szerkezet oldalirányú kitéréséből fakadó hatással (46. ábra). Ennek eredményeként egy jóval lágyabb rugót kapunk, hiszen úgy

⁴ A cikkben nem találunk a perzisztenciahosszra vonatkozó explicit adatot, hanem más rugalmas paraméterből származtathatjuk.

tűnik, mintha a rugónk a kis hőmozgásból származó erő hatására is nagy amplitúdóval oszcillálna. Ez a hatás a polimer hosszának növelésével meredeken nő.



46. ábra. A hosszanti rugalmasság meghatározása a vég-vég távolság mérése alapján. A) Ideális esetben, a rugó csak hosszirányú amplitúdóval rendelkezik, a vég-vég távolság és az erő között lineáris összefüggés lesz. B) Az MD szimulációkból nyert szerkezetek viselkedése: a lánc oldalirányú kitérés befolyásolja a vég-vég távolságot.

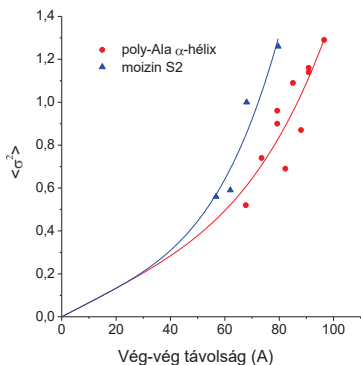
Az általunk vizsgált hélixek perzisztenciahossza a hélix hosszának 10-15 %-át is elérik, így az oldalirányú kitérés már nem elhanyagolható mértékben járul hozzá a vég-vég távolságokhoz. (Érdeemes összehasonlítani 6-os és 7-es Függelékben ábrázolt, azonos fehérjékhez tartozó szórásnégyzeteket.)

A két módszer alapján meghatározott Young modulus a legtöbb fehérje esetén eléggé hasonló. Némi aggodalomra ad okot, hogy a miozin proximális S2 hosszanti rugalmasságának meghatározásakor Karpilus és munkatársai az egyensúlyi molekuladinamikai és normálmód analízisből származó adatok alapján ennél lényegesebben flexibilisebb, lágyabb szerkezetet kaptak (26). Habár, mint a 4.1 fejezet alapján láttuk, a miozin fejek találkozásánál lévő *coiled coil* szerkezete kevésbé stabil, ami magyarázatul szolgálhat a lágyabb viselkedésre.

Peptid	Young modulus (pN/nm ²)	
	Vég-vég távolságok szórása alapján	kontúrhossz szórása alapján
Kaldezmon	8000	15600
EK6	11200	9500
ER6	8100	8500
GCP60	8800	7800
M4K4	9100	16100
Miozin 10	10200	8900
Miozin 6	8300	7900

10. táblázat. A két eltérő módszerrel meghatározott Young modulus

Azonban a cikkben leírtakat figyelmesen szemügyre véve láthatjuk, hogy a számolásaik a polimer lánc vég-vég távolságain alapulnak, ám a modulus meghatározásakor nem vették figyelembe a szál oldalirányú elhajlását. Szerencsére a publikáció tartalmazta a táblázatokat a vég-vég távolságokhoz tartozó σ^2 -kel. Ezek segítségével, újra tudjuk számítani adataik alapján az S2 *coiled coil* mechanikai paramétereit (47. ábra). Az így kiszámolt paraméterek már jóval merevebb rugóról tanúskodtak, továbbá az elméletünk szerinti számolást támasztja alá egy korábbi *coiled coil*-ok elaszticitásával foglalkozó közlemény (131), mely szintén 150 nm-t ad meg a *coiled coil* perzisztenciahosszára, és 1000 pN/nm²-t a Young modulusra.



	Általunk levezetett L_p (Å)	Young modulus pN/nm ²	Karplus szerint Young modulus pN/nm ²
Poli alanin	1214	9100	4024
Miozin S2	756	9200	3448

47. ábra. Adamovic (2008) cikkében meghatározott vég-vég távolság szórásnégyzete a polimerhossz függvényében. Folyamatos vonal: illesztés az általunk levezetett 21. egyenlettel, mely számításba veszi a polimer oldalirányú elhajlását is. A táblázat az általunk illesztett görbe segítségével meghatározott, és Karplus cikkében leírt mechanikai paramétereket tartalmazza.

5. Eredmények összefoglalása

Különböző konvencionális miozinokból származó proximális S2 fragmentumok vizsgálatából megállapítottuk, hogy erős korreláció figyelhető meg a miozin szabályozása és a két fej találkozását követő *coiled coil* stabilitása között. Az úgynevezett regulált miozinoknál, ahol a szabályozás a miozin aktivitását befolyásolja, a szabályozás a szerkezet nagymértékű átrendeződésével jár, ott a vizsgált S2 fragmentum stabilitása kisebb lesz, amit azzal magyarázhatunk, hogy a kikapcsolt állapot során a visszahajló miozin fej az S2 szakasz részleges letekeredésével jár, aminek egy instabilabb szerkezet jobban kedvez. Ezt az instabilitást az *a-d* pozíciókban található hidrophil aminosavak nagy száma, a kedvező ionos kötések hiánya biztosítja. Továbbá ez látszik a 2,3 Å felbontással meghatározott, kagylóból származó S2 térszerkezeten is, amiben a kisebb stabilitásra az N-terminális irányban növekvő B faktor, a hidrofób varratot alkotó aminosavak kevéssé meghatározott szerkezete utal (92).

Munkánk kezdetekor, a miozin-6 mediális farok doménjéről nem állt rendelkezésre kísérletes adat, a CD spektroszkópiás és keresztkötéses vizsgálatokkal ugyan mi is kimutattuk, hogy a predikciókkal ellentétben nem *coiled coil*-t, hanem egyszálú α -hélixet képez (CSAH), de a közlés elsőségéről lemaradva, csak egy konferencián mutattuk be ezen eredményünket (111). Egy néhány hónappal ezelőtt megjelent közlemény tanúsága szerint a CSAH szerkezetek képesek dimert képezni, bár nem a *coiled coil*-okra jellemző módon (112). Talán ezzel magyarázható, hogy számos törekvésünk a dimer kimutatására sikertelen maradt.

A CSAH motívum miozin-6-ban leírt előfordulása mellett, az irodalomban további független esetek felfedezése adta az ötletet, hogy nem unikális esetekről lehet szó a fehérjék világában. A négy pozitív és négy negatív aminosav ismétlődéséből létrejövő motívum felismerésére két, elveiben különböző predikciós programot fejlesztettünk, melyekkel a várakozásainknak megfelelően több tucat újabb fehérjében azonosítottuk a CSAH motívum jelenlétét. A találatok közül néhány kiválasztott szekvencia kísérletes vizsgálata bebizonyította a predikció jóságát. A módszert bemutató cikkünket (132), a 2009-es megjelenése óta számos közleményben citálták, köztük egy *Nature Reviews Molecular Cell* közleményben, ami a munka érdekességét jelzi.

Figyelembé véve, hogy a szekvenciából történő szerkezet jóslásnak milyen kiemelkedő jelentősége van a szerkezeti biológiai kutatásokban, kutatási stratégiák tervezésében, a predikciós programokat *web*-es felületen a tudományos közösség szabad felhasználására bocsájtottuk. A felhasználónak lehetősége van választani a kétféle prediktor közül, szabadon

módosíthatja a főbb paramétereket, valamint a predikciók eredményét változatos formába letöltheti, megjelenítheti. Így online, bárki ellenőrizheti a CSAH motívum előfordulását az általa vizsgált fehérje szekvenciájában. A *web-server* elérési címe:

<http://himalia.chem.elte.hu/cgi-bin/csahserver.cgi>

A *web-server*-t bemutató közlemény kéziratának publikációja a dolgozat beadásakor folyamatban van.

A CSAH szerkezetek vizsgálatokor felfigyeltünk annak nagyfokú stabilitására, kivételes ellenálló képességére hőmérséklettel, pH-val, és ionerővel szemben. Egyszerűsége, szerkezetének robusztussága kiváló célpontjává teszi szerkezeti alapkutatásoknak, nanotechnológiai fejlesztéseknek. Egy ilyen érdekes szerkezet stabilitásának megértése fontos kérdés, melyre a tudomány mai trendjét követve a szerkezet atomi szintű meghatározása alapvető törekvés. Ez irányban voltak kísérletes próbálkozásaink, ám nem jártak sikerrel: a szekvencia és a szerkezet alacsony komplexitása az NMR-es kísérleteket nehezítette meg azáltal, hogy a hasonló kémiai környezetben lévő oldalláncok nagyon rossz jeldiszerpiót eredményeztek, ami lehetetlenné tette a kiértékelést. A fehérje kristályosodását feltehetőleg a szerkezet felszínét borító nagy töléssűrűség akadályozta meg.

Szerencsére a motívum kis mérete és egyszerű szerkezete lehetővé tette, hogy atomi szintű információt nyerjünk molekuladinamikai szimulációk révén. Az ideális α -helikális szerkezetből indított szimulációk tanúsága szerint kisebb fluktuációk, és a végek letekeredése ellenére a szimulációs idő alatt a szerkezet megőrzi α -helikális jellegét. A szimulációkból látszik, hogy a szerkezet nem „töredezett botként” (*semibroken rod*), hanem egy teljes hosszában merev rúdként viselkedik. Azt, hogy a CSAH szerkezetek rendelkeznek-e a feltételezett mechanikai szerepek betöltéséhez szükséges kellő merevséggel, a lineáris polimereket jellemző rugalmas paraméterekből tudhatjuk meg. Az általunk kifejlesztett módszerek és programok segítségével a szimulációs idő alatt felvett szerkezetekből kiszámoltuk a polimerszálak perzisztenciahosszát és Young modulusát. A kapott értékek alapján kijelenthetjük, hogy a CSAH szerkezetek kellően merevek, hogy akár a miozin erőkarjaként, akár egy merev távtartóként funkcionáljanak. A molekuladinamikai szimulációkat bemutató közleményünk kéziratán jelenleg is dolgozunk.

6. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik valamilyen módon hozzájárultak munkám sikeréhez és dolgozat elkészültéhez. Elsősorban témavezetőmnek **Nyitrai Lászlónak** tartozom köszönettel, aki látott bennem kellő fantáziát, és megengedte, hogy a csatlakozzak kutatócsoportjához, aki kezdetektől irányította, támogatta a kutatásaimat, és emellett kellő szabadságot is biztosított önálló ötleteim megvalósításához. A dolgozatban bemutatott munka természetesen sok kiváló szakember együttműködéseként jöhetett létre: **Tóth Gábor** és **Gáspári Zoltán** a CSAH motívum felismerésére képes programok, valamint a *web-server* létrehozásában játszottak kulcs szerepet, **Michel Espinoza-Fonseca** a molekuláris dinamikai szimulációkat végezte, **Derényi Imre** bámulatos matematikai és fizikai ismeretei nélkül megoldhatatlan lett volna számomra a hélixek rugalmas paramétereinek kiszámítása. Továbbá köszönettel tartozom **Karos Józsefnek**, aki a DSC mérések és a termodinamikai analízisben nyújtott pótolhatatlan segítséget, **Hóbor Fruzsínának**, aki szakdolgozóként részt vett az S2 fragmentumokkal végzett munkában.

Hálás vagyok a tanszék munkatársainak a közösen eltöltött évekért, az inspiráló szellemi légkörtért. Szívesen fogok visszagondolni a közös kirándulásokra, korcsolyázásokra. Külön kiemelném **Pál Gábort** és **Kovács Mihályt** akik a tudományhoz való hozzáállásukkal, éleslátásukkal mindig lenyűgöztek.

Külön köszönettel tartozom páromnak, **Kovács Erikának**, aki amellett, hogy elviselt, támogatott a disszertáció megírása felé vezető sokszor meglehetősen rögös úton, példaképként áll előttem, Ő az egyik legkiválóbb kutató, akivel találkoztam.

Végül **szüleim** és **nagynéném** kimeríthetetlen segítségét szeretném megköszönni, akik mindent megadtak, amit egy szülő megadhat gyermekének. Kezdetektől fogva, egészen kis koromtól támogatták természettudományos érdeklődésemet, és bármilyen örültségbe is vágtam fejszémet Ők mindig mellettem álltak.

7. Publikációs lista

7.1.A doktori dolgozat témájában megjelent közlemények

Referált nemzetközi folyóiratban megjelent közlemények

Brown JH, Yang Y, Reshetnikova L, Gourinath S, **Süveges D**, Kardos J, Hóbor F, Reutzler R, Nyitray L, Cohen C. (2008): An unstable head-rod junction may promote folding into the compact off-state conformation of regulated myosins.

J Mol Biol., 375(5):1434-43.

D. Süveges, Z. Gáspári, G. Tóth, L. Nyitray (2009): Charged single α -helix: a versatile protein structural motif.

Proteins. 74(4):905-16

Z. Gáspári, **D. Süveges**, L. Nyitray, G. Tóth (2010): Consensus prediction of charged single α -helices by the CSAH server.

Kézirat publikálás alatt.

L. M. Espinoza-Fonseca, **D. Süveges**, I. Derényi, L. Nyitray (2010): Structural and dynamic properties of charged single α -helices

Kézirat előkészítése folyamatban

Magyar nyelvű folyóiratban megjelent közlemény

D. Süveges, L. Nyitray (2008): Kétszálú és magányos α -hélixek: két sokoldalú fehérjeszerkezeti elem

Biokémia (A Magyar Biokémiai Egyesület kiadványa) 32/4: 92–94.

<http://www.mbkegy.hu/docs/biokemf/pdf/b200812.pdf>

Nemzetközi konferencián bemutatott eredmények

Szóbeli prezentáció

D. Süveges, Z. Gáspári, G. Tóth, L. Nyitray (2008): Charged single α -helix: a versatile protein structural motif

4th Central European Conference, Chemistry towards biology, Dobogókő, Hungary

Poszter prezentáció

D. Süveges, Cs. Hetényi, Z. Gáspári, G. Tóth, and L. Nyitray (2005): Helical Tail fragments of myosin VI, exist as a monomeric highly flexible structures

J. Muscle Res. Cell Motility. 26:74

D. Süveges, Z. Gáspári, G. Tóth, and L. Nyitray (2007): Prediction of highly charged single α -helical structures in proteins.

FEBS J., 274: 256

F. Hóbor, **D. Süveges**, J. Kardos, J. H. Brown, C. Cohen, L. Nyitray (2008): Possible structural basis of different regulation of myosin II isoforms

4th Central European Conference, Chemistry towards biology, Dobogókő, Hungary

L. M. Espinoza-Fonseca, **D. Süveges**, Z. Gáspári, L. Nyitray (2009): Role of cationic residues in fine tuning flexibility of naturally occurring charged single α -helices

Biophysical Journal 96(3) pp. 322a

7.2. Egyéb közlemények

Referált nemzetközi folyóiratban megjelent/megjelenés előtt álló közlemények

B. Szappanos, **D. Süveges**, L. Nyitray, A. Perczel, Z. Gáspári (2010): Folded-unfolded cross-predictions and protein evolution: the case study of coiled coils
FEBS Lett. 584(8):1623-7.

L. Radnai, P. Rapali, Z. Hódi, **D. Süveges**, T. Molnár, B. Kiss, B. Bécsi, F. Erdódi, J. Kardos, M. Kovács, L. Nyitray (2010): Affinity, avidity and kinetics of targeted sequence binding to LC8 dynein light chain isoforms
J Biol Chem. 2010 Dec 3;285(49):38649-57

P. Rapali, L. Radnai, **D. Süveges**, C. Hetényi, V. Harmat, F. Tölgyesi, W.Y. Wahlgren, G. Katona, L. Nyitray, G. Pál (2010): Binding motif preference of DYNLL mapped by *in vitro* evolved peptides: creating a tight-binding peptide and predicting novel binding partners.
Plos One – Birálat alatt.

Magyar nyelvű folyóiratban megjelent közlemény

Rapali P., Radnai L., **Süveges D.**, Harmat V., W.Y. Wahlgren, Katona G., Nyitray L. és Pál G. (2010): Az LC8 dinein könnyűlánc kötőmotívumának jellemzése, és új kölcsönható partnerek jóslása irányított evolúció segítségével.
Biokémia (A Magyar Biokémiai Egyesület kiadványa) 36/4: 28–34.
<http://www.mbkegy.hu/docs/biokemf/pdf/b201012.pdf>

Nemzetközi konferencián bemutatott eredmények

G. Pohl, P. Stráner, L. Radnai, **D. Süveges**, L. Nyitray, A. Perczel (2008): Preparation of uniformly labelled point mutants of TC5b miniprotein for NMR dynamic studies
4th Central European Conference, Chemistry towards biology, Dobogókő, Hungary

P. Rapali, L. Radnai, J. Kardos, **D. Süveges**, T. Molnár, Bence Kiss, Zsuzsa Hódi, László Nyitray (2008): Mechanism of DLC binding to multiple protein partners
4th Central European Conference, Chemistry towards biology, Dobogókő, Hungary

P. Stráner, G. Pohl, A. Láng, **D. Süveges**, L. Nyitray, A. Perczel (2008): Backbone mobility of Trp-cage mutants, skeletal motion of miniproteins
4th Central European Conference, Chemistry towards biology, Dobogókő, Hungary

D. Süveges, P. Rapali, L. Radnai, W. Y. Wahlgren, G. Katona, L. Nyitray1 (2010): Echinoderm microtubule associated protein like 3 (EML3): a novel binding partner of the dynein light chain, DYNLL
FEBS J., 277: 301

B. Szappanos, **D. Süveges**, G. Tóth, L. Nyitray, A. Perczel, Z. Gáspári (2010): Interrelationships between coiled coils, intrinsically disordered sequences and charged single α -helices
FEBS J., 277: 257

8.Hivatkozások jegyzéke

1. Mukherjea, M., Llinas, P., Kim, H., Travaglia, M., Safer, D., Menetrey, J., Franzini-Armstrong, C., Selvin, P. R., Houdusse, A., and Sweeney, H. L. (2009) Myosin VI dimerization triggers an unfolding of a three-helix bundle in order to extend its reach, *Mol Cell* 35, 305-315.
2. Cheney, R. E., and Mooseker, M. S. (1992) Unconventional myosins, *Curr Opin Cell Biol* 4, 27-35.
3. Hirokawa, N., and Takemura, R. (2003) Biochemical and molecular characterization of diseases linked to motor proteins, *Trends Biochem Sci* 28, 558-565.
4. Hirokawa, N., Niwa, S., and Tanaka, Y. (2010) Molecular motors in neurons: transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease, *Neuron* 68, 610-638.
5. Wu, X., Jung, G., and Hammer, J. A., 3rd. (2000) Functions of unconventional myosins, *Curr Opin Cell Biol* 12, 42-51.
6. Hofmann, W. A., Johnson, T., Klaczynski, M., Fan, J. L., and de Lanerolle, P. (2006) From transcription to transport: emerging roles for nuclear myosin I, *Biochem Cell Biol* 84, 418-426.
7. Sotelo-Silveira, J. R., Calliari, A., Kun, A., Koenig, E., and Sotelo, J. R. (2006) RNA trafficking in axons, *Traffic* 7, 508-515.
8. Libby, R. T., and Steel, K. P. (2000) The roles of unconventional myosins in hearing and deafness, *Essays Biochem* 35, 159-174.
9. Roux, I., Hosie, S., Johnson, S. L., Bahloul, A., Cayet, N., Nouaille, S., Kros, C. J., Petit, C., and Safieddine, S. (2009) Myosin VI is required for the proper maturation and function of inner hair cell ribbon synapses, *Hum Mol Genet* 18, 4615-4628.
10. Bhat, P., and Thorn, P. (2009) Myosin 2 maintains an open exocytic fusion pore in secretory epithelial cells, *Mol Biol Cell* 20, 1795-1803.
11. Inoue, T., Kon, T., Ohkura, R., Yamakawa, H., Ohara, O., Yokota, J., and Sutoh, K. (2008) BREK/LMTK2 is a myosin VI-binding protein involved in endosomal membrane trafficking, *Genes Cells* 13, 483-495.
12. Roberts, R., Lister, I., Schmitz, S., Walker, M., Veigel, C., Trinick, J., Buss, F., and Kendrick-Jones, J. (2004) Myosin VI: cellular functions and motor properties, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 359, 1931-1944.
13. Rudolf, R., Bittins, C. M., and Gerdes, H. H. (2011) The role of myosin V in exocytosis and synaptic plasticity, *J Neurochem* 116, 177-191.
14. Sattarzadeh, A., Franzen, R., and Schmelzer, E. (2008) The Arabidopsis class VIII myosin ATM2 is involved in endocytosis, *Cell Motil Cytoskeleton* 65, 457-468.
15. Parsons, J. T., Horwitz, A. R., and Schwartz, M. A. (2010) Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension, *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 633-643.
16. Vicente-Manzanares, M., Ma, X., Adelstein, R. S., and Horwitz, A. R. (2009) Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration, *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 778-790.
17. Rhoads, A. R., and Friedberg, F. (1997) Sequence motifs for calmodulin recognition, *FASEB J* 11, 331-340.
18. Trybus, K. M. (1994) Role of myosin light chains, *J Muscle Res Cell Motil* 15, 587-594.
19. Lowey, S., and Trybus, K. M. (1995) Role of skeletal and smooth muscle myosin light chains, *Biophys J* 68, 120S-126S; discussion 126S-127S.
20. Espreafico, E. M., Cheney, R. E., Matteoli, M., Nascimento, A. A., De Camilli, P. V., Larson, R. E., and Mooseker, M. S. (1992) Primary structure and cellular localization of chicken brain myosin-V (p190), an unconventional myosin with calmodulin light chains, *J Cell Biol* 119, 1541-1557.
21. Oliver, T. N., Berg, J. S., and Cheney, R. E. (1999) Tails of unconventional myosins, *Cell Mol Life Sci* 56, 243-257.

22. Spink, B. J., Sivaramakrishnan, S., Lipfert, J., Doniach, S., and Spudich, J. A. (2008) Long single alpha-helical tail domains bridge the gap between structure and function of myosin VI, *Nat Struct Mol Biol* 15, 591-597.
23. Krementsov, D. N., Krementsova, E. B., and Trybus, K. M. (2004) Myosin V: regulation by calcium, calmodulin, and the tail domain, *J Cell Biol* 164, 877-886.
24. Krendel, M., and Mooseker, M. S. (2005) Myosins: tails (and heads) of functional diversity, *Physiology (Bethesda)* 20, 239-251.
25. Berg, J. S., Powell, B. C., and Cheney, R. E. (2001) A millennial myosin census, *Mol Biol Cell* 12, 780-794.
26. Adamovic, I., Mijailovich, S. M., and Karplus, M. (2008) The elastic properties of the structurally characterized myosin II S2 subdomain: a molecular dynamics and normal mode analysis, *Biophys J* 94, 3779-3789.
27. Maciver, S. K. (1996) Myosin II function in non-muscle cells, *Bioessays* 18, 179-182.
28. Neujahr, R., Heizer, C., Albrecht, R., Ecke, M., Schwartz, J. M., Weber, I., and Gerisch, G. (1997) Three-dimensional patterns and redistribution of myosin II and actin in mitotic Dictyostelium cells, *J Cell Biol* 139, 1793-1804.
29. Stryer, L., (Ed.) (2002) *Biochemistry*, 5 ed.
30. Craig, R., and Woodhead, J. L. (2006) Structure and function of myosin filaments, *Curr Opin Struct Biol* 16, 204-212.
31. Sarlós, K., Gyimesi, M., and Kovács, M. (2009) Anyagmozgítás és információ-továbbítás a sejten - Biológiai motorok, *Természet világa* 140, 201-203.
32. Lan, G., and Sun, S. X. (2005) Dynamics of myosin-V processivity, *Biophys J* 88, 999-1008.
33. Gordon, A. M., Homsher, E., and Regnier, M. (2000) Regulation of contraction in striated muscle, *Physiol Rev* 80, 853-924.
34. Jancso, A., and Szent-Gyorgyi, A. G. (1994) Regulation of scallop myosin by the regulatory light chain depends on a single glycine residue, *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 8762-8766.
35. Xie, X., Harrison, D. H., Schlichting, I., Sweet, R. M., Kalabokis, V. N., Szent-Gyorgyi, A. G., and Cohen, C. (1994) Structure of the regulatory domain of scallop myosin at 2.8 Å resolution, *Nature* 368, 306-312.
36. Nakamura, A., and Kohama, K. (1999) Calcium regulation of the actin-myosin interaction of Physarum polycephalum, *Int Rev Cytol* 191, 53-98.
37. Bresnick, A. R. (1999) Molecular mechanisms of nonmuscle myosin-II regulation, *Curr Opin Cell Biol* 11, 26-33.
38. Gallagher, P. J., Herring, B. P., and Stull, J. T. (1997) Myosin light chain kinases, *J Muscle Res Cell Motil* 18, 1-16.
39. Sweeney, H. L., and Stull, J. T. (1990) Alteration of cross-bridge kinetics by myosin light chain phosphorylation in rabbit skeletal muscle: implications for regulation of actin-myosin interaction, *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 414-418.
40. Levine, R. J., Kensler, R. W., Yang, Z., Stull, J. T., and Sweeney, H. L. (1996) Myosin light chain phosphorylation affects the structure of rabbit skeletal muscle thick filaments, *Biophys J* 71, 898-907.
41. Craig, R., Smith, R., and Kendrick-Jones, J. (1983) Light-chain phosphorylation controls the conformation of vertebrate non-muscle and smooth muscle myosin molecules, *Nature* 302, 436-439.
42. Onishi, H., and Wakabayashi, T. (1982) Electron microscopic studies of myosin molecules from chicken gizzard muscle I: the formation of the intramolecular loop in the myosin tail, *J Biochem* 92, 871-879.
43. Trybus, K. M., Huiatt, T. W., and Lowey, S. (1982) A bent monomeric conformation of myosin from smooth muscle, *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 6151-6155.
44. Walker, M., Knight, P., and Trinick, J. (1985) Negative staining of myosin molecules, *J Mol Biol* 184, 535-542.
45. Ankreth, R. J., Rowe, A. J., Cross, R. A., Kendrick-Jones, J., and Bagshaw, C. R. (1991) A folded (10 S) conformer of myosin from a striated muscle and its implications for regulation of ATPase activity, *J Mol Biol* 217, 323-335.

46. Woodhead, J. L., Zhao, F. Q., Craig, R., Egelman, E. H., Alamo, L., and Padron, R. (2005) Atomic model of a myosin filament in the relaxed state, *Nature* 436, 1195-1199.
47. Seow, C. Y. (2005) Myosin filament assembly in an ever-changing myofibrillar lattice of smooth muscle, *Am J Physiol Cell Physiol* 289, C1363-1368.
48. Jung, H. S., Komatsu, S., Ikebe, M., and Craig, R. (2008) Head-head and head-tail interaction: a general mechanism for switching off myosin II activity in cells, *Mol Biol Cell* 19, 3234-3242.
49. Wendt, T., Taylor, D., Trybus, K. M., and Taylor, K. (2001) Three-dimensional image reconstruction of dephosphorylated smooth muscle heavy meromyosin reveals asymmetry in the interaction between myosin heads and placement of subfragment 2, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4361-4366.
50. Burgess, S. A., Yu, S., Walker, M. L., Hawkins, R. J., Chalovich, J. M., and Knight, P. J. (2007) Structures of smooth muscle myosin and heavy meromyosin in the folded, shutdown state, *J Mol Biol* 372, 1165-1178.
51. Rodriguez, O. C., and Cheney, R. E. (2000) A new direction for myosin, *Trends Cell Biol* 10, 307-311.
52. Wells, A. L., Lin, A. W., Chen, L. Q., Safer, D., Cain, S. M., Hasson, T., Carragher, B. O., Milligan, R. A., and Sweeney, H. L. (1999) Myosin VI is an actin-based motor that moves backwards, *Nature* 401, 505-508.
53. Aschenbrenner, L., Lee, T., and Hasson, T. (2003) Myo6 facilitates the translocation of endocytic vesicles from cell peripheries, *Mol Biol Cell* 14, 2728-2743.
54. Buss, F., Arden, S. D., Lindsay, M., Luzio, J. P., and Kendrick-Jones, J. (2001) Myosin VI isoform localized to clathrin-coated vesicles with a role in clathrin-mediated endocytosis, *EMBO J* 20, 3676-3684.
55. Sato, O. (2006) [Myosin VI: involvement in hereditary hearing loss], *Seikagaku* 78, 45-50.
56. Buss, F., Kendrick-Jones, J., Lionne, C., Knight, A. E., Cote, G. P., and Paul Luzio, J. (1998) The localization of myosin VI at the golgi complex and leading edge of fibroblasts and its phosphorylation and recruitment into membrane ruffles of A431 cells after growth factor stimulation, *J Cell Biol* 143, 1535-1545.
57. Sahlender, D. A., Roberts, R. C., Arden, S. D., Spudich, G., Taylor, M. J., Luzio, J. P., Kendrick-Jones, J., and Buss, F. (2005) Optineurin links myosin VI to the Golgi complex and is involved in Golgi organization and exocytosis, *J Cell Biol* 169, 285-295.
58. Warner, C. L., Stewart, A., Luzio, J. P., Steel, K. P., Libby, R. T., Kendrick-Jones, J., and Buss, F. (2003) Loss of myosin VI reduces secretion and the size of the Golgi in fibroblasts from Snell's waltzer mice, *EMBO J* 22, 569-579.
59. Menetrey, J., Bahloul, A., Wells, A. L., Yengo, C. M., Morris, C. A., Sweeney, H. L., and Houdusse, A. (2005) The structure of the myosin VI motor reveals the mechanism of directionality reversal, *Nature* 435, 779-785.
60. Park, H., Ramamurthy, B., Travaglia, M., Safer, D., Chen, L. Q., Franzini-Armstrong, C., Selvin, P. R., and Sweeney, H. L. (2006) Full-length myosin VI dimerizes and moves processively along actin filaments upon monomer clustering, *Mol Cell* 21, 331-336.
61. Pierobon, P., Achouri, S., Courty, S., Dunn, A. R., Spudich, J. A., Dahan, M., and Cappello, G. (2009) Velocity, processivity, and individual steps of single myosin V molecules in live cells, *Biophys J* 96, 4268-4275.
62. Baker, J. E., Kremenstova, E. B., Kennedy, G. G., Armstrong, A., Trybus, K. M., and Warshaw, D. M. (2004) Myosin V processivity: multiple kinetic pathways for head-to-head coordination, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 5542-5546.
63. Okten, Z., Churchman, L. S., Rock, R. S., and Spudich, J. A. (2004) Myosin VI walks hand-over-hand along actin, *Nat Struct Mol Biol* 11, 884-887.
64. Rock, R. S., Rice, S. E., Wells, A. L., Purcell, T. J., Spudich, J. A., and Sweeney, H. L. (2001) Myosin VI is a processive motor with a large step size, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 13655-13659.
65. Yildiz, A., Park, H., Safer, D., Yang, Z., Chen, L. Q., Selvin, P. R., and Sweeney, H. L. (2004) Myosin VI steps via a hand-over-hand mechanism with its lever arm undergoing fluctuations when attached to actin, *J Biol Chem* 279, 37223-37226.

66. Lister, I., Schmitz, S., Walker, M., Trinick, J., Buss, F., Veigel, C., and Kendrick-Jones, J. (2004) A monomeric myosin VI with a large working stroke, *EMBO J* 23, 1729-1738.
67. Lyu, P. C., Gans, P. J., and Kallenbach, N. R. (1992) Energetic contribution of solvent-exposed ion pairs to alpha-helix structure, *J Mol Biol* 223, 343-350.
68. Iwaki, M., Tanaka, H., Iwane, A. H., Katayama, E., Ikebe, M., and Yanagida, T. (2006) Cargo-binding makes a wild-type single-headed myosin-VI move processively, *Biophys J* 90, 3643-3652.
69. Spudich, G., Chibalina, M. V., Au, J. S., Arden, S. D., Buss, F., and Kendrick-Jones, J. (2007) Myosin VI targeting to clathrin-coated structures and dimerization is mediated by binding to Disabled-2 and PtdIns(4,5)P2, *Nat Cell Biol* 9, 176-183.
70. Lyu, P. C., Liff, M. L., Marky, L. A., and Kallenbach, N. R. (1990) Side chain contributions to the stability of alpha-helical structure in peptides, *Science* 250, 669-673.
71. Lyu, P. C., Marky, L. A., and Kallenbach, N. R. (1989) The role of ion pairs in α -helix stability: two new designed helical peptides *J Am Chem Soc* 111, 2733 - 2734.
72. Marqusee, S., and Baldwin, R. L. (1987) Helix stabilization by Glu-...Lys⁺ salt bridges in short peptides of de novo design, *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 8898-8902.
73. Knight, P. J., Thirumurugan, K., Xu, Y., Wang, F., Kalverda, A. P., Stafford, W. F., 3rd, Sellers, J. R., and Peckham, M. (2005) The predicted coiled-coil domain of myosin 10 forms a novel elongated domain that lengthens the head, *J Biol Chem* 280, 34702-34708.
74. Kuhlman, B., Yang, H. Y., Boice, J. A., Fairman, R., and Raleigh, D. P. (1997) An exceptionally stable helix from the ribosomal protein L9: implications for protein folding and stability, *J Mol Biol* 270, 640-647.
75. Wang, C. L., Chalovich, J. M., Graceffa, P., Lu, R. C., Mabuchi, K., and Stafford, W. F. (1991) A long helix from the central region of smooth muscle caldesmon, *J Biol Chem* 266, 13958-13963.
76. Wang, E., and Wang, C. L. (1996) (i, i + 4) Ion pairs stabilize helical peptides derived from smooth muscle caldesmon, *Arch Biochem Biophys* 329, 156-162.
77. Olson, C. A., Spek, E. J., Shi, Z., Vologodskii, A., and Kallenbach, N. R. (2001) Cooperative helix stabilization by complex Arg-Glu salt bridges, *Proteins* 44, 123-132.
78. Andrew, C. D., Penel, S., Jones, G. R., and Doig, A. J. (2001) Stabilizing nonpolar/polar side-chain interactions in the alpha-helix, *Proteins* 45, 449-455.
79. Garcia, A. E., and Sanbonmatsu, K. Y. (2002) Alpha-helical stabilization by side chain shielding of backbone hydrogen bonds, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 2782-2787.
80. Vila, J. A., Ripoll, D. R., and Scheraga, H. A. (2000) Physical reasons for the unusual alpha-helix stabilization afforded by charged or neutral polar residues in alanine-rich peptides, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13075-13079.
81. Wilkins, M. R., Gasteiger, E., Bairoch, A., Sanchez, J. C., Williams, K. L., Appel, R. D., and Hochstrasser, D. F. (1999) Protein identification and analysis tools in the ExpASY server, *Methods Mol Biol* 112, 531-552.
82. Hodi, Z., Nemeth, A. L., Radnai, L., Hetenyi, C., Schlett, K., Bodor, A., Perczel, A., and Nyitrai, L. (2006) Alternatively spliced exon B of myosin Va is essential for binding the tail-associated light chain shared by dynein, *Biochemistry* 45, 12582-12595.
83. Greenfield, N. J., Montelione, G. T., Farid, R. S., and Hitchcock-DeGregori, S. E. (1998) The structure of the N-terminus of striated muscle alpha-tropomyosin in a chimeric peptide: nuclear magnetic resonance structure and circular dichroism studies, *Biochemistry* 37, 7834-7843.
84. Scholtz, J. M., Qian, H., Robbins, V. H., and Baldwin, R. L. (1993) The energetics of ion-pair and hydrogen-bonding interactions in a helical peptide, *Biochemistry* 32, 9668-9676.
85. Shepherd, C. M., van der Spoel, D., and Vogel, H. J. (2004) Molecular dynamics simulations of peptides from the central domain of smooth muscle caldesmon, *J Biomol Struct Dyn* 21, 555-566.
86. Sharma, D., Issac, B., Raghava, G. P., and Ramaswamy, R. (2004) Spectral Repeat Finder (SRF): identification of repetitive sequences using Fourier transformation, *Bioinformatics* 20, 1405-1412.

87. Humphrey, W., Dalke, A., and Schulten, K. (1996) VMD: visual molecular dynamics, *J Mol Graph* 14, 33-38, 27-38.
88. Frishman, D., and Argos, P. (1995) Knowledge-based protein secondary structure assignment, *Proteins* 23, 566-579.
89. Lau, S. Y., Taneja, A. K., and Hodges, R. S. (1984) Synthesis of a model protein of defined secondary and quaternary structure. Effect of chain length on the stabilization and formation of two-stranded alpha-helical coiled-coils, *J Biol Chem* 259, 13253-13261.
90. Holtzer, M. E., and Holtzer, A. (1992) Alpha-helix to random coil transitions: determination of peptide concentration from the CD at the isodichroic point, *Biopolymers* 32, 1675-1677.
91. Blankenfeldt, W., Thoma, N. H., Wray, J. S., Gautel, M., and Schlichting, I. (2006) Crystal structures of human cardiac beta-myosin II S2-Delta provide insight into the functional role of the S2 subfragment, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 17713-17717.
92. Brown, J. H., Yang, Y., Reshetnikova, L., Gourinath, S., Suveges, D., Kardos, J., Hobor, F., Reutzler, R., Nyitray, L., and Cohen, C. (2008) An unstable head-rod junction may promote folding into the compact off-state conformation of regulated myosins, *J Mol Biol* 375, 1434-1443.
93. Li, Y., Brown, J. H., Reshetnikova, L., Blazsek, A., Farkas, L., Nyitray, L., and Cohen, C. (2003) Visualization of an unstable coiled coil from the scallop myosin rod, *Nature* 424, 341-345.
94. Jigami, Y., and Odani, T. (1999) Mannosylphosphate transfer to yeast mannan, *Biochim Biophys Acta* 1426, 335-345.
95. Laursen, B. S., Kjaergaard, A. C., Mortensen, K. K., Hoffman, D. W., and Sperling-Petersen, H. U. (2004) The N-terminal domain (IF2N) of bacterial translation initiation factor IF2 is connected to the conserved C-terminal domains by a flexible linker, *Protein Sci* 13, 230-239.
96. Laursen, B. S., Sorensen, H. P., Mortensen, K. K., and Sperling-Petersen, H. U. (2005) Initiation of protein synthesis in bacteria, *Microbiol Mol Biol Rev* 69, 101-123.
97. Kendirgi, F., Rexer, D. J., Alcazar-Roman, A. R., Onishko, H. M., and Wenthe, S. R. (2005) Interaction between the shuttling mRNA export factor Gle1 and the nucleoporin hCG1: a conserved mechanism in the export of Hsp70 mRNA, *Mol Biol Cell* 16, 4304-4315.
98. Sohda, M., Misumi, Y., Yamamoto, A., Yano, A., Nakamura, N., and Ikehara, Y. (2001) Identification and characterization of a novel Golgi protein, GCP60, that interacts with the integral membrane protein giantin, *J Biol Chem* 276, 45298-45306.
99. Sbodio, J. I., Hicks, S. W., Simon, D., and Machamer, C. E. (2006) GCP60 preferentially interacts with a caspase-generated golgin-160 fragment, *J Biol Chem* 281, 27924-27931.
100. Takai, Y., and Nakanishi, H. (2003) Nectin and afadin: novel organizers of intercellular junctions, *J Cell Sci* 116, 17-27.
101. Straub, T., Grue, P., Uhse, A., Lisby, M., Knudsen, B. R., Tange, T. O., Westergaard, O., and Boege, F. (1998) The RNA-splicing factor PSF/p54 controls DNA-topoisomerase I activity by a direct interaction, *J Biol Chem* 273, 26261-26264.
102. Yao, Z., Zhou, G., Wang, X. S., Brown, A., Diener, K., Gan, H., and Tan, T. H. (1999) A novel human STE20-related protein kinase, HGK, that specifically activates the c-Jun N-terminal kinase signaling pathway, *J Biol Chem* 274, 2118-2125.
103. Lupas, A. (1996) Prediction and analysis of coiled-coil structures, *Methods Enzymol* 266, 513-525.
104. Lupas, A., Van Dyke, M., and Stock, J. (1991) Predicting coiled coils from protein sequences, *Science* 252, 1162-1164.
105. Dosztanyi, Z., Csizmok, V., Tompa, P., and Simon, I. (2005) IUPred: web server for the prediction of intrinsically unstructured regions of proteins based on estimated energy content, *Bioinformatics* 21, 3433-3434.
106. Dosztanyi, Z., Csizmok, V., Tompa, P., and Simon, I. (2005) The pairwise energy content estimated from amino acid composition discriminates between folded and intrinsically unstructured proteins, *J Mol Biol* 347, 827-839.
107. Peckham, M. S., and Knight, P. J. (2009) When a predicted coiled coil is really a single α -helix, in myosins and other proteins, *Soft Matter* 5, 2493-2503.
108. Tompa, P. (2002) Intrinsically unstructured proteins, *Trends Biochem Sci* 27, 527-533.

109. Lobleby, A., Whitmore, L., and Wallace, B. A. (2002) DICHROWEB: an interactive website for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism spectra, *Bioinformatics* 18, 211-212.
110. Compton, L. A., and Johnson, W. C., Jr. (1986) Analysis of protein circular dichroism spectra for secondary structure using a simple matrix multiplication, *Anal Biochem* 155, 155-167.
111. Süveges, D., Németh, A., Gáspári, Z., Tóth, G., and Nyitray, L. (2005) Helical tail fragments of myosin VI exist as monomeric, highly flexible structures., *J. Muscle Res. Cell Motility* 26, 74.
112. Kim, H., Hsin, J., Liu, Y., Selvin, P. R., and Schulten, K. (2010) Formation of salt bridges mediates internal dimerization of myosin VI medial tail domain, *Structure* 18, 1443-1449.
113. Yu, C., Feng, W., Wei, Z., Miyanoiri, Y., Wen, W., Zhao, Y., and Zhang, M. (2009) Myosin VI undergoes cargo-mediated dimerization, *Cell* 138, 537-548.
114. Betcher-Lange, S. L., and Lehrer, S. S. (1978) Pyrene excimer fluorescence in rabbit skeletal alphaalphanthropomyosin labeled with N-(1-pyrene)maleimide. A probe of sulfhydryl proximity and local chain separation, *J Biol Chem* 253, 3757-3760.
115. Graceffa, P., and Lehrer, S. S. (1980) The excimer fluorescence of pyrene-labeled tropomyosin. A probe of conformational dynamics, *J Biol Chem* 255, 11296-11300.
116. Lehrer, S. S. (1997) Intramolecular pyrene excimer fluorescence: a probe of proximity and protein conformational change, *Methods Enzymol* 278, 286-295.
117. Radnai, L., Rapali, P., Hodi, Z., Süveges, D., Molnar, T., Kiss, B., Becsi, B., Erdodi, F., Buday, L., Kardos, J., Kovacs, M., and Nyitray, L. (2010) Affinity, avidity, and kinetics of target sequence binding to LC8 dynein light chain isoforms, *J Biol Chem* 285, 38649-38657.
118. Zagrovic, B., Jayachandran, G., Millett, I. S., Doniach, S., and Pande, V. S. (2005) How large is an alpha-helix? Studies of the radii of gyration of helical peptides by small-angle X-ray scattering and molecular dynamics, *J Mol Biol* 353, 232-241.
119. Baboolal, T. G., Sakamoto, T., Forgacs, E., White, H. D., Jackson, S. M., Takagi, Y., Farrow, R. E., Molloy, J. E., Knight, P. J., Sellers, J. R., and Peckham, M. (2009) The SAH domain extends the functional length of the myosin lever, *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 22193-22198.
120. Brenner, B. (2006) The stroke size of myosins: a reevaluation, *J Muscle Res Cell Motil* 27, 173-187.
121. Uyeda, T. Q., Abramson, P. D., and Spudich, J. A. (1996) The neck region of the myosin motor domain acts as a lever arm to generate movement, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 4459-4464.
122. Smith, S. B., Finzi, L., and Bustamante, C. (1992) Direct mechanical measurements of the elasticity of single DNA molecules by using magnetic beads, *Science* 258, 1122-1126.
123. Bednar, J., Furrer, P., Katritch, V., Stasiak, A. Z., Dubochet, J., and Stasiak, A. (1995) Determination of DNA persistence length by cryo-electron microscopy. Separation of the static and dynamic contributions to the apparent persistence length of DNA, *J Mol Biol* 254, 579-594.
124. Schwaiger, I., Sattler, C., Hostetter, D. R., and Rief, M. (2002) The myosin coiled-coil is a truly elastic protein structure, *Nat Mater* 1, 232-235.
125. Hvidt, S., Nestler, F. H., Greaser, M. L., and Ferry, J. D. (1982) Flexibility of myosin rod determined from dilute solution viscoelastic measurements, *Biochemistry* 21, 4064-4073.
126. Phillips, G. N., Jr., and Chacko, S. (1996) Mechanical properties of tropomyosin and implications for muscle regulation, *Biopolymers* 38, 89-95.
127. Ott, A., Magnasco, M., Simon, A., and Libchaber, A. (1993) Measurement of the persistence length of polymerized actin using fluorescence microscopy, *Phys Rev E Stat Phys Plasmas Fluids Relat Interdiscip Topics* 48, R1642-R1645.
128. Sivaramkrishnan, S., Sung, J., Ali, M., Doniach, S., Flyvbjerg, H., and Spudich, J. A. (2009) Combining single-molecule optical trapping and small-angle x-ray scattering measurements to compute the persistence length of a protein ER/K alpha-helix, *Biophys J* 97, 2993-2999.
129. Sivaramkrishnan, S., Spink, B. J., Sim, A. Y., Doniach, S., and Spudich, J. A. (2008) Dynamic charge interactions create surprising rigidity in the ER/K alpha-helical protein motif, *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 13356-13361.

130. Best, R. B., Buchete, N. V., and Hummer, G. (2008) Are current molecular dynamics force fields too helical?, *Biophys J* 95, L07-09.
131. Wolgemuth, C. W., and Sun, S. X. (2006) Elasticity of alpha-helical coiled coils, *Phys Rev Lett* 97, 248101.
132. Suveges, D., Gaspari, Z., Toth, G., and Nyitrai, L. (2009) Charged single alpha-helix: a versatile protein structural motif, *Proteins* 74, 905-916.

9. Függelék

1. Függelék. A scan4csah programhoz meghatározott súlyok. Az iteratív optimaizációs eljárás során a meghatározott értékek egy ismert CSAH motívumot tartalmazó szekvencia szetten lettek optimaizálva.

A kölcsönható töltések pozíciója	Töltések sorrendje	Az interakció súlya
$i, i+4$	- +	1
$i, i+3$	- +	9
$i, i+4$	+ -	0
$i, i+3$	+ -	3
$i, i+4, i+8$	- + -	7
$i, i+4, i+7$		
$i, i+3, i+7$		
$i, i+3, i+6$		
$i, i+4, i+8$	+ - +	0
$i, i+4, i+7$		
$i, i+3, i+7$		
$i, i+3, i+6$		
$i, i+4$	+ + / - -	-3
$i, i+3$	+ + / - -	0
$i, i+2$	+ - / - +	-2
$i, i+1$	+ - / - +	0

2. Függelék. Két példa arra, hogy CSAH-nak prediktált szekvenciát tartalmazó fehérjék ortológjai között találunk olyan fehérjéket is, melyek CSAH-ot nem, csak *coiled-coil*-t tartalmaznak

NONO – Non-POU domain-containing octamer binding protein

Domain Architecture

Domain	Pfam code
RNA recognition, binding motif. 2X	PF00076 ;
NOPS domain found in the C' terminal of NONA	PF08075 ;

SwissProtID	Entry name	SCAN4CSAH	Homologs		Coiled-coil prediction by COILS
			FT_charge		
Q15233	NONO_HUMAN	314-370	321-384		268-371
Q99K48	NONO_MOUSE	316-372	321-384		270-373
Q5FVM4	NONO_RAT	319-375	321-384		273-377
Q5RFL9	NONO_PONPY	314-370	321-384		268-371
P23246	SFPQ_HUMAN	537-610	545-608		492-596
Q9GRW7	NONA_DROVI	512-583	545-608		131-174, 482-570
Q8VIJ6	SFPQ_MOUSE	529-602			484-588
Q1JPI8	FSFCL_DANRE	316-373			271-356
Q9U1N0	HRP65_CHITE	340-411			310-414
Q9GRX4	NONA_DROLR	508-579			137-165, 478-566
Q04047	NONA_DROME	529-582			499-618
Q1LZD9	FSFCL_BOVIN				257-359
Q5ZK88	FSFCL_CHICK				277-376
Q8WXF1	FSFCL_HUMAN				278-371
Q8R326	FSFCL_MOUSE				277-370
Q4KLH4	FSFCL_RAT				277-370

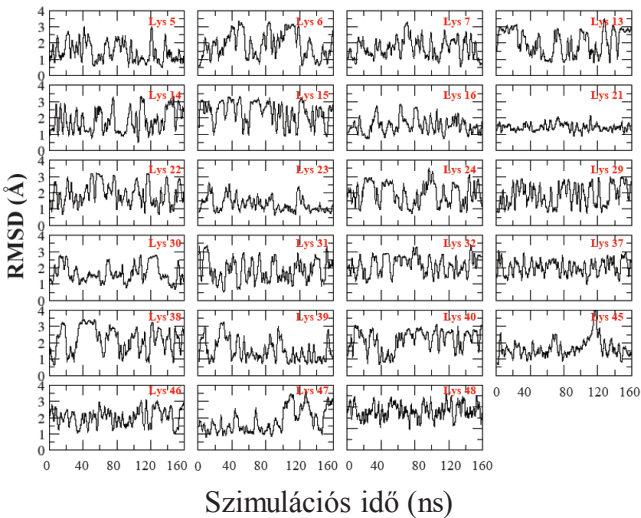
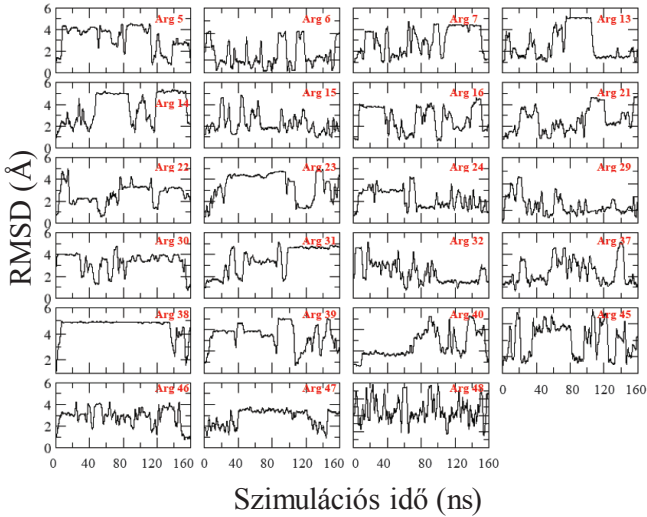
M4K4 – Mitogen activated protein kinase kinase kinase kinase 4

Domain Architecture

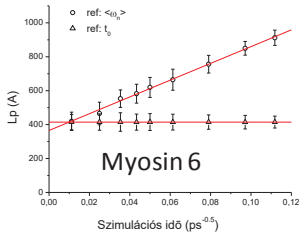
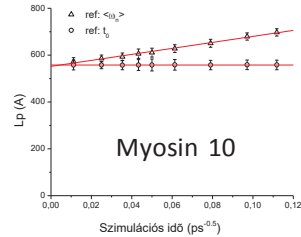
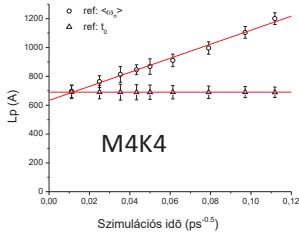
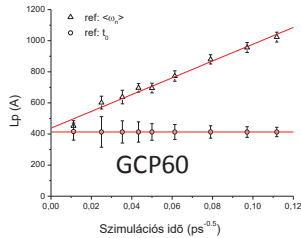
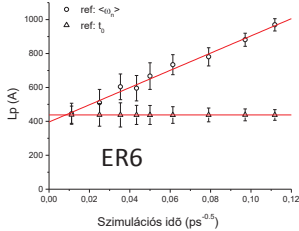
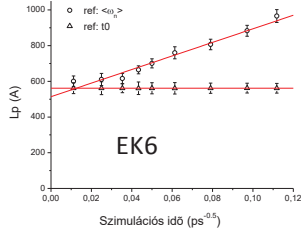
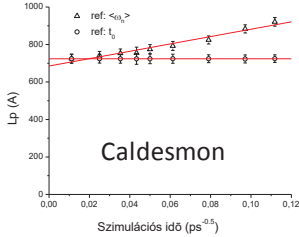
Domain	Pfam code
Serin threonin kinase domain	PF00069
Citrulin binding domain	PF00780

SwissProtID	Entry name	SCAN4CSAH	Homologs		Coiled-coil prediction by COILS
			FT_charge		
P97820	M4K4_MOUSE	376-478	417-480		357-449
Q95819	M4K4_HUMAN	377-479	417-480		358-530
Q9JM52	MINK1_MOUSE	395-466			370-470
P83510	TNIK_MOUSE	361-468			355-482
Q8N4C8	MINK1_HUMAN	395-466			350-498
Q9UKE5	TNIK_HUMAN	361-458			355-551
Q9Y5S2	MRCKB_HUMAN				431-820
Q7TT50	MRCKB_MOUSE				430-823
Q7TT49	MRCKB_RAT				434-823
Q3U096	MRCKA_MOUSE				435-816
Q5VT25	MRCKA_HUMAN				435-824
O54874	MRCKA_RAT				434-820
Q6DT37	MRCKG_HUMAN				406-802
Q8OUW5	MRCKG_MOUSE				420-802
Q9R0G8	NRK_MOUSE				714-750
Q7Z2Y5	NRK_HUMAN				725-759

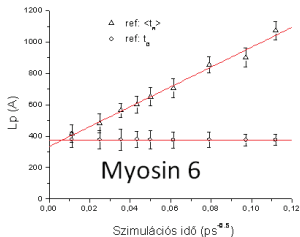
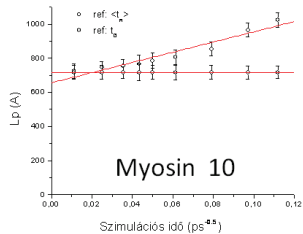
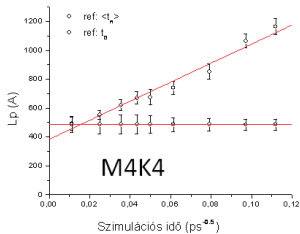
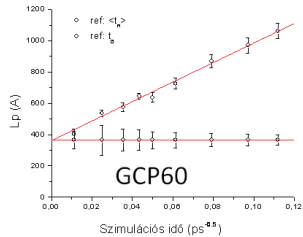
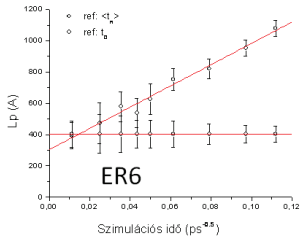
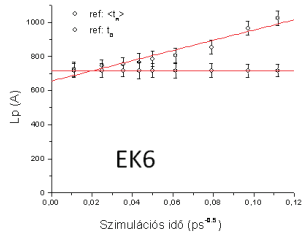
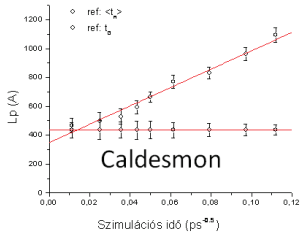
3. Függelék. A) az arginin, B) a lizin oldalláncok szerkezeti fluktuációja a szimuláció ideje alatt.



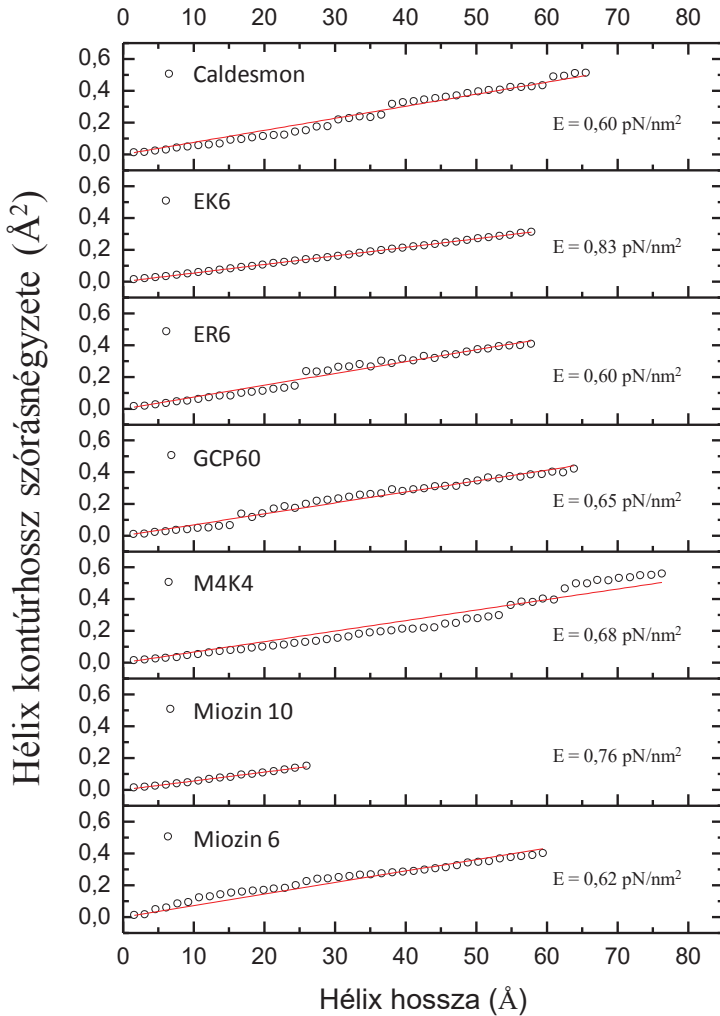
4. Függelék: A szálehajlásos módszerrel történt perisztenciahossz meghatározás az összes MD szimulációban részt vevő fehérje esetében. A grafikonok tartalmazzák az $\langle \omega_n \rangle$ és a t_0 referenciákkal számolt értékeket. A perisztenciahosszat a pontokra illesztett egyenes y tengelymetszete jelöli ki, mely megfelel a végtelen hosszú szimulációs időre történő extrapolációnak. A meghatározott paraméterek az eredmények fejezetben (65. oldal), az elméleti háttér az anyagok és módszerek fejezetben (36. oldal) találhatóak.



5. Függelék Az irányvektorok elhajlásán alapuló módszerrel történt perzisztenciahossz meghatározás az összes MD szimulációban részt vevő fehérje esetében. A grafikonok tartalmazzák az $\langle t_n \rangle$ és t_0 referenciákkal számolt értékeket. A perzisztenciahosszat a pontokra illesztett egyenes y tengelymetszete jelöli ki, mely megfelel a végtelen hosszú szimulációs időre történő extrapolációnak. A meghatározott paraméterek az eredmények fejezetben (9. táblázat), az elméleti háttér az anyagok és módszerek fejezetben (38. oldal) találhatóak.



6. Függelék. A fehérjék hosszanti rugalmasságának meghatározása a lánc hossz szórásnégyzetének függvényében. Mint látható a szórásnégyzet értéke a polimerhosszal lineárisan nő, a kettő hányadosa, állandó, megadja a polimerre jellemző rugalmas paramétert.



7. Függelék. A szimulációban résztvevő fehérjék rugalmas paramétereinek meghatározása a polimerlánc vég-vég távolságainak szórása alapján. Az előző módszer ellenében, itt a távolságok terheltek lesznek azzal a hibával, amit a polimerlánc oldalirányú kitérése okoz. Ez a hiba rövid polimer esetén ($L < L_p/10$, pl.: EK6, miozin 10) nem jelentős, ellenkező esetében egyre növekvő hibát okoz.

