

Erőgeneráláshoz vezető szerkezetváltozások a miozinban

Doktori (PhD) értekezés

Takács Balázs

Témavezető: **Dr. Kovács Mihály**,
habilitált tudományos főmunkatárs

ELTE Biokémiai Tanszék,

Biológia Doktori Iskola,

Szerkezeti Biokémia Doktori Program

Tanszékvezető: **Dr. Nyitrai László**,

az MTA doktora, habilitált egyetemi docens

Iskolavezető: **Prof. Erdei Anna**,

az MTA rendes tagja, tanszékvezető egyetemi tanár

Programvezető: **Prof. Gráf László**,

az MTA rendes tagja, egyetemi tanár



Budapest, 2010.

*„Ha majd elindulsz Ithaka felé,
válaszd hozzá a leghosszabb utat,
mely csupa kaland és felfedezés.”*

(Kavafisz: Ithaka c. versének kezdősorai)

Tartalomjegyzék

1. Összefoglalás	8
1.1. Magyar nyelvű összefoglalás	8
1.2. Summary in English	8
2. Bevezetés	10
2.1. A kutatási irány	10
2.2. A használt nevezéktan és jelölések	10
3. Irodalmi áttekintés	12
3.1. A motorfehérjék meghatározása és csoportosítása	12
3.2. A miozin szupercsalád és evolúciója	12
3.3. A miozinmolekula felépítése és fragmentumai	15
3.4. A miozin ATPáz mechanizmusa	16
3.5. A miozin funkcionális egységei	18
3.6. Kommunikáció a miozin molekulán belül	19
3.7. Az aktinfilamentum és az aktomiozin komplex szerkezete	20
3.8. Miozin gátlószerek	22
4. Célkitűzések és kérdések	24
4.1. A blebbistatin nevű inhibitor mechanizmusának vizsgálata	24
4.2. Az erős aktinkötés folyamatának vizsgálata	24
5. Anyagok és módszerek	25
5.1. A munka során használt anyagok	25
5.2. Fehérjetermelés és fehérjetisztítás	25
5.2.1. Gerinces vázizom miozin 2 preparálás	25
5.2.1.1. Miozinkivonás	25
5.2.1.2. Az S1 fragmentum (skS1) készítése	26
5.2.1.3. A HMM fragmentum (skHMM) készítése	26
5.2.2. <i>Dictyostelium discoideum</i> miozin 2 motor domén (DdMD) expresszió	26
5.2.3. DdMD preparálás	27
5.2.4. Kalmár (<i>Loligo pealeii</i>) izom miozin 2 S1 preparálás	28

5.2.5. Miozin 5 S1 expresszió	29
5.2.6. Miozin 5 S1 preparálás	30
5.2.7. A miozinok koncentrációjának mérése	31
5.2.8. Aktinpreparálás	32
5.2.8.1. Aktin „szárazpor” készítés	32
5.2.8.2. F-aktin preparálás	32
5.2.8.3. Pirén-F-aktin preparálás	33
5.3. Mérések	34
5.3.1. A mérések alapelvei	34
5.3.2. <i>Steady-state</i> ATPáz mérések	35
5.3.3. <i>Steady-state</i> fluoreszcencia-mérések	35
5.3.4. Megállított áramlásos (<i>stopped-flow</i>) kísérletek	36
5.3.5. Koszedimentáció	37
5.3.6. Kalorimetria	37
5.3.7. Elektron-mikroszkópia	38
5.3.8. Atomi szerkezeteken alapuló számítások	39
5.3.8.1. A kölcsönhatási energia számítása	39
5.3.8.2. A 'transducer' torziójának számítása	40
5.4. A kísérletes adatok feldolgozása és értékelése	40
6. Eredmények	42
6.1. A miozin ADP és blebbistatin hármas komplexében ('M.ADP.B') az erőgeneráló lépés kezdőállapotára emlékeztető konformációt vesz fel	42
6.1.1. Probléma és kísérleti elrendezés	42
6.1.2. A blebbistatin gátolja a DdMD konstrukciók ATPáz aktivitását	43
6.1.3. A blebbistatin az erőkar felhúzását idézi elő 'miozin.ADP' ('M.ADP') komplexben	43
6.1.3.1. A W501+ mutáns triptofán fluoreszcencia-spektrumai aktin távollétében	44
6.1.3.2. A W501+ mutáns triptofán fluoreszcenciájának hőmérséklet-függése	45
6.1.3.3. A 'miozin.ADP.AIF ₄ ' komplex képződésének kinetikája	46
6.1.4. A 'M.ADP.B' hármas komplex képződésének kinetikája	47

6.1.5. Az új konformáció megerősítése elektron-mikroszkópos felvételekkel	48
6.1.6. A blebbistatin nem változtatja meg a miozin aktinkötő sajátosságait	49
6.1.6.1. <i>A W239+ mutáns triptofán fluoreszcencia-spektrumai aktin távollétében</i>	49
6.1.6.2. <i>A W239+ mutáns triptofán fluoreszcenciájának hőmérséklet-függése</i>	50
6.1.6.3. <i>A blebbistatin hatása a miozin-nukleotid komplexek aktinkötésére</i>	51
6.1.7. A 'M.ADP.B' komplex aktinkötésének kinetikája	52
6.1.7.1. <i>A 'M.ADP' és a 'M.ADP.B' komplex aktinkötési kinetikájának összehasonlítása</i>	52
6.1.7.2. <i>Az 'aktomiozin.ADP.blebbistatin' ('A.M.ADP.B') négyes komplex képződése</i>	56
6.1.8. A miozinfejek többsége 'A.M.ADP.B' négyes komplexben is erős aktinkötő, felhúzott erőkarú állapotban van jelen	57
6.1.8.1. <i>A W501+ mutáns triptofán fluoreszcencia-spektrumai aktin jelenlétében</i>	57
6.1.8.2. <i>Az erős és gyenge aktinkötő állapotok megoszlása pirén-aktin spektrumok alapján</i>	58
6.1.9. A blebbistatin kötése nem változtatja meg az apo miozin szerkezetét	59
6.2. Az aktinkötő zseb bezáródása meghatározza a miozinok aktinkötésének energetikáját	61
6.2.1. Probléma és kísérleti elrendezés	61
6.2.2. A miozin aktinkötő folyamata: hasonlóságok és különbségek az izoformák között	63
6.2.2.1. <i>A pirén-aktin fluoreszcencia-spektrumok</i>	63
6.2.2.2. <i>Az aktinkötés kinetikája</i>	63
6.2.2.3. <i>Az aktinkötés kinetikájának ionerősség-függése</i>	65
6.2.3. Az aktin nélkül is zárt árokkal bíró miozinok aktinkötése nukleotid távollétében exoterm folyamat	65

6.2.3.1. Az aktinkötés kinetikájának hőmérséklet-függése	65
6.2.3.2. Az aktomiozin disszociáció kinetikájának hőmérséklet-függése	66
6.2.3.3. Az aktomiozin kölcsönhatás energetikája nukleotid távollétében	67
6.2.4. Az exoterm és endoterm aktinkötés igazolása fluoreszcencia-mérések egyensúlyi titrálásokkal	67
6.2.5. Az exoterm és endoterm aktinkötés megerősítése kalorimetriával	69
6.2.6. Az aktomiozin kölcsönhatást az ADP jelenléte entalpiakusan kedvezőtlenebb irányba tolja el	70
6.2.7. Az aktinkötés termodinamikai paramétereinek összefoglalása	71
6.2.8. Az aktinkötő árok két felülete közti kötés energetikája	73
6.2.9. A 'transducer' torziós szöge hasonló az egyes izoformákban	74
7. Az eredmények megbeszélése	76
7.1. Az erőgeneráló lépés kezdőállapota	76
7.2. Az aktinkötés energetikája	77
8. Konklúzió és kitekintés	82
9. Köszönetnyilvánítás	83
10. Publikációk	84
11. Rövidítések	86
12. Ábrák és táblázatok jegyzéke	88
12.1. Ábrák jegyzéke	88
12.2. Táblázatok jegyzéke	90
13. Függelék	92
13.1. Pufferek és reagens oldatok	92
13.2. Minták összetétele	93
13.2.1. A steady-state ATPáz mérések mintái	94
13.2.2. A koszedimentációs kísérletek mintái	95
13.3. A megállított áramlásos (<i>stopped-flow</i>) készülék elve	95
13.4. A <i>K-means clustering</i> eljárás	96
13.5. A felhasznált egyenletek	97
13.6. A használt illesztések	98

14. Táblázatok 100

15. Irodalom 115

1. Összefoglalás

1.1. Magyar nyelvű összefoglalás

E munkában az aktomiozin rendszerben kulcsfontosságú erőgenerálási lépésről szerzett új ismereteinket írom le. Az erőgenerálás a miozin motor működésének az alapja, melynek során az ATP-hidrolízis termékei felszabadulnak, a miozin erős aktinkötést létesít, erőkarja lecsapódik és a molekula disztális része elmozdul az aktinfilamentum mentén. Korábbi eredmények azt sugallták, hogy az erőgenerálás kezdőpontja egy magas aktin affinitású, felhúzott erőkarú miozin lehet. Egy ilyen tulajdonságokkal bíró állapotot elsőként sikerült kimutatnunk: blebbistatin inhibitor és ADP jelenlétében a miozin megőrzi magas aktin affinitását, de egy felhúzott erőkarú szerkezetet vesz fel. Másképpen szólva az inhibitor „befagyasztja” az ATPáz ciklusban az erőgenerálásnak ezt a köztiállapotát. Az erőgenerálás végállapota a nukleotidmentes, *rigor* aktomiozin komplex, melynek atomi szerkezete ma sem ismert. A meglévő szerkezeti és kinetikai adatok alapján a *rigor* komplex kialakulásához a miozin ún. aktinkötő árkának be kell záródnia. A *rigor* aktomiozin állapotba az egyes miozin izoformák más-más útvonalon és energetikával juthatnak. Azt találtuk, hogy ez az energetikai változatosság az izoformák szerkezeti változatosságával függ össze: az aktin távollétében is zárt árokkal bíró *Loligo* és *Dictyostelium* miozin 2 formák, valamint a vezikula-transzporter miozin 5 aktinkötése exoterm folyamat, ellentétben az aktin távollétében nyitott árkú gerinces vázizom miozin 2 endoterm aktinkötésével. Az előbbi esetben az aktinkötés csupán egyetlen lépést feltételez, a második esetében a már korábban elfogadott modell két lépést ír le. Az aktinkötés során a miozinmolekula a központi β -lemez, a – valószínűleg a nukleotid- és aktinkötő hely közti kommunikációban szereplő – *transducer* torziójának változása révén belső feszülést is elszenved. Számításaink szerint a torziós szög változása azonos mértékű a különböző szerkezettel és aktinkötési energetikával jellemzett izoformákban, ami azt támasztja alá, hogy a *transducer* valóban szerepet játszik az erőgenerálásban is.

1.2. Summary in English

In this thesis I describe our new findings on the powerstroke, the key step of the mechanochemical cycle of the actomyosin system. The powerstroke is the basis of

myosin's motor function and force generation. Upon this process, the release of ATP hydrolysis products occurs, myosin forms strong interactions with the actin filament, myosin's lever swings and the distal part of myosin translocates relative to the actin filament. Based on previous results, a high actin-affinity, primed-lever myosin intermediate was proposed to be the start point of myosin's powerstroke. We first captured a state characterized with these properties: myosin complexed with ADP and blebbistatin inhibitor retains its high actin affinity but it primes the lever. In other words, blebbistatin „freezes” myosin's ATPase cycle in this „start-of-powerstroke” intermediate. The end state of the powerstroke is the nucleotide-free *rigor* actomyosin complex. The atomic structure of the *rigor* complex is still lacking. However, structural and kinetic data indicate that the actin-binding cleft of myosin must undergo a closure upon formation of the *rigor* complex. Different myosin isoforms may use different pathways and energetics upon binding to actin. We found that the isoform's energetic variability relates the isoform's structural variability. Myosins adopting a closed cleft even in the absence of actin – some myosin 2 isoforms or vesicle transporter myosin 5 – bind to actin exothermically in contrast to endothermic actinbinding of vertebrate muscle myosin 2 which has an open cleft in the absence of actin. Actin binding was considered to involve only one step in the former and two steps in the latter case. Upon actin binding, myosin molecules undergo an internal strain by the torsional twist of its central β -sheet. This element, the so-called *transducer* proposed to play a role in the communication between myosin's actin- and nucleotide-binding pocket. According to our calculations the change of the torsional angle of the *transducer* is similar in all isoforms characterized with different structures and actin binding energetics. This result supports the idea that the *transducer* plays a role in force generation as well.

2. Bevezetés

2.1. A kutatási irány

Doktori munkámban egy régóta kutatott fehérjét, a miozin 2-t vizsgáltam. Ha egy laikusnak kell elmagyaráznom, mivel foglalkozom, azt válaszolom, motorfehérjéssel. Motorfehérjék minden élő sejtben, sőt, a vírusokban is jelen vannak. E motorok teszik lehetővé az egyes molekulák, sejtalkotók, sejtek, testrészek, sőt, végső soron az egész szervezet mozgását. A legismertebb példa erre az ún. *konvencionális* miozinok közé (a miozin 2 osztályba) tartozó vázizom miozin, mely egyben a legrégebben ismert miozin motor. Az izomműködés elve a máig elfogadott csúszó filamentum elmélet szerint az, hogy a vastag szálakba (*filamentumokba*) szerveződő miozin – kereszthidak révén – elcsúszik az aktinból felépülő vékony filamentumokon.

A miozinok nemcsak a vázizomban, hanem minden eukarióta sejtben megtalálhatóak, és számos formájuk ismert. Különböző típusaik részt vesznek a sejtben belüli szállítási (*transport-*) folyamatokban, a sejtalk meghatározásában, a sejtosztódásban, a sejtmozgásokban, vagy akár az egyes érzékszervek és az izmok működésében. Hibás működésük vagy mutáns formáik különböző betegségeket vagy kórképeket okozhatnak. Megismerésük – az alapvető tudományos kíváncsiságon túl – ezért is nagy jelentőségű a biológiában. A miozinok kutatása ezen felül, mondhatni, hungarikum, hiszen miozint Szent-Györgyi Albert, aktint Straub F. Brunó csoportja izolált először a világon. Az ELTE TTK Biokémiai Csoportjának, majd Biokémiai Tanszékének tudományos hírnevét is – többek között – az izombiokémiai vizsgálatok eredményei alapozták meg, Bíró Endre tanszékvezető professzor irányításával. A motorfehérjék kutatásában azóta is megfigyelhető a folytonosság a tanszéken (1).

A munkához szükséges motivációt a fentiekén túl elsősorban az tartja fenn, hogy a miozin erőgenerálásával kapcsolatos legérdekesebb kérdések még mindig megoldatlanok. Dolgozatom az erőgenerálás témájával foglalkozik, vagyis azzal, hogyan képes a miozin elmozdulni az aktin mentén.

2.2. A használt nevezéktan és jelölések

A dolgozatot magyarul írtam meg, ezért igyekeztem mindent magyarul megfogalmazni vagy magyarra lefordítani. Az idegen nyelvű szakkifejezéseket,

„szakzsargon”, tudományos neveket vagy lefordíthatatlan szavakat (pl. *steady-state*, *miniprep kit*, *transducer*) dőlt betűvel szedtem. A magyar szakkifejezések mellett ugyanígy dőlt betűvel megemlítettem azoknak az angol nyelvű szakirodalomban használatos párját is, ha szükségesnek tartottam (pl.: *actin binding clef*).

Az egyes miozin osztályokat arab számmal írtam. A miozin konstrukciókat a publikációinkban használt módon neveztem, ezek leírása az **5.2. Fehérjetermelés, fehérjepreparálás** alfejezetben, valamint összefoglalva az **1-2. táblázatban** található.

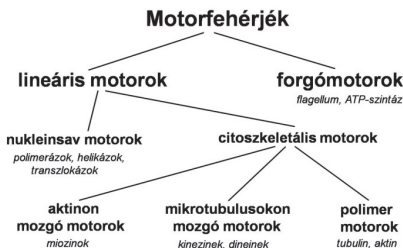
Fontosnak tartottam kiemelni, hogy ki milyen hozzájárulást tett doktori munkámhoz, illetve e dolgozathoz. Ezért az igeragozásnál az alábbi elveket követtem, hogy a történetekhez hű maradjak. A kísérletek és eredmények leírásánál múlt időt; az eredmények értelmezésénél és megbeszélésénél jelen időt használtam. Többes szám első személyben fogalmaztam a fehérjepreparálások receptjénél, a kísérletek tervezésénél (pl. „a komplex képződését ... követtük nyomon”), a másokkal közösen kivitelezett munkáknál – a kollégákat megnevezve – és az eredmények értelmezésénél. A kollaborátoraink által elvégzett munkákat mindig az ő nevükön írtam le. Végül egyes szám első személyben fogalmaztam a magam által elvégzett és értékelt méréseknél, valamint a dolgozat elkészítésére vonatkozó megjegyzéseknél.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. A motorfehérjék meghatározása és csoportosítása

A motorfehérjék energiát igényelnek, amit valamilyen energiatermelő kémiai reakcióból nyernek – ez a legtöbb motornál az ATP vagy GTP hidrolízise. Mivel így kémiai energiát alakítanak mechanikai energiává (*kemomechanikai energia transzdukció*), mechanoenzimeknek is nevezik és katalitikus mechanizmusuk alapján az energázok csoportjába (2) sorolják ezeket az enzimeket.

A motorfehérjéket a mozgás iránya szerint lineáris és forgómotorokra oszthatjuk (1. ábra).

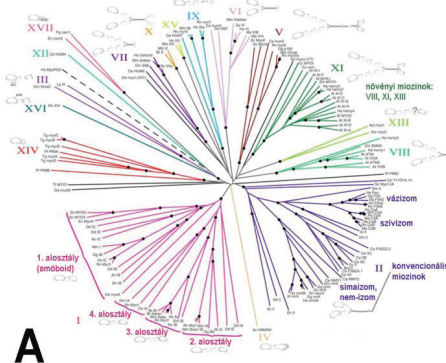


1. ábra: A motorfehérjék csoportosítása.

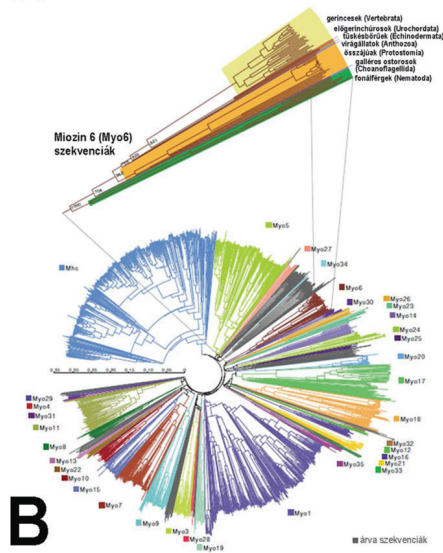
Forgómotor a bakteriális ostor (*flagellum*), valamint az oxidatív foszforilációban szereplő ATP-szintáz. A lineáris motorokat tovább csoportosíthatjuk nukleinsav- és citoszkeletális motorokra. DNS és RNS mentén mozognak a polimerázok, helikázok; és egyéb, a működésük során szereplő enzimek (transzlokázok, rekombináázok stb.). A mikrotubulus „síneken” a kinezinok és dineinek lépkednek. A miozinok definíció szerint azok a motorok, amelyek aktinfilamentumon haladnak. A tubulín és aktin önmagában a polimer motorok közé tartozik (3).

3.2. A miozin szupercsalád és evolúciója

A miozinok valószínűleg a kinezinokkal (és G-fehérjékkel) közös előalakból, egy ősi nukleotidkötő fehérjéből alakultak ki (4). A miozin szupercsaládot a filogenetikai elemzések egyre több csoportra osztják (5-8), a legújabb kutatások szerint már 35 osztályt foglal magába (2. ábra) (9).



A



B

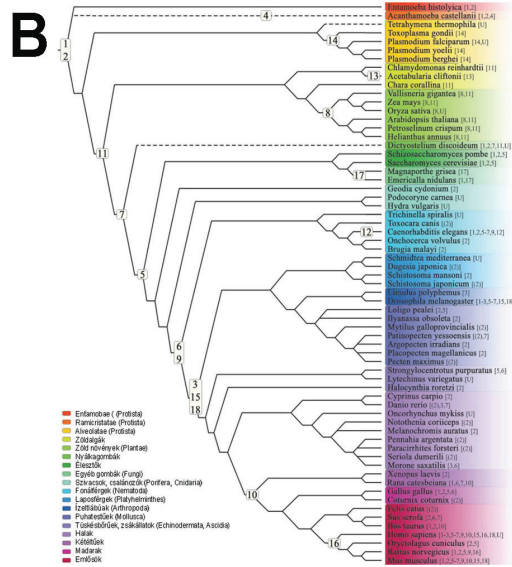
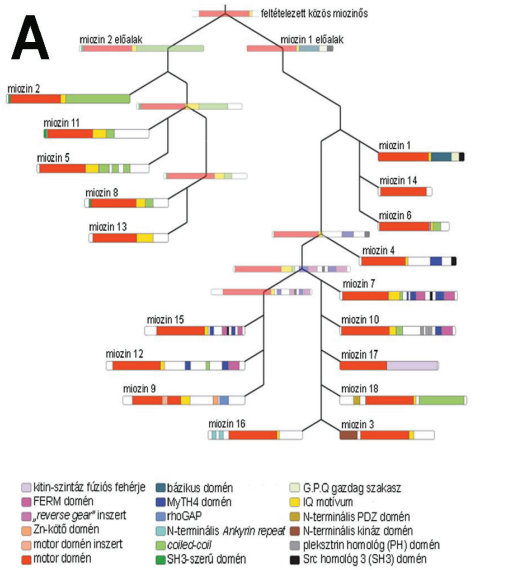
2. ábra: A miozin szupercsalád gyökértelen filogenetikai fája a motor domének szekvenciái alapján.

A filogenetikai fa a) Hodge és Cope (7); illetve b) Odronitz és Kollmar (9) szerint módosítva. A b) panelen a kiemelt részlet a miozin 6 osztály formáinak a különböző taxonokban való megjelenését mutatja.

A miozin szupercsalád feltételezett evolúcióját mutatja a **3. ábra** (10). A legkorábban megjelent miozin formák e tanulmány szerint a miozin 1 – mely a membránforgalomban játszik szerepet – és a miozin 2 – mely ősi funkciója az osztódás után a leánysejtek szétválásása – lehettek; a többi osztály ezekből alakult ki. Ennek fényében érdekes, hogy a mai növényekben nincsen miozin 2. Nagy formagazdagságának és általános előfordulásának köszönhetően a miozin szupercsalád mára az eukarióta

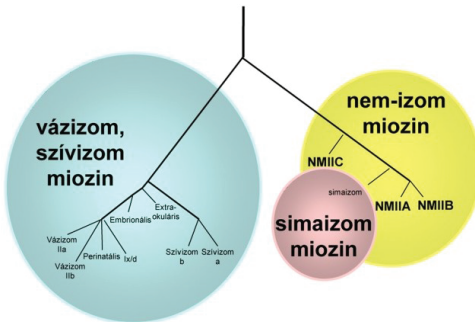
életfa filogenetikai kutatásának is fontos objektumává vált (9,11,12).

Konvencionális miozinoknak nevezik összefoglaló néven a miozin 2 osztályba tartozó váz- és szívizom, simaizom és nem-izom miozin 2 izoformákat. Ezek leszármazása szerint a simaizom és a nem-izom miozinok alkotják az egyik, a váz- és szívizom miozinok a másik fő kládot (**4. ábra**) (13).



3. ábra: A miozin szuperfamilia feltételezett evolúciója Thompson és Langford (10) alapján módosítva.

a) Az egyes miozin osztályok leszármazása és a miozin formák doménszerkezete; b) a miozin osztályok megjelenése a törzsféjlődés során. A felsorolt fajok mellett szögletes zárójelben az azokban leírt miozin osztály(ok) száma szerepel, külön zárójelben szedve a cikk megjelenéséig még nem publikált eredményeket; „U – unclassified” a még nem osztályozott miozin(oka)t jelenti.

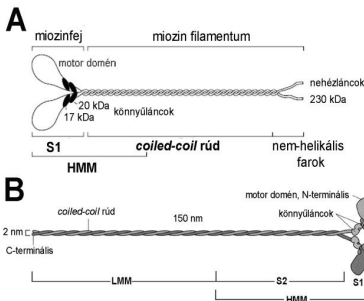


4. ábra: A konvencionális miozinok leszármazása Golomb és mtsai (13) alapján módosítva.

A humán miozin 2 izoformák filogenetikai fája a nehézláncok szekvenciái alapján, az aminosavak egyezőségének függvényében.

3.3. A miozinmolekula felépítése és fragmentumai

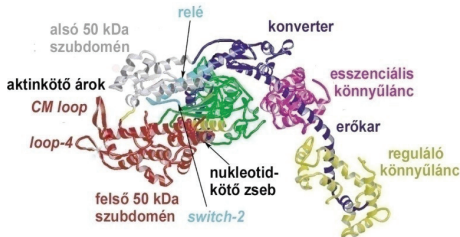
A miozinok multimer fehérjék: nehéz- és könnyűláncokból állnak. A nehézlánc (MHC) fej- és farokrégióra osztható (**5. ábra**). Az N-terminális fej (*subfragmentum-I*, *SI*) szerkezetét és szekvenciáját tekintve a legkonzervatívabb része a molekulának. Ez tartalmazza a motordomént és az erőkart. A motordomén (MD) a katalitikus rész, melynek funkcionális egységei a nukleotid- és aktinkötő zseb, valamint az átalakító (*relékonverter*) régió. Ez utóbbi erősíti fel a nukleotidkötő zsebben történő kis szerkezeti változást, mely az erőkarra (*lever arm* vagy röviden *lever*) terjed át, annak lecsapásához vezetve. Az erőkar a nehézlánc egy α -helikális szakaszából és az ennek IQ-motívumaihoz kötődő, stabilizáló könnyűláncokból (MLC) áll. A miozin 2 formákhöz nehézláncokként két, a kalmodulin családba tartozó könnyűlánc; a 17 kDa-os esszenciális és a 20 kDa-os regulációs könnyűlánc (ELC, RLC) csatlakozik (**6. ábra**). Az erőkar funkcióját magányos töltött α -hélix movumok (CSAH) is betölthetik (14,15). A miozinok C-terminális farokrégiója mutatja szerepe és szerkezete szerint a legnagyobb változatosságot az egyes osztályokban; különféle effektor doméneket tartalmazhat (pl. kináz domén a miozin 3 (16) vagy membránkötő domén a miozin 10 (17) esetén). A konvencionális miozinokban a farokrégió fiziológiás ionerősségnél *coiled-coil* filamentumot formál. A legújabb kutatások szerint ez a *coiled-coil* „rúd” (pálca, *rod*) nem pusztán szerkezeti elem, hanem flexibilis, a szabályozásban is szerepet játszó rész (18). E filamentum jelenléte ugyanakkor megnehezíti az oldatkinetikai vizsgálatokat. A gyakorlatban ezért különböző fragmentumokat vizsgálnak oldatban. Az e fragmentumokat előállító limitált proteolízist Szent-Györgyi és Mihályi alkalmazta először (19,20).



5. ábra: A miozin 2 alegység-szerkezete.

- a) Conti és Adelstein (21), illetve
b) Szent-Györgyi (22) alapján módosítva.

A miozinok tripszinnel vagy kimotripszinnel nehéz (HMM) és könnyű (LMM) meromiozina hasíthatóak. A HMM a két fejet és a farokrégió egy rövid szakaszát foglalja magába, az LMM a „maradék” farokrész. A HMM már szolubilis, vizsgálható oldatban, de papainnal tovább emészthető két S1 (fej) és egy S2 (a maradék *coiled-coil*) fragmentumra (5-6. ábra). Az S1 is tovább bontható limitált proteolízissal egy 50 kDa, egy 25 kDa és egy 20 kDa fragmentumra (23). Az 50 kDa fragmentum tartalmazza az aktinkötő árkot (*actin binding cleft, 50 kDa cleft*) egy hosszanti hasíték formájában. Ezt a régiót ezért felső és alsó 50 kDa szubdoménre (U50 – *upper50*, L50 – *lower50*) osztják (6. ábra). A 20 kDa fragmentum molekulatömege az erőkar nehézlánc-részével együtt értendő.



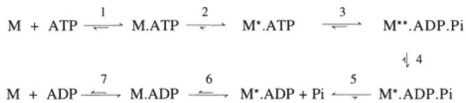
6. ábra: A miozin 2 S1 felépítése és funkcionális egységei.

A csirke vázizom miozin S1 fragmentumának szerkezete Rayment és mtsai (24) alapján módosítva.

3.4. A miozin ATPáz mechanizmusa

A miozin (M) aktin távollétében végbemenő ATPáz ciklusát Bagshaw és Trentham írta le (25-27) (7. ábra). Sémájuk szerint az ütközési komplex kialakulása (1. lépés) után következik egy kvázi-irreverzibilis konformáció-változás (2. lépés). Maga a hidrolízis

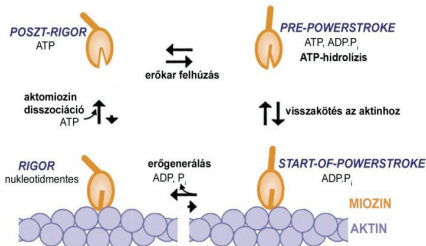
(3.) lépés lassabb, reverzibilis reakció. Ekkor történik a miozin „felhúzása”, mely a következő (4.) lépésben relaxálódik. Ezután történik meg a termékek (P_i és ADP) felszabadulása (5-7. lépés). A séma fontos tulajdonsága, hogy az ATPáz reakció hajtóerejét az ATP-kötés szabadenergia-különbségének tulajdonítja.



7. ábra: A Bagshaw-Trentham séma.

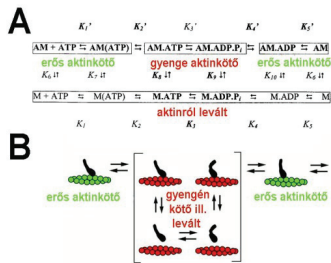
A magas fluoreszcenciájú állapotokat „*” illetve „**” jelöli.

A miozin aktin jelenlétében végbemenő ATPáz ciklusát a kemomechanikai ciklus modell írja le, mely 4 alapvető lépést különböztet meg (28,29) (**8. ábra**). A nukleotidmentes, *rigor* aktomiozin komplex ATP kötés hatására disszociál. A következő lépés az ATP hidrolízise, mely során a miozin erőkarja felhúzódik (*lever priming*). A miozin így kötődik vissza az aktinhoz (M.ADP.P_i). Végül a termékek felszabadulásával kapcsoltan megtörténik az erőgeneráló lépés (*powerstroke*), melynek során a miozin erőkarja lecsapódik és a miozin disztális része elcsúszik az aktinfilamentumhoz képest.



8. ábra: Az aktomiozin kemomechanikai ciklus modellje (Lymn-Taylor modell), a legfontosabb szerkezetek elnevezésével.

A miozin ciklikus működése során erős és gyenge aktinkötő állapotok váltakoznak (**9. ábra**). Erős aktinkötő állapotot a nukleotidmentes (*rigor*) és az ADP-kötött miozin, gyenge aktinkötő az ATP, vagy ADP.P_i-kötött miozin.



9. ábra: Erős és gyenge aktinkötő állapotok megoszlása De La Cruz és mtsai szerint.

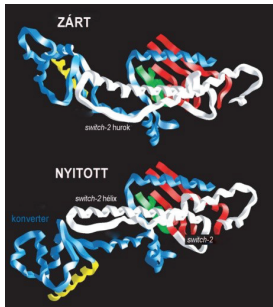
a) A kinetikai séma (30); b) a rajzolt séma (31) alapján módosítva

3.5. A miozin funkcionális egységei

A miozinfaj funkcionális egységei az aktinkötő régió és nukleotidkötő hely, valamint az erőkar.

Az aktinkötő árok az 50 kDa fragmentumban található (**6. ábra**), ezért 50 kDa ároknak is nevezik. Az aktin kötésében számos felszíni hurok vesz részt: *loop-4*, *CM (cardiomyopathy) loop*, prolin-gazdag/aktivációs hurok. A *loop-4* stabilizálja az aktomiozin kölcsönhatást, a hegyén elhelyezkedő savas oldallánc az aktin bázikus aminosavaival sóhidat képez (32). A *CM-loop* (33) és a prolin-gazdag/aktivációs hurok a miozin aktin aktivációjához szükséges (Várkuti és mtsai, közlés alatt).

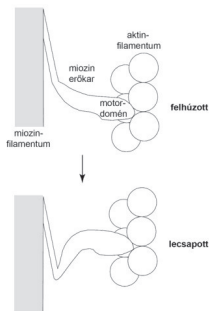
A nukleotidkötő zseb kialakításában egymástól szekvenciálisan távol eső hurkok játszanak szerepet, melyek közül a legfontosabbak: a P-hurok (foszfátkötő hurok, *P-loop*), a *switch-1* (kapcsoló-1) és a *switch-2* (kapcsoló-2). Ezek a felszíni hurkok igen konzervatív részei a miozin fejnek, nevüket a G-fehérjékben fellelhető homológ szekvenciákról kapták (4). A P-hurok NTPázok az egyik legnagyobb és legősibb csoportot alkotják a citoplazmatikus fehérjék közt (34,35). Idetartoznak a miozinokon kívül a kinezinok és a P-hurok GTPáz fehérjék (pl. Rac, Rho cserefaktorok). A P-hurok szekvenciája szerint egy glicin-gazdag szakaszt egy lizin, majd egy szerin vagy treonin követ (36). A *switch-1* és *switch-2* hurkok az atomi szerkezetek tanúsága szerint képesek külön-külön nyitott és zárt állapotban előfordulni. A „nyitott” és „zárt” kifejezések a ligandum szempontjából értendők; azaz zárt konformációnak nevezzük, amikor a hurok a nukleotidhoz közelebb, nyitott konformációnak, amikor a hurok a nukleotidtól távolabb van (**10. ábra**). A *switch-2* záródásával járó konformáció-változás endoterm folyamat (37).



10. ábra: A *switch-2* helyzete; zárt és nyitott állapota Geeves és Holmes (38) alapján módosítva.

A zárt-nyitott átmenet során a konverter helyzetének megváltozása a *switch-2* elem elmozdulását idézi elő: a *switch-2* hélix a hozzá kapcsolódó *switch-2* hurok hajlását és csavarodását eredményezi.

Az erőkart a konverter kapcsolja a relé régióhoz, ami pedig az aktinkötő régióval és a nukleotidkötő zsebbel teremt kapcsolatot. Az erőkar két fő konformációja a felhúzott (*up* vagy *primed*) és a lecsapott (*down* vagy *knocked*) állapot (**11. ábra**).



11. ábra: Az erőkar két végállapota Geeves és Holmes (38) alapján módosítva.

Az aktomiozin „keresztábrában” történő szerkezeti változása a miozin disztális, erőkarként szolgáló részének elmozdulására korlátozódik.

3.6. Kommunikáció a miozin molekulán belül

A fenti funkcionális egységek közti allosztérikus kommunikáció képezi a motor működés alapját. A jelenlegi modell szerint az allosztéria az alábbi módokon valósul meg:

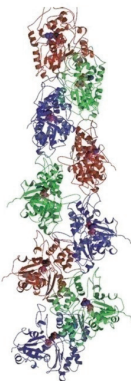
- 1) Az erős aktinkötés létrejöttéhez a miozinfej felső és alsó 50 kDa szubdoménjei közt levő aktinkötő ároknak be kell záródnia (39-41).
- 2) Az aktin-miozin kölcsönhatás a *switch-1* hurok mozgásával kapcsolatos folyamat: erős aktinkötő állapotokban a *switch-1* nyitott, gyenge aktinkötő állapotokban

zárt konformációban található. A *switch-1* ilyen módon a nukleotid- és az aktinkötő hely közti kommunikációban játszik szerepet (42,43).

- 3) A *switch-2* hurok mozgása az erőkarral van összhangban aktinról levált állapotban: felhúzott erőkarnál a *switch-2* zárt, lecsapott erőkarnál a *switch-2* nyitott konformációjú. A *switch-2* így a nukleotidkötő hely, valamint az erőkar közti kommunikációban szerepel (37,44,45).
- 4) Az erőgenerálás nem az erőkar felhúzásával ellentétes konformációs útvonalon megy végbe, hanem zárt *switch-1* és *switch-2* hurok mellett történik az erőkar lecsapása (51).

3.7. Az aktin és az aktomiozin komplex szerkezete

Az aktint Straub F. Brunó azonosította 1943-ban. Az aktin monomer (globuláris vagy G-aktin) atomi szerkezetét csak 1990-ben írták le (46), DNáz I-gyel és egyéb komplexekben kristályosítva. A G-aktint két, egymáshoz hasonló domén alkotja – miozin- és DNS-kötő domén –, melyeket egy ötszálú β -lemez és α -hélix alkotnak. A Mg-nukleotid a két domén közti árokba, a β -lemezek közé kötődik. Mindkét domén két szubdoménből épül fel, melyek egyike az aktin-aktin kölcsönhatásokban, a másik pedig a nukleotid kötőseb kialakításában vesz részt. Az aktinfilamentum (F-aktin) szerkezeti modelljét úgy építették fel, hogy orientált aktin gélek röntgenszórásos képébe illesztették bele a G-aktin atomi szerkezetét. Az F-aktin eszerint 13 monomer balmenetes hélixeként írható le (47) (**12. ábra**).



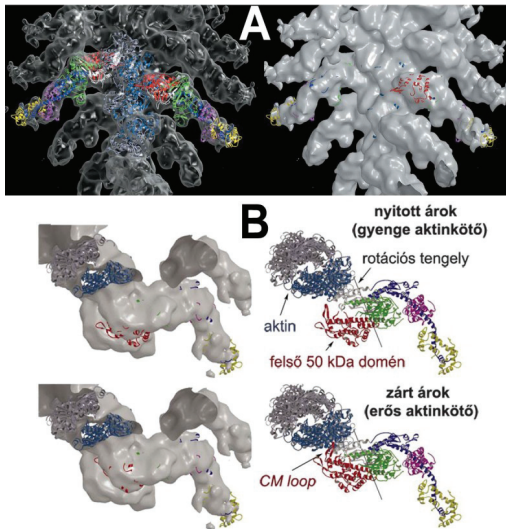
12. ábra: Az aktin szerkezete Geeves és Holmes (38) szerint. Az egyes aktin protomerek különböző színnel láthatók.

A filamentum kialakulása során bekövetkező konformációváltozásokat a modell finomítása során írták le. Ugyanekkor határozták meg az F-aktint stabilizáló ciklikus peptid, a falloidin kötőhelyét, valamint falloidin-kötött aktin szerkezetét (48). Az aktin polimerizációja során a monomerek 166° -ot fordulnak el egymáshoz képest, másrészt a szubdomének is 0,3-0,4 nm-rel közelebb kerülnek egymáshoz, bezárva a nukleotid kötőhelyet.

Az F-aktin legújabb szerkezeti modellje 2009-ben látott napvilágot (49). Ez a korábbiakhoz képest egy síkabb, kompaktabb szerkezetéről számol be, amit a G-aktin 2 doménjének egymáshoz képest 20° -kal való elfordulása idéz elő.

Az aktinfilamentum dinamikus fel- és leépülése (*treadmilling*) során alacsony ATPáz aktivitás mérhető. Ez a jelenség alakítja ki az aktinfilamentum direkcionálisát és az aktin polimer motor működését: az ATP-kötött G-aktin monomerek folyamatosan asszociálódnak a + véghez (*barbed end*) és az ADP-kötött monomerek folyamatosan disszociálódnak a – végről (*pointed end*).

Az aktomiozin *rigor* komplex pontos atomi szerkezete a mai napig sem ismert. A komplex modelljét a miozinfaj meglévő *poszt-rigor* szerkezetének a miozinnal telített „dekorált” aktin krio-elektronmikroszkópos felvételébe való illesztésével kapták meg (13. ábra) (43,50).

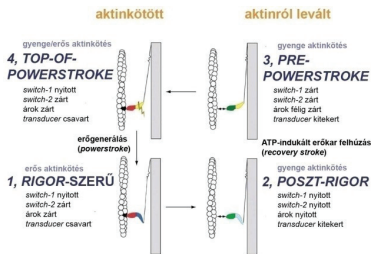


13. ábra: Az aktomiozin komplex modellje Holmes és mtsai alapján módosítva.

a) Az F-aktin és a miozin 2 S1 kristályszerkezeti modelljének illesztése az aktomiozin „keresztthíd” elektronmikroszkópos felvételek alapján készített térkitöltő modelljébe (50) szerint. A két ábra ugyanazt mutatja; két keresztthíd látható átlátszó, illetve átlátszatlan felszínnel. b) Az erős aktinkötés során bekövetkező konformáció-változás térkitöltő modellen, illetve röntgenszerkezettel ábrázolva (43) szerint. A röntgenszerkezetet a modellbe illesztve látszik, hogy a miozin

molekula egyes részei – pl. gyenge kötő állapotban a felső 50 kDa domén – a modell szerinti felszínén kívül esnek. A nem jelölt részek szinkódja a 6. ábrával egyezik (kék: konverter és erőkar, zöld: N-terminális 25 kDa domén, rózsaszín: ELC, sárga: RLC).

Az aktomiozin ciklus modelljét a szerkezetekkel összhangban a **14. ábra** mutatja. A modellben a *switch-1* és *switch-2* huroknak, az aktinkötő ároknak és a motordomén központi β -lemezének (*transducer*) az állapotait feleltették meg a Lymn-Taylor modell 4 lépésével.



14. ábra: Az aktomiozin kemomechanikai ciklus modellje a szerkezetekkel összhangban Geeves és Holmes (51) alapján módosítva.

Az aktomiozin kölcsönhatást energetikai szempontból is vizsgálták. A nyúl modellen tanulmányozott gerinces vázizom miozin 2 S1 (skS1) aktinkötése entrópia-hajtott, endoterm folyamat (52-55). Egyéb miozin izoformák más-más aktivációs entalpiaváltozást mutattak aktinkötés hatására (56). Az erős aktinkötés kialakulása nagyban hozzájárul az erőgenerálás során történő munkavégzéshez (57). A miozin energetikai állapotához valószínűleg a motordomén központi β -lemezének (a *transducer*-nek) a torziója is hozzájárul, ami a miozin konformáció-változásai során következik be.

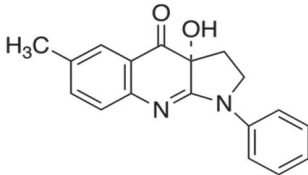
3.8. Miozin gátlók

A miozin gátlására többféle inhibitor is leírtak, azonban ezek alkalmazhatósága korlátozott. A BDM – 2,3-butándion-monoxim – egyéb sejtfehérjékkel is kölcsönhatásba lép (58); a BTS – N-benzil-p-toluolszulfonamid – befolyásolja a miozin aktin affinitását (59).

A blebbistatint (**15. ábra**) a sejtosztódást gátló miozin inhibitoraként írták le (60). Későbbi vizsgálatok kiderítették, hogy a nem-izom miozin izoformákon kívül a vázizom és bizonyos simaizom miozinok specifikus inhibitora is (61-63). Ugyanakkor szelektív inhibitor: más osztályokba tartozó miozinok ATPáz aktivitását nem gátolja (62). Gátló hatását úgy fejt ki, hogy az aktinkötő árok mélyére köt (**16. ábra**), a poszt-hidrolizis állapotban blokkolja a miozint (M.ADP.P_i komplex), gátolja a motilitást és lassítja a

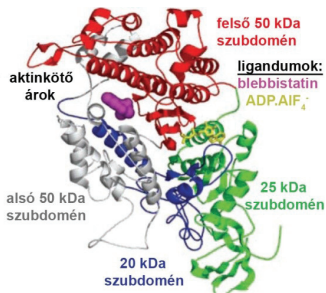
foszfat-felszabadulást (61,64). Ez a blokkolt szerkezet a miozin gyenge aktinkötő állapota, így a blebbistatin használata azzal az előnnyel jár, hogy a sejten belül nem okoz aktin-miozin „keresztkötéseket”. A jelátviteli kutatásokban és *in vivo* munkákban ezért széleskörűen alkalmazzák, amikor a miozin 2 izoformák funkcióját ki akarják iltetni.

A blebbistatin fontos, a sejtbiológiai és fluoreszcens kísérletekben figyelembe veendő tulajdonsága, hogy a kék és az UV fény inaktíválja (65,66).



15. ábra: A blebbistatin szerkezete.

Forrás: trc-canada.com. Az S(-)blebbistatin kémiai szerkezete szerint 1-fenil-1,2,3,4-tetrahidro-4-hidoxipirroló-[2,3-b]-7-metilkinolin-4-on.



16. ábra: A blebbistatin az aktinkötő árok mélyére köt.

Témavezetőm és mtsai (61) alapján módosítva. Az ábrázolt miozin 2 a DdMD MgADP·AlF₄⁻-komplexe (PDB kód: 1MND).

4. Célkitűzések és kérdések

Munkánk célja az erős aktinkötés és az erőgenerálás során végbemenő szerkezetváltozások azonosítása volt. Az alábbi két témakörben a következő kérdésekre kerestük a választ:

4.1. A blebbistatin nevű inhibitor mechanizmusának vizsgálata

- 1) Hogyan befolyásolja a blebbistatin a miozin 2 motordomén konformáció-változásait?
- 2) Megváltoztatja-e a blebbistatin a nukleotidkötő zseb és az aktinkötő árok, illetve a nukleotidkötő zseb és az erőkar kapcsoltságát?

A kezdeti eredmények szerint további kérdések merültek fel, mivel ezekről is információ szerezhető a blebbistatin segítségével:

- 3) A termékfelszabadulás során az erős aktinkötés létrejötté és az erőkar lecsapása milyen konformációs változásokon keresztül valósul meg?
- 4) A már azonosított miozin.ADP.P_i.blebbistatin komplexen kívül előállítható-e az erőgenerálásnak más stabil konformációs intermediere?

4.2. Az erős aktinkötés folyamatának vizsgálata

Az erős aktinkötés létrejöttének energetikai profilja és kinetikája hogyan függ össze a miozinnal az aktin távollétében felvett szerkezetével a különböző miozin izoformákban?

- 1) Az erős aktinkötés kialakulásakor a miozinban bekövetkező konformáció-változások (pl. az árokzáródás) hogyan befolyásolják az aktinkötés energetikáját?
- 2) Az energetikai változások mennyire járulnak hozzá az erőgeneráló lépés „hajtásához”?
- 3) Az energetikai változások mennyire univerzálisak a különböző miozin izoformák erőgenerálása során?

5. Anyagok és módszerek

5.1. A munka során használt anyagok

A munkánk során használt vegyszerek és reagensek a Sigma-Aldrich termékei. A kivételek: a 'HL5' (Formedium) és az 'Insect-Xpress' (Lonza) táptalaj; az Sf9 és kompetens sejtek, a falloidin, valamint a 4-20 % gradiens Tris-Glycine gélek (Invitrogen); a geneticin és az FBS (Gibco); a DNS-izoláló *miniprep kit* és a 'Ni-NTA' agaróz gyanta (Qiagen); az anti-egér IgG ellenanyag és a Western Blue reagens (Promega); a FLAG peptid (EZBiolab); a 'Q Sepharose' gyanta (GE Healthcare); a NaHCO₃ (Reanal); az aceton, ecetsav és etanol (Molar Chemicals); az N-(1-pirén)jódacetamid (Molecular Probes); a mérésekhez használt, nagy tisztaságú ATP és ADP (Roche)¹; a blebbistatin (Calbiochem).

A műanyag eszközök, a gépek és a műszerek gyártóit a szövegben jeleztem.

5.2. Fehérjetermelés és fehérjetisztítás

5.2.1. Gerinces vázizom miozin 2 preparálás

A gerinces vázizom miozin 2-t Margossian és Lowey (54); az S1 és HMM fragmentumokat (a továbbiakban: skS1 és skHMM) Okamoto és Sekine (67) módszere alapján preparáltuk nyúl vázizomból Hegyi György professzor segítségével.

5.2.1.1. Miozinkivonás

A nyúl vázizmokat jégben lehűtöttük 15 percig, húsdarálón megdaráltuk és 3 ml/g miozin kivonópufferrel (150 mM KH₂PO₄; 300 mM KCl; 89 mM KOH) 10 percig jégben kevertettük. A szuszpenziót 7000/perc fordulatszámon 10 percig 4 °C-on centrifugáltuk Avanti J25i készülékben JLA 9.1000 rotorral, majd a felülúszót gézen átszűrtük. A tiszta felülúszó volt a miozin oldata. A miozint 12-szeres térfogatú hideg 1 mM EDTA oldatba való csurgatással kicsaptuk, majd hagytuk ülepedni. Ezután a felülúszót leszívtuk és a csapadékot 0,5 M végkoncentrációjú KCl-ban visszaoldottuk. A kicsapás, ülepités és visszaoldás ciklusát megismételtük, majd a feloldott miozint 40000/perc fordulatszámon 90 percig 4 °C-on ultracentrifugáltuk Beckman L7-65 készülékben 55.2 Ti rotorral. A felülúszó tetejéről leszívtuk a maradék lipidréteget

¹ A fehérjepreparálásoknál a Sigma-Aldrich által gyártott ATP-t használtuk.

(szükség esetén a felülúszót gézen is átszűrtük), végül a miozin oldatból koncentrációmérés után (átlagosan 40-50 mg/ml) S1, illetve HMM fragmentumot készítettünk.

5.2.1.2. Az S1 fragmentum (skS1) készítése

A miozin oldatát 1. dialízispufferrel (13,6 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 6,4 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ pH 7,2; 120 mM NaCl; 2 mM EDTA) 20-25 mg/ml koncentrációjúra hígítottuk és ugyanebben dializáltuk egy éjszakán át. Az így „felig kicsapott” miozint 0,05 mg/ml végkoncentrációjú α -kimotripsinnel emésztettük 10 percig 25 °C-on. Az emésztést 3 mM PMSF hozzáadásával állítottuk le, majd a miozint 2. dialízispufferben (20 mM HEPES pH 7,2; 10 mM KCl) egy éjszakán át dializáltuk. Végül ultracentrifugáltuk (40000/perc, 55.2 Ti rotor, 90 perc, 4 °C), a tiszta felülúszóban volt az skS1 fragmentum.

5.2.1.3. A HMM fragmentum (skHMM) készítése

A miozin oldatát először KCl; $(\text{KH})_3\text{PO}_4$ pH 6,5 és MgCl_2 oldatokkal hígítottuk úgy, hogy a miozin végkoncentrációja 20-25 mg/ml, a foszfát pufferé 50 mM, a KCl-é 500 mM, a MgCl_2 -é 2 mM legyen. A további lépéseket (emésztés és leállítás, dialízis, ultracentrifugálás) az S1 fragmentum készítésével megegyezően végeztük.

A tisztított fragmentumok rendszerint 4-7 mg/ml (30-50 μM , $M_r = 134$ kDa, skS1); illetve 1,5-5,5 mg/ml (10-30 μM , $M_r = 170$ kDa, skHMM) koncentrációjúak voltak. Az S1 és HMM mintákat 250 μl -ként fagyasztócsövekbe (Greiner Bio-One) töltöttük és így fagyasztottuk le folyékony nitrogénben, majd Arpege 110 tartályban (VWR) tároltuk.

5.2.2. *Dictyostelium discoideum* miozin 2 motordomén (DdMD) expresszió

A vad típusú (m761), valamint az egy-triptofános (W239+, W501+) miozin 2 motordomén konstrukciókat *Dictyostelium discoideum* sejtes nyálkagomba rendszerben expresszáltuk (68,69).

A laborban korábban, a pDXA-3H/M761 plazmid (70) mutagenézisével² készített szekvenciákat (42,45) $\text{DH5}\alpha$ *E. coli* kompetens sejtekben szaporítottuk fel és *QiaPrep*

² A W501+ mutánsban a vad típusú DdMD m761 másik három triptofánját (W36, W42, W584) cserélték fenilalaninra; a W239+ esetén először mind a négy triptofánt fenilalaninra mutálták (W- konstrukció), majd a vad típusú F239-et triptofánra.

spin miniprep kit segítségével izoláltuk. A konstrukciókat elektroporálással (Gene Pulser XCell készülékkel, Bio-Rad) juttattuk *Dictyostelium discoideum* (a továbbiakban: Dd) AX2 ORF+ sejtekbe (71). A Dd sejteket 21 °C-on növesztettük 20 ml HL5 táptalajban 12,4 g/l glükóz; 100 unit/ml penicillin; 0,1 mg/ml streptomycin és geneticinjelenlétében 75 cm²-es sejtenyésztő lemezen (TPP). A plazmidot felvett sejteket először 10 mg/l geneticinnel szelektáltuk, és csak a lemez benövése után alkalmaztuk 30 mg/l koncentrációban. A lemez benövése után a sejteket 100 ml kultúrába oltottuk át és ráztuk 120/perc fordulatszámon 21 °C-on. 10⁷/ml sejszám elérése után a kultúrát 100 ml-ből először 400 ml-be, majd ebből 4l-be oltottuk át.

A lemez benövéséhez elektroporálás után 7-21 napra volt szüksége a Dd sejteknek, egyéb esetben 2-3 naponta kellett átoltani a lemezen vagy rázatva fenntartott kultúrát.

5.2.3. DdMD preparálás

A Dd sejteket 10⁷/ml sejszám elérésekor centrifugálással gyűjtöttük össze (2700/perc, 7 perc, 4 °C Beckman J2-MC készülékben, JLA 10.500 rotorral), majd egyszer PBS-ben (10,1 mM Na₂HPO₄·7H₂O; 1,8 mM KH₂PO₄ pH 7,3; 140 mM NaCl; 2,7 mM KCl) mostuk.

A sejtek feltárásakor az üledéket (35-40 mg) 160 ml lízis pufferben (50 mM Tris pH 8,0; 2 mM EDTA; 0,2 mM EGTA; 3 mM DTT; 5 mM benzamidin; 40 µg/ml PMSF) homogenizáltuk, majd további 80 ml 1 V/V % TritonX-100 detergenst is tartalmazó lízis puffert adtunk hozzá. A szuszpenziót 2-3-szor 6 percig jégben szonikáltuk Branson Sonifier 250 készülékkel (VWR). A lizátumot még 1 óra hosszan jégben inkubáltuk, majd 55000/perc fordulatszámon 60 percig 4 °C-on ultracentrifugáltuk 55.2 Ti rotorral.

A termeltetett miozin kivonásához az üledéket 90 ml extrakciós pufferben (50 mM HEPES pH 7,3; 30 mM K-acetát; 10 mM Mg-acetát; 3 mM β-merkaptóetanol; 5 mM benzamidin; 40 µg/ml PMSF) homogenizáltuk, majd ultracentrifugáltuk (55000/perc, 45 perc, 4 °C). Ennek az üledékét ismét homogenizáltuk 60 ml, 10 mM ATP-t és 10 mM MgCl₂-ot is tartalmazó extrakciós pufferben. Ultracentrifugálás (55000/perc, 60 perc, 4 °C, 55.2 Ti rotor) után a felülúszóból a motordomént His-címkés affinitás kromatográfiával tisztítottuk hidegszobában (45,69).

Az affinitás-tisztításhoz 15 ml Ni-NTA agaróz gyantát 50 ml alacsony sórtartalmú pufferrel (50 mM HEPES pH 7,3; 30 mM K-acetát; 3 mM β-merkaptóetanol; 5 mM

benzamidin) mosva készítettünk elő. A miozin felülűsöt a gyantára 2 ml/perc sebességgel vittük fel Pump P-1 perisztaltikus folyadékpumpával (Amersham Biosciences). Ezután ismét 50 ml alacsony sótartalmú pufferrel, majd 40 ml magas sótartalmú (50 mM HEPES pH 7,3; 300 mM K-acetát; 3 mM β -merkaptóetanol; 5 mM benzamidin) pufferrel mostuk a töltetet (2-2 ml/perc sebességgel). Végül az egyéb szennyező fehérjéket távolítottuk el (3 ml/perc) 80 ml alacsony imidazol-tartalmú pufferrel (50 mM imidazol; 45 mM HEPES pH 7,3; 27 mM K-acetát; 3 mM β -merkaptóetanol; 5 mM benzamidin). A frakciók fehérjetartalmát Bradford reagenssel (0,1 g/l Coomassie Brilliant Blue G250; 0,05 V/V % etanol; 0,1 V/V % foszforsav) ellenőriztük. A rekombináns motordomént magas imidazol-tartalmú pufferrel (450 mM imidazol pH 7,3; 2 mM HEPES; 4 mM NaCl; 0,2 mM $MgCl_2$; 3 mM β -merkaptóetanol; 5 mM benzamidin) eluáltuk (0,9 ml/perc). A frakciók fehérjetartalmát ezúttal is ellenőriztük Bradford reagenssel. A tisztított motordomént DdMD mérési pufferben (20 mM HEPES pH 7,2; 40 mM NaCl; 2 mM $MgCl_2$; 1 mM DTT) dializáltuk kétszer 8 órán át.

Egy adag gyantát 5 alkalommal használtunk DdMD tisztításra. Az elúció után a gyantát további 30 ml elúciós pufferrel, majd 50 ml vízzel mostuk el. Ha hosszabb ideig nem használtuk, a gyantát 20 V/V % etanolban tároltuk.

Konstrukciótól függően rendszerint 0,9-2,5 mg/ml-es (10-30 μ M, $M_r = 89$ kDa) koncentrációjú miozint sikerült tisztítani. A mintákat cseppenként (100-150 μ l/csepp) fagyasztottuk le folyékony nitrogénben.

5.2.4. Kalmár (*Loligo pealeii*) izom miozin 2 preparálás

A közönséges kalmár (*Loligo pealeii*, squid) miozin 2-t, illetve S1-et (LpS1) Stafford és mtsai (72), illetve Kalabokis és mtsai (73) által leírt módszer szerint Elizabeth O'Neill-Hennessey preparálta Andrew Szent-Györgyi laboratóriumában (Brandeis University, Waltham, Egyesült Államok). A fehérjeminták 15-20 mg/ml (110-150 μ M, $M_r = 134$ kDa) koncentrációjúak voltak.

5.2.5. Miozin 5 S1 expresszió

Az egér vad típusú miozin 5a S1 fragmentumát (m5S1) *Spodoptera frugiperda* eredetű sejt kultúrában (a továbbiakban: Sf9) termeltük, bakulovírus expressziós vektorokat használva (74,75).

A szekvenciák előállításához a miozin 5 S1 N-terminális 820 aminosavát és az első két IQ motívumát, valamint a FLAG címkét (szekvencia: DYKDDDDK ill. GACTACAAGGACGACGATGATAAG) kódoló cDNS-t DH10Bac *E. coli* kompetens sejtekben szaporítottuk fel, pFastBac1 bakulovírus vektorba klónoztuk, majd Sf9 sejtekben amplifikáltuk. A vektorok ellenőrzésére agaróz gélelektroforézist (1,5 % agaróz, 40 V, 30 perc) és DNS-szekvenálást végeztünk.

A bakulovírusokat legalább 3. generációig amplifikáltuk; ezt 8×10^5 /ml koncentrációjú Sf9 sejtben, 1 V/V % vírus mellett végeztük 48 órán át (27 °C, 125/perc, lásd lejjebb). A vírust centrifugálás (1000/perc, 2 perc, 4 °C Janetzi K23 centrifugában, kilendülő rotorral) után a felülúszó³ tartalmazta, melyet 2 V/V % FBS mellett 4 °C-on, fénytől védve tároltunk 75 cm²-es sejtenyésztő lemezen. A vírusokkal való munkánál az Invitrogen protokollja alapján jártunk el (http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/bactobac_man.pdf).

Az Sf9 sejteket 27 °C-on növesztettük 50 ml térfogatban Insect-Xpress táptalajban 50 unit/ml penicillin és 0,05 mg/ml streptomycin jelenlétében 125/perc fordulatszámon rázatva. Az Sf9 sejtenyésztésnél is az Invitrogen leírását vettük alapul (http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/insect_man.pdf). A kultúrát hetente kétszer⁴ hígítottuk, 8×10^5 /ml koncentrációjúra. A fehérjeexpresszióra szánt kultúrát 50 ml után először 2-400 ml, majd 2-3 l térfogatban vettük fel.

Expresszió alkalmával 2-3 liter 2×10^6 /ml koncentrációjú sejt kultúrát együtt fertőztünk amplifikált (legalább 3. generációs), a fenti pFastBac1 vektort, valamint *Xenopus laevis* kalmodulinjának szekvenciáját hordozó bakulovírusal. Az expresszió időtartamát (48 vagy 72 h) és az ideális fertőző vírusmennyiséget (1, 3 vagy 5 V/V %) „próbaexpresszióval” határoztuk meg 25 ml Sf9 kultúrában SDS-gélelektroforézist követő Western blot segítségével.

³ Szükség esetén (pl. maradék sejttermék vagy bakteriális szennyezés gyanúja) a vírusokat 0,22 µm-es pórusú Millex szűrőn (Millipore) is átszűrtük. A szűrés ugyanakkor gyengíti a vírusok minőségét.

⁴ A sejt hígítást „3 és fél” naponta, hétfő délelőtt és csütörtök délután, illetve kedd délelőtt és péntek délután végeztük; egy sejt kultúránál lehetőleg mindig azonos órában.

Az SDS-gélelektroforézist az **5.3.5. fejezetben** írtam le. A Western blot során Hybond-C Extra membránra (Amersham Biosciences) vittük át a fehérjéket (40 V, 60 perc, jégben), majd az alábbi reagensekkel detektáltunk: 1. ellenanyag – 1 ng/ml monoklonális egér anti-FLAG IgG; 2. ellenanyag – 0,1 µg/ml alkalikus foszfátázzal konjugált anti-egér IgG; előhívó reagens – membránonként 1 ml Western Blue. Az ellenanyagokat 15 ml 1,5 % BSA-t is tartalmazó TBS-TWEEN pufferben (49,5 mM Tris pH 8; 117 mM glicin; 0,005 V/V % TWEEN-20) hígítottuk, amivel a membránt is mostuk az egyes lépések közt.

5.2.6. Miozin 5 S1 preparálás

Az Sf9 sejteket centrifugálással gyűjtöttük össze (9000/perc, 10 perc, 4 °C Avanti J25i készülékben JLA 9.1000 rotorral), majd kétszer PBS-ben mostuk. A második mosás során a sejteket 50 ml-es Falcon-csövekbe (TPP) tettük át, centrifugálás (3000/perc, 2 perc, 4 °C Janetzki K23 készülékben kilendülő rotorral) után az üledéket folyékony nitrogénben gyorsan lefagyasztottuk; majd a feltárásig -80 °C-on tároltuk.

Feltáráskor az üledéket jégben extrakciós pufferben (10 mM HEPES pH 7,3; 0,5 M NaCl; 10 mM MgCl₂; 1 mM EGTA; 3 mM NaN₃; 0,1 mM DTT; 0,1 mM PMSF; 1 µg/ml leupeptin; 2 mM ATP) olvasztottuk fel, majd homogenizáltuk. Szükség esetén a szuszpenziót 2-3-szor 1 percig jégben szonikáltuk is. Centrifugálás (20000/perc, 20 perc, 4 °C Beckman J2-MC készülékben JA-20 rotorral) után a felülúszóból a m5S1-et FLAG-címkés affinitás kromatográfiával tisztítottuk hidegszobában (74,75).

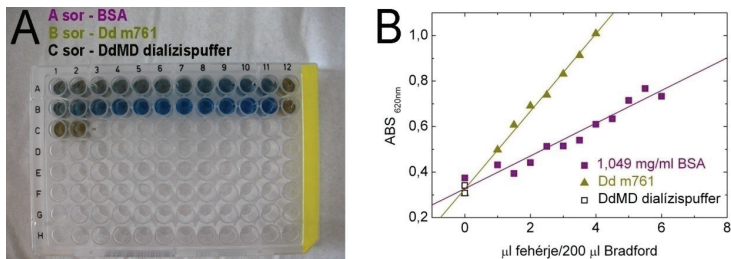
1 ml anti-FLAG agaróz gyantát 3 ml PBS-aziddal (PBS + 5 mM NaN₃); majd 4 ml 0,1 M pH 3,5 glicinnel; végül ismét kétszer 3 ml PBS-aziddal mosva készítettünk elő. A feltárt sejtek felülúszóját összekevertük a gyantával, majd 1 éjszakán át 4 °C-on forgattuk Falcon-csövekben. Centrifugálás (1000/perc, 2 perc, 4 °C Janetzki K23 készülékben kilendülő rotorral) után a gyantát MgATP-t is tartalmazó 1. mosópufferben (10 mM HEPES pH 7,2; 0,5 M NaCl; 0,1 mM EGTA; 3 mM NaN₃; 0,1 mM DTT; 0,1 mM PMSF; 1 µg/ml leupeptin; 1 mM ATP; 5 mM MgCl₂) mostuk. A gyantát oszlopba töltöttük, majd róla az egyéb szennyező fehérjéket újabb 3 ml 1. mosópufferrel távolítottuk el. A FLAG-ellenanyaggal keresztreaktív fehérjéket 3 ml alacsony ionerejű 2. mosópufferrel (10 mM HEPES pH 7,2; 0,1 M NaCl; 0,1 mM EGTA; 3 mM NaN₃; 0,1 mM DTT; 0,1 mM PMSF; 1 µg/ml leupeptin) mostuk le.

Végül a rekombináns S1 fragmentumot 2. mosópufferben oldott 0,3 mg/ml FLAG peptiddel eluáltuk, 300 μ l-es frakciókat szedve. A frakciók fehérjetartalmát Bradford reagenssel ellenőriztük. Egy adag anti-FLAG gyantát 3 alkalommal használtunk m5S1 tisztítására. Az elúció után a gyantát az előkészítéssel azonos módon mostuk el, majd PBS-azidban tároltuk 4 °C-on. Szükség esetén az eluált frakciókat 'Q Sepharose' gyantán töményítettük: a gyantát 2. mosópuffer és 3 M KCl 1:1 arányú keverékével mosva készítettük elő, a FLAG frakciókat felvittük, majd MgATP-mentes 1. mosópufferrel eluáltuk. Az S1-tartalmú frakciókat 8 órán át 1. dialízispufferben (MgATP-mentes 1. mosópuffer), majd 3 órán át 2. dialízispufferben (10 mM HEPES pH 7,2; 0,1 M KCl; 0,1 mM EGTA; 3 mM NaN_3) dializáltuk (mindkét puffer tartalmazott 1 mM DTT-t is).

Rendszerint 0,4-1 mg/ml-es (3,5-8 μ M; $M_r = 120$ kDa) koncentrációjú m5S1-et sikerült tisztítani. A mintákat 250 μ l-ként fagyasztottuk le folyékony nitrogénben.

5.2.7. A miozin koncentrációjának mérése

A tisztított miozin koncentrációját Bradford reagenssel mértük 200 μ l térfogatban 96-lukú lemezen (TPP) 620 nm-en Biotrak II lemezleolvasó készülékkel (Amersham Biosciences). Kontrollként 1 mg/ml-es BSA oldatot használtunk (17. ábra).



17. ábra: Fehérjekoncentráció-mérés 96-lukú lemezen.

- a) A kalibráló BSA oldat, illetve a tisztított Dd miozin különböző térfogatai 200 μ l Bradford reagenssel összekeverve a lemezen. A fehérjét 1-6 μ l közt mértem be; 1,5 μ l-ként növekvő térfogattal; a 12. luk csak Bradford reagenst tartalmaz.
- b) A kapott abszorbanciák a fehérjék bemért térfogatának függvényében. Az illesztett egyenesek ($y = a + bx$, lásd: 13.6. fejezet) meredekségéből (b) számoltam a preparált fehérje koncentrációját. Itt: $b_{\text{BSA}} = 0,072 \pm 0,006$ és $b_{\text{m761}} = 0,170 \pm 0,005$; ebből $[\text{m761}] = 2,49$ mg/ml (28 μ M).

Szükség esetén a fehérjemintákat Amicon ill. Centricon bekonzentráló csövekben (Millipore) való centrifugálással (legfeljebb 3000/perc, 4 °C Janetzi K23 készülékben kilendülő rotorral) töményítettük.

5.2.8. Aktinpreparálás

Méréseinkhez nyúl vázizomból származó α -aktint használtunk, melyet Straub (76), valamint Spudich és Watt módszere alapján (77), az alábbi módon preparáltunk.

5.2.8.1. Aktin „szárazpor” készítés

A nyúl vázizom miozinhoz hasonlóan az aktin „szárazport” is Hegyi György professzor segítségével készítettük.

A miozin kivonása utáni izommaradékot -20 °C-on lefagyasztottuk, majd felolvasztás nélkül felszeleteltük és megmértük a tömegét. Az izmot kétszer 10 percig 5 ml/g hideg vízzel; kétszer 10 percig 5 ml/g hideg 0,4 %-os NaHCO_3 -oldattal; majd 1 percig ismét hideg vízzel mostuk. Az egyes mosások után az izommaradékot szűrőzsákban mindig kipréseltük. Végül az izmot a teljes vízmentesítéshez 5-6-szor 10-15 percig 1-2 ml/g hideg acetonnal mostuk, majd rendre kipréseltük. A fennmaradó forgácsot – az aktin „szárazport” – teljes száradás után 4 °C-on tároltuk.

5.2.8.2. F-aktin preparálás

Preparálásonként 5-6 g aktinport 20 ml/g hideg G pufferben (2 mM Tris pH 7,7; 0,1 mM CaCl_2 ; 2,5 mM DTT; 0,5 mM ATP) 40 percig jégben kevertettük, majd vízlégszivattyú segítségével szűrőpapíron leszűrtünk. Az oldatot 2 mM MgCl_2 és 50 mM KCl hozzáadásával 30 percig szobahőmérsékleten polimerizáltuk, ezután a tropomiozin-mentesítésért további 450 mM KCl-ot hozzáadva 1 órán át jégben kevertettük. Az oldatot 40000/perc fordulatszámra 90 percig 4 °C-on ultracentrifugáltuk Beckman L7-65 készülékben 55.2 Ti rotorral, a csapadékot 15-20 ml G pufferben homogenizáltuk, majdugyanabban háromszor 8 órán át dializáltuk (depolimerizálás). Az oldatot ismét ultracentrifugáltuk (40000/perc, 90 perc, 4 °C, 55.2 Ti rotor), a felülúszó volt a tiszta G-aktin. A G-aktint 2 mM MgCl_2 és 50 mM KCl hozzáadásával 30 percig szobahőmérsékleten polimerizáltuk, majd ultracentrifugáltuk (40000/perc, 90 perc, 4 °C, 55.2 Ti rotor). A csapadékot 8-15 ml F pufferben (4 mM HEPES; 2 mM MgCl_2 ; 3 mM NaN_3 ; 1 mM DTT) homogenizálva, majd e pufferben kétszer 8 órán át dializálva megkaptuk az F-aktint.

Az F-aktin koncentrációját a 290 nm-en mért abszorbanciája alapján határoztuk meg ($M_r = 42$ kDa és $\epsilon_{290} = 2,65 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Rendszerint 4-8 mg/ml-es koncentrációjú F-aktint (a továbbiakban rövidítve: A) sikerült készítenünk (100-200 μM), a szárazporból 1-2 %-os hatásfokú kitermeléssel.

5.2.8.3. Pirén-F-aktin preparálás

Az aktin Cys³⁷⁴-en N-(1-pirén)jódacetamiddal (a továbbiakban: PIA) való kovalens jelölését Cooper és mtsai által leírtak (78) alapján kiviteleztük, az alábbi módon.

Az F-aktint 1 mg/ml-es (24 μM) koncentrációjúra hígítottuk, majd kétszer dializáltuk DTT-mentes F pufferben⁵ (a DTT versengene a PIA-dal a Cys-hez való kötődésért). A pirén-jelölést DMSO-ban frissen feloldott 50 mM-os PIA-dal végeztük, melyet 10-szeres moláris feleslegben (208-szoros hígításban) adtunk az aktinhoz. Ezután az aktint egy éjszakán át billegőasztalon, szobahőmérsékleten inkubáltuk fénytől védve. A jelölt F-aktint 1000/perc fordulatszámom 1 percre centrifugáltuk Janetzki K23 készülékben kilendülő rotorral, a felülúszót kétszeresére hígítottuk DTT-tartalmú F pufferrel, majd ultracentrifugáltuk (40000/perc, 90 perc, 4 °C, 55.2 Ti rotor). A depolimerizálást a jelöletlen aktinhoz hasonlóan végeztük (polimerizálás, dialízis G pufferben, majd ultracentrifugálás). A tiszta G-aktint 2 mM MgCl₂ és 100 mM KCl hozzáadásával 30 percre szobahőmérsékleten polimerizáltuk, majd ultracentrifugáltuk (40000/perc, 90 perc, 4 °C, 55.2 Ti rotor). A csapadékot 3-8 ml F pufferben felvéve, majd e pufferben kétszer 8 órán át dializálva megkaptuk a pirén-F-aktint (a továbbiakban: PA).

A PA koncentrációját a 290 nm-en (aktin), 320 nm-en (fényszórás), illetve a 344 nm-en (pirén) mért abszorbancia (*ABS*) alapján számoltuk ki, az alábbi összefüggések szerint:

$$[\text{aktin}] (\mu\text{M}) = [(ABS_{290} - ABS_{320}) - 0,127 \cdot ABS_{344}] / 0,022$$

$$[\text{pirén jelölés}] (\mu\text{M}) = ABS_{344} / 0,022$$

$$\text{A jelölés hatásfoka} = [\text{aktin}] / [\text{pirén jelölés}] \cdot 100 \%$$

Rendszerint 50-100 μM koncentrációjú PA-preparátumokat állítottunk elő,

70-100 %-os pirén jelöléssel.

⁵ Rendszerint a friss jelöletlen F-aktint DTT-mentes pufferben vettük fel, majd a jelölésre szánt aktin elvétele után dializáltuk a maradékot DTT-tartalmú F pufferben. Így a jelölendő aktin nem is találkozott DTT-vel.

Mind a jelöletlen, mind a pirén-jelölt F-aktint 1,5-szeres moláris feleslegben hozzáadott falloidinnal stabilizáltuk; az aktin mért koncentrációját a hozzáadott térfogat szerint korrigáltuk. A preparált aktint jégben tároltuk és legfeljebb 1 hónapig használtuk fel. A továbbiakban az aktin (A) vagy pirén-aktin (PA) F-aktint jelent.

A preparált és tisztított fehérjéket az **1. táblázatban**, a rekombináns konstrukciókat külön a **2. táblázatban**, a gyakrabban használt reagenseket a **3. táblázatban**, az oldatokat a **Függelék 13.1. fejezetében** foglaltam össze.

5.3. Mérések

5.3.1. A mérések alapelvei

Az **Eredmények 6.1. alfejezetében** ismertetett blebbistatinos méréseket DdMD mérési pufferben (20 mM HEPES pH 7,2; 40 mM NaCl; 2 mM MgCl₂; 1 mM DTT – lásd: **5.2.4. fejezet**) kiviteleztem, rendszerint 20 °C-on. A **6.2. alfejezetben** leírt, aktinkötéssel foglalkozó kísérleteket *stopped-flow* (SF) pufferben (20 mM HEPES pH 7,0; 0,1 mM EGTA; 5 mM MgCl₂; 1 mM DTT) végeztem. Az SF puffer ionerősségét KCl-dal állítottam be. Ha külön nem jeleztem a körülményeket, akkor 50 mM KCl-ot tartalmazó „SF50” pufferben (ionerősség (*I*) = 75 mM), 25 °C-on mértem.

A nukleotidmentes mintákból az esetleg jelen lévő szennyező nukleotidokat általában 0,1 *unit*/ml apirázzal távolítottam el; szobahőmérsékleten 30 percig inkubálva.

Az ADP-ből a szennyező ATP-t miozinnal hidrolizáltam el, szobahőmérsékleten 30 percig inkubálva. Ahol másként nem jeleztem, ott az ADP törzsoldatot – mely a méréstől függően 1 mM, 10 mM vagy 50 mM koncentrációjú volt – inkubáltam 3 μM miozinnal a mintákhoz való hozzáadás előtt⁶. A DdMD konstrukciók ADP-ben való aktinkötésének vizsgálatakor, illetve a különböző hőmérsékleten végzett egyensúlyi titrálások esetén nem az ADP törzsoldatban, hanem a különböző koncentrációjú miozint (M) tartalmazó 'M.ADP' ill. 'A.M.ADP' mintákban hidrolizáltam el a szennyező ATP-t (szobahőmérsékleten 30 percig inkubálva). Lásd az **Eredmények 6.1.7.1** és **6.2.6. fejezetében** bemutatott kísérleteket.

⁶ A koncentrációkat úgy választottam, hogy az ADP-ben levő miozin a mintához való hozzáadás után legfeljebb 1 %-os hibát okozzon a bemérési koncentrációkban.

5.3.2. *Steady-state* ATPáz mérések

A miozin konstrukciók *steady-state* bazális (aktin távollétében mért) és aktin-aktivált ATPáz aktivitását Shimadzu UV-2101 PC spektrofotométeren mértem a NADH-csatolt reakció (*coupled assay*, *NADH-linked assay*) módszerével (79,80).

A reakció elve:

miozin: $\text{ATP} \rightarrow \text{ADP} + \text{P}_i$

piroszölősav kináz (PK): $\text{ADP} + \text{foszfoenol-piroszölősav (PEP)} \rightarrow \text{ATP} + \text{piroszölősav}$

tejsav-dehidrogenáz (LDH): $\text{piroszölősav} + \text{NADH} \rightarrow \text{tejsav} + \text{NAD}^+$

A reakciót a miozin hozzáadásával indítottam el, az aktin-aktivált méréseknél az aktinnal titráltam a mintákat.

Az ATPáz aktivitás számítása:

A NADH fogyását a 340 nm-en mért abszorbancia (ABS_{340}) csökkenése alapján követtem. Az egyes hozzáadások után a görbe lineáris szakaszára rendre egyenest illesztettem.

Aktivitás (s^{-1}) = meredekség [$dABS_{340}/dt$]/($\epsilon_{\text{NADH}, 340} \cdot [\text{miozin}]$)

A miozin aktuális koncentrációját minden esetben korrigáltam a hozzáadásokból származó hígulással, valamint a mért aktivitásokból levontam az aktin saját ATPáz aktivitását is.

A minták összetételét a **Függelék 13.2.1. fejezetében** írtam le.

5.3.3. *Steady-state* fluoreszcencia-mérések

A fluoreszcencia-méréseket SPEX 320 FluoroMaxTM spektrofluoriméteren végeztem 10 mm-es kvarcküvetében (Hellma) 200 μl térfogatban 4 nm-es rés mellett, rendszerint 's/r' (*sample/reference*) módban az alábbi beállítások szerint:

Triptofán fluoreszcencia-spektrumok:

gerjesztés 297 nm-en, emisszió 310-430 nm között;

csúcshoz egy kisebb fluoreszcencia-tartomány átlagát vettem (általában 342-348 nm),

és az eredményeket erre az átlagértékre normalizáltam.

Pirén-aktin fluoreszcencia-spektrumok:

gerjesztési spektrum 300-390 nm közt, emisszió 406 nm-en;

emissziós spektrum 380-460 nm közt, gerjesztés 365 nm-en.

Az idő ill. a hőmérséklet függvényében mért triptofán fluoreszcencia:

gerjesztés 297 nm-en; emisszió az adott preparátum spektrumának maximuma alapján egy, a 340-346 nm közti hullámhosszon; a normalizálást az egyes méréseknl írtam le.

Az adatokat minden mérésnél korrigáltam a triptofán vagy pirén szenzort hordozó fehérje hígulásával. A spektrumok esetén továbbá az értékelésnél a többi eredményből mindig kivontam a fehérjementes (ill. a megfelelő koncentrációjú blebbistatint már tartalmazó) puffer fluoreszcenciáját.

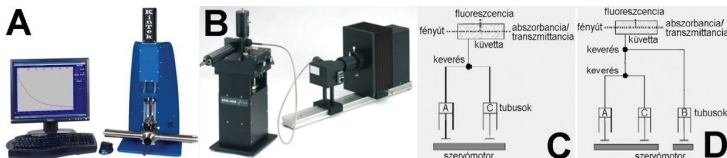
5.3.4. Megállított áramlásos (stopped-flow) kísérletek

A megállított áramlásos méréseket KinTek SF-2004 (Kin-Tek Corporation, **18. a ábra**), és Bio-Kine SFM 300/400 (Bio-Logic, **18. b ábra**) gyorskinetikai berendezésen végeztem 4 nm-es rés mellett az alábbi beállításokkal.

Triptofán fluoreszcencia: gerjesztés 297 nm-en, emisszió 340 nm-es interferencia szűrővel (Corion CFS-001999 9L134).

Pirén-aktin fluoreszcencia: gerjesztés 365 nm-en, emisszió 420 nm-es felüláteresztő (long pass) szűrővel (Comar Instruments).

Fényszórás: emisszió 320 nm-es szűrővel (Comar Instruments)⁷.



18. ábra: A használt SF készülékek.

a) Kin-Tek SF-2004 (forrás: <http://www.kintek-corp.com>), b) Bio-Kine SFM 300/400 (forrás: <http://www.bio-logic.info>), c-d) A készülékek sémája egyszeres és kétszeres keverés („összelövés”) esetén <http://www.hi-techsci.com> alapján módosítva.

A tubusokban levő mintákat mindig 1:1 térfogati arányban kevertem össze. A keverés rövidítése a grafikonokon „x” (pl. M x PA). A kísérletek leírásánál és az

⁷ Ha kizárólag fényszórást mértem, a gerjesztést is 320 nm-en végeztem. Ha más csatormán is detektáltam triptofán vagy pirén fluoreszcenciát, a gerjesztést is úgy választottam.

eredmények ábrázolásánál általában a minták gyorskeverés utáni (*post-mix*) koncentrációját tüntettem fel. A készülékek sémája a **18. c és d ábrákon** látható; a készülékek elvét a **Függelék 13.3** fejezetében írtam le.

5.3.5. Koszedimentáció

A 100 μ l-be összemért mintákat 90000/perc fordulatszámom 20 percig 4 °C-on ultracentrifugáltam Beckman Optima™ TL készülékben TLA 100.1 rotorral. A minták pontos összetétele és a bemérés sorrendje a **Függelék 13.2.2. fejezetében** található.

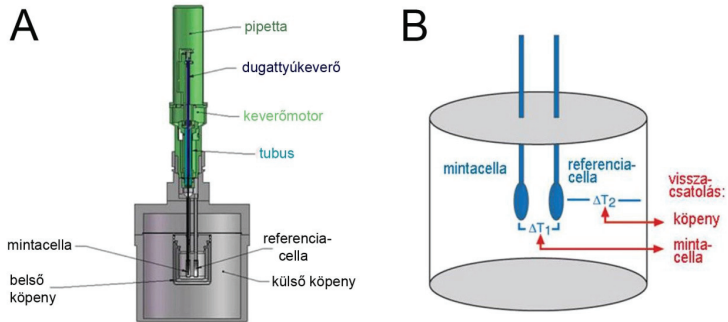
A felülúszót leszívtam és 20 μ l SDS-kezelő oldatot (375 mM Tris pH 6,5; 10 V/V % glicerín; 41,6 mM SDS; 2 M β -merkaptoetanol; 15 V/V % brómfenolkék) adtam hozzá. Az üledéket egyszer megmostam mérési pufferekben, hogy ne tartalmazzon a felülúszóból származó szennyezést. Ezután az üledéket is felvettem 100 μ l mérési pufferekben és 20 μ l SDS-kezelőt adtam hozzá.

A kezelt mintákat 5 percig forraltam, majd SDS-gélelektroforézist végeztem gradiensen, 170 V feszültség mellett 90 percig szobahőmérsékleten. A géleket ezután kétszer megmostam vízzel; majd 30 percig Coomassie festékkel (0,24 V/V % Coomassie Brilliant Blue R250; 50 V/V % metanol; 9 V/V % ecetsav), végül 60 percig festéktenítőt oldattal (13,5 V/V % etanol; 9,5 V/V % ecetsav) kezeltem.

A megfestett géleket GeneSnap programmal fényképeztem le és GeneTools denzitometrálo szoftverrel (mindkettő SynGene) értékeltem a „*Rolling disk*” menüpont szerint. Ez kétféle eredményt adott meg (*height* és *volume*); mivel ezekkel általában hasonló tendenciát kaptam, a kettőből statisztikát számoltam. Az ábrákon az üledékben maradt miozint, vagyis az aktinkötő miozinhányadot tüntettem fel az aktinkoncentráció függvényében (*fractional attachment*).

5.3.6. Kalorimetria

A kalorimetriás méréseket 25 °C-on, VP-ITC készüléken (MicroCal Corporation, **19. ábra**) végeztük a Semmelweis Egyetem Biofizikai Intézetében, Dr. Tölgyesi Ferenc laboratóriumában, Dr. Kardos József útmutatásával.



19. ábra: A VP-ITC készülék (forrás: www.microcal.com).

a) A készülék keresztmetszeti rajza.

b) A készülék sémája.

Az S1 és HMM fragmentumokat $100 \mu\text{M}$ koncentrációra töményítettük. Az aktin, S1 és HMM mintákat ezután a mérési pufferben (20 mM HEPES pH 7,0; 50 mM KCl; $0,1 \text{ mM}$ EGTA; 1 mM MgCl_2 ; 1 mM DTT) dializáltuk 1 éjszakán át. A kísérletek során általában $1,8 \text{ ml}$ $5 \mu\text{M}$ -os aktint tettünk a kaloriméter mintacellájába; majd azt a hőmérséklet kiegyenlítődése után a miozin mintákkal titráltuk (600 másodpercenként az skS1, 700 másodpercenként az skHMM és 1300 másodpercenként az LpS1 esetén). Kontrollként miozin-, illetve aktinmentes mintákat alkalmaztunk, a fehérje helyett mérési pufferrel. Értékeléskor az egymást követő hozzáadásokból származó hőváltozásokat összeadtuk és a miozin koncentrációjának függvényében ábrázoltuk (az értékelés módját részletesen lásd az **Eredmények 6.2.5. fejezetében**).

5.3.7. Elektron-mikroszkópia

Az elektron-mikroszkópos felvételeket Dr. Neil Billington és Peter J. Knight professzor (University of Leeds, Egyesült Királyság) készítette, vázizom miozin 2 S1 (skS1) mintákkal. 100 nM skS1 fehérjét $0,5 \text{ unit/ml}$ apirázal 15 percig (*apo-S1*); illetve 1 mM ADP, 1 mM glükóz és $0,5 \text{ unit/ml}$ hexokináz jelenlétében (S1.ADP komplex) 30 percig $20 \text{ }^\circ\text{C}$ -on inkubáltak. Az 'S1.ADP' minták egy részét továbbá $100 \mu\text{M}$ blebbistatinnal is kezelték 5 percig. A minták egy-egy cseppjét EM rácsra helyezték, és 1% uranil-acetáttal jelölték. A felvételeket $0,52 \text{ nm/pixel}$ felbontással digitalizálták és a

SPIDER szoftverrel elemezték (81), referencia-mentes illesztéssel. Az osztályozást a képek varianciája és a “*K-means clustering*” elve alapján végezték (82); utóbbi módszert a **Függelék 13.4 fejezetében** írtam le.

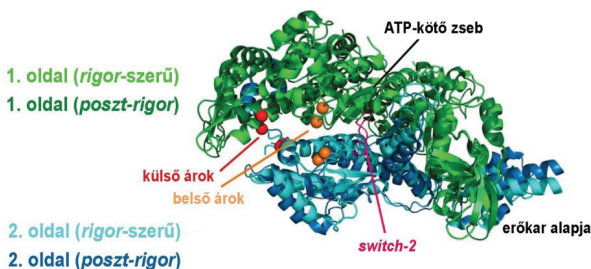
5.3.8. Atomi szerkezeteken alapuló számítások

A számításokat Dr. Hetényi Csaba végezte.

A *rigor*-szerű (zárt árokkal bíró) és a *poszt-rigor* (nyitott árokkal bíró) skS1, LpS1, DdMD és mS1 miozinok szerkezete (24,56,83-86) a *Protein Data Bank*-ból származik (87,88), lásd: **12-13. táblázat**.

5.3.8.1. A kölcsönhatási energia számítása

A vizsgált miozinok motordoménjének szerkezetét az aktinkötő árok egymással szemközti két „oldalára” osztotta (1. és 2. oldal), melyeket a *switch-2* hurok köt össze (**20. ábra**). A két oldal rendre az alábbi szakaszokból állt: az skS1-re D4-V460 (1. oldal) és G466-E777 (2. oldal); az LpS1-re M1-V461 (1. oldal) és G466-E773 (2. oldal); a DdMD-re N2-V452 (1. oldal) és G457-E759 (2. oldal); az mS1-re E5-V435 (1. oldal) és G440-K761 (2. oldal) az 1OE9 esetében; illetve A2-V435 (1. oldal) és G440-L737 (2. oldal) az mS1 1W7J szerkezeténél.



20. ábra: Az aktinkötő árok és a nehézlánc két oldala az LpS1 példáján.

A két oldal az LpS1 *rigor*-szerű (zárt árkú, 315G, világos színekkel) és *poszt-rigor* (nyitott árkú, 315F, sötét színekkel) konformációjában (1. oldal – zöld) és (2. oldal – kék), az összekötő *switch-2* hurokkal (rózsaszín). A számításokhoz a külső és belső árok szélességét meghatározó C_α atomok térkitöltő ábrázolással szerepelnek: 424. és 601. aminosavak – külső árok (piros); illetve 281. és 474. aminosav – belső árok (narancssárga).

Az árok két oldala közti kölcsönhatási energia értékét (E_{kh}), illetve annak összetevőit a két oldal közti különbségként számolta ki ($\Delta E_{\text{elektrosztatikus}}$, $\Delta G_{\text{deszolvációs}}$). Ezután ezen értékeknek a két vizsgált konformáció (*rigor*-szerű és *poszt-rigor*) közti különbségét ($\Delta \Delta E_{\text{árok}}$, $\Delta \Delta G_{\text{deszolvációs}}$) számította ki (**12. táblázat**). A számításokhoz a FastContact szervert használta (<http://structure.pitt.edu/servers/fastcontact/doc/>) (89,90); melynek paramétereinél az alapértelmezett beállításokat választotta (5-7 Å távolságú deszolvációs kölcsönhatások, fixált peptidgerinc).

5.3.8.2. A 'transducer' torziójának számítása

A β_1 és β_7 szálak által meghatározott torziós szögeket (**a** ill. **c** vektor) a β -lemezek vázai-longitudinális éle (**b** vektor) mentén számította az alábbi egyenletek szerint:

$$\begin{aligned}\vec{a} \times \vec{b} &= \vec{n}_{ab} \left| \vec{a} \right| \left| \vec{b} \right| \sin \vartheta_{ab} \\ \vec{b} \times \vec{c} &= \vec{n}_{bc} \left| \vec{b} \right| \left| \vec{c} \right| \sin \vartheta_{bc} \\ \phi &= \arccos \left(\frac{\vec{n}_{ab} \cdot \vec{n}_{bc}}{\left| \vec{n}_{ab} \right| \left| \vec{n}_{bc} \right|} \right)\end{aligned}$$

Itt **n** a megfelelő sík normálvektora; ϑ a megfelelő vektorok által bezárt szög (ezt pontosan nem határozta meg) (91); a vektorokat az A, B, C, D pontok *x*, *y*, *z* koordinátaival definiálta; az A, B, C, D pontok a C_{α} atomokat mutatják, amelyek a β_1 (A, B) és β_7 (C, D) szálakban találhatóak, így **a** = AB, **b** = BC és **c** = CD. Az A, B, C és D pontoknak megfelelő C_{α} atomok a szekvenciában rendre: S119, Y116, T267, S262 skS1-re; S116, Y113, Y270, I262 LpS1-re; S119, Y116, Y261, I253 DdMD-re; C103, Y100, Y242, I234 mS1-re. ϕ az ABC és BCD síkok közti torziós szög; $\Delta\phi$ a torziós szög változása, melyet az előzőhöz hasonlóan a két vizsgált konformáció (*rigor*-szerű és *poszt-rigor*) különbségeként számított ki (**12. táblázat**).

5.4. A kísérletes adatok feldolgozása és értékelése

A mért adatokat Microsoft Office Excel 2003 és 2007, OriginLab 7.0 és 8.0 (MicroCal Corporation) segítségével dolgoztuk fel és értékeltük. A megállított áramlásos kísérletek elemzését a műszerhez tartozó KinTek StopFlow v8.2.6 (KinTek Corporation) ill. Bio-Kine32 v4.46 (Bio-Logic) szoftverrel végeztük. A felhasznált egyenleteket a **Függelék**

13.5, az illesztéseket a **Függelék 13.6. fejezetében** foglaltam össze. A Tris-Glycine, valamint az agaróz géleket a GeneSnap és GeneTools (SynGene) szoftverekkel rögzítettem és elemeztem.

Minden kísérletet 2-6 alkalommal végeztünk el, az egyes párhuzamosokat lehetőleg különböző preparálásokból származó fehérjemintákkal. A grafikonokon vagy egy reprezentatív mérést, vagy több párhuzamos mérés átlagát tüntettem fel; ezt minden ábránál külön jeleztem. Az átlagok mellett a standard hibát jelöltem.

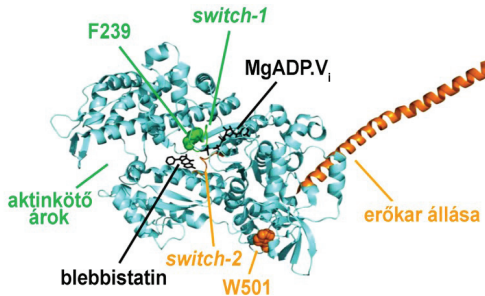
Az ábrákat az Adobe Photoshop CS 8.0 szoftver segítségével egységesítettem (300 dpi, Arial betűtípus, jpg formátum).

6. Eredmények

6.1. A miozin ADP és blebbistatin hármas komplexében ('M.ADP.B') az erőgeneráló lépés kezdőállapotára emlékeztető konformációt vesz fel

6.1.1. Probléma és kísérleti elrendezés

A miozin motor aktivitásának kulcsa az erőgenerálás, melynek során ébredő feszültség előfeltétele az aktinfilamentum mentén való elmozdulásnak. Arra voltunk kíváncsiak, hogy az erőgenerálás milyen konformációs útvonalon át történhet. Az erőkifejtő lépés vizsgálatát megnehezíti, hogy igen gyorsan megy végbe, köztiállapotai rövid életűek és *steady-state* részarányuk rendkívül alacsony (51). Ezért a blebbistatin nevű inhibitorral (61) gátolt ciklust tanulmányoztuk. Miozin modellként korábban már jól leírt és jellemzett vad típusú – m761 (70) – és egy-triptofános – W501+ (37,45) és W239+ mutáns (42) – *Dictyostelium discoideum* miozin 2 motordomén konstrukciókat (DdMD) alkalmaztunk (21. ábra).



21. ábra: Egy-triptofános DdMD mutánsok.

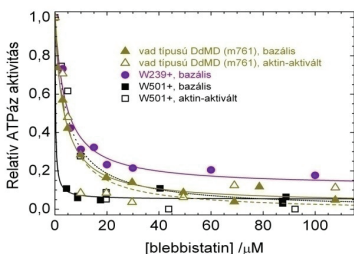
Az egyedi triptofán szenzorok és a blebbistatin helyzete a DdMD molekulában. A motor domént késsel, a blebbistatint és a kötött nukleotidot feketével ábráztuk (a szerkezet PDB kódja: 1YV3). A triptofánok pozícióját és az általuk érzékelt elemeket azonos színnel jeleztük. Így az 501-es triptofán, a *switch-2* hurok és az erőkar narancssárga; a 239-es fenilalanin – melyet triptofánra cseréltünk a W239+ mutánsban –, a *switch-1* hurok és az aktinkötő árok zölddel látható. Az erőkart (narancssárga hélix) a fésűkagyló (*scallop*) S1 MgADP.V_i komplexének szerkezetéből (PDB kód: 1QVI) illesztettük be. A DdMD itt zárt *switch-1* (gyenge aktinkötő) és zárt *switch-2* hurokkal bíró (felhúzott erőkarú) *pre-powerstroke* szerkezetben szerepel.

A mutánsok triptofán fluoreszcencia-változásait korábban megfeleltették a miozinféjben bekövetkező konformáció-változásoknak (37,42,44,45,92). A miozinokat a triptofán és pirén-aktin fluoreszcencia-szenzorok felhasználásával spektroszkópai és kinetikai, továbbá elektron-mikroszkópos és szedimentációs vizsgálatoknak vetették alá.

Eredményeink szerint a 'miozin.ADB.blebbistatin' komplex jelentős frakciója egy, az ATPáz ciklusban alapvető, de korábban hozzáférhetetlen, magas aktin affinitású, felhúzott erőkarú állapotot vesz fel, mely az erőkifejtő lépés kezdőállapotára (a „*start-of-powerstroke*” intermedierre) emlékeztet. Az alábbiakban ismertetem az e konklúzióhoz vezető eredményeket.

6.1.2. A blebbistatin gátolja a DdMD konstrukciók ATPáz aktivitását

A blebbistatint miozin 2 inhibitorként írták le (60,61), és az is ismert, hogy potenciális gátlószere a DdMD konstrukcióknak (62,64,93). Ezek alapján megmértem a blebbistatin gátló hatását a használt vad típusú és egy-triptofános DdMD fehérjék ATPáz aktivitására (a beméréseket pontosan lásd a 13.2.1. fejezetben). Az inhibitor mindegyik vizsgált esetben, bazális (aktin távollétében mért) és aktin-aktivált ATPáz aktivitásoknál is hasonló gátlást mutatott: a $K_{1/2} \approx 4 \mu\text{M}$, a maximális gátlás 90 % felett volt (22. ábra, 4. táblázat).



22. ábra: A blebbistatin gátolja a DdMD konstrukciók ATPáz aktivitását.

A vad típusú (m761, ▲), W239+ (●) és W501+ (■) motor domének bazális (aktin távollétében mért; teli jelek, folyamos vonal) és aktin-aktivált (nyitott jelek, szaggatott vonal) ATPáz aktivitását a blebbistatin koncentrációjának függvényében ábrázoltam 20 °C-on és az adatokra hiperbolát illesztettem.

Az ábrán két párhuzamos mérés átlaga látható. A kapott eredményeket a 4. táblázat tartalmazza.

6.1.3. A blebbistatin az erőkar felhúzását idézi elő 'miozin.ADP' ('M.ADP') komplexben

A mutánsok nukleotidkötés hatására bekövetkező fluoreszcencia-változását aktin távollétében követtük nyomon. Az egy-triptofános DdMD mutánsok (5 μM W501+,

illetve W239+) triptofán fluoreszcencia-spektrumát mértem nukleotidmentes állapotban, majd 100 μM ADP, illetve 1 mM ATP mellett; különböző blebbistatin-koncentrációknál. A blebbistatint a pufferhez tettem, még a DdMD hozzáadása előtt. A kapott spektrumokat a nukleotidmentes miozin spektrumának csúcsára normalizáltam minden egyes inhibitor-koncentrációnál⁸. Végül az így kapott relatív fluoreszcencia-változásokat ábrázoltam a blebbistatin koncentrációjának függvényében.

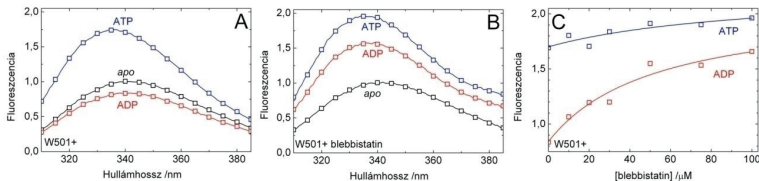
6.1.3.1. A W501+ mutáns triptofán fluoreszcencia-spektrumai aktin távollétében

Először a W501+ mutánt vizsgáltam, mely a triptofánját a relé-konverter régióban, az erőkar alapjánál hordozza (45). A W501+ a *switch-2* hurok mozgásának és ezzel kapcsolatosan az erőkar állapotának a szenzora (**10, 21. ábra**). A W501+ fluoreszcenciája ADP hatására kisebb (10-20%) relatív csökkenést mutatott, amely a *switch-2* nyitott állapotát jelzi. ATP (és az ADP.P_i-analóg ADP.AIF₄⁻, ezt nem ábrázoltam) hozzáadására ellenben jelentős fluoreszcencia-növekedést (70-80 %) tapasztaltam (**23. a ábra**), amely a *switch-2* zárt állapotára utal. A *switch-2* nyitott-zárt átmenete az erőkar felhúzásával (*priming*) kapcsolt folyamat, melynek során az a lecsapottból (*poszt-rigor*) a felhúzott állapotba (*pre-powerstroke*) kerül (37,94) (**8. és 14. ábra**).

Blebbistatint is adva a miozin mintákhoz, ATP-ben az előzőhöz hasonlóan nagy fluoreszcencia-emelkedés történt (80-100 %, az inhibitor koncentrációjának függvényében), ami azt jelzi, hogy az inhibitor jelenlétében is a felhúzott erőkarú (*pre-powerstroke*) 'M.ADP.P_i' komplex a domináns. ADP-ben ugyanakkor a blebbistatinmentes mintától eltérően szintén fluoreszcencia-emelkedést kaptam (10-70 %, az inhibitor koncentrációjának függvényében), ami magas blebbistatin-koncentrációnál az ATP-ben mért W501+ fluoreszcencia-szintjéhez tartott (**23. b ábra**). A hiperbolikus illesztéssel extrapolált relatív fluoreszcenciák a következők voltak: $2,2 \pm 0,4$ ADP-ben és $2,1 \pm 0,3$ ATP-ben (**23. c ábra, 5. táblázat**). Ez az eredmény azt jelzi, hogy ADP mellett a blebbistatin zárt *switch-2*-vel bíró, felhúzott erőkarú állapot létrejöttét idézi elő. Ilyen állapot ADP-ben eddig ismeretlen volt, hiszen a miozin erőkarjának felhúzásához korábban ATP, vagy más, a γ -foszfát kötőhelyet is betöltő ligandum jelenlétét tartották elengedhetetlenül szükségesnek.

⁸ Mivel a DdMD triptofán fluoreszcencia-spektruma nem ad éles csúcsot, ahogy az Anyagok és módszerek fejezetben is említettem, egy, legfeljebb 10 nm-es tartomány (rendszerint 342-348 nm közt) értékeit átlagoltam és a spektrumot erre az átlagértékre normalizáltam.

A fenti eredményekből meghatároztuk a blebbistatin kötésének egyensúlyi állandóját is, ami 'W501+.ADP' komplexben $K_d = 53 \pm 16 \mu\text{M}$ -nak adódott (**6. táblázat**).



23. ábra: A blebbistatin hatása a W501+ mutáns nukleotid-indukált fluoreszcencia-változásaira.

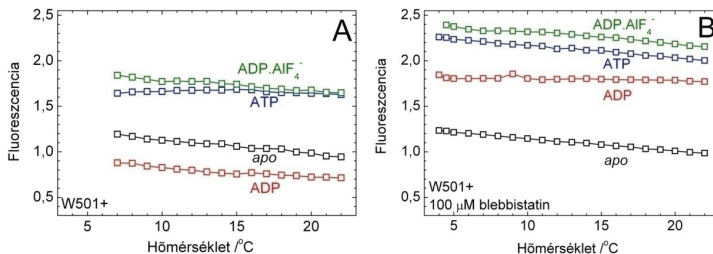
5 μM W501+ triptofán fluoreszcencia-spektrumai (négyzetek) a) blebbistatin nélkül és b) 50 μM blebbistatin jelenlétében, nukleotidmentes állapotban (egyszerűsítve: *apo*, fekete), majd 100 μM ADP (piros), illetve 1 mM ATP (kék) mellett 20 °C-on; valamint c) a relatív fluoreszcencia-szintek a blebbistatin-koncentráció függvényében. A nukleotidmentes miozin fluoreszcenciájának csúcsát rendre 1-re normalizáltam. A c) ábra adataira hiperbolát illesztve meghatároztam a telítési blebbistatin-koncentrációra érvényes relatív fluoreszcencia-szinteket (**5. táblázat**) és a blebbistatin-kötés egyensúlyi állandóit (**6. táblázat**). Az ábrán a három párhuzamos mérés egyike látható.

6.1.3.2. A W501+ mutáns triptofán fluoreszcenciájának hőmérséklet-függése

A DdMD mutánsok triptofán fluoreszcenciájának hőmérséklet-függését is aktin távollétében mértem 5 μM miozinnal nukleotidmentes állapotban, 100 μM ADP, 2 mM ATP és $\text{ADP}\cdot\text{AlF}_4^-$ (100 μM ADP + 3 mM NaF + 100 μM AlCl_3) mellett. Az $\text{ADP}\cdot\text{AlF}_4^-$ az $\text{ADP}\cdot\text{P}_i$ analógja, az AlF_4^- a γ -foszfát helyére köt (85). Két sorozatot alkalmaztam: blebbistatin-mentes (**24. a ábra**), illetve 100 μM blebbistatint tartalmazó mintákat (**24. b ábra**). A kísérleteket úgy végeztem, hogy a küvetát először lassan lehűttem (22-4 °C közt), aztán lassan visszamelegítettem. A fluoreszcencia-intenzitásokat minden esetben 1 °C-onként (± 0.1 °C) detektáltam, a lehűtés és felmelegítés során kapott értékeket átlagoltam. Végül a két sorozatnál (inhibitormentes illetve inhibitor tartalmazó minták) rendre a nukleotidmentes miozin 20 °C-on kapott értékére normalizáltam ($F_{20\text{ °C}} = 1$).

A kapott eredmények a spektrumokhoz hasonló tendenciát mutattak: 100 μM blebbistatin mellett ADP-ben a W501+ relatív fluoreszcenciája az ATP-ben, illetve az $\text{ADP}\cdot\text{AlF}_4^-$ -ban mért szinthez tartott. A *switch-2* bezáródását továbbá az is jelezte,

hogy a W501+ relatív fluoreszcencia-emelkedése a 'W501+.ADP.B' komplexben magasabb hőmérsékleten kifejezettebb volt (**24. ábra**); a *switch-2* nyitott-zárt átmenetéhez vezető konformáció-változás ugyanis endoterm folyamat (37).



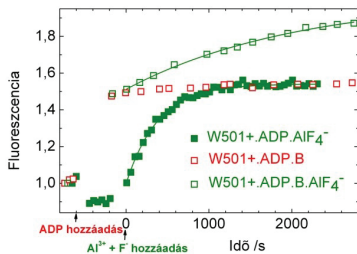
24. ábra: A W501+ mutáns fluoreszcenciájának hőmérséklet-függése.

5 μM W501+ fluoreszcenciáját mértem a) blebbistatin nélkül és b) 100 μM blebbistatin jelenlétében; nukleotidmentes állapotban (egyszerűsítve: *apo*, fekete), majd 100 μM ADP (piros), 2 mM ATP (kék) és ADP.AIF₄⁻ (100 μM ADP + 3 mM NaF + 100 μM AlCl₃, zöld) mellett. Két mérés átlagát ábrázoltam. Az egyes nukleotid-állapotokat a továbbiakban ugyanígy jelöltem.

6.1.3.3. A 'miozin.ADP.AIF₄⁻' komplex képződésének kinetikája

A *switch-2* bezáródását és a γ -foszfát kötőhely betöltését a 'W501+.ADP.AIF₄⁻' komplex képződésének kinetikáját követve vizsgáltuk fluoriméteren (az AIF₄⁻ a γ -foszfát helyére köt, lásd az előzőekben). Blebbistatin-mentes, illetve 100 μM blebbistatint tartalmazó 5 μM W501+ motordomén mintához 100 μM ADP-t, majd 3 mM NaF-ot és 100 μM AlCl₃-ot adtam. A kontroll minta csak ADP-t és blebbistatint tartalmazott, NaF-ot és AlCl₃-ot nem. A mért W501+ fluoreszcencia-értékeket rendre a nukleotidmentes miozin fluoreszcenciájára normalizáltam (**25. ábra**).

A blebbistatin gátolta a 'W501+.ADP.AIF₄⁻' komplex képződését, amint az a fluoreszcencia-spektrumokból is következik. A görbékre egyszeres exponenciális függvényt illesztve a megfigyelt sebességi állandó $k_{\text{obs}} = 0,0025 \pm 0,0001 \text{ s}^{-1}$ volt blebbistatin nélkül és $k_{\text{obs, bleb}} = 0,00068 \pm 0,00020 \text{ s}^{-1}$ 100 μM blebbistatin mellett. Az AIF₄⁻ csak a 'W501+.ADP' komplexhez kötődik, mely nem volt teljesen telítve blebbistatinnal ($K_d = 53 \pm 16 \text{ μM}$ a **23. c ábra** adatai szerint). Ez az eredmény tehát azt jelzi, hogy a 'M.ADP.B' komplex valóban hozzáférhetetlen γ -foszfát kötőhellyel bír.



25. ábra: A blebbistatin hatása a 'W501+.ADP.AIF₄⁻' komplex képződésének kinetikájára.

5 μM W501+ fluoreszcenciáját követtem az idő függvényében 100 μM ADP, majd 3 μM NaF és 100 μM AlCl₃ egymás utáni (nyílak) hozzáadására blebbistatin nélkül (■) és 100 μM blebbistatin jelenlétében (□) 20 °C-on. A kontroll minta (□) a miozin mellett csak ADP-t és blebbistatint

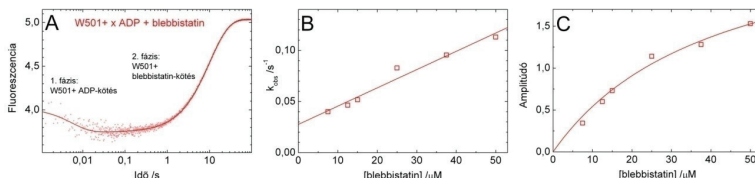
tartalmazott. Az adatokra egyszeres exponenciálist illeszttem, amely megadta a megfigyelt sebességi állandókat ($k_{\text{obs}} = 0,0025 \pm 0,0001 \text{ s}^{-1}$ blebbistatin nélkül és $k_{\text{obs, bleb}} = 0,00068 \pm 0,00020 \text{ s}^{-1}$ 100 μM blebbistatin jelenlétében). Ha a γ -foszfát-kötőhely a 'W501+.ADP' komplex esetén szabad, a 'W501+.ADP.AIF₄⁻' esetén pedig nem, akkor a 'W501+.ADP.AIF₄⁻' komplex képződésének gátlására az alábbi séma írható fel: $k_{\text{obs, bleb}} = k_{\text{obs}}K_d/(K_d + [\text{blebbistatin}])$. A $k_{\text{obs}} = 0,0025 \text{ s}^{-1}$ (**23. c ábra**) és $K_d = 37 \text{ μM}$ (**7. táblázat**) értékeket alkalmazva a kapott $k_{\text{obs, bleb}} = 0,00068 \text{ s}^{-1}$ éppen a kísérletben kapott eredménnyel egyezik meg.

6.1.4. A 'M.ADP.B' hármas komplex képződésének kinetikája

E komplex képződését is a W501+ fluoreszcenciájának változásával követtük nyomon. 50 μM ADP-t kevertem össze különböző koncentrációjú blebbistatin mintákkal a *stopped-flow* készülék egyik tubusában; majd ezt az oldatot kevertem a másik tubusba tett 2,5 μM W501+ miozinnal (gyorskeverés utáni koncentrációk).

Kétfázisú görbéket kaptam (**26. a ábra**). Az első, gyors fázisban (38 μM blebbistatin mellett $k_{\text{obs}} \approx 200 \text{ s}^{-1}$) a fluoreszcencia kismértékben csökkent, ami a W501+ ADP-kötését jelzi. Az ezt követő, viszonylag lassabb második fázisban nagy fluoreszcencia-emelkedés történt (38 μM blebbistatin mellett $k_{\text{obs}} \approx 0,1 \text{ s}^{-1}$), ami a blebbistatin kötését mutatja a 'M.ADP' komplexhez. A második fázis megfigyelt sebességi állandói lineárisan emelkedtek a blebbistatin koncentráció növelésével. Az adatokra illesztett egyenes meredeksége $k_{\text{on}} = 0,0018 \text{ μM}^{-1}\text{s}^{-1}$ -nak; a tengelymetszet $k_{\text{off}} = 0,028 \text{ s}^{-1}$ -nak adódott; ami $K_d = 16 \text{ μM}$ -t eredményezett a 'M.ADP' blebbistatin kötésére (**26. b ábra**). Ha e második fázis amplitúdóira hiperbolát illesztettünk (**26. c ábra**), a kapott $K_d = 42 \pm 10 \text{ μM}$ volt. Ez egyrészt a motordomének nagyjából 70 %-ának a hármas komplexbe való beépülését engedi meg magas blebbistatin-koncentrációnál (a

blebbistatin vízdékonysága 100 μM); másrészt a fluoreszcencia-spektrumokból származó K_d értékkel ($53 \pm 16 \mu\text{M}$) összhangban van (**23. c ábra**).



26. ábra: A 'W501+.ADP.blebbistatin' hármas komplex képződésének kinetikája.

a) A W501+ fluoreszcencia-tranziense a *stopped-flow* készülékben. Az egyik tubus 2,5 μM W501+ miozint; a másik 50 μM ADP és 38 μM blebbistatin keverékét tartalmazta; melyeket 20 °C-on kevertem össze (a keverést x-szel jelöltem). b) A második fázis sebességi állandói, és c) a második fázis amplitúdói a blebbistatin-koncentráció függvényében. A b) ábra adatpontjaira egyenest, a c) ábra adataira hiperbolát illeszttem, melyeket felhasználtam a blebbistatin-kötés egyensúlyi állandójának meghatározásához (**7. táblázat**).

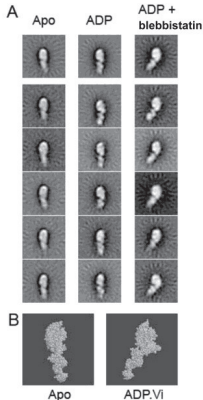
A 'M.ADP' blebbistatin kötésének egyensúlyi állandója a három módszerrel kapott értékeket átlagolva $K_d = 37 \pm 19 \mu\text{M}$ (**7. táblázat**).

6.1.5. Az új konformáció megerősítése elektron-mikroszkópos felvételekkel

Az elektron-mikroszkópos felvételeket angliai kollaborátoraink – Dr. Neil Billington és Peter J. Knight professzor (University of Leeds, Egyesült Királyság) – készítették. DdMD helyett nyúl vázizom miozin 2 S1-gyel (skS1) dolgoztak. E miozin fragmentum a motordoménen kívül az erőkart is tartalmazza, melynek lecsapott vagy felhúzott állása így meghatározható; másrészt a blebbistatin a DdMD-hez hasonlóan gátolja (61,62,93). Kollaborátoraink az *apo-S1*, az ADP-komplexben levő S1, valamint az ADP.B-komplexben levő S1 molekulák képét hasonlították össze.

Az *apo-S1* és az S1.ADP esetében a motordomén és az erőkar egy vonalba esett – „kolineáris” megjelenésű volt –, ezekkel ellentétben az 'S1.ADP.B' komplex a felvételeken „meggörbült” szerkezetet mutatott (**27. a ábra**). A képeket osztályokba sorolva azt kapták, hogy az ADP.B-komplexben levő S1 molekulák mintegy 80 %-a volt „görbült” szerkezetben, ami összhangban áll az előbbi kísérlet eredményével (**26. c ábra**). A felvételeken látszó „kolineáris” ill. „görbült” S1 molekulák képe nagyon

emlékeztet a lecsapott, ill. felhúzott erőkarú miozinok tipikus atomi szerkezetére (**27. b ábra**). Így elmondhatjuk, hogy a tapasztalt fluoreszcencia-változások valóban az erőkar mozgását jelzik és a 'M.ADP.B' komplex felhúzott erőkarral bír.



27. ábra: A blebbistatin és az ADP hatása a miozin fejek szerkezetére.

a) Elektron-mikroszkópos felvételek: az skS1 molekulák átlagolt képei. A bal oldali oszlop a nukleotidmentes (*apo*), a középső az 1 mM ADP-t, a jobb oldali az 1 mM ADP-t és 100 μ M blebbistatint tartalmazó skS1 mintákat ábrázolja. A képek oldalhossza 31.2 nm. A felső sorban az összes kép átlaga látható, az alatta levő 5 kép rendre az egyes osztályok átlagolt képe. A képek közepén látható a motor domén, alatta az erőkar. A képekben megjelenő „glória” a felvételek átlagolásának eredménye.

b) Tipikus röntgen-krisztallográfias motor domén szerkezetek fésűkagyló (*scallop*) miozinon, az a) panellel azonos orientációban.

Baloldalon az *apo*-S1 (1SR6), jobboldalon az S1.ADP.V_i (1QVI) látható.

6.1.6. A blebbistatin nem változtatja meg a miozin aktinkötő sajátságait

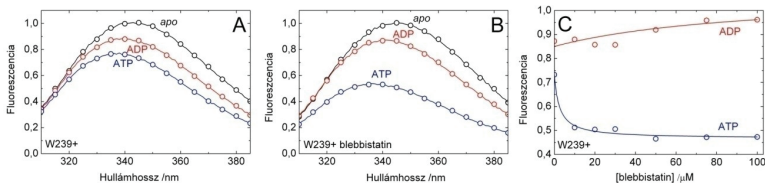
6.1.6.1. A W239+ mutáns triptofán fluoreszcencia-spektrumai aktin távollétében

A W239+ mutánssal is elvégeztem a nukleotidkötés hatására bekövetkező fluoreszcencia-változások vizsgálatát; e triptofán szenzor a *switch-1* hurokban található (**21. ábra**) (42). A hurok zárt-nyitott átmenete – amely gyors lépés, ahol $K \approx 1$ – az alacsony és magas aktin affinitású állapotok közti kapcsolóként működik. ATP hatására a W239+ fluoreszcenciája csökkent (25 %, **28. a ábra**), ez a kioltás a *switch-1* hurok záródását és így az alacsony aktin affinitású állapot felé való eltolódást jelzi. Az aktin affinitás csökkenését valószínűleg az aktinkötő árok külső részének (külső árok, *outer cleft*) kinyílása idézi elő. Ezek a molekuláris mozgások vezetnek az ATP-indukált aktomiozin disszociációhoz (42).

Blebbistatin hatására a W239+ fluoreszcenciája ATP-ben még nagyobb (50 %) csökkenést mutatott. ADP-ben csak kisebb csökkenést tapasztaltam (10-15 %), amely az inhibitor mellett sem változott jelentősen (5-8 % csökkenés, **28. b ábra**). A blebbistatin koncentráció növelésével a W239+ relatív fluoreszcenciája tehát ADP-ben és ATP-ben nem tartott azonos szinthez (**28. c ábra, 5. táblázat**). Ez az eredmény azt

jelzi, hogy a blebbistatin nem változtatja meg a *switch-1* hurok konformációját és így a miozin aktinkötő sajátságait a különböző nukleotid-állapotokban. Az inhibitor ATP-ben gyenge aktinkötő, zárt *switch-1*-gyel bíró miozint stabilizál; a 'M.ADP.B' hármass komplex ellenben megőrzi magas aktin affinitását, a *switch-1* reverzibilis mozgásának következtében.

A W239+ blebbistatin-kötésének egyensúlyi állandóit a **6. táblázat** tartalmazza.

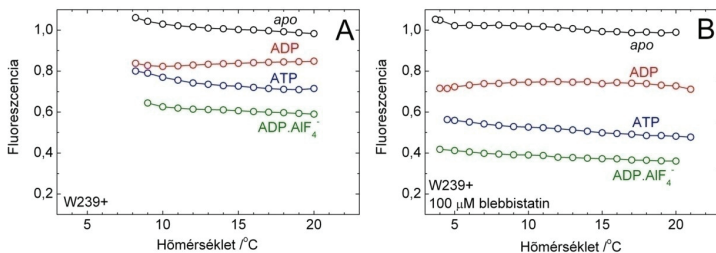


28. ábra: A blebbistatin hatása W239+ mutáns nukleotid-indukált fluoreszcencia-változásaira.

a) 5 μM W239+ triptofán fluoreszcencia-spektrumai (körök) blebbistatin nélkül és b) 50 μM blebbistatin jelenlétében 20 °C-on; valamint c) a relatív fluoreszcencia-szintek a blebbistatin-koncentráció függvényében. A nukleotidmentes miozin fluoreszcenciájának csúcsát rendre 1-re normalizáltam. A nukleotid-állapotok jelölése a **23. ábrával** azonos. A c) ábra adataira hiperbolát illetve meghatároztam a telítési blebbistatin-koncentrációra érvényes relatív fluoreszcencia-szinteket (**5. táblázat**) és a blebbistatin-kötés egyensúlyi állandóit (**6. táblázat**). Az ábrán a három párhuzamos mérés egyike látható.

6.1.6.2. A W239+ mutáns triptofán fluoreszcenciájának hőmérséklet-függése

A W501+ mutánsnál leírtak szerint a W239+ fluoreszcenciájának hőmérséklet-függését is megmértem. Ezúttal is a spektrumokhoz hasonló változásokat tapasztaltunk: blebbistatin hozzáadására ADP-ben hasonló, ATP és ADP.AIF₄⁻ mellett a nukleotidmentes mintához képest nagyobb relatív fluoreszcencia-csökkenés történt (**29. ábra**).

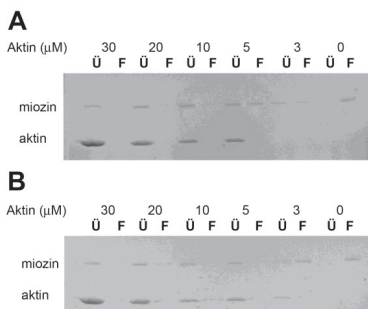


29. ábra: A W239+ mutáns fluoreszcenciájának hőmérséklet-függése.

5 μM W239+ fluoreszcenciáját mértem a) blebbistatin nélkül és b) 100 μM blebbistatin jelenlétében. A nukleotid-állapotok jelölése a **24. ábrával** azonos. Két mérés átlagát ábrázoltam.

6.1.6.3. A blebbistatin hatása a miozin-nukleotid komplexek aktinkötésére

Azt, hogy az inhibitor valóban nem változtatja-e meg a miozin aktinkötő sajátosságait a különböző nukleotid-állapotokban, direkt módon ultracentrifugálásos koszedimentációs kísérletekkel igazoltuk. 2 μM vad típusú DdMD miozint (m761) különböző koncentrációjú aktinnal inkubáltam nukleotid nélkül, 100 μM ADP és 1 mM ATP mellett blebbistatin nélkül; illetve 100 μM blebbistatin jelenlétében (a beméréseket pontosan lásd a **13.2.2. fejezetben**) Ezután a mintákat ultracentrifugáltam, a felülúszót és az üledéket gélen megfuttattam és denzitometrálтам (**30. ábra**).

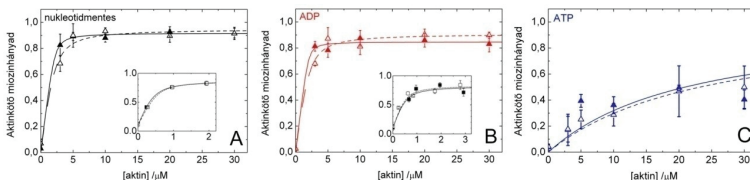


30. ábra: A blebbistatin hatása a vad típusú DdMD aktinkötésére, a géleképek.

A géleken a miozin és aktin minták megjelenése látható a centrifugálás után a felülúszóban (F) és az üledékben (Ü) 2 μM miozin, 100 μM ADP és emelkedő aktinkoncentráció mellett a) blebbistatin nélkül, b) 100 μM blebbistatin jelenlétében. Molekulasúly-markert nem használtam e kísérleteknél. A kapott géleket

denzitometrálтам. A kísérletek belső kontrollja az volt, hogy az aktin koncentrációja lineárisan nő-e, illetve a miozin koncentrációja azonos-e az egyes mintákban a denzitomrálással kapott értékek szerint (egy mintán itt a felülúszó és az üledék együttese értendő).

Az üledékben maradt, vagyis az aktinkötő miozinhányadot ábrázoltam az aktinkoncentráció függvényében, az értékekre másodfokú függvényt illesztve. A kísérleteket elvégeztem 1 μM DdMD mellett, kisebb aktinkoncentrációkkal is, ezek az eredmények a betett ábrákon láthatók (**31. a-c ábra**).



31. ábra: A blebbistatin hatása a vad típusú DdMD aktinkötésére a különböző nukleotid-állapotokban, az aktinkötő miozinhányad.

2 μM m761 aktinkötő miozinhányadát az aktin koncentrációjának függvényében ábrázoltam a) nukleotidmentes állapotban (fekete), b) 100 μM ADP (piros), és c) 1 mM ATP (kék) mellett; blebbistatin nélkül (teli jelek) és 100 μM blebbistatin jelenlétében (üres jelek). Az adatokra másodfokú függvényt illeszttem (az egyenletet lásd a **Függelék 13.6 fejezetében**; c értéket rögzíttem). A betett ábrákon ugyanilyen kísérletek eredményei, 1 μM m761 és alacsonyabb aktinkoncentrációk mellett láthatók. Az ábrák 4 (a betettek 2) párhuzamos kísérlet átlagát mutatják.

Az inhibitor nem befolyásolta sem a nukleotidmentes, sem az ADP-kötött miozin magas aktin affinitását ($K_d < 1 \mu\text{M}$), sem az ATP-kötött miozin gyenge aktinkötő állapotát ($K_d \approx 20 \mu\text{M}$). Így megerősítettük a W239+ fluoreszcencia-mérések alapján kapott eredményt, miszerint a blebbistatin nem változtatja meg a *switch-1* hurok konformációs egyensúlyát és így a miozin aktinkötő sajátosságait sem a különböző nukleotid-állapotokban (**8. táblázat**).

6.1.7. A 'M.ADP' aktinkötésének kinetikája

6.1.7.1. A 'M.ADP' és a 'M.ADP.B' komplex aktinkötésének kinetikája

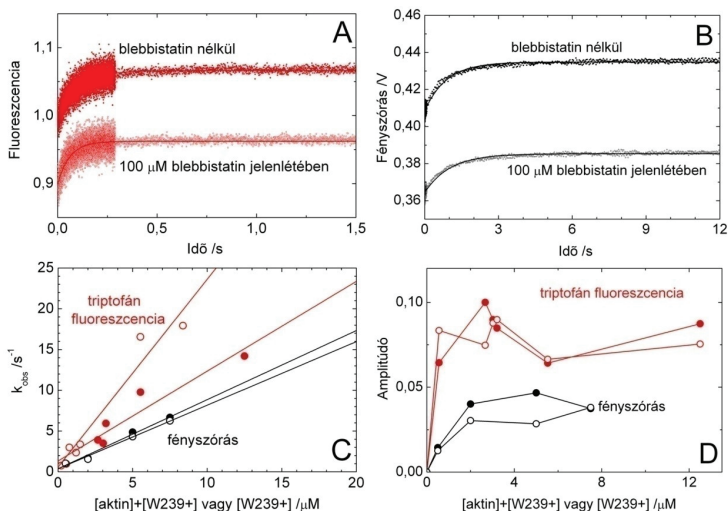
A DdMD mutánsok ADP-komplexének aktinkötését inhibitor mellett és annak távollétében tranziens kinetikai mérésekkel hasonlítottuk össze, a triptofán fluoreszcencia és a fényszórás változását követve.

Először a 'W239+.ADP' aktinkötését vizsgáltam: miozint és 0.5 mM ADP-t kevertem össze aktinnal és 0.5 mM ADP-vel blebbistatin nélkül és 100 μM

blebbistatin (mindkét tubusban) jelenlétében, emelkedő miozin- és aktin-koncentráció mellett. Bár a kísérletet nem pszeudo-elsőrendű körülmények közt végeztem ($[A]/[M] \approx 1.5/1$ volt, a jel-zaj arányt javítandó), a triptofán fluoreszcencia-változásokra egyszeres exponenciálist jól lehetett illeszteni (**32. a ábra**). A tranziensek mintegy 8 %-os emelkedést mutattak minden esetben: az összes fehérje-koncentrációnál, az inhibitor távollétében és jelenlétében is. Mivel az aktin monomer 4 triptofánt tartalmaz, és így fluoreszcenciája a kezdeti jelnek nagyjából 80 %-át teszi ki, ez az eredmény a W239+ mutánszt leíró korábbi közleménnyel összhangban van (42). Ebben kimutatták, hogy a W239+ ADP-komplexben kevert zárt (alacsony fluoreszcenciájú) és nyitott *switch-1* (magas fluoreszcenciájú) populációja aktinkötés hatására gyakorlatilag homogén nyitott *switch-1* állapot felé tolódik el (amit 36 % W239+ fluoreszcencia-emelkedés kísér). A kísérletet elvégeztem a fényszórás változását követve is (**32. b ábra**), ami az aktomiozin kötés vagy disszociáció detektálására használható. A teljes jelváltozásra 5 % emelkedést kaptam, ami jó egyezést mutat a korábbi eredményekkel (42).

Az exponenciális illesztésekből származó megfigyelt sebességi állandókat a fehérje-koncentráció függvényében ábrázoltam és az adatokra egyenest illesztettem (**32. c ábra**). A triptofán fluoreszcencia (a továbbiakban: W) esetén a nem pszeudo-elsőrendű körülmények miatt az x tengelyen az $[A] + [W239+]$ együttes koncentrációt, a fényszórásnál a $[W239+]$ koncentrációt tüntettem fel. Az aktinkötés kapott másodrendű sebességi állandója $1,1 \pm 0,2 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (W), illetve $0,84 \pm 0,07 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (fényszórás) volt 'W239+.ADP'; és $2,3 \pm 0,3 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (W), illetve $0,78 \pm 0,06 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (fényszórás) 'W239+.ADP.B' komplexre. A tengelymetszetek igen közel estek a zéróhoz, ami az aktin disszociációjának alacsony egyensúlyi állandóját jelenti (**32. c ábra, 9. táblázat**, $K_d < 2 \mu\text{M}$): a 'W239+.ADP' és a 'W239+.ADP.B' tehát erős aktinkötő komplexet alkot. Mindkét esetben ábrázoltam a megfigyelt amplitúdókat is a fehérje-koncentráció függvényében: a triptofán fluoreszcencia tranzienseknél a relatív emelkedést a kezdeti értékekhez képest, a fényszórásnál a mesterséges egységben megfigyelt amplitúdókat (**32. d ábra**). A kapott emelkedés $0,082 \pm 0,005$ (W), illetve $0,049 \pm 0,007$ (fényszórás) volt inhibitor nélkül; és $0,079 \pm 0,003$ (W), illetve $0,040 \pm 0,005$ (fényszórás) volt inhibitor tartalmazó komplexre (**32. d ábra, 9. táblázat**);

korai telítés mellett ($K_d < 2 \mu\text{M}$). Tehát az amplitúdók elemzése is megerősítette a W239+ erős aktinkötését.



32. ábra: A $^3\text{W239.ADP}'$ és a $^3\text{W239.ADP.B}'$ komplex aktinkötésének kinetikája.

a) A triptofán fluoreszcencia transziensei (piros) $2,2 \mu\text{M}$ W239 + $500 \mu\text{M}$ ADP és $3,3 \mu\text{M}$ aktin + $500 \mu\text{M}$ ADP összekeverésekor blebbistatin nélkül (felső görbe, ●) és $100 \mu\text{M}$ blebbistatin jelenlétében (alsó görbe, ○) 20°C -on. A görbékét kezdeti értékükre normalizáltam és a blebbistatint tartalmazó minta esetén $-0,1$ -del eltoltam, hogy könnyebben lehessen ábrázolni. A görbékre egyszeres exponenciálist illesztettem ($k_{\text{obs}} = 9,8 \text{ s}^{-1}$ és $k_{\text{obs, bleb}} = 17 \text{ s}^{-1}$).

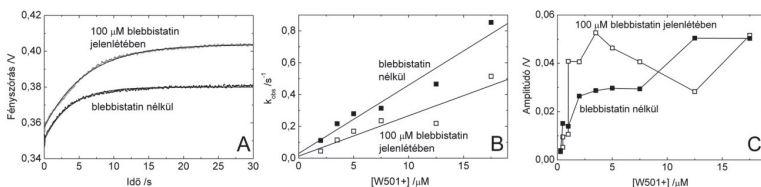
b) A fényszórás transziensei (fekete körök) $2 \mu\text{M}$ W239 + $500 \mu\text{M}$ ADP és $3 \mu\text{M}$ aktin + $500 \mu\text{M}$ ADP összekeverésekor blebbistatin nélkül (felső görbe, ●) és $100 \mu\text{M}$ blebbistatin jelenlétében (alsó görbe, ○) 20°C -on. A blebbistatint nem tartalmazó minta esetén a görbét $+0,05$ -dal módosítottam, hogy könnyebben lehessen ábrázolni. A görbékre egyszeres exponenciálist illesztettem ($k_{\text{obs}} = 1,123 \text{ s}^{-1}$ és $k_{\text{obs, bleb}} = 0,973 \text{ s}^{-1}$).

c) A megfigyelt sebességi állandók a fehérje-koncentráció függvényében. Az adatokra egyenest illesztettem, amelyből meghatároztam az aktinkötés másodrendű sebességi állandóját és az aktin disszociációjának egyensúlyi állandóját (9. táblázat).

d) Az amplitúdók fehérjekoncentráció-függése. Az adatokra illesztett hiperbola (az ábrán nem tüntettem fel) megadta az aktin disszociáció egyensúlyi állandóját (9. táblázat).

A c) és d) ábrán a jelmagyarázat az a) és b) ábrával egyezik; továbbá a triptofán fluoreszcencia esetén a $[\text{W239+}] + [\text{aktin}]$ együttes koncentrációt tüntettem fel.

A mérést elvégeztem a W501+ mutánsnal is, a fényszórás változását követve (**33. a ábra**), hogy összehasonlíthassuk a 'W501+.ADP.AIF₄⁻' és a 'W501+.ADP.B' komplexek aktinkötésének kinetikáját. Az előbbi a 'M.ADP.P_i' poszt-hidrolízis állapot analógja, melyben a W501+ gyenge aktinkötő tulajdonságú, a komplex gyors aktinkötésének egyensúlyi állandóját korábban $K_d = 57 \mu\text{M}$ -nak mérték (95). A W501+ ADP mellett ezzel ellentétben blebbistatin nélkül és 100 μM blebbistatin mellett is erős aktinkötést mutatott. A kísérletünkben kapott k_{obs} -ok elemzéséből származó másodrendű sebességi állandó $0,043 \pm 0,005 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ volt 'W501+.ADP' és $0,025 \pm 0,005 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ volt 'W501+.ADP.B' komplexre; a tengelymetszetek igen közel estek a zéróhoz (**33. b ábra, 9. táblázat**). Az amplitúdók emelkedésére kapott értékek rendre: $0,050 \pm 0,009$ blebbistatin nélkül és $0,037 \pm 0,004$ blebbistatin mellett; korai telítésnél ($K_d < 1,5 \mu\text{M}$; **33. c ábra; 9. táblázat**).



33. ábra: A 'W501+.ADP' és a 'W501+.ADP.B' komplex aktinkötésének kinetikája.

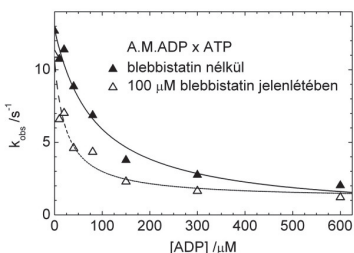
- A fényszórás transziensei 2,5 μM W501 + 500 μM ADP és 0,5 μM aktin + 500 μM ADP összekeverésekor blebbistatin nélkül (alsó görbe, ■) és 100 μM blebbistatin jelenlétében (felső görbe, □) 20 °C-on. A görbékre egyszeres exponenciálist illesztettem ($k_{\text{obs}} = 0,28 \text{ s}^{-1}$ és $k_{\text{obs, bleb}} = 0,17 \text{ s}^{-1}$).
- A megfigyelt sebességi állandók a W501+ koncentrációjának függvényében. Az adatokra egyenest illeszttem, amelyből meghatároztam az aktinkötés másodrendű sebességi állandóját és az aktin disszociációjának egyensúlyi állandóját (**9. táblázat**).
- Az amplitúdók fehérjekoncentráció-függése. Az adatokra illesztett hiperbola (az ábrán nem tüntettem fel) megadta az aktin disszociáció egyensúlyi állandóját (**9. táblázat**).

Összességében e méréseink azt bizonyítják, hogy – bár a W239+ és a W501+ mutáns más-más aktinkötési kinetikát mutat – mindkét konstrukció 'M.ADP' és 'M.ADP.B' komplexe erős aktinkötő tulajdonsággal bír.

6.1.7.2. Az 'aktomiozin.ADP.blebbistatin' ('A.M.ADP.B') négyes komplex képződése

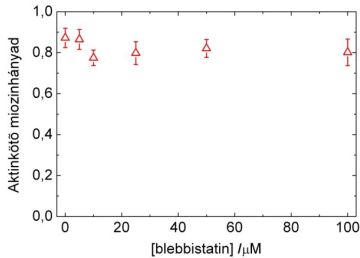
Az előbbi eredmények (31-33. ábra) azt sugallják, hogy – bár a blebbistatin a miozin aktinkötő árkának mélyére kötődik – a 'M.ADP.B' komplex képes az aktinhoz kötődve 'A.M.ADP.B' négyes komplexet formálni magas ADP- és inhibitor-koncentrációnál. A négyes komplex képződésének megerősítésére a következő két kísérletet végeztük.

Először az ATP-indukált AM disszociáció ADP általi gátlását vizsgáltuk blebbistatin nélkül, illetve 100 μM blebbistatin jelenlétében. 0,5 μM DdMD fehérjét kevertem össze 1 μM aktinnal és különböző koncentrációjú ADP-vel a *stopped-flow* készülék egyik tubusában, majd ezt kevertem a másik tubusba tett 200 μM ATP-vel a fényszórás változását követve (keverés előtti koncentrációk). A megfigyelt sebességi állandók az ADP-koncentráció függvényében csökkentek, mivel az ADP „láthatatlanul” kötődik az aktomiozin komplexhez. A k_{obs} értékekre hiperbolát illetve az ADP-kötés egyensúlyi állandója $K_d = 69 \pm 12 \mu\text{M}$ volt inhibitor nélkül, illetve $K_d = 24 \pm 1 \mu\text{M}$ az inhibitor jelenlétében (34. ábra). A blebbistatin tehát háromszorosára növelte az aktomiozin komplex ADP-affinitását. A második bizonyítékként ismét egy koszedimentációs kísérletet végeztem el: ezúttal 1 μM m761-et 5 μM aktin és 1 mM ADP mellett, de különböző koncentrációjú blebbistatin jelenlétében inkubáltam. Ultracentrifugálás után a 'M.ADP' komplex aktinkötő hányada magas inhibitor-koncentrációnál is alig csökkent, végig 80 % körül maradt. Ez azt mutatja, hogy az aktin és a blebbistatin együttesen képes kötődni a 'M.ADP' komplexhez (35. ábra).



34. ábra: Az ATP-indukált aktomiozin disszociáció gátlása ADP-vel és a blebbistatin hatása a reakcióra.

A fényszórás változását követtem blebbistatin nélkül (▲) és 100 μM blebbistatin jelenlétében (△) 20 °C-on. A megfigyelt sebességi állandókra hiperbolát illesztettem, ami megadta az aktomiozin ADP-kötésének egyensúlyi állandóját. A két párhuzamos mérés egyikét ábrázoltam.



35. ábra: Az 'A.M.ADP.blebbistatin' négyes komplex képződésének megerősítése koszedimentációs kísérlettel. A 'M.ADP' aktiváló miozinhányadát ($[m761] = 1 \mu\text{M}$, $[A] = 5 \mu\text{M}$, $[ADP] = 1 \text{mM}$) ábrázoltam emelkedő blebbistatin-koncentráció mellett (Δ). Két kísérlet átlaga látható.

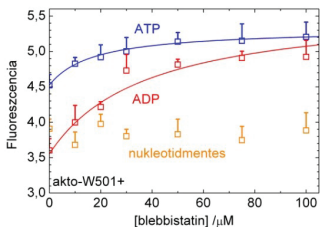
6.1.8. A miozinfajok többsége 'A.M.ADP.B' négyes komplexben is erős aktiváló, felhúzott erőkarú állapotban van jelen

6.1.8.1. A W501+ mutáns triptofán fluoreszcencia-spektruma aktin jelenlétében

A W501+ mutánsal aktin jelenlétében is megvizsgáltuk a nukleotidok kötéseire bekövetkező fluoreszcencia-változásokat. A kísérletet az aktin nélkül elvégzett mérésekkel azonos módon kiviteleztem a következő koncentrációkkal: $3 \mu\text{M}$ miozin önmagában, majd $5 \mu\text{M}$ aktinnal, végül $5 \mu\text{M}$ aktin és $0,5 \text{mM}$ ADP vagy $5 \mu\text{M}$ aktin és 1mM ATP mellett. Az eredmények az aktin távollétében (**23. ábra**) kapottakkal azonos tendenciát mutattak: a blebbistatin-koncentráció növekedésével az aktó-W501+ fluoreszcenciája ADP-ben és ATP-ben azonos szinthez tartott (**36. ábra**). A hiperbolikus illesztéssel extrapolált fluoreszcencia-szintek – az aktin fluoreszcenciáját kivonva – a következők voltak: $2,6 \pm 0,3$ ADP-ben és $2,4 \pm 0,1$ ATP-ben (**5. táblázat**). Ez két dolgot jelez:

- 1) Blebbistatin mellett az aktin jelenléte nem befolyásolja az erőkar állapotainak megoszlását.
- 2) Blebbistatinban az aktó-W501+ ADP-kötése is előidézi az erőkar felhúzását.

A fenti eredményekből meghatároztuk a blebbistatin kötésének egyensúlyi állandóját is, ami 'A.M.ADP' komplexben $K_d = 38 \pm 17 \mu\text{M}$ -nak adódott (**36. ábra, 6. táblázat**), ez gyakorlatilag megegyezik a 'M.ADP' esetében kapott $K_d = 37 \pm 19 \mu\text{M}$ értékkel (**23. c, 26. b és c ábra, 7. táblázat**).



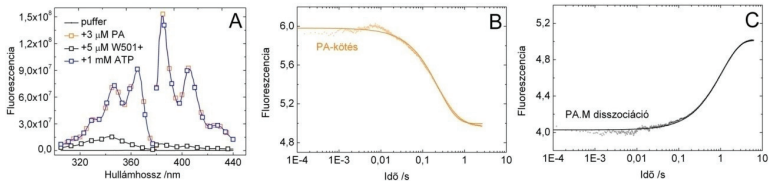
36. ábra: A blebbistatin hatása az akto-W501+ nukleotid-indukált fluoreszcencia-változásaira.

A relatív fluoreszcencia-szintek a blebbistatin-koncentráció függvényében 3 μM W501+ mutáns 5 μM aktin mellett nukleotidmentes állapotban (narancssárga), majd 500 μM ADP (piros), illetve 1 mM ATP (kék) mellett 20 °C-on. A nukleotid- és aktinmentes miozin fluoreszcenciájának csúcsát rendre

1-re normalizáltam. Az ábra adataira hiperbolát illetve meghatároztam a telítési blebbistatin-koncentrációra érvényes relatív fluoreszcencia-szinteket (**5. táblázat**) és a blebbistatin-kötés egyensúlyi állapotait (**6. táblázat**). Az ábrán a három párhuzamos mérés átlaga látható.

6.1.8.2. Az erős és gyenge aktinkötő állapotok megoszlása pirén-aktin spektrumok alapján

A DdMD konstrukciók aktinkötését a blebbistatin-koncentráció függvényében pirén-jelölt aktin segítségével is vizsgáltuk. A pirén-aktin az aktomiozin interakció detektálására használható. Ha a miozin erősen köti az aktint, a pirén-aktin fluoreszcenciája jelentős csökkenést mutat (78). Ez a *quench* a gerjesztési spektrumban a 365 nm-es, az emissziós spektrumban a 406 nm-es csúcson a legnagyobb (mintegy 80 %-os csökkenés). Ha a pirén-aktomiozin komplex (P.A.M) disszociál jelöletlen aktin vagy ATP hozzáadásakor, a pirén-aktin fluoreszcenciája visszatér csaknem az eredeti szintre (**37. a-c ábra**).



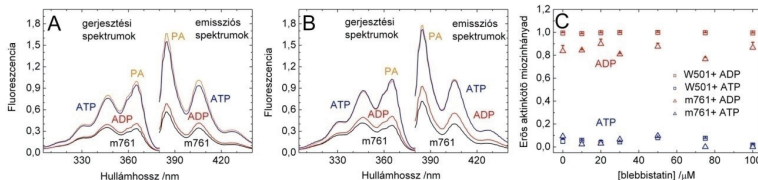
37. ábra: A pirén-aktin (PA) fluoreszcencia-változásai.

a) Normalizálatlan („nyers”) PA fluoreszcencia-spektrumok: a W501+ PA-kötése és a disszociáció ATP hozzáadására. 3 μM PA-hoz (narancssárga) adtam 5 μM W501+ motor domént (fekete), majd ehhez 1 mM ATP-t (kék) 20 °C-on.

b) Az LpS1 PA-kötési, illetve c) a P.A.M disszociációs SF-tranziense. 0,4 μM LpS1-et kevertem össze 2 μM pirén-aktinnal, illetve 1 μM PA.S1 komplexet 10 μM aktinnal (keverés előtti koncentrációk) 18 °C-on. Az egyszeres exponenciális illesztéssel kapott megfigyelt sebességi állandók $k_{\text{obs, on}} = 4,15 \text{ s}^{-1}$ (PA-kötés, narancssárga), illetve $k_{\text{obs, off}} = 0,97 \text{ s}^{-1}$ (P.A.M disszociáció, szürke) voltak.

Az erős és gyenge aktinkötő állapotok megoszlását úgy mértem, hogy 3 μM pirén-aktin spektrumait vettem fel miozin nélkül, majd 5 μM DdMD-vel, végül 5 μM DdMD és 0,5 mM ADP vagy 5 μM DdMD és 1 mM ATP mellett; különböző blebbistatin-koncentrációknál (**38. a-b ábra**). Az „üres” pirén-aktint tekintettem a 0 % erős (vagy 100 % gyenge), a P.A.M komplexet a 100 % erős (vagy 0 % gyenge) aktinkötő állapotnak; amelyek szerint kiszámoltam a két nukleotid melletti aktinkötő állapotok arányát (**38. c ábra**; az egyenletet lásd a **Függelék 13.6 fejezetében**).

ATP mellett mind az m761, mind a W501+ konstrukció gyenge aktinkötést mutatott, (a miozinpopulációnak legfeljebb 10 %-a volt erős aktinkötő); a nukleotidmentes és az ADP-kötött miozin ellenben megőrizte erős aktinkötő tulajdonságát (a miozinpopulációnak mintegy 80 %-a volt erős aktinkötő) az összes vizsgált blebbistatin-koncentrációnál (**38. c ábra**). Tehát a 'M.ADP.B' komplexek többsége blebbistatin mellett is erős aktinkötő állapotban van jelen.



38. ábra: Az erős és gyenge aktinkötő állapotok megoszlása PA fluoreszcencia-spektrumok alapján.

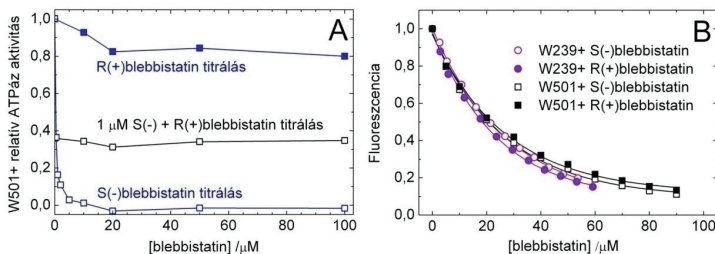
Normalizált spektrumok a) blebbistatin nélkül és b) 50 μM blebbistatin jelenlétében 3 μM PA (narancssárga), 3 μM PA + 5 μM m761 (fekete) és 3 μM PA + 5 μM m761 + 500 μM ADP (piros), vagy 3 μM PA + 5 μM m761 + 1 mM ATP (kék) mellett. c) Az m761 (Δ) és a W501+ (\square) erős aktinkötő miozinhányada ADP (piros), illetve ATP mellett (kék) a blebbistatin-koncentráció függvényében.

6.1.9. A blebbistatin kötése nem változtatja meg az *apo* miozin szerkezetét

A DdMD konstrukciók blebbistatin-kötés hatására bekövetkező triptofán fluoreszcencia-változását vizsgáltam nukleotidmentes (*apo*) motordoménen is. E kísérletekben a fluoreszcencia-változást az idő függvényében követtem, a két mutáns motordomén konstrukciót titrálva blebbistatinnal. Az inhibitornak ezúttal mindkét enantiomerjét felhasználtam: az eddig leírt mérésekben is alkalmazott, aktív S(-)

blebbistatint; valamint kontrollként az inaktív formát, az R(+)-blebbistatint (60). A két izomer eltérő miozinkötő tulajdonsággal is bír: az S-blebbistatin kötődik az *apo*-W501-hez, az R-blebbistatin viszont nem (39. a ábra).

A fluoreszcencia-csökkenés mind a négy esetben szinte azonos, mutánsenként a két enantiomerrel pedig teljesen azonos lefutást mutatott (39. b ábra). Ez azt jelzi, hogy a csökkenés nem a miozin saját, *intrinsic* triptofán fluoreszcencia-változásának, hanem a blebbistatin fényabszorpciójából származó belső szűrő hatásának (*inner filter effect*) a következménye (ϵ_{297} ; blebbistatin $\approx 7000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Ez az eredmény megegyezik a W501+ és W239+ triptofán fluoreszcencia-spektrumai esetén kapottakkal: a blebbistatin-koncentráció növelésével a nukleotidmentes DdMD „nyers” fluoreszcenciája csökkent. Eszerint az S-blebbistatin kötése önmagában (aktin és nukleotid távollétében) nem okoz triptofán fluoreszcencia-változást a W501+ és W239+ mutánsokban, vagyis nem idéz elő szerkezetváltozást az *apo* motordoménben.



39. ábra: A blebbistatin kötése a DdMD mutánsokhoz.

a) Az S(-)-blebbistatin és R(+)-blebbistatin hatása a W501+ mutáns aktin-aktivált ATPáz aktivitására, 0,1 μM W501+ és 20 μM ATP mellett. Az R(+)-blebbistatin nem befolyásolja sem a W501+ ATPáz aktivitását (■), sem az 1 μM S(-) blebbistatin ATPáz aktivitást gátló hatását (□).

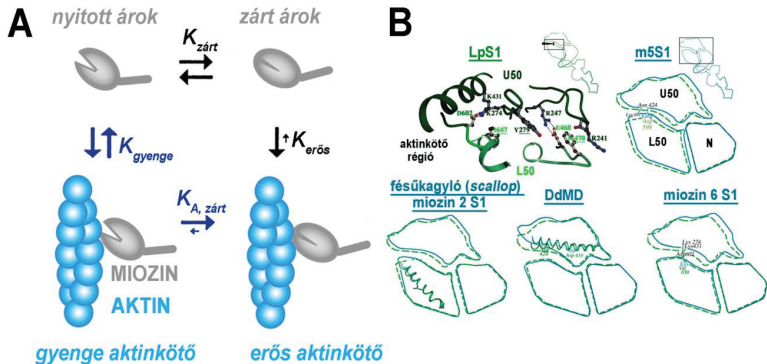
b) Az S(-)-blebbistatin (üres jelek) és R(+)-blebbistatin (teli jelek) hatása az *apo*-W239+ (●) és az *apo*-W501+ (■) fluoreszcenciájára.

6.2. Az aktinkötő zseb bezáródása meghatározza a miozinok aktinkötésének energetikáját

6.2.1. Probléma és kísérleti elrendezés

Az erő kifejtő lépés végállapota az erősen kötő *rigor* aktomiozin komplex, amely rövid életideje ellenére az egyik legfontosabb köztiállapota az erő kifejtés során történő munkavégzésnek. A *rigor* komplex atomi felbontású pontos szerkezete a mai napig sem ismert. A korábban nyúl és csirke modelleken tanulmányozott gerinces vázizom miozin 2 ismert „*rigor*-szerű” szerkezetében az aktinkötő árok nyitott állapotban van (24), az erős aktinkötés kialakításához viszont az ároknak be kell záródnia (24,39,41). A klasszikus “3G” modell – Geeves, Goody és Gutfreund (96,97) – szerint a miozin 2 aktinkötése gyenge asszociációval kezdődik, majd az aktomiozin komplex izomerizációjával válik erőssé; egy „indukált illeszkedés” típusú mechanizmust jelezve (40. a ábra). Léteznek ugyanakkor olyan miozin izoformák, – puhatestű (*Loligo*, *Placopecten spp*) izom miozin 2, *Dictyostelium discoideum* miozin 2, miozin 5, miozin 6 – amelyek aktin távollétében is részben vagy teljesen zárt árokkal bírnak (40,56,84,98) (20. és 40. b ábra). E szerkezetek egyrészt emlékeztetnek a *rigor* állapotra (40. b ábra), másrészt e miozinok indukált illeszkedés nélkül is képesek lehetnek az erős aktinkötésre (40. a ábra).

A gerinces vázizom miozin 2 S1 aktinkötése entrópia-hajtott, endoterm folyamat (52-55). A reakció endoterm természetére magyarázat lehet, hogy a pozitív entalpia-változás a miozinfejen ébredő feszülés velejárója; amely feszülés pedig az aktinfilamentummal való pontos térbeli komplementaritás kialakítása, és részben az árok bezárása miatt szükséges. Így az *apo* miozinban levő árok állapota és az aktinkötés energetikája között összefüggésnek kell lennie. E hipotézis vizsgálatára négy miozin izoforma összehasonlító vizsgálatát végeztük el gyors tranziens kinetikai, egyensúlyi fluorimetriás és kalorimetriás mérésekkel; valamint atomi szintű energetikai számításokkal. A tranziens kinetikai és egyensúlyi fluorimetriás kísérleteknél pirén-aktin szenzort használtunk, az előző alfejezetben már leírt módon (6.1.8.2. fejezet, 37. ábra). A négy miozin izoforma az alábbi volt: nyúl vázizom miozin 2 S1 (és HMM fragmentum; skS1 ill. skHMM), vad típusú *Dictyostelium discoideum* miozin 2 motordomén (m761 konstrukció; a továbbiakban csak DdMD), közönséges kalmár – *Loligo pealei* – izom miozin 2 S1 (LpS1) és eger miozin 5a S1 (m5S1).



40. ábra: Az aktinkötés útvonalai és az aktinkötő árok állapota különböző miozin izoformákban.

a) Az aktinkötés útvonalaival szerkezeti és kinetikai sémája. Aktin távollétében a miozinfej (szürke) zárt vagy nyitott árkú konformációt vehet fel. A két állapot közti átmenetet a $K_{\text{zárt}}$ egyensúlyi állandó szabja meg (felső sor). Azok a miozin izoformák, melyek aktin távollétében többségében nyitott árkú állapotban vannak jelen, az aktinhoz (világoskék) a 3G „indukált illeszkedés” mechanizmussal kötődnek (96,97). Ez egy kezdeti gyenge kötés (K_{gyenge}) és az ezt követő szerkezeti átalakulás ($K_{\text{A, zárt}}$ lépéséből áll (sötétkék nyilak). Azok a miozin izoformák, melyek aktin távollétében többségében zárt árkú állapotban vannak jelen (így az erős aktinkötésre „konformációsán előszelektált állapotban” vannak), az aktinhoz nagyobb szerkezeti átalakulás nélkül képesek lehetnek kötődni ($K_{\text{erős}}$, fekete nyilak).

b) Az aktinkötő árok állapota aktin távollétében különböző miozin izoformákban Yang és mtsai (56) alapján módosítva.

Az egyes miozin motor domének *rigor*-szerű szerkezetének kinagyított részlete (kék) a szubdomének (U50 és L50 – felső és alsó 50 kDa, N – N-terminális 25 kDa) és az aktinkötő árok helyzetével, az LpS1 (zöld, szaggatott vonal) szerkezetére vetítve. Az aktinkötő árok is külső (U50 és L50 közt) és belső árokra (U50 és N közt) osztható, melyek eltérő mértékű zárttságot mutatnak. A záródáshoz hozzájáruló sőhidak és hélixek is fel vannak tüntetve.

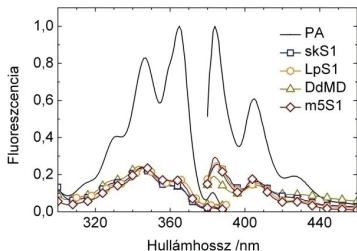
Az ábra bal felső részén az LpS1 U50 (sötétzöld) és L50 (világoszöld) szubdoménjei közti kölcsönhatásban résztvevő elemek vannak kinagyítva. A szerzők a sőhidakat szaggatott vonallal, az eltemetett apoláros aminosav-maradékokat aláhúzással jelezték.

Eredményeink szerint az skS1 aktinkötésének endoterm volta egyedülálló, az egyes miozin izoformák árkának állapota meghatározza az aktinkötés útvonalt, de nem szabja meg direkt módon az aktinkötés kinetikáját és az egyes miozinok aktin affinitását.

6.2.2. A miozin aktinkötő folyamata: hasonlóságok és különbségek az izoformák között

6.2.2.1. A pirén-aktin fluoreszcencia-spektrumok

A spektrumokat 25 °C-on vettem fel, a puffer után először 1 μM pirén-aktint mértem, majd 2 μM miozint adtam hozzá. Az emissziós spektrumokat ezúttal a 384 nm-es csúcsra normalizáltam, hogy könnyebben lehessen ábrázolni. A vizsgált miozinok mindegyikének kötése hasonló, nagy pirén-aktin fluoreszcencia-csökkenést (a 365 és 384 nm-es csúcs esetén 80%) eredményezett (**41. ábra**). Ez arra utal, hogy ezen izoformák esetében hasonló az aktomiozin kölcsönhatási felület (*interface*).

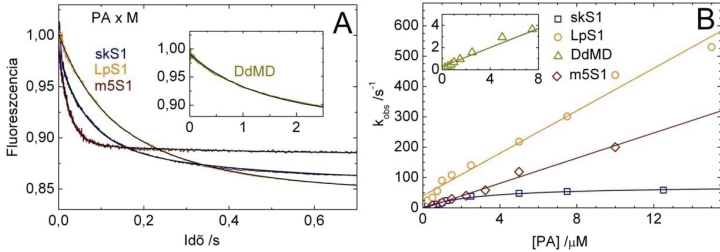


41. ábra: A vizsgált miozin izoformák PA fluoreszcencia-spektrumai.

Normalizált PA fluoreszcencia spektrumok: 1 μM pirén-aktin önmagában (fekete vonal), majd 2 μM miozin mellett 25 °C-on. A miozin izoformákat ezen az ábrán és a továbbiakban az alábbi módon jelöltem: skS1 – □, LpS1 – ○, DdMD – △, m5S1 – ◇. Két párhuzamos mérés átlaga látható.

6.2.2.2. Az aktinkötés kinetikája

A fenti, 365 nm-en mérhető fluoreszcencia-kioltást felhasználva mértem a miozinok aktinkötésének kinetikáját *stopped-flow* készüléken. A másodrendű aktinkötési sebességi állandók (k_{on}) meghatározására a miozint különböző koncentrációjú pirén-aktinnal kevertem össze pseudo-elsőrendű körülmények közt ($[\text{PA}]/[\text{M}] \geq 5$), alacsony ionerősségnél ($I = 25 \text{ mM}$). A jelváltozás, ahogy a spektrumok alapján is várható, a PA-fluoreszcencia gyors csökkenése volt (**42. a ábra**). A görbékre egyszeres exponenciális függvényt illesztettem, az ezekből származó megfigyelt sebességi állandókat (k_{obs}) a PA-koncentráció függvényében ábrázoltam (**42. b ábra**).



42. ábra: A vizsgált miozin izoformák PA-kötési kinetikája.

a) Normalizált SF-görbék 1 μM PA és 0,2 μM miozin összekeverésekor 18 °C-on $I = 75$ mM mellett. Egy tranziens 10-15 párhuzamos görbe átlaga, a kapott fluoreszcenciákat a kezdeti értékre normalizáltam. A tranziensekre egyszeres exponenciális illesztettem, a megfigyelt sebességi állandók a következők voltak:

8,9 s^{-1} (skS1); 5,7 s^{-1} (LpS1); 0,30 s^{-1} (DdMD) és 38 s^{-1} (m5S1).

b) A megfigyelt sebességi állandók PA-koncentráció függése. Az adatokra az skS1 esetében hiperbolát illeszttem, a kapott kezdeti meredekség (k_{on}) 26 $\mu M^{-1}s^{-1}$, a megfigyelt sebességi állandó maximuma (k_{max}) 73 s^{-1} volt. A többi izoforma esetében az értékekre egyenest illeszttem, melyek meredeksége a következő k_{on} értékeket adta: 35 $\mu M^{-1}s^{-1}$ (LpS1); 0,43 $\mu M^{-1}s^{-1}$ (DdMD) és 21 $\mu M^{-1}s^{-1}$ (m5S1). A tengelymetszetek (k_{off}) nem különböztek szignifikánsan a zérótól.

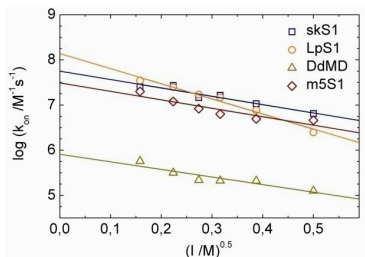
Mindkét panelen a két párhuzamos mérés egyikét ábrázoltam. Az összes mérés átlaga a **10. táblázatban** található.

Az skS1 esetében a k_{obs} értékek magas koncentrációknál telítést mutattak, az extrapolált sebességi állandó $k_{max} = 79 \pm 4 s^{-1}$ -nak adódott (**42. b ábra**, **10. táblázat**). Ez a görbe a korábban leírt kétlépéses aktinkötő reakciómechanizmussal cseng egybe: a gyors másodrendű kötési lépést (K_{gyenge}) egy izomerizációs lépés követi ($K_{A, zárt}$) (**40. a ábra**). A k_{max} értéke a szerkezeti változással jár, $K_{A, zárt}$ egyensúlyi állandóval jelölt lépésnek a sebességi állandóját fejezi ki (97,99,100). A többi vizsgált izoforma esetén ellenben nem tapasztalható egyértelműen telítés, a k_{obs} -ok inkább lineáris függést mutattak a PA-koncentrációtól (**42. b ábra**).

Magasabb ionerősségnél már egyik miozinnál sem jelent meg a telítés. A további kísérletekben a k_{on} -t a k_{obs} -ok PA-koncentráció függésének kezdeti meredekségével határoztuk meg ($[PA] < 5 \mu M$) különböző ionerősségeknél és hőmérsékleteken (**10. táblázat**).

6.2.2.3. Az aktinkötés kinetikájának ionerősség-függése

Az előzőekben bemutatott módon meghatározott k_{on} értékek ionerősség-függését úgy mértem, hogy az SF pufferhez az ionerősségnek megfelelő mennyiségű KCl-ot adtam. A kapott k_{on} értékek tízes alapú logaritmusát ($\log k_{on}$) az ionerősség négyzetgyökének függvényében ($I^{0.5}$) ábrázoltam (*Debye-Hückel plot*), az adatokra egyenest illeszttem (**43. ábra**).



43. ábra: A vizsgált miozin izoformák PA-kötési kinetikájának ionerősség-függése.

A jelölések leírását lásd a **41. ábránál**. A két párhuzamos mérés egyikét ábrázoltam. Az összes mérés átlaga a **10. táblázatban** található.

Az **1. egyenlet** felhasználásával meghatároztuk a nulla ionerősségre extrapolált kötési sebességi állandót ($k_{on, 0}$, az illesztett egyenes tengelymetszetéből) és az ionerősség-függést (az illesztett egyenes meredeksége, S) (101,102):

$$\log k_{on} = \log k_{on, 0} + S \cdot I^{0.5} \quad \text{1. egyenlet}$$

Az skS1, LpS1 és m5S1 számított $k_{on, 0}$ paramétere nagyon hasonlóan bizonyult; az értékük egy diffúzió-limitált reakció nagyságrendjébe esett (103,104). A DdMD aktinkötése a többi izoformánál két nagyságrenddel alacsonyabb $k_{on, 0}$ értéket adott. Az ionerősség-függés az skS1, m5S1 és DdMD esetében volt szinte azonos, az LpS1-re kaptunk magasabb értéket a többi izoformánál (**43. ábra, 10. táblázat**).

6.2.3. Az aktin nélkül is zárt árokkal bíró miozinok aktinkötése nukleotid távollétében exoterm folyamat

6.2.3.1. Az aktinkötés kinetikájának hőmérséklet-függése

Az aktinkötés hőmérséklet-függését szintén az előzőekben leírt módon határoztam meg 3 °C-onként ($\pm 0,1$ °C) emelkedő hőmérsékleteken 50 mM KCl mellett ($I = 75$ mM). A kapott k_{on} értékeket Arrhenius szerint ábrázoltam (az egyenletet lásd a

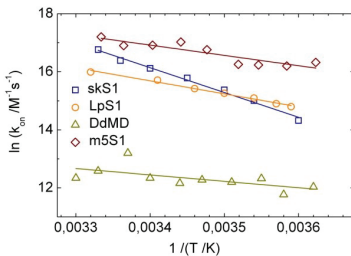
Függelék 13.5 fejezetében) és az adatokra egyenest illeszttem, melynek meredekségéből számoltam az aktivációs entalpiát ($\Delta H_{\text{on}}^{\ddagger}$, **44. ábra, 10. táblázat**).

Az illesztett egyenes tengelymetszetéből az entalpiához hasonló módon kiszámítható az aktivációs entrópia ($\Delta S_{\text{on}}^{\ddagger}$) is. Ezt nagyobb elméleti és mérési bizonytalansága miatt azonban nem tettem meg.

6.2.3.2. Az aktomiozin disszociáció kinetikájának hőmérséklet-függése

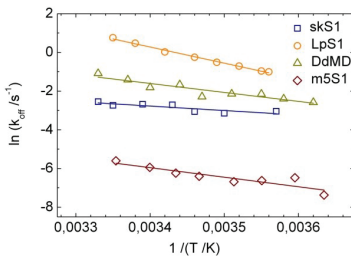
Az aktin disszociációjának sebességi állandóját (k_{off}), illetve annak hőmérséklet-függését leszorításos (*chasing*) kísérletekkel határoztam meg: 0,5 μM pirén-aktomiozin (P.A.M) komplexet kevertem össze 5 μM jelöletlen aktinnal az előbbi módon. A kapott k_{off} értékeket az aktinkötéshez hasonlóan ábrázoltam és az aktivációs entalpiát kiszámoltam ($\Delta H_{\text{off}}^{\ddagger}$, **45. ábra, 10. táblázat**).

A m5S1 esetében a lassabb reakció miatt (egy tranzienst lefutása mintegy 2000 s) e mérést fluoriméteren végeztem, nem a *stopped-flow* készüléken; továbbá az alkalmazott koncentrációk 0,2 μM P.A.M és 5 μM aktin voltak.



44. ábra: A vizsgált miozin izoformák PA-kötési kinetikájának hőmérséklet-függése.

A másodrendű kötési sebességi állandók (k_{on}) Arrhenius-ábrázolása (lásd a **Függelék 13.5 fejezetében**) megadta az aktinkötés aktivációs entalpiáját ($\Delta H_{\text{on}}^{\ddagger}$, **10. táblázat**). A két párhuzamos egyikét ábrázoltam; a kapott $\Delta H_{\text{on}}^{\ddagger}$ (kJmol^{-1}) értékek itt 71 (skS1), 37 (LpS1), 18 (DdMD) és 30 (m5S1) voltak. A jelölések leírását lásd a **41. ábránál**.



45. ábra: A 'P.A.M.' disszociáció kinetikájának hőmérséklet-függése a különböző miozin izoformákon.

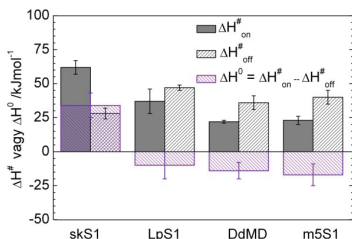
A megfigyelt sebességi állandók (k_{off}) Arrhenius-ábrázolása (lásd a **Függelék 13.5 fejezetében**) megadta az aktin disszociáció aktivációs entalpiáját ($\Delta H_{\text{off}}^{\ddagger}$, **10. táblázat**). A két párhuzamos mérést egyikét ábrázoltam; a kapott $\Delta H_{\text{off}}^{\ddagger}$ (kJmol^{-1}) értékek itt 19 (skS1), 69 (LpS1), 39 (DdMD) és 41 (m5S1) voltak. A jelölések leírását lásd a **41. ábránál**.

6.2.3.3. Az aktomiozin interakció energetikája nukleotid távollétében

Az skS1 aktinkötésének aktivációs entalpiája ($\Delta H_{\text{on}}^{\ddagger}$) sokkal nagyobb volt, mint a másik három izoformának. Az aktin disszociációjának aktivációs entalpiájára ($\Delta H_{\text{off}}^{\ddagger}$) ezzel ellentétben sokkal alacsonyabb értéket kaptunk, mint a másik három izoforma esetén. Ezekből az értékekből kiszámítható az aktinkötés standard entalpiaváltozása:

$$\Delta H^0 = \Delta H_{\text{on}}^{\ddagger} - \Delta H_{\text{off}}^{\ddagger} \quad \text{2. egyenlet}$$

Az előbbiektől szerint a ΔH^0 a gerinces miozinra jóval nagyobb érték, mint a többi vizsgált miozin esetében. Az skS1 – a korábbi adatokkal összhangban – endoterm aktinkötést mutatott, a három másik izoforma aktinkötése ellenben gyengén exoterm folyamatnak bizonyult (46. ábra, 10. táblázat). Ezen eredmény megerősítésére a két alábbi független kísérletet végeztük el.



46. ábra: Az aktinkötés standard entalpiaváltozása.

A 44-45. ábrán bemutatott kísérletek során kapott entalpia-változásokat (teli szürke oszlopok – $\Delta H_{\text{on}}^{\ddagger}$ és csíkozott oszlopok – $\Delta H_{\text{off}}^{\ddagger}$) és az ezekből számolt standard entalpia-változásokat (ΔH^0 , lila oszlopok) ábrázoltam (10. táblázat).

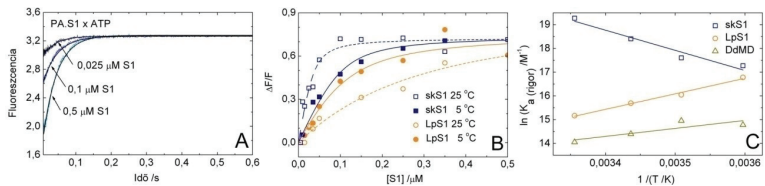
6.2.4. Az exoterm és endoterm aktinkötés igazolása fluoreszcencia-mérési egyensúlyi titrálásokkal

A miozinok aktinkötésének egyensúlyi állandóit megállított áramlós egyensúlyi titrálásokkal határoztuk meg Kurzawa és Geeves szerint (105) 5, 12, 18 és 25 °C-on. 0,1 μM pirén-aktint inkubáltam különböző koncentrációjú miozinnal 0,1 unit/ml apiráz jelenlétében 30 percig szobahőmérsékleten. Ezután e mintákat a *stopped-flow* műszerben 20 μM ATP-vel kevertem össze (keverés előtti koncentrációk), ami teljesen disszociálta a 'PA.M' komplexet (47. a ábra). A kapott tranziensekre exponenciális függvényt illesztettem. E kísérletet m5S1-gyel nem végeztem el, annak nukleotid távollétében lévő extrém magas aktin affinitása miatt (30).

Az ATP-indukált PA-fluoreszcenciaváltozás amplitúdója megmutatja a PA-kötött miozin arányát. Az amplitúdó-változásokat (ΔAmp) normalizáltam (a sémát lásd a

Függelék 13.5 fejezetében), hogy kiküszöböljem a lámpa esetleges intenzitás-változásaiból származó hibát. A normalizált amplitúdókat a miozin keverés előtti (*pre-mix*) koncentrációjának függvényében ábrázoltam, az adatokra másodfokú függvényt illeszttem (**47. b ábra**; a függvényt lásd a **Függelék 13.6 fejezetében**).

A kapott egyensúlyi állandókat van't Hoff szerint ábrázolva látható, hogy az skS1 asszociációs állandója a hőmérséklet emelésével nőtt, a másik két izoformáé ellenben csökkent (**47. c ábra**). Tehát az egyensúlyi titrálások igazolták a fenti eredményeinket: az LpS1 és a DdMD gyengén exoterm aktinkötést mutat az skS1 endoterm aktinkötő folyamatával ellentétben (**10. táblázat**).



47. ábra: A vizsgált miozin izoformák aktin affinitásának meghatározása egyensúlyi titrálásokkal.

a) SF-görbék 0,1 μM PA és a jelzett koncentrációjú skS1 keverékének 20 μM ATP-vel való összekeverésekor (keverés előtti koncentrációk) 25 °C-on. Mindegyik tranzienst 10-15 párhuzamos görbe átlaga, a sötétedő színek az emelkedő S1-koncentrációt jelzik. A tranziensekre egyszeres exponenciáliszt illeszttem, a megfigyelt amplitúdók itt 0,324 (0,025 μM); 0,760 (0,1 μM); és 1,743 (0,5 μM) voltak.

b) A normalizált amplitúdók (a normalizálás módját lásd a **Függelék 13.5 fejezetében**) az S1 keverés előtti koncentrációjának függvényében az skS1 és az LpS1 esetén 25 °C-on (üres jelek) és 5 °C-on (teli jelek). Az adatokra másodfokú függvényt illeszttem (az egyenletet lásd a **Függelék 13.6 fejezetében**); $s = 0$ értéket rögzítettem), ami megadta a PA-kötés egyensúlyi állandóját. Ez az ábrázolt mérésre: 28 nM (skS1, 5°C), 5 nM (skS1, 25°C), 42 nM (LpS1, 5°C), és 230 nM (LpS1, 25°C) volt.

c) A kapott egyensúlyi állandókat van't Hoff szerint ($\ln K_a = -\Delta H^0/R \cdot 1/T + \Delta S^0/R$) ábrázoltam. Az illesztett egyenesek az alábbi standard entalpia- (ΔH^0 , kJmol⁻¹) és standard entrópia-változásokat (ΔS^0 ; JK⁻¹mol⁻¹) eredményezték: 71 és 400 (skS1); -52 és -60 (LpS1); -28 és 24 (DdMD).

Mindegyik panelen a három párhuzamos mérés egyikét ábrázoltam, az összes mérés eredményének átlaga a **10. táblázatban** látható. A b) és c) panelen a jelölés a **41. ábrával** megegyező.

Az egyensúlyi titrálásokból és a tranzienst kinetikai mérésekből eltérő ΔH^0 értékeket kaptunk; a legnagyobb különbséget az LpS1 esetén tapasztaltuk (**10. táblázat**). Ezt a különbséget valószínűleg a ΔH^0 meghatározására alkalmazott két különböző módszer –

az Arrhenius-görbék meredekségének különbsége (**44-45. ábra**), illetve az egyensúlyi adatokra illesztett másodfokú függvény (**47. b ábra**) – eltérő hibája okozza. Ugyanakkor az skS1 és a másik három izoforma eltérő energetikai profilja e bizonytalanság ellenére is kiténik.

6.2.5. Az exoterm és endoterm aktinkötés megerősítése kalorimetriával

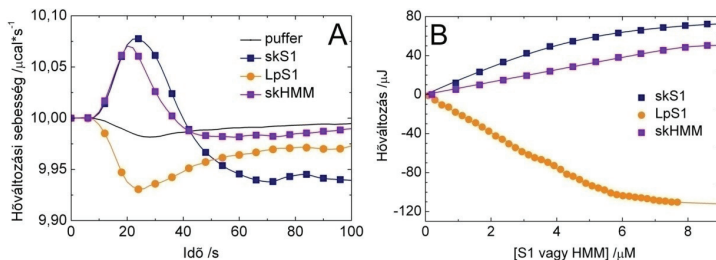
Az skS1 és LpS1 aktinkötése során elnyelődő vagy felszabaduló hőt direkt módon izotermális titrációs kalorimetriával (ITC) mértük Dr. Kardos József útmutatásával. Az ITC műszer egy referencia- és egy mintacellát tartalmaz (**19. ábra**). A mintacellába tett aktint titráltuk a miozin mintákkal, a kontroll méréseknél pufferral titráltuk az aktint, miozinnal a puffert, illetve pufferral a puffert. A kísérletek során azt a hőmennyiséget detektáltuk, amennyivel az aktuális időpillanatban a mintacellát fűteni kell, hogy a hőmérséklete megegyezzen a referencia-celláéval.

SkS1, valamint skHMM aktinhoz való hozzáadásakor egy gyors hőelnyelő fázis figyelhetünk meg, a várt endoterm reakciónak megfelelően. Az LpS1-nél ez a hőelnyelés nem volt jelen, helyette egy gyors hőfelszabadulási fázis látszott, ami exoterm reakciót jelez (**48. a ábra**). Korábban megállapították, hogy a gyors fázisban mért hőváltozás gyakorlatilag az aktinkötés entalpiájával egyenlő (55). Mindhárom titrálásnál megjelent azonban egy lassú hőváltozással járó második fázis is (**48. a ábra**) (55). Ez az aktin szerkezetében az S1, illetve HMM hatására bekövetkező lassú változásnak tulajdonítható („kötegelődés” – *bundling*). A lassú fázis megjelenése megnehezíti a miozin aktinkötése során bekövetkező specifikus hőváltozás pontos meghatározását, azonban azt jól mutatják a kísérletek, hogy az entalpiaváltozás LpS1-ben hasonló nagyságrendű, de ellentétes előjelű, mint skS1-ben.

A titrálás során az egymást követő hozzáadásokból származó hőváltozásokat a detektált „hőváltozási sebesség” görbe integrálásával számítottuk. A kapott értékeket összeadtuk és a miozin koncentrációjának függvényében ábrázoltuk, majd másodfokú függvényt illesztettünk rá (**48. b ábra**). Az illesztés paramétereit a **11. táblázat** tartalmazza. A számolt ΔH^0 értékek az irodalomban korábban szereplő (55), és a fluoreszcens méréseinkből származó adatoknál ugyan alacsonyabbak, de a megfigyelt tendencia az eddigi eredményekkel összhangban van (**10. táblázat**). Az észlelt

különbég valószínűleg annak a következménye, hogy a lassú fázis is hozzájárul az aktinkötés során történő hőváltozáshoz.

Nagy anyagigénye miatt e kísérletet a rekombináns miozin konstrukciókkal – DdMD és m5S1 mintával – nem végeztük el.



48. ábra: Az aktinkötés során fellépő hőváltozás mérése kalorimetriával.

a) Egy hozzáadás során kapott hőváltozás a kaloriméteren. 5 μM F-aktinhoz miozinmentes puffert (fekete vonal); 0,73 μM skS1-et (■); 0,73 μM skHMM-et (■) illetve 0,20 μM LpS1-et (●) adtunk.

b) Egy titrálás során mért entalpia-változás a miozin 2 izoformákon. A titrálás során egymást követő hozzáadásokból származó hőváltozásokat összeadtuk és a miozin koncentrációjának függvényében ábrázoltuk, majd másodfokú függvényt (az egyenletet lásd a **Függelék 13.6 fejezetében**; $s = 0$ értéket rögzítettük) illesztettünk rá (**11. táblázat**).

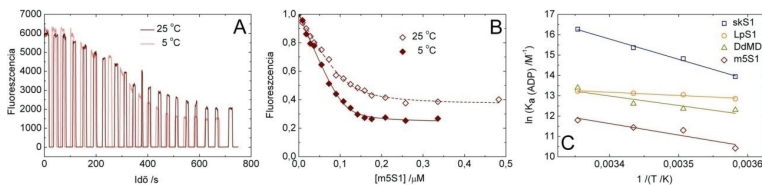
A két párhuzamos mérés egyikét ábrázoltam.

6.2.6. Az aktomiozin interakciót az ADP jelenléte entalpiikusan kedvezőtlenebb irányba tolja el

A fluoreszcencia-mérések egyensúlyi titrálásokat (**47. ábra**) 1 mM ADP mellett is megisméltük, hogy lássuk, e nukleotid jelenléte hogyan befolyásolja az erős aktomiozin komplex kialakulásának energetikáját. A méréseket kétféle módon is elvégeztem. A *stopped-flow* műszerben az ADP-mentes méréshez (**47. a ábra**) hasonlóan jártam el: a szobahőmérsékleten előre inkubált; 0,4 μM PA-t, különböző koncentrációjú miozint és 1 mM ADP-t tartalmazó 'PA.M.D' komplexet kevertem össze 100 μM ATP-vel (keverés előtti koncentrációk) (105). A fluoriméterben a 0,1 μM PA-t és 1 mM ADP-t tartalmazó mintát titráltam miozinnal (**49. a ábra**) (106).

Az exponenciális illesztésekből származó amplitúdókat (*stopped-flow*), illetve a titrálások során kapott és normalizált fluoreszcencia-szinteket (fluoriméter) a miozin

koncentrációjának függvényében ábrázoltuk és az adatokra másodfokú függvényt illesztettünk (**49. b ábra**). Az ezekből származó egyensúlyi állandók van't Hoff ábrázolása azt mutatja, hogy a nukleotid jelenléte a miozinok aktinkötését endoterm irányba tolja el (a ΔH^0 értéke 40-50 kJ/mol-lal nagyobb, mint a nukleotidmentes miozinminták esetén) (**49. c ábra, 10. táblázat**).



49. ábra: A 'M.ADP' komplex aktin affinitásának meghatározása egyensúlyi titrálásokkal.

a) Titrálási görbék a fluoriméteren. A 0,1 μM PA-t és 1 mM ADP-t tartalmazó mintát m5S1-gyel titrálom 5 °C-on (rózsaszín) és 25 °C-on (vörös). A görbe alakja abból származik, hogy a fluoriméter rését csak az egyes hozzáadások után néhány másodpercre nyitottam ki, a *photobleaching* elkerülésére. A mért fluoreszcencia-értékek nagyságrendje azért ekkora, mert a detektálást 's&r' (*sample & reference*) módban végeztem.

b) A m5S1 normalizált fluoreszcencia-szintjei a miozin koncentrációjának függvényében 25 °C-on (üres jelek) és 5 °C-on (teli jelek). A mért fluoreszcenciákat az oldat hígulásával korrigáltam, a miozinmentes PA értékére normalizáltam és az adatokra másodfokú függvényt illesztettem (az egyenletet lásd a **Függelék 13.6 fejezetében**; $s = 1$ értéket rögzítettem). Ez megadta a PA-kötés egyensúlyi állandóját, mely az ábrázolt mérésre: 10 nM (5 °C) és 4 nM (25°C).

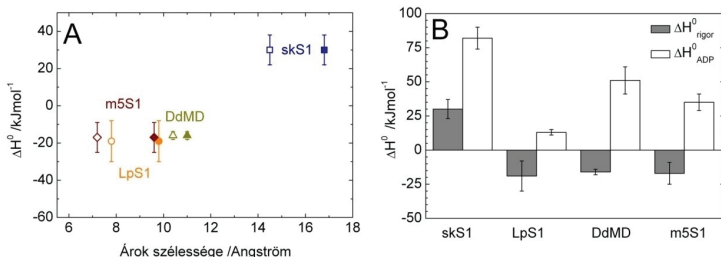
c) A fluoriméteren vagy *stopped-flow* készüléken végzett titrálásokkal kapott egyensúlyi állandók van't Hoff-ábrázolása. Az illesztett egyenesek az alábbi standard entalpia- (ΔH^0 , kJmol⁻¹) és entropiaváltozásokat (ΔS^0 , JK⁻¹mol⁻¹) eredményezték: 83 és 400 (skS1); 12 és 150 (LpS1); 39 és 240 (DdMD); 47 és 260 (m5S1). Az izoformák jelölése a **41. ábrával** megegyező.

Mindegyik panelen a három párhuzamos mérés egyikét ábrázoltam, az összes mérés eredményének átlaga a **10. táblázatban** látható.

6.2.7. Az aktinkötés termodinamikai paramétereinek összefoglalása

A következő ábrákon összefoglaltam a kísérleteinkből származó eredményeket. Az elsőt a vizsgált miozinok szerkezeti és energetikai paramétereinek összevetése látható (**50. ábra**). A második a saját kísérleteinkből származó és az irodalomban talált

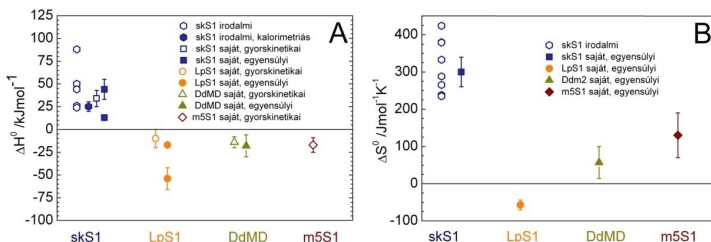
eredményeket tartalmazza a négy miozin izoformáról. Eredményeink összhangban állnak egymással és az irodalomban fellelhető adatokkal (**51. ábra**).



50. ábra: A vizsgált miozin izoformák szerkezeti és energetikai paramétereinek összevetése.

a) A belső (teli jelek) és külső árok (nyitott jelek) szélességének, és az aktinkötés mért standard entalpia-változásának (ΔH°) összefüggése. Az árok szélességét (lásd **20. ábra**) a miozin S1 vagy MD konstrukciók aktin és nukleotid távollétében meghatározott (*rigor*-szerű) kristályszerkezete alapján számítottuk (skS1 – 2MYS; LpS1 – 3I5G; DdMD – 2AKA; m5S1 – 1OE9; lásd **12-13. táblázat**). A ΔH° értékként az összes mérésből származó érték átlagát ábrázoltam. Az izoformák jelölése a **41. ábrával** megegyező.

b) Az aktinkötés standard entalpia-változása a nukleotidmentes (*rigor*-szerű, szürke oszlopok) és az ADP-kötött (*poszt-rigor*, fehér oszlopok) miozin izoformákban.



51. ábra: Az általunk mért és az irodalomban korábban leírt termodinamikai paraméterek összefoglalása.

a) A vizsgált izoformák standard entalpia-változása.

b) A vizsgált izoformák standard entrópia-változása.

A saját méréseinknél a **41. ábránál** leírt jelölést alkalmaztam; továbbá a gyorskinetikai mérésekből származó eredményeket üres, az egyensúlyi titrálásos (kalorimetriás és PA-fluoreszcenciás) adatokat teli jellel ábrázoltam; az skS1 irodalomban korábban leírt adatait hatszöggel jeleztem, a kalorimetriás eredményeket (55) teli, a kinetikai adatokat (52,53,99,100) üres hatszöggel.

6.2.8. Az aktinkötő árok két oldala közti kötés energetikája

A kísérletekben meghatározott energetikai paraméterek szerkezeti alapjának meghatározására Dr. Hetényi Csaba kalkulációkat végzett a vizsgált izoformák *rigor*-szerű (zárt árkú) és *poszt-rigor* (nyitott árkú) atomi szerkezetein. Az skS1-gyel a hiányzó *rigor*-szerű szerkezet miatt e kalkulációt nem végezte el. A kölcsönható felszín meghatározására a miozinfejet az az aktinkötő árok egymással szemközti két oldalára osztotta, melyeket a *switch-2* hurok választ el (**20. ábra**, a módszert részletesen lásd az **5.3.8.1. fejezetben**). A két oldal közti kölcsönhatás energiájához (E_{kh}) hozzájáruló paraméterek vizsgálatára olyan módszert használt, melyet fehérje-fehérje interakciók kötési szabadenergiájának kiszámítására ajánlanak (89,90,107).

$$E_{kh} = \Delta E_{\text{elektrosztatikus}} + \Delta G_{\text{deszolvációs}} - T\Delta S_{\text{konfigurációs}} \quad \mathbf{3. \text{ egyenlet}}$$

Itt $\Delta E_{\text{elektrosztatikus}}$ az elektrosztatikus kölcsönhatás energiájának változása, $\Delta G_{\text{deszolvációs}}$ a deszolvációs szabadenergia változása, $T\Delta S_{\text{konfigurációs}}$ a konfigurációs entrópia változása. $\Delta E_{\text{elektrosztatikus}}$ entalpiikus tagnak tekinthető (108). $\Delta G_{\text{deszolvációs}}$ a deszolvációs entalpiikus és entrópiikus hozzájárulását is tartalmazza. Ha a két felület hidrofób aminosavai közt kapcsolatok alakulnak ki, akkor értéke negatív (a deszolvációs energetikailag kedvezőbb). $T\Delta S_{\text{konfigurációs}}$ entrópiikus tag, mely azonos kötőpartnerek esetén (itt: ugyanannak a miozin izoformának a különböző szerkezeteinél) a másik két taghoz képest elhanyagolhatóan tekinthető. Így $\Delta E_{\text{elektrosztatikus}}$ és $\Delta G_{\text{deszolvációs}}$ meghatározásával kiszámolta a kötési szabadenergia különbségét az LpS1, DdMD és mS1 *rigor*-szerű és *poszt-rigor* szerkezete közt:

$$\Delta E_{kh} = E_{kh}(\text{rigor-szerű}) - E_{kh}(\text{poszt-rigor}) \quad \mathbf{4. \text{ egyenlet}}$$

Itt E_{kh} értéke csupán az árok két oldala közti (potenciális) kölcsönhatás energiájának mérőszáma az egyes izoformákban, nem az árok bezárásához vezető konformáció-változások energetikáját jellemzi. (A módszer eredeti leírásában a kiszámolt energiaértékeket ΔG -ként jelölték (89,90)).

A kalkulált eredményeket a **12. táblázat** tartalmazza, ezek alapján az alábbi megfigyelések tehetők:

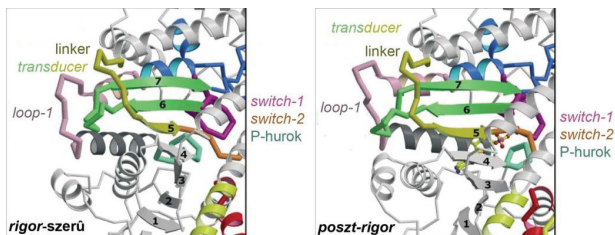
- 1) Az árok két felülete közti kötés az elektrosztatikus kölcsönhatások révén entalpiikusan kedvező ($\Delta\Delta E_{\text{elektrosztatikus}}$ értéke negatív).

- 2) A két felület közti kötés sokkal kedvezőbb *rigor*-szerű, mint *poszt-rigor* konformációban, mert ΔE_{kh} értéke negatív.
- 3) A ΔE_{kh} abszolútértéke és a kötés kedvező volta az alábbi sorrendben nő: LpS1 < DdMD < m5S1.
- 4) A ΔE_{kh} mindegyik izoforma esetén tartalmaz elektrosztatikus és deszolvációs hozzájárulást is.
- 5) A $\Delta G_{\text{deszolvációs}}$ negatív értéke a két felület közti hidrofób kölcsönhatásokra utal.

A fenti számítások kizárólag miozin szerkezetek felhasználásával készültek, az aktinkötés bevonása nélkül. Így az itt kapott értékek sem tartalmaznak az aktomiozin kötőfelszín kialakulásából származó entalpiikus hozzájárulást. Az aktin-miozin kölcsönhatás valószínűleg tovább árnyalja a miozin izoformák közt az aktinkötés ΔH^0 értékében megfigyelt eltéréseket (10. táblázat).

6.2.9. A 'transducer' becsült torziós szöge hasonló az egyes izoformákban

A miozin motordomén magjában található egy hétszálú β -lemez, ami a felső 50 kDa szubdomént és az N-terminális szubdomént köti össze. Ez valószínűleg szerepet játszik a motordomén nukleotid- és aktinkötő helye közti allosztérikus kommunikációban, torziós szögének változásai által (56,83). A β -lemez utolsó három szálát és a hozzá kapcsolódó elemeket ezért „transducer”-nek nevezték el (52. ábra).



52. ábra: A *transducer* helyzete a miozinban Coureaux és mtsai (83) szerint.

A *transducer* a motor domén magjában lévő, a nukleotidkötő helyhez közel eső hétszálú β -lemez utolsó három (5-7) szála (és az azzal együtt mozgó elemek, így a *loop-1*), mely az ábrázolt két állapot közt torziót szenved.

A *transducer*-t „csavart” (*twisted*) konformációban azonosították *rigor*-szerű és „részben kitekert” (*partially untwisted*) konformációban *poszt-rigor* állapotban. Arra voltunk kíváncsiak, hogy az egyes miozinok aktinkötésének különböző energetikai profilja származhat-e a *transducer* eltérő mértékű kitekeredéséből (*untwisting*). Ezért kollaborátorunk, Dr. Hetényi Csaba kiszámolta a *transducer* kitekeredésének $\Delta\varphi$ szögét, amely a miozinok *rigor*-szerű állapotából a *poszt-rigor*ba történő átmenete, illetve ezzel együtt az árok kinyílása során történik.

A kapott értékek a **13. táblázatban** láthatók. A számítások szerint a $\Delta\varphi$ szög nagyon hasonló volt mind a négy vizsgált miozin esetén. Bár az skS1 *rigor*-szerű atomi szerkezete nincs megoldva és így az izoforma $\Delta\varphi$ szöge eltérő lehet, a másik három vizsgált miozin bármelyikének értékét alkalmazva szintén hasonló értéket kaptunk. Ez összhangban áll azzal a korábbi leírással, hogy a mS1 *rigor*-szerű röntgenszerkezete deformáció nélkül beilleszthető az akto-skS1 *rigor* komplex krio-elektronmikroszkópos „borítékába” (50). A fenti eredmények szerint a miozin izoformák eltérő energetikája nem a *transducer* különböző mértékű kitekeredéséből ered.

Érdekes, de még eldöntetlen az a kérdés, hogy a *rigor*-szerű (csavart) vagy a *poszt-rigor* (kitekert) konformáció φ szöge jelenti-e a *transducer* mechanikailag relaxált(abb) állapotát. A ΔE_{kh} érték negatív, vagyis az árok záródása termodinamikailag kedvezőbb. Az árok két szemközti felülete közti kötési interakciónak is köszönhetően (**12. táblázat**) a kitekeredés szabadenergia-változása ($\Delta G_{\text{kitekert}}$) legalább részben fedezi a kedvező interakciók felbomlásának szabadenergia-költségét, ami az árok kinyílásakor következik be (a *rigor*-szerű – *poszt-rigor* átmenet során).

7. Az eredmények megbeszélése

7.1. Az erőgeneráló lépés kezdőállapota

Munkánk során kimutattuk, hogy a miozin 2 molekulák az ATPáz ciklus során blebbistatin-kötés hatására zárt *switch-1* és zárt *switch-2* hurokkal bíró, vagyis gyenge aktinkötő, felhúzott erőkarú *pre-powerstroke* állapotot vesznek fel, a korábbi megfigyelésekkel összhangban (61,63,64). Ugyanakkor arra az új eredményre jutottunk, hogy a miozin 2 fejek többsége ATP nélkül és ADP jelenlétében blebbistatin-kötés hatására zárt *switch-2* hurokkal bíró, felhúzott erőkarú *pre-powerstroke* szerkezetben van jelen (**23**, **26**. és **36. ábra**). Ez az állapot azonban megőrzi a *switch-1* hurok egyensúlyát és így a 'M.ADP' komplexre jellemző magas aktin affinitását (**28**, **32-33**. és **38. ábra**). A fluoreszcens méréseken túl a 'M.ADP.B' komplex felhúzott erőkarú szerkezetét elektronmikroszkópos felvételekkel (**27. ábra**), magas aktin affinitását koszedimentációs kísérletekkel erősítettük meg (**31**. és **35. ábra**). A 'M.ADP.B' (egyik lehetséges) szerkezete a komplex ezen tulajdonságai alapján nagyon hasonlít a normál (nem gátolt) ATPáz ciklus egy szükséges, de eddig le nem írt „*start-of-powerstroke*” köztiállapotához. Ez az erő kifejtő lépés kezdőállapota, ami rövid életideje miatt az inhibitor távollétében eddig nem volt ismert (51).

A ciklus során a miozin-termék komplex (M.ADP.P_i) visszaköt az aktin-filamentumhoz, ami a termékek felszabadulásához és az erő kifejtéshez (*powerstroke*) vezet. E lépések során gyenge aktinkötő (zárt *switch-1*, nyitott külső árok), felhúzott erőkarú, zárt *switch-2*-vel bíró (*pre-powerstroke*) szerkezetből erős aktinkötő (nyitott *switch-1*, zárt külső árok), lecsapott erőkarú (*rigor*) szerkezetbe megy át a miozinfej (40,84) (**8**. és **14. ábra**).

A jelen szerkezeti és spektroszkópiai információk alapján valószínűnek tűnik, hogy az erőgenerálás nem az ATP által előidézett szerkezeti változások (*recovery stroke*) fordítottjaként következik be (40,51). Az erő kifejtést inkább egy aktinkötött „*start-of-powerstroke*” 'M.ADP.P_i' állapoton át feltételezzük, amelyben az aktinkötő árok még zárva van, ugyanakkor az erőkar már fel van húzva. A *switch-2* zárva marad ezután az erőkar lecsapásakor, amikor az erő kifejtés megtörténik (**14. ábra**). A hidrolízis termékeinek felszabadulását a P-hurok egy konformáció-változása segíti elő, ami a

motordomén központi β -lemezésének „csavarodásához” (*transducer twist*) vezet (51). Így az erőgenerálási útvonalnak kikerülhetetlen része egy zárt *switch-2*-vel bíró, felhúzott erőkarú konformáció, amelyben a *switch-1* reverzibilis módon nyílhat (így a külső árkot bezárva) (51,95). Az itt bemutatott eredmények azt támasztják alá, hogy az általunk leírt M.ADP.blebbistatin komplex képezheti a “*start-of-powerstroke*” állapotot. A normál (nem-gátolt) ciklusban nehéz ilyen rövid életideje és kis gyakorisága miatt. A másik három alapvető miozin állapotról már rendelkezésre állnak szerkezetek, de a “*start-of-powerstroke*” köztiállapot szerkezete még hiányzik. Oldatban végzett kísérleteink azt mutatják, hogy ADP és blebbistatin mellett a “*start-of-powerstroke*” és a *pre-powerstroke* állapotok konformációs egyensúlyban vannak, ami a kristályosítást is befolyásolhatja (mint korábban a M.ADP.BeF_x komplex esetén (38)).

A dataink egybevágóan korábbi röntgendiffrakciós és elektronmikroszkópos eredményekkel. Zhao és mtsai leírták, hogy az ADP-kötött miozinfajok helikális rendeződést mutatnak blebbistatin hatására tarantulapók (*Theraphosidae* család) vastag filamentumaiban (109). A helikálisan rendezett állapotot a *pre-powerstroke* konformációnak feleltették meg (110). Xu és mtsai arra az eredményre jutottak, hogy túlnyújtott izomrostokon a blebbistatin a miozinfajok rendeződését okozza a „nem átlapoló” (csak miozint tartalmazó) szakaszokon; továbbá a rendezett állapotok gyakorisága jelentősen megnő különböző nukleotidok, köztük ADP mellett blebbistatin hozzáadására (111). Mi, ezzel a munkával ellentétben, nem tapasztaltunk konformáció-változást a nukleotidmentes miozinban blebbistatin hozzáadására (**39. b ábra**). E munkák is azt támasztják alá, hogy a blebbistatin a γ -foszfát kötőhely betöltött vagy betöltetlen állapotától függetlenül a miozint *pre-powerstroke* konformációba viszi. A blebbistatin által előidézett erőkar felhúzódadást, az aktívhely konformációját és a 'M.ADP.B' komplex aktinkötő sajátságait ugyanakkor mi írtuk le először.

7.2. Az aktinkötés energetikája

Az aktomiozin kölcsönhatás energetikai vizsgálataival korábban kimutatták, hogy a nukleotidmentes skS1 aktinkötése entrópia-hajtott, entrópiusan kedvezőtlen folyamat (52-55). A reakció energetikai viszonyainak szerkezeti alapját azonban még nem írták le részletesen. A kölcsönhatás endoterm természete meglepőnek tűnhet, hiszen nagy fehérje-fehérje kölcsönhatási felület jön létre az erős, magas affinitású aktinkötés során.

Munkánk során az skS1-et olyan miozin izoformákkal hasonlítottuk össze, amelyek feltételezhetően más szerkezeti és kinetikai úton kötik az aktint (24,30,56,84,112) (**40. b ábra**). Az egyes izoformák aktomiozin kölcsönhatásának összehasonlító vizsgálatával az alábbi új eredményekre jutottunk:

- 1) A vizsgált izoformák hasonló pirén-aktin fluoreszcencia-csökkenést mutattak, ami hasonló aktinkötő kölcsönhatási felületre utal (**41. ábra**).
- 2) Az skS1 endoterm aktinkötése egyedülálló a vizsgált izoformák közt (**46-48. és 50. ábra, 10. táblázat**).
- 3) Az aktinkötés energetikai profilja összefügg az árok – kristályszerkezetekben megfigyelt – záródásának mértékével az aktin távollétében. A zárt árokkal kristályosított LpS1, DdMD, m5S1 miozinok (24,40,56,84) aktinkötése az skS1-gyel ellentétben exoterm (**46-48. és 50. ábra, 10. táblázat**).
- 4) Az egyes miozinok aktinkötésének sebességi állandója és a kötés affinitása nem korrelál az aktinkötés energetikájával és az árok konformációjával (**10. táblázat**).
- 5) Az árok bezáródása közben a *transducer* torziójának kalkulált szöge igen hasonló az összes izoformában (**13. táblázat**), bár az skS1-nek nincs nagy felbontású *rigor*-szerű szerkezete.
- 6) Az ADP a miozinok aktinkötését endoterm irányba tolja el a nukleotidmentes állapothoz képest, a különbség mértéke hasonló nagyságrendű mindegyik izoforma esetében (**50. b ábra, 10. táblázat**).

A nukleotid-mentes, aktinról levált *apo* miozin nem része az aktomiozin mechanokémiai útvonalaknak, és az *apo* állapotú miozin feje nagy konformációs különbségeket mutathat. Korábban mégis úgy vélték, hogy az árok állapota az aktin távollétében ($K_{\text{zárt}}$) meghatározza az aktinkötés útvonalát (112). A négy vizsgált miozin izoforma közül egyedül az skS1-et kristályosították nyitott árokkal aktin és nukleotid távollétében (24). Ennek megfelelően mi egyedül az skS1 aktinkötésének kinetikájánál kaptunk telítést (**42. b ábra**), mely egy kétlépéses, „indukált illeszkedés” típusú aktinkötési mechanizmust jelez (**40. a ábra**) (96,97,99,100). Ennek a miozinnek az aktinkötési kinetikája a többihez képest nagyobb hőmérséklet-függést is mutat (**44. ábra, 10. táblázat** – magasabb $\Delta H_{\text{on}}^{\ddagger}$). Ez arra utal, hogy a szerkezeti átalakulás $K_{\text{A, zárt}}$ -tal jelzett sebességi állandójának (**40. a ábra**) a hőmérséklet-függése kifejezettebb az

asszociációs lépésekhez (K_{gyenge} ill. $K_{\text{erős}}$) képest. A többi vizsgált izoformában nem tudtuk megfigyelni az aktinkötés többlépéses voltát. Ez bonyolítja a pontos meghatározását az asszociációs és az árokszáródási lépéseknek az aktinkötés energetikájához való hozzájárulását.

A korábbi sejtésekkel ellentétben mi azt tapasztaltuk, hogy az árok záródása az aktin távollétében ($K_{\text{zárt}}$) nem szabja meg direkt módon sem az aktinkötés affinitását, sem a másodrendű aktinkötési sebességi állandó nagyságrendjét (**10. táblázat**). Bár a $K_{\text{zárt}}$ egyensúlyi állandó nem határozható meg közvetlenül, a szerkezeti adatok és energetikai számításaink (**12. táblázat**) azt jelzik, hogy az egyensúly a zárt állapot felé van eltolva LpS1, DdMD és m5S1; ellenben a nyitott állapot felé skS1 esetében. Eredményeink szerint a nulla ionerősségre extrapolált másodrendű aktinkötési sebességi állandó skS1, LpS1 és m5S1 esetében nagyon hasonló, egy tisztán diffúzió-limitált reakció nagyságrendjéhez van közel (103,104) (**43. ábra, 10. táblázat**). Ez az skS1 a másik két miozintól eltérő aktinkötő mechanizmusa – telítési kinetika (**42. b ábra**); magasabb hőmérséklet-függés (**44. ábra**); kétlépéses, szerkezeti átalakulással járó aktinkötés (96,100) – ellenére is igaz. Ez az eredmény, nevezetesen hogy az aktinkötő árokszáródása és az aktin affinitás nem korrelál (**10. táblázat**), azt sugallja, hogy a különböző miozinok nemcsak a $K_{\text{zárt}}$ egyensúlyi állandóban, hanem a gyenge vagy erős aktinkötő állapotok affinitásában (K_{gyenge} ill. $K_{\text{erős}}$) is változatosságot mutatnak. A m5S1 rendkívül magas aktin affinitása (30) valószínűleg – legalábbis részben – annak köszönhető, hogy hosszabb és pozitívabb töltésű *loop-2* hurokkal bír (113), amit alátámaszt a *loop-2* m5S1 mutáns konstrukciók megváltozott aktin affinitása 'M.ADP' állapotban (113). Nemrég kimutatták azt is, hogy a m5S1 és az skS1 nukleotidmentes állapotban különböző módon befolyásolja az F-aktin kooperativitását és intrafilamentáris mozgásait (114).

A DdMD érdekes módon nagyjából 2 nagyságrenddel alacsonyabb aktinkötési sebességi állandókat mutatott, zéró ionerősségre extrapolálva is (**43. ábra**). Így ennek az izoformának a lassú aktinkötése nem tulajdonítható kizárólag az aktinfilamentumokhoz való gyengébb elektrosztatikus vonzásának. Mi a Dd miozin motordomén (DdMD) konstrukcióit alkalmaztuk, nem DdS1 fragmentumot e munkában. Korábban a DdS1 és a DdMD aktin affinitását hasonlóan találták (70,115). A DdS1 másodrendű aktinkötési sebességi állandóját (k_{on}) nem mérték meg, de DdMD-szerű konstrukciók sorozatának vizsgálata szerint a k_{on} értéke nem függött a DdMD csonkolásának helyétől (más szóval a

konstrukció méretétől) (70). A DdS1 továbbá minden enzimatis lépésben az skS1-nél lassabb kinetikájúnak bizonyult (70,115); hasonlóan a nem-izom miozin izoformákhoz (79,116). A DdMD – a többi vizsgált izoformához képesti – lassabb aktinkötési kinetikája valószínűleg a *Dictyostelium* miozin 2 izoforma-specifikus jelensége, mely a sejtben betöltött szerepéhez való alkalmazkodásnak és nem az erőkar hiányának a következménye.

Eredményeink azt mutatják, hogy az skS1 aktinkötése (a késsel jelzett útvonal a **40. ábrán**) magában foglal egy lépést, amikor az árok bezáródik (K_A , zárt), a többi izoforma közvetlen aktinkötése ($K_{erős}$) során ellenben ez a szerkezeti változás nem következik be. Az összefüggés ezen útvonal és az entalpiaváltozás között (pozitív ΔH^0 az skS1-nél, negatív ΔH^0 a többi izoformánál; **46. és 50. ábra, 10. táblázat**) azt jelzi, hogy az árok bezáródása entalpiikusan kedvezőtlen folyamat. Ez a kedvezőtlen (pozitív) entalpiahozzájárulás származhat az elektrosztatikus kölcsönhatások megszűnéséből (az árok záródása során a vízmolekulák kizáródása miatt) és/vagy a motordomén belső átrendeződéséből. Az energetikai számításaink szerint a *poszt-rigor* – *rigor*-szerű konformációs átmenet nagy kedvező (negatív) elektrosztatikus hozzájárulással bír, mely az árok két felülete közti kölcsönhatásokból származik (**12. táblázat**). Ezt a nagy kedvező hozzájárulást nem valószínű, hogy a vízmolekulák átrendeződése által a kölcsönhatások megszűnése felülmúlná. Az endoterm komponens így valószínűleg a motordomén belső szerkezeti változásaiból származik. Ezt a következtetést támasztja alá az is, hogy az aktinkötés során bekövetkező izomerizációs lépés egyensúlyi állandója (K_A , zárt) endotermnek bizonyult korábban (99,100). A motordomén belső átrendeződésétől eltekintve az aktin és miozin kölcsönhatásai valószínűleg hozzájárulnak a különböző miozin izoformák aktinkötésének ΔH^0 értékében megfigyelt különbségekhez (**10. táblázat**).

A nyitott árokkal bíró (*poszt-rigor*, ADP-ben az aktinkötés előtt található meg) szerkezetből a zárt árokkal bíróba (*rigor*-szerű, nukleotid távollétében található meg) való átmenet entalpiikus költsége valószínűleg szintén hozzájárul az ADP-kötött és nukleotidmentes miozin pozitív (kedvezőtlen) entalpiikus különbségéhez ($\Delta\Delta H^0$ a **10. táblázatban, 50. b ábra**). A $\Delta\Delta H^0$ értékeket a teljes aktinkötő folyamatra az aktinkötő árok záródásának irányában definiáltuk:

$$\Delta\Delta H^0 = \Delta H^0_{\text{ADP-kötött}} - \Delta H^0_{\text{nukleotidmentes}}$$

5. egyenlet

Itt $\Delta H^0_{\text{ADP-kötött}}$ tartalmazza az árok bezáródását és az aktinkötést ($K_{\text{zárt}}$ és $K_{\text{erős}}$ a **40. a ábrán**), $\Delta H^0_{\text{nukleotidmentes}}$ pedig főleg az aktinkötési lépést ($K_{\text{erős}}$ a **40. a ábrán**). A $\Delta\Delta E_{\text{elektrosztatikus}}$ és $\Delta\Delta G_{\text{árok}}$ (**12. táblázat**) paramétereiket ellenben a zárt (*rigor*-szerű) és nyitott (*poszt-rigor*) árokkal bíró állapotok közti különbségként, az aktin távollétében határoztuk meg ($K_{\text{zárt}}$ a **40. a ábrán**). A $\Delta\Delta H^0$ értékei nagyon hasonlóak voltak minden izoformára, az skS1-re is, jelezve, hogy ezt nem egyenlítheti ki az árok bezáródásának entalpiikus „költsége”. Azonban ennek nagy eltérése a kedvező (negatív) $\Delta\Delta E_{\text{elektrosztatikus}}$ értékétől (**12. táblázat**) utal a motordomén belső szerkezeti átrendeződésének entalpiikus „költségére”. A jelenleg ismert szerkezetek alapján az árok záródásának entalpiikus költségét (vagy annak egy részét) a motordomén központi β -lemezőnek megnövekvő torziós feszültségének tulajdonítják. Ennek a β -lemezőnek (*transducer*, **52. ábra**) a szomszédos szerkezeti elemekkel együtt valószínűleg szerepe van az energia-transzdukcióban a motordomén aktin- és nukleotid-affinitásának kapcsolása által (50,51,56).

A bemutatott eredmények alapján úgy gondoljuk, hogy a „teljesen kitekert” *transducer* konformáció, mely a zárt árkú (*rigor*-szerű) állapot jellemzője, mechanikailag feszítettebb, mint a „részben kitekert” konformáció a nyitott árkú (*poszt-rigor*) állapotban. Vagyis a miozinfjében belső feszültség ébred az árok bezárásakor az aktin-filamentummal való pontos térbeli komplementaritás kialakítása érdekében. Az általunk vizsgált izoformák mindegyikében hasonló mértékű a *transducer* torziós szögének változása (**13. táblázat**). Ez azt erősíti meg, hogy e torzió szükséges az erőgeneráláshoz, ugyanakkor nem magyarázhatja a kapott energetikai különbségeket.

8. Konklúzió és kitekintés

A blebbistatinnal végzett vizsgálataink fontos információt szolgáltatottak a miozin ATPáz ciklusáról. Felhúzott erőkarú miozin eddig csak ATP, vagy más, a γ -foszfát kötőhelyet betöltő ligandum esetében volt ismert. A kimutatott intermedier vélhetően az erő kifejtő lépés kezdőállapota. Eszerint az erős aktinkötés létrejötte váltja ki az erő kifejtő lépést. Az erős aktinkötés létrejötte során az aktinkötő ároknak be kell záródnia. Gerinces vázizom miozinban ez endoterm folyamat. Az aktin távollétében is zárt árokkal bíró *Loligo* és *Dictyostelium* miozin 2, valamint a miozin 5 aktinkötése ellenben exoterm. Az árok állapota így meghatározza az aktinkötés energetikáját, ezáltal az erőgeneráló lépést.

A „blebbistatin” szót begépelve a PubMed adatbázis körülbelül 250 cikket ad ki eredménynek. Ezen munkák többsége azonban csupán felhasználja a blebbistatint jelátviteli vagy élettani kutatásokban, nem a miozin szerkezetének vagy funkciójának feltárásában alkalmazza. Reméljük, hogy a fenti eredményeink alapján a blebbistatin, illetve az általunk tanulmányozott 'M.ADP.B' komplex, valamint ennek aktinkötött formája az aktomiozin ciklus és az erőgenerálás megértésében is rendkívül hasznos lehet. A mi munkánkból hiányzik az 'A.M.ADP.B' komplex szerkezeti (például elektronmikroszkópos) vizsgálata, ez egy lehetséges továbblépés a témában.

A miozin izoformák összehasonlító vizsgálatakor a $K_{zárt}$ egyensúlyi állandót szerettük volna meghatározni, hiszen korábban úgy vélték, ez meghatározza az aktinkötés affinitását és az aktinkötés sebességi állandóját. Ilyen összefüggést nem találtunk, csak az egyensúly (nyitott vagy zárt árkú állapot felé eltolt volta) és az aktinkötés energetikája között. Az aktinkötés, vagyis az árok bezáródása során feltételezhetően szerkezeti feszülés történik a miozin molekulában, mely a *transducer* torziójával jellemezhető. A *transducer* torziós szögének változása – számításaink szerint – hasonló a különböző miozin izoformákban. Érdekes lenne a *transducer* pontos mechanikai szerepét, feszülését kísérletes módon vagy *in silico* részletesebben is megvizsgálni.

9. Köszönetnyilvánítás

Doktorandusként előltött négy évemért és az ezen idő alatt kapott segítségért nekik tartozom köszönettel:

Családomnak.

Témavezetőmnek: Kovács Mihálynak, vagyis Stocinak, a Motor Enzimológia Csoport vezetőjének.

Labortársaimnak: a Gervai Judit, Gyimesi Máté, Harami Gábor, Jelinek Balázs, Kocsis Zsuzsa, Molnár Eszter, Nagy Niki, Sarankó Hajni és Sarlós Kata alkotta csapatnak.

A cikkeinkben szereplő kollaborátoroknak, névszerint: Neil Billington, Hetényi Csaba, Kardos József, Kintses Bálint, Peter J. Knight, Málnási-Csizmadia András, Elizabeth O’Neill-Hennessey és Andrew G. Szent-Györgyi.

A tanszék munkatársainak, elsősorban Hegyi György professzornak; Simon Zolinak, a Photoshop szakértőjének; Szász Ilona és Kurucz-Váradi Kati asszisztenseknek.

A tanszék vezetőinek: Gráf László professzornak és Nyitrai Lászlónak.

Barátaimnak, különösen: Marcinak a borokért; Bálintnak a biciklitúrákért; biológus évfolyamtársaimnak, névszerint Erikának, Panninak, Verának, Dominak és Norbinak és Yetinek az egyetemen és azok falain kívül közösen eltöltött időért.

Azoknak is, akik akaratlanul vagy szándékosan gyarapították ősz hajszálaimat, hiszen ez is egy lecke.

10. Publikációk

Az értekezés alapjául szolgáló publikációk:

Balázs Takács, Neil Billington, Máté Gyimesi, Bálint Kintses, András Málnási-Csizmadia, Peter J. Knight, and Mihály Kovács (2010): Myosin complexed with ADP and blebbistatin reversibly adopts a conformation resembling the start point of the working stroke. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 6799-6804.

Balázs Takács, Elizabeth O'Neill-Hennessey, Csaba Hetényi, József Kardos, Andrew G. Szent-Györgyi, and Mihály Kovács (2010): Myosin cleft closure determines the energetics of the actomyosin interaction. *FASEB J*, [Epub ahead of print].

Magyar nyelvű cikkek:

Nagy Nikolett, **Takács Balázs**, Kovács Mihály (2010): Motorenzimek működési alapelvei és egyedi finomhangolása. *Biokémia*, **XXXIV/2**, 12-21.

Takács Balázs, Kovács Mihály (2009): Motorok a sejtben – Mi hajt bennünket? *Élet és Tudomány*, **LXIV/6**, 174-175.

Konferencia-szereplések (aláhúzva az előadó szerző):

Balázs Takács, Elizabeth O'Neill-Hennessey, Csaba Hetényi, József Kardos, Andrew G. Szent-Györgyi, Mihály Kovács (2010): Myosin cleft closure determines the energetics of the actomyosin interaction. *Ist Prague's Protein Spring Workshop*, Prága.

Balázs Takács, Elizabeth O'Neill-Hennessey, Csaba Hetényi, József Kardos, Andrew G. Szent-Györgyi, Mihály Kovács (2010): Myosin cleft closure determines the energetics of the actomyosin interaction. *Conference on Muscle and Many other Motors*, Alpbach, Ausztria.

Balázs Takács, Elizabeth O'Neill-Hennessey, Csaba Hetényi, József Kardos, Andrew G. Szent-Györgyi, Mihály Kovács (2009): Myosin cleft closure determines the energetics of the actomyosin interaction. *European Muscle Conference*, Lille.

Nikolett Nagy, Kata Sarlós, **Balázs Takács**, Judit Tóth, Yuting Yang, David S. Pearson, Csaba Hetényi, László Nyitrai, András Málnási-Csizmadia, Michael A. Geeves, Clive R. Bagshaw, James R. Sellers, Jerry H. Brown, Andrew G. Szent-Györgyi, Carolyn Cohen, Mihály Kovács (2008): Routes of allosteric communication between functional parts of the

myosin motor. *Scientific Meeting of International Research Scholars of the Howard Hughes Medical Institute*, Lisszabon.

Balázs Takács, Máté Gyimesi, Bálint Kintses, András Málnási-Csizmadia, Mihály Kovács (2008): Utility of a myosin inhibitor in deciphering the structural mechanism of force generation. *Chemistry towards Biology Conference*, Dobogókő.

Balázs Takács, Máté Gyimesi, Bálint Kintses, András Málnási-Csizmadia, Mihály Kovács (2008): Blebbistatin alters nucleotide-induced structural changes in myosin. *European Muscle Conference*, Oxford.

Balázs Takács, Máté Gyimesi, Bálint Kintses, András Málnási-Csizmadia, Mihály Kovács (2007): Effect of blebbistatin on nucleotide-induced conformational changes of myosin. *European Muscle Conference*, Stockholm.

Az értekezésben nem szereplő, saját közlemények:

Nikolett T. Nagy, Takeshi Sakamoto, **Balázs Takács**, Máté Gyimesi, Eszter Hazai, Zsolt Bikádi, James R. Sellers, and Mihály Kovács (2010): Functional adaptation of the switch-2 nucleotide sensor enables rapid processive translocation by myosin-5. *FASEB J* [Epub ahead of print].

Ákos Kertész, **Balázs Takács**, Györgyi Váradi, Gábor K. Tóth, and Gabriella Sármay (2006): Design and functional activity of phosphopeptides with potential immunomodulating capacity, based on the sequence of Grb2-associated binder 1. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1091**, 437-444.

11. Rövidítések

A	: aktin
ABS	: abszorbancia
ADP	: adenzin-difoszfát
Amp	: amplitúdó
ATP	: adenzin-trifoszfát
B	: blebbistatin
BSA	: <i>bovine serum albumin</i> , marhaszérum albumin
Cys	: cisztein aminosav-maradék
Dd	: <i>Dictyostelium discoideum</i>
DdMD	: <i>Dictyostelium discoideum</i> miozin 2 motordomén
DMSO	: dimetil-szulfoxid
DTT	: ditiotreitól
ϵ	: moláris extinkciós koefficiens [$M^{-1}cm^{-1}$]
EM	: elektronmikroszkóp
F	: fluoreszcencia-intenzitás
FBS	: <i>fetal bovine serum</i> , embrionális marhaszérum
His	: hisztidin aminosav-maradék
HMM	: nehéz meromiozin fragmentum
I	: ionerősség [mM]
ITC	: izotermális titrációs kaloriméter / kalorimetria
kDa	: kilodalton
LDH	: laktát- (tejsav-) dehidrogenáz
LpS1	: közöséges kalmár (<i>Loligo pealei</i>) miozin 2 S1 fragmentum
M	: miozin
m5S1	: miozin 5a S1 fragmentum
NAD	: nikotinamid-adenin-dinukleotid
NADH	: redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid
NTA	: nitrilo-trieetsav
ORF	: <i>open reading frame</i> , nyitott leolvasási keret
PA	: pirén-aktin

PBS	: phosphate-buffered saline
PEP	: foszfoenol-piroszőlősav
PIA	: N-(1-pirén)jódacetamid
P _i	: szervesetlen foszfát
PK	: piruvát- (piroszőlősav-) kináz
PMSF	: fenil-metil-szulfonil-fluorid
S1	: szubfragmentum-1, miozinfaj
SDS	: nátrium-dodecilszulfát
skS1	: nyúl vázizom (<i>skeletal</i>) miozin 2 S1 fragmentum
skHMM	: nyúl vázizom (<i>skeletal</i>) miozin 2 HMM fragmentum
W	: triptofán aminosav-oldallánc, ill. triptofán fluoreszcencia(-változás)

12. Ábrák és táblázatok jegyzéke

12.1. Ábrák jegyzéke

1. **ábra:** A motorfehérjék csoportosítása.
2. **ábra:** A miozin szupercsalád gyökértelen filogenetikai fája a motordomének szekvenciái alapján.
3. **ábra:** A miozin szupercsalád feltételezett evolúciója Thompson és Langford alapján módosítva.
4. **ábra:** A konvencionális miozinok leszármazása Golomb és mtsai szerint.
5. **ábra:** A miozin 2 alegység-szerkezete.
6. **ábra:** A miozin 2 S1 felépítése és funkcionális egységei.
7. **ábra:** A Bagshaw-Trentham séma.
8. **ábra:** A kemomechanikai ciklus (Lymn-Taylor) modell.
9. **ábra:** Erős és gyenge aktinkötő állapotok megoszlása De La Cruz és mtsai szerint.
10. **ábra:** A switch-2 helyzete, nyitott és zárt állapota Geeves és Holmes alapján módosítva.
11. **ábra:** Az erőkar két végállapota Geeves és Holmes alapján módosítva.
12. **ábra:** Az aktin szerkezete.
13. **ábra:** Az aktomiozin komplex modellje Holmes és mtsai alapján módosítva.
14. **ábra:** Az aktomiozin kemomechanikai ciklus modellje a szerkezetekkel összhangban Geeves és Holmes alapján módosítva.
15. **ábra:** A blebbistatin szerkezete.
16. **ábra:** A blebbistatin az aktinkötő árok mélyére köt.
17. **ábra:** Fehérjekoncentráció-mérés 96-lukú lemezen.
18. **ábra:** A használt SF készülékek és sémájuk.
19. **ábra:** A VP-ITC készülék.
20. **ábra:** Az aktinkötő árok és a nehézlánc két felülete az LpS1 példáján.
21. **ábra:** Egy-triptofános DdMD mutánsok.
22. **ábra:** A blebbistatin gátolja a DdMD konstrukciók ATPáz aktivitását.
23. **ábra:** A blebbistatin hatása a W501+ mutáns nukleotid-indukált fluoreszcenciaváltozásaira.
24. **ábra:** A W501+ mutáns fluoreszcenciájának hőmérséklet-függése.

25. **ábra:** A blebbistatin hatása a 'W501+.ADP.AIF₄' komplex képződésének kinetikájára.
26. **ábra:** A 'W501+.ADP.blebbistatin' hármas komplex képződésének kinetikája.
27. **ábra:** A blebbistatin és az ADP hatása a miozin fejek szerkezetére.
28. **ábra:** A blebbistatin hatása a W239+ mutáns nukleotid-indukált fluoreszcencia-változásaira.
29. **ábra:** A W239+ mutáns fluoreszcenciájának hőmérséklet-függése.
30. **ábra:** A blebbistatin hatása a vad típusú DdMD aktinkötésére, a géleképek.
31. **ábra:** A blebbistatin hatása a vad típusú DdMD aktinkötésére a különböző nukleotid-állapotokban, az aktinkötő miozinhányad.
32. **ábra:** A 'W239.ADP' és a 'W239.ADP.B' komplex aktinkötésének kinetikája.
33. **ábra:** A 'W501.ADP' és a 'W501.ADP.B' komplex aktinkötésének kinetikája.
34. **ábra:** Az ATP-indukált aktomiozin disszociáció gátlása ADP-vel és a blebbistatin hatása a reakcióra.
35. **ábra:** Az 'A.M.ADP.blebbistatin' négyes komplex képződésének megerősítése koszedimentációs kísérlettel.
36. **ábra:** A blebbistatin hatása az aktó-W501+ nukleotid-indukált fluoreszcencia-változásaira.
37. **ábra:** A pirén-aktin (PA) fluoreszcencia-változásai.
38. **ábra:** Az erős és gyenge aktinkötő állapotok megoszlása PA fluoreszcencia-spektrumok alapján.
39. **ábra:** A blebbistatin kötése az *apo*-DdMD mutánsokhoz.
40. **ábra:** Az aktinkötés útvonalai és az aktinkötő árok állapota különböző miozin izoformákban.
41. **ábra:** A vizsgált miozin izoformák PA fluoreszcencia-spektrumai.
42. **ábra:** A vizsgált miozin izoformák PA-kötési kinetikája.
43. **ábra:** A vizsgált miozin izoformák PA-kötési kinetikájának ionerősség-függése.
44. **ábra:** A vizsgált miozin izoformák PA-kötési kinetikájának hőmérséklet-függése.
45. **ábra:** A 'PA.M' disszociáció kinetikájának hőmérséklet-függése a különböző miozin izoformákon.
46. **ábra:** Az aktinkötés standard entalpiaváltozása.

- 47. ábra:** A vizsgált miozin izoformák aktin affinitásának meghatározása egyensúlyi titrálásokkal.
- 48. ábra:** Az aktinkötés során fellépő hőváltozás mérése kalorimetriával.
- 49. ábra:** A 'M.ADP' komplex aktin affinitásának meghatározása egyensúlyi titrálásokkal.
- 50. ábra:** A vizsgált miozin izoformák szerkezeti és energetikai paramétereinek összevetése.
- 51. ábra:** Az általunk mért és az irodalomban korábban leírt termodinamikai paraméterek összefoglalása.
- 52. ábra:** A *transducer* helyzete a miozinban Coureux és mtsai szerint.
- 53. ábra:** A *K-means clustering* algoritmus sémája.

12.2. Táblázatok jegyzéke

- 1. táblázat:** A kísérletekben használt aktin és miozin fehérjék összefoglalása.
- 2. táblázat:** A kísérletekben használt rekombináns miozin konstrukciók adatai.
- 3. táblázat:** A gyakrabban alkalmazott reagensek beoldása és használata.
- 4. táblázat:** A blebbistatin gátló hatása a DdMD konstrukciók ATPáz aktivitására.
- 5. táblázat:** A relatív triptofán fluoreszcencia-szintek blebbistatin nélkül (F_0 blebbistatin), illetve telítési blebbistatin-koncentráció mellett (F_{\max} blebbistatin).
- 6. táblázat:** A blebbistatin-kötés egyensúlyi állandói a DdMD mutánsokban a két nukleotid mellett a triptofán fluoreszcencia-spektrumok alapján.
- 7. táblázat:** A 'W501+.ADP' blebbistatin kötésének egyensúlyi állandói a különböző módszerekkel mérve.
- 8. táblázat:** Az aktin koszedimentációs kísérletekben kapott disszociációs állandói a különböző nukleotid-állapotokban.
- 9. táblázat:** A 'M.ADP' és a 'M.ADP.B' komplexek aktinkötésének kinetikai paraméterei.
- 10. táblázat:** A vizsgált miozin izoformák aktinkötésének kinetikai és energetikai paraméterei.
- 11. táblázat:** A kalorimetriás mérések során nyert hőváltozásokra való illesztés paraméterei.

12. táblázat: Az aktinkötő árok két felülete közti kötés számított energetikai paraméterei (Dr. Hetényi Csaba munkája).

13. táblázat: A *transducer* becsült torziós szögének változása (Dr. Hetényi Csaba munkája).

13. Függelék

Az itt leírtaknál a dolgozatban használt sorrendet követtem.

13.1. Pufferek és reagens oldatok

Bradford reagens:

0,1 g/l Coomassie Brilliant Blue G250; 0,05 V/V % etanol; 0,1 V/V % foszforsav; a reagenst a végén leszűrtük

Coomassie gélfesték:

0,24 V/V % Coomassie Brilliant Blue R250; 50 V/V % metanol; 9 V/V % ecetsav; a festékoldatot 1 éjszakán át kevertettük

Coomassie festéktelenítő oldat:

13,5 V/V % etanol; 9,5 V/V % ecetsav

DdMD alacsony imidazol-tartalmú puffer:

50 mM imidazol; 45 mM HEPES pH 7,3; 27 mM K-acetát; 3 mM β -merkaptóetanol; 5 mM benzamidin

= 10 V/V % 0,5 M imidazol + 90 V/V % alacsony sótartalmú puffer

DdMD alacsony sótartalmú puffer:

50 mM HEPES pH 7,3; 30 mM K-acetát; 3 mM β -merkaptóetanol; 5 mM benzamidin

DdMD extrakciós puffer:

50 mM HEPES pH 7,3; 30 mM K-acetát; 10 mM Mg-acetát; 3 mM β -merkaptóetanol; 5 mM benzamidin; 40 μ g/ml PMSF

– 2 körben; a másodikban tartalmazott 10 mM ATP-t és 10 mM $MgCl_2$ -ot is

DdMD lízis puffer:

50 mM Tris pH 8,0; 2 mM EDTA; 0,2 mM EGTA; 3 mM DTT; 5 mM benzamidin; 40 μ g/ml PMSF

– 2 körben; a másodikban tartalmazott 1 V/V % TritonX-100 detergenst is

DdMD magas imidazol-tartalmú (elúciós) puffer:

450 mM imidazol pH 7,3; 2 mM HEPES; 4 mM NaCl; 0,2 mM $MgCl_2$; 3 mM β -merkaptóetanol; 5 mM benzamidin

= 90 V/V % 0,5 M imidazol + 10 V/V % DdMD mérési puffer

DdMD magas sótartalmú puffer:

50 mM HEPES pH 7,3; 300 mM K-acetát; 3 mM β -merkaptotetanol; 5 mM benzamidin

DdMD mérési puffer:

20 mM HEPES pH 7,2; 40 mM NaCl; 2 mM $MgCl_2$; 1 mM DTT

= DdMD dialízis puffer

F puffer:

4 mM HEPES; 2 mM $MgCl_2$; 3 mM NaN_3 ; 1 mM DTT

= magas ionerejű F-aktin puffer, PIA jelöléskor DTT nélkül

G puffer:

2 mM Tris pH 7,7; 0,1 mM $CaCl_2$; 2,5 mM DTT; 0,5 mM ATP

= alacsony ionerejű, G-aktin puffer

Kalorimetria mérési puffer:

20 mM HEPES pH 7,0; 50 mM KCl; 0,1 mM EGTA; 1 mM $MgCl_2$; 1 mM DTT

= csökkentett $MgCl_2$ -tartalmú SF50 puffer

Kalmár miozin 2 dialízispuffer:

20 mM MOPS pH 7,0; 80 mM NaCl; 2 mM $MgCl_2$; 0,2 mM $CaCl_2$; 3 mM NaN_3 ; 0,1

mM EDTA; 5 μ g/ml leupeptin; 0,1 mM DTT

Miozin 5 S1 extrakciós puffer:

10 mM HEPES pH 7,3; 0,5 M NaCl; 1 mM EGTA; 3 mM NaN_3 ; 0,1 mM DTT; 0,1 mM

PMSF; 1 μ g/ml leupeptin; 2 mM ATP; 10 mM $MgCl_2$

Miozin 5 S1 1. mosópuffer:

10 mM HEPES pH 7,2; 0,5 M NaCl; 0,1 mM EGTA; 3 mM NaN_3 ; 0,1 mM DTT; 0,1

mM PMSF; 1 μ g/ml leupeptin; 1 mM ATP; 5 mM $MgCl_2$

Miozin 5 S1 2. mosópuffer:

10 mM HEPES pH 7,2; 0,1 M NaCl; 0,1 mM EGTA; 3 mM NaN_3 ; 0,1 mM DTT; 0,1

mM PMSF; 1 μ g/ml leupeptin

Miozin 5 S1 1. dialízispuffer:

10 mM HEPES pH 7,2; 0,5 M NaCl; 0,1 mM EGTA; 3 mM NaN_3 ; 1 mM DTT

= MgATP-mentes 1. mosópuffer

Miozin 5 S1 2. dialízispuffer:

10 mM HEPES pH 7,2; 0,1 M KCl; 0,1 mM EGTA; 3 mM NaN_3 ; 1 mM DTT

Nyúl vázizom miozin 1. dialízispuffer:

13,6 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 6,4 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ pH 7,2; 120 mM NaCl; 2 mM EDTA

Nyúl vázizom miozin 2. dialízispuffer:

20 mM HEPES pH 7,2; 10 mM KCl

Nyúl vázizom miozin kivonópuffer:

150 mM KH_2PO_4 ; 300 mM KCl; 89 mM KOH

PBS:

10,1 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,8 mM KH_2PO_4 pH 7,3; 140 mM NaCl; 2,7 mM KCl

PBS-azid:

PBS + 5 mM NaN_3

SDS-kezelő oldat:

375 mM Tris pH 6,5; 10 V/V % glicerin; 41,6 mM SDS; 2 M β -merkaptoetanol; 15 V/V % brómfenolkék

SDS-gélelektroforézis puffer:

25 mM Tris; 192 mM glicin pH 8,3; 3,5 mM SDS

SF (stopped-flow) puffer:

20 mM HEPES pH 7,0; 0,1 mM EGTA; 5 mM MgCl_2 ; 1 mM DTT

SF50 puffer:

20 mM HEPES pH 7,0; 0,1 mM EGTA; 5 mM MgCl_2 ; 50 mM KCl; 1 mM DTT

TBS-TWEEN:

50 mM Tris pH 8; 150,6 mM NaCl; 0,005 V/V % TWEEN-20

1x Tris-glicin puffer:

25 mM Tris; 192 mM glicin pH 8,3

Western blot puffer:

80 V/V % Tris-glicin puffer + 20 V/V % metanol

13.2. A minták összetétele**13.2.1. A steady-state ATPáz mérések mintaösszetétele**

Az alábbi koncentrációkat alkalmaztuk: 2 V/V % PK/LDH enzimkeverék; 1 mM PEP; 200 μM NADH; 1 mM DTT; 0,02-2 μM miozin (a konstrukciótól, ill. a bazális

vagy aktin-aktivált ATPáz méréstől függően); 1 mM ATP (ennek hozzáadásával indítottuk el a reakciót); 0-100 μM aktin titrálva (az aktin-aktivált ATPáz méréséknél).

Rendszerint 1 ml térfogatba mértük össze a reakciót (az ATP-t is beleértve). Az ATPáz gátlási kísérleteknél az aktin koncentrációja volt állandó (30-50 μM közt a K_M értéke alapján) és a gátlószerezrel titráltunk (0-100 μM blebbistatin).

13.2.2. A koszedimentációs kísérletek mintaösszetétele

A koncentrációk:

m761 (M) 2 μM ; aktin (A) 0, 3, 5, 10, 20, 30 μM ; DTT 1 μM ; blebbistatin (B) 100 μM , apiráz 1 *unit*/ml, ADP 1 mM, ATP 5 mM.

A betett ábrakon:

m761 (M) 1 μM ; aktin (A) 0; 0,3; 0,7; 1; 2; 3 μM . A többi összetevő a fentiekkel megegyező koncentrációban.

A bemérések sorrendje:

rigor: A + M + apiráz, 15 perc inkubálás szobahőmérsékleten, majd centrifugálás

ADP: A + M + ADP, 30 perc inkubálás szobahőmérsékleten, majd centrifugálás

ATP: A + M + ATP, majd rögtön centrifugálás

rigor + B: A + M + apiráz, 15 perc inkubálás szobahőmérsékleten; + B, 2 perc inkubálás szobahőmérsékleten, majd centrifugálás

ADP + B: A + M + ADP 30 perc inkubálás szobahőmérsékleten; + B, 2 perc inkubálás szobahőmérsékleten, majd centrifugálás

ATP + B: A + M + B, 2 perc inkubálás szobahőmérsékleten; + ATP, majd rögtön centrifugálás

13.3. A megállított áramlásos (*stopped-flow*) készülék elve

Az általunk használt két *stopped-flow* készülék elve azonos, a séma a **18. c és d ábrán** látható. A készülék tubusaiba tölthetők elkülönítve a reaktánsok, melyeket számítógép-vezérelt szervomotorral lehet a keverőkamrába juttatni (a reaktánsokat „összelőni”). A „lövés” sebessége és a bejuttatott térfogat változtatható. A keverőkamrából az oldat a küvettába jut. A reaktánsok keverése és az oldat küvettáig való eljutása határozza meg a készülékek holtidejét, ami általában ms nagyságrendbe esik. A küvettában történik a reakció detektálása, mely a számítógép képernyőjén a

megfelelő SF szoftverrel folyamatosan követhető. A küvetében detektálhatunk fluoreszcenciát, fényszórást, vagy abszorbanciát/transzmittanciát; a T-elrendezésnek köszönhetően egyszerre akár két különböző csatornán is. A T-elrendezés szerint a két fotoelektron-sokszorozó egy vonalba esik és merőleges a diódára. A készülékek termosztálása vízkeringetéssel történik; csakúgy, mint a Kin-Tek SF esetén a lámpa hűtése. A küvetta pontos hőmérsékletét kontakthőmérő segítségével követtük, melyet a Kin-Tek SF esetén utólag építettünk be (testo 925 hőmérő – Testo Kft), a Bio-Logic SF viszont tartalmazott.

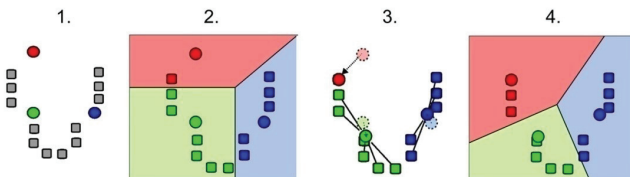
A dolgozatban leírt kísérletekben nem alkalmaztuk, de lehetőség van „kétszeres összelövéésre” (*double push*) is, amikor a két tubusból származó, már összekevert reaktánsokat a harmadik tubusba tett oldattal keverjük össze; a reakciót ezután detektálva a küvetében (**18. d ábra**). A Kin-Tek *stopped-flow* berendezés módosításával laborunkban korábban kialakítottak egy „hőmérséklet-ugrások” (*temperature-jump/stopped-flow*) készüléket is, mellyel az enzimreakciók magas hőmérsékleten is vizsgálhatók (117).

13.4. A *K-means clustering* eljárás

A *K-means clustering* statisztikai módszer, mely n darab megfigyelés k darab csoportba (*cluster*-be) való besorolását végzi el. Mindegyik megfigyelés abba a csoportba kerül, amelyik a leghasonlóbb átlaggal bír.

Az algoritmus főbb lépései (**53. ábra**):

1. Az adatokból random módon k darab átlagérték kiválasztása.
2. Az átlagok alapján k darab csoport képzése és az adatok besorolása.
3. Mindegyik csoporton belül egy új átlagérték keresése.
4. Finomítás a 2. és 3. lépés ismétlésével.



53. ábra: A *K-means clustering* algoritmus sémája.

A módszer legfontosabb alkalmazási területei a számítógépes képfeldolgozás és a mesterséges intelligencia kutatása.

A szöveg és a kép forrása: http://en.wikipedia.org/wiki/K-means_clustering

13.5. A felhasznált egyenletek

Az aktinkötő állapotok aránya PA-spektrumok alapján

$$N_{\text{erős}} = 1 - (F_N - F_M)/F_{\text{PA}} \cdot 100 \%$$

$$N_{\text{gyenge}} = (F_N - F_M)/F_{\text{PA}} \cdot 100 \%$$

$$\text{Ellenőrzés: } N_{\text{erős}} + N_{\text{gyenge}} = 1$$

A paraméterek: F a fluoreszcencia-spektrum 365 nm-es (gerjesztési), ill. 406 nm-es (emissziós) csúcsa; F_N a miozin (itt: DdMD) fluoreszcencia-csúcsa nukleotid jelenlétében; F_M a miozin fluoreszcencia-csúcsa nukleotid nélkül; F_{PA} a pirén-aktin fluoreszcencia-csúcsa miozin nélkül; $N_{\text{erős}}$, ill. N_{gyenge} az erős, ill. gyenge aktinkötő állapotok aránya százalékban kifejezve. A gerjesztési és emissziós spektrumból származó eredményeket átlagoltam (**38. ábra**).

Arrhenius-egyenlet

Az enzimreakciók hőmérséklet-függését Arrhenius írta le az alábbi egyenlet szerint:

$$k = A e^{-E_a/RT}$$

A paraméterek: k a reakció sebességi állandója, T az abszolút hőmérséklet, A egy hőmérséklettől független pre-exponenciális faktor (prefaktor), E_a az aktiválási energia, R az egyetemes gázállandó.

A gyakorlatban az egyenlet természetes alapú logaritmusát használjuk; $\ln k$ -t ábrázolva $1/T$ vagy $1000/T$ függvényében (**44-45. ábra**):

$$\ln k = -E_a/R \cdot 1/T + \ln A$$

van't Hoff-egyenlet

Az egyensúlyi állandó hőmérséklet-függését a van't Hoff-egyenlet (*van't Hoff isochore*) írja le:

$$d \ln K / dT = \Delta H^0 / RT^2$$

A paraméterek: K a reakció egyensúlyi állandója, T az abszolút hőmérséklet, R az egyetemes gázállandó, ΔH^0 a standard szabadentalpia-változás.

$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ és $\Delta G^0 = -RT\ln K$ felhasználásával a gyakorlatban itt is kettősreciprok-ábrázolást alkalmazunk ($\ln K$ $1000/T$ függvényében; **47. c** és **49. c ábra**):

$$\ln K = -\Delta H^0/RT + \Delta S^0/R$$

A normalizálás az egyensúlyi titrálások esetén

Az x tengelyen a miozin S1 vagy MD koncentrációját, az y tengelyen a $\Delta F/F$ értékét ábrázoltam (**47. b ábra**). Itt $\Delta F = \Delta Amp$ az egyes SF-tranziensekre; $F = C -$ alapvonal, ahol C az exponenciális illesztés platója az egyes SF-tranziensekre, az alapvonalat a PA-mentes minták ATP-vel való összekeverésével határoztam meg.

13.6. A használt illesztések és paramétereik

lineáris

Kin-Tek SF:	$Y = kt + C$
Origin:	$y = a + bx$
C, a	tengelymetszet (<i>intercept</i>)
k, b	meredekség (<i>slope</i>)

egyszeres exponenciális

Kin-Tek SF:	$Y = A_1 e^{(-k_1 t)} + C$
Origin:	$y = A_1 e^{(-x/t_1)} + y_0$

kétszeres exponenciális

Kin-Tek SF:	$Y = A_1 e^{(-k_1 t)} + A_2 e^{(-k_2 t)} + C$
Origin:	$y = A_1 e^{(-x/t_1)} + A_2 e^{(-x/t_2)} + y_0$
$A_1; A_2$	1. és 2. fázis amplitúdója
t_1, t_2	időállandó (<i>decay constant</i>)
$k_1 = 1/t_1; k_2 = 1/t_2$	1. és 2. fázis megfigyelt sebességi állandója (k_{obs})
C, y_0	plató (<i>offset</i>)

hiperbola

Origin:	$y = P_1 x / (P_2 + x)$
---------	-------------------------

módosított (inhibíciós) hiperbola

Origin:	$y = P_1 x / (P_2 + x) + P_3$
---------	-------------------------------

P_1	vertikális aszimptota, k_{\max} vagy k_{\min}
P_2	horizontális aszimptota, K_M
P_3	tengelymetszet

másodfokú függvény (quadroffset)

Origin: $y = a((c + x + k - ((c + x + k)^2 - 4cx)^{0.5})/2c) + s$

s tengelymetszet

a amplitúdó

c koncentráció

k egyensúlyi állandó, K_a ill. K_d

14. Táblázatok

1. táblázat: A kísérletekben használt aktin és miozin fehérjék összefoglalása.

Fehérje	Jelölés	Molekulásúly (M_r)	Eredet	Tárolás	Puffer
Gerinces vázizom miozin 2 S1	skS1	134 kDa	nyúl vázizom	folyékony nitrogénben	20 mM HEPES pH 7,2; 10 mM KCl
Gerinces vázizom miozin 2 HMM	skHMM	170 kDa	nyúl vázizom	folyékony nitrogénben	20 mM HEPES pH 7,2; 10 mM KCl
<i>Dictyostelium discoideum</i> miozin 2 motordomén	DdMD (W239+, W501+, m761)	89 kDa	<i>Dictyostelium discoideum</i> sejt kultúra, rekombináns	folyékony nitrogénben	20 mM HEPES pH 7,2; 40 mM NaCl; 2 mM MgCl ₂ ; 1 mM DTT
<i>Loligo pealei</i> miozin 2 S1	LpS1	134 kDa	kalmár (<i>Loligo pealei</i>), Andrew G. Szent-Györgyi laboratóriumából (Brandeis University, Waltham, Egyesült Államok)	folyékony nitrogénben	20 mM MOPS pH 7,0; 80 mM NaCl; 2 mM MgCl ₂ ; 0,2 mM CaCl ₂ ; 3 mM NaN ₃ ; 0,1 mM EDTA; 5 µg/ml leupeptin; 0,1 mM DTT
Egér miozin 5a S1	m5S1	120 kDa	S19 sejt kultúra, rekombináns	folyékony nitrogénben	10 mM HEPES pH 7,2; 0,1 mM EGTA; 3 mM NaN ₃ ; 0,1 M KCl; 1 mM DTT
Aktin	A	42 kDa	nyúl vázizom	aktin „szárazpor” 4 °C-on 1 évig; F-aktin jégben 1 hónapig	4 mM HEPES pH 7,1; 2 mM MgCl ₂ ; 3 mM NaN ₃ ; 1 mM DTT

2. táblázat: A kísérletekben használt rekombináns miozin konstrukciók adatai.

Miozin	Leírás	Bazális ATPáz aktivitás; s ⁻¹	Aktin-aktivált ATPáz aktivitás (v _{max}); s ⁻¹	Hivatkozás
DdMD m761	vad típusú DdMD, a 761-es aminosavnál csonkolva	0,05	1	(70)
DdMD W239+	a triptofán szenzort a <i>switch-1</i> hurok tartalmazza (a 239. aminosav); <i>switch-1</i> szenzor	0,06	0,1	(42)
DdMD W501+	a triptofán szenzort a relé-konverter régió tartalmazza (az 501. aminosav); erőkar szenzor	0,06	4	(32,45)
m5S1	vad típusú egér miozin 5a S1	0,02	10	Nagy T. N. és mtsai (2010) FASEB J ¹

¹Az értekezésben nem szereplő saját közlemény, lásd pontosan a **10. fejezetben**.

3. táblázat: A gyakran alkalmazott reagensek beoldása és használata.

Reagens	Beoldás	Koncentrációmérés	Tárolás (beoldva)	Használat
ATP és ADP	100 mM vízben; 1,2-szeres moláris Mg-felesleg mellett, pH ≈ 7	$\epsilon_{260} = 15400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	100-200 μL -ként –80 °C-on (mérésekhez) ill. –20 °C-on (preparáláshoz)	mintákhoz megfelelő hígításokban
apiráz	100 unit/ml F pufferben	–	100 μL -ként –80 °C-on	mintákhoz 0,1 vagy 0,5 unit/ml koncentrációban
blebbistatin	100 mM DMSO-ban	$\epsilon_{297} = 4100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	–20 °C-on 1 hónapig, fénytől védve	miozin mintákhoz megfelelő hígításokban
BSA	1 mg/ml vízben	$\epsilon_{279} = 44000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	–20 °C-on	koncentrációméréshez kontroll (0,07-0,7 μM tartományban)
DTT	1 M vízben	–	–20 °C-on	mintákhoz 0,1 vagy 1 mM koncentrációban
falloidin	10 mM 96 %-os etanolban	–	–20 °C-on	F-aktinhoz 1.5-szeres moláris feleslegben
N-(1-pirén)jódacetamid (PIA)	50 mM DMSO-ban frissen	–	–	1 mg/ml-es (24 μM) F-aktinhoz 10-szeres moláris feleslegben (208-szorosára hígítva)
NADH	10 mM vízben	–	–20 °C-on, fénytől védve	csatolt reakcióhoz 200 μM koncentrációban
PEP	100 mM vízben	–	–20 °C-on	csatolt reakcióhoz 1 mM koncentrációban

4. táblázat: A blebbistatin gátló hatása a DdMD konstrukciók ATPáz aktivitására (**22. ábra**).

DdMD konstrukció	ATPáz aktivitás	$K_{1/2}$; μM	Maximális gátlás; %
vad (m761)	bazális	$3,5 \pm 0,4$	96 ± 3
vad (m761)	aktin-aktivált	$2,6 \pm 1,3$	> 99
W501+	bazális	< 2	95 ± 3
W501+	aktin-aktivált	$4,6 \pm 0,9$	> 99
W239+	bazális	$4,0 \pm 1,0$	90 ± 7

5. táblázat: A relatív triptofán fluoreszcencia-szintek blebbistatin nélkül (F_0 blebbistatin), illetve telítési blebbistatin-koncentráció mellett (F_{\max} blebbistatin).

DdMD-nukleotid komplex	F_0 blebbistatin	F_{\max} blebbistatin
W501+.ADP ^a	0,8	2,1 ± 0,3
W501+.ATP ^a	1,7	2,2 ± 0,4
W239+.ADP ^b	0,9	1,1 ± 0,1
W239+.ATP ^b	0,73	0,46 ± 0,04
akto-W501+.ADP ^c	0,7	2,6 ± 0,3
akto-W501+.ATP ^c	1,6	2,4 ± 0,1

^a **23. c ábra**

^b **28. c ábra**

^c **36. c ábra**, az „üres” aktin triptofán fluoreszcenciáját levontuk a kapott értékekből.

6. táblázat: A blebbistatin-kötés egyensúlyi állandói a DdMD mutánsokban a két nukleotid mellett, a triptofán fluoreszcencia-spektrumok alapján.

DdMD-nukleotid komplex	K_D ; μM
W501+.ADP ^a	53 \pm 16
W501+.ATP ^a	99 \pm 110
W239+.ADP ^b	–
W239+.ATP ^b	2,5 \pm 1,0
akto-W501+.ADP ^c	38 \pm 17
akto-W501+.ATP ^c	17 \pm 3

^a 23. c ábra

^b 28. c ábra

^c 36. c ábra

7. táblázat: A 'W501+.ADP' blebbistatin-kötésének egyensúlyi állandója a különböző módszerekkel mérve.

Módszer	K_d , μM
Triptofán fluoreszcencia-spektrumok (23. c ábra)	53 ± 16
A 'M.ADP.B' komplex képződésének kinetikája, k_{obs} -ok alapján (26. b ábra)	16
A 'M.ADP.B' komplex képződésének kinetikája, amplitúdók alapján (26. c ábra)	42 ± 10
A három eredmény átlaga	37 ± 19

8. táblázat: Az aktin koszedimentációs kísérletekben kapott disszociációs állandói a különböző nukleotid-állapotokban (31. ábra).

Minta	K_d
nukleotidmentes	$0,12 \pm 0,07$
nukleotidmentes + B	$0,51 \pm 0,27$
nukleotidmentes (betett ábra)	$0,09 \pm 0,04$
nukleotidmentes + B (betett ábra)	$0,11 \pm 0,06$
ADP	$0,06 \pm 0,06$
ADP + B	$0,55 \pm 0,08$
ADP (betett ábra)	$0,10 \pm 0,06$
ADP + B (betett ábra)	$0,05 \pm 0,04$
ATP	20 ± 6
ATP + B	22 ± 3

9. táblázat: A 'M.ADP' és a 'M.ADP.B' komplexek aktinkötésének kinetikai paraméterei (32-33. ábra).

Komplex	k_{obs} -ok alapján			Amplitúdók alapján		Átlag
	$k_{\text{on}}; \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$k_{\text{off}}; \text{s}^{-1}$	$K_d; \mu\text{M}$	ΔAmp	$K_d; \mu\text{M}$	$K_d; \mu\text{M}$
W239+.ADP	$1,1 \pm 0,2$ (W)	$1,3 \pm 1,0$ (W)	1,2 (W)	$0,082 \pm 0,005$ (W)	$0,16 \pm 0,16$ (W)	$0,65 \pm 0,39$
	$0,84 \pm 0,07$	$0,37 \pm 0,33$	0,44	$0,049 \pm 0,007$	$0,80 \pm 0,49$	
W239+.ADP.B	$2,3 \pm 0,3$ (W)	$0,6 \pm 1,2$ (W)	0,3 (W)	$0,079 \pm 0,003$ (W)	1 > (W)	$0,56 \pm 0,26$
	$0,78 \pm 0,06$	$0,37 \pm 0,28$	0,47	$0,040 \pm 0,005$	$0,92 \pm 0,45$	
W501+.ADP	$0,043 \pm 0,005$	$0,030 \pm 0,051$	0,70	$0,037 \pm 0,004$	$1,25 \pm 0,43$	$0,98 \pm 0,28$
W501+.ADP.B	$0,025 \pm 0,005$	$0,013 \pm 0,049$	0,52	$0,050 \pm 0,009$	$1,02 \pm 0,68$	$0,77 \pm 0,25$

A „W” a triptofán fluoreszcencia-változásokból származó adatokat jelenti, a többi esetben a fényszórás változását követtük.

10. táblázat: A vizsgált miozin izoformák aktinkötésének kinetikai és energetikai paramétereit.

Nukleotidmentes (rigor)	skS1	LpS1	DdMD	m5S1
$k_{on}; \mu M^{-1}s^{-1} a$	25 ± 2	35 ± 8	0,46 ± 0,14	20 ± 3
$k_{max}; s^{-1} b$	79 ± 4	–	–	–
$k_{on,0}; \mu M^{-1}s^{-1} c$	56 ± 11	140 ± 30	0,8 ± 0,2	31 ± 9
$S; M^{-0.5} c$	-1,9 ± 0,3	-3,3 ± 0,3	-1,7 ± 0,3	-1,9 ± 0,4
$k_{off}; s^{-1} a$	0,15 ± 0,04	2,1 ± 0,3	0,34 ± 0,03	0,0037 ± 0,0005
$\Delta H_{on}^{\ddagger}; kJmol^{-1} a$	62 ± 4	37 ± 2	22 ± 5	23 ± 5
$\Delta H_{off}^{\ddagger}; kJmol^{-1} a$	28 ± 5	47 ± 9	36 ± 1	40 ± 3
$\Delta H^0; kJmol^{-1} a,d$	34 ± 9	-10 ± 10	-14 ± 6	-17 ± 8
$\Delta H^0; kJmol^{-1} e$	44 ± 11	-54 ± 12	-18 ± 12	–
$\Delta H^0; kJmol^{-1} f$	13 ± 3	-17 ± 3	–	–
$\Delta S^0; JK^{-1}mol^{-1}$	300 ± 40 ^e	-57 ± 13 ^e	57 ± 43 ^e	130 ± 60 ^a
$\Delta G^0; kJmol^{-1} g$	-45	-37	-35	-56
$K_d; \mu M$	0,011 ± 0,003 ^{a,e}	0,19 ± 0,05 ^{a,e}	0,63 ± 0,05 ^{a,e}	0,00013 ± 0,00001 ^a
ADP-kötött	skS1	LpS1	DdMD	m5S1
$\Delta H^0; kJmol^{-1} e$	82 ± 8	13 ± 2	51 ± 10	35 ± 6
$\Delta S^0; JK^{-1}mol^{-1} e$	410 ± 30	160 ± 10	300 ± 40	220 ± 30
$\Delta G^0; kJmol^{-1} g$	-40	-33	-38	-29
$K_d; \mu M^e$	0,20 ± 0,10	1,8 ± 0,2	1,3 ± 0,4	7,2 ± 0,5
Különbég^h	skS1	LpS1	DdMD	m5S1
$\Delta\Delta H^0; kJmol^{-1} a,e$	43 ± 13	45 ± 24	67 ± 12	52 ± 14
$\Delta\Delta S^0; JK^{-1}mol^{-1} e$	110 ± 70	220 ± 20	240 ± 80	90 ± 90
$\Delta\Delta G^0; kJmol^{-1} g$	5	4	-3	27

^aGyorskinetikai mérésekből (**44-45. ábra**).

^bA telítésre extrapolált megfigyelt sebességi állandó $I = 25$ mM mellett (**42. ábra**).

^cA nulla ionerősségre ($I = 0$) extrapolált másodrendű aktinkötési sebességi állandók ($k_{\text{on}, 0}$) és a k_{on} ionerősség-függése (S) (**43. ábra**). A felhasznált **1. egyenlet** szerint: $\log k_{\text{on}} = \log k_{\text{on}, 0} + S \cdot I^{0.5}$ (101,102).

^dA gyorskinetikai mérésekből számolt értékek a $\Delta H^0 = \Delta H_{\text{on}}^{\ddagger} - \Delta H_{\text{off}}^{\ddagger}$ egyenletet felhasználva (**44-46. ábra**). Az aktivációs entrópiát (ΔS^{\ddagger}) nagyobb bizonytalansága miatt nem határoztuk meg.

^eEgyensúlyi fluorimetriás mérésekből (**47, és 49. ábra**).

^fKalorimetriás mérésekből (**48. ábra**).

^gEgyensúlyi fluorimetriás mérések ΔH^0 és ΔS^0 átlagából 25°C-ra, kivéve a nukleotidmentes m5S1-nél, ahol gyorskinetikai adatokból származik.

^hA nukleotidmentes és ADP-kötött miozinfejek termodinamikai paramétereinek különbsége (pl.: $\Delta\Delta H^0 = \Delta H_{\text{ADP-kötött}}^0 - \Delta H_{\text{nukleotidmentes}}^0$) (**50. b ábra**).

11. táblázat: A kalorimetriás mérések során nyert hőváltozásokra való illesztés paraméterei (48. ábra).

Minta	s (rögzítve)	a	c	k (K_d ; μM)
skS1	0	$82,7 \pm 4,3$	$4,877 \pm 0,250$	$0,656 \pm 0,271$
skHMM	0	$51,5 \pm 1,9$	$8,021 \pm 0,240$	$0,020 \pm 0,025$
LpS1	0	$-115,3 \pm 1,1$	$5,764 \pm 0,035$	$0,101 \pm 0,016$

12. táblázat: Az aktinkötő árok két felülete közti kötés számított energetikai paraméterei (Dr. Hetényi Csaba számítása).

Izoforma	Állapot	PDB kód	$\Delta E_{\text{elektrosztatikus}}^a$; kJ/mol	$\Delta G_{\text{deszolvációs}}^a$; kJ/mol	$\Delta \Delta E_{\text{árok}}^b$; kJ/mol	ΔE_{kh}^c ; kJ/mol
LpS1	<i>rigor-szerű</i>	315G	-279	-158	-71	-49
	<i>poszt-rigor</i>	315F	-208	-180		
DdMD	<i>rigor-szerű</i>	2AKA	-359	-223	-40	-62
	<i>poszt-rigor</i>	1MMD	-319	-201		
m5S1	<i>rigor-szerű</i>	1OE9	-301	-227	-49	-70
	<i>poszt-rigor</i>	1W7J	-252	-206		

^a Az aktinkötő árok két felülete közti kölcsönhatási (kh) energiát adó értékek (E_{kh} , **4. egyenlet**, **20. ábra**).

^b $\Delta \Delta E_{\text{árok}} = \Delta E_{\text{elektrosztatikus}}(\text{rigor-szerű}) - \Delta E_{\text{elektrosztatikus}}(\text{poszt-rigor})$

^c $\Delta E_{\text{kh}} = \Delta \Delta E_{\text{árok}} + (\Delta G_{\text{deszolvációs}}(\text{rigor-szerű}) - \Delta G_{\text{deszolvációs}}(\text{poszt-rigor}))$ (**4. egyenlet**)

13. táblázat: A *transducer* becsült torziós szögének változása (Dr. Hetényi Csaba számításai).

Izoforma	Állapot	PDB kód	Torziós szög (φ ; fok)	A torziós szög változása ($\Delta\varphi$; fok)
skS1	<i>rigor</i> -szerű	–	–115,0 ^a	
	<i>poszt-rigor</i>	2MYS	–105,0	10,0
LpS1	<i>rigor</i> -szerű	3I5G	–113,5	
	<i>poszt-rigor</i>	3I5F	–104,4	9,1
DdMD	<i>rigor</i> -szerű	2AKA	–116,8	
	<i>poszt-rigor</i>	1MMD	–105,4	11,4
m5S1	<i>rigor</i> -szerű	1OE9	–115,0	
	<i>poszt-rigor</i>	1W7J	–106,1	8,9

^a Az m5S1 izoforma értéke (az ismert 3 érték mediánja).

*„... a szerzett tudásból és tapasztalatból
máris megtudhattad, mit jelent Ithaka!”*

(Kavafisz: Ithaka c. versének befejező sorai)

15. Irodalom

1. Gráf, L., Nyitrai, L. and Simon, Z. (2008) 40 éves a Biokémiai Tanszék. *Az ELTE Biokémiai Tanszékének jubileumi kiadványa.*
2. Purich, D.L. (2001) Enzyme catalysis: a new definition accounting for noncovalent substrate- and product-like states. *Trends Biochem Sci*, **26**, 417-421.
3. Tilney, L.G. (1975) Actin filaments in the acrosomal reaction of *Limulus* sperm. Motion generated by alterations in the packing of the filaments. *J Cell Biol*, **64**, 289-310.
4. Kull, F.J., Vale, R.D. and Fletterick, R.J. (1998) The case for a common ancestor: kinesin and myosin motor proteins and G proteins. *J Muscle Res Cell Motil*, **19**, 877-886.
5. Berg, J.S., Powell, B.C. and Cheney, R.E. (2001) A millennial myosin census. *Mol Biol Cell*, **12**, 780-794.
6. Foth, B.J., Goedecke, M.C. and Soldati, D. (2006) New insights into myosin evolution and classification. *Proc Natl Acad Sci USA*, **103**, 3681-3686.
7. Hodge, T. and Cope, M.J. (2000) A myosin family tree. *J Cell Sci*, **113 Pt 19**, 3353-3354.
8. Sellers, J.R. (2000) Myosins: a diverse superfamily. *Biochim Biophys Acta*, **1496**, 3-22.
9. Odronitz, F. and Kollmar, M. (2007) Drawing the tree of eukaryotic life based on the analysis of 2,269 manually annotated myosins from 328 species. *Genome Biol*, **8**, R196.
10. Thompson, R.F. and Langford, G.M. (2002) Myosin superfamily evolutionary history. *Anat Rec*, **268**, 276-289.
11. Richards, T.A. and Cavalier-Smith, T. (2005) Myosin domain evolution and the primary divergence of eukaryotes. *Nature*, **436**, 1113-1118.
12. Titus, M.A. (2005) Evolution: a treasure trove of motors. *Nature*, **436**, 1097-1099.
13. Golomb, E., Ma, X., Jana, S.S., Preston, Y.A., Kawamoto, S., Shoham, N.G., Goldin, E., Conti, M.A., Sellers, J.R. and Adelstein, R.S. (2004) Identification and characterization of nonmuscle myosin II-C, a new member of the myosin II family. *J Biol Chem*, **279**, 2800-2808.
14. 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. *et al.* (2009) The SAH domain extends the functional length of the myosin lever. *Proc Natl Acad Sci USA*, **106**, 22193-22198.
15. Suveges, D., Gaspari, Z., Toth, G. and Nyitrai, L. (2009) Charged single alpha-helix: a versatile protein structural motif. *Proteins*, **74**, 905-916.
16. Ng, K.P., Kambara, T., Matsuura, M., Burke, M. and Ikebe, M. (1996) Identification of myosin III as a protein kinase. *Biochemistry*, **35**, 9392-9399.
17. Berg, J.S., Derfler, B.H., Pennisi, C.M., Corey, D.P. and Cheney, R.E. (2000) Myosin-X, a novel myosin with pleckstrin homology domains, associates with regions of dynamic actin. *J Cell Sci*, **113 Pt 19**, 3439-3451.
18. Brown, J.H., Yang, Y., Reshetnikova, L., Gourinath, S., Suveges, D., Kardos, J., Hobor, F., Reutzler, R., Nyitrai, L. and Cohen, C. (2008) An unstable head-rod

- junction may promote folding into the compact off-state conformation of regulated myosins. *J Mol Biol*, **375**, 1434-1443.
19. Mihályi, E. and Szent-Gyorgyi, A.G. (1953) Trypsin digestion of muscle proteins. III. Adenosinetriphosphatase activity and actinbinding capacity of the digested myosin. *J Biol Chem*, **201**, 211-219.
 20. Mihályi, E. and Szent-Gyorgyi, A.G. (1953) Trypsin digestion of muscle proteins. I. Ultracentrifugal analysis of the process. *J Biol Chem*, **201**, 189-196.
 21. Conti, M.A. and Adelstein, R.S. (2008) Nonmuscle myosin II moves in new directions. *J Cell Sci*, **121**, 11-18.
 22. Szent-Gyorgyi, A.G. (2004) The early history of the biochemistry of muscle contraction. *J Gen Physiol*, **123**, 631-641.
 23. Balint, M., Sreter, F.A., Wolf, I., Nagy, B. and Gergely, J. (1975) The substructure of heavy meromyosin. The effect of Ca²⁺ and Mg²⁺ on the tryptic fragmentation of heavy meromyosin. *J Biol Chem*, **250**, 6168-6177.
 24. Rayment, I., Rypniewski, W.R., Schmidt-Base, K., Smith, R., Tomchick, D.R., Benning, M.M., Winkelmann, D.A., Wesenberg, G. and Holden, H.M. (1993) Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor. *Science*, **261**, 50-58.
 25. Bagshaw, C.R., Eccleston, J.F., Eckstein, F., Goody, R.S., Gutfreund, H. and Trentham, D.R. (1974) The magnesium ion-dependent adenosine triphosphatase of myosin. Two-step processes of adenosine triphosphate association and adenosine diphosphate dissociation. *Biochem J*, **141**, 351-364.
 26. Bagshaw, C.R. and Trentham, D.R. (1973) The reversibility of adenosine triphosphate cleavage by myosin. *Biochem J*, **133**, 323-328.
 27. Bagshaw, C.R. and Trentham, D.R. (1974) The characterization of myosin-product complexes and of product-release steps during the magnesium ion-dependent adenosine triphosphatase reaction. *Biochem J*, **141**, 331-349.
 28. Lynn, R.W. and Taylor, E.W. (1971) Mechanism of adenosine triphosphate hydrolysis by actomyosin. *Biochemistry*, **10**, 4617-4624.
 29. Taylor, E.W. and Lynn, R.W. (1972) Enzyme kinetics and the mechanism of muscle contraction. *Muscle Biol*, **1**, 47-69.
 30. De La Cruz, E.M., Wells, A.L., Rosenfeld, S.S., Ostap, E.M. and Sweeney, H.L. (1999) The kinetic mechanism of myosin V. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 13726-13731.
 31. De La Cruz, E.M., Ostap, E.M. and Sweeney, H.L. (2001) Kinetic mechanism and regulation of myosin VI. *J Biol Chem*, **276**, 32373-32381.
 32. Gyimesi, M., Tsaturyan, A.K., Kellermayer, M.S. and Malnasi-Csizmadia, A. (2008) Kinetic characterization of the function of myosin loop 4 in the actin-myosin interaction. *Biochemistry*, **47**, 283-291.
 33. Ajtai, K., Garamszegi, S.P., Watanabe, S., Ikebe, M. and Burghardt, T.P. (2004) The myosin cardiac loop participates functionally in the actomyosin interaction. *J Biol Chem*, **279**, 23415-23421.
 34. Goody, R.S. and Hofmann-Goody, W. (2002) Exchange factors, effectors, GAPS and motor proteins: common thermodynamic and kinetic principles for different functions. *Eur Biophys J*, **31**, 268-274.
 35. Vale, R.D. (1996) Switches, latches, and amplifiers: common themes of G proteins and molecular motors. *J Cell Biol*, **135**, 291-302.

36. Saraste, M., Sibbald, P.R. and Wittinghofer, A. (1990) The P-loop--a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem Sci*, **15**, 430-434.
37. Malnasi-Csizmadia, A., Pearson, D.S., Kovacs, M., Woolley, R.J., Geeves, M.A. and Bagshaw, C.R. (2001) Kinetic resolution of a conformational transition and the ATP hydrolysis step using relaxation methods with a Dictyostelium myosin II mutant containing a single tryptophan residue. *Biochemistry*, **40**, 12727-12737.
38. Geeves, M.A. and Holmes, K.C. (1999) Structural mechanism of muscle contraction. *Annu Rev Biochem*, **68**, 687-728.
39. Conibear, P.B., Bagshaw, C.R., Fajer, P.G., Kovacs, M. and Malnasi-Csizmadia, A. (2003) Myosin cleft movement and its coupling to actomyosin dissociation. *Nat Struct Biol*, **10**, 831-835.
40. Reubold, T.F., Eschenburg, S., Becker, A., Kull, F.J. and Manstein, D.J. (2003) A structural model for actin-induced nucleotide release in myosin. *Nat Struct Biol*, **10**, 826-830.
41. Yengo, C.M., De La Cruz, E.M., Chrin, L.R., Gaffney, D.P., 2nd and Berger, C.L. (2002) Actin-induced closure of the actin-binding cleft of smooth muscle myosin. *J Biol Chem*, **277**, 24114-24119.
42. Kintses, B., Gyimesi, M., Pearson, D.S., Geeves, M.A., Zeng, W., Bagshaw, C.R. and Malnasi-Csizmadia, A. (2007) Reversible movement of switch 1 loop of myosin determines actin interaction. *Embo J*, **26**, 265-274.
43. Holmes, K.C., Angert, I., Kull, F.J., Jahn, W. and Schroder, R.R. (2003) Electron cryo-microscopy shows how strong binding of myosin to actin releases nucleotide. *Nature*, **425**, 423-427.
44. Malnasi-Csizmadia, A., Dickens, J.L., Zeng, W. and Bagshaw, C.R. (2005) Switch movements and the myosin crossbridge stroke. *J Muscle Res Cell Motil*, **26**, 31-37.
45. Malnasi-Csizmadia, A., Woolley, R.J. and Bagshaw, C.R. (2000) Resolution of conformational states of Dictyostelium myosin II motor domain using tryptophan (W501) mutants: implications for the open-closed transition identified by crystallography. *Biochemistry*, **39**, 16135-16146.
46. Kabsch, W., Mannherz, H.G., Suck, D., Pai, E.F. and Holmes, K.C. (1990) Atomic structure of the actin:DNase I complex. *Nature*, **347**, 37-44.
47. Holmes, K.C., Popp, D., Gebhard, W. and Kabsch, W. (1990) Atomic model of the actin filament. *Nature*, **347**, 44-49.
48. Lorenz, M., Popp, D. and Holmes, K.C. (1993) Refinement of the F-actin model against X-ray fiber diffraction data by the use of a directed mutation algorithm. *J Mol Biol*, **234**, 826-836.
49. Oda, T., Iwasa, M., Aihara, T., Maeda, Y. and Narita, A. (2009) The nature of the globular- to fibrous-actin transition. *Nature*, **457**, 441-445.
50. Holmes, K.C., Schroder, R.R., Sweeney, H.L. and Houdusse, A. (2004) The structure of the rigor complex and its implications for the power stroke. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **359**, 1819-1828.
51. Geeves, M.A. and Holmes, K.C. (2005) The molecular mechanism of muscle contraction. *Adv Protein Chem*, **71**, 161-193.
52. Highsmith, S. (1977) The effects of temperature and salts on myosin subfragment-1 and F-actin association. *Arch Biochem Biophys*, **180**, 404-408.
53. Konrad, M. and Goody, R.S. (1982) Kinetic and thermodynamic properties of the ternary complex between F-actin, myosin subfragment 1 and adenosine 5'-[beta, gamma-imido]triphosphate. *Eur J Biochem*, **128**, 547-555.

54. Margossian, S.S. and Lowey, S. (1982) Preparation of myosin and its subfragments from rabbit skeletal muscle. *Methods Enzymol*, **85 Pt B**, 55-71.
55. Smith, S.J., White, H.D. and Woledge, R.C. (1984) Microcalorimetric measurement of the enthalpy of binding of rabbit skeletal myosin subfragment 1 and heavy meromyosin to F-actin. *J Biol Chem*, **259**, 10303-10308.
56. Yang, Y., Gourinath, S., Kovacs, M., Nyitrai, L., Reutzel, R., Himmel, D.M., O'Neill-Hennessey, E., Reshetnikova, L., Szent-Gyorgyi, A.G., Brown, J.H. *et al.* (2007) Rigor-like structures from muscle myosins reveal key mechanical elements in the transduction pathways of this allosteric motor. *Structure*, **15**, 553-564.
57. Karatzaféri, C., Chinn, M.K. and Cooke, R. (2004) The force exerted by a muscle cross-bridge depends directly on the strength of the actomyosin bond. *Biophys J*, **87**, 2532-2544.
58. Ostap, E.M. (2002) 2,3-Butanedione monoxime (BDM) as a myosin inhibitor. *J Muscle Res Cell Motil*, **23**, 305-308.
59. Shaw, M.A., Ostap, E.M. and Goldman, Y.E. (2003) Mechanism of inhibition of skeletal muscle actomyosin by N-benzyl-p-toluenesulfonamide. *Biochemistry*, **42**, 6128-6135.
60. Straight, A.F., Cheung, A., Limouze, J., Chen, I., Westwood, N.J., Sellers, J.R. and Mitchison, T.J. (2003) Dissecting temporal and spatial control of cytokinesis with a myosin II Inhibitor. *Science*, **299**, 1743-1747.
61. Kovacs, M., Toth, J., Hetenyi, C., Malnasi-Csizmadia, A. and Sellers, J.R. (2004) Mechanism of blebbistatin inhibition of myosin II. *J Biol Chem*, **279**, 35557-35563.
62. Limouze, J., Straight, A.F., Mitchison, T. and Sellers, J.R. (2004) Specificity of blebbistatin, an inhibitor of myosin II. *J Muscle Res Cell Motil*, **25**, 337-341.
63. Ramamurthy, B., Yengo, C.M., Straight, A.F., Mitchison, T.J. and Sweeney, H.L. (2004) Kinetic mechanism of blebbistatin inhibition of nonmuscle myosin IIb. *Biochemistry*, **43**, 14832-14839.
64. Allingham, J.S., Smith, R. and Rayment, I. (2005) The structural basis of blebbistatin inhibition and specificity for myosin II. *Nat Struct Mol Biol*, **12**, 378-379.
65. Kolega, J. (2004) Phototoxicity and photoinactivation of blebbistatin in UV and visible light. *Biochem Biophys Res Commun*, **320**, 1020-1025.
66. Sakamoto, T., Limouze, J., Combs, C.A., Straight, A.F. and Sellers, J.R. (2005) Blebbistatin, a myosin II inhibitor, is photoinactivated by blue light. *Biochemistry*, **44**, 584-588.
67. Okamoto, Y. and Sekine, T. (1985) A streamlined method of subfragment one preparation from myosin. *J Biochem*, **98**, 1143-1145.
68. Manstein, D.J., Schuster, H.P., Morandini, P. and Hunt, D.M. (1995) Cloning vectors for the production of proteins in Dictyostelium discoideum. *Gene*, **162**, 129-134.
69. Manstein, D.J. and Hunt, D.M. (1995) Overexpression of myosin motor domains in Dictyostelium: screening of transformants and purification of the affinity tagged protein. *J Muscle Res Cell Motil*, **16**, 325-332.
70. Kurzawa, S.E., Manstein, D.J. and Geeves, M.A. (1997) Dictyostelium discoideum myosin II: characterization of functional myosin motor fragments. *Biochemistry*, **36**, 317-323.
71. Batra, R. and Manstein, D.J. (1999) Functional characterisation of Dictyostelium myosin II with conserved tryptophanyl residue 501 mutated to tyrosine. *Biol Chem*, **380**, 1017-1023.

72. Stafford, W.F., 3rd, Szentkiralyi, E.M. and Szent-Gyorgyi, A.G. (1979) Regulatory properties of single-headed fragments of scallop myosin. *Biochemistry*, **18**, 5273-5280.
73. Kalabokis, V.N. and Szent-Gyorgyi, A.G. (1997) Cooperativity and regulation of scallop myosin and myosin fragments. *Biochemistry*, **36**, 15834-15840.
74. Wang, F., Chen, L., Arcucci, O., Harvey, E.V., Bowers, B., Xu, Y., Hammer, J.A., 3rd and Sellers, J.R. (2000) Effect of ADP and ionic strength on the kinetic and motile properties of recombinant mouse myosin V. *J Biol Chem*, **275**, 4329-4335.
75. Sakamoto, T., Wang, F., Schmitz, S., Xu, Y., Xu, Q., Molloy, J.E., Veigel, C. and Sellers, J.R. (2003) Neck length and processivity of myosin V. *J Biol Chem*, **278**, 29201-29207.
76. Straub, F.B. (1943) *Actin*. Univ. of Szeged.
77. Spudich, J.A. and Watt, S. (1971) The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin. *J Biol Chem*, **246**, 4866-4871.
78. Cooper, J.A., Walker, S.B. and Pollard, T.D. (1983) Pyrene actin: documentation of the validity of a sensitive assay for actin polymerization. *J Muscle Res Cell Motil*, **4**, 253-262.
79. Wang, F., Kovacs, M., Hu, A., Limouze, J., Harvey, E.V. and Sellers, J.R. (2003) Kinetic mechanism of non-muscle myosin IIB: functional adaptations for tension generation and maintenance. *J Biol Chem*, **278**, 27439-27448.
80. Trentham, D.R., Bardsley, R.G., Eccleston, J.F. and Weeds, A.G. (1972) Elementary processes of the magnesium ion-dependent adenosine triphosphatase activity of heavy meromyosin. A transient kinetic approach to the study of kinases and adenosine triphosphatases and a colorimetric inorganic phosphate assay in situ. *Biochem J*, **126**, 635-644.
81. Burgess, S.A., Walker, M.L., Sakakibara, H., Oiwa, K. and Knight, P.J. (2004) The structure of dynein-c by negative stain electron microscopy. *J Struct Biol*, **146**, 205-216.
82. Burgess, S.A., Walker, M.L., Thirumurugan, K., Trinick, J. and Knight, P.J. (2004) Use of negative stain and single-particle image processing to explore dynamic properties of flexible macromolecules. *J Struct Biol*, **147**, 247-258.
83. Coureux, P.D., Sweeney, H.L. and Houdusse, A. (2004) Three myosin V structures delineate essential features of chemo-mechanical transduction. *Embo J*, **23**, 4527-4537.
84. Coureux, P.D., Wells, A.L., Menetrey, J., Yengo, C.M., Morris, C.A., Sweeney, H.L. and Houdusse, A. (2003) A structural state of the myosin V motor without bound nucleotide. *Nature*, **425**, 419-423.
85. Fisher, A.J., Smith, C.A., Thoden, J.B., Smith, R., Sutoh, K., Holden, H.M. and Rayment, I. (1995) X-ray structures of the myosin motor domain of Dictyostelium discoideum complexed with MgADP.BeFx and MgADP.AIF₄. *Biochemistry*, **34**, 8960-8972.
86. Reubold, T.F., Eschenburg, S., Becker, A., Leonard, M., Schmid, S.L., Vallee, R.B., Kull, F.J. and Manstein, D.J. (2005) Crystal structure of the GTPase domain of rat dynamin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 13093-13098.
87. Berman, H., Henrick, K. and Nakamura, H. (2003) Announcing the worldwide Protein Data Bank. *Nat Struct Biol*, **10**, 980.

88. Berman, H.M., Battistuz, T., Bhat, T.N., Bluhm, W.F., Bourne, P.E., Burkhardt, K., Feng, Z., Gilliland, G.L., Iype, L., Jain, S. *et al.* (2002) The Protein Data Bank. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **58**, 899-907.
89. Camacho, C.J. and Zhang, C. (2005) FastContact: rapid estimate of contact and binding free energies. *Bioinformatics*, **21**, 2534-2536.
90. Champ, P.C. and Camacho, C.J. (2007) FastContact: a free energy scoring tool for protein-protein complex structures. *Nucleic Acids Res*, **35**, W556-560.
91. Cecchini, M., Houdusse, A. and Karplus, M. (2008) Allosteric communication in myosin V: from small conformational changes to large directed movements. *PLoS Comput Biol*, **4**, e1000129.
92. Malnasi-Csizmadia, A., Kovacs, M., Woolley, R.J., Botchway, S.W. and Bagshaw, C.R. (2001) The dynamics of the relay loop tryptophan residue in the Dictyostelium myosin motor domain and the origin of spectroscopic signals. *J Biol Chem*, **276**, 19483-19490.
93. Shu, S., Liu, X. and Korn, E.D. (2005) Blebbistatin and blebbistatin-inactivated myosin II inhibit myosin II-independent processes in Dictyostelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 1472-1477.
94. Urbanke, C. and Wray, J. (2001) A fluorescence temperature-jump study of conformational transitions in myosin subfragment 1. *Biochem J*, **358**, 165-173.
95. Gyimesi, M., Kintses, B., Bodor, A., Perczel, A., Fischer, S., Bagshaw, C.R. and Malnasi-Csizmadia, A. (2008) The mechanism of the reverse recovery step, phosphate release, and actin activation of Dictyostelium myosin II. *J Biol Chem*, **283**, 8153-8163.
96. Geeves, M.A., Goody, R.S. and Gutfreund, H. (1984) Kinetics of acto-S1 interaction as a guide to a model for the crossbridge cycle. *J Muscle Res Cell Motil*, **5**, 351-361.
97. Geeves, M.A. and Jeffries, T.E. (1988) The effect of nucleotide upon a specific isomerization of actomyosin subfragment 1. *Biochem J*, **256**, 41-46.
98. 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.
99. Coates, J.H., Criddle, A.H. and Geeves, M.A. (1985) Pressure-relaxation studies of pyrene-labelled actin and myosin subfragment 1 from rabbit skeletal muscle. Evidence for two states of acto-subfragment 1. *Biochem J*, **232**, 351-356.
100. Taylor, E.W. (1991) Kinetic studies on the association and dissociation of myosin subfragment 1 and actin. *J Biol Chem*, **266**, 294-302.
101. Eigen, M., Kruse, W., Maass, G. and DeMaeyer, L. (1964) Rate constants of protolytic reactions in aqueous solution II: The maximum rate of ionic recombination in solution. *Prog. React. Kinet.*, **2**, 287-296.
102. Lin, S.H. and Faller, L.D. (2005) Ionic-strength dependence of the conformational change in the unphosphorylated sodium pump. *Biochemistry*, **44**, 1482-1494.
103. Atkins, P. (1990) *Physical Chemistry*. 4th ed. Oxford University Press, Oxford.
104. Fersht, A. (1977), *Enzyme Structure and Mechanism*. 2nd ed. W.H.Freeman & Co., New York, pp. 147-148.
105. Kurzawa, S.E. and Geeves, M.A. (1996) A novel stopped-flow method for measuring the affinity of actin for myosin head fragments using microgram quantities of protein. *J Muscle Res Cell Motil*, **17**, 669-676.
106. Conibear, P.B. and Geeves, M.A. (1998) Cooperativity between the two heads of rabbit skeletal muscle heavy meromyosin in binding to actin. *Biophys J*, **75**, 926-937.

107. Brooks, B.R., Brooks, C.L., 3rd, Mackerell, A.D., Jr., Nilsson, L., Petrella, R.J., Roux, B., Won, Y., Archontis, G., Bartels, C., Boresch, S. *et al.* (2009) CHARMM: the biomolecular simulation program. *J Comput Chem*, **30**, 1545-1614.
108. Hetenyi, C., Maran, U., Garcia-Sosa, A.T. and Karelson, M. (2007) Structure-based calculation of drug efficiency indices. *Bioinformatics*, **23**, 2678-2685.
109. Zhao, F.Q., Padron, R. and Craig, R. (2008) Blebbistatin stabilizes the helical order of myosin filaments by promoting the switch 2 closed state. *Biophys J*, **95**, 3322-3329.
110. Xu, S., Offer, G., Gu, J., White, H.D. and Yu, L.C. (2003) Temperature and ligand dependence of conformation and helical order in myosin filaments. *Biochemistry*, **42**, 390-401.
111. Xu, S., White, H.D., Offer, G.W. and Yu, L.C. (2009) Stabilization of helical order in the thick filaments by blebbistatin: further evidence of coexisting multiple conformations of myosin. *Biophys J*, **96**, 3673-3681.
112. Sweeney, H.L. and Houdusse, A. (2004) The motor mechanism of myosin V: insights for muscle contraction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **359**, 1829-1841.
113. Yengo, C.M. and Sweeney, H.L. (2004) Functional role of loop 2 in myosin V. *Biochemistry*, **43**, 2605-2612.
114. Prochniewicz, E., Chin, H.F., Henn, A., Hannemann, D.E., Olivares, A.O., Thomas, D.D. and De La Cruz, E.M. (2010) Myosin isoform determines the conformational dynamics and cooperativity of actin filaments in the strongly bound actomyosin complex. *J Mol Biol*, **396**, 501-509.
115. Ritchie, M.D., Geeves, M.A., Woodward, S.K. and Manstein, D.J. (1993) Kinetic characterization of a cytoplasmic myosin motor domain expressed in Dictyostelium discoideum. *Proc Natl Acad Sci USA*, **90**, 8619-8623.
116. Kovacs, M., Wang, F., Hu, A., Zhang, Y. and Sellers, J.R. (2003) Functional divergence of human cytoplasmic myosin II: kinetic characterization of the non-muscle IIA isoform. *J Biol Chem*, **278**, 38132-38140.
117. Kintses, B., Simon, Z., Gyimesi, M., Toth, J., Jelinek, B., Niedetzky, C., Kovacs, M. and Malnasi-Csizmadia, A. (2006) Enzyme kinetics above denaturation temperature: a temperature-jump/stopped-flow apparatus. *Biophys J*, **91**, 4605-4610.