

# **A *switch-2* hurok szerepe a miozin 5 működési mechanizmusában**

**Nagy Nikolett**

**Szakdolgozat**



**Témavezető: Dr. Kovács Mihály**  
**Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar**  
**Biológiai Intézet**  
**Biokémiai Tanszék**

**2008**

## Tartalomjegyzék

### Tartalomjegyzék

1.Összefoglalás (Summary)	3
2.Bevezetés	5
3.Irodalmi áttekintés	6
A miozin 5 osztály	6
A miozin 5a enzimciklusa	8
Terhelési arány (Duty ratio)	10
A miozinok rigor állapota	11
4.Célkitűzés	15
5.Anyagok és módszerek	16
5.1 Egyfejű miozin 5 pontmutánsok létrehozása és vizsgálata	16
Transzfekció	16
Vírus amplifikáció, próba-expresszió	17
Fehérjekonstrukciók expressziója	17
Flag-címkés miozin konstrukciók preparálása	18
Tryptofán fluoreszcencia spektroszkópia	19
Steady-state bazális (aktin mentes) ATPáz aktivitás mérése	19
Aktin-aktivált ATPáz aktivitás mérése	20.
ATP kötés mérése	20.
ADP kötés mérése	20.
ATP-indukált aktomiozin disszociáció mérése	21.
Aktomiozin-komplex ADP affinitásának mérése	21.
Aktin-kötés mérése	21.
Nukleotid-mentes aktomiozin disszociójának mérése	22
Pi felszabadulás mérése	22
5.2 Kétfejű miozin 5 (HMM) konstrukciók létrehozása	24
Miozin 5 HMM konstrukciók klónozása	24
Emésztés	24
Az emésztett fragmentumok izolálása gélből	25.
Ligálás	26.

Transzformálás és a transzformált sejtek növesztése	26.
Miniprep készítése	27.
HMM konstrukciók transzfekciója	28
Vírus-amplifikáció, fehérjekonstrukciók expressziója, FLAG-címkés miozin 5 HMM konstrukciók preparálása	29
6. Eredmények	30
6.1 Egyfejű miozin 5 pontmutánsok létrehozása és vizsgálata	30
Rekombináns fehérjék expressziója és preparálása	30.
A konstrukciók bazális és aktin-aktivált ATPáz aktivitása	31.
Triptofán fluoreszcencia változások ADP és ATP kötésre	32.
ATP és ADP kötés kinetikája	33.
ATP-indukált pirén-aktomiozin disszociáció és ADP-affinitás	20.
Pi felszabadulás	
Az aktin-kötés kinetikája és hőmérséklet-függése	21.
6.2 Kétfejű miozin 5 (HMM) konstrukciók létrehozása	
Miozin 5 HMM konstrukciók klónozása	22.
Rekombináns HMM konstrukciók	
7. Eredmények megbeszélése	24.
8. Konklúzió	28.
9. Köszönetnyilvánítás	30.
10. Rövidítésjegyzék	
11. Hivatkozások	29.

## 1. ÖSSZEFOGLALÁS

Szakdolgozati munkámat az Eötvös Loránd Tudományegyetem Biokémiai Tanszékén készítettem. Vizsgálataim tárgya a miozin 5a motorfehérje volt, melynek fiziológiai jelentősége a melanociták rövidtávú transzportjában, illetve a *Purkinje* sejtek dendrit-tüskéibe történő SER transzportjában van, ezáltal szerepet játszva ezen sejtek ingerlékenységének kialakításában (IP<sub>3</sub>, Ca<sup>2+</sup>), illetve a poszt-szinaptikus szignáltranszdukció folyamatában [1]. A dimer, kétfejű miozin 5a motorfehérje processzivitása, azaz azon tulajdonsága, hogy számos enzimciklus és azzal járó mechanikai lépés elvégzésére képes az aktin sínről való leválás nélkül, alapvető feltétele funkciója betöltésének [2]. Munkám célja az volt, hogy a miozin 5a molekula egy, az enzimikus mechanizmusban kitüntetett szerepet játszó, konzervatív régiójában (switch-2 hurok) található egyetlen osztályspecifikus aminosav (Y439) szerepét vizsgáljam a molekula processzív mechanizmusában [3]. Az említett miozin-osztályonként variábilis aminosavra nézve létrehozott mutáns, illetve a vad típusú konstrukciók fluoreszcencia spektroszkópai, *steady-state* és tranziens kinetikai analízisével kimutattuk ezen aminosav szerepét a processzivitásban, illetve feltártuk kulcsfontosságú szerepét az enzimciklus más, alapvető mechanizmusában.

## **SUMMARY**

This work was prepared at Eötvös Loránd University, Department of Biochemistry. The subject of our examinations was the myosin 5a motor protein, which has essential role in the short way intracellular transport within melanocytes. Moreover, this protein is important in Purkinje cells where it is capable of transporing the SER towards the dendritic spines of the cell to enable responses to stimuli in these cells (IP<sub>3</sub>, Ca<sup>2+</sup>). The dimeric, two-headed myosin 5a is a processive motor, which means that it is capable of taking numerous enzyme cycles and mechanical steps along the actin filament without detachment. The processivity of myosin 5a is necessary to perform its function. The aim of our examinations was to find out the role of the only class specific amino acid (Y439) situated in the consensus region of switch-2 (the switch-2 loop is an active participant of the enzyme mechanism of myosins). We have made three different mutants on this class-specific position. By comparing these mutants to the wild type in fluorescence spectroscopic, steady-state and transient kinetic measurements, we have identified the differences in the enzyme mechanism caused by the mutations. We have revealed the role of this class-specific amino acid in processivity and we have demonstrated its essential role in other fundamental mechanisms of the enzyme cycle.

## 2. BEVEZETÉS

A motorfehérjék az eukarióta életforma nagyfokú komplexitásához jelentősen hozzájáruló fehérjecsoport, melyek kémiai energiát mechanikai energiává alakítva számos, különböző feladat elvégzésére specializálódott mozgatórendszer működését teszik lehetővé.

Két alapvető nagy csoportjukat a lineáris motorok, illetve a forgómotorok (ATP szintáz, bakteriális flagellum) alkotják.

A lineáris motorok közé tartoznak a citoszkéletális miozin, kinezin, dinein motorok, a polimer aktin, tubulin motorok, illetve a nukleinsav és egyéb motorokhoz tartozó az RNS-, DNS-polimerázok, helikázok, transzlokázok.

A citoszkéletális motorok közé tartozó kinezin és dinein motorok tubulinból felépülő mikrotubulusok mentén mozognak, míg a **miozin szupercsalád tagjai aktin filamentumok mentén mozgó, az ATP kötődés és hidrolízis energiáját hasznosító motorok, melyek térszerkezeti átalakulásokon keresztül képesek a kémiai energiát mechanikai energiává alakítani.**

A polimer motorokhoz tartozó, a miozinok számára „sínként” szolgáló aktin valamennyi eukarióta sejtben megtalálható. Az eukarióta sejtekben a globuláris (G-) aktin monomerek aktin filamentumokat (F-aktin) formálnak, melyek egyes esetekben (pl. az izomsejtekben és a bélhámsejtek kefeszegélyében) viszonylag állandó struktúrákat, míg más sejtekben a szálak dinamikus, szabályozott polimerizációja és depolimerizációja révén dinamikus hálózatot alakítanak ki.

A miozinok szupercsaládjá 24 fehérjecsaládra oszlik. A konvencionális miozin 2 osztály mellett, mely váz-, szív- és simaizom, illetve nem-izom miozinokat tartalmaz, az úgynevezett nem-konvencionális miozinok közé 23 különböző, funkciójuk tekintetében heterogén fehérjecsaládot sorolhatunk (miozin 1, miozin 3-24).

A miozin motorok nagy funkcionális változatosságot mutatnak, így például szerepet játszanak a váz-, szív- és simaizom kontrakcióban, intracelluláris transzport, sejt migráció és sejt differenciálódás, citokinézis, endo- és exocitózis, citoszkéleton plaszticitás folyamataiban [3, 4]. Ezt a nagyfokú funkcionális plaszticitást az biztosítja, hogy ezen motorfehérjék egyedi szekvenciális tulajdonságokkal, ezáltal egyedi háromdimenziós struktúrával rendelkeznek, mely különböző térszerkezeti átalakulásokat tesz lehetővé enzimciklusuk során ezzel támogatva működésük egyediségét.

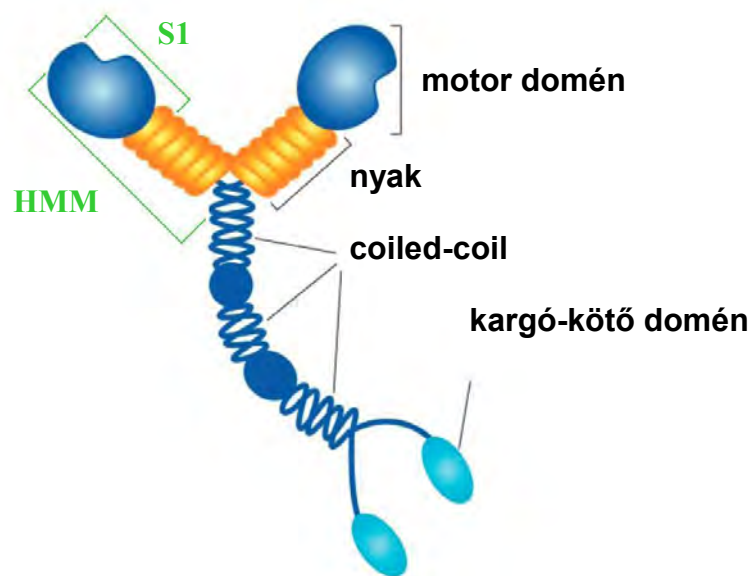
### 3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

#### A MIOZIN 5 OSZTÁLY

A miozin 2 osztály mellett legtöbbször a miozin 5 osztályt tanulmányozták, melynek gerincesekben három génje ismert. Ezen gének termékei a miozin 5a, 5b, illetve a miozin 5c izoformák, melyek különböző funkciót töltenek be az eukarióta sejtek „életében”.

A miozin 5a motorfehérje vezikulumok és sejtorganellumok rövidtávú intracelluláris transzportját végzi [5-9], a miozin 5b motor a receptor feldolgozás (transzferrin receptor [10], muszkarin-acetilkinin receptor [1]) folyamataiban vesz részt, míg a miozin 5c a membránforgalom egyes folyamatainak (transzferrin receptor) lebonyolításában játszik szerepet [11].

A miozin 5 osztály képviselőinek szerkezetét az 1. ábra mutatja [12]. Az osztály mindhárom képviselőjének szerkezetét két dimerizált nehézlánc és nehézlánconként hat könnyűlánc alkotja. A nehézláncok N-terminális „feji” régióját egy-egy motordomén illetve egy-egy erőkar alkotja. Az erőkarok IQ motívumaihoz kapcsolódnak a reguláló funkciójú könnyűláncok. Az erőkar C-terminálisán helyezkedik el a dimerizációért felelős coiled-coil formáló régió és az azt követő kargó kötő domén.



1. ábra: A miozin 5 motorok szerkezete [12]

A három izoforma elsődleges szerkezetét tekintve megközelítőleg 50 %-ban mutat egyezést: a miozin 5c motordoménjének aminosav szekvenciája 62%-os egyezést mutat a miozin 5a , illetve a miozin 5b izoformával egyaránt, coiled-coil régiójuk 20-30%-a azonos, illetve némi szekvenciális különbség figyelhető meg a kargó kötő régióban.

A miozin 5a [2, 13-17], - 5b [18], illetve a miozin 5c [11] izoformák részletes kinetikai analízise azt mutatja, hogy a három izoforma elsődleges szerkezetében (ezáltal konformációjában is) megfigyelhető finom, de egyben jelentős különbségeik eltérő kinetikai sajátosságokkal rendelkező mechanizmust biztosítanak.

Az osztály képviselőinek részletes kinetikai analízise alapján a következők állapíthatók meg:

A miozin 5a és 5b izoformák *processzív* enzimikus mechanizmust mutatnak, valamint enzimciklusukban az erős aktinkötött állapotok dominálnak (*high duty ratio, magas terhelési arány*), enzimciklusuk sebesség-meghatározó lépése az ADP felszabadulás az aktomiozin komplexről.

A miozin 5c izoforma nem mutat *processzív* működési mechanizmust, valamint enzimciklusában a gyenge aktinkötött állapotok dominálnak (*low duty ratio, alacsony terhelési arány*), enzimciklusának sebesség-meghatározó lépése a  $P_i$  felszabadulás az aktomiozin- ADP komplexről, mely alapján biokémiailag a nagy sokaságban működő miozinokkal (pl. izom miozin 2) mutat hasonlóságot.

Az egyes izoformák eltérő szekvenciális adottságai, eltérő mechano-kémiai mechanizmust biztosítanak, melynek eredményeképpen a három izoforma eltérő funkció betöltésére specializálódott.

## A MIOZIN 5a ENZIMCIKLUSA

A miozin 5a kétféjű egyedi molekulaként lépegető mozgást végez az aktin filamentum mentén [19]. E jól karakterizált mozgást a két fej összehangolt (fázisában elcsúsztatott) működése teszi lehetővé [20]. A miozin 5a **processzív** motorfehérje, azaz számos enzimátikus ciklus – és azzal járó mechanikai lépés – elvégzésére képes az aktin filamentumról való leválás nélkül.

Működésének kulcsa – a többi miozin osztályhoz hasonlóan – a miozin fej (motor domén) ATP- és aktin kötőhelyei, illetve a mozgást felerősítő erőkar intramolekuláris kommunikációjában rejlik.

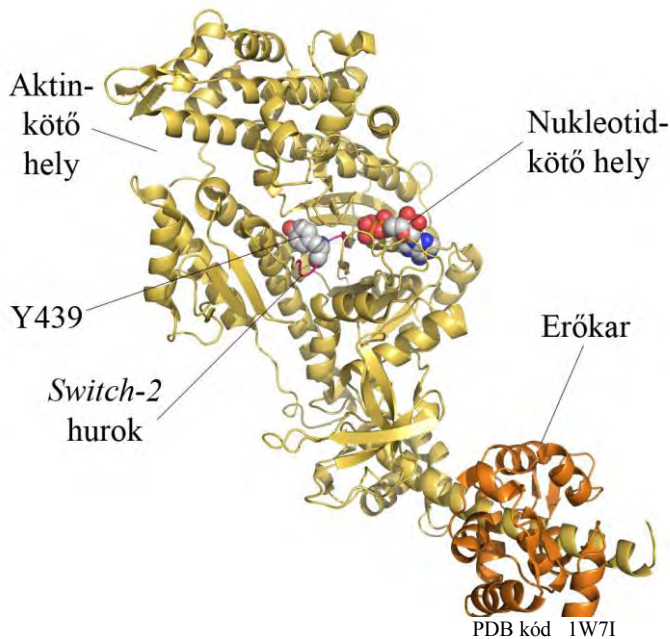
A miozin 5 processzív mozgásának kinetikai feltétele, hogy a miozin fej az ATPáz ciklusidő nagy részét aktinhoz kötött állapotban töltsse. Ezért a miozin 5 enzimátikus mechanizmusa (azon belül döntően a termék-felszabadulási lépések kinetikája) drasztikusan eltér az izom miozin 2-étől [11]. Miozin 5 esetén a sebesség-meghatározó lépés az ADP felszabadulása az aktomiozinról [2]. Ez a tulajdonság biztosítja az aktomiozin-ADP komplex hosszú életidejét.

A **switch-2** hurok valamennyi miozin (illetve kinezin és G-fehérje) nukleotid-kötő helyének konzervatív szerkezeti eleme, amely **aktív résztvevője az enzimátikus mechanizmusnak** (2. ábra) [3]:

- Hozzájárul az ATP-hidrolízis katalíziséhez, és konformáció-változása felerősíti az emelőkar kilendülését;
- Specifikus konformációt vesz fel a miozin 5 rigor (nukleotid-mentes, aktin-kötött) állapotában, ami szerepet játszhat a miozin 5 jellegzetes kinetikai sajátságainak kialakításában;
- Konformációja érzékeny az aktívhely nukleotid tartalmára.

Az ATP kötődése a nukleotid kötőhelyre konformáció-változást indukál, melynek hatására csökken a miozin aktin affinitása, ami a miozin aktinról való disszociációját eredményezi (3. ábra). Az ATP kötés kiváltja a **switch-2** nyitott-zárt konformációs átmenetét. Így a **switch-2** olyan állapotba kerül, amely biztosítja egy, az ATP-hidrolízishez kulcsfontosságú H-kötés

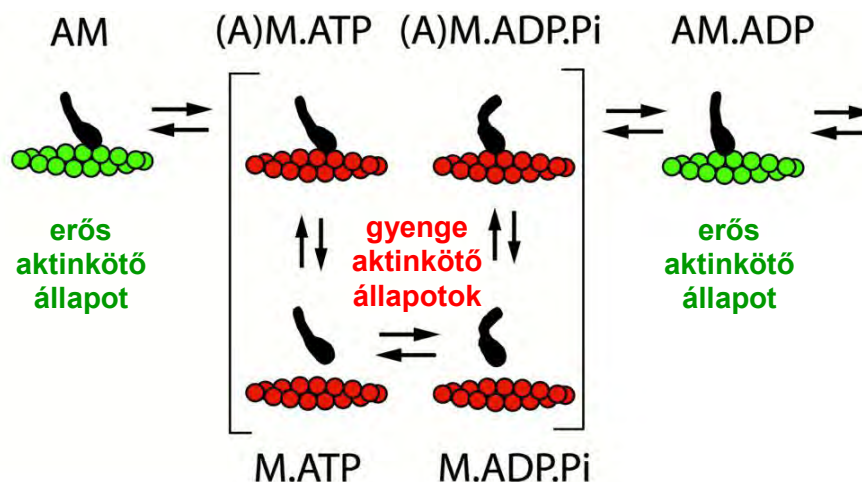
kialakulását, mely a hurok glicinjének főlánca (miozin 5-ben G440) és az ATP  $\gamma$ -foszfátja között alakul ki.



2. ábra: A miozin 5 fej szerkezete a switch-2 hurok nyitott állapotában [26]

A hidrolízist követően kialakuló miozin.ADP.P<sub>i</sub> komplex az ATP állapothoz hasonlóan alacsony aktin-affinitású (3. ábra). Az ebből az állapotból való továbbhaladáshoz a *switch-2* újbóli kinyílása szükséges, amely lehetővé teszi a foszfát felszabadulást (miozin 2 esetén ez a sebesség-meghatározó lépés [21]) és a vele járó erőgeneráló lépést. Ekkor ismét erős aktin-kötő állapot (aktomiozin.ADP komplex) alakul ki, melyről az ADP leválásával a

ciklus a végéhez ér, illetve újraindul ATP jelenlétében (3. ábra). Ellentétben a miozin 2-vel, a miozin 5 motor ciklusidejének legnagyobb részét a fent említett erős aktinkötő aktomiozin.ADP állapotban tölti, mivel az ADP disszociációja a sebesség-meghatározó lépés. A miozin 5 aktomiozin.ADP állapotának hosszú életideje lehetővé teszi, hogy a kétféjű miozin 5 molekulában az éppen lépő (ATP-kötött) fej számára a tartó (aktin- és ADP-kötött) fej elegendő időt biztosítson a lépés elvégzéséhez.



3. ábra: A miozin működési ciklusa [4]. Rövidítések: A: aktin, M: miozin, Pi: foszfát

## TERHELÉSI ARÁNY ( DUTY RATIO)

Eltérő funkciójukból adódóan az egyes miozin osztályok képviselői eltérő kinetikai paraméterekkel rendelkeznek. A ciklusidőnek az erős aktinkötő állapotokban eltöltött hányada **(terhelési arány, *duty ratio*)** fontos funkcionális paraméter: a nagy sokaságban működő miozinok (pl. izom miozin 2) esetén alacsony (kb. 4 %), míg a kétféjű egyedi molekulaként működő miozin 5a esetén magas terhelési arány (70-80 %) szükséges [4]. Ezt a nagyfokú kinetikai plaszticitást, amely a funkció szolgálatában áll, a különböző miozinok aminosav-szekvenciájából eredő térszerkezeti feltételeknek kell biztosítania. A nukleotid kötőhely és az aktin kötőhely állapota a ciklus egyes állomásain kulcsfontosságú az említett szempontból. A fentebb említett ***switch-2* hurok** (konzervatív szekvenciája LDIXGFE) **a miozin fej egyik olyan szerkezeti eleme, amely kiválóan alkalmas a kinetikai/mechanikai sajátságokat meghatározó szerkezeti tényezők vizsgálatára.** Az X-szel jelölt középső pozícióban szekvencia variabilitás tapasztalható az egyes miozin osztályok között: miozin 2-ben alanin vagy szerin van jelen, míg a miozin 5 tirozint tartalmaz ebben a pozícióban [3].

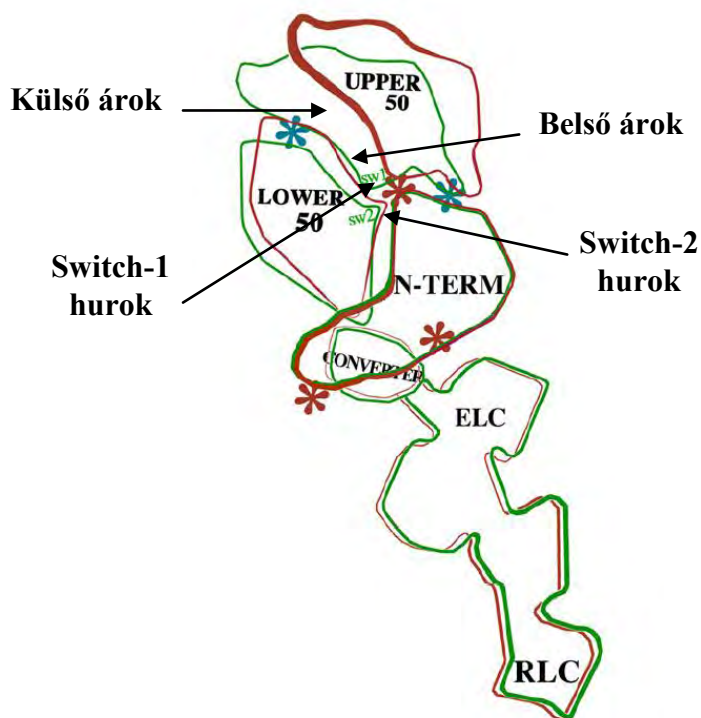
## A MIOZINOK RIGOR ÁLLAPOTA

Az egyes miozin osztályok képviselőinek működési mechanizmusát szerkezeti szempontból vizsgáló kutatások eredményei azt mutatják, hogy a miozinok rigor (nukleotid-mentes, aktin-kötött) állapotában a különböző miozin osztályok képviselői bizonyos kulcsfontosságú régiókat tekintve eltérő szerkezeti sajátosságokat mutatnak, mely szoros kapcsolatban állhat a kinetikai paraméterek modulálásával, ezáltal részt véve a molekula egyedi funkciójának kialakításában.

Ezen kutatások alapján a motordomén

- **belső árkának** (az aktinkötő árok belső, a nukleotidkötő-helyhez közeli része) és
- **külső árkának** (aktinkötő árok külső, az aktinnal kölcsönható része) állapota (nyitott, zárt), továbbá
- az aktinkötő - helyen található, az aktin- és a nukleotid kötőhelyek közötti kommunikációt biztosító **switch-1 hurok** állapota (nyitott, zárt),
- a nukleotidkötő - helyen található **switch-2 hurok**nak (4.ábra) ezen régiókhöz viszonyított pozíciója

a miozinok rigor állapotában eltérést mutat az egyes miozin osztályok esetében [22].



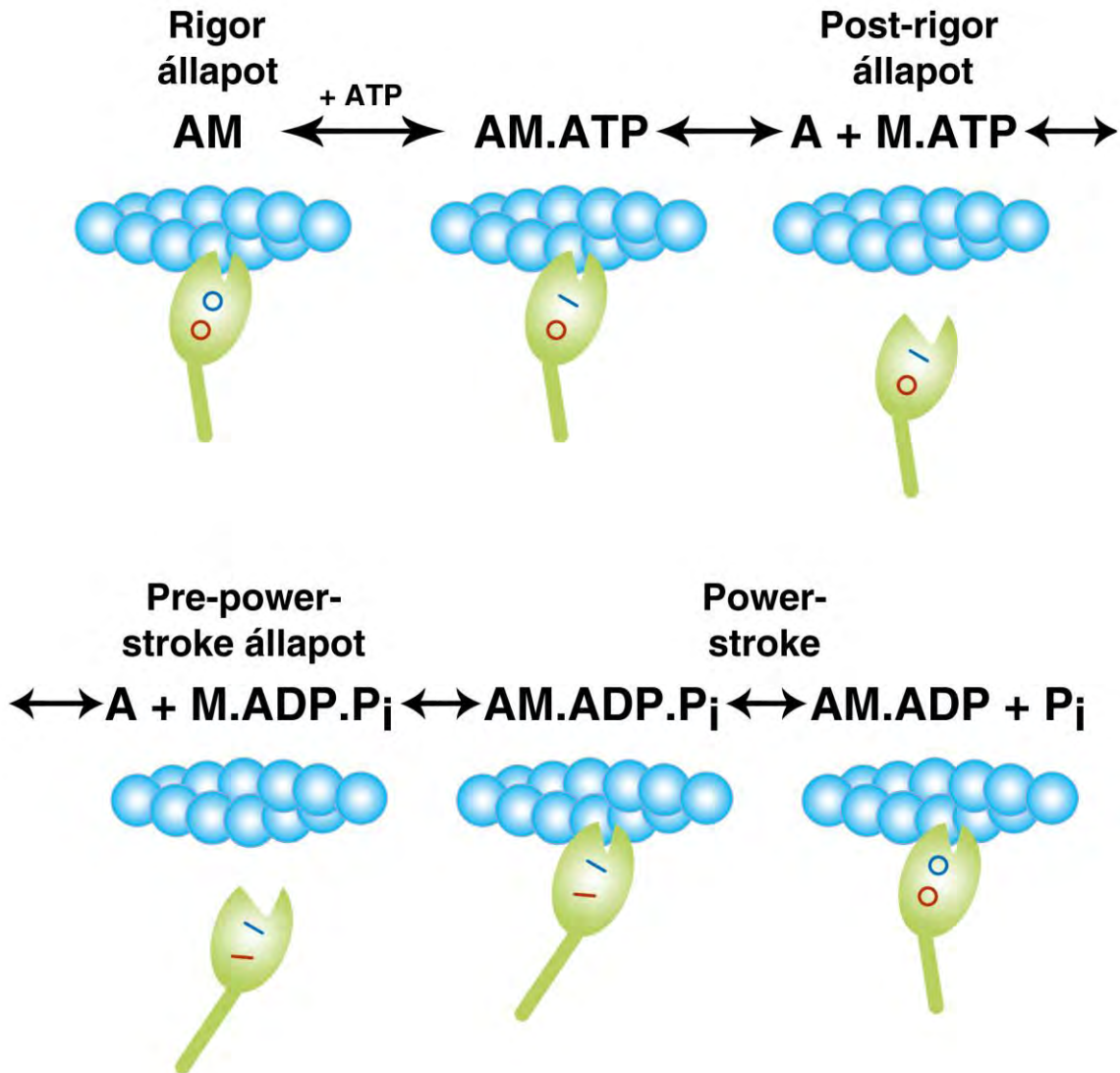
4. ábra: A belső árok, a külső árok, valamint a switch-1 és switch-2 régiók pozíciója. (izom miozin S1 rigor-like (zöld) és post-rigor (piros) állapota.) [22]

Az alábbi miozinok rigor szerkezetének vizsgálata alapján a *Placopecten magellanicus* fésűkagyló faj héjzáró és testfal miozin 2, a *Loligo pealei* kalmár miozin 2, *Dictyostelium* nyálkgomba miozin 2, - miozin 6, illetve a csirke miozin 5a rigor állapotában a **külső árok** és a **belső árok**, valamint a **switch-1** hurok az alábbi állapotban fordulnak elő [22]:

	<i>Külső árok</i>	<i>Belső árok</i>	<i>Switch-1</i>
<i>Placopecten magellanicus</i> héjzáró miozin 2	<b>zárt</b>	<b>nyitott</b>	<b>zárt</b>
<i>Placopecten magellanicus</i> testfal miozin 2	<b>zárt</b>	<b>nyitott</b>	<b>zárt</b>
<i>Loligo pealei</i> miozin 2	<b>zárt</b>	<b>nyitott</b>	<b>zárt</b>
<i>Dictyostelium discoideum</i> miozin 2	<b>nyitott</b>	<b>zárt</b>	<b>nyitott</b>
<i>Dictyostelium discoideum</i> miozin 6	<b>nyitott</b>	<b>nyitott</b>	<b>zárt</b>
<i>Gallus gallus</i> miozin 5a	<b><u>zárt</u></b>	<b><u>zárt</u></b>	<b><u>nyitott</u></b>

1. táblázat: Különböző miozinok rigor állapotában a *külső árok*, *belső árok*, valamint a *switch-1* hurok állapota.

A *külső árok*nak, a *switch-1* és a *switch-2* huroknak az alábbi ábrán feltüntetett állapotai figyelhetők meg a miozin enzimeciklus egyes állomásain:



5. ábra: Miozin 5 motordomén outer cleftjének, illetve switch-2 és switch-1 régiójának állapotai az enzimeciklus egyes állomásain. *Árok a motordoménen* : outer cleft, *Kék kör/vonal* : switch-1 hurok nyitott/zárt állapota. *Inner cleft* (nincs feltüntetve): ellentétesen mozog a switch-1-gyel, *Piros kör/vonal*: switch-2 hurok nyitott/zárt állapota. A switch-2 nyitott állapotában: erőkar lecsapott, switch-2 zárt: erőkar felhúzott, switch-1 nyitott: gyenge nukleotid kötés, zárt: erős nukleotid kötés, outer cleft nyitott: gyenge aktin kötés, outer cleft zárt: erős aktin kötés.

Az enzimeciklus rigor állapotában az inner és outer cleft, valamint a switch-1 hurok állapota és a switch-2 hurok pozíciója a különböző miozinok esetében eltérő lehet. Ez a szerkezeti variabilitás eltérő kinetikai feltételeket teremt a rigor állapotból való továbbhaladáshoz az enzimeciklus rigort követő lépései („*post-rigor*”) felé.

A *switch-2* hurok konzervatív szekvenciájában (LDIXGFE) egyetlen aminosav (X) variábilis a miozin osztályok között, ezért az X pozícióban található aminosav az egyetlen elem a hurkon belül, mely hozzájárulhat a *switch-2* hurok eltérő pozicionálásához.

A miozin 5 motor tirozint tartalmaz az X pozícióban (2.ábra), mely nagy aminosav lévén szterikus feszültséget okoz az aktívhely környezetében, ezáltal eltérő pozícióba kényszeríti a *switch-2* hurkot azon miozinokhoz képest, melyek kis aminosavat (miozin 2: alanin, szerin) tartalmaznak a *switch-2* X pozíciójában.

## 4. CÉLKITŰZÉS

Kísérleteinkben a *switch-2* konzervatív szekvenciájában (LDIXGFE) található variábilis X pozíciónak a miozin 5a processzív mechanizmusában betöltött szerepét vizsgáljuk. **Vizsgálatainkkal információt szeretnénk nyerni arról, hogy a miozin 5a aktívhelyszerkezetének finomhangolása hogyan járul hozzá a processzív mozgási mechanizmushoz.** Vad típusú miozin 5a-ban a *switch-2* tirozint tartalmaz az X pozícióban. Kísérleteinkben az ehelyütt létrehozott pontmutációknak a vad típus enzimatisz mechanizmusára gyakorolt hatását vizsgáljuk.

A következő pontmutánsokat készítettük el: **Y439A, Y439S, Y439E**

Az Y439A és Y439S mutánsok a miozin 5a-tól drasztikusan eltérő működésű miozin 2 vad típusú szekvenciáját utánozzák[3], míg az Y439E egy már jellemzett mesterséges miozin 2 mutáns [23] miozin 5-ös változata.

*A továbbiakban a miozin 5a izoformát az egyszerűség kedvéért miozin 5-ként említem.*

## 5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Kísérleteinkhez egyfejű miozin 5 fej (S1, lásd 1. ábra) konstrukciókat hoztunk létre, melyek segítségével az eredetileg kétfejű miozin 5 egyedi fejeinek kinetikai sajátságai a két fej közötti kooperatív hatások eliminálásával tisztán vizsgálhatók. (A miozin fej önmagában mutatja a teljes molekulára jellemző katalitikus aktivitást.) Az egyfejű konstrukciók tulajdonságainak részletes ismeretében lesz később értelmezhető a kétfejű molekula viselkedése.

Az egyfejű miozin 5 mutánsok mintájára létrehoztunk kétfejű (HMM, lásd 1. ábra) miozin 5 mutánsokat is, melyeket egyedi molekula motilitás vizsgálatokban fogunk karakterizálni.

### 5.1 EGYFEJŰ MIOZIN 5 PONTMUTÁNSOK LÉTREHOZÁSA ÉS VIZSGÁLATA

Munkám során a témavezetőm által korábban elkészített, a fenti pontmutánsokat illetve vad típusú kontrollt kódoló rekombináns bacmid DNS konstrukciókkal dolgoztam bakulovírus-Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) rovarsejt expressziós rendszerben.

#### TRANSZFEKCIÓ

A rendelkezése álló négy bacmid konstrukciót transzfektáltuk Sf9 rovar sejtbe Cellfectin (Invitrogen) reagens segítségével. A rekombináns bacmid DNS nem épül be a rovarsejt genomjába. A Cellfectin reagens liposzómát képezve bevonja a bacmid DNS-t, ami elősegíti a sejtbe jutást és a fertőzőképes vírusok termelődését. Folyamatosan fenntartott Sf9 sejt kultúrából 30 ml  $4,5 \cdot 10^5$ /ml sejt koncentrációjú kultúrát állítottunk elő. Három darab steril, 6-lyukú műanyag edény minden egyes rekeszébe 2 ml sejt kultúrát pipettáztunk és 1 óráig inkubáltuk 27°C-on. A fenti inkubációs idő alatt konstrukciónként két-két Eppendorf csőbe csőenként 5  $\mu$ l (1  $\mu$ g/ $\mu$ l) bacmid DNS-t tettünk, majd térfogatukat antibiotikum-mentes táptalajjal 100  $\mu$ l-re egészítettük ki. 50 ml-es Falcon-csőbe 45  $\mu$ l Cellfectin reagenst pipettáztunk és 705  $\mu$ l antibiotikum-mentes táptalajt mértünk hozzá. Az így készült elegyből 100-100  $\mu$ l-t mértünk az Eppendorf-csövek tartalmához és 45 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten. Ezután a 200  $\mu$ l elegyet tartalmazó csövekhez 0,8-0,8 ml antibiotikum-mentes táptalajt adtunk. A 2 ml „mosó” táptalajt óvatosan eltávolítottuk a sejtekről, az 1-1 ml

bacmid DNS-Cellfectin keveréket a sejtekhez pipettáztuk és 5 óráig inkubáltuk 27°C-on. Ezután a transzfekciós keveréket eltávolítottuk a sejtekről és 2 ml antibiotikumot tartalmazó táptalajra cseréltük, majd a sejteket 72 óráig 27°C-on inkubáltuk. Az inkubációs idő elteltével a felülúszót eltávolítottuk a sejtekről (a felülúszó az első generációs vírusokat (P1) tartalmazza), és 2% (vol/vol) FBS-t (Fetal Bovine Serum) hozzákeverve hidegszobában, fénytől védve tároltuk.

## VÍRUS-AMPLIFIKÁCIÓ

50 ml ( $8 \cdot 10^5$ /ml) Sf9 sejt kultúrát 1 ml P1 vírussal fertőztünk, majd 48 óráig rázattuk 27°C-on. 50 ml-es Falcon csőben (Janetzki K23 centrifugával, 1000 rpm-en) centrifugáltuk a kultúrát, steril tárolólombikba összegyűjtöttük a felülúszót (második generációs vírus, P2), majd 2% FBS-t adtunk hozzá. A továbbiakban 4°C-on tároltuk fénytől védve. 100 ml ( $8 \cdot 10^5$ /ml) Sf9 sejt kultúrát 1 ml P2-vel fertőztünk és 48 óráig rázattuk 27°C-on. Két darab 50 ml-es Falcon csőben (K23, 1000 rpm) centrifugáltuk a kultúrát, steril tárolólombikba összegyűjtöttük a felülúszót (P3), majd 2% FBS-t adtunk hozzá. A továbbiakban 4°C-on tároltuk fénytől óvva.

## PRÓBA-EXPRESSZIÓ

1%, 3%, 10% (vol/vol) P3-mal 3db 50 ml-es ( $2 \cdot 10^6$ /ml) Sf9 sejt kultúrát fertőztünk meg és 72 óráig rázattuk 27°C-on. Centrifugálással (K23, 1000 rpm) összegyűjtöttük a sejteket, és 5 ml PBS-ben (50 mM foszfát puffer pH 7,4, 100 mM NaCl) felszuszpendáltuk. Ezután SDS gélelektroforézis/Western blot módszerrel ellenőriztük a fehérje-expresszió hatásfokát (8. ábra).

## FEHÉRJEKONSTRUKCIÓK (vad típus, Y439A, Y439S, Y439E) EXPRESSZIÓJA

A fehérjekonstrukciók expressziója során az SDS gélelektroforézis/Western blot segítségével meghatározott optimális fertőzési vírus-koncentrációt (10 % vol/vol) alkalmaztuk. 400 ml  $2 \cdot 10^6$ /ml koncentrációjú Sf9 sejt kultúrát fertőztünk meg 10 % (vol/vol) P3-mal, illetve 0,5 % (vol/vol) könnyűlánc (kalmodulin) vírussal, majd 72 óráig rázattuk 27°C-on. Centrifugálással (Beckman L7-65 centrifuga, 5', 3000 rpm, 4°C) összegyűjtöttük, majd PBS-sel mostuk az összegyűjtött sejteket. A PBS eltávolítása után folyékony nitrogénben gyorsfagyasztottuk, majd -80°C-on tároltuk a sejteket. Az expresszió hatásfokát SDS gélelektroforézis/Western

blot módszerrel ellenőriztük. Valamennyi miozin 5 konstrukció nehézláncához C-terminális FLAG-címkét fuzionáltattunk a könnyebb tisztíthatóság érdekében.

## FLAG-CÍMKÉS MIOZIN KONSTRUKCIÓK PREPARÁLÁSA

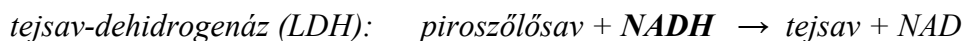
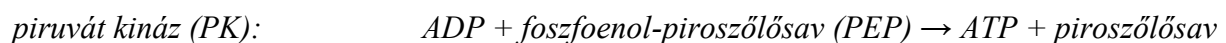
A fagyasztott sejteket 80 ml extrakciós pufferben (10 mM MOPS pH 7,3, 200 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 3 mM NaN<sub>3</sub>, 2 mM ATP, 0,1 mM DTT, proteáz inhibitor mix) felolvasztottuk és homogenizáltuk. Fénymikroszkóppal ellenőriztük az intakt sejtek arányát a lizátumban, majd szonikáltuk a sejteket a tökéletesebb lízis érdekében. Ezután a sejttörmelékot centrifugálással távolítottuk el (15', 20000 rpm, Jouan KR22i centrifuga), és a felülúszót megőriztük. Az összegyűjtött felülúszóhoz 1,5 ml FLAG affinitás gyantát (Sigma) adtunk és egy éjszakán át forgatva kevertettük 4°C-on. Ezután a gyantát centrifugáltuk (2', 1000rpm, K23), majd a centrifugacső tartalmának felső, gyantát nem tartalmazó részét eltávolítottuk. M-ATP puffert (10 mM HEPES pH 7,2, 0,1 mM EGTA, 3 mM NaN<sub>3</sub>, 0,5 M NaCl, 0,1 mM DTT, 1 mM ATP, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) adunk a gyantához, óvatosan összeráztuk, az így kapott elegyet centrifugáltuk (5', 1000rpm, K23 centrifuga) és a felülúszót külön edénybe gyűjtöttük. Az összegyűjtött gyantát kromatográfiás oszlopba töltöttük és egy oszloptérfogatnyi M-ATP pufferrel átmostuk. Az átfolyót összegyűjtöttük. A gyantát 3 oszloptérfogat HMM pufferrel (10 mM HEPES pH 7,2, 0,1 mM EGTA, 3 mM NaN<sub>3</sub>, 0,1 mM DTT) átmostuk, a mosófolyadékot összegyűjtöttük. A rekombináns fehérjét 0,3 mg/ml FLAG-peptidet tartalmazó oldattal eluáltuk. Lassú átfolyási sebesség (<1 ml/perc) mellett 1 ml-es frakciókat gyűjtöttünk. A frakciók fehérjetartalmát Bradford reagenssel ellenőriztük mikrotitráló lemezen (a FLAG-peptid oldatát használtuk fehérjementes kontrollként). A fehérjét tartalmazó frakciókat Q-Sepharose ioncserélő oszlopra kötöttük (100 mM ionerősségnél), majd M-ATP pufferrel eluáltuk (I > 500 mM) koncentrált fehérje-frakciók nyerése érdekében. A fehérje-frakciókat tárolópufferben dializáltuk (10 mM HEPES pH 7,2, 0,1 mM EGTA, 3 mM NaN<sub>3</sub>, 0,1 M NaCl, 1 mM DTT) és koncentrációjukat Bradford reagenssel meghatároztuk. A gyűjtött mosópufferek fehérjetartalmának SDS gélelektroforézissel végzett analíziséből következtettünk a preparálás során keletkező esetleges fehérjevesztésre, amely 10 %-nál kevesebb volt. A preparálás sikerességét SDS-PAGE segítségével ellenőriztük (9. ábra).

## TRIPTOFÁN FLUORESZCENCIA SPEKTROSZKÓPIA

A miozin 5 fehérjeminták triptofán fluoreszcencia intenzitását nukleotid távollétében (apo állapot), illetve 100  $\mu\text{M}$  ADP vagy 0,5 mM ATP jelenlétében mértük SPEX FluoroMax spektrofluoriméterrel, mikroküvetében (200  $\mu\text{l}$  térfogat) 25°C-on a következő mérési pufferben: 10 mM HEPES pH 7,0, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,15 mM EGTA, 100 mM KCl, 1 mM DTT. A triptofánoknak a tirozinoktól független szelektív gerjesztését 297 nm-en értük el (gerjesztési sávszélesség: 1 nm). A fluoreszcencia-emissziós spektrumokat 310 és 430 nm között vettük fel (emissziós sávszélesség: 4 nm). Valamennyi spektrumot négy alkalommal vettünk fel. A fehérjementes mérési pufferrel felvett spektrumokat kivontuk a miozin spektrumokból. Ügyeltünk rá, hogy az ATP-s méréseknél a szubsztrátot akkora feleslegben adjuk a miozinhoz, hogy a steady-state ATP hidrolízis reakció ne érjen véget a mérési idő alatt.

## STEADY-STATE BAZÁLIS (AKTIN-MENTES) ATPáz AKTIVITÁS MÉRÉSE

Az ADP és ATP optikai tulajdonságai megegyeznek, így az ATPáz aktivitás közvetlen optikai mérése nem lehetséges. Ezért az alábbi kapcsolt reakciósorozatban elbomló NADH 340 nm-es hullámhosszon mért abszorbancia-változásából ( $\epsilon_{\text{NADH}, 340} = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) következtetünk az ATPáz aktivitás mértékére:



A mérést a triptofán fluoreszcencia-méréseknél leírt pufferben, 45 egység/ml PK, 57 egység/ml LDH, 200  $\mu\text{M}$  NADH, 1 mM PEP és 1 mM ATP jelenlétében 1  $\mu\text{M}$  miozin koncentrációnál végeztük 500  $\mu\text{l}$  térfogatban 25°C-on. (A PK és LDH koncentrációkat a gyártó (Sigma) szerinti enzim-egységekben tüntettük fel.) Az  $A_{340}$  érték időbeli változását Shimadzu UVPC fotométer kinetikai moduljának segítségével követtük, 1 cm úthosszú kűvetta használatával. Az ATPáz aktivitást az abszorbancia időbeli változásához illesztett lineáris függvény meredekségéből ( $dA_{340}/dt$ ) számítottuk az alábbi módon:

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

## AKTIN-AKTIVÁLT ATPáz AKTIVITÁS MÉRÉSE

A miozin 5 konstrukciók aktin-aktivált ATPáz aktivitását is a fenti módon végeztük, azzal a különbséggel, hogy a mérési puffer nem tartalmazott KCl-ot (az ionerősség emelésével az aktin-telítődés nehezen kimérhetővé válik). A konstrukciók ATPáz aktivitását 0,3-10  $\mu\text{M}$  közötti aktin koncentrációknál határoztuk meg. Az aktin önálló ATPáz aktivitásából (és nem a miozin aktiválásából) eredő, a miozin elhagyásával készített mintákban mért háttér ATPáz aktivitást minden esetben levontuk az aktomiozin minták aktivitásából.

## ATP-KÖTÉS MÉRÉSE

Az ATP kötődése a miozin nukleotid-kötőhelyére rövid időskálán ( $< 1$  s) lejátszódó folyamat, így a reakció kinetikájának nyomon követésére KinTek és BioLogic *stopped-flow* tranziens kinetikai mérőműszereket használtunk, amelyekkel a reagensek 1 ms holtidővel összekeverhetők, és a reakció során bekövetkező optikai változások követhetők. A mérés során 1  $\mu\text{M}$  miozint különböző koncentrációjú (5-25  $\mu\text{M}$ ) fluoreszcensen jelölt ATP-vel (dmantATP = N-metilantraniloil-2'-dezoxi-ATP) kevertünk össze 1:1 térfogatarányban, 25°C-on, a következő mérési pufferben: 20 mM HEPES pH 7,0, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,1 mM EGTA, 50 mM KCl, 1mM DTT. (A mérés előtt a miozin mintákat 20 egység/ml apirázzal inkubáltuk (25°C, 30') a nem kívánatos nukleotidok eltávolítása érdekében.) A dmantATP-t 280nm-en gerjesztettük (a fehérje-triptofánokról történő energia-transzfer révén), és a fluoreszcencia-emissziót 400 nm-es felüláteresztő (*long-pass*) optikai szűrőn keresztül detektáltuk. (A feltüntetett koncentrációk minden esetben a keverés előtti koncentrációk a *stopped-flow* kísérletekben.)

## ADP-KÖTÉS MÉRÉSE

A mérést az ATP kötés vizsgálatánál leírt reagens koncentrációknál és körülmények között végeztük, dmantATP helyett dmantADP használatával. (dmantADP előállítás: 0,04  $\mu\text{M}$ -os nyúl vázizom miozin 2-vel hidrolizáltattunk dmantATP-t a tranziens kinetikai méréseinknél használt pufferben 4,5 órán át 25°C-on – a hidrolízishez szükséges optimális időt a vázizom miozin átviteli száma és a koncentrációk ismeretében számítottuk.)

## ATP-INDUKÁLT AKTOMIOZIN DISSZOCIÁCIÓ MÉRÉSE

A mérést megelőzően 0,4  $\mu\text{M}$ -os miozin és 0,7  $\mu\text{M}$ -os fluoreszcensen jelölt aktin (pirén-aktin) oldatát apirázzal inkubáltuk az ATP-kötésnél leírt módon. A mérés során aktomiozin komplexet tartalmazó mintát különböző koncentrációjú (10-1000  $\mu\text{M}$ ) ATP-vel kevertük össze 1:1 térfogatarányban 25°C-on a *stopped-flow* műszerben. A fluoreszcens jelet adó pirén-aktint 365 nm-en gerjesztettük, az emissziót 400 nm-es felüláteresztő optikai szűrőn keresztül detektáltuk. A méréshez használt pirén-aktinhoz másfélszeres moláris feleslegben falloidint (Invitrogen) adtunk az aktin filamentumok stabilizálása érdekében.

## AKTOMIOZIN KOMPLEX ADP-AFFINITÁSÁNAK MÉRÉSE

Az ADP kötődése az aktomiozin komplexhez nem eredményez fluoreszcencia-változást a pirén-aktomiozin komplexben, így az ADP affinitás csak közvetetten mérhető. A mérés előtt 0,7  $\mu\text{M}$  miozin és 0,5  $\mu\text{M}$  pirén-aktin oldatát inkubáltuk különböző koncentrációjú (0-30  $\mu\text{M}$ ) ADP-vel. Az így készült titrálási sor minden tagját 200  $\mu\text{M}$  ATP oldattal kevertük össze 25°C-on a *stopped-flow* műszerben. Az így kapott ATP-indukált aktomiozin-disszociációs tranziensek kétfázisúak voltak: a gyors fázis a nukleotid-mentes pirén-aktomiozin ATP-indukált disszociációját mutatta, míg a lassú fázis esetében az ADP-kötött pirén-aktomiozinnál az ADP-nek el kellett távoznia (lassú lépés), hogy az ATP-kötés megtörténhessen. A lassú fázis frakcionális amplitúdójából így következtethettünk az ADP-telítettség mértékére és a pirén-aktomiozin ADP affinitására. A mérési puffer megegyezett a fentebbi tranziens kinetikai méréseinknél használt pufferrel.

## AKTIN-KÖTÉS MÉRÉSE

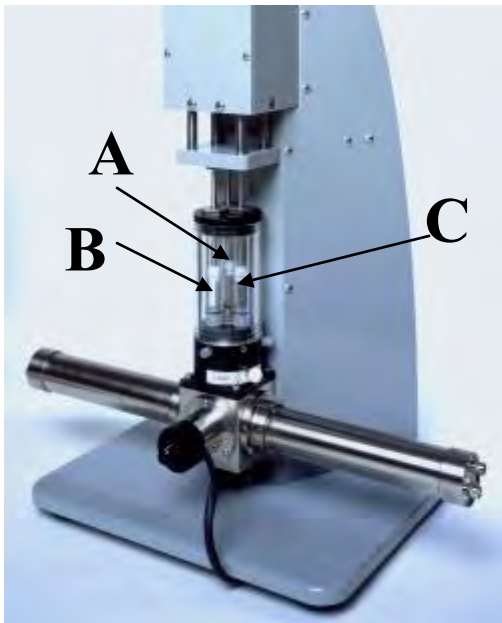
A fenti módon apirázzal inkubált 0,2-1,3  $\mu\text{M}$  miozin oldatokat ötszörös feleslegben lévő pirén-aktinnal kevertük össze 1:1 térfogatarányban, és a pirén-aktin fluoreszcencia-változását detektáltuk *stopped-flow* műszerrel. A mérési puffer megegyezett a fentebbi tranziens kinetikai méréseinknél használt pufferrel. A kötés hőmérséklet-függésének méréséhez a kísérletet 3,4 - 25,4°C közötti hőmérsékleteken végeztük.

## NUKLEOTID-MENTES AKTOMIOZIN DISSZOCIÁCIÓJÁNAK MÉRÉSE

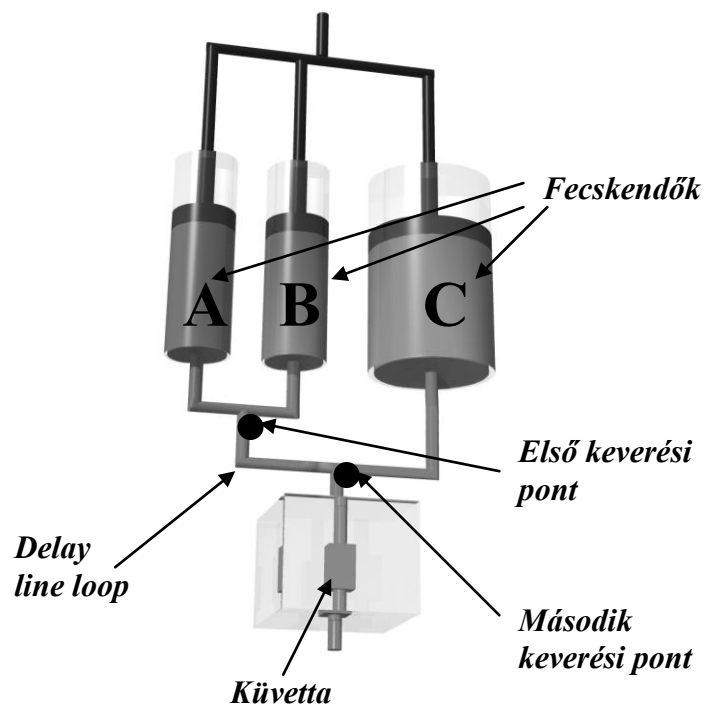
0,8  $\mu\text{M}$  miozint és 1  $\mu\text{M}$  pirén-aktint tartalmazó aktomiozin komplex fluoreszcencia-változását követtük nyomon 10  $\mu\text{M}$  jelöletlen aktin hozzáadása után 25°C-on Spex fluoriméterben. A pirén-aktin fluoreszcencia változásának követésével vizsgáltuk a miozin disszociációját a pirén-aktinról. A mérést megelőzően a mintákat a fenti módon apirázzal inkubáltuk. A minták elkészítéséhez a tranziens kinetikai méréseinknél használt puffert alkalmaztuk.

## P<sub>i</sub> FELSZABADULÁS MÉRÉSE

A P<sub>i</sub> disszociáció vizsgálatát Stopped-flow apparátus (6-7. ábra) segítségével végeztük, a készülék *Double mix* üzemmódját használva.



6. ábra: KinTek stopped-flow tranziens kinetikai mérőműszer képe (KinTek Corp.)



7. ábra: KinTek stopped-flow felépítésének sematikus rajza (Simon Zoltán)

A KinTek és BioLogic *stopped-flow* tranziens kinetikai mérőműszereket tranziens kinetikai folyamatok vizsgálatára használjuk. Ezen készülékek segítségével a reagensek 1 ms

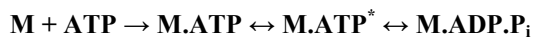
hoididővel összekeverhetők, és a reakció során bekövetkező optikai változások követhetők nyomon.

*Single mix* üzemmódban **A** és **C** fecskendőket használjuk, mert **A** és **B** használata esetén a keverés utáni hoididő jelentősen megnőne a reakcióelegy *delay line loopban* töltött ideje miatt (7. ábra), így a reakció lezajlana már a küvettába érkezés előtt, ahol a detektálás történik.

*Double mix* üzemmódban az **A**, **C** illetve **B** fecskendőt egyaránt használjuk. A *Double mix* üzemmód lényege, hogy az **A** és **B** fecskendőben lévő anyagok összekeverése után beállítható a második keverés (**AB** mix keverése a **C** fecskendő tartalmával) előtti reakcióidő hossza.

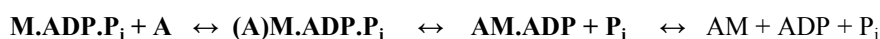
A miozin 5 S1 konstrukciók  $P_i$  disszociációjának mérése során az **A** fecskendő (2 ml): 1  $\mu\text{M}$  miozint, **B** fecskendő (2 ml): 1  $\mu\text{M}$  ATP-t, **C** (1 ml): 0-100  $\mu\text{M}$  aktint tartalmazott (a feltüntetett koncentrációk a keverés előtti koncentrációk). Az első keverés a miozin és ATP összekeverésére szolgált illetve a második keverés előtti hoididő hosszának optimalizálásával beállítható volt, hogy a második keverést megelőzően a reakció eljusson az ATP hidrolíziséig, de a reakció ne jusson el a termékfelszabadulási lépésekig ( $P_i$  felszabadulás, ADP felszabadulás).

Első keveréstől a második keverésig lezajló lépései az enzimciklusnak:



A második keverés során 0-100  $\mu\text{M}$ -os növekvő aktin koncentrációjú oldatokat kevertünk a reakcióelegyhez és a különböző aktinkoncentrációk jelenlétében vizsgáltuk a  $P_i$  felszabadulást.

A második keverés után lezajló lépései az enzimciklusnak:



Az **AM.ADP** komplexről felszabaduló  $P_i$ -ot a fluoreszcensen jelölt PBP (foszfát - kötő protein) köti meg (melyet mind a miozin, aktin és ATP oldat esetében 3  $\mu\text{M}$ -os koncentrációban alkalmaztunk) és a kötődés hatására kialakuló fluoreszcencia változást detektálja a stopped-flow apparátus.

Az oldatok készítéséhez használt puffert (20 mM HEPES, pH 7,0, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM EGTA, 50 mM KCl, 1mM DTT, 0,5 mM 7-metilguanozin, 0,02 egység/ml (Sigma definíció szerint) purin-nukleozid foszforiláz (az utóbbi két komponens az esetleges foszfát-szennyezés eltávolítására szolgál)), illetve a méréshez használt oldatokat műanyag edényben készítettük, hogy elkerüljük a P<sub>i</sub> kioldódását az üvegedényekből.

## 5.2 KÉTFEJŰ MIOZIN 5 (HMM) KONSTRUKCIÓK LÉTREHOZÁSA

Célunk az volt, hogy a mutáns miozin 5 S1 (egyfejű, a miozin 2 szubfragmentum 1-hez hasonló) konstrukciók (Y439A, Y439S, Y439E) mintájára létrehozzuk a mutáns miozin 5 HMM (kétfajű, a fejeken kívül egy, a dimerizációért felelős coiled-coil „farok”-darabot is tartalmazó, a miozin 2 nehéz meromiozin (HMM) fragmentumához hasonló) konstrukciókat is. A mutáns HMM konstrukciók klónozása során a már rendelkezésre álló, pFastBac1 klónozó vektorban lévő mutáns miozin 5 S1 konstrukcióinkat (Y439A, Y439S, Y439E), illetve pVL 1392 vektorban lévő vad típusú miozin 5 HMM konstrukciókat használtunk fel.

### EMÉSZTÉS

A pFastBac1 vektorban lévő mutáns miozin 5 S1 konstrukciókat illetve pVL 1392 vektorban lévő vad típusú miozin 5 HMM konstrukciókat Eco81I (hasítóhely: CC <sup>^</sup> TNA <sup>^</sup> GG) restrikciós endonukleázzal emésztettük.

Mindhárom mutáns konstrukció és a vad típusú konstrukció esetében is az emésztést 50 µl végtér fogatú reakcióelegyben végeztük az alábbiak szerint: 42 µl (6,3 µg) miniprep plazmid, 3 µl Eco81I (10U/µl; Fermentas), 5 µl Tango puffer. Az így kapott reakcióelegyeket 4 óráig inkubáltuk 37°C-on. Az enzimet úgy választottuk, hogy az emésztés eredményeként kihalított 1765 bp hosszúságú szakaszba mind a mutánsok, mind a vad típusú konstrukció esetén belessen a switch-2 hurok (LDIXGFE) **X** pozíciójának aminosavat kódoló bázis triplet (a pFastBac1-S1 konstrukciók esetén: 5367-5369. bp = **X**, pVL 1392 - HMM konstrukciók esetén: 5463-5465. bp = **X**).

Az emésztést követően a vad típusú HMM konstrukció 5' foszfátját CIAP enzim segítségével eltávolítottuk: az 50 µl végtér fogatú Eco81I-vel emésztett vad típusú HMM konstrukciót

tartalmazó mintához 0,5 µl CIAP (1 U/µl , Fermentas) enzimet adtunk és 30 percig inkubáltuk 37 °C-on.

## AZ EMÉSZTETT FRAGMENTUMOK IZOLÁLÁSA GÉLBŐL

1 %-os agaróz gélen (1 g agaróz/ 100 ml 1\*TAE (Trisz (4,84 g/l), acetát (1,142 ml/l), 10 mM EDTA pH: 8)) futtatuk az emésztett pFastBac1 vektorban lévő mutáns miozin 5 S1 DNS konstrukciókat, illetve a pVL 1392 vektorban lévő CIAP enzimmel kezelt vad típusú miozin 5 HMM DNS konstrukciókat. Az emésztett mintákat 10 µl 6 x Loading Dye Solution (Fermentas #R0611) kezelővel kevertük össze és 3 µl GeneRuler 1kb DNS létra (Fermentas #SM0311; 0,5 µg /µl) mellett futtattuk 45 percig 120 mA áramerősségen. A futtatás célja az volt, hogy az emésztés révén létrejött kis (1765 bp) és nagy DNS fragmentumokat (11158 bp) elválasszuk egymástól. Az elválasztás lehetővé tette, hogy éles, steril penge segítségével a vad típusú miozin 5 HMM konstrukciót tartalmazó pVL 1392 vektorból emésztés után visszamaradt nagy DNS fragmentumot (11158 bp), illetve a mutáns miozin 5 S1 konstrukciókat (Y439A, Y439S, Y439E) tartalmazó pFastBac1 vektorból emésztés után visszamaradt kis DNS fragmentumot (1765 bp, ez a szakasz tartalmazza a switch-2 hurkot kódoló DNS szakaszt) elkülönítsük a továbbiakban nem használandó DNS fragmentumoktól. A ligálandó DNS fragmentumokat gélextrakciós kittel (*Qiagen, QIAquick Gel Extraction Kit*) izoláltuk az alábbiak szerint:

A pengével kivágott (a ligálandó DNS fragmentumokat tartalmazó) géldarabok tömegét lemértük, majd háromszoros géltérfogat QG puffert adtunk hozzájuk. A mintákat 50°C-os vízfürdőbe helyezve inkubáltuk 10 percig (illetve a gél teljes felolvadásáig). A gél felolvadása érdekében az elegyet az inkubálás alatt két-három alkalommal óvatosan kevertük. Az inkubálást követően egy géltérfogat izopropanolt adtunk a mintákhoz és összekevertük. Az így kapott mintákat szilika-gél membrán oszlopra (QIAprep spin column) vittük fel és 1 percig centrifugáltuk (13000 rpm-en). Az átfolyót eltávolítottuk és 0,5 ml QG puffert adtunk a szilika-gél membrán oszlopokhoz, majd 1 percig centrifugáltuk (13000 rpm-en). Az átfolyót ismét eltávolítottuk és 0,75 ml PE puffert adtunk a szilika-gél membrán oszlopokhoz, majd 1 percig centrifugáltuk (13000 rpm-en), majd ismételen 1 percig centrifugáltuk .

A szilika-gél membrán oszlopokat (QIAprep spin column) Eppendorf-csővekbe helyeztük, majd 50 µl 50°C-os EB oldattal (alacsony ionerő, pH 7), 2 percig inkubáltuk a membránon lévő DNS fragmentumokat, majd centrifugálással (1 perc, 12000 rpm) lemostuk a DNS-t az

oszlopról. A kapott mintákat 2-2 µl-ét 1 %-os agarózgélben futtatuk az inszert / vektor arány megállapítása érdekében.

## LIGÁLÁS

T4 DNS ligáz (Fermentas) enzimmel a mutáns miozin 5 S1 konstrukciókat (Y439A, Y439S, Y439E) tartalmazó pFastBac1 vektorból emésztés után visszamaradt kis DNS fragmentumokat (= inszertek, 1765 bp, ez a szakasz tartalmazza a switch-2 hurkot kódoló DNS régiót) illesztettük egyenként a vad típusú miozin 5 HMM konstrukciót tartalmazó pVL 1392 vektorból emésztés után visszamaradt nagy DNS fragmentumba (11158 bp). A ligálási reakció előtt a fent már említett agaróz gélelektroforézis segítségével állapítottuk meg az inszert és a vektor moláris arányát. Azonos térfogatokat futtatva a vektorból és az inszertből, megállapítható a gélből izolált minták molaránya. Figyelembe véve, hogy a vektor mérete megközelítőleg hétszerese (11158 bázispár) az inszertnek (1765 bázispár), kiszámolhatóak a szükséges térfogatok a ligálási reakcióhoz (hogy az inszert/vektor molaránya 3/1 legyen).

A reakció 10 µl végtérfogatban zajlott: 1 µl T4 ligáz enzimet (Fermentas) és 1 µl T4 ligáz puffert használva a maradék 8 µl mennyiséget kellett elosztani az inszert és a vektor között, hogy molarányuk 3/1 legyen (inszert 3 µl, vektor: 5 µl).

Negatív kontrollként az alábbi mintát alkalmaztuk: 10 µl végtérfogatban 1 µl T4 ligáz enzim (Fermentas) és 1 µl T4 ligáz puffer, a vad típusú miozin 5 HMM konstrukciót tartalmazó pVL 1392 vektorból emésztés után visszamaradt és izolált nagy DNS fragmentumot tartalmazó mintájának 5 µl-e (reprezentálva ezzel a többi mintát) és 3 µl steril desztillált víz. Az így összemért reakcióelegyet szobahőmérsékleten 3 óráig inkubáltuk.

## TRANSZFORMÁLÁS ÉS A TRANSZFORMÁLT SEJTEK NÖVESZTÉSE

A mutáns miozin 5 HMM konstrukciókat (Y439A, Y439S, Y439E) amplifikálás céljából *Escherichia coli* Top 10 (Invitrogen) kompetens törzsbe transzformáltuk. 50 µl *Escherichia coli* Top 10 sejthez 1,5 µl DNS-t (ligátumot) adtunk és 30 percig inkubáltuk jégen. 1 percig 42 °C-os vízfürdőben hősokkoltuk a mintákat, melyet 5 perc jégen történő inkubáció követett. 300 µl antibiotikumtól mentes LB (5g NaCl (*Sigma*), 5 g élesztő kivonat (*OXOID Yeast Extract*), 10 g pepton (*OXOID Proteose Peptone*) 1 liter kétszer desztillált vízben oldva)

tápoldat hozzáadása után 45 percig rázattuk a sejteket (170 rpm, 37°C). Ez alatt az idő alatt a transzformáns sejtek ampicillin rezisztenciájához szükséges  $\beta$ -laktamáz génről megtörténik az átíródás. Ezután a mintákat ampicillin tartalmú LB-agar lemezekre (5 g NaCl, 5 g élesztőkivonat, 10 g agar (Molar Chemicals), 10 g pepton, 100  $\mu$ g/ml ampicillin (Sigma) 1 liter kétszer desztillált vízben oldva) szélesztettük, majd egy éjszakán át növesztettük 37°C-on.

Másnap a lemezeken kinőtt telepeket átoltottuk 5 ml 100  $\mu$ g/ml ampicillint tartalmazó LB tápoldatba (1-1 jól elkülönült telepet 5 csőbe, mindhárom mutáns esetében), majd egy éjszakán át 37°C-on rázattuk.

## MINIPREP KÉSZÍTÉSE

A mutáns miozin 5 HMM-et tartalmazó vektorok izolálása transzformált *E. coli* sejtekből *Qiagen QIAprep MiniPrep Kit* segítségével történt, az alábbiak szerint:

Az egy éjszakán át 37°C-on rázatott 5 ml transzformáns *E. coli* sejteket Eppendorf-csőbe gyűjtöttük centrifugálással (13000 rpm, 5 perc). A sejteket felsuszpendáltuk 250  $\mu$ l P1 oldatban (RNáz tartalmú). A sejteket 250  $\mu$ l P2 oldat (SDS tartalmú – sejtek feltárása) hozzáadásával lizáltuk, majd óvatos forgatással kevertük (a LyseBlue reagens miatt elkékült a minta). Nagy ionerejű (nagy  $K^+$  ion koncentrációjú) N3 oldat 350  $\mu$ l-ét adtuk a mintákhoz (hozzáadásával a kromoszomális DNS, fehérjék, sejtörmelék kicsapódnak az oldatból), majd óvatosan forgatva azonnal összekevertük. A képződött csapadékot centrifugálással (10 perc, 13000 rpm) leüleptítettük. A plazmid DNS-t tartalmazó felülúszót átvittük szilika-gél membrán oszlopra (QIAprep spin column). A centrifugálás (1 perc, 13000 rpm) során az alkalmazott nagy ionerőn a plazmid DNS a membránon megkötődik. Ezután az oszlopot 500  $\mu$ l PB pufferrel mostuk (centrifugálás 1 perc, 13000 rpm). Az oszlopot 750  $\mu$ l etanol tartalmú PE (sómentesítés) oldattal átmostuk (centrifugálás 1 perc, 13000 rpm). Majd a membránon maradó etanol nyomokat újabb centrifugálással (1 perc, 13000 rpm) eltávolítottuk.

50  $\mu$ l 50°C-os EB oldattal (alacsony ionerő, pH 7) 1 percig inkubáltuk a membránon lévő plazmid DNS-t, majd centrifugálással (1 perc, 13000 rpm) lemostuk a plazmid DNS-t az oszlopról. Az izolálást követően az izolált plazmid DNS-t tartalmazó mintákat 1 %-os agaróz gélen futtattuk, hogy ellenőrizzük az izolálás sikerességét.

## HMM KONSTRUKCIÓK TRANSZFEKCIÓJA

Ráztatott kultúrában folyamatosan fenntartott Sf9 sejtéből  $4,5 \cdot 10^5$  /ml sejt koncentrációjú kultúrát állítottunk elő. Steril 6-lyukú lemez 5 rekeszébe 2 ml  $4,5 \cdot 10^5$  /ml sejt koncentrációjú Sf9 sejtet pipettáztunk. Egy rekesz negatív kontrollként, a további négy a vad és mutáns (Y439A, Y439S, Y439E) HMM konstrukciók transzfekeciójára szolgált.

A 6-lyukú lemezrere kimért kultúrákat 30 percig inkubáltuk 27°C-on. A sejtek inkubálási ideje alatt 4 darab steril 10 ml-es Falcon csőben 5 µg (33,33 µl; az egyes konstrukciók miniprep koncentrációja: 150 µg/ml) pVL transzfer vektort (ezen vektorok tartalmazzák a mutáns illetve vad típusú HMM konstrukciókat) és 0,5 µg (5 µl) BaculoGold DNS-t (BD BaculoGold<sup>TM</sup>, Linearized Baculovirus DNA) kevertünk össze és 5 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten. Az 5 perces inkubálási idő elteltével 1 ml Transzfekeciós Puffer B-t (BD BaculoGold<sup>TM</sup>) adtuk minden egyes DNS mixhez.

A 6-lyukú lemez aljára kitapadt Sf9 sejtekről pipettával óvatosan eltávolítottuk a táptalajt (ügyelve arra, hogy a kitapadt sejteket ne bolygassuk), kivéve a negatív kontrollról és minden egyes rekeszhez 1 ml Transzfekeciós Puffer A-t (BD BaculoGold<sup>TM</sup>) adtuk.

A fent leírt módon előkészített Transzfekeciós Puffer B - DNS mixeket cseppekben a kitapasztott Sf9 sejtekhez adtuk és minden ötödik csepp után óvatosan kevertük, majd négy óráig inkubáltuk 27°C-on.

Az inkubációs idő elteltével a táptalajt eltávolítottuk a sejtekről és 3 ml Szérum Médiumra (Insect Express médium (Lonza), 10% Fetal Bovine Serum, 1% Penicillin-Streptomycin) cseréltük (mosási lépés). Ezután a táptalajt ismét eltávolítottuk és 3 ml friss Szérum Médiumra cseréltük, majd 4 napig inkubáltuk 27°C-on.

Az inkubálási idő elteltével a transzfekeció sikerességét fénymikroszkóp segítségével vizsgáltuk: az egyes konstrukciókat tartalmazó rekeszekben az Sf9 sejtek konfluenciáját hasonlítva a negatív kontrollhoz.

A felülúszót eltávolítottuk a sejtekről (a felülúszó az első generációs vírusokat (P1) tartalmazza), és 2% (vol/vol) FBS-t (Fetal Bovine Serum) hozzákeverve hidegszobában, fénytől védve tároltuk.

## VÍRUS-AMPLIFIKÁCIÓ, FEHÉRJEKONSTRUKCIÓK (vad típus, Y439A, Y439S, Y439E) EXPRESSZIÓJA

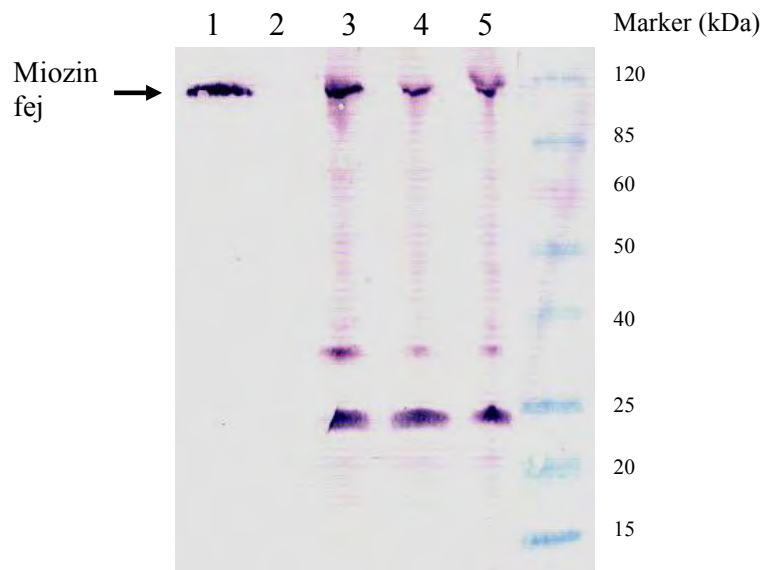
A vírus-amplifikáció, valamint a fehérjekonstrukciók expressziója az egyfejú, S1 konstrukcióknál leírtak szerint történt. A HMM konstrukciókkal folytatott munkákat a közeljövőben a FLAG-címkés miozin 5 HMM konstrukciók preparálása követi.

## 6. EREDMÉNYEK

### 6.1 EGYFEJŰ MIOZIN 5 PONTMUTÁNSOK LÉTREHOZÁSA ÉS VIZSGÁLATA

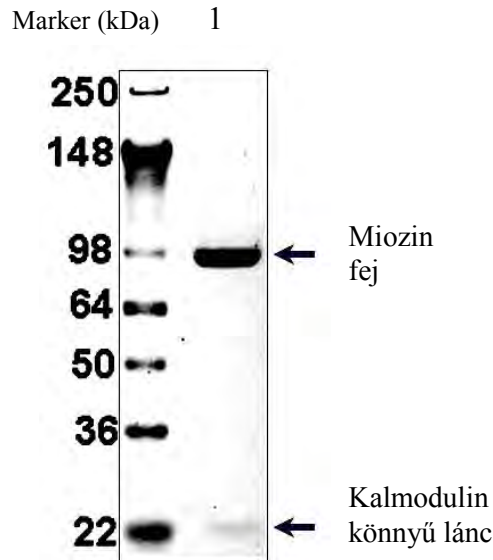
#### A REKOMBINÁNS FEHÉRJÉK EXPRESSZIÓJA ÉS PREPARÁLÁSA

A rekombináns fehérjék expresszióját kis mennyiségű Sf9 sejtlyázátum Western blot analízisével ellenőriztük (8. ábra). A nitrocellulóz membránon jól látható a pozitív kontrollként alkalmazott tisztított, FLAG-címkés miozin fej fragmentum, illetve az Y439A mutáns miozin 5 konstrukció 1, 3, 10 % (vol/vol) vírussal fertőzött Sf9 sejt, amely fehérje megjelenése a membránon a sikeres fehérje-expressziót mutatja (a miozin fej nehézlánc molekulatömege 110 kDa). A nitrocellulóz membránon megjelent kisebb molekulahúlyú fehérjék az Sf9 sejt olyan endogén fehérjéi, amelyek festődnek az anti-FLAG antitesttel.



8. ábra: Sf9 sejtlyázátumok anti-FLAG antitesttel végzett Western blot analízise. 1: pozitív kontroll (tisztított FLAG-címkés miozin fej), 2: negatív kontroll (vírussal nem fertőzött Sf9 sejt), 3-5: különböző mennyiségű Y439A mutáns miozin 5 bakulovírussal fertőzött Sf9 sejt (3: 10 % (vol/vol) vírus, 4: 3 % (vol/vol) vírus, 5: 1 % (vol/vol) vírus)

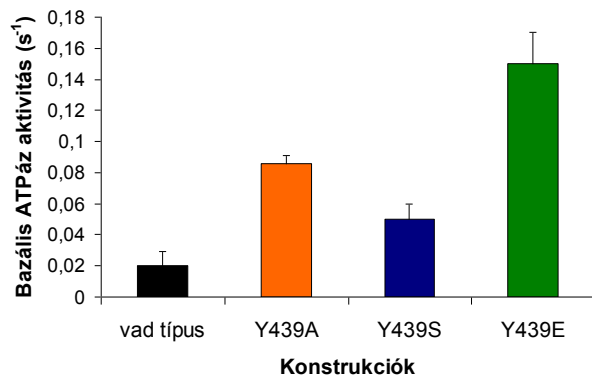
A 9. ábrán látható *SDS – PAGE* gélkép a Flag-címkés egyfejű miozin 5 Y439A konstrukció preparálásának sikerességét mutatja. A többi mutáns konstrukció esetében az Y439A mutánssal megegyező tisztaságú preparátumokat kaptunk.



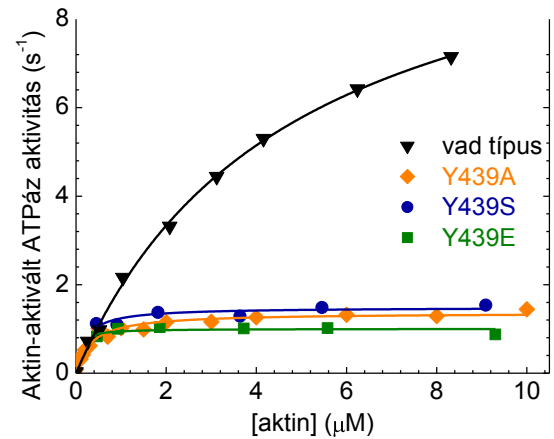
9. ábra: Tisztított Y439A konstrukció (1) Coomassie Brilliant Blue-val festett *SDS-PAGE* gélképe.

## A KONSTRUKCIÓK BAZÁLIS (AKTIN-MENTES) ÉS AKTIN-AKTIVÁLT ATPáz AKTIVITÁSA

A vad típusú kontrollal összevetve mindhárom mutáns esetében a bazális ATPáz aktivitás növekedése volt tapasztalható (10. ábra, 2. táblázat). Az Y439S mutáns esetében volt a legkisebb az aktivitás-növekedés mértéke. Az Y439E mutáns aktivitás-növekedése volt a legnagyobb, míg az Y439A mutáns köztes értéket mutatott. Az 11. ábra a miozin 5 konstrukciók aktin-aktivált ATPáz aktivitását mutatja az aktin koncentráció függvényében, amely hiperbolikus függést mutat. Az illesztett hiperbolák maximuma a maximális aktin-aktivált ATPáz aktivitást jelzi. A másik fontos paraméter a maximális aktivitás felének eléréséhez szükséges aktin koncentráció ( $K_{aktin}$ , 2. táblázat). Mindhárom mutáns maximális aktivitása jelentősen a vad típusé alatt maradt, a fél-telítési értéket viszont jelentősen alacsonyabb aktin koncentrációnál érték el



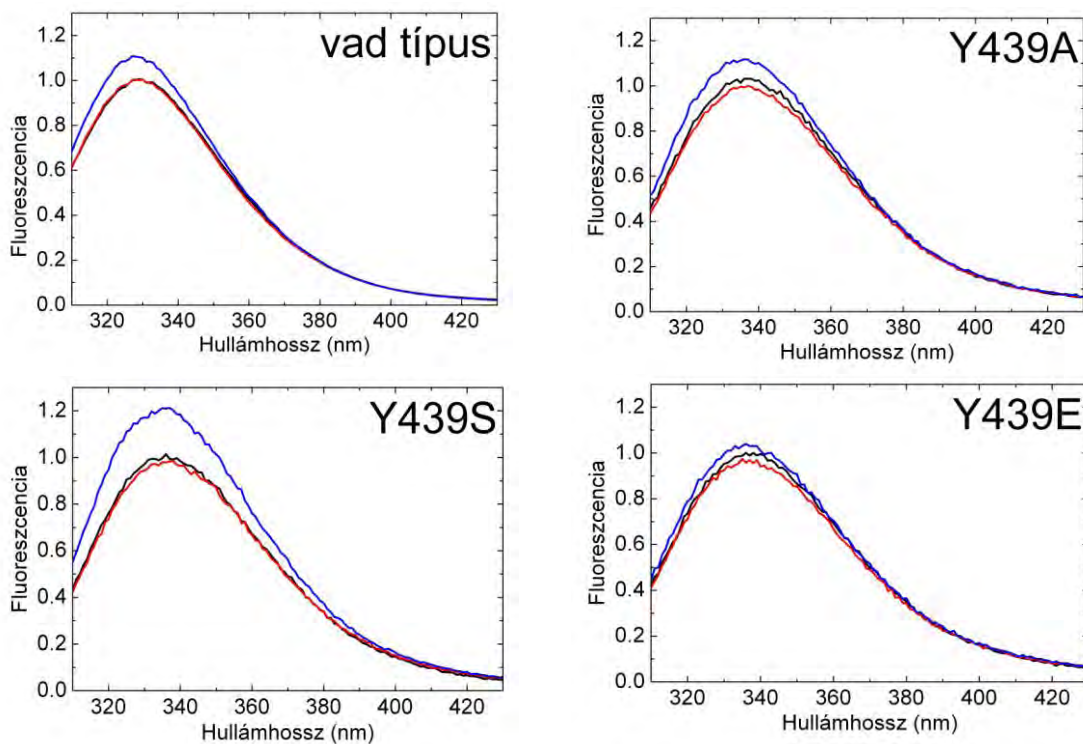
10. ábra: Miozin 5 konstrukciók bazális ATPáz aktivitása



11. ábra: Miozin 5 konstrukciók aktin-aktivált ATPáz aktivitása

## TRIPTOFÁN FLUORESZCENCIA VÁLTOZÁSOK ADP ÉS ATP KÖTÉSÉRE

A miozin fej nukleotid-kötés hatására bekövetkező triptofán fluoreszcencia-változásáért az erőkar bázisánál található triptofán (miozin 5-ben W483) felelős [2, 24]. Az e triptofánt tartalmazó hurok a *switch-2* huroktól való távoli helyzetének ellenére a *switch-2* konformáció-változását is jelzi (ezek a szerkezeti elemek együtt mozognak az ATPáz ciklus során [25]).



12. ábra: Triptofán fluoreszcencia emisszió változása ADP és ATP kötésre  
Fekete: apo-miozin, piros: miozin + ADP, kék: miozin + ATP

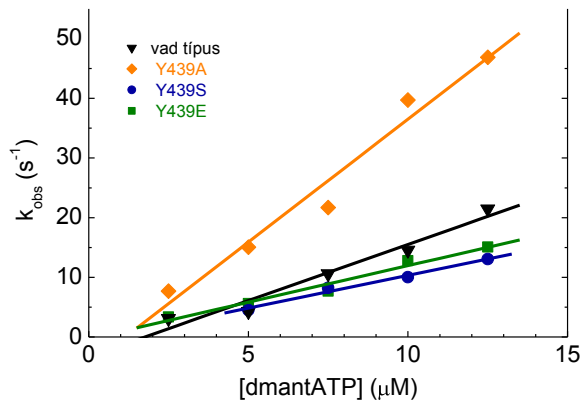
ADP kötésre az alap triptofán fluoreszcencia értékhez képest nem volt tapasztalható számottevő változás sem a mutáns konstrukciók, sem a vad típus esetében, ami azt jelzi, hogy a *switch-2* az ADP-kötött miozin 5-ben az apo-miozin 5-höz hasonló nyitott állapotban van (12. ábra). ATP kötésre azonban jelentős triptofán fluoreszcencia intenzitás-emelkedés volt tapasztalható, amely különböző mértékű volt a vad típusú illetve mutáns konstrukciók esetében (12. ábra, 2. táblázat). Az Y439A mutáns esetében a vad típusúnál mérsékeltebb fluoreszcencia-növekedés volt tapasztalható, míg az Y439S mutáns igen jelentős fluoreszcencia-növekedést mutatott. Az Y439E mutáns esetében a fluoreszcencia-növekedés alig volt detektálható. E fluoreszcencia-változások a *switch-2* hurok nyitott és zárt állapotainak egyensúlyát jelzik ATP jelenlétében, amelynek jelentőségét az eredmények megbeszélésénél tárgyalom.

Konstrukció	Bazális ATPáz aktivitás ( $s^{-1}$ )	Triptofán fluoreszcencia változás ADP kötésre (%)	Triptofán fluoreszcencia változás ATP kötésre (%)	Maximális aktin-aktivált ATPáz aktivitás ( $V_{max}$ , $s^{-1}$ )	$K_{aktin}$ ( $\mu M$ )
vad típus	$0,020 \pm 0,009$	$\approx 0$	11	$11 \pm 1$	$4,8 \pm 0,3$
Y439A	$0,086 \pm 0,005$	$\approx 0$	8	$1,4 \pm 0,1$	$0,36 \pm 0,04$
Y439S	$0,05 \pm 0,01$	$\approx 0$	22	$1,5 \pm 0,1$	$0,20 \pm 0,08$
Y439E	$0,15 \pm 0,02$	$\approx 0$	3	$1,0 \pm 0,1$	$0,06 \pm 0,01$

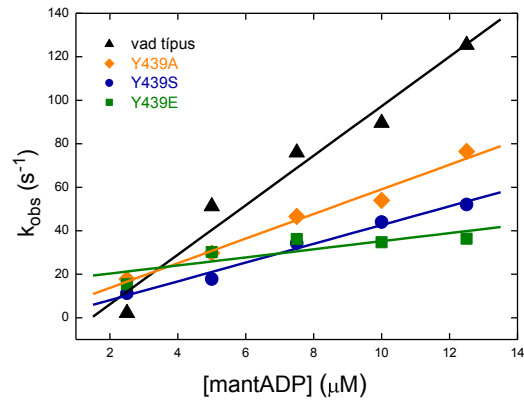
2. táblázat: Triptofán fluoreszcencia-változások, steady-state és aktin-aktivált ATPáz aktivitások

## ATP ÉS ADP KÖTÉS KINETIKÁJA

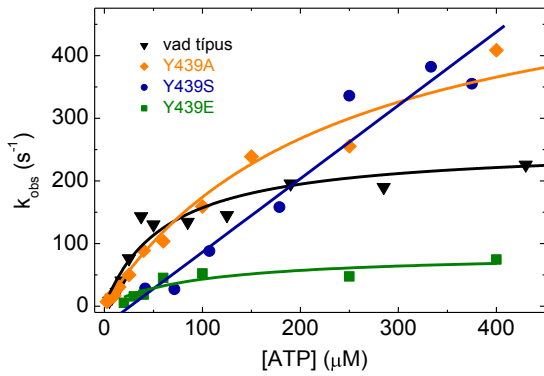
A kísérlet során a konstrukciók nukleotid kötésének kinetikáját vizsgáltuk állandó miozin és növekvő nukleotid koncentráció mellett (pszeudo-elsőrendű körülmények között, ahol a kötés exponenciális kinetikát mutatott). A kapott kötési tranziensekre illesztett exponenciális görbék megfigyelt sebességi állandóinak ( $k_{obs}$ ) a nukleotid-koncentrációtól való függéséből (azaz a lineáris függés meredekségéből) meghatároztuk a másodrendű kötési sebességi állandókat. A konstrukciók ATP kötése között nem mutatkozott nagy eltérés, csak az Y439A mutáns esetében volt a kötés jelentősen gyorsabb, mint a többi konstrukció esetében (13. ábra, 3. táblázat). ADP esetén a vad típus mutatta a leggyorsabb nukleotid-kötést, míg a mutáns konstrukciók ADP kötési sebességi állandói alacsonyabb értéknek adódtak (14. ábra, 3. táblázat).



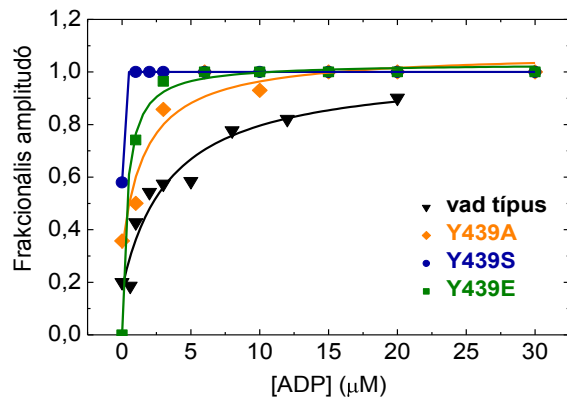
13. ábra: *dmantATP*-kötés megfigyelt sebességi állandói ( $k_{obs}$ ). Fekete: vad típus, narancssárga: Y439A, kék: Y439S, zöld: Y439E



14. ábra: *dmantADP*-kötés megfigyelt sebességi állandói. Fekete: vad típus, Jelölések a 13. ábra szerint



15. ábra: *ATP*-indukált pirén-aktomiozin disszociáció megfigyelt sebességi állandói. Jelölések a 13. ábra szerint



16. ábra: Pirén-aktomiozin-ADP-t *ATP*-vel keverve a kapott kétfázisú tranziens lassú fázisának frakcionális amplitudója (a lassú fázis a pirén-aktomiozin ADP-kötött frakcióját reprezentálja) Jelölések a 13. ábra szerint

## ATP-INDUKÁLT PIRÉN-AKTOMIOZIN DISSZOCIÁCIÓ ÉS ADP-AFFINITÁS

A konstrukciók aktinról való ATP-indukált disszociációját növekvő ATP koncentráció mellett vizsgáltuk (15. ábra). A kapott tranziensekre illesztett exponenciális görbék segítségével meghatározott megfigyelt sebességi állandók az ATP koncentráció függvényében hiperbolikus függést mutattak. Ez a viselkedés kétlépéses reakcióra utal, amely egy másodrendű kötési lépésből és az azt követő elsőrendű szerkezetváltozási (izomerizációs) lépésből áll – utóbbi válik sebesség-meghatározóvá nagy ATP koncentrációk esetén, ahol a kötés gyorsabban megtörténik. A kapott értékekre illesztett hiperbolák segítségével meghatároztuk az izomerizációs lépés sebességi állandóját (amely megegyezik az illesztett hiperbola maximumával), valamint az ATP kötés másodrendű sebességi állandóját (amely a hiperbola maximumértékének és a fél-telítési ATP-koncentráció értéknek a hányadosa) (15. ábra, 3. táblázat). Az Y439S mutáns esetében a megfigyelt sebességi állandók nem mutattak hiperbolikus telítést, így ebben az esetben az ATP-kötés másodrendű sebességi állandóját az adatokhoz illesztett egyenes meredekségéből határoztuk meg (15. ábra, 3. táblázat). Az ATP indukált pirén-aktomiozin disszociáció maximális sebességi állandói Y439E < vad típus < Y439A < Y439S sorrendben nőttek.

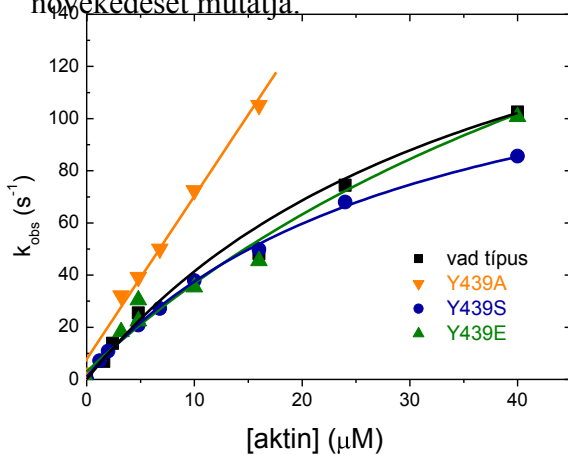
A pirén-aktomiozin komplex ADP-affinitásának vizsgálata során kapott kétfázisú tranziensek lassú fázisának frakcionális amplitudóját az ADP koncentrációjának függvényében ábrázoltuk és az illesztett hiperbolákból számítottuk a konstrukciókra jellemző ADP kötési  $K_d$  értékeket (16. ábra, 3. táblázat). Az összes mutáns esetében jelentős ADP affinitás-növekedés volt tapasztalható a vad típushoz képest (16. ábra, 3. táblázat).

Konstrukció	dmantATP kötés (miozin) ( $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )	dmantADP kötés (miozin) ( $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )	ATP kötés (pirén-aktomiozin) ( $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )	ATP kötés izomerizáció (maximális $k_{\text{obs}}$ ) ( $\text{s}^{-1}$ )	ADP disszociáció ( $\text{s}^{-1}$ ) (pirén-aktomiozin)	ADP kötés $K_d$ (pirén-aktomiozin)
vad típus	$1,9 \pm 0,2$	$11 \pm 1$	$4,1 \pm 1,0$	$260 \pm 20$	$17 \pm 3,4$	$3,5 \pm 1,49$
Y439A	$4,1 \pm 0,4$	$5,7 \pm 0,5$	$2,5 \pm 0,5$	$580 \pm 50$	$3,7 \pm 0,3$	$1,8 \pm 0,1$
Y439S	$1,1 \pm 0,1$	$4,3 \pm 0,3$	$1,2 \pm 0,1$	$> 600$	$3,7 \pm 0,3$	$< 1$
Y439E	$1,2 \pm 0,1$	$1,9 \pm 0,7$	$0,9 \pm 0,5$	$85 \pm 18$	$2,1 \pm 0,2$	$0,35 \pm 0,05$

3. táblázat: Nukleotid-kötés, ATP-indukált pirén-aktomiozin disszociáció és ADP-affinitás

## P<sub>i</sub> FELSZABADULÁS

A kísérlet során a konstrukciók P<sub>i</sub> felszabadulási kinetikáját vizsgáltuk állandó miozin és növekvő aktin koncentráció mellett (a kísérletek részletes leírását lásd az Anyagok és módszerek fejezetben). A kapott tranziensekre illesztett exponenciális görbék megfigyelt sebességi állandóit ( $k_{\text{obs}}$ ) ábrázoltuk az aktin koncentráció függvényében (17. ábra). A kapott pontokra illesztett hiperbolák maximum értéke a P<sub>i</sub> felszabadulás sebességi állandóját, míg a hiperbola féltelítési aktin koncentrációja az M.ADP.P<sub>i</sub> komplex aktin-kötési K<sub>d</sub>-ját adja meg (17. ábra, 4. táblázat). Az Y439S, Y439E konstrukciók P<sub>i</sub> felszabadulás sebességi állandója, illetve M.ADP.P<sub>i</sub> komplex aktin-kötési K<sub>d</sub>-ja (4. táblázat) kis eltérést mutatott a vad típustól, azonban az Y439A mutáns esetében a megfigyelt sebességi állandók nem mutattak hiperbolikus telítést az alkalmazott aktin koncentrációknál, mely az Y439A konstrukció P<sub>i</sub> felszabadulási sebességi állandójának és a M.ADP.P<sub>i</sub> komplex aktin-kötési K<sub>d</sub>-jának jelentős növekedését mutatja.



17. ábra: P<sub>i</sub> felszabadulás megfigyelt sebességi állandóinak aktin koncentráció függése. Fekete: vad típus, narancssárga: Y439A, kék: Y439S, zöld: Y439E

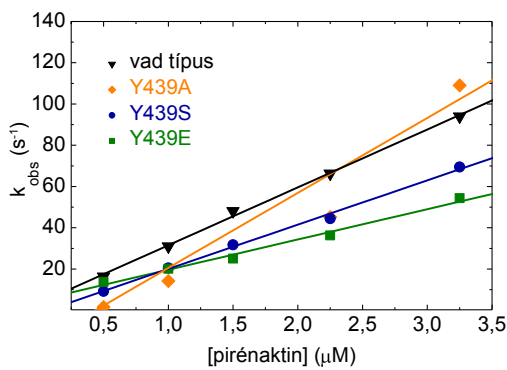
Konstrukció	P <sub>i</sub> disszociáció (s <sup>-1</sup> AM. ADP)	M.ADP.P <sub>i</sub> komplex aktin-kötési K <sub>d</sub>	V <sub>max</sub> /K <sub>M</sub> (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	P <sub>i</sub> felszabadulás egyszeri átvitel kísérlet (single turnover) Aktin távollétében (s <sup>-1</sup> )	Bazális ATPáz aktivitás (s <sup>-1</sup> )
Vad típus	270	71	5,4	0,025 ± 0,005	0,020 ± 0,009
Y439A	>120	>20	6,3	0,34 ± 0,02	0,086 ± 0,005
Y439S	150	31	4,2	0,053 ± 0,006	0,05 ± 0,01
Y439E	200	38	5,5	0,11 ± 0,003	0,15 ± 0,02

4. táblázat: P<sub>i</sub> felszabadulás sebességi állandója, M.ADP.P<sub>i</sub> komplex aktin-kötési K<sub>d</sub>-ja, és az aktin távollétében mért P<sub>i</sub> felszabadulás single turn over kísérlet sebességi állandójának összehasonlítása a bazális ATPáz aktivitás adatokkal

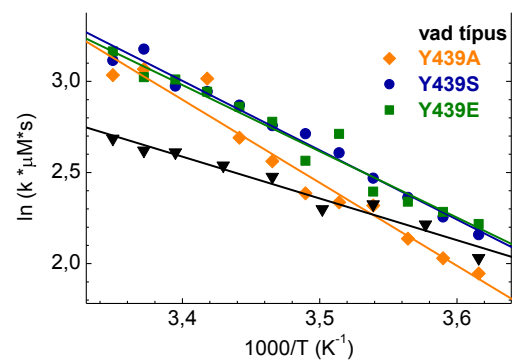
## AKTIN-KÖTÉS KINETIKÁJA ÉS HŐMÉRSÉKLET-FÜGGÉSE

A konstrukciók aktin-kötését növekvő aktin koncentrációknál vizsgáltuk (pszeudo-elsőrendű körülmények között). A kapott megfigyelt sebességi állandókat az aktin-koncentráció függvényében ábrázoltuk és az így kapott pontokra illesztett egyenes meredekségéből számítottuk ki az aktin-kötés másodrendű sebességi állandóját (18. ábra, 4. táblázat). A nukleotid-mentes pirén-aktomiozin disszociációjának sebességi állandóit a fluorimetriás mérés során kapott tranziensekhez illesztett exponenciális függvény paramétereit alapján számoltuk (4. táblázat).

Az aktin-kötés hőmérséklet-függésének vizsgálata során az aktin-kötés sebességi állandóját 3,4-25,4°C közötti hőmérsékleteken vizsgáltuk és a hőmérséklet függvényében ábrázoltuk (Arrhenius ábrázolás, 19. ábra). Az illesztett egyenesek meredekségéből számoltuk a konstrukciók aktin-kötési reakciójának aktiválási szabadentalpia-változását (19. ábra, 4. táblázat). A mutáns konstrukciók hőmérsékletfüggése, így a reakció aktiválási szabadentalpia-változása is jelentős növekedést mutatott a vad típushoz képest, melynek jelentőségét az eredmények megbeszélésénél tárgyalom.



18. ábra: Aktin-kötés megfigyelt sebességi állandói. Fekete: vad típus, narancssárga: Y439A, kék: Y439S, zöld: Y439E



19. ábra: Arrhenius ábrázolás: az aktin-kötés sebességi állandójának hőmérsékletfüggése. Fekete: vad típus, narancssárga: Y439A, kék: Y439S, zöld: Y439E

Konstrukció	Aktin-kötés sebességi állandója ( $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) 25 °C	Aktin disszociáció sebességi állandója ( $\text{s}^{-1}$ ) 25 °C	Aktinkötés $K_d$ ( $\mu\text{M}$ ) 25 °C	Aktinkötés $\Delta H^\ddagger$ (kJ/mol)
vad típus	28	$1,1 \cdot 10^{-3}$	$3,9 \cdot 10^{-5}$	$19 \pm 1$
Y439A	36	$7,6 \cdot 10^{-3}$	$2,1 \cdot 10^{-4}$	$38 \pm 3$
Y439S	22	$2,5 \cdot 10^{-3}$	$1,2 \cdot 10^{-4}$	$32 \pm 1$
Y439E	15	$3,0 \cdot 10^{-3}$	$2,1 \cdot 10^{-4}$	$30 \pm 2$

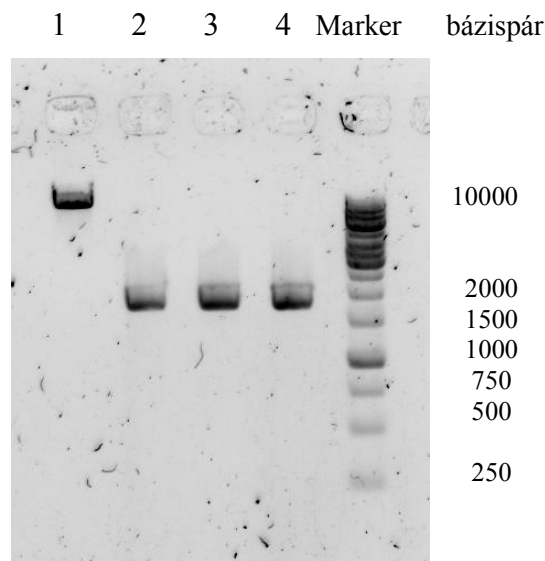
4. táblázat: Aktin-kötés és hőmérséklet-függése

## 6.2 KÉTFEJŰ MIOZIN 5 (HMM) KONSTRUKCIÓK LÉTREHOZÁSA

### MIOZIN 5 HMM KONSTRUKCIÓK KLÓNOZÁSA

*A fent ismertetett kísérletekben egyfejű miozin 5 mutáns konstrukciókon vizsgáltuk a switch-2 mutációk okozta kinetikai változásokat. Annak felderítésére, hogy ezen mutációk a mért kinetikai paramétereken keresztül hogyan befolyásolják a miozin 5 molekula motilitását és processzivitását, kétfejű (HMM) konstrukciókat állítottunk elő. A kétfejű konstrukciókkal egyedi molekula motilitás vizsgálatokat fogunk végezni.*

Három különböző (Y439A, Y439S, Y439E) miozin 5 HMM mutánst állítottunk elő, melyek esetében az S1 konstrukciókhoz hasonlóan a mutáció a switch-2 hurok (LDIXGFE) **X=439** pozícióját érintette. A 20. ábrán az Eco81I (hasítóhely: CC ^ TNA ^ GG) restriktív endonukleázzal emésztett, majd a Qiagen, QIAquick gél extrakciós kit segítségével izolált vad típusú miozin 5 HMM konstrukciót tartalmazó pVL 1392 vektorból emésztés után visszamaradt nagy DNS fragmentum (= vektor, 1.), illetve a mutáns (Y439A, 2.; Y439S, 3.; Y439E, 4.) miozin 5 S1 konstrukciókat tartalmazó pFastBac1 vektorból emésztés után visszamaradt kis (1765 bp, ez a szakasz tartalmazza a switch-2 hurkot kódoló DNS szakaszt) DNS fragmentumok (= inszert) láthatók.

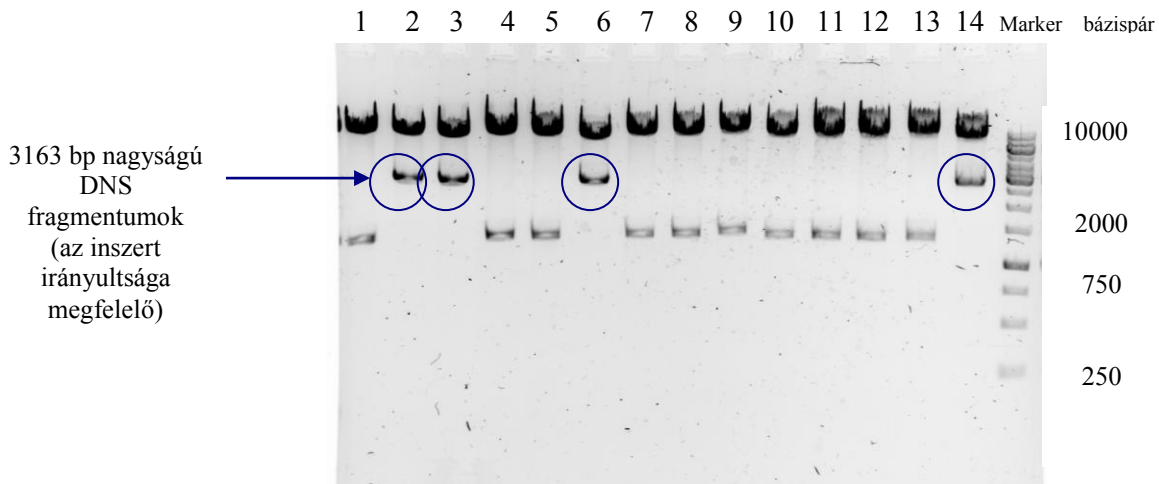


20. ábra: A Qiagen, QIAquick gél extrakciós kit segítségével izolált vad típusú miozin 5 HMM konstrukciót tartalmazó pVL 1392 vektorból emésztés után visszamaradt nagy DNS fragmentum (1), illetve a mutáns (Y439A (2), Y439S(3), Y439E(4) miozin 5 S1 konstrukciókat tartalmazó pFastBac1 vektorból emésztés után visszamaradt kis (1765 bp, ez a szakasz tartalmazza a switch-2 hurkot) DNS fragmentumok

Az inszert és a vektor T4 ligázal történő ligálását követően beépült inszert irányultságát a 21. ábra mutatja.

Az inszert irányultságának ellenőrzésére azért volt szükség, mert a kiindulási pFastBac1 vektorban lévő mutáns miozin 5 S1 konstrukciókat illetve pVL 1392 vektorban lévő vad típusú miozin 5 HMM konstrukciókat egyazon restrikciós endonukleázzal (Eco81I) emésztettük. Mivel a hasított végek megegyeznek, az inszert kétféle irányban épülhet be. Azon konstrukciókat, amelyek esetében megfelelő irányban épült be az inszert, az XbaI (hasítóhely: T<sup>~</sup>CTAG<sup>^</sup>A) restrikciós endonukleáz segítségével különítettük el azoktól, melyekben az inszert irányultsága nem megfelelő.

Az XbaI restrikciós endonukleáznak két hasítóhelye van a mutáns miozin 5 HMM konstrukciókban. Az egyik hasítóhely az inszerten belül (4299/4303), míg a másik hasítóhely az inszerten kívül (7456/7460) található. Ha az inszert irányultsága megfelelő, akkor XbaI restrikciós endonukleáz 3163 bp nagyságú DNS fragmentumot hasít ki, azonban ha az inszert irányultsága nem megfelelő, akkor 1607 bp nagyságú DNS fragmentum hasad ki, melyek agaróz gélen futtatva jól elkülöníthetők.



21. ábra: Az Y439A (1-5), Y439S (6-10), Y439E (11-14) miozin 5 HMM konstrukciók *XbaI* restrikciós endonukleázzal próbaemésztve

A 21. ábrán látható, hogy a 2., 3. (Y439A), 6. (Y439S), 14. (Y439E) minta esetében a pVL 1392 vektorba megfelelő irányban épült be az inszert, mivel a csíkok a 3163 bázispárnál jelentek meg, míg az 1., 4., 5., 7., 8., 9., 10., 11., 12., 13. minták 1607 bázispárnak megfelelő magasságban jelentek meg a gélképen, mely az inszert helytelen irányultságát jelzi. A 2., (Y439A), 6. (Y439S), 14. (Y439E) mintát felhasználva plazmid miniprepet készítettünk, melyet DNS szekvenálással ellenőriztünk.

## REKOMBINÁNS HMM KONSTRUKCIÓK

A különböző HMM konstrukciók transzfekcióját követően a transzfekció sikerességét a különböző konstrukciókat tartalmazó Sf9 sejtek konfluenciája alapján fénymikroszkópban vizsgáltuk, az egyes konstrukciókat tartalmazó rekeszekben az Sf9 sejtek konfluenciáját hasonlítva a negatív kontrollhoz.

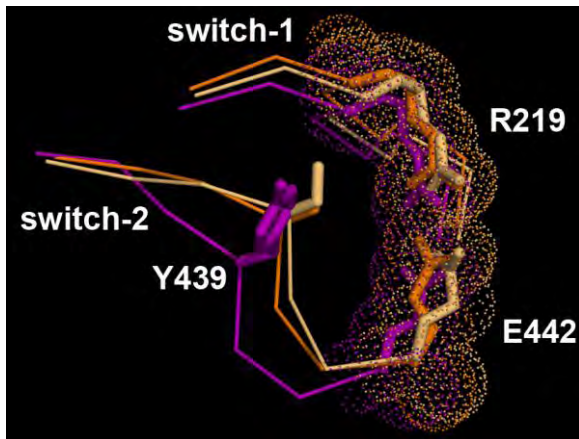
A negatív kontroll esetében teljesen összefüggő „sejtszőnyeg” borította a rekeszt, míg a mutáns és vad típusú konstrukciók esetében sejtmentes foltok voltak megfigyelhetők a „sejtszőnyegen”. A foltok jelenléte a sikeresen felnövekedett első generációs vírusnemzedék (P1) jelenlétére utal.

## 7. EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE

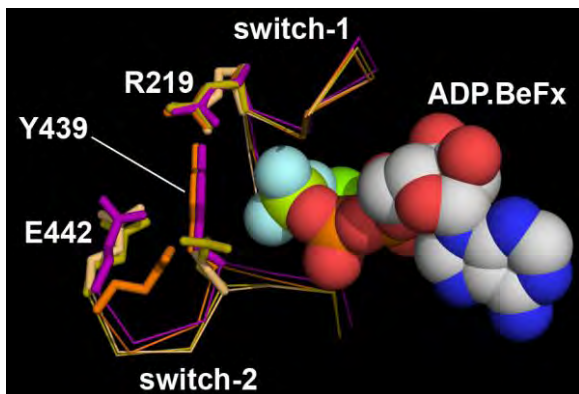
A mutáns (Y439A, Y439S, Y439E) miozin 5 konstrukciók vad típusú kontrollal összevetett kinetikai és fluoreszcencia-spektroszkópiai vizsgálatával követtük nyomon a mutációk által az enzimműködésben okozott változásokat.

A *switch-2* hurok konformációja a miozin egyes állapotaiban kulcsfontosságú az egész molekula működése szempontjából. A hurok konszenzus szekvenciájában (LDIXGFE) csak egyetlen aminosav (X) különbözik (és így módosíthatja a hurok konformációját) az egyes miozin osztályok között. Különböző miozinok (miozin 2, miozin 5) különböző állapotaiban (nukleotid-kötött *switch-2* nyitott és zárt állapotok, valamint a rigor-szerű (aktin-kötést imitáló) állapot) meghatározott kristályszerkezetei alapján megvizsgáltuk az X pozícióban lévő aminosav-különbségek hatásait a *switch-2* konformációjára és ezen túlmutatóan ennek hatását a hurok mikrokozonyezetére (23., 24. és 25. ábrák).

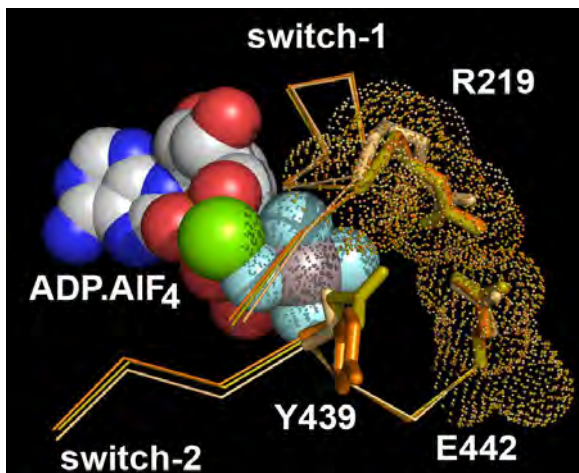
A *switch-2* hurok a nukleotid kötőhely szerkezeti eleme, amely a molekula enzimciklusa alatt olyan kulcsfontosságú régiókkal kommunikál, mint a *switch-1* hurok (ez a hurok létesít kommunikációt az aktin és nukleotid kötőhelyek között) és a konverter régió (amely révén a *switch-2* konformációja meghatározza az emelőkar orientációját). A hurok konformációjának, illetve ezáltal környezetének megváltozása biztosíthatja új kölcsönhatások kialakulását a molekulán belül, illetve a meglévők megszűnését, ezáltal módosítva a molekula kinetikai paramétereit. A 23. ábra a *switch-2* és *switch-1* hurkok konformációját mutatja a molekula „rigor-szerű” állapotában (*switch-1*: nyitott, *switch-2*: nyitott). Az ábrán látható, hogy mindhárom ábrázolt miozin esetében sóhíd alakul ki a *switch-1* hurok (NNSSRFG) argininje (miozin 5-ben R219) és a *switch-2* hurok (LDIXGFE) glutaminsava (E442) között. Azonban miozin 5 esetében a *switch-2* tirozin (Y439) oldallánc a *switch-2* hurkot eltolja, ezáltal más környezetbe kényszeríti azon miozinokhoz képest, melyekben a *switch-2* hurok kis oldalláncú aminosavat (szerin, alanin) tartalmaz ebben a pozícióban. A 25. ábra a *switch-2* és a *switch-1* hurkok konformációját mutatja a molekula „*switch-2* zárt” nukleotid-kötött állapotában (*switch-1*: zárt, *switch-2*: zárt).



23. ábra: A switch-1 és switch-2 hurkok konformációja „rigor-szerű” állapotban (switch-1: nyitott, switch-2: nyitott). Világossárga: *Dictyostelium* miozin 2 (S439, (PDB kód: 1Q5G), lila: miozin 5 (Y439) (1OE9), narancs: *Loligo* miozin 2 (A439) (2OVK). A könnyebb érthetőség érdekében mindenütt a miozin 5 szekvenca-számozása szerinti pozíció-számokat tüntettük fel. A 23-25. ábrák a PyMol program segítségével készültek.



24. ábra: A switch-1 és switch-2 hurkok konformációja a miozin „switch-2 open” állapotában (switch-1: zárt, switch-2: nyitott) Világossárga: *Dictyostelium* vad típusú miozin 2 (1MMD), középsárga: *Dictyostelium* S439E mutáns (1W9K), lila: miozin 5, narancssárga: *Dictyostelium* S439Y mutáns (1W9I)



25. ábra: A switch-1 és switch-2 hurkok konformációja a miozin fej „switch-2 closed” állapotában (switch-1: zárt, switch-2: zárt). Világossárga: *Dictyostelium* vad típusú miozin 2 (1MND), középsárga: *Dictyostelium* S439E mutáns (1W9L), narancssárga: *Dictyostelium* S439Y mutáns (1W9J)

Az ábrán látható, hogy ebben az állapotban is sóhíd formálódik a switch-1 hurok (NNSS**R**FG) argininje és a switch-2 hurok (LDIXG**F**E) glutaminsava között (ezen sóhíd biztosítja a switch-2 hurok (LDIXG**F**E) glicinjének főláncá és az ATP  $\gamma$ -foszfátja közötti hidrogénkötés létrejöttét, mely kulcsfontosságú a hidrolízishez), azonban a 439-es pozíció oldallánca ebben az állapotban nem befolyásolja a switch-2 konformációját.

A 24. ábra a switch-2 és a switch-1 hurkok konformációját mutatja a molekula „switch-2 nyitott” állapotában (switch-1: zárt, switch-2: nyitott). Ebben az állapotban az előbb említett

sóhid megszűnik (lehetővé téve a termék-felszabadulást). A miozin 5 *switch-2* szekvenciáját utánzó *Dictyostelium* miozin 2 S439Y mutáns tirozinja a miozin 5-ben lévő tirozinnal megegyező helyzetben áll, azonban a mutáció a *switch-2* glutaminsavat a vad típustól eltérő helyzetbe tolja.

Kísérleteink alátámasztják a *switch-2* hurok tirozinjának szerepét a miozin 5 sajátos mechanizmusában. A mutációk (Y439A, Y439S, Y439E) jelentősen megváltoztatták a miozin 5 molekula kinetikai paramétereit. Az erőkar bázisánál található triptofán (W483) fluoreszcencia-változásának mértéke a *switch-2* konformáció-változását jelzi. Nukleotid-mentes állapotban a miozin 5 *switch-2* hurka nyitott állapotban van. Az ATP kötődése a nukleotid kötőhelyre a *switch-2* hurkot zárt állapotba kényszeríti.

Az így fellépő konformáció-változás megváltoztatja az erőkar bázisánál található triptofán kémiai környezetét, ami fluoreszcencia-emelkedést okoz.

A termék (foszfát) felszabadulása a ciklus leglassabb lépése, ezért a megelőző lépésekben a *switch-2* nyitott és zárt állapotainak az 1. séma szerinti egyensúlyai alakulnak ki, amelyek meghatározzák a steady-state fluoreszcencia-intenzitást ATP jelenlétében:



1. séma: A *switch-2* nyitott és zárt állapotának átmenetei az ATPáz ciklus során (M: miozin; nyitott állapot: alacsony triptofán fluoreszcencia; zárt állapot: magas triptofán fluoreszcencia)

A *switch-2* egyensúlyainak a nyitott állapot felé történő eltolódása egyrészt az ATP-kötésre bekövetkező fluoreszcencia-változás csökkenését, másrészt – mivel a foszfát-felszabadulás csak a nyitott állapotból történhet – a bazális ATPáz aktivitás növekedését okozza. Mérési eredményeink összhangban vannak ezzel a modellel: azt tapasztaltuk, hogy az ATP-kötésre bekövetkező triptofán fluoreszcencia-változás növekedése a bazális ATPáz aktivitás csökkenésével jár együtt (2. táblázat). A triptofán fluoreszcencia-növekedés Y439E < Y439A < Y439S sorrendben növekedett, míg az ATPáz aktivitás ugyanebben a sorrendben csökkent. Ezen effektusok jelentőségét az adja, hogy a *switch-2* zárt állapot arányának növekedése a gyenge aktinkötő állapotok életidejének növekedését vonja maga után, így módosítva a molekula mechanikai paramétereit. A bazális ATPáz aktivitás legnagyobb arányú növekedését az Y439E mutáció okozta: ez összhangban áll azzal, hogy a miozin 2-ben

korábban jellemzett homológ mutáció a *switch-2*-t „tágra nyitott” állapotba kényszerítette [23].

Mindhárom vizsgált mutáció jelentősen csökkentette a miozin 5 maximális aktin-aktivált ATPáz aktivitását (11. ábra, 2. táblázat). A vad típusú miozinban az ADP-nek az aktomiozin-ADP komplexből történő felszabadulása az ATPáz ciklus sebesség-meghatározó lépése, ezért az ATPáz aktivitás csökkenését az ADP-felszabadulási lépés lassulásának tulajdonítjuk. Ezt igazolják az ADP-felszabadulás sebességi állandóját közvetlenül kimutató eredményeink is (3. táblázat).

A mutánsok (Y439A, Y439S, Y439E) esetében a vad típusnál lassabb ADP disszociációt és ezzel összhangban nagyobb ADP affinitást tapasztaltunk (3. táblázat). Érdekes módon, azok a vad típusú miozinok (pl. miozin 2), amelyek *switch-2* hurkának X pozíciója alanint vagy szerint tartalmaz, gyors ADP disszociációt és kis ADP affinitást mutatnak (nagy tömegben működő miozinok lévén). Ebből arra következtetünk, hogy az ADP disszociáció, illetve ADP affinitás befolyásolását egy komplex rendszer végzi, amely rendszer egyik tagját a *switch-2* hurok X pozíciójában található aminosav képviseli.

A konstrukciók aktin hiányában mért steady-state bazális ATPáz aktivitásához képest (vad típusú miozin 5-ben aktin hiányában az enzimciklus sebesség meghatározó lépése a  $P_i$  felszabadulás) jelentős ATPáz aktivitás növekedés tapasztalható aktin jelenlétében (vad típusú miozin 5-ben aktin jelenlétében az enzimciklus sebesség meghatározó lépése az ADP felszabadulás) (2. táblázat). A mért bazális ATPáz aktivitás (aktin hiányában) értékek jól korrelálnak az aktin hiányában mért  $P_i$  felszabadulás *single turnover* kísérletnél meghatározott megfigyelt sebességi állandókkal (4. táblázat), azonban az Y439A mutáns esetében a  $P_i$  felszabadulás *single turnover* kísérletnél meghatározott megfigyelt sebességi állandó négyszer gyorsabbnak adódott (4. táblázat) a bazális ATPáz aktivitás értékhez képest, ami arra utal, hogy az Y439A mutáns esetében aktin hiányában a  $P_i$  felszabadulás mellett kell lennie más sebességmeghatározó lépésnek is, mellyel együttesen alakítják az Y439A mutáns bazális ATPáz aktivitását. Aktin jelenlétében a mutáns és vad típusú konstrukciók esetében is egy-két nagyságrenddel gyorsabb  $P_i$  felszabadulás volt tapasztalható *single turnover* kísérlet során az aktin-aktivált ATPáz aktivitás értékekhez képest (4. táblázat, 2. táblázat). Aktin jelenlétében az Y439S és Y439E mutánsok a vad típusúhoz hasonló  $P_i$  felszabadulást mutattak, azonban az Y439A mutáns esetében a  $P_i$  felszabadulás jelentős gyorsulása volt tapasztalható a többi konstrukcióhoz képest (17. ábra, 4. táblázat) mely az Y439A mutáns esetében az egyébként is magas terhelési arány további növekedését eredményezheti (az AM-ADP- $P_i$

komplex gyorsabban képes „továbbhaladni” az enzimeciklus erős aktinkötő AM.ADP állapota felé).

Az aktin-kötés hőmérséklet-függése a mutáns konstrukciók esetében nagyobbak adódott a vad típushoz képest, ami az aktin-kötés aktiválási szabadentalpiájának emelkedését jelzi a mutánsok esetében. Ez a megfigyelés összhangban van azzal, hogy miozin 2-ben a mutánsokhoz hasonlóan magas az aktiválási szabadentalpia [3]. A szabadentalpia növekedése a reakció energiagátjának növekedését mutatja, tehát a *switch-2* X pozíciójának tirozinja a reakció energiagátjának csökkentésével segíti elő a gyors aktin-kötést.

## 8. KONKLÚZIÓ

Fő következtetéseink:

1. A *switch-2* X pozíciójában jelenlévő tirozin oldallánc a miozin 5-ben aktin távollétében a foszfát-felszabadulás lassítását, míg aktin jelenlétében az ADP-felszabadulás gyorsulását okozza, így hozzájárul az ATPáz ciklus aktin-aktivációjának modulálásához.
2. A *switch-2* tirozin a miozin 5 rigor állapotában a *switch-2* különleges konformációját eredményezi. Ez a konformáció – az aktin-kötőhellyel történő kommunikáció révén – lehetővé teszi a miozin 5 gyors, rendkívül csekély aktiválási energia mellett történő aktin-kötését.
3. Eredményeink arra utalnak, hogy a *switch-2* hurok az ATP-hidrolízisben játszott szerepén kívül a termék-felszabadulási lépések kinetikai modulálásával teszi lehetővé a miozin 5 processzív működését.

További munkánk során a mutáns miozin 5 konstrukciók kétféjű változatainak egyedi molekula motilitás- és processzivitás-vizsgálatával fogjuk meghatározni, hogy a motor módosult kinetikai paraméterei hogyan járulnak hozzá a processzivitás, e fontos biológiai jelenség létrejöttéhez.

## 9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsőként köszönetet szeretnék mondani témavezetőmnek, Dr. Kovács Mihálynak, akinek hozzáértése, támogatása és határtalan türelme nélkül ez a dolgozat nem jöhetett volna létre. Köszönet illeti prof. Gráf Lászlót, az ELTE TTK Biokémiai Tanszékének korábbi vezetőjét, valamint Dr. Nyitray Lászlót, a tanszék jelenlegi vezetőjét, akik lehetővé tették számomra a munkát a tanszéken. Köszönettel tartozom laborunk összes munkatársának fáradhatatlan segítő készségéért és türelméért (Dr. Gyimesi Máté, Sarlós Kata, Takács Balázs, Sarankó Hajnalka) valamint Dr. Málnási-Csizmadia András laborja összes munkatársának (Dr. Málnási Csizmadia András, Kintses Bálint, Simon Zoltán, Várkuti Boglárka, Végner László, Rauscher Anna, Papp Dániel, Jelinek Balázs, Zahoránszky Gergely, Zhenhui Yang). Végül, de nem utolsósorban a családomnak, akik mellettem álltak a munkám során.

## 10. RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

A	adenin, alanin, aktin
ADP	adenozin-difoszfát
ATP	adenozin-trifoszfát
C	citozin
D	aszpartát
Da	dalton
dmantADP	N-metilantranoil-2'-dezozi-ADP
dmantATP	N-metilantranoil-2'-dezozi-ATP
DNS	dezozi-ribo-nukleinsav
DTT	ditio-treitol
E	glutaminsav
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
EGTA	etilén-diamin-tetraacetát
F	fenilalanin
FBS	Fetal Bovine Serum
F-aktin	filamentózus aktin
G	guanin, glicin
G-aktin	globuláris aktin
HMM	nehéz meromiozin ( <i>Heavy MeroMyosin</i> )
I	izoleucin
IP3	inozitol-triszfoszfát
KCl	kalcium-klorid
kDa	kilodalton
L	lizin
LB (agarlemez)	Luria Bertani
LDH	laktát-dehidrogenáz
M	miozin
MgCl <sub>2</sub>	magnézium-klorid
N	bármely bázis
NaCl	nátrium-klorid
NADH	nikotinamid-dinukleotid
NaN <sub>3</sub>	nátrium-azid
P1	első generációs vírusnemzedék
P2	második generációs vírusnemzedék
P3	harmadik generációs vírusnemzedék
P <sub>i</sub>	foszfát
PEP	foszfo-enol-piruvát
PK	piruvát kináz
R	arginin
RNáz	ribonukleáz
RNS	ribonukleinsav
rpm	percenkénti fordulatszám (round per minute)
S	szerin
S1	Szubfragment-1

---

SDS	nátrium-dodecil-szulfát
SDS – PAGE	nátrium-dodecil-szulfát (sodium dodecyl sulfate) poliakrilamid gélelektroforézis
SER	sima felszínű endoplazmatikus retikulum
Sf9	<i>Spodoptera frugiperda</i> rovarsejt
T	timin
Trisz	trisz-(hidroxi-metil)-amino-metán
U	egység (unit)
W	triptofán
Y	tirozin

## 11. HIVATKOZÁSOK

1. Volpicelli, L.A., et al., *Rab11a and myosin Vb regulate recycling of the M4 muscarinic acetylcholine receptor*. J Neurosci, 2002. **22**(22): p. 9776-84.
2. De La Cruz, E.M., et al., *The kinetic mechanism of myosin V*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(24): p. 13726-31.
3. Sellers, J.R., *Myosins*. 1999, New York: Oxford University Press.
4. De La Cruz, E.M. and E.M. Ostap, *Relating biochemistry and function in the myosin superfamily*. Curr Opin Cell Biol, 2004. **16**(1): p. 61-7.
5. Cheney, R.E., et al., *Brain myosin-V is a two-headed unconventional myosin with motor activity*. Cell, 1993. **75**(1): p. 13-23.
6. Libby, R.T., et al., *Myosin Va is required for normal photoreceptor synaptic activity*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 19): p. 4509-15.
7. Matesic, L.E., et al., *Mutations in Mlph, encoding a member of the Rab effector family, cause the melanosome transport defects observed in leaden mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(18): p. 10238-43.
8. Mercer, J.A., et al., *Novel myosin heavy chain encoded by murine dilute coat colour locus*. Nature, 1991. **349**(6311): p. 709-13.
9. Wilson, S.M., et al., *A mutation in Rab27a causes the vesicle transport defects observed in ashen mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(14): p. 7933-8.
10. Lapiere, L.A., et al., *Myosin vb is associated with plasma membrane recycling systems*. Mol Biol Cell, 2001. **12**(6): p. 1843-57.
11. Takagi, Y., Yang, Y., Fujiwara, I., Jacobs, D., Cheney, R.E., Sellers, J.R., and Kovács, M., *Human Myosin Vc Is a Low Duty Ratio, Nonprocessive Molecular Motor*. JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 2008.
12. Toth, J., et al., *Myosin V from Drosophila reveals diversity of motor mechanisms within the myosin V family*. J Biol Chem, 2005. **280**(34): p. 30594-603.
13. De La Cruz, E.M., H.L. Sweeney, and E.M. Ostap, *ADP inhibition of myosin V ATPase activity*. Biophys J, 2000. **79**(3): p. 1524-9.
14. Nascimento, A.A., et al., *Enzymatic characterization and functional domain mapping of brain myosin-V*. J Biol Chem, 1996. **271**(29): p. 17561-9.

15. Trybus, K.M., E. Kremmentsova, and Y. Freyzon, *Kinetic characterization of a monomeric unconventional myosin V construct*. J Biol Chem, 1999. **274**(39): p. 27448-56.
16. Yengo, C.M., et al., *Kinetic characterization of the weak binding states of myosin V*. Biochemistry, 2002. **41**(26): p. 8508-17.
17. Yengo, C.M. and H.L. Sweeney, *Functional role of loop 2 in myosin V*. Biochemistry, 2004. **43**(9): p. 2605-12.
18. Watanabe, S., et al., *Mechanoenzymatic characterization of human myosin Vb*. Biochemistry, 2006. **45**(8): p. 2729-38.
19. Mehta, A.D., et al., *Myosin-V is a processive actin-based motor*. Nature, 1999. **400**(6744): p. 590-3.
20. Baker, J.P. and M.A. Titus, *A family of unconventional myosins from the nematode Caenorhabditis elegans*. J Mol Biol, 1997. **272**(4): p. 523-35.
21. Gyimesi, M., et al., *The mechanism of the reverse recovery step, phosphate release, and actin activation of Dictyostelium myosin II*. J Biol Chem, 2008. **283**(13): p. 8153-63.
22. Yang, Y., et al., *Rigor-like structures from muscle myosins reveal key mechanical elements in the transduction pathways of this allosteric motor*. Structure, 2007. **15**(5): p. 553-64.
23. Morris, C.A., Wells, A. L., Houdusse, A., and Sweeney, H. L., *Kinetic Analysis of Myosin II "Backdoor" Mutants*, in *9th Annual Retreat and Symposium of the Pennsylvania Muscle Institute*. 2001.
24. Malnasi-Csizmadia, A., R.J. Woolley, and C.R. Bagshaw, *Resolution of conformational states of Dictyostelium myosin II motor domain using tryptophan (W501) mutants: implications for the open-closed transition identified by crystallography*. Biochemistry, 2000. **39**(51): p. 16135-46.
25. Geeves, M.A. and K.C. Holmes, *Structural mechanism of muscle contraction*. Annu Rev Biochem, 1999. **68**: p. 687-728.
26. Coureux, P.D., et al., *A structural state of the myosin V motor without bound nucleotide*. Nature, 2003. **425**(6956): p. 419-23.