

Terhelésfüggő enzimmechanizmusok vizsgálata nem-izom miozin molekulán

Sarlós Kata

szakdolgozat

Témavezető: Dr. Kovács Mihály, tudományos főmunkatárs

**Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar
Biokémiai Tanszék**



2008

TARTALOMJEGYZÉK

1	BEVEZETŐ	3
2	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	6
2.1	A MIOZIN MOLEKULA ÁLTALÁNOS JELLEMZÉSE	6
2.1.1	<i>Szerkezet és funkció</i>	6
2.1.1.1	<i>Szerkezet és szabályozás</i>	6
2.1.1.2	<i>Az izomkontrakció mechanizmusa</i>	8
2.1.2	<i>A miozin szupercsalád változatossága</i>	11
2.2	A NEM-IZOM MIOZIN 2 ALCSALÁD	14
2.3	TERMODINAMIKA MOLEKULÁK SZINTJÉN	15
2.4	MOTOROK TERHELÉSFÜGGÉSÉNEK VIZSGÁLATA.....	18
2.4.1	<i>Egyedi molekula vizsgálatok</i>	18
2.4.2	<i>Tranziens kinetikai vizsgálatok</i>	20
3	CÉLKITŰZÉSEK	22
4	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	22
4.1	NM2A ELŐÁLLÍTÁSA EUKARIÓTA SEJTKULTÚRÁBAN BAKULOVÍRUS SEGÍTSÉGÉVEL.....	22
4.2	NM2A PREPARÁLÁSA FLAG AFFINITÁS KROMATOGRÁFIÁVAL	23
4.3	DMADP KÉSZÍTÉSE	24
4.4	NM2A VIZSGÁLATA TRANZIENS KINETIKAI MÓDSZEREKKEL.....	24
4.5	NM2A-HMM TIOFOSZFORILÁLÁSA	27
4.6	AKTIN PREPARÁLÁS	27
4.7	PIRÉN – AKTIN PREPARÁLÁS	28
4.8	A REAKCIÓ MODELLEZÉSE GEPASI PROGRAM SEGÍTSÉGÉVEL	28
5	EREDMÉNYEK	28
5.1	A KÍSÉRLETEK SZERKEZETI MODELLJE.....	28
5.2	A FLUORESCENCIA TRANZIENSEK ELEMZÉSE	29
5.3	A KINETIKAI PARAMÉTEREK HŐMÉRSÉKLET-FÜGGÉSE.....	31
5.4	A DMADP FELSZABADULÁS KINETIKAI SZIMULÁCIÓJA.....	33
5.5	KONTROLL KÍSÉRLETEK TERHELETLEN (EGYFEJŰ) NM2A-S1 KONSTRUKCIÓVAL	36
6	EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE	42
7	ÖSSZEFOGLALÁS	44
8	SUMMARY	44
9	RÖVIDÍTÉSEK	46
10	HIVATKOZÁSOK	48
11	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	50

1 BEVEZETŐ

Az enzimek alapvető szerepet betöltő alkotóelemei az élő rendszereknek. Szerepük nagyon sokféle lehet, kezdve a DNS átírástól egészen az ATP termelésig. Ma már szinte elképzelhetetlen egy biológiai folyamat leírása a benne résztvevő fehérjék felépítésének és szerepének tisztázása nélkül. Esszenciális mivoltuk miatt rendkívül fontos, hogy tisztában legyünk működésük alapelveivel, és hogy megértsük, milyen tényezők hogyan befolyásolják szerkezetüket és működésüket.

Kísérleteinkben a humán nem-izom miozin 2a (NM2A) motorfehérje vizsgálatán keresztül keresünk választ arra, hogy a mechanikai terhelés milyen hatással van a reakció kinetikai paramétereire. Feltételezésünk szerint ez általánosítható a többi enzim működésére is, arra az esetre, amikor ezek mechanikai terhelés alatt dolgoznak. A terhelés vizsgálata – a biokémia és a mechanika összefüggésének tudományos érdekességén kívül – azért különösen fontos, mert az élő szervezetben sok fehérje (köztük a motorenzimek is) mechanikai terhelés alatt áll, így tudnunk kell, hogy ez milyen mértékben befolyásolja a fehérjék működését, illetve milyen szerepet tölt be az allosztérikus szabályozásában.

A nem-izom miozin 2 létfontosságú feladatokat lát el az élő sejtben. Az általunk vizsgált NM2A a sejtosztódásban és -differenciálódásban játszik szerepet (1). Mint minden motorfehérje, az NM2A is kémiai energiából (ATP hidrolízis) állít elő mechanikai munkát (2). A mechanikai munka az aktin polimer sínen való elmozdulásban nyilvánul meg. A folyamat lépései a következők (1. *Ábra*). Az ATP-mentes miozin erősen köti az aktint. ATP kötés hatására a miozin disszociál az aktinról, és a hidrolízis aktinról levált állapotban történik. Az aktin allosztérikus hatására a hidrolízis egyik termékének, a foszfátnak a felszabadulása felgyorsul, ezzel együtt végbemegy az erő kifejtő lépés (egy apró konformáció-változás az aktív helyen, mely erőkar segítségével felerősödik). Az ezt követő lépés az ADP felszabadulása, mely vizsgálatunk tárgyát képezi.

Fontos szempont egy motorfehérje vizsgálatakor, hogy a motor mennyi időt (és az ATP-áz ciklus mekkora részét) tölt erősen aktin kötött állapotban (1. *Ábra – pirossal jelölt állapotok*) (3). Az általunk vizsgált NM2A az izom miozinhoz képest hosszabb ciklusidővel rendelkezik, és ADP felszabadulási lépésének lassúsága miatt jóval hosszabb időt is tölt erősen az aktinhoz kötve, emiatt hosszabb időtartamú erő kifejtésre képes (4-7).



1. Ábra: A miozin ATP-áz ciklusának egyszerűsített sémája (Kék – gyenge aktinkötő állapotok, piros – erősen aktin kötött állapotok)

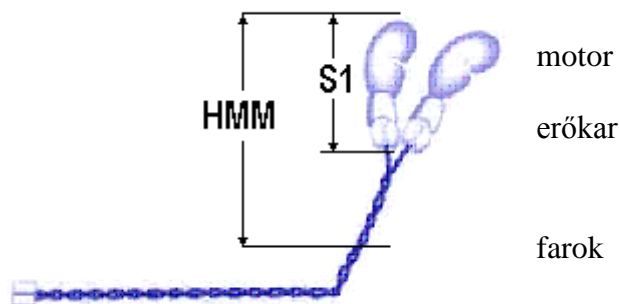
Vizsgálatainkban a humán NM2A ADP-felszabadulási lépését, mint modell reakciót használtuk az enzimkinetika mechanikai terhelés-függésének vizsgálatára. A reakciót különböző hőmérsékleteken, tranziens kinetikai (stopped-flow) módszerrel, fluoreszcensen jelölt ADP-vel (N-metilantraniloil-2'-dezoxi-ADP (dmADP)) vizsgáltuk. Kísérleteinkben elő tudtuk állítani az aktin-kötött NM2A-ADP komplex mechanikailag terheletlen és terhelt állapotait. Az NM2A azért kiemelkedően jó vizsgálati alany ezekben a kísérletekben, mert magas aktin és ADP affinitással rendelkezik, így az aktomiozin-ADP hármas komplex könnyen és stabilan előállítható (az egyes komponensek kötődésének K_d -jei 1 μ M alatti értékek) (5-7).

A kémiai reakciók hőmérsékletfüggésének leírását adó termodinamikai összefüggés az Arrhenius-egyenlet:

$$k(T) = A e^{-\frac{E}{k_B T}} \quad (1)$$

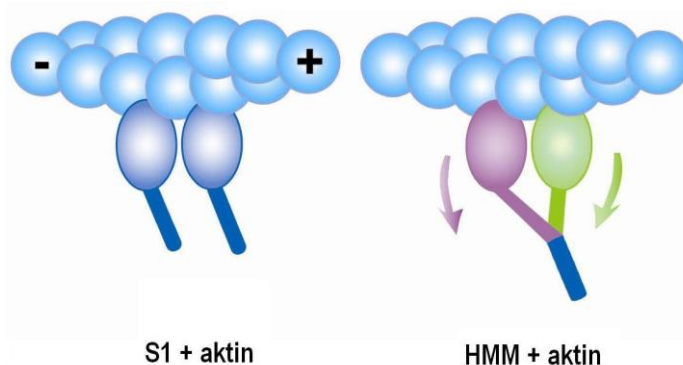
ahol k a sebességi állandó, T az abszolút hőmérséklet, A egy hőmérséklettől független, ún. pre-exponenciális faktor, k_B a Boltzmann-állandó, E pedig az aktivációs energia. Vizsgálatainkkal azt szeretnénk kideríteni, hogy a mechanikai terhelés milyen befolyással van az egyenletben leírt paraméterekre, és azok közül melyiket és hogyan befolyásolja.

A teljes természetes NM2A molekulát motor, erőkar és fark domének alkotják (2. Ábra). A motor és az erőkar alkotja a miozin fejt (ún. S1 fragmentum), a fark pedig coiled-coil-t képezve a molekula dimerizációjáért, illetve a miozin filamentumok képződéséért felelős (1). A mechanikai terhelés vizsgálatára szolubilis (filamentumot nem képző), egy- és kétfejű rekombináns humán NM2A konstrukciókat állítottunk elő. Terheletlen kontrollként használtuk az egyfejű S1 változatot, mely önmagában is működőképes (a motor domén tartalmazza az ATP és aktin kötőhelyeket). A kétfejű (HMM) változatban a fejek az őket összekötő coiled-coil struktúrán keresztül erőhatást gyakorolhatnak egymásra (2. Ábra).



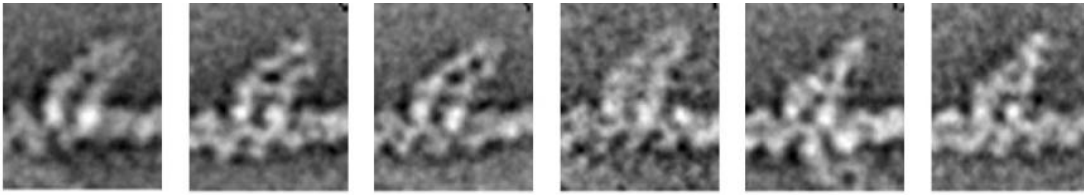
2. Ábra: A miozin és fragmentumainak szerkezete

Ennek mechanizmusa a következő. Amikor két független miozin fej az aktin filamentumon lévő szomszédos miozin kötőhelyekhez kapcsolódik, az erőkarok végei több nm távolságban helyezkednek el egymástól (3. Ábra, bal oldali rajz). Ezzel ellentétben, ha a szomszédos kötőhelyeket egy kétfejű HMM molekula fejei foglalják el, akkor mindkét fejnek mechanikai torzuláson kell keresztülmennie ahhoz, hogy az erőkarok végei a farok kezdeténél összeérjenek (3. Ábra, jobb oldali rajz). A HMM két feje által érzékelt különböző mechanikai terhelés a két fej különböző kinetikai sajátságaiban nyilvánulhat meg. Korábbi mechanikai vizsgálatok alapján tudjuk, hogy az előre irányuló terhelés gyorsítja, a hátra irányuló lassítja az ADP felszabadulást (8;9).



3. Ábra: Intramolekuláris feszültség kialakulása az akto-HMM komplexben és a terheletlen akto-S1 konstrukció

A reakció sebességének terheléstől való függése – a jelenség általános tudományos érdekessége mellett – fontos szerepet játszik sok motor működésében, mivel ez oldja meg a két fej közti kommunikációt, ötletesen kihasználva a fehérje szerkezeti tulajdonságait (pontosabban a benne ébredő feszültséget) a motor működésének szabályozására.



4. Ábra: Aktin-kötött HMM molekulák negatívan festett elektronmikroszkópos képe
(kollaborátorunk, Dr. Peter Knight (Univ. Of Leeds) felvételei)

A 4. ábrán aktin-kötött HMM molekulák elektronmikroszkópos képe látható. Jól látható, ahogy a két fej az egymás melletti kötőhelyekhez kapcsolódik az aktinon.

2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 A miozin molekula általános jellemzése

2.1.1 Szerkezet és funkció

2.1.1.1 Szerkezet és szabályozás

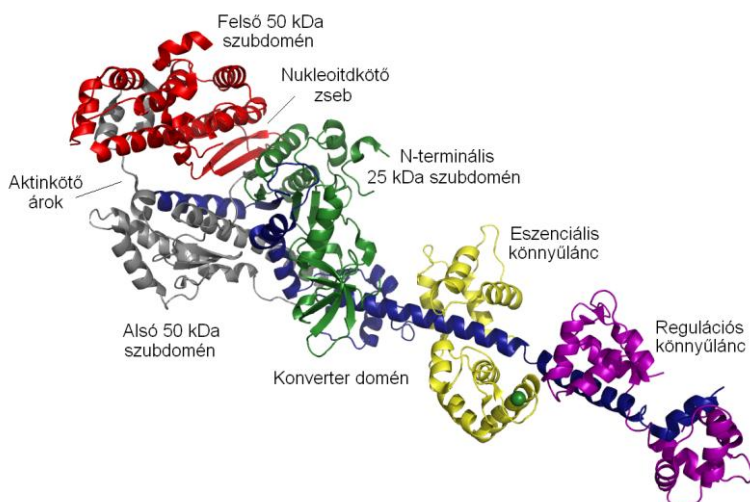
A miozin motorfehérje régóta a biokémiai kutatások egyik kedvenc alanya, szerkezete, típusai, ezek funkciói, széleskörű tudományos érdeklődésre tartanak számot. Ennek következtében számos aspektusból jól karakterizált enzimről beszélhetünk. Ám mindezek ellenére a miozinnal kapcsolatos vizsgálódás tág terepet biztosít a kutatóknak, hiszen a szupercsalád rengeteg típusú és funkciójú változatot tartalmaz, nem beszélve az enzim bonyolult működési mechanizmusáról.

Az emberiség által az egyik leginkább megérteni kívánt probléma a mozgás. Ez szorosan kapcsolódik az izomműködéshez, melynek esszenciális összetevője a miozin molekula, melynek ciklikus működése eredményezi az élő szervezetek mozgását. Az összehúzódásra képes izomszövet vizsgálata a múlt század elején főleg anatómiai módszerekkel kezdődött. Az izomszövetből különböző módszerekkel kivont fehérjeoldatot (feltételezték, hogy ezen fehérje játszik szerepet a kontrakcióban) miozinnak nevezték. A mikroszkóppal látható harántcsíkt izomszövet különleges, szabályos sturktúrájára keresték a választ. Az első, igazán biokémiai kutatás a szegeden tevékenykedő Szent-Györgyi Albert és munkatársainak nevéhez fűződik. Ők tudták először elkülöníteni az izomszövet

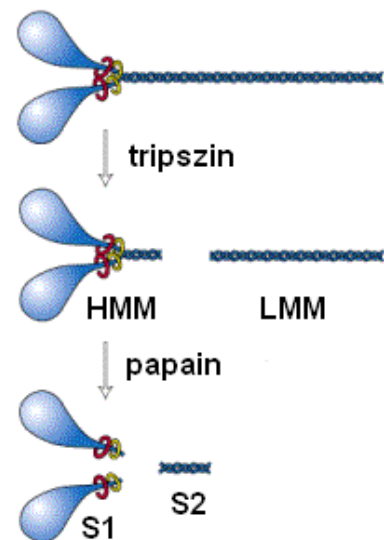
fehérjefrakcióit, a miozin és az aktin szétválasztása Szent-Györgyi tanítványa Straub F. Brúnó nevéhez köthető (25).

Az úgynevezett konvencionális vagy vázizom miozin proteolitikus hasításokkal több egységre bontható. Tripszines hasítással állíthatók elő az úgynevezett HMM és LMM (heavy meromyosin, light meromyosin – nehéz és könnyű meromiozin) fragmentumok, ezt először Mihályi és Szent-Györgyi András állították elő. Papainnal történő emésztés a HMM részt két részre bontja, az úgynevezett S1 és S2 régiókra (subfragment 1 és 2) (5. Ábra). A fragmentumok részletesebb szerkezeti vizsgálata Bálint Miklós nevéhez köthető (18, 19).

A konvencionális miozin molekula kettő, egyenként 200 kDa molekulatömegű nehéz, valamint két-két 15-20 kDa tömegű könnyűláncból (ELC – eszenciális könnyű lánc, RLC – regulációs könnyűlánc) áll. A nehézláncok egy globuláris „feji”, és egy hosszú „farki” régióból állnak. A két lánc a farki régión keresztül ún. „coiled-coil” kölcsönhatással kapcsolódik egymáshoz, a fejekhez egy ún. „nyak” struktúra köti össze a farkakat. Ehhez a régióhoz csatlakoznak a könnyűláncok. Az S1 fragmentum lényegében a feji és a nyaki régiót tartalmazza, motor doménnek is nevezik, mivel enzimatis aktivitása sértetlen, ahogy ezt in vitro motilitási vizsgálatok bizonyítják (35).



6. Ábra: Nukleotid mentes kagyló (*Aequipecten irradians*) vázizom miozin kristályszerkezete (Houdusse et al., 2000)



5. Ábra: A miozin proteolitikus hasításának termékei forrás:

www.nbi.dk/~pmhansen/2Dactmotil.htm

méretű, az N-terminális 25 kDa méretű, valamint az alfa-helikális szerkezetű konverter domén (6. Ábra). Központi régiójának meghatározó másodlagos szerkezeti eleme a paralel futó 7 béta-lemez. A felső és alsó 50 kDa-os szubdomének fogják közre az aktinkötő árkot, a molekula túloldalán afelső 50 kDa-os és az N-terminális 25

kDa-os rész között a nukleotidkötő zseb helyezkedik el. Egyszerűbb megközelítésben a mozgás során a szubdomének merev egységekként tekinthetők, a mozgás egymáshoz képesti elmozdulásokként keletkeznek. A miozin a P-loop NTP-ázok közé tartozó fehérje, ez a motívum evolúciósan konzervált, és a nukleotidkötő zsebben helyezkedik el. A nukleotid kötésében résztvevő régiók alapján a miozin rokonságban van többek között az élettanilag oly jelentős G-fehérjékkel (pl. ras).

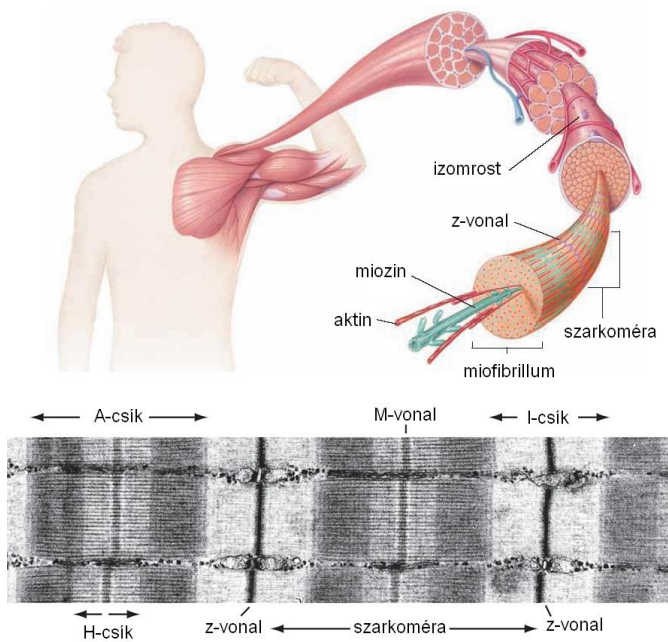
A könnyűláncok szerkezeti homológia alapján (EF-kéz vagy hélix-kanyar-hélix motívum) a Ca^{2+} kötő fehérjékkel mutat rokonságot (pl. kalmodulin). Szerepük a nehézlánc stabilizálása, a nukleotid kötőzsebben történt változások továbbítása az erőkar felé, valamint egyes miozinokban a molekula működésének szabályozása (1).

A miozin molekula különböző állapotainak szerkezetét a röntgenkristallográfiás szerkezetek alapján derítették fel. Az első kristályszerkezet csirke vázizom szubfragment 1 részéről készült a 90-es években (32, 33), az első regulációs domén térszerkezet Xie, Szent-Györgyi és Cohen révén szintén a 90-es években került megoldásra (34). A sejtes nyálkagomba (*Dictyostelium discoideum*) konvencionális miozin szerkezete különböző nukleotid analógokkal (pl. MgAMPPNP , MgADPBeF_x , $\text{MgATP}\gamma\text{S}$) került feltárássra – ezek a hidrolízis egyes lépéseit mimikálják (27, 28, 29, 30, 31). Az ún. dekorált aktin filamentum (minden kötőhelyet dictyostelium miozin foglal el) szerkezetét szintén ekkor ismertették (36).

Az aktomiozin rendszer szabályozása döntő részben Ca^{2+} szintjéhez kötött, mechanizmusai változatosak lehetnek. A vázizomban a reguláció az aktin kötőhelyeinek fizikai elfedésén alapszik, a tropomiozin-troponin fehérjekomplexen keresztül. A magas Ca^{2+} szint hatására a komplex szabadon hagyja a kötőhelyeket, így az aktomiozin ATP-áz ciklus zavartalanul működhet, alacsony Ca^{2+} szint a kötőhelyek blokkolását eredményezi, ezt nevezzük sztérikus gátlás modellnek (37, 38). A reguláció másik módja a könnyűláncok foszforilációján alapszik. A foszforilálás ki-be kapcsolóként működik, ha a könnyű láncok foszforilálva vannak, akkor a fehérje „bekapcsolt” állapotban van, defoszforilált esetben inaktív. A foszforilálást-defoszforilálást az MLCK (myosin light chain kinase – miozin könnyű lánc kináz) illetve a miozin foszfatáz rendszer végzi, a bekapcsolási szignál ebben az esetben is a magas Ca^{2+} szint. Ez a fajta szabályozás a simaizom miozinra, illetve a citoplazmikus nem-izom miozinokra jellemző (39, 40).

2.1.1.2 Az izomkontrakció mechanizmusa

Az aktomiozin rendszer működéséről a két fehérje felfedezése óta számos elmélet született. A legrégebbi elképzelés a „csúszó filamentum” modell, mely a harántcsíkolt

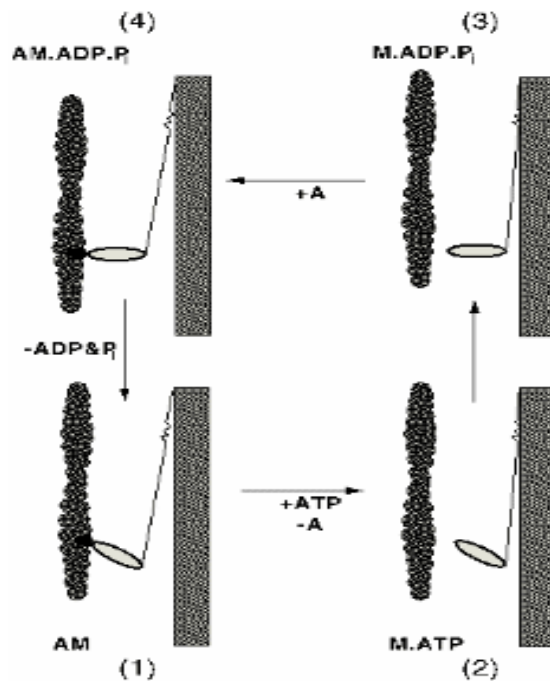


7. Ábra: A vázizom hierarchikus felépítésének vázlata, és elektronmikroszkópos képe. Szerkesztve: <http://www.castlefordschools.com> (rajz) valamint R. Craig, University of Massachussettes EM képe alapján

izomszövet anatómiai struktúrájának felderítései született. Az elképzelés szerint a kontrakció a vékony (aktin) és vastag (miozin) filamentumok egymásba való elcsúszásán alapszik. Amikor összecúsznak, az izom megrövidül, amikor eltávolodnak, az izom megnyúlik. A szarkomerek ritmikus ismétlődésének következtében a mikroszkópikus elmozdulások összeadódnak, így a cm-ben mérhető hosszváltozás szemmel is nyomkövethető (7. Ábra).

Huxley és Huxley

munkássága nyomán fény derült az aktomiozin komplex részletesebb szerkezetére, miszerint a filamentumok nem pusztán rudak, melyek egymásba csúsznak, hanem köztük ún. keresztidák találhatók. Ezen keresztidák a vastag filamentumhoz folyamatosan kötve vannak, és ritmikusán tolják odébb a vékony filamentumot (20, 21, 22). Lymn és Taylor a ciklus különböző állapotaihoz hozzárendelte az ATP-áz ciklus egyes lépéseit, így született meg az izomkontrakció „kilendülő keresztid” elmélete (23). Az elmélet szerint a keresztidat a teljes S1 régió alkotja, mely a ciklus első lépésében 45°-os szöget zár be az aktinnal, ezt az ún. rigor állapotként azonosították (nukleotid mentes állapot, a hullamerevségre utal). ATP kötéskor a keresztid disszociál az aktinról (második lépés), majd a hidrolízissel egyszerre az erőkar lecsapódik, ekkor merőlegesen áll az aktin



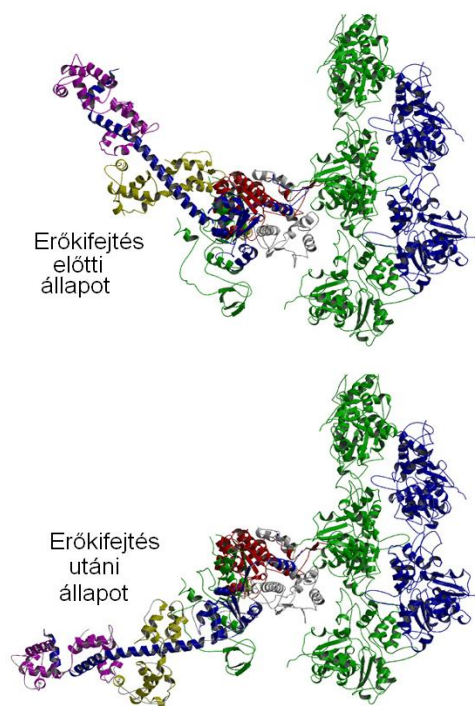
8. Ábra: Az aktomiozin kemomechanikai ciklus Lymn-Taylor féle kilendülő keresztid modellje

filamentumhoz képest, melyhez még mindig nincs hozzákötve (harmadik lépés). A folyamat negyedik lépésében a miozin visszaköt az aktinhoz, majd a termékfelszabadulással párhuzamosan megtörténik az erő kifejtő lépés (powerstroke), a kereszthíd az aktinhoz kötve ismét 45°-os szögbe áll be, eltolva ezáltal egy kicsivel a vékony filamentumot a vastaghoz képest (8. Ábra).

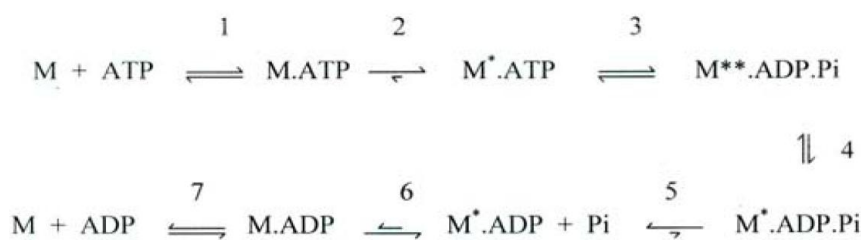
A háromdimenziós kristályszerkezetek rávilágítottak, hogy valójában nincs kilendülő kereszthíd, a fej nagy része ugyanabban a szögben csatlakozik az aktinhoz az egész ciklus során. A molekulának csak egy része mozdul el, az ún. erőkar régió, mely felerősíti a nukleotidkötő zsebben történt apró konformációs változásokat. Az erőkar fel (pre-powerstroke), illetve lecsapott (post-powerstroke) állapotai az erő kifejtő lépés előtti és utáni állapotok (9. Ábra). Az elméletet tehát a „kilendülő erőkar” modellre módosították (24).

A Lymn-Taylor modell megalkotása után nem sokkal Bagshaw és Trentham a motor domén belső fluoreszcencia változásai alapján megalkotta a miozin ATP-áz ciklus részletes kientikai modelljét (26) (10. Ábra). A modell ma is alapjául szolgál a miozinnal kapcsolatos kinetikai kutatásoknak. A

motor domén belső fluoreszcencia változásai egyrészt a nukleotid kötő zseb környékén található (1. fluoreszcencia emelkedés – M* állapot), másrészt a relé-hélixen elhelyezkedő (2. fluoreszcencia emelkedés – M** állapot) triptofán aminosavak okozzák. – A triptofánok fluoreszcencia változása arra utal, hogy szerkezeti változások következtében pozíciót változtatnak a folyamat során, ebből arra következtethetünk, hogy az adott triptofán és környezete érintett volt az adott folyamathoz szükséges



9. Ábra: Az aktomiozin komplex kristályszerkezetei az erő kifejtő lépés előtt és után. Jól látható, hogy a fej nagy részének orientációja nem változik, csak az erőkar csonkja áll más irányban (Módosítva: Fischer et al 1995. Biochemistry)

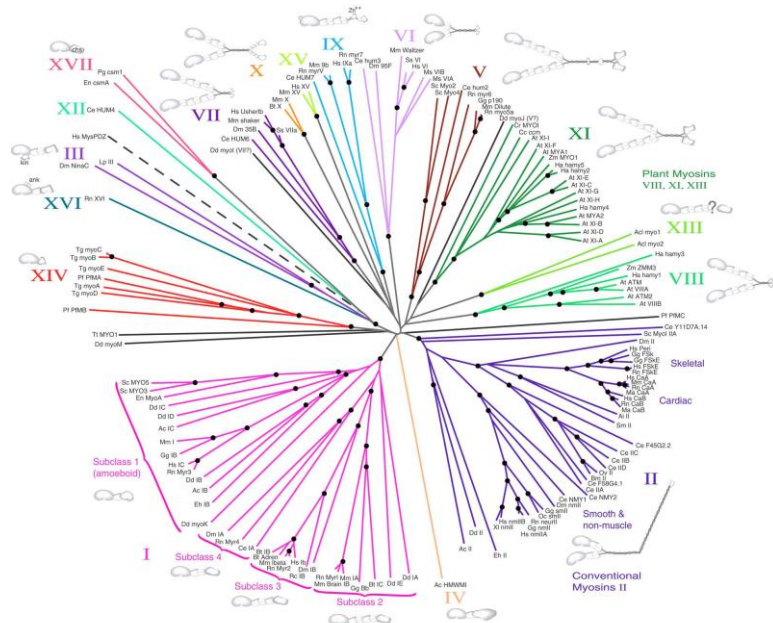


10. Ábra: Bagshaw és Trentham kinetikai modellje a miozin ATP-áz ciklusáról

konformációváltozásban. A triptofánok kedvelt fluoreszcens jeledők, mivel viszonylag kevés (általában 3-4) található belőlük a fehérjékben, ezért specifikus jeleket közvetítenek. Gyakran alkalmazott eljárás, hogy triptofánokat mutagenézissel betesznek, illetve kivesznek a szekvenciából. Bagshaw és Trentham modellje aktin mentes állapotban mutatja az ATP-áz ciklust. Az aktinnal való kapcsolatról általában elmondható, hogy az erős aktinkötő állapotok a nukleotidmentes és az ADP állapotok, míg az ATP és ADP.Pi állapotok gyengén kötik az aktint. Az üvegnyak vagy sebesség meghatározó lépés (a ciklus lelassabb lépése – mivel a többi lépés sokkal gyorsabb, ez a lépés határozza meg, hogy a ciklus milyen gyorsan zajlik, valamint, hogy mely állapotban tölt legtöbb időt a molekula) konvencionális miozin esetében a foszfát felszabadulás, amely közvetlenül megelőzi az erő kifejtést. (Bizonyos miozinok esetén a sebesség meghatározó lépés az ADP felszabadulás - lásd később.) A későbbi kutatások a ciklust még több részlépésre bontják, kinetikailag karakterizálva az egyes lépéseket különböző miozinok esetén. A Lymn-Taylor valamint a ráépülő kilendülő erőkar modell a Bagshaw-Trentham sémával kiegészítve képezik az alapját a mai enzimkintikai kutatásoknak (2).

2.1.2 A miozin szuperfamilia változatossága

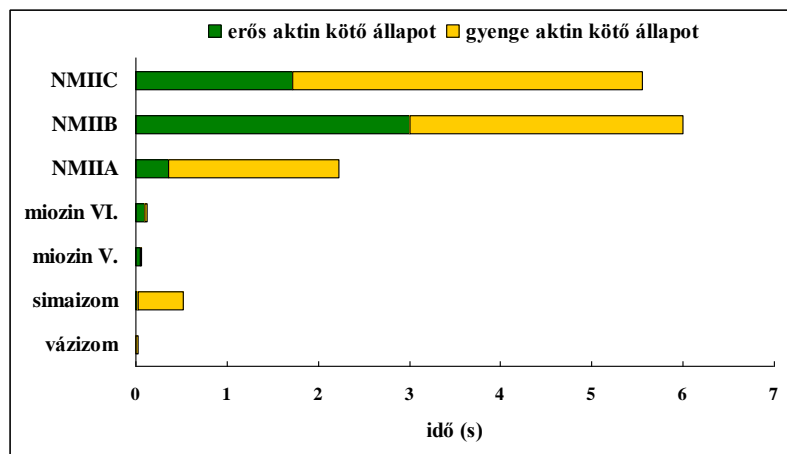
A miozin szuperfamilia 24 osztályba tartozik (a biokémiai nomenklatura nem követi a rendszertanban megszokottat), tagjai, szerkezetileg és funkcionálisan rendkívül változatosak. Az élő szervezetben számtalan feladatot miozinok látnak el, minél komplexebb egy élőlény, annál többféle miozinnal rendelkezik. (Emberben idáig 17 féle miozint azonosítottak.) A 11. ábrán nyomonkövethetjük a miozin szuperfamilia evolúciós kapcsolatait. Valamennyi osztály közös jellemzője, hogy aktin



11. Ábra: A miozin szuperfamilia tagjai. Az ágak hossza az evolúciós távolságokat tükrözi. (Hodge és Cope et al 2000)

aktivált MgATP-áz aktivitással rendelkezik, valamint, hogy a már ismertett régiókból (fej, nyak, fark) áll. A motor domén enzimatis aktivitásban fontos szerepet kapó részeinek szekvenciája és szerkezete evolúciósan jól konzervált, nagyobb térszerkezeti eltérés a motor domén felszíni hurkaiban, illetve az amino terminuson fordulnak elő. A miozin szupercsalád változatosságát nagyrészt szerkezeti, illetve enzimkinetikai oldalról vizsgálták. Egyértelmű, konkrét megfeleltetés az aminosav szekvencia eltérése és az enzimatis tulajdonságok között a szerkezet és a mechanizmus bonyolultsága miatt nehezen bizonyítható. Az osztályok között egy, illetve kétféjűek is előfordulnak, ez a C-terminális fark régió sturktúrájától függ, ami meghatározza, hogy képes-e az adott miozin a filamentumképzésre. A II. osztályba tartozó miozinok filamentális struktúrákat hoznak létre, míg például az V. osztályba tartozók önmagukban működnek (szerepük pl. vezikulák szállításában van). Változatosság mutatkozik a könnyű láncok mennyiségében és fajtáiban, valamint az őket a nehéz lánhoz kapcsoló IQ motívumok szekvenciájában (1).

Ezen szerkezeti eltérések hatással vannak az enzimatis tulajdonságokra is, különböző feladatokat ellátó miozinok a feladatra optimalizált kinetikai tulajdonságokkal rendelkeznek (3). Az egyik meghatározó tulajdonság, hogy a miozin ciklusidejének mekkora hányadát tölti erősen aktin kötött állapotban (ún. duty-ratio) (12. Ábra). A vázizomnak nem érdemes sokáig erősen az aktinhoz kötnie, mivel nagy tömegben dolgozik, így a fejek akadályoznák egymást. Az egyfejű I. osztályba tartozó miozinok (általában membrán környékén lokalizáltak – szerepük lehet a feszültségfüggő ioncsatornák szabályozásában) szintén rövid időt töltenek erősen az aktinhoz kötve. Ám a processzív



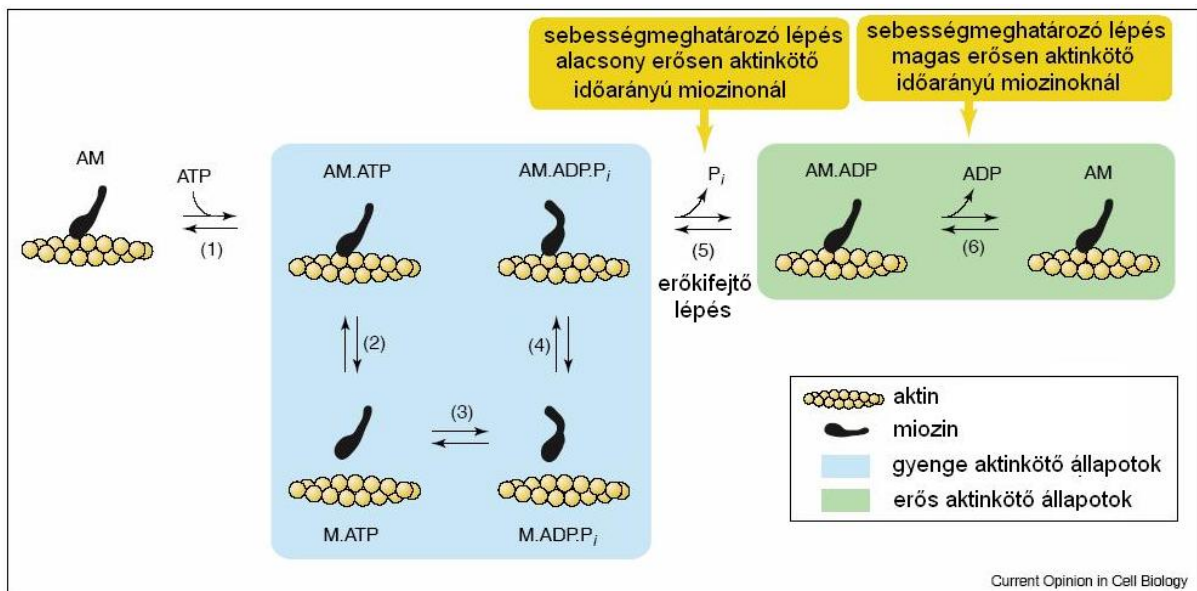
12. Ábra: A ciklusidő és az erősen aktinkötő állapot élettartamának összehasonlítása különböző miozinok esetén

(Kovacs et al., Marston & Taylor, De La Cruz et al.)

(egymás után több enzimatis ciklus megtételére képes, úgy, hogy egyik fejével mindig az aktinhoz kötve marad) miozin V. számára elengedhetetlen, hogy ciklusideje nagy részét erősen az aktinhoz kötve töltse. A II osztályba tartozó nem-izom miozinok a harántcsíkolt és simaizomhoz hasonlóan filamentáris szerkezetűek, azaz több miozin molekula a superhelikális fark régióval összekapcsolódik. Nem processzívek, ám fő szerepük az

izomtónus fenntartásában van, az NM2A például a simaizomban nagy mennyiségben fordul elő, segítve azt a belső szerveket rögzítő feladatának ellátásában. Ehhez rendkívül fontos, hogy egyrészt a ciklusidejük rendkívül hosszú, másrészt a harántcsíkolt izomhoz képest mindhárom forma (NM2A, NM2B, NM2C) a ciklusidőnek nagyobb részét tölti erősen aktinkötő állapotban.

Azoknál a motoroknál, melyeknél az erősen aktinkötő állapot aránya magas, ott a konvencionális miozinnál megszokottól eltérően nem a foszfát felszabadulás, hanem az ADP felszabadulás lesz a sebesség meghatározó lépés (3). Emiatt nem a gyenge aktinkötő poszthidrolízis állapotban (aktomiozin-ADP.Pi komplex), hanem az ADP felszabadulás előtti erős aktinkötő (aktomiozin-ADP komplex) állapotban fog a rendszer a legtöbb időt eltölteni (13. Ábra). Fontos hangsúlyozni, hogy nem az erősen aktinhoz kötött idő abszolút értéke számít, hanem a ciklusidőhöz viszonyított aránya. A miozin V. a vázizom miozinnal összemérhetően gyors motor, így az erősen aktinkötő állapot abszolút életideje is viszonylag rövid, ám ez a ciklusidőnek nagy részét kitölti. A reverz motor miozin VI. mely csak kicsit lassabb, mint a miozin V. és szintén nem képez filamentumokat, a miozin V.-höz hasonló kinetikai tulajdonságokkal rendelkezik. Ezek a kinetikai különbségek alapvetőek a különböző miozinfajták élettani szerepének optimalizálásában.



13. Ábra: Az aktomiozin rendszer ATP-áz ciklusa, az erős és gyenge aktinkötő állapotok feltüntetésével. A számokkal jelölt lépések: 1, Az ATP beköt az aktomiozin rigor komplexhez. 2, Az ATP kötés hatására miozin disszociál az aktinról. 3, A hidrolízis során megtörténik az erőkar „felhúzása”. 4, A miozin-ADP-anorganikus foszfát komplex gyengén visszaköt az aktinhoz. 5, A foszfát felzabadulással együtt megtörténik az erőkifejtő lépés. 6, ADP felzabadulás az aktomiozin-ADP komplexről (Módosítva: Ostap & De La Cruz et al. 2004)

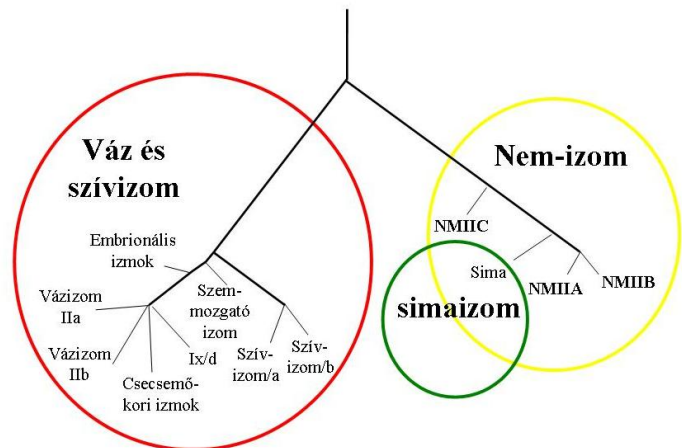
2.2 A nem-izom miozin 2 alcsalád

A nem-izom miozin 2 csoport a simaizommal mutat közeli rokonságot, ezt bizonyítja többek között szabályozásuk hasonló elve (könnyű lánccsoportozással történő ki és bekapcsolás). A humán miozin II. osztály leszármazási kapcsolatait a 14. ábra mutatja (41). Az alcsaládnak három ma ismert képviselője van (NM2A, NM2B, NM2C). A

konvencionális miozinokhoz hasonlóan két fejűek, és filamentáris struktúrába rendeződnek. Fontos feladatuk a sejtosztódáskor a membránbefűződés irányítása, valamint a simaizommal közösen előfordulva változatos fiziológiai szerepek ellátása. A nem-izom, vagy citoplazmikus miozinok kinetikai tulajdonságait az elmúlt öt évben karakterizálták, steady-state, és tranzienst kinetikai módszerekkel.

A nem-izom miozin 2A izoforma hasonlít leginkább a konvencionális miozinokhoz. Ciklusideje ugyan jóval hosszabb ($t_{\text{ciklus}} \sim 2,2 \text{ s}$), mint a vázizomnak ($t_{\text{ciklus}} \sim 0,03 \text{ s}$), ám (a 2B formához viszonyítva) viszonylag kis idejét (16 % - vázizom esetén ez 4%) tölti a ciklusidőnek erősen aktin kötött állapotban (ezt bizonyos faktorok, mint később látni fogjuk, pl. a mechanikai terhelés jelentősen befolyásolja). Magas ADP ($K_{\text{ADP}} = 2 \mu\text{M}$) és aktin ($K_{\text{aktin}} = 75 \mu\text{M}$) affinitással rendelkezik. A vérlemezkék, és a limfociták szelektíven gazdagok NM2A-ban, vegetatív szervek simaizom falában (uterus, vastagbél – döntően kontraktilis szervekben), valamint embrionális szervekben is nagy számban fordul elő, sokszor a „B” izoformával együtt. Részletes kinetikai karakterizálása Kovács és Sellers nevéhez köthető (5).

A „B” izoforma a konvencionális miozintól gyökeresen eltérő kinetikai sajátosságokat mutat. Ciklusideje jelentős részét (50 %) tölti erősen aktin kötött állapotban, ciklusideje rendkívül hosszú ($t_{\text{ciklus}} \sim 6 \text{ s}$). Az „A” izoformához hasonlóan magas aktin ($K_{\text{aktin}} = 59 \mu\text{M}$), és ADP ($K_{\text{ADP}} = 0,11 \mu\text{M}$) affinitással rendelkezik. Gyakran fordul elő idegszövetben (pl. frontális lebeny), valamint a 2A-hoz hasonlóan simaizommal borított belső szervek falában



14. Ábra: A humán miozin II. izoformák leszármazási kapcsolatai (a vonalak hossza az evolúciós távolságokat tükrözi)

(Golomb et al. J. Biol. Chem. 2003)

(vhólyag, aorta – döntően ott, ahol fő feladat az alaktartás). Részletes kinetikai leírása Rosenfeld és Sweeney (4) valamint Wang és Sellers (7) által történt.

A citoplazmatikus miozin C izoforma létezésére a humán genom analizálása derített fényt, Golomb és munkatársai által részlegesen leírásra került (41). Az NM2C-nek két izoformája van, ezek alternatív splicing eredményei. Jellemzően differenciált szövetekben fordul elő, simizom tartalmú szövetekben kifejezetten alacsony az expressziós szintje, ellentétben a másik két izoformával (2A, 2B). Tömegesen előfordul a kérges testben és a hídiban (jellemzően idegsejttest szegény, gliasejt és axon gazdag régiók). Ciklusideje a „B” és az „A” izoforma közé esik ($t_{\text{ciklus}} \sim 5,5$ s), viszonylag nagy százalékát tölti a ciklusidőnek (30 %) erősen aktinkötött állapotban. Részletes kinetikai vizsgálata még várat magára.

2.3 Termodinamika molekulák szintjén

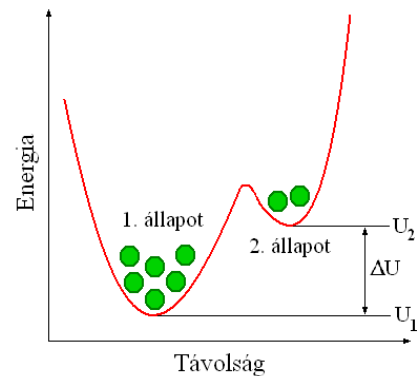
A termodinamika molekulák szintjén statisztikai és valószínűségszámítási eszközökkel dolgozik. Egyik alapvető törvényszerűsége a Boltzmann-törvény, amely azt mondja ki, hogy egy nem alapállapotban lévő (nem abszolút nulla hőmérsékleten) rendszer esetén egy adott molekula mekkora valószínűséggel tartózkodik egy adott állapotban (16):

$$p_i = \frac{e^{-\frac{U_i}{k_B T}}}{\sum_i e^{-\frac{U_i}{k_B T}}} \quad \left[\sum_i p_i = 1 \right] \quad (2)$$

Ahol „ p_i ” az i -edik állapot valószínűsége, „ U_i ” az i -edik állapothoz tartozó energia, „ k_B ” a Boltzmann-állandó, „ T ” az abszolút hőmérséklet. Ez a valószínűség gyakorlatilag csak az adott állapot energiájától és a hőmérséklettől függ. Az energia bármire vonatkozhat, lehet potenciális (pl. gravitáció, elasztikus, stb.) vagy mozgási, vagy egy adott kinetikai fázishoz kötött. Ez mutatja a Boltzmann-eloszlás általános voltát.

Két, adott energiájú állapot (U_1 , U_2) közti átmenet valószínűségét avval fejezhetjük ki, hogy mekkora annak a valószínűsége, hogy a részecskét a második állapotban találom az egyeshez képest (valószínűségek hányadosa) (15. Ábra):

$$\frac{p_2}{p_1} = e^{-\frac{\Delta U}{k_B T}} \quad [\Delta U = U_2 - U_1] \quad (3)$$



15. Ábra: Részecske megtalálási valószínűsége a Boltzmann-eloszlás alapján (Howard et al. 2001 alapján)

A két állapot közötti átmenet valószínűsége tehát adott hőmérsékleten csak az állapotok közti energiakülönbségtől függ. A rendszer egyensúlyi állapotának a Boltzmann-eloszlás felel meg.

A legegyszerűbb kémiai reakció az elsőrendű reakció, melyben a változás sebessége (k_1 , k_{-1} sebességi állandók) lineárisan függ a koncentrációtól:



Ekkor a koncentrációk időbeli változása:

$$\frac{d[E_1]}{dt} = -k_1[E_1] + k_{-1}[E_2] \quad (5)$$

Egyensúly esetén a koncentrációk időben nem változnak ($d[E_1]/dt=0$). Ekkor definiálhatjuk az ún. egyensúlyi állandót (K_{eq}), amely a sebességi állandók hányadosa. Ekkor:

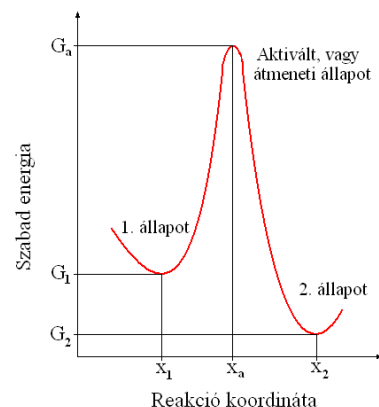
$$K_{eq} = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{[E_2]}{[E_1]} \quad (6)$$

Az előzőek értelmében, ha egy rendszer két állapot között (E_1 , E_2) egyensúlyban van (pl. egy fehérje két szerkezeti állapota), akkor az egyes állapotok koncentrációját ($[E_1]$, $[E_2]$) a két állapot energiakülönbsége határozza meg. Az egyes állapotok koncentrációi (betöltöttsége) alapján kiszámítható a folyamatra jellemző egyensúlyi állandó (K_{eq}):

$$K_{eq} = \frac{[E_2]}{[E_1]} = \frac{p_2}{p_1} = e^{-\frac{\Delta G}{k_B T}} \quad (7)$$

Ahol „ ΔG ” a (Gibbs-féle) szabadenergia ($G = U - TS$), az „ S ” entrópia a szerkezeti állapotok számával van összefüggésben. Itt nem részletezett indoklások alapján az „ U ” energiák a „ G ” szabadenergiákkal helyettesíthetők.

Ha a kémiai átalakulásokat az átmeneti vagy aktivált állapot teóriával értelmezzük, akkor egy fehérje esetén elképzelhető két, viszonylag alacsony energiájú (tehát előnyös szerkezetű) állapot, melyek között az átmenet egy magasabb energiájú állapoton keresztül



16. Ábra: Az aktivált állapot teória (Howard et al. 2001 alapján)

vezet. (16. Ábra). Ezt az állapotot energiagátnak is nevezik. A Boltzmann-eloszlás értelmében annak a valószínűsége, hogy a molekula az aktivált állapotban legyen:

$$\frac{[E_a]}{[E_1]} = e^{-\frac{G_a - G_1}{k_B T}} \quad (8)$$

A termék keletkezésének sebessége $A^*[E_a]$, valamint első rendű reakcióról van szó, tehát a reakció sebessége egyenesen arányos a reagens koncentrációval, így néhány rövid átalakítás után:

$$k_1 = A e^{-\frac{\Delta G_{a1}}{k_B T}} \quad [\Delta G_{a1} = \Delta G_a - \Delta G_1] \quad (9)$$

Ezt az egyenletet Arrhenius-egyenletnek nevezzük, „A” pedig az ún. preexponenciális faktor, mely számos arányossági tagot magában hordoz, viszont nem függ a hőmérséklettől. Így „ ΔG ” az aktivációs energiagátként értelmezhető, melyet „le kell győzni” az átalakulás végbemeneteléhez. Ennyi energiát kell legalább befektetni (pl. ATP hidrolízissel), hogy megtörténjen az átalakulás.

Ha E_1 és E_2 állapotok közötti átmenet egy egyszerű szerkezeti változásnak feleltethető meg (pl. a fehérje egy része d távolsággal elmozdul), akkor a rendszerre külső erővel az elmozdulás irányában hatva eltolhatjuk az egyensúlyt valamelyik irányba (attól függően, hogy az erővel mely irányban hatunk). Ekkor az „F” erő által végzett munka növeli, vagy csökkenti az aktivációs energiagátat:

$$\Delta G = \Delta G^0 - Fd \quad (10)$$

Ekkor az egyensúlyi állandó:

$$K_{eq} = \frac{[E_2]}{[E_1]} = \frac{p_2}{p_1} = e^{-\frac{\Delta G}{k_B T}} = e^{-\frac{\Delta G^0 - Fd}{k_B T}} = K_{eq}^0 e^{\frac{Fd}{k_B T}} \quad (11)$$

Az aktivációs állapot elmélet értelmében a külső erő a következőképpen befolyásolja a reakció sebességét:

$$k_1 = A e^{-\frac{\Delta G_{a1} - Fd_{a1}}{k_B T}} = k_1^0 e^{\frac{Fd_{a1}}{k_B T}} \quad (12)$$

Ahol a „0” indexű tagok az erőhatás mentes állapotra vonatkoznak. A biológiai erők nagyságrendje jellemzően a pikonewton, mivel a biológiai energiaskála az $1 k_B T$ (hőmozgás energiája) szinttől a $25 k_B T$ (ATP hidrolízis) szintig terjed, valamint a molekuláris elmozdulások nagyságrendje a nanométeres skálán mozog (1. Táblázat).

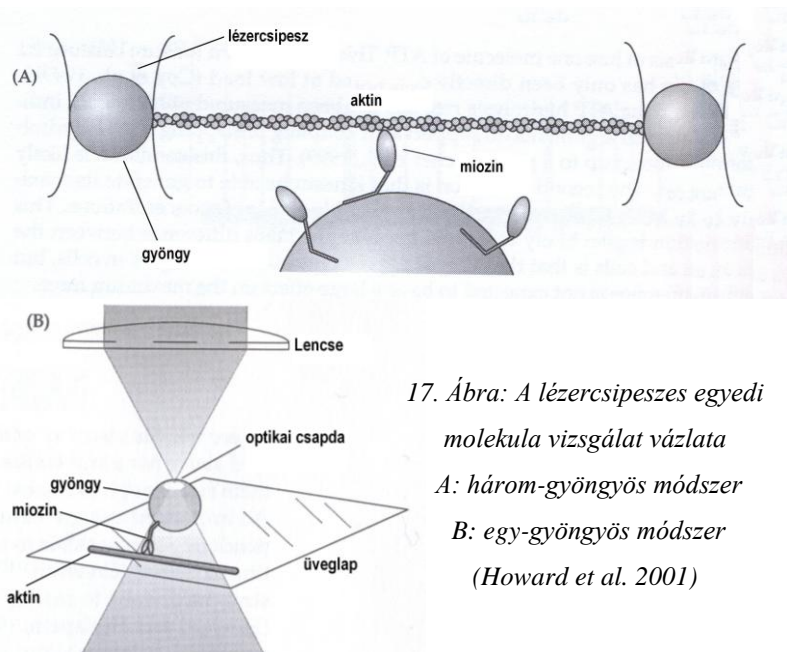
Energia	Formula	Érték (10^{-21} J)
hőmozgás (25 °C)	kT	4,1
zöld foton ($\lambda = 500$ nm)	$h\nu = hc/\lambda$	397
ATP hidrolízis	ΔG	100
elektron transzport (180 mV)	eV	28,8

1. Táblázat: Energiák összehasonlítása (Howard et al. 2001 alapján)

2.4 Motorok terhelésfüggésének vizsgálata

2.4.1 Egyedi molekula vizsgálatok

Az egyedi molekula vizsgálatok két legelterjedtebb módja a TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence – a fény teljes visszaverődésén alapuló fluoreszcens technika) és a lézercsipeszes (optical tweezer) mérések (16). Az előbbi esetben a filamentum (aktin illetve mikrotubulus) van rögzítve, és a rajta lépegető egyedi molekula (fluoreszcensen jelölt miozin vagy kinezin) lépéseit követik nyomon. Az utóbbi esetnek két fajtája van, vagy az aljzathoz rögzített filamentumon mozgó molekula végét rögzítik gyöngyhöz (átmérő $\sim 1 \mu\text{m}$), melyet egy lézercsipesz tart (egy-gyöngyös módszer), vagy két lézercsipesz tartja a filamentum két végéhez rögzített gyöngyöket, és a molekula végét szintén egy gyöngyhöz rögzítik (három-gyöngyös módszer) (17. Ábra).



17. Ábra: A lézercsipeszes egyedi molekula vizsgálat vázlatok
A: három-gyöngyös módszer
B: egy-gyöngyös módszer
(Howard et al. 2001)

A lézercsipesz működése a fény törési törvényén (Snellius-Descartes törvény), és az impulzusegységmaradás törvényén alapszik. A lencse egy adott pontba fókuszálja a fényt, ebben a pontban rögzül a gyöngy (a gyöngy nem teljesen fix, de nagyjából mindig ugyanott marad, mivel ha kimozdul, a mozgással ellentétes irányú erők visszatérítik a fókuszpontba) (16). A csipesszel egyrészt erőt lehet kifejteni, másrészt elmozdulást lehet detektálni.

Az egy-gyöngyös módszert leggyakrabban motilitási vizsgálatokban alkalmazzák. A polimer fehérjén lépegető egyedi fehérje elmozdítja a gyöngyöt, ez az elmozdulás a csipesz segítségével mérhető. Amikor az egyedi molekula disszociál a polimer láncról, a gyöngy visszatér eredeti helyzetébe. A megtett távolság, valamint az egy lépés alatt megtehető távolság ismeretében a polimerhez kötve töltött ciklusok száma kiszámítható. (Valójában annak érdekében, hogy a molekulát ne érje egyre nagyobb feszítő erő, a gyöngyöt utána mozdítják a csipesszel együtt, ez az elmozdulás szintén mérhető.)

A három-gyöngyös módszerrel vizsgálhatók a molekula kinetikai tulajdonságainak változásai terhelés hatására (8, 9). A módszer kifejlesztése Veigel nevéhez fűződik. A molekula rögzített helyzetben van a harmadik gyöngyön, az erőt a polimer lánc párhuzamos mozgásával generálják, meghatározott intenzitással, időtartamon, és távon. Az érzékelt jel a molekula által a polimer szálra kifejtett erő változása. A vizsgálatot rendkívül sokszor el kellett végezni, majd a kapott eredményeket statisztikai elemzésnek alávetni.

Veigel a simaizom miozin S1 fragmentumának terhelésfüggését vizsgálta (8). Vizsgálataiban két lépésben hatott erővel a molekula. Az első lépés időtartama erősen terhelésfüggő volt (a molekula erőhatásának irányában ható terhelés gyorsította, az ellenkező irányú lassította – kb. kétszeres változás a sebességi állandókban)), míg a második lépés sebessége nem függött igazán a terheléstől, sokkal inkább az ATP koncentrációtól. Ezek alapján a második erő kifejtő lépés akkor ér véget, amikor a miozin ATP hatására disszociál az aktinról, az első lépés pedig akkor, amikor az ADP felszabadul a miozin molekuláról. Az első lépés nem igazán függött az ATP koncentrációtól, ez természetes is, mivel ebben az esetben a nukleotid köztözebe foglalt az ADP által. Veigel eredményei alapján a simaizom miozinról történő ADP felszabadulás erősen terhelésfüggő, az előre (aktin „+” vége felé) irányuló terhelés gyorsítja, a hátra (aktin „-” vége felé) irányuló terhelés lassítja azt.

Veigel hasonló vizsgálatokat végzett a miozin V. molekula S1 fragmentumával (9), hasonló eredményre jutva, mint a simaizom miozin esetében. A miozin V. molekula ADP felszabadulási lépése a simaizomnál még erősebb terhelésfüggést mutatott. Veigel az ADP felszabadulás terhelésfüggésével magyarázta a miozin V. molekula processzív működését, amihez egyrészt az szükséges, hogy az egyik fej mindig aktinhoz kötve maradjon (magas az

erősen aktinkötő állapotok aránya), valamint elengedhetetlen a két fej egymással való kommunikációja. Viegel szerint a két fej az aktinhoz kötve egymásra erőt fejt ki, ezáltal szabályozzák egymás aktomiozin-ADP állapotának élettartamát.

Veigel vizsgálataiban felfedezte, hogy a különböző miozin molekulák nem egyformán érzékenyek a mechanikai terhelésre, valamint, hogy az aktomiozin komplex ATP-áz ciklusának egyes lépései sem egyformák terhelésfüggés szempontjából. A leginkább terhelésfüggést mutató lépés az ADP felszabadulás (lásd korábban). Az adott molekulára valamint molekuláris folyamatra Veigel egy mérőszámot vezetett be, ez egy karakterisztikus távolság (nm nagyságrendű), mely egyedi molekula vizsgálatokkal mérhető. A sebességi állandó terhelésfüggése ezen távolság segítségével fejezhető ki:

$$k(T) = Ae^{-\frac{\Delta G - Fd}{k_B T}} \quad (13)$$

Ahol „A” preexponenciális faktor, „ k_B ” a Boltzmann állandó, „ ΔG ” az aktivációs szabadenergia a két állapot között, „T” az abszolút hőmérséklet, „F” a molekulára kifejtett külső erő. „d” az adott molekulára jellemző karakterisztikus távolság, mely az erővel szorozva munka, azaz energia dimenziójú mennyiséggé válik. Veigel szerint a kereszt híddal való elmozdulásaként interpretálható, és a molekula feszültségre való érzékenységét fejezi ki.

Az egyedi molekula vizsgálatok (ilyen vizsgálatokat számos más motorfehérjén, pl. kinezinon is végeztek) képezték a későbbi, tranziens kinetikai terhelésfüggést kutató vizsgálatok alapjait. Az evvel közvetlenül mérhető szerkezeti változások nagy segítséget nyújtottak a kinetikai változások szerkezeti alapjainak interpretálásához.

2.4.2 Tranziens kinetikai vizsgálatok

A tranziens kinetikai mérések nagy előnye az egyedi molekula vizsgálatokkal szemben, hogy egyszerre (egy lövéssel) számos eseményt detektálunk, mivel több molekula végzi ugyanazt a folyamatot. Ennek eredményeképpen jobb lesz a jel-zaj arány, mivel az egyedi molekula vizsgálatoknál értelemszerűen egyszerre csak egy molekulát tudunk vizsgálni. Ahhoz hogy statisztikát lehessen készíteni belőle, rengetegszer kell ugyanazt megmérni. Másik nagy előny, hogy a fluoreszcens nukleotidok segítségével egyértelműen be tudjuk azonosítani, hogy a fluoreszcencia változás mely kémiai folyamatnak tulajdonítható. Egyedi molekula vizsgálat esetén a konkrét kémiai folyamatra csak indirekten tudunk

következtetni. A tranziens kinetika hátránya viszont, hogy az egyedi molekulával direkten vizsgálható szerkezeti változásokra csak a kristályszerkezetek és a kémiai változással kapcsolatos ismereteink alapján következtethetünk. Triptofán fluoreszcencia változás esetén is maximum annyit lehet mondani, hogy az adott triptofán és környezete mélyebbre vagy a felszínhez közelebb került-e a folyamat során.

A terhelésfüggés tranziens kinetikai vizsgálatának egyik megközelítése azon az elven alapszik, hogy a kétféjű motorfehérjében a polimer sínhez kötve, annak szomszédos kötőhelyeit elfoglalva a szabad állapothoz képest feszültség keletkezik a molekulán belül.

Rosenfeld a mizon V. és a kinezin motorfehérjék kinetikai paramétereit vizsgálta ezzel a módszerrel, és mindkét enzim processzivitását azzal magyarázta, hogy a fejek egymásra erőt kifejtve kommunikálnak, így szabályozzák egymás ATP-áz ciklusait, annak érdekében, hogy az egyik fej mindig az aktinhoz illetve a mikrotubulushoz kötve maradjon (14, 15).

A nem-izom miozin 2A és 2B terhelésfüggését Kovács mutatta ki, a miozinok kétféjű konstrukcióinak használata segítségével (13). Az aktin-NM2-ADP komplexről (mindkét fejjel erős aktinkötő állapot – elektronmikroszkópos felvételek segítségével alátámasztva)), történő ADP felszabadulást vizsgálta, nagy mennyiségű, kompetitív nukleotid (ATP, ADP) hozzáadásával. Fluoreszcens jelként dmADP-t, valamint pirén-aktint használt. Terheletlen kontrollként egyfejű (S1) konstrukciót, illetve aktinmentes állapotot használt. A terheletlen állapotokban az ADP felszabadulás egy lépésben, míg a terhelt állapotokban két lépésben történt. Ez azzal magyarázható, hogy terheletlen állapotban homogén populációkat látunk, míg terhelt állapotban az egyes fejek az erőhatás miatt lecsökkent, illetve megnőtt sebességgel szabadítják fel az ADP-t, így külön detektálhatjuk az ADP felszabadulást az egyes fejekekről. A sebességi állandók a terhelt állapotokban öt-tízszeres csökkenést, illetve növekedést mutattak a terheletlen állapotokhoz képest. A munkának az ADP kötés kinetikájának karakterizálása is részét képezte, amely nem mutatott terhelésfüggést.

A terhelésfüggés magyarázatot adhat az ún. Fenn-effektusra, mely szerint az izom izotónikus (állandó izom feszültség) kontrakció során több hő termelődik, mint izometrikus (állandó izomhossz) esetén. Fenn ezt a hőt rövidülési, vagy összehúzóási hőnek nevezték. A több hő termelés arányban áll az összehúzóás alatt elfogyasztott ATP mennyiségével. Ezek szerint az izom rövidülésével nem járó kontrakció (ilyenre van szükség pl. a belső szervek falában az alakot fenntartó izmok pl. aorta esetén) energiaspóroló „üzemmódban” működik a miozin, tehát egy ATP-áz ciklus jóval tovább tart (nő az erősen aktinkötő állapot életideje – tehát egyre lassabb az ADP felszabadítás sebessége). Emiatt az izom nem rövidül, hanem egyre növekvő feszültség alatt folyamatosan tartja az aktint, így adott idő alatt kevesebb ATP-

t fogyaszt, mint izotónikus kontrakció esetén, amikor sok ATP-áz ciklus lezajlik, hogy az izom összehúzódhasson.

3 CÉLKITŰZÉSEK

Kísérleteinkben arra keressük a választ, hogy:

1. A mechanikai terhelés hogyan változtatja meg az Arrhenius-egyenletben leírt termodinamikai és kinetikai paramétereket?
2. Milyen szerkezeti és dinamikai változások történhetnek a fehérjében a hőmérséklet változtatásával?
3. Mivel magyarázható a terheletlen kontrolként alkalmazott szubfargment 1 konstrukció nem várt viselkedése?

4 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1 NM2A előállításuk eukarióta sejt kultúrában bakulovírus segítségével

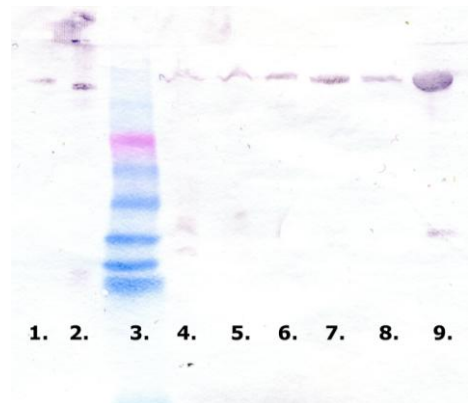
A fehérjét Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) rovarsejt-kultúrával termeltettük. A kódoló géndarabot bakulovírus vektorral juttattuk a sejtekbe. Táptalajnak InsectExpress medium oldatot (+ 1% penicillin-streptomycin) használtunk. A vírust mindig sötétben tároltuk, 4 °C-on, 2% (V/V) FBS-t (fetal bovine serum) hozzáadva. A vírus (külön HMM-et, S1-et és a könnyű láncokat tartalmazó konstrukciók) elérhető volt a témavezető korábbi munkájából, a meglévő vírus törzseket amplifikáltuk az expresszió megkezdése előtt.

Amplifikálás: A P1 vírustörzs (ez a kezdetben elkészült vírus) kb. 1,5 ml volt, ebből szaporítottuk fel a későbbi „vírusnemzedékeket”. A P2 generációt úgy készítettük, hogy 50 ml sejt kultúrát ($8 \cdot 10^5$ sejt/ml) 1 ml P1-el fertőztünk, majd 48 órán át, rázatva inkubáltuk 27 °C-on. Ezután lecentrifugáltuk (1000 rpm, 1 min, hűtéssel, K23 centrifuga), majd a felülúszót 2% FBS-t hozzáadva 4 °C-on tároljuk (P2). A P3 generáció elkészítésekor 100 ml sejt kultúrát ($8 \cdot 10^5$ sejt/ml) fertőzünk meg 1 ml P2-vel, és a P2-höz hasonlóan rázatjuk, majd centrifugáltuk és tároltuk. A P3 generáció fehérjetermelését SDS gél/Western blot eljárással ellenőriztük.

Expresszió: 400 ml Sf9 kultúrához ($2 \cdot 10^6$ sejt/ml) hozzáadtuk a fehérjénket termelő vírust és a hozzá tartozó könnyűláncokat termelő vírust, és 72 órán át inkubáltuk 27 °C-on folyamatos rázás közben. Ezután centrifugáltuk a sejteket (5 perc, 3000 rpm, 4 °C), majd PBS-ben mostuk. Az összegyűjtött sejteket 50 ml-ként folyékony nitrogénben hirtelen fagyasztottuk, majd -80 °C-on tároltuk. Az expresszió eredményét SDS gél/Western blot eljárással ellenőriztük.

4.2 NM2A preparálása FLAG affinitás kromatográfiával

Valamennyi expresszált fehérjekonstrukció C-terminális FLAG-címkét hordozott a könnyebb tisztíthatóság érdekében. A preparálás első lépése a fagyasztott sejtek felolvasztása és homogenizálása extrakciós pufferben [10mM HEPES pH 7,3; 200 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1mM EGTA, 3 mM NaN₃, 0,1 mM DTT (ditiotreitól), 0,1 mM PMSF (fenil-metil-szulfonil-fluorid), 1 mg/l leupeptin, proteáz gátló koktél, (ezek védik a fehérjét a felhasadástól) 2 mM ATP (hogy a miozin elengedje az aktint, és ne ragadjon bele a sejttermékbe)]. Az extraktumot szonikáltuk, majd centrifugáltuk (15 min, 20000 RPM, 4°C, Jouan KR22i centrifuga). A centrifuga felülúszóhoz 3 ml FLAG affinitás gyantát (Sigma) adtunk, és egy éjszakán át rázatva inkubáltuk. Másnap centrifugáltuk (1000 RPM, 1 min, K23 centrifuga) és a gyantát kromatográfiás oszlopba töltöttük. Ezután M+ATP-pufferrel és 80 % : 20 % arányú HMM puffer : M puffer keverékkel mostuk az oszlopot, hogy a fölösleges sejtalkotók távozzanak. (HMM puffer: 10 mM HEPES pH 7,2, 0,1 mM EGTA, 3 mM NaN₃, 0,1 mM DTT, 0,1 mM PMSF, 1 mg/l leupeptin; M+ATP puffer: 10 mM HEPES pH 7,2, 0,1 mM EGTA, 3 mM NaN₃, 0,5 M NaCl, 0,1 mM DTT, 0,1 mM PMSF, 1 mg/l leupeptin, 1 mM ATP, 5 mM MgCl₂). Az oszlopon átfolyó fázisokat is gyűjtöttük, későbbi Western blot-analízishez. Az NM2A-t 0,3 mg/ml kompetitív FLAG peptiddel mostuk le az affinitás



18. Ábra: Western Blot NM2A-S1 preparálás. A csíkok sorrendben: 1-2. pozitív kontrol, 3. fehérjelétra, 4-5. teljes sejtízátum, 6. első centrifugálás utáni felülúszó, 7. FLAG-oszlop átfolyó, 8. Mary és HMM pufferes mosás, 9. FLAG-peptides elúció. Látható, hogy az oszlop nem köti meg tökéletesen a fehérjét, ennek oka az oszlop elhasználódása

oszlopról, az eluált frakciókban a fehérjekoncentrációt Bradford-reagenssel ellenőriztük. A fehérjét ezután Q-Sepharose ioncserélő oszlopon koncentráltuk (felvitel kis ionerejű 80 % : 20 % arányú HMM puffer : M puffer keverékben lemosás nagy ionerejű M pufferrel). A koncentrált fehérjét 100 mM NaCl-t tartalmazó HMM pufferben dializáltuk, majd gyorsfagyasztottuk, és folyékony N₂-ben tároltuk. SDS gél elektroforézis/Western blot módszerrel vizsgáltuk (létra: Benchmark prestained protein ladder – invitrogen) az egyes frakciókban lévő fehérje mennyiségét, hogy tudjuk, mekkora volt a veszteség a preparálás alatt.

4.3 dmADP készítése

A dmADP-t (N-metilantraniloil-2'-dezoxi-ADP 2-e dezoxi-ADP és metilizatoinsav-anhidrid konjugációjával állítottuk elő. A szintézist szerves oldószerben (dimetil-formamid) végeztük, mivel vizes fázisban a hatásfoka kicsi. Dezoxi-ADP-t (dADP) használtunk, hogy a metilizatoinsav-anhidrid csak az egyik hidroxil-csoport helyére tudjon kötődni. Ez azért fontos, mivel a 2' és 3' OH-csoportot egyaránt tartalmazó ADP használatakor a metilantraniloil csoport mindkét helyre kötődhet, ami a miozinnal különböző módon reagáló izomereket (és ebből kifolyólag komplikált kinetikai profilokat) eredményez. Mivel a Na-dADP szerves oldószerekben kicsapódik, ezért előtte egy HiTrap Q FPLC ioncserélő oszlopon a Na⁺ iont trietil-ammónium-hidrogén-karbonátra cseréltük. Ezt követően az anyagot liofilizáltuk, majd elvégeztük a szintézist (egy éjszakán át, 4 °C-on, dimetil-formamidban, 10:1 metilizatoinsav-anhidrid:dADP molaránynál). A szintetizált dmADP-t ioncserélő oszlopon tisztítottuk, utána liofilizáltuk, majd lefagyasztottuk és -80 °C-on tároltuk.

4.4 NM2A vizsgálata tranziens kinetikai módszerekkel

A reakciók tranziens kinetikai nyomon követése lehetőséget biztosít arra, hogy az enzimátikus ciklus azon lépéseit is megfigyeljük, melyek milliszekundumos időskálán mozognak. A steady-state ATP-áz mérésekkor csak a ciklus sebesség meghatározó lépését figyelhetjük meg, a tranziens kinetika lehetőséget nyújt a lépések külön-külön való kinetikai karakterizálására.

Kísérleteinkben az ADP akto-NM2A komplexről való felszabadulásának kinetikáját és annak hőmérsékletfüggését vizsgáltuk, a fehérje mechanikailag terhelt és terheletlen állapotaiban. Az enzimreakciót stopped-flow (megállított áramlásos) kísérletekkel vizsgáltuk.

Ez a gyorskeveréses mérőberendezés (KinTek Corp.) reakciók milliszekundumos időfelbontású követésére alkalmas. A műszer felépítési és működési elve a következő.

A két, különböző fecskendőbe töltött reaktáns a dugattyúk gyors megnyomásakor egy keverőkamrába, majd onnan egy küvettaába jut (19. ábra). A reakció szinte azonnal (kb. 1 ms holtidő után) megfigyelhető. A küvetta egy leolvasó berendezés belsejében van, mellyel abszorbanciát és fluoreszcenciát is érzékelhetünk (17).

A reakciót egy speciálisan erre tervezett programmal (Kintek SF-2004) követtük nyomon és értékeltük ki. A programban beállítható többek között a megfigyelni kívánt időtartam, a tubusból kinyomott anyag mennyisége, az áramlás sebessége, és hogy milyen módszerrel kívánjuk detektálni a reakciót.

A fluoreszcencia időbeli változására a Kintek programjának segítségével általában egy vagy többlépéses folyamat esetén kétfázisú exponenciális függvény illeszthető:

$$Y = Ae^{-kt} + C \quad (14)$$

$$Y = A_1e^{-k_1t} + A_2e^{-k_2t} + C \quad (15)$$

Ahol „A” a fluoreszcencia változás amplitúdója, „k” a sebességi állandó, C pedig a végső fluoreszcenciaszint.



19. ábra: A stopped-flow mérőberendezés (bal oldali ábra) és sémája (jobb oldali ábra) (KinTek Corp.)

Kísérleteink a fluoreszcencia időbeli változását követtük nyomon. A megfigyelt jelet a hőmérséklet- és ADP koncentrációfüggés esetén dmADP fluoreszcens nukleotid adta. Ennek

előnyös tulajdonsága, hogy a jelöletlen ADP-hez nagyon hasonló kinetikai tulajdonságokkal rendelkezik. Miozinhoz kötődve erősen megnő a fluoreszcenciája, a fehérjéről való felszabadulásakor pedig lecsökken. További jelerősítést értünk el azzal, hogy a dmADP-t nem közvetlenül, hanem a miozin triptofánokról történő rezonancia energia transzfer révén gerjesztettük (gerjesztési hullámhossz: 280 nm, emisszió detektálása: 420 nm-es felüláteresztő optikai szűrővel). A fluoreszcencia-jel időbeli változását figyeltük meg, különböző hőmérsékleteken.

Az aktinkoncentrációfüggést vizsgáltuk jelöletlen aktin-dmADP párosítással, valamint jelöletlen ADP-pirén aktin párosítással is (a pirén aktinról lásd bővebben később). A pirén aktin fluoreszcencia növekedést mutat, amikor leválik róla a miozin, azokban a mérésekben, melyekben pirén aktint használtunk, a kompetitor értelemszerűen ATP volt.

A hőmérsékletfüggés és az ADP koncentráció mérésekor akto-NM2A-S1-dmADP (terheletlen, egyfejű állapot), illetve akto-NM2A-HMM-dmADP (terhelt, kétfejű állapot) komplexeket kevertünk össze jelöletlen ADP-vel illetve ATP-vel. Aktinkoncentráció függés esetén az akto-NM2A-S1-dmADP valamint NM2B-S1 komplexet löttük össze ADP-vel, illetve a pirén-aktin-NM2A-S1-ADP valamint NM2B-S1 komplexet ATP-vel. A jelöletlen ADP-t és ATP-t nagy (ADP esetében 20-szoros, ATP esetében 100-szoros) fölöslegben reagáltattuk az akto-NM2A-dmADP komplexekkel. Az ilyen, ún. „chasing” kísérletekben a disszociációs sebességi állandó izoláltan vizsgálható, mivel a nagy feleslegű jelöletlen ADP és ATP jelenléte miatt a dmADP visszakötődése nem befolyásolja a fluoreszcencia tranzienseket. A reaktánsokat a következő összetételű pufferben vettük fel: 10 mM HEPES pH 7,0; 5 mM MgCl₂, 0,15 mM EGTA, 100 mM KCl, 1mM DTT.

Az egyes sorozatokbanösszelőtt reaktánsok összetétele a következő volt:

Hőmérsékletfüggés:

1. A: 5 μM aktin, 0,8 μM [NM2A-S1](#), 5 μM dmADP
B: 200 μM [ADP](#)
2. A: 5 μM aktin, 0,8 μM [NM2A-S1](#), 5 μM dmADP
B: 1 mM ATP
3. A: 5 μM aktin, 1 μM [NM2A-HMM](#), 5 μM dmADP
B: 200 μM [ADP](#)
4. A: 5 μM aktin, 1 μM [NM2A-HMM](#), 5 μM dmADP
B: 1 mM [ATP](#)

Aktin koncentrációfüggés:

5. A: 0; 0,3; 0,6; 1; 1,5; 2; 3; 5 μM aktin, 1 μM [NM2A-S1](#), 5 μM dmADP
B: 200 μM [ADP](#)
6. A: 0,1; 0,3; 0,6; 1; 1,5; 2; 3; 5 μM pirén-aktin, 1 μM [NM2A-S1](#), 5 μM dmADP
B: 1 mM ATP
7. A: 0; 0,3; 0,6; 1; 1,5; 3; 8 μM aktin, 1 μM [NM2B-S1](#), 5 μM dmADP
B: 200 μM [ADP](#)
8. A: 0,3; 0,6; 1; 1,5; 3; 8 μM pirén-aktin, 1 μM [NM2B-S1](#), 5 μM dmADP
B: 1 mM ATP

ADP koncentrációfüggés:

9. A: 5 μM aktin, 1 μM [NM2A-S1](#), 0,3; 0,6; 1; 1,5; 3; 6; 12; 20 μM dmADP
B: 200 μM [ADP](#)

4.5 NM2A-HMM tiofoszforilálása

A HMM-et tiofoszforilálni kellett, hogy biztosítsuk a motor aktivitását (6). (A tiofoszforilálás a foszforilálás hatását mimikálja, ám annál stabilabb módosítás. Az S1 konstrukció konstitutívan, tiofoszforilálás nélkül is aktív.) A tiofoszforilálást 1 $\mu\text{g/ml}$ MLCK (miozin könnyűlánc kináz), 1 μM kalmodulin (a kalmodulin Ca^{2+} -kötött állapotban biztosítja az MLCK aktivitását), 1 mM ATP γ S (a tiofoszforiláláshoz szükséges ATP-analóg szubsztrát), 2,5 mM CaCl_2 jelenlétében végeztük a fenti mérési pufferben, egy órán keresztül, szobahőmérsékleten. Ezután az ATP γ S-et gélszűrővel (Sephadex-G-25 medium) választottuk el a fehérjétől.

4.6 Aktin preparálás

Az aktin filamentumokat nyúl vázizomból készített szárazporból, Spudich és Watt módszere alapján állítottuk elő (10). Méréseinkben az aktin filamentumokat falloidin (Sigma) segítségével stabilizáltuk (a falloidin meggátolja az aktin depolimerizációt).

4.7 Pirén – aktin preparálás

Az elkészített F-aktint tízszeres moláris feleslegben DMSO-ban (dimetil-szulfoxid) oldott pirén-jódacetamiddal (Molecular Probes) jelöltük. A pirén fluoreszcens anyag (gerjesztési maximum: 338 nm, emissziós maximum: 378 nm), a jódacetamid az aktin 374-e ciszteinjével lép reakcióba (emiat rendkívül fontos, hogy a puffer ne tartalmazzon DTT-t, mivel a pirén az aktin helyett a DTT-vel elreagálna). A jelölést egy éjszakán át szobahőmérsékleten végezzük, a kicsapódott, felesleges anyagokat centrifugálással (1000 rpm, 4 °C, 2 min) választjuk el. Ezt követően megismételjük az aktin tisztítási lépéseket Spudich módszere alapján (10).

4.8 A reakció modellezése Gepasi program segítségével

A különböző, (ATP illetve ADP kompetitoros) reakciókat Gepasi kinetikai szimulációs program (www.gepasi.org) segítségével modelleztük, annak érdekében, hogy összehasonlíthassuk a kapott eredményeket elméleti értékekkel.

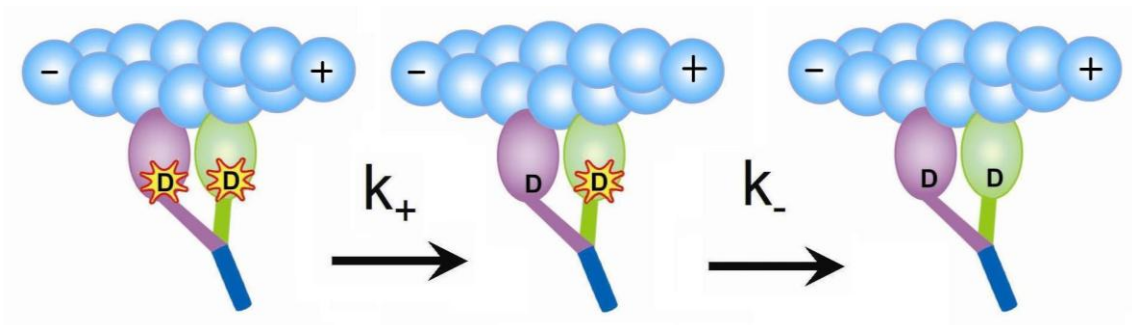
5 EREDMÉNYEK

5.1 A kísérletek szerkezeti modellje

Kísérleteinkben a dmADP akto-NM2A-HMM-ről (illetve akto-NM2A-S1-ről) való felszabadulását követtük nyomon, mechanikailag terhelt és terheletlen állapotokban. Tranziens kinetikai méréseink során a dmADP-nek a disszociációkor bekövetkező fluoreszcencia-csökkenését detektáltuk.

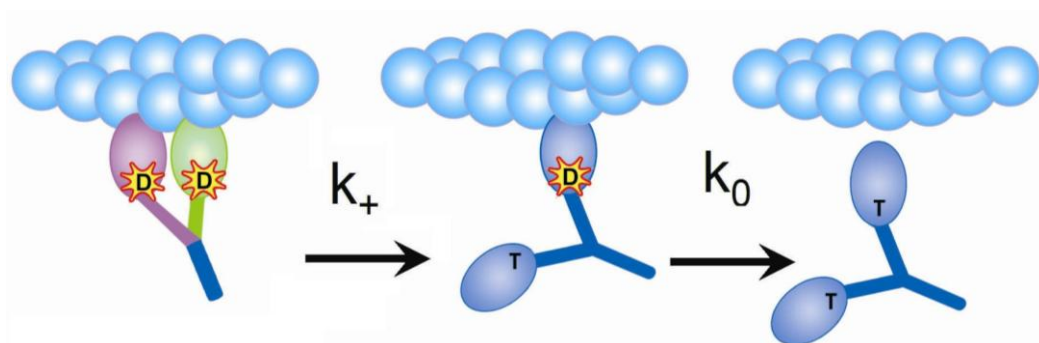
Ha az akto-NM2A-HMM-dmADP komplexet nagy feleslegben lévő jelöletlen ADP-vel keverjük össze a stopped-flow készülékben, akkor először a hátsó (követő, az aktin filamentum mínusz vége felől elhelyezkedő) fejben cserélődik le a dmADP ADP-re (20. Ábra). A követő fej, mivel előre húzza az első (vezető) fej, nagyobb sebességi állandóval (k_+) szabadítja fel a dmADP-t, mint terheletlen körülmények között (k_0). A vezető fejre Newton III., kölcsönhatásokra vonatkozó törvényének értelmében egy ugyanakkora, de

ellentétes irányú erő hat, így ez a fej egy, a terheletlen állapoténál kisebb sebességi állandóval (k_-) fogja felszabadítani az ADP-t (20. Ábra).



20. Ábra: A dmADP (csillaggal jelölt D) szekvenciális kicserélődése ADP-re (D) az NM2A-HMM molekula követő (lila), majd vezető (zöld) fején

Ha az akto-NM2A-HMM-dmADP komplexhez feleslegben jelöletlen ATP-t keverünk, akkor az előző reakcióhoz hasonlóan először a követő fejben cserélődik le a dmADP ATP-re (21. Ábra). A folyamat az előzőekhez hasonlóan szintén a terheletlen állapotnál nagyobb k_+ sebességi állandóval megy végbe, mivel ebben az esetben is előre irányuló terhelést érez a követő fej. ATP kötésekor viszont az előző reakcióval ellentétben a követő fej disszociál az aktinról, így a terhelés megszűnik. Emiatt a vezető fejben a dmADP lecserélődés terheletlen állapotban, k_0 sebességi állandóval történik (21. Ábra).

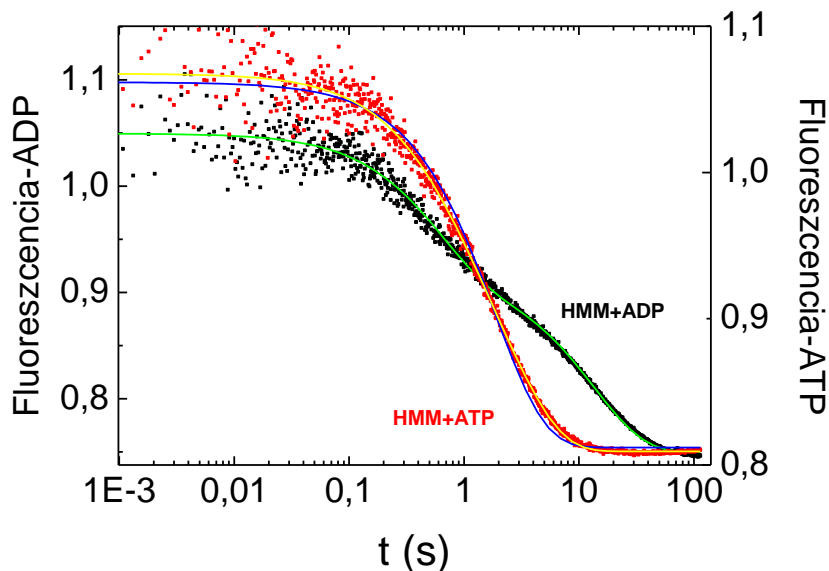


21. Ábra: A dmADP (csillaggal jelölt D) kicserélődése ATP-re (T) az NM2A-HMM molekulán (Lila: követő fej, zöld: vezető fej, sötétkék: mechanikailag terheletlen HMM molekula)

5.2 A fluoreszcencia tranziensek elemzése

A dmADP fluoreszcencia időbeli változását KinTek SF-2004, illetve Origin programok segítségével értékeltük. A mérésorozatokat két alkalommal végeztük el, és a két

esetben igen hasonló eredményeket kaptunk. A reakciók időbeli lecsengését exponenciális függvényekkel közelítettük. A 22. ábrán nyomon követhetjük a folyamatok időbeli alakulását a HMM esetén.



22. Ábra: Akto-NM2A-HMM *dmADP* felszabadításának időbeli nyomon követése ADP (fekete) és ATP (piros) hozzáadása után. Illesztett paraméterek:

$$\text{ADP (két exponenciális, zöld): } y = 0,13 * e^{-t * 1,66} + 0,16 * e^{-t * 0,073} + 0,74$$

$$\text{ATP (két exponenciális, sárga): } y = 0,07 * e^{-t * 1,63} + 0,18 * e^{-t * 0,38} + 0,809$$

$$\text{ATP (egy exponenciális, kék): } y = 0,24 * e^{-t * 0,53} + 0,811$$

A HMM esetében az ATP és ADP kompetitorokhoz tartozó görbék között rendkívül nagy a különbség. ADP alkalmazásakor a reakció tisztán szétválik két, közel azonos amplitúdójú fázisra (sebességi állandók: k_+ és k_- ; 20. és 22. Ábra). ATP esetében a két fázis nem válik külön ennyire élesen, ezért az illesztett sebességi állandók (k_+ , k_0 , 21. Ábra) jobban „összemosódnak”, ami megnehezíti az adatok kiértékelését. Itt a *dmADP* felszabadítás időbeli lecsengésére egyfázisú exponenciális függvényt is lehet illeszteni viszonylag kis szisztematikus hibával (22. Ábra), amelynek sebességi állandója így a k_+ és k_0 átlagához közeli értéket fog mutatni.

Az 2. táblázatban néhány példát láthatunk a HMM molekula *dmADP* felszabadító lépésének sebességi állandóira, ADP és ATP esetében, két különböző hőmérsékleten.

t (°C)	kompetitor	k_+ (s ⁻¹)	k_0 (s ⁻¹)	$k_-(s^{-1})$
9	ADP	1,6	-	0,067
	ATP	1,6	0,36	-
18	ADP	6,9	-	0,33
	ATP	6,9	1,9	-

2. Táblázat: Néhány példa a $dmADP$ felszabadulás különböző irányokban mechanikailag terhelt (k_+ , k_-) és terheletlen (k_0) sebességi állandóira NM2A-HMM esetén két különböző hőmérsékleten

5.3 A kinetikai paraméterek hőmérséklet-függése

Ha a kapott adatokat az Arrhenius egyenletből származó Eyring egyenlet (16. egyenlet) szerint ábrázoljuk (9. Ábra), a meredekségekből és a tengelymetszetekből kiszámíthatjuk a reakcióra jellemző aktivációs szabadentalpiát (ΔH^\ddagger), valamint az aktivációs entrópiát (ΔS^\ddagger) (3. Táblázat). Az Eyring-féle egyenlet a következő:

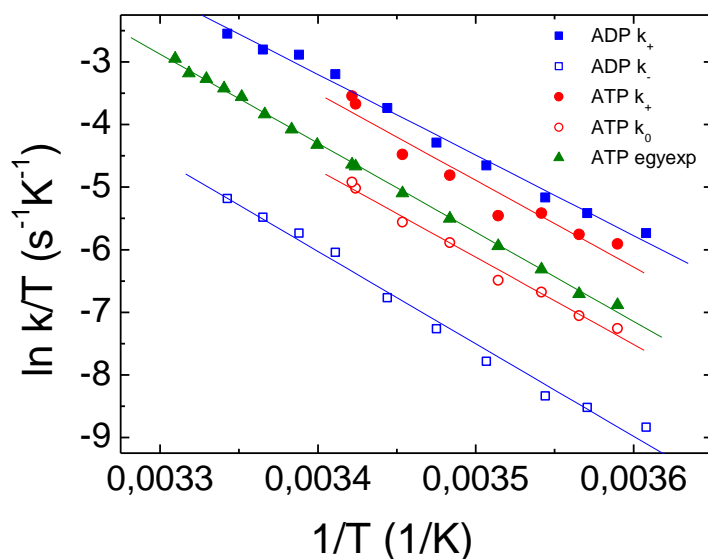
$$\ln \frac{k}{T} = -\frac{\Delta H^\ddagger}{R} \cdot \frac{1}{T} + \ln \frac{k_B}{h} + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} \quad (16)$$

Ahol k_B a Boltzmann-állandó, h Planck-állandó, R pedig az univerzális gázállandó.

A táblázatból kiolvasható, hogy ADP kompetitor esetén a hátrafelé irányuló terhelés növeli az aktivációs entalpiát (ezáltal lassítva a reakciót, k_-), míg az előre irányuló terhelés csökkenti azt (így a reakció gyorsabb lesz, k_+). A terheletlen k_0 sebességi állandó paraméterei k_+ és k_- közötti értékeket vesznek fel. Kimutatható változás az aktivációs entrópiákban is, emiatt az Arrhenius egyenletben szereplő preexponenciális faktorban is kismértékű változás következik be.

ATP esetében a (k_+ , k_0) sebességi állandók közelségük miatt „összemosódnak”, ezáltal a reakció két fázisa magasabb hőmérsékleten (20°C felett) már nem különíthető el, illetve alacsonyabb hőmérsékleteken is csak nehezen különíthetők el a csekély mértékben (három-négyszeresen) különböző sebességi állandójú fázisok. Az elkülönítést a kísérletekben természetesen jelenlévő zaj is nehezíti. Ez az oka annak, hogy ATP kompetitor esetében a k_+ -

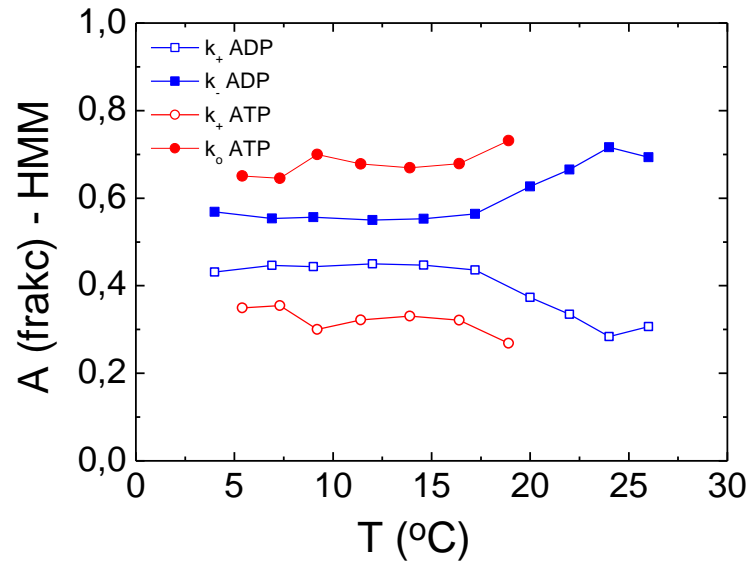
hoz tartozó paramétereket jóval nagyobb hiba terheli, mint ADP esetén (3. Táblázat, 23. Ábra).



23. Ábra: A dmADP felszabadulás sebességi állandóinak hőmérsékletfüggése az Eyring egyenlet alapján (A zölddel jelölt pontsor egyfázisú exponenciális illesztés esetén, a pirossal jelöltek kétfázisú illesztések esetén mutatják a sebességi állandók hőmérsékletfüggését ATP kompetitor alkalmazásakor. Magasabb hőmérsékleteken ($1/T < 0,0034/K$) a két fázis elválasztása nem volt lehetséges ATP kompetitorral.)

Sebességi állandó	m [K]	B	$\Delta H^\#$ [kJ/mól]	$\Delta S^\#$ [J/(mól*K)]
ADP k_+	-12878	40,58	$107 \pm 3,6$	140 ± 12
ADP k_-	-14773	44,20	$122 \pm 4,7$	170 ± 15
ATP k_+	-13842	43,55	115 ± 12	165 ± 41
ATP k_0	-13935	42,65	$116 \pm 1,6$	157 ± 17
ATP k (egy exponenciális)	-14231	44,08	$118 \pm 1,1$	$169 \pm 3,8$

3. Táblázat: A dmADP felszabadulás sebességi állandóinak hőmérsékletfüggéséhez (9. ábra) tartozó meredekségek és tengelymetszetek ($y = mx + b$ egyenlet alapján), illetve a belőlük kiszámítható aktivációs entalpia ($\Delta H^\#$) és entrópia ($\Delta S^\#$) értékek



24. Ábra: A dmADP felszabadulás gyors és lassú fázisaihoz tartozó frakcionális amplitúdók ($A_{frakc} = A_i / \sum A_i$) hőmérsékletfüggése

A reakciók amplitúdó eloszlása a 24. ábrán követhető nyomon. Jól látható, hogy az ATP kompetitor alkalmazásával felvett tranziensek frakcionális amplitúdói ($A_{frakc} = A_i / \sum A_i$) jobban eltérnek a 20-21. ábra sémája alapján elvárt 0,5-0,5 megoszlástól, mint az ADP kompetitorhoz tartozók. Ennek az oka, hogy az ATP-hez tartozó sebességi állandók kevésbé válnak szét, mint ADP esetében (lásd alább). Magas hőmérsékleten nem ábrázolhatók az ATP-hez tartozó frakcionális amplitúdók, mivel ekkor a dmADP felszabadulás időfüggésében nem volt szétválasztható a két fázis (vö. 22. Ábra).

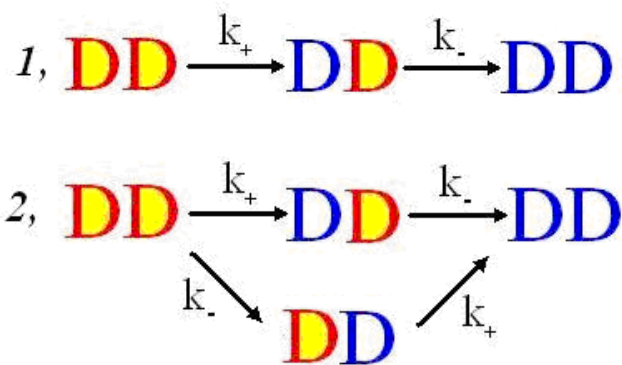
5.4 A dmADP felszabadulás kinetikai szimulációja

A már említett jelenséget, miszerint a sebességi állandók egyes esetekben „összemosódhatnak” és az illesztett frakcionális amplitúdók is eltérhetnek a 0,5-0,5 értéktől, a reakciósémák alapján végzett numerikus szimulációk segítségével értelmeztük. Arra voltunk kíváncsiak, hogyan befolyásolja az exponenciális illesztések megfigyelt sebességi állandóit és amplitúdóit a gyors és lassú fázis sebességi állandóinak aránya (vagyis, hogy a különböző sebességi állandójú folyamatok mennyire „tisztán” válnak szét egymástól).

A Gepasi kinetikai modellező program segítségével zajmentes, szimulált fluoreszcencia-tranzienseket állítottunk elő. Ezekben a szimulációkban az akto-NM2A-HMM követő és vezető fejéhez kötött dmADP molekulák irreverzibilis disszociációját követtük, ami megfelel a stopped-flow kísérleteinkben alkalmazott körülményeknek (ott a nagy feleslegben adott jelöletlen kompetitor biztosította a dmADP disszociáció irreverzibilitását).

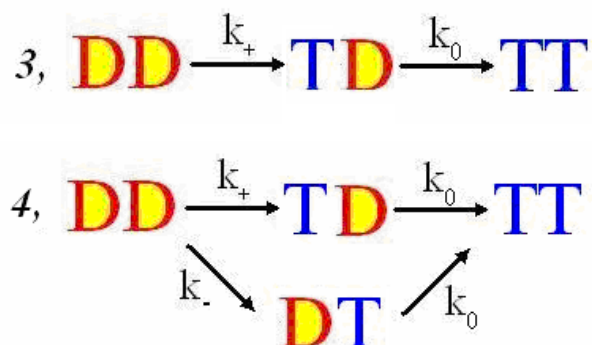
Az alkalmazott kinetikai modellek a következők voltak:

ADP kompetíció esetén:



25. Ábra: Az ADP kompetíció modellezése. **D** : fluoreszcensen jelölt ADP (dmADP), **D** : jelöletlen ADP. A kétbetűs szimbólumokban az első betű a HMM követő fejét, a második a vezető fejet jelöli.

ATP kompetíció esetén:

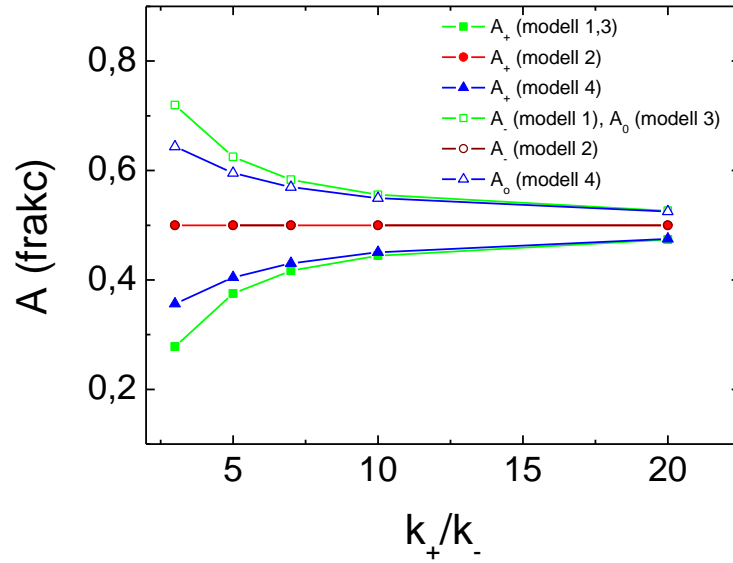


26. Ábra: Az ATP kompetíció modellezése. **D** : fluoreszcensen jelölt ATP, **T** : jelöletlen ATP. A kétbetűs szimbólumokban az első betű a HMM követő fejét, a második a vezető fejet jelöli

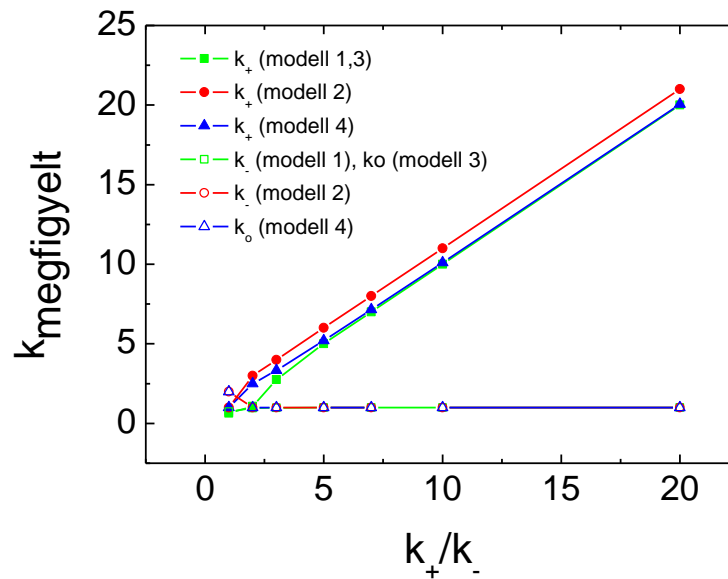
Az 1-es és 3-as modellek egyszerűsített eseteket tükröznek, amikor a dmADP szekvenciálisan először a követő fejben cserélődik le, majd a vezető fejben. (Matematikai formulációját tekintve a 3. modell azonos az 1. modellel.) A valóságban azonban néhány esetben ez megtörténhet fordítva is, amit a 2-es és 4-es, alternatív útvonalakat is tartalmazó modellek értelmeznek (25-26. *Ábra*).

A sebességi állandók különböző arányait véve ($k_+/k_- = 1-20$ az 1. és 2. modellek esetén, $k_+/k_0 = 1-20$ a 3. és 4. modellek esetén) szimulált fluoreszcencia-tranzienseket generáltunk, amelyekhez kétfázisú exponenciális lecsengés függvényeket illesztettünk. Az illesztett függvények valamennyi esetben szisztematikus eltérés nélkül illettek a szimulált tranziensekhez. Az illesztett függvények frakcionális amplitúdóit és megfigyelt sebességi állandóit a 27. és 28. ábrák mutatják be. Jól látszik, hogy a gyors fázis frakcionális amplitúdója annál inkább elmarad az elvárt 0,5 értéktől, minél közelebb esik a két sebességi állandó értéke (azaz minél kisebb a k_+/k_- ill. k_+/k_0 arány) (13. *ábra*). (Láthatjuk, hogy még k_+/k_- ill. $k_+/k_0 = 20$ értéknél sem éri el teljesen az amplitúdók aránya a 0,5-0,5 értékpárt minden esetben, egyedül az egyszerűsített ADP kompetíciós esetben (1. modell).)

A 24. és 27. ábrák összevetéséből látható, hogy a kinetikai modellezés eredménye összhangban van a kísérleti adatokkal. Mivel az ATP kompetitorhoz tartozó sebességi állandók (k_+ és k_0) közelebb vannak egymáshoz, mint az ADP kompetitorhoz tartozók (k_+ és k_-), ezért a gyors fázis amplitúdója jobban elmarad a lassú fázisétól az előző esetben. A hőmérséklet emelkedésével a sebességi állandók mind az ATP mind az ADP kompetíció esetében közelednek, és – az előzőekhez hasonlóan – emiatt a gyors fázis frakcionális amplitúdója láthatóan csökken. A megfigyelt sebességi állandók is szintén annál inkább torzulnak és „egymásba mosódnak”, minél közelebb vannak egymáshoz, de k_+/k_- ill. $k_+/k_0 = 5$ aránynál már jól elkülönülnek (28. *Ábra*).



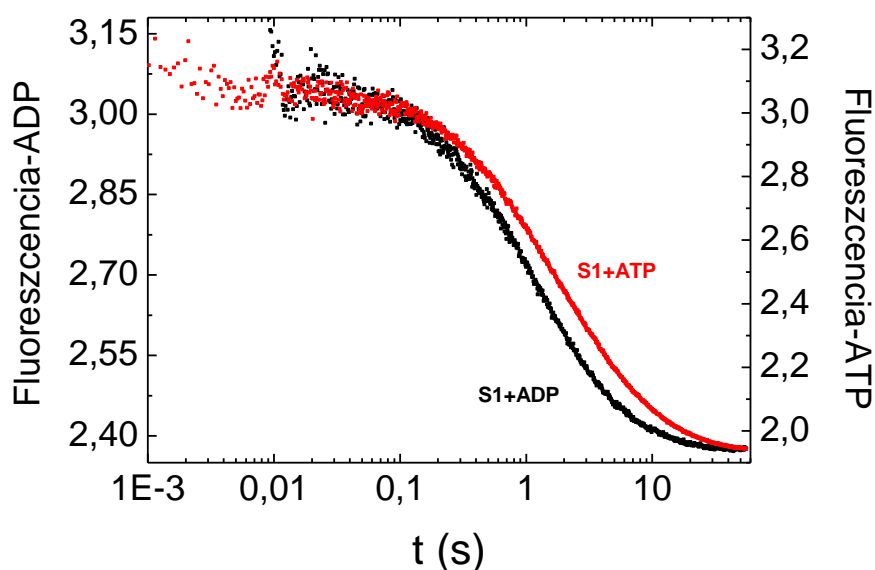
27. Ábra: A frakcionális amplitúdók torzulása a sebességi állandók arányainak függvényében a különböző modellek szerint.



28. Ábra: A megfigyelt sebességi állandók torzulása a sebességi állandók arányainak függvényében a különböző modellek szerint

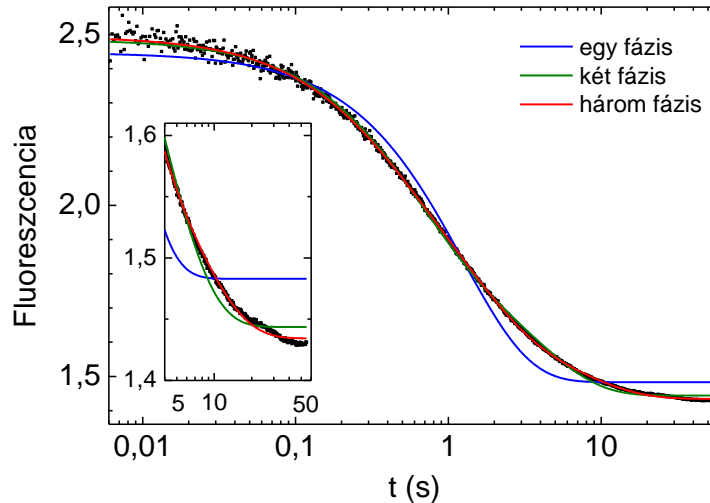
5.5 Kontroll kísérletek terheletlen (egyfejű) NM2A-S1 konstrukcióval

Mechanikai terheléstől mentes kontrollként a HMM kísérletekkel azonos körülmények között megvizsgáltuk az akto-NM2A-S1 (egyfejú konstrukció) dmADP felszabadítási lépését ADP és ATP kompetitor alkalmazásával (29. *Ábra*). A görbéken jól látható, hogy az akto-NM2A-S1 ATP illetve ADP felszabadulásának időbeli lecsengése meglehetősen hasonló egymáshoz, különbségük a HMM esetében tapasztalt effektushoz képest elhanyagolható (vö. 22. *Ábra*). Az S1 terheletlen kontroll, így ATP és ADP kompetitor esetén hasonló viselkedést mutat.



29. *Ábra*: NM2A-S1 dm ADP felszabadításának időbeli nyomon követése ADP (fekete) és ATP (piros) hozzáadása után

A tranziensek többfázisúak voltak mind ATP, mind ADP esetén, ami arra utal, hogy az akto-NM2A-S1 mechanikailag terheletlen állapotában több különböző konformer egyensúlya alakul ki (30. *Ábra*).



30. Ábra: NM2A-S1 ADP felszabadítása. Látható, hogy leginkább a három fázisú exponenciális függvény illik a fluoreszcencia időbeli lecsengésére

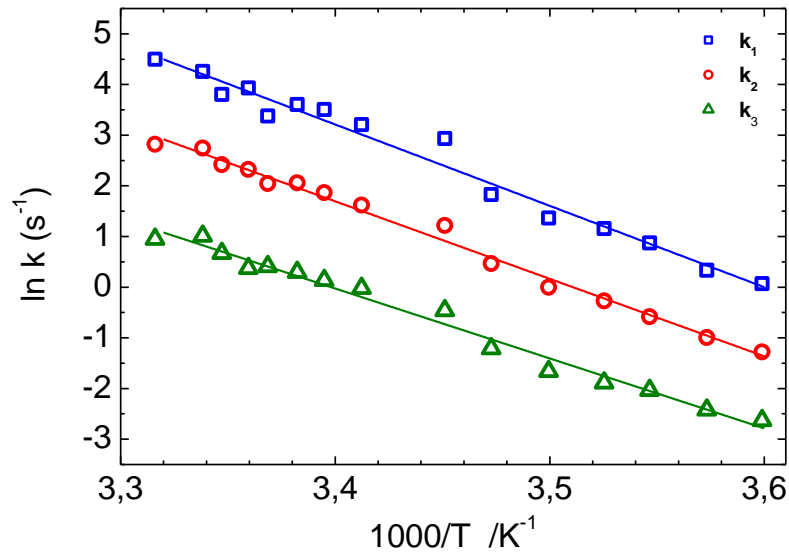
A korábbi eredmények alapján véleményünk szerint a különböző konformereknek (legalább három) eltérő irányban áll a erőkarja, mely a nukleotidköötőzsebbel való kommunikációval szabályozza az ADP felszabadulás sebességét. Ezeket az állapotokat azért láthatjuk, mert a köztük lévő átmenet viszonylag lassú folyamat – ha az átmenet gyors lenne, nem látnánk külön fázisokat, a rendszer homogénül viselkedne. Feltételezésünk szerint ezek szerkezetileg alacsony-energiájú (tehát kedvező) állapotok, melyeket magas energia-gátak választanak el egymástól.

Az ADP felszabadulás hőmérsékletfüggését vizsgáltuk NM2A-S1 konstrukcióval is. Kompetitorként ADP-t és ATP-t is használtunk. Minden hőmérsékleten háromfázisú exponenciális függvényt lehetett illeszteni a fluoreszcencia időbeli lecsengésére. Mivel ADP és ATP esetén az effektus nagyon hasonló volt, ezért itt csak az egyiket (ATP kompetíció) mutatjuk be (31-32. Ábra).

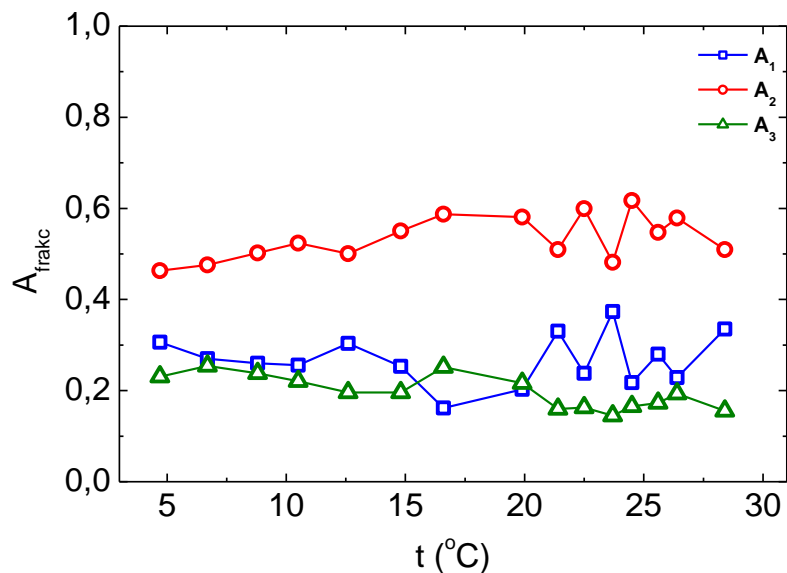
A három fázis sebességi állandóit a hőmérséklet függvényében ábrázolva (Arrhenius-féle ábrázolás) láthatjuk, hogy a három sebességi állandó nagyjából egyforma hőmérsékletfüggést mutat (a meredkségek nagyjából megegyeznek) (31. Ábra). Ebből arra következtethetünk, hogy az egyes szerkezeti állapotok energetikailag egyformán kedvezőek, köztük kicsi az entalpiakülönbség.

A frakcionális amplitúdók nagysága semmilyen szignifikáns változást nem mutat hőmérsékletváltozás hatására, az egyes fázisokhoz tartozó amplitúdók megoszlása tehát nem függ a hőmérséklettől (32. Ábra). Ez megerősíti az előző feltételezésünket, mely szerint az

egyes szerkezeti állapotok energetikailag hasonlóak, mivel azok betöltöttsége a hőmérséklettel nem változik. Ha lenne különbség, akkor az energetikailag kedvezőtlenebb állapot alacsony hőmérsékleten nagyon kis betöltöttségű lenne (kicsi lenne a hozzá tartozó frakcionális amplitúdó), és a hőmérséklet emelésével egyre nagyobb szerepet kapna (nőne a hozzá tartozó frakcionális amplitúdó).



31. Ábra: NM2A-S1 dmADP felszabadulásának sebességi állandói a hőmérséklet függvényében ATP kompetíció esetén



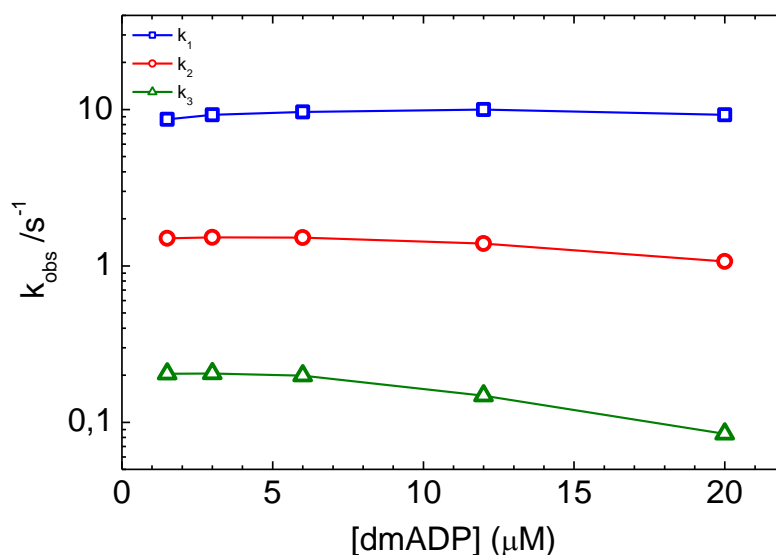
32. Ábra: NM2A-S1 dmADP frakcionális amplitúdói a hőmérséklet függvényében ATP kompetíció esetén

Ezt az érdekes többfázisússágot továbbvizsgálva megmértük, hogyan függenek az ADP felszabadulás kinetikai paraméterei egyéb tényezőktől.

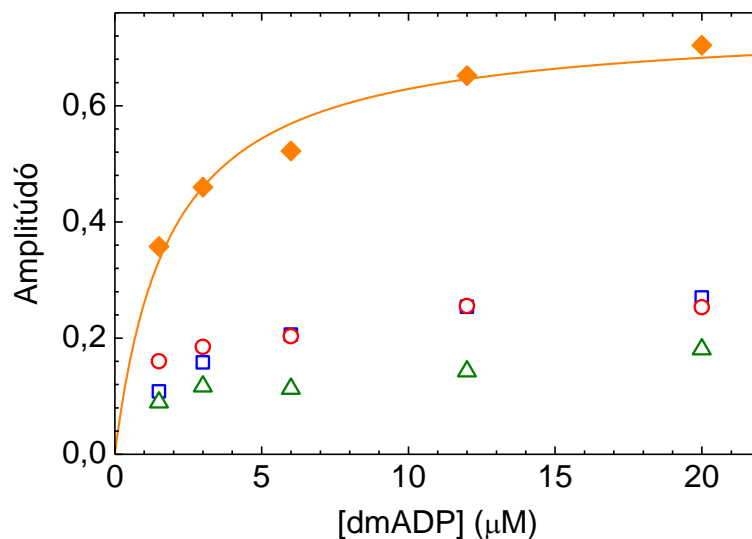
Elsőként a dmADP koncentrációfüggést vizsgáltuk. Az összekeverés előtt különböző koncentrációjú dmADP-vel preinkubáltuk az aktomiozin komplexet (lásd: anyagok és módszerek), majd nagy mennyiségű jelöletlen ADP-vel löttük össze. Továbbra is három fázist láttunk.

A sebességi állandók nem mutattak dmADP koncentrációfüggést (33. *Ábra*). Az egyes fázisokhoz tartozó amplitúdók természetesen mind növekedtek a dmADP koncentráció növelésével, hiszen egyre több fluoreszcens szubsztrát volt a rendszerben, ami a fluoreszcencia változásának abszolút szintjét érhető módon növeli. Az amplitúdók telítés felé haladnak, ahogy minden nukleotidkötő zsebet dmADP foglal el (34. *Ábra*). Az amplitúdók egymáshoz viszonyított aránya azonban kevésbé függ az ADP koncentrációtól.

Ezek alapján arra következtethetünk, hogy a különböző szerkezeti állapotok belső konverzió eredményei, nem az ADP kötése határozza meg, melyik állapot preferált. Egyik szerkezeti állapothoz köt az ADP, majd az egyes állapotok ettől függetlenül átalakulhatnak egymásba.



31. *Ábra*: NM2A-S1 dmADP felszabadulásának sebességi állandói a dmADP koncentráció függvényében ADP kompetíció esetén



32. Ábra: NM2A-S1 dmADP amplitúdói a hőmérséklet függvényében ADP kompetíció esetén. A narancssárga rombuszok az amplitúdók összegét jelentik.

Elképzelésünk szerint az egyes szerkezeti állapotok preferáltságát az aktin filamentum miozin fejekkel való betöltöttsége befolyásolhatja (ha minden kötőhelyet miozin foglal el, nincs hely csak egyféle állapot létrehozására). Emiatt az ADP felszabadulás aktinkoncentráció függését (jelöletlen aktin, illetve pirén-aktin) is megvizsgáltuk NM2A-S1, valamint NM2B-S1 esetében is.

Az NM2B-S1 nem mutatott több fázisú ADP felszabadítást, mindegyik aktin koncentráció mellett egyfázisú volt a folyamat. Ebből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy mivel az NM2B egyébként is sokkal lassabb, valamint döntően tenziótartó feladatokat (pl. hólyag, aorta) lát el, emiatt ő szerkezetileg egy lassú ADP felszabadító állapotra van beállítva, mely szerkezeti-energetikai szempontokból a legkedvezőbb az NM2B számára. Ez segítheti a nem-izom miozinok eltérő fiziológias szerepének ellátását.

Az NM2A-S1 ugyan több fázisú, ám az aktinkoncentrációtól nem függ a fázisok száma. Ebből arra következtethetünk, hogy az egyes szerkezeti állapotokat nem befolyásolja az aktinfilamentum miozinnal való telítettsége, a különböző szerkezeti állapotok létezése a miozin molekulán belső konverzió eredménye.

6 EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE

Munkánk során arra kerestük a választ, hogy a molekulákra ható mechanikai terhelés (erő) milyen hatással van az enzimmreakció termodinamikai és kinetikai paramétereire. Kidolgoztunk egy modell rendszert, melynek segítségével ez a kérdés kísérletileg, kvantitatív módon vizsgálható. Modellünk az NM2A motorfehérje volt, melynek mechanikailag terhelt illetve terheletlen állapotait vizsgálva kvantitatív képet kaphattunk a terhelés hatásáról. A kísérletekben az akto-NM2A fehérje ADP felszabadító lépését vizsgáltuk tranziens kinetikai módszerekkel, fluoreszcensen jelölt ADP (dmADP) segítségével. Kompetitorként nagy feleslegű ADP-t illetve ATP-t használtunk.

A kísérleteinkben felvett dmADP felszabadulási tranziensek (22. *Ábra*) pontosan megfelelnek a 20. és 21. ábrán felvázolt sémák alapján prediktálható viselkedésnek. A dmADP felszabadulás első fázisának sebességi állandói (k_+) hasonlítanak egymásra ADP és ATP kompetitor alkalmazása esetén. Ennek az az oka, hogy a követő fej előre irányuló mechanikai terhelést érez, ezáltal gyorsítva a dmADP felszabadulását mindkét esetben (20. és 21. *Ábra*). A második fázis sebességi állandójában viszont jelentős eltéréseket tapasztalhatunk, mivel az ATP esetén a második fázis a terheletlen állapot (k_0), míg ADP kompetitor esetén hátrafelé irányuló erőhatással terhelt állapot (k_-) sebességi állandóját tükrözi (20-21. *Ábra*).

Kísérleteink eredményeit számítógépes szimuláció segítségével összehasonlítottuk az elméletben elvárt értékekkel. A HMM konstrukció kísérletileg kapott amplitúdóviszonyai hűen tükrözik a modellben foglaltakat, jól látható, hogy a sebességi állandók közelsége miként módosítja az amplitúdók egymáshoz viszonyított arányát (24. és 27. *Ábra*). Minél kisebb a sebességi állandók aránya, a frakcionális amplitúdók annál inkább eltérnek a 0,5-0,5 értéktől, mégpedig úgy, hogy a lassú fázis amplitúdója növekszik.

A k_+ , k_0 és k_- sebességi állandók eltérő hőmérséklet-függése azt tükrözi, hogy a mechanikai terhelés megváltoztatja a reakció aktiválási entalpiáját (ΔH^\ddagger): az előre irányuló terhelés csökkenti, a hátra irányuló növeli (ezáltal az előre irányuló terhelés gyorsít, a hátra irányuló lassít). A gyorsabb k_+ állandó kisebb meredekségű hőmérséklet-függése miatt a hőmérséklet emelésével csökken a k_+ és k_0 , illetve még inkább a k_+ és k_- állandók aránya. Mivel témavezetőm korábbi munkáiból ismert, hogy az ADP-kötés kinetikája nem mutat jelentős terhelés-függést NM2A-HMM esetén (6), az ADP-felszabadulás sebességi állandóinak ilyen hőmérsékletfüggése azt vonja maga után, hogy magasabb hőmérsékleten

kevésbé fog különbözni a HMM vezető és követő fejeinek ADP-affinitása. Az affinitásbeli különbözőségért elsősorban a terhelt fejekben tárolt elasztikus energia felelős (11), ezért arra is következtethetünk, hogy a rendszer ilyen energiakomponense csökken a hőmérséklet emelésével – a nagyobb hőmozgás következtében a szerkezet fellazul, csökken a molekula rugóállandója.

A terhelés kis mértékben befolyásolja a reakció entrópikus (ΔS^\ddagger) tagját is, amiből arra következtethetünk, hogy a mechanikai terhelés megváltoztatja az aktiválási entrópiától függő preexponenciális tagot az Arrhenius egyenletben. Ez összhangban van a laborunk által más fehérjéken végzett kutatási eredményekkel, miszerint a molekulán belüli belső súrlódás a molekula konformációs energia-tájképének befolyásolásán keresztül megváltoztathatja az Arrhenius egyenletben szereplő preexponenciális tagot.

A terheletlen kontroll, az S1 konstrukció, ATP és ADP kompetíció esetén hasonlóan viselkedett (29. *Ábra*), ellentétben a terhelt HMM-mel, mely rendkívül eltérő ADP felszabadítási karakterisztikát mutatott a kompetitor nukleotid függvényében. Ezzel ellátta kontroll feladatát. Az ADP felszabadulás azonban érdekes, több fázisú jellegű volt (30. *Ábra*), ebből több egymásba lassan átalakul konformer jelenlétére következtettünk. Emiatt több kísérletet is lefolytattunk az S1 konstrukcióval. Megállapítottuk, hogy a fázisok hasonló hőmérsékletfüggést mutatnak (31-32. *Ábra*), mely az egyes konformerek energetikai hasonlóságát mutatja. A fázisok sebességi állandói (33. *Ábra*) nem függtek a kezdeti dmADP koncentrációtól, valamint a fázisok száma nem függött az aktinkoncentrációtól, ezekből arra következtettünk, hogy a különböző konformerek jelenléte belső konverzió eredménye. A közeli rokon, NM2B-S1-nek is megvizsgáltuk aktinkoncentrációfüggését, azt tapasztalva, hogy ez a változat mindig egyfázisú, azaz egy szerkezeti állapot dominálja az S1 molekula aktomiozin-ADP állapotát. Ezt a jelenséget a nem-izom miozinok eltérő fiziológiás szerepeivel magyarázhatjuk.

7 ÖSSZEFOGLALÁS

Az NM2A dmADP felszabadító lépésének hőmérsékletfüggés szerinti vizsgálatából a következő tanulságokat vonhatjuk le:

A mechanikai terhelés a reakció aktiválási energiáját megváltoztatja, mégpedig oly módon, hogy az előre („gyorsító” irányba) ható terhelés csökkenti azt, ezáltal gyorsítva a dmADP felszabadulást; a hátra irányuló terhelés pedig növeli az aktivációs entalpiát.

A különböző mechanikai terhelések alatt álló miozin fejek sebességi állandóinak eltérő hőmérséklet-függéséből arra következtethetünk, hogy a mechanikai erőhatás a molekula konformációs energia-tájképének befolyásolásán keresztül meghatározza a reakció észlelt sebességét.

A hőmérséklet emelésével csökken a terhelt molekulában tárolt elasztikus energia.

Az S1 konstrukció NM2A esetében többféle szerkezetű aktomiozin-ADP állapottal rendelkezik, ellentétben az NM2B-S1-el, mely csak eggyel. Ez a változatosság elősegítheti az NM2B tenzió megtartó (pl. aorta), valamint az NM2A változatos (lehetőség a tenzió megtartás, és a simaizom működésének segítése közötti váltásra terhelés függvényében – pl. vastagbél) fiziológiás feladataira való finom hangolást.

Mindezek a megfigyelések további vizsgálatok lefolytatásának igényét vetítik előre (szélesebb hőmérsékleti tartomány vizsgálata hőmérsékletugrásos kísérlettel, összehasonlítás más fehérjékkel stb.). A jövőbeni kísérletek célja lesz, hogy a mechanikai terhelés szerkezeti és termodinamikai összefüggéseibe mélyebb betekintést nyerhessünk.

8 SUMMARY

The members of the non-muscle myosin subfamily have some similar (long cycle-time, filamentar structure, regulation by phosphorylation), and some distinct (different duty ratio, different load sensitivity) properties. The kinetic differences are important for the fine-tuning of this enzymes to their physiological functions.

In this work, we measured the temperature dependence of the load-dependent kinetics of NM2A. To generate load we prepared the acto-HMM-ADP complex, in which an internal strain arise, the two heads affets each other antagonistic forces. The leading head pulls the trailing head forward (in the direction of the „+” end of the actin filament), and the trail head pulls the lead head in the other direction. We used the S1 construct as an unloaded control. To

measure the temperature dependence, we made stopped-flow experiments, we used dmADP as a fluorescent substrate. We mixed the acto-NM2A-dmADP complex with large excess of unlabelled nucleotide (ADP or ADP) at different temperatures.

From this experiments we made a conclusion, that mechanical load changes the activation enthalpy of the reaction (forward load decreases, reverse load increases). The rate constants of the reaction showed different temperature dependence, which means, increasing temperature results decreasing load-effect. We explained this phenomenon with the increasing heat-motion, and the decreasing elastic-energy of the molecule.

The S1 showed multiphasic ADP release, we explained this behaviour with different acto-NM2A-S1-ADP conformations, which are energetically equal, according to their similar temperature dependence. From the independence of the rate constants of dmADP concentration, and the number of the phases of actin-concentration we deduced, that the different conformers are results of an internal conversion of the NM2A-S1 molecule. The NM2B-S1 construct showed no such behaviour, it was single phasic in every conditions. We explained the different behaviour of non-muscle myosin isoforms according to their diverse physiological functions (2A – uterus, colon, 2B – bladder, aorta).

To summarize our progress we made a good characterization of the temperature dependence of a load dependent molecule, and explained its physiological roles, including the unexpected behaviour of NM2A-S1. Load dependence of non-muscle myosins are important properties for the fine-tuning of this enzymes to their physiological functions.

9 RÖVIDÍTÉSEK

A	preexponenciális faktor, amplitúdó
ADP	adenozin-difoszfát
ADPBeF _x	
AMPPNP	
ATP	adenozin-trifoszfát
ATP _γ S	
CaCl ₂	kalcium-klorid
d	távolság
dADP	dezoxi-ADP
dmADP	N-metil-antranilil-2'-dezoxi-ADP
DMF	dimetil-formamid
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNS	dezoxi-ribo-nuklein-sav
DTT	di-tio-treitol
E, U	energia
EGTA	ethylene glycol tetraacetic acid
ELC	essential light chain/eszenciális könnyűlánc
[E1], [E2]	állapotok koncentrációi
F	erő
FBS	fetal bovine serum
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography,
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HMM	heavy meromyosin/nehéz meromiozin
k ₀ , k ₋ , k ₊ , k ₁ , k ₂	sebességi állandók
K _{ADP}	
K _{aktin}	
k _B	Boltzmann állandó
KCl	kálium-klorid
K _d	disszociációs állandó
kDa	kilodalton
K _{eq}	egyensúlyi állandó
LMM	light meromyosin/könnyű meromiozin
ln	természetes alapú logaritmus
M	mól/l
m	méter
MgCl ₂	magnézium-klorid
MLCK	myosin light chain kinase/miokín könnyűlánc kináz
n	nano
N ₂	nitrogén
NaCl	Nátrium-klorid
NM2	non-muscle-myosin/nem-izom miozin
NM2A	non-muscle-myosin-2A/nem-izom miozin 2A
NM2B	non-muscle-myosin-2A/nem-izom miozin 2B

NM2C	non-muscle-myosin-2A/nem-izom miozin 2C
OH	hidroxil
p	pico
p ₁ , p ₂	valószínűség
P1, P2, P3	vírusgenerációk
PAGE	poliacrilamid gél elektroforézis
Pi	inorganikus foszfát
PMSF	phenil-metil-sulphonil-fluoride
RLC	regulatory light chain/regulációs könnyűlánc
S1, S2	szubfragment 1-2
SDS	sodium-dodecil-sulphate
Sf9	Spodoptera frugiperda
T	hőmérséklet
t	idő
t _{ciklus}	ciklusidő
TEAHC	trietil-ammónium-hidrogén-karbonát
TIRF	Total Internal Reflection Fluorescence
μ	micro
W	munka
WB	western blot
ΔG	aktivációs szabadenergia
ΔH	aktivációs szabadentalpia
ΔS	aktivációs szabadentropia
λ	hullámhossz

10 HIVATKOZÁSOK

1. Sellers, J. R. (1999) *Myosins* Oxford University Press, New York, ISBN 0-19-850509-4.
2. Geeves, M. A. and Holmes, K. C. (1999) Structural mechanism of muscle contraction, *Annu. Rev. Biochem.* 68, 687-728.
3. De La Cruz, E. M. and Ostap, E. M. (2004) Relating biochemistry and function in the myosin superfamily, *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 61-67.
4. Rosenfeld, S. S., Xing, J., Chen, L. Q., and Sweeney, H. L. (2003) Myosin IIb is unconventionally conventional, *J. Biol. Chem.* 278, 27449-27455.
5. 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.
6. Kovacs, M., Toth, J., Nyitrai, L., and Sellers, J. R. (2004) Two-headed binding of the unphosphorylated nonmuscle heavy meromyosin-ADP complex to actin, *Biochemistry* 43, 4219-4226.
7. 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.
8. Veigel, C., Molloy, J. E., Schmitz, S., and Kendrick-Jones, J. (2003) Load-dependent kinetics of force production by smooth muscle myosin measured with optical tweezers, *Nat. Cell Biol.* 5, 980-986.
9. Veigel, C., Schmitz, S., Wang, F., and Sellers, J. R. (2005) Load-dependent kinetics of myosin-V can explain its high processivity, *Nat. Cell Biol.* 7, 861-869.
10. 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.
11. Nyitrai, M. and Geeves, M. A. (2004) Adenosine diphosphate and strain sensitivity in myosin motors, *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 359, 1867-1877.
12. Duke, T. and Leiber, S. (1996) Motor Protein Mechanics: A Stochastic Model with Minimal Mechanochemical Coupling, *Biophysical Journal*, Vol. 17, 1235-1247
13. Kovacs, M., Thirumurugan, K., Knight, P., and Sellers, J. R. (2007) Load-dependent mechanism of non-muscle myosin-2, *PNAS*. Vol. 104., 9994-9999.
14. Rosenfeld, S. and Sweeney, H. L. (2004) A model of myosin V. processivity, *J. Biol. Chem.* 279, 40100-40111.
15. Rosenfeld, S., Fordyce, P. M., Jefferson, G. M., King, P. H., and Blok, S. M. (2003), Stepping and stretching, How kinesin uses internal strain to walk processively, *J. Biol. Chem.* 278, 18550-18556.
16. Howard, J. (2001) *Mechanics of Motor Proteins and the Cytoskeleton* Sinauer Associates, Inc., Massachusetts, ISBN 0-87893-333-6.
17. Johnson, K. A. (2003) *Kinetic Analysis of Macromolecules* Oxford University Press, New York, ISBN 978-0-19-852494-6.
18. Bálint, M., Sreter, F. A., Wolf, I., Nagy, B., Gergely, J., (1975) The substructure of heavy meromyosin, the effect of Ca^{2+} and Mg^{2+} on the tryptic fragmentation of heavy meromyosin. *J. Biol. Chem.* 250, 6168-6177.
19. Bálint, M., Szilágyi, L., Fekete, Gy., Blazsó, M., Bíró, E., (1968) Studies on proteins and protein complexes of muscle by means of proteolysis. V. Fragmentation of light meromyosin by trypsin. *J. Mol. Biol.* 37, 317-330.

20. Huxley, A. F., and Niedergerke, R. M., (1954) Structural changes during muscle contraction. Interference microscopy of living muscle fibres, *Nature* 971.
21. Huxley, A. F., and Simons, R. M., (1971) Proposed mechanism of force generation in striated muscle, *Nature* 533.
22. Huxley, H. E. (1969) The mechanism of muscular contraction, *Science* 1356.
23. Lynn, R. W. and Taylor, E. W. (1971) Mechanism of adenosine triphosphate hydrolysis by actomyosin, *Biochemistry* 10, 4617-4624.
24. Holmes, K. C. (1997) The swinging lever-arm hypothesis of muscle contraction, *Curr. Biol.* 7, R112-R118.
25. Straub, F. B. (1943) Actin, *University of Szeged*.
26. 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 triphosphate reaction, *Biochem J.* 141, 331-349.
27. Bauer, C. B., Kuhlman P. A., Bagshaw, C. R., Rayment, I. (1997) X-ray crystal structure and solution fluorescence characterization of Mg²⁺(3')-O-(N-methylanthraniloyl) nucleotides bound to the *Dictyostelium discoideum* myosin motor domain. *J. Mol. Biol.* 274, 394-407.
28. Fisher, A. J., Smith, C. A., Thoden, J. B., Smith, R., Sutoh, K., Holden, H. M., Rayment, I. (1995) X-ray structures of the myosin motor domain of *Dictyostelium discoideum* complexed with MgADP.BeFx and MgADP.AlF₄⁻. *Biochemistry* 34, 8960-8972.
29. Gulick, A. M., Bauer, C. B., Thoden, J. B., Rayment, I. (1997) X-ray structures of the MgADP, MgATPγS, and MgAMPPNP complexes of the *Dictyostelium discoideum* myosin motor domain. *Biochemistry* 36, 11619-11628.
30. Smith, C. A., Rayment, I. (1996) X-ray structure of the magnesium(II).ADP.vanadate complex of the *Dictyostelium discoideum* myosin motor domain to 1.9 Å resolution. *Biochemistry* 35, 5404-5417.
31. Smith, C. A., Rayment, I. (1995) X-ray structure of the magnesium(II)-pyrophosphate complex of the truncated head of *Dictyostelium discoideum* myosin to 2.7 Å resolution. *Biochemistry* 34, 8973-8981.
32. Rayment, I., Holden, H. M. (1994) The three-dimensional structure of a molecular motor. *TIBS* 19, 129-134.
33. Rayment, I., Rypniewski, W. R., Schmidt-Base, K., Smith, R., Tomchick, D. R., Benning, M. M., Winkelmann, D. A., Wesenberg, G., Holden, H. M. (1993) Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor. *Science* 261, 50-58.
34. Xie, X., Harrison, D. H., Schlichting, I., Sweet, R. M., Kalabokis, V. N., Szent-Györgyi, A. G., Cohen, C. (1994) Structure of the regulatory domain of scallop myosin at 2.8 Å resolution. *Nature* 368, 306-312.
35. Manstein, D. J., Ruppel, K. M., Spudich, J. A. (1989) Expression and characterization of a functional myosin head fragment in *Dictyostelium discoideum*. *Science* 246, 656-658.
36. Schröder, R. R., Manstein, D. J., Jahn, W., Holden, H., Rayment, I., Holmes, K. C., Spudich, J. A. (1993) Three-dimensional atomic model of F-actin decorated with *Dictyostelium* myosin S1. *Nature* 364, 171-174.
37. Leavis, P. C., Gergely, J. (1984) Thin filament proteins and thin filament-linked regulation of vertebrate muscle contraction. *Critical Reviews in Biochemistry* 16, 235-305.

38. Chalovich, J. M., Eisenberg, E. (1982) Inhibition of actomyosin ATPase activity by troponin-tropomyosin without blocking the binding of myosin to actin. *J. Biol. Chem.* 257, 2431-2437.
39. Rüegg, J. C. (1986) Calcium in muscle activation: a comparative approach. *Springer-Verlag*.
40. Sellers, J. R., Adelstein, R. S. (1987) Regulation of contractile activity. *In: The Enzymes XVIII*, Academic Press, Orlando and London, pp. 381-418.
41. Golomb, E., Ma, X., Jana, S. S., Preston, Y. A., Kawamoto, S., Shosam, N. G., Goldin, E., Conti, M. A., Sellers, J. R., and Adelstein R. S. (2003) Identification and characterization of nonmuscle myosin II-C, a new member of the myosin II family, *J. Biol. Chem.* 279, 2800-2808.

11 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenek előtt köszönetet szeretnék mondani témavezetőmnek, Dr. Kovács Mihálynak, akinek hozzáértése és támogatása nagymértékben segítette a dolgozat létrejöttét. Köszönet illeti az ELTE TTK Biokémiai Tanszék volt és jelenlegi vezetőit prof. Gráf Lászlót és Nyitrai Lászlót, akik lehetővé tették számomra a munkát a tanszéken. Köszönettel tartozom a laborunk összes munkatársának (Dr. Málnási Csizmadia András, Dr. Tóth Judit, Dr. Gyimesi Máté, Kintses Bálint, Takács Balázs, Nagy Nikolett, Rauscher Anna, Várkuti Boglárka, Végner László, Simon Zoltán, Jelinek Balázs, Jackie Zhenhui Yang, Zahoránszky Gergely), akik szellemi és érzelmi támogatásukkal mozdították előre a munkát. Végül, de nem utolsó sorban a családomnak, akik mellettem álltak a munka során.