DR. MÁLNÁSI-CSIZMADIA ANDRÁS

Utazás a motor domén körül: A miozin konformációs átalakulásai és intramolekuláris kommunikációs útvonalak

Készült a Magyar Tudományos Akadémia Doktora címre beadott értekezés alapján

2008/2009

Előszó

Jelen dolgozat a Magyar Tudományos Akadémia részére készített doktori pályázat alapján készült. Ezt a kis könyvecskét egyrészről azért készítettem, hogy az utóbbi kilenc évben elért eredményeinket összefoglaljam. Úgy gondolom, hogy kutatásaink egy mérföldkőhöz érkeztek: ebben az időszakban feltártuk, hogy a motor enzimek egyes funkcionális régiói hogyan működnek, és a régiók hogyan befolyásolják egymás működését. A jövőben azt kívánjuk vizsgálni, hogy milyen okai, fizikai háttere van ezeknek a működéseknek és kölcsönhatásoknak. Azt vizsgáljuk, hogy az enzimben kialakuló mechanikai feszültségek hogyan fejlődnek ki, hogy változnak a működés során, és hogyan hajtják az enzimciklust. Amikor egy kutatócsoport elérkezik egy ilyen mérföldkőhöz, hasznos összefoglalni azt a munkát, amelyre alapozva az új elméleti és kísérleti megközelítésekkel kuatómunkáját végzi a jövőben.

Másrészről ezzel a könyvvel szertnék köszönetet mondani doktori bírálóimnak, ***Prof. Batke Józsefnek, Prof. Belágyi Józsefnek*** és ***Prof. Erdődi Ferencnek***. Igen jól estek a nagyon pozitív kicsengésű bírálatok, a kérdések, amelyek egyes fejezeteket új megvilágításba helyeztek, valamint a jövőre vonatkozó bíztató szavak.

A bemutatott munka túlnyomó részét az Eötvös Loránd Tudományegyetem Biokémiai Tanszékén, míg kisebb részét a University of Leicester, Department of Biochemistry-n végeztük.

Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt családomnak szeretnék köszönetet nyilvánítani. Feleségem, Dr. Kovács Dóra és a gyerekek, Anna, Eszter és Gergő támasza nélkül nem élvezhettem volna a kutatás örömét. Szüleimnek, Szőnyi Évának és Dr. Málnási Csizmadia Lajosnak köszönöm az egész életen át tartó támogatást és bátorítást, valamint azt, hogy már gyerekkoromban is izgalmas intellektuális légkörben fejlődhettem szellemiekben. Hálával tartozom gimnáziumi fizikatanáromnak, Dr Frajka Félix atyának, aki megalapzta természettudományos érdeklődésemet, és tanulmányaim során végig támogatott és buzdított.

Azt, hogy a dolgozatban szereplő eredményeket bemutathattam mindenekelőtt szakdolgozatos és PhD hallgatóimnak, Dr. Kovács Mihálynak, Hnisz Dénesnek, Dr. Gyimesi Máténak, Kintses Bálintnak, Simon Zoltánnak, Dr. Tóth Júliának, Zhenhui Yangnak, Zahoránszky Gergelynek, Végner Lászlónak, Várkuti Boglárkának, Rauscher Annának és Papp Dánielnek köszönhetem. Nekik köszönhetem azt is, hogy mindig megfiatalító, izgalmas és lelkesítő közegben élvezhetem a tudományt. Külön köszönettel tartozom nekik azért is, mert a jelen dolgozat ábráinak egy részét részben vagy egészben segítettek elkészíteni. Nem feledkezhetek meg Jelinek Balázs lelkes és áldozatos munkájáról, amely kovásza a kutatócsoport egységének, és nélküle nem érhettünk volna el ilyen sikereket.

A Biokémiai Tanszékre Professzor Gráf László támogatásával kerülhettem vissza a posztdoktori időszak után. Hálával tartozom Neki kitüntető bizalmáért, és azért, hogy szabadkezet kaphattam a tanszéken történő

laborépítésre. Úgy gondolom, hogy az Ő vezetésének köszönhetően szinte egyedülálló módon számos fiatal kutató kezdhetett sikeres laborépítésbe, miközben nemcsak hogy megtarthatták kutatói függetlenségüket, hanem tovább építhetettek independens kutatócsoportokat. Így egy olyan sikeres közeg jött létre független csoportok révén az ELTE Biokémiai Tanszékén, amely szinte párját ritkítja a régióban.

Hálásan köszönöm Dr. Nyitray László és Professzor Hegyi György folyamatos támogatását, segítségét és az utóbbi években a bátorítást, amely nagyban hozzájárult sikereimhez. Ugyancsak ők voltak, akik a molekuláris biológia és a fehérjekémiai alapjait megtanították nekem. Nyitray László volt szakdolgozatos és PhD témavezetőm. Továbbá Ő volt az, akinek azt köszönhetem, hogy bevezetett a nemzetközi tudományos életbe.

Hálával és köszönettel tartozom Prof. Andrew Szent-Györgyinek, aki már PhD tanulmányaim alatt is támogatott, és irányítása alatt a bostoni Brandeis Egyetemen, laboratóriumában gyakorlatban elsajáthítattam a bonyolult enzimpreparalási technikákat, ligandum kötési és más módszereket. Neki köszönhetem, hogy a nemzetközi kutatóközösségbe integrálódhattam. Az Ő személyén, tudásán és sajátélmény történetein keresztül munkám és pályafutásom közvetlenül kapcsolódhat a biokémia hőskorához, Szent-Györgyi Albert, Bíró Endre, Hugh Huxley és mások által épített alapokhoz.

Külön köszönet illeti Tóth Júliát, Simon Zoltánt és Jelinek Balázst a dolgozat megírásában és korrektúrájában nyújtott hatalmas és áldozatos munkájukért. Ezen segítségek nélkül – egészen biztosan mondhatom, ez a munka és a doktori pályázat nem készülhetett volna el.

A köszönetnyilvánítás végére hagytam két barátomat, ezzel is kiemelve azt, hogy milyen sokkal tartozom Nekik. Professzor Clive R. Bagshaw-nak köszönhetem, hogy érett gondolkodású kutatóvá válhattam. Ő az az ember, akitől a legmagasabb szinten láthattam, mi a tudományos gondolkodás, intellektuális megközelítés. Mindent megtettem, hogy legalább egy kicsit ellessek ebből a gondolkodásból, hogy még nagyobb örömömre szolgálhasson a kutatás. Dr. Kovács Mihállyal majd nyolc éve dolgozunk együtt. Azt hiszem, megtaláltam azt a kollégát, akivel együtt érdemes építkezni. Vitáink, közös gondolkodásaink, közös kutatásaink, tervezgetéseink és terveink nemcsak élvezetesek és gyümölcsözők, hanem barátságunk alapjául is szolgálnak.

A köszönetnyilvánítást írni gyötrelmes, mert csak nem lehet olyan hosszú, mint maga a dolgozat, hogy felsoroljam azt a sok barátot, akikkel együtt járhatok ezen az úton, és köszönhetem nekik, hogy az úton lehessek – velük együtt.

Tartalom

1. Bevezetés **7.**
1.1 Komplex rendszerek vizsgálatának kísérletes megközelítése ***8.***
1.2 Szerkezeti megközelítés – kinetikai megközelítés ***10.***
1.3 A dolgozat felépítése ***12.***
2. Információáramlás a miozin funkcionális régiói között **13.**
2.1 Bevezetés, kérdésfelvetés ***13.***
2.1.1 A miozin motor domén funkcionális régiói *14.*
2.1.2 A miozin és az aktomiozin ATPáz mechanizmusa *17.*
2.1.2.1 A Bagshaw-Trentham modell 18.
2.1.2.2 A Lymn-Taylor modell, problémafelvetés 19.
2.2 Tudományos probléma és kérdés ***20.***
2.2.1 Tudományos probléma: Mi hajtja a motort? *20*
2.2.2 Kutatásaim kiindulási kérdései *21.*
2.3 A kísérleti objektum, kísérleti módszerek, munkahipotézis ***23.***
2.4 A legfontosabb tudományos eredményeink és interpretációik a miozin hatásmechanizmusának vizsgálatában ***27.***
2.4.1 Első állomás: A nukleotid kötés mechanizmusa *29.*
2.4.1.1 A W129+ fluoreszcencia tulajdonságai 31.
2.4.1.2 A nukleotidkötés kinetikája 34.
2.4.2 Második állomás: Az aktinkötő régió konformációs állapotai *38.*
2.4.3 Harmadik állomás: A nukleotid és az aktin kötés kapcsolata *43.*
2.4.3.1 A W239+ és a W242+ fluoreszcenciaváltozása nukleotidok hatására 45.
2.4.3.2 A *switch 1* régió konformációs egyensúlyai 46.
2.4.3.3 A *switch 1* konformációváltozásai nukleotidkötéskor 48.
2.4.3.4 A Mg^{2+} kötés mechanizmusa 50.
2.4.3.5 A *switch 1* egyensúlyi konformációs állapotai határozzák meg az aktinkötés erősségét 53.
2.4.4 Negyedik állomás: A switch 2 hurok mozgásai *59.*
2.4.4.1 A W461+ és a W458+ fluoreszcencia változása nukleotidok hatására 61.
2.4.4.2 A *switch 2* konformációs átmenetei 63.
2.4.5 Ötödik állomás: Az ATP hidrolízise és az erőkar mozgása *67.*
2.4.5.1 A W501+ fluoreszcencia tulajdonságai 70.
2.4.5.2 A W501+ magas és alacsony fluoreszcenciájú állapotok egyensúlyának jellemzése 73.

2.4.5.3 Az erőkar felhúzási lépés elkülönítése az ATP hidrolízislépéstől 76.
2.4.5.4 A W501+ reakciója ADP-vel 80.
2.4.5.5 A W501+ reakciója AMPPNP-vel 82.
2.4.5.6 A W501+ reakciója ATP-vel 83
2.4.6 Hatodik állomás: A munkaütem mechanizmusa 91.
2.4.6.1 Az ATPáz ciklus lejátszása visszafele 93.
2.4.6.2 A fordított felhúzási lépés 97.
2.4.6.3 A lassú konformációátmenet következményei 100.
2.5 Mi hajtja a motort? 104.
2.6 A jelen és a jövő: új kérdések, új megközelítések 111.
3. Függelék 113.
3.1 Fontosabb anyagok és módszerek 113.
3.1.1 Enzimkonstrukciók 113.
3.1.2 Enzimkonstrukciók előállítása 115.
3.1.3 Tranziens és steady state kinetikai módszerek 115.
3.1.4 Fluoreszcencia módszerek 116.
3.2 A dolgozatban szereplő enzimatikus folyamatok általunk kimért kinetikai paraméterei, és egyéb fontosabb kvantitatív kísérleti eredmények 118.
3.3 Egyéb fontosabb kutatásaink 132.
3.3.1. A blebbistatin miozin II inhibitor hatásmechanizmusa és kötőhelye 132.
3.3.2 Enzimaktivitás vizsgálata denaturációs hőmérséklet felett: egy új módszer kifejlesztése 133.
3.3.2.1 A temperature-jump/stopped flow működési elve és szerkezete 133.
3.3.2.2 A módszer alkalmazási területei, legfontosabb eredmények 135.
3.3.3 A fehérjék belső súrlódásának hatása az enzimreakciók sebességére 136.
3.3.4 Loop 4 szerepe az aktinkötésben 137.
3.3.5 MIF, új módszer a gyógyszermolekulák hatásspektrumának predikciójához 139.
4. Irodalomjegyzék 122.

„(…) az emberi és állati intelligencia között nincs éles határvonal. Így elegendő egy földigiliszta intelligenciáját vizsgálni. Semmi kétség, a földigiliszták agya szimulálható számítógépen.” [1]

Stephen Hawking

Meggyőződésem, hogy Hawking mint „meggyőződéses redukcionista” téved. Nagyon szerénytelen megjegyzés azt állítani, hogy olyan komplex rendszereket megértés szintjén szimulálni tudjunk számítógépen, mint egy állat teljes idegrendszeri működése. Nemhogy egy agyi működést, de még egy enzim működését sem értjük vagy tudjuk számítógépen szimulálni, és nagy kérdés, hogy valaha is képések leszünk-e erre a ma ismert diszciplínáink körében.

Minden ember agyának működése a valóstól megkülönböztethetetlen mértékig szimulálható számítógépen – egyet kivéve: a sajátomét.

Derényi Imre, 2009. február, Boston, Hotel Radisson, 322. szoba

[1] Roger Penrose, Stephen Hawking: A nagy a kicsi és az emberi elme. Akkord Kiadó, 2003. (Cambridge University Press 1997.)

1. Bevezetés

Egy akadémiai doktori disszertáció mindig különleges alkalma, formája és fóruma annak, hogy a jelölt gondolatait megossza a tisztelt Olvasóval. A jelölt részéről azért különleges, mert pályájának egy fontos állomásán mutatja be tudományos eredményeit: akkor, amikor úgy érzi, hogy tudományos munkásságának eredményei elérték azt a kritkius szintet, hogy összefoglalásuk egy dolgozatban egy olyan konzisztens gondolatcsomag, amellyel szerény mértékben gazdagíthatja a magyar tudományos közösséget. Másrészről azért különleges, mert a dolgozatot valószínűleg csak egy szűk kör olvassa el részleteiben, azonban ez a néhány Olvasó annál kritikusabban és annál nagyobb szakértelemmel rendelkezve. Ezen „különlegességeknek" köszönhetően ez a dolgozat – más „nagy doktori" dolgozatokkal egyetemben – egyfajta szűk klub fórumának is tekinthető, ahol a gondolatok pontos kifejtése (a tehetségemhez mérten) alapvető kritérium, ugyanakkor ebben a kis tudományos klubban olyan elméletek is kifejthetők, amelyek vitára adhatnak alkalmat, és bátrabban megmutatkozhat az író egyéni gondolkozása, személyes stílusa is.

Szakterületem annak vizsgálata, hogy a közvetlenül láthatatlan objektum (motor enzim) közvetlenül láthatatlan mozgása és szerkezeti átalakulásai hogyan is alakítják a kémiai energiát (ATP hidrolízisének energiája) mechanikai munkává. Kicsit tágabban fogalmazva, - és őszintén megmondva úgy, ahogy engem jobban érdekel a problémakör - azt vizsgáljuk, hogy egy enzim funkcionális régiói között hogyan történik a kommunikáció. Ennek vizsgálatára a motor enzimek nagyon jó objektumok, mert funkciójukban és szerkezetben jól elkülönülő funkcionális régiók harmónikus együttműködése révén manifesztálódik a motor funkció: A nukleotidkötő régió megköti és hidrolizálja az ATP-t, a relé és a konverter régiókban történnek a nagy konformációs átalakulások, amelyek mozgatják az erőkart, valamint az aktinkötő régió köti az aktin filamentumot, amelyhez képest változtatja a relatív helyzetét a miozin (1. ábra). A nukleotid megkötésének és a termékek leválásának, az aktinhoz való különböző erősségű kötődéseknek és a relé/konverter régiók mozgásainak megfelelő sorrendben kell megtörténnie, hogy végeredményben mechanikai munka (ellenerővel szembeni mozgás az aktin filamentumon) létrejöhessen. Ha ezek a jelenségek nem megfelelő sorrendben történnek, akkor nem jön létre munka, az ATP hidrolízisének energiája hővé pazarlódik, ú.n. haszontalan ciklus („futile cycle") alakul ki az enzimreakció során. Mint később bemutatom, mi is ki tudtuk mutatni, hogy az egyes funkcionális

régiók enzimatikus reakciói[2] önállóan is létrejöhetnek, vagyis a régiók egymástól függetlenül is működhetnek. Ahhoz azonban, hogy munkalépés is megtörténjen, ezeknek a folyamatoknak harmonikusan, lépésről lépésre kell megtörténnie. Mindez pedig azt feltételezi, hogy a régiók között pontos kommunikáció szükséges.

Hogyan jön létre ez a kommunikáció? Számomra ez az izgalmas kérdés, és minél jobban beleássuk magunkat ebbe a kérdésbe, annál komplexebb (és sokszor bizony kuszább) kép sejlik fel előttünk. Sokan foglalkoznak azzal a problémával, hogy mi a minimál termodinamiai nanomotor, vagyis a legkevesebb funkcionális egységből összeállítható molekuláris méretű motor. Ez izgalmas feladat, és talán még gyakorlati haszna is lesz a jövőben, azonban én nem hiszem, hogy ebből kiindulva meg tudjuk fejteni azt a kérdést, hogy hogyan működnek a motor enzimek. Éppen ezért én más oldalról közelítem a kérdést: melyek azok a fizikai (kémiai) jelenségek, amelyek szükségesek ahhoz, hogy a motor funkció, illetve ezzel analóg jelenség, az enzimeken belüli molekuláris kommunkáció létrejöjjön.

1.1 Komplex rendszerek vizsgálatának kísérletes megközelítése

A fenti kérdés számomra azonban nem(csak) elméleti probléma, hanem legalább ugyanolyan kihívás az is, hogy olyan kísérleti rendszereket állítsunk össze, ahol ezek a részjelenségek vizsgálhatók. Ez azért is izgalmas, mert amint összeállítok egy kísérleti rendszert, abban a pillanatban befolyásolom magát a megfigyelni kívánt rendszeremet is, és én is a kísérlet részévé válok. Ez a megállapítás a tudományos vizsgálódásokra vonatkoztatva az 1920-as években született, és a huszadik század talán legfontosabb tétele volt. Gyakorlati oldalon ezzel a kérdéssel először a fizikusok találkoztak a huszadik század elején, mert igen apró objaktumokkal kezdtek el foglalkozni. Ezek a gyakorlati problémák azután az elméletek és a filozófia ágait hozták létre. Azért volt szép ez az időszak

[2] Továbbiakban enzimatikus reakciónak fogom nevezni az enzimben funkcionális kémiai átalakulással járó reakciókat (pl ATP hidrolízis) valamint a funkcionális konformáció átalakulásokat (pl a relé/ konverter régiók konformációs átalakulását vagy a termékek disszociációját) is. Annak ellenére nevezem ezeket a folyamatokat sokhelyütt enzimreakciónak, hogy ezek t.k. enzimatikus lépések. Ugyanakkor ezek a folyamatok szerkezetileg és időben jól elszigetelten (is) lejátszódnak, így ezek az enzimatikus lépések az egyes funkcionális régiók enzmatikus reakcióinak tekinthetők.

az elméletgyártók számára, mert azon ritka alkalom volt, amikor a gyakorlati problémákból közvelenül **kellett** új világképet kialakítani [3].

Nagyon hasonló probléma jelentkezik a huszadik század végén a nano- és biokémiai objektumok vizsgálata terén is. Főleg azokon a területeken ütközünk ebbe a kérdésbe, ahol komplex molekulákon, például enzimeken belüli funkcionális jelenségeket vizsgálunk. A másik oldalról pedig azt is látom, hogy kevesen realizálták ezeken a tudományterületeken azt a problémát, hogy a kísérlet hogyan is befolyásolja magát a vizsgált jelenséget. Mindazonáltal meggyőződésem, hogy ebben az esetben nemcsak azért lép fel szignifikáns kölcsönhatás a kísérlet és a jelenség között, mert „durva" módszerekkel vizsgáljuk az apró objektumainkat, hanem azért, mert nagyon nagy komplexitású rendszereket vizsgálunk.

Nézzük csak meg közelebbről, mit is értek ez alatt. Az enzimek szerkezetével foglalkozó kutatók úgy gondolhatják, hogy a fenti kölcsönhatás nem befolyásolja eredményeinket. Azt mondhatják, hogy a röntgensugár és a kristályosítás nem jelent „durva" beavatkozást a rendszerbe. Dolgozatomban a későbbiekben bemutatom, hogy ez távolról sincs így, de mindenesetre ez a szemléletmód jól tükrözi azokat a modelleket, amelyeket a „szerkezeti kutatók" dolgoztak ki arról, hogyan is működnek az enzimek: modelljeik olyanok mint egy autó, amelyben a motor, a kuplung, a sebességváltó segítségével hajtják a kerekeket.

Ezzel szemben az enzimek működése közben több tízezer atom mozgása zajlik valamilyen módon. Ha egy atomcsoport funkcióját akarom vizsgálni, egyik egyszerű módszer, hogy azt a néhány atomcsoportot kicsit átrendezem vagy kicserélem másikra hely-specifikus mutációval. Ilyenkor néhány atomot cserélek ki mindössze, elenyésző számút az összeshez képest, mégis akár mindent tönkre is tehetek. Arra törekszem, hogy olyan cseréket hajtsak végre, amelyek nagyon specifikus hatásúak, vagyis a vizsgált jelenségcsoportból mégcsak ne is egy jelenséget, hanem annak is

---

[3] Ne feledjük, nemcsak a fizikusok voltak olyan szerencsések, hogy a gyakorlatból egy új, nemcsak a fizikára ható világképet építhettek fel. Legalább ilyen szép, sőt, filozófiai szempontból sokhelyütt még izgalmasabb épületet kellett építeniük a biológusoknak: a darwini evolúció elméletét, amely annak a modellje, hogy hihetetlenül egyszerű elemekből hogyan fejlődhet ki egy hihetetlenül komplex és egyre komplexebb világ. Ennek az elméletnek a komplexitását és csodálatos egyszerűségét az is jól jelzi, hogy mind a mai napig milyen hatalmas viharokat kelt az élet legkülönbözőbb területein. Annak ellenére, hogy milyen egyszerűen csodálatos, mind a mai napig nehezen fogadja be még a tudóstársadalom is. Hiszen ennek az elméletnek nemcsak a biológiában van jogosultsága, hanem minden tudományágban (fizika, kémia, közgazdaságtan stb.) alapvető szerepe van, ahol komplex, fejlődő (nemcsak élő!) rendszer kialakulását kell vizsgálni.

csak egy részjelenségét befolyásoljam. A másik kísérleti megközelítésem az, hogy egyes funkcionális régiókba olyan szenzorokat helyezek el, amelyek jelzik az ott folyó változásokat, azonban a szenzorok behelyezése a működést csak minimálisan változtatja meg.

Térjünk azonban vissza az alapkérdéshez, amit a fejezet elején vetettem fel. Úgy gondolom, hogy nagy komplexitású, igen apró rendszerek (ahol a termodinamikai mozgások összemérhetők a funkcionális mozgásokkal) vizsgálatakor hasonló gyakorlati és elméleti(!) problémák merülnek fel, mint a fizikában a huszadik század elején, vagyis a kísérlet olyan mértékben befolyásolja a vizsgált jelenséget, hogy a befolyásolás már nem elhanyagolható, és a befolyásolás utólag „nem vonható ki" a rendszerből. A kísérlet és a jelenség szuperpozíciója úgy tűnik más jellegű a mi rendszerünkben, mint a fizikusában, amikor az elektront vizsgálja, habár mindkét esetben véletlenszerű események halmazával kell foglalkozni. A legnagyobb különbség az, hogy míg az elektron esetében nem komplex rendszert feltételezünk, addig az enzimek vizsgálatánál szembeszökő, hogy sok-sok entitás komplex szerkezetét és véletlenszerű mozgását tanulmányozzuk.

Alábbiakban vázlatosan jellemzem azt a két szemléletmódot, ahogy a szerkezeti biokémikusok , illetve az enzimkinetikusok viszonyulnak az enzimek működéséhez mind a mai napig. Az utóbbi időkben értünk el arra a technikai, technológiai színvonalra, hogy a két megközelítés elméleti és kísérleti módszertanát egyesítsük. Az első két, különálló megközelítés viszonylag jól tanulmányozható anélkül, hogy úton-útfélen beleütközzünk abba nehézségbe, hogy a kísérlet jelentősen befolyásolja a jelenséget. Azonban amikor a két diszciplínát együtt alkalmazzuk, akkor mind elméleti mind gyakorlati szinten tapasztaljuk, hogy a kísérleti beállítás olyan mértékben és előre nem kiszámítható módon befolyásolja a jelenséget, hogy azt már nem hanyagolhatjuk el.

Ez mindenképpen izgalmas kihívás, egy olyan kaland, amelyben a vizsgáló és a vizsgált jelenség „szuperponál": ennél jobban pedig nem is lehetne „feloldódni" abban az izgalmas tevékenységben amit csinálunk.

1.2 Szerkezeti megközelítés – kinetikai megközelítés

Jól megfigyelhető két szekértábor az enzimek hatásmechanizmusával foglalkozó tudományos világban: a népesebb és népszerűbb szerkezeti, valamint a kinetikai megközelítéseket alkalmazó kutatók köre. Különösebben nem ellenséges táborok ezek, de nem vesznek igazán mélységeiben tudomást egymás munkáiról. A népszerűbb és

egyszerűen érthető modelleket át is veszik egymástól, de nem szintetizálják ezeket a modelleket. Amit hiányolok az az, hogy főleg metodikai szempontból, kísérlettervezésben nem egyesítik a két szemléletmódot. Alábbiakban kisarkítva jellemzem a két megközelítést, majd leírom azt, hogy milyen szerény hozzájárulásokat próbálunk tenni annak érdekében, hogy a két szemléletet a kísérleteinkben egyesítsük.

Az enzimek háromdimenziós szerkezeteit megfejtő kutatók előszeretettel képzelnek el olyan mechanikai rendszert, amelyben az egyik funkcionális régió egy kapcsolón keresztül átkapcsolja a szomszédos régiót egy másik állapotba (2. ábra). Ez egyszerű, és sok szempontból látványos leírása az enzimatikus folyamatoknak, ráadásul igen divatos is, hiszen érzékletesen leírható egy ilyen rendszer, „könnyen eladható" elmélet. …és szeretjük könnyen megérteni a világ egy részét, hogy utána „továbbléphessünk rajta", át a következő részre. Későbbiekben bemutatom, hogy bármilyen csábító gondolat is a fenti modell, de az enzimek nem úgy működnek, mint egy autó egyes részei, a motor, a kuplung a sebességváltó, a kerék, stb.

A kinetikai megközelítés alapvetően nem vesz tudomást az enzim szerkezetéről, hanem az enzimet – esetleg az enzim nagyobb egységeit, illetve a reakcióba lépő ligandumokat entitásokként kezeli. Arra törekszik mindössze, hogy az enzimatikus ciklus időbeliségét, a tranziens reakciók időbeli karakterisztikáját pontosan modellezze azáltal, hogy megfelelő számú reakciólépést megfelelő sorrendben helyez el. Annak ellenére, hogy a kinetikai mechanizmus építmények megértése bizony sokszor komoly szellemi erőfeszítésre kényszeríti az Olvasókat - ezért nem is olyan „népszerű" tudományterület, mint a szerkezeti biokémia –, nagyon fontos információt szolgáltat az enzimek működésének megértésehez. Például szerkezeti módszerekkel nem tudjuk meghatározni az enzimatikus ciklus trajektóriáját, mert a ciklus során keletkező, de csak kis koncentrációban megjelenő állapotok szerkezetét nem lehet meghatározni. Ugyancsak kizárólag az egyes enzimatikus állapotok szerkezetének ismeretében nem tudunk energetikai következtetéseket levonni.

Mindazonáltal a nyolcvanas évek végétől egyre erőteljesebben merült fel az igény arra, hogy a két módszertant – a szerkezeti és a kinetikai megközelítésket – együttesen alkalmazzuk mind a kísérletekben, mind az elméletekben.

A kinetikai, a molekuláris biológiai és a szerkezeti biokémiai módszerek kombinációjával új kísérleti megközelítést vezettünk be a motor fehérjék kutatásába: az enzimreakciók során bekövetkező konformációs átmenetek helyspecifikus fluoreszcens szignálok változásán keresztül

gyorskinetikai módszerekkel tanulmányoztuk. Ez a módszer lehetővé tette, hogy az enzimek atomi szerkezeti modelljei és az enzimkinetikai modellek végre „találkozzanak”, ezáltal a kinetikai eredményeket közvetlenül szerkezeti alapokra tudtuk helyezni. Dolgozatomban ezeket a kísérleti megközelítéseket a miozin motor domén működésének vizsgálatára alkalmaztam.

1.3 A dolgozat felépítése

Miután részleteiben bemutatom a miozin motor domén szerkezetét és ATPáz ciklusát aktin távollétében és jelenlétében, a fejezetek sorrendjében egy időbeli utazásra hívom az Olvasót. Ebben az utazásban kísérletek között fogunk kirándulásokat tenni, nagyjából olyan sorrendben, ahogy ezek a kísérletek a valóságban is megtörténtek. Ezt az utazást az évek során én a valóságban is megtettem munkatársaimmal együtt, és abban a szerencsében volt részem és részünk, hogy egy problémakör szinte tematikus kibontakozásának lehettünk tanúi. Kezdetekben a miozin motor domén egyes funkcionális részeinek a működését, konformációátalakulásait vizsgáltuk régióspecifikus konformációs szenzorok alkalmazásával. Később rátérhettünk arra, hogy az egyes funkcionális egységek mozgásai hogyan befolyásolják egymást. Bemutatom, hogy az erőkar mozgását milyen folyamatok határozzák meg, az erőkar lecsapódása (a munkaütem) milyen módon szinkronizálódik az aktin kötéssel. Ez azért kulcslépés, mert ha a munkaütem nem aktinkötött állapotban történik, akkor nincs elmozdulás az aktin filamentum mentén, haszontalan („futile”) ciklus jön létre. Már Szent-Györgyi Albert kutatásai óta ismert, hogy az aktin több nagyságrenddel megnöveli a miozin ATPáz aktivitását. Modellünk arra is magyarázatot ad, hogy ez a meglepő – és a motor enzimek körében általános jelenség- miért jön létre, miért „szükséges”. Végül bemutatom legújabb modellünket arról, hogy hogyan érzékeli a relé/konverter régió az aktin kötést, vagyis mi a kommunikációs útvonal az aktinkötő és a relé/konverter régió között.

Dolgozatom befejező részében felvázolom terveinket a jövőbeni kutatásainkról. Bemutatom néhány elképzelésünket arról, hogy milyen kísérletekkel tanulmányozhatjuk az enzimekben működésük során átrendeződő mechanikai erővonalakat. Úgy gondoljuk, hogy ezek a kísérleti megközelítések, valamint az a gondolat, hogy a belső erővonalak átrendeződése funkcionális és fundamentális jelenség, új utakat nyithatnak meg az enzimek működésének megértésében.

A történet egységének és folyamatosságának érdekében a dolgozatot nem szabdalom fel minden egyes témára vonatkozó irodalmi áttekintésekkel, illetve külön fejezetre tagolt diszkussziókkal. A legfontosabb számszerű adatokat a dolgozat végén található függelékekben összegeztem, illetve a folyamatosságot esetleg megtörő, ezért az alábbiakban kimaradt eredményeket az Olvasó megtalálhatja a hivatkozott publikációinkban.

2. Információáramlás a miozin funkcionális régiói között

2.1 Bevezetés, kérdésfelvetés

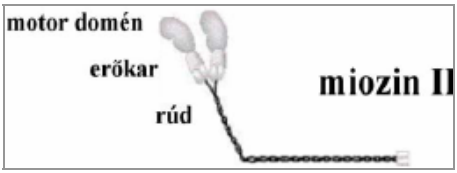
A miozin a legbehatóbban tanulmányozott motor fehérje, sőt az egyik legtöbbet vizsgált enzim is. A „miozinológia" jelentőségét növeli, hogy ebből a kutatási területből számos alapvető biokémiai és biofizikai kutatási és módszertani irányzat nőtt ki, mint pl. a legutóbbi időkben divatos nanobiotechnológiai irányzatok (*3-5*) és egyedi molekula kinetikai módszerek (*6*), vagy ezen a területen fejlesztették azokat ki, pl. a legújabb nanonéter felbontású vizualizációs eljárást, a FIONA-t (*7*). Mindazonáltal a miozin volt az az objektum, amelyen elsőkként határozták meg az enzimatikus állapotokat intrinszik fluoreszcencia mérésekkel, illetve igen alaposan tanulmányozták gyors-kinetikai módszerekkel. A tudományterület jelentőségét mutatja, hogy az American Biophysical Society éves kongresszusán a tematika negyede-ötöde motor fehérjékről szól, azon belül pedig fele miozinról.

Ennek ellenére még mindig nem ismerjük az energia transzdukció (a kémiai energia átalakítása munkává) molekuláris mechanizmusát (*8;9*). A miozin katalitikusan aktív része, az ú.n. motor domén is számos funkcionális régióból áll, és ezen régiók szinkronizált működése elengedhetetlen az energia transzdukcióhoz. Éppen ezért kiindulási kérdésünk az, hogy a funkcionális régiók közötti információáramlás hogyan történik. A kérdés azért is jelentős, mert a válaszok általánosíthatók más miozin típusokra. Megjegyezzük, hogy a miozinok egy nagy enzim családot képeznek, és tagjai minden eukariota sejtben esszenciálisak. Ugyanakkor legutóbbi eredményeink azt is mutatják, hogy a miozin ATP kötőzseb környékén zajló események hasonló mechanizmussal mennek végbe, mint a P-*loop* NTPáz enzim család más tagjainál (*10-12*).

Mielőtt a kutatási kérdéseinket részletesen kifejtenénk, tekintsük át nagy vonalakban a miozin szerkezetét, illetve felvázolom a miozin és az aktomiozin ATPáz ciklusának általánosan elfogadott működési mechanizmusát. Ezen információk birtokában részletezem a kutatási kérdéseket és hipotézist.

2.1.1. A miozin motor domén funkcionális régiói

A köznyelvben klasszikus miozinként aposztrofált fehérjék a miozin II fehérje családba tartoznak. Közös jellemzőik, hogy egy hosszú *coiled-coil* farok doménen két fej található (1. ábra).

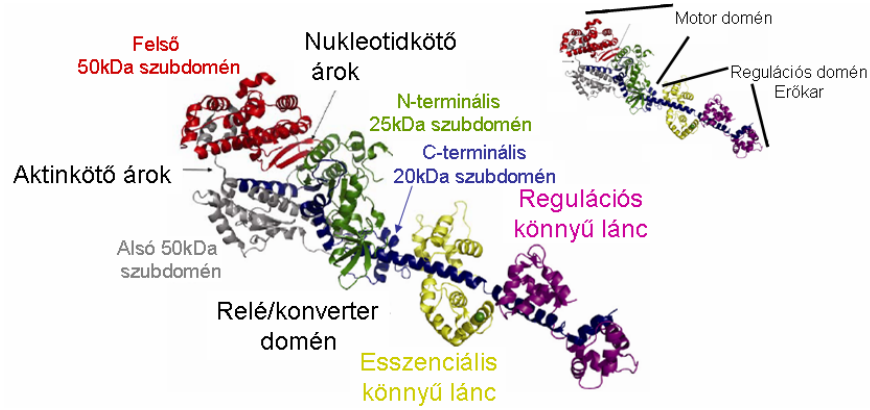


1. ábra A miozin II sematikus szerkezete.

A miozin II család legismertebb tagjai a harántcsíkolt izomszövetben és a simaizomban találhatók, de számos citoplazmatikus miozin II is ismert. Manapság az egyik legelterjedtebb miozin kutatási modell objektum a *Dictyostelium* miozin II, mert hasonló tulajdonságokkal rendelkezik, mint a vázizom és a simaizom miozin II, ugyanakkor rekombináns formája könnyen expresszálható. Kutatásainkban mi is nagyrészt ezt a miozin formát , illetve rekombináns helyspecifikus mutánsait használtuk.

A miozin fej (szubfragmentum 1, S1) motor doménból és regulációs doménból áll (2. ábra). A regulációs domén (vagy nyak) alkotja az erőkart, míg a motor domén a katalitikus egység. A motor domén funkcionális egységei a nukleotidkötő- és az aktinkötő régió valamint az ún. átalakító régiók, a relé és a konverter. Utóbbi régiókban amplifikálódik a nukleotidkötő régióban keletkező kicsiny szerkezeti változás. A relé és a konverter régiókban felnagyított konformáció változás az erőkarra kerül, és végső soron az erőkar csapását okozza. Ennek a molekuláris folyamatnak az eredménye a kontrakció.

Vizsgálataink fő tárgya a miozin motor domén. Ennek a doménnak az atomi szerkezete mintegy tíz éve ismert (*13;14*). A miozin motort domént szerkezetileg több szempontból oszthatjuk fel.



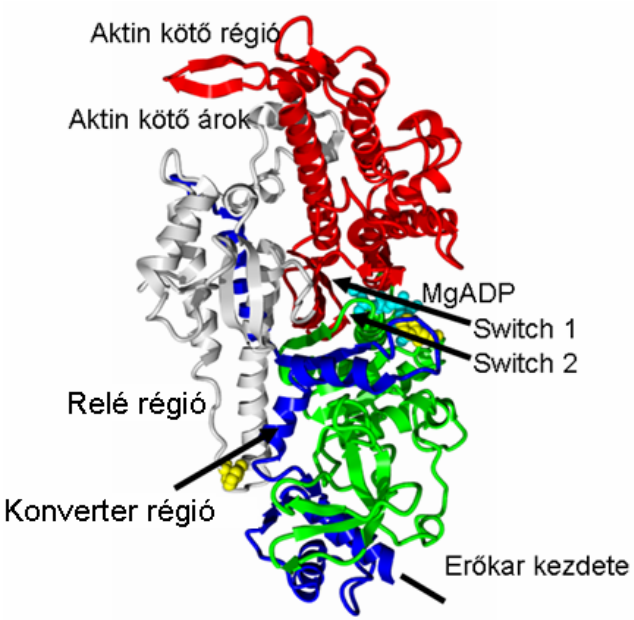
2. ábra A miozin II feji régiójának (S1) atomi felbontású szerkezeti képe (*1*). A relé/konverter régió mozgatja az erőkart, amely a 20 kDa szubdomén C-terminális szakasza és a két könnyű lánc. A belső ábrán bemutatom a motor domén és az erőkar elhelyezkedését.

A motor domént, illetve az S1-et limitált proteolízissel három részre lehet bontani: egy N-terminális 25 kDa, egy középső 50 kDa és egy C-terminális fragmetumra, amelynek molekula tömege az erőkar doménnal együtt 20 kDa. Ezeket az elnevezéseket - amelyek meghatározásában az ELTE Biokémiai Tanszéknek kiemelkedő szerepe volt - a mai napig használják, és ebben a kérdésben mindmáig Prof. Bálint Miklós klasszikusnak számító cikkére hivatkoznak (*15*).

A kristályszerkezet meghatározásával a funkcionális szubdoméneket is el lehet különíteni. A további tárgyalás szempontjából a legfontosabb szerkezeti egységek a következők:

1. A nukleotidkötő régiót szekvenciálisan egymástól távol eső részek alkotják. A legfontosabb hurkok, amelyek az ATP trifoszfát egységét veszik körül, az ún. *switch 1*, *switch 2* és a *P-loop*. Szerkezetileg és szekvenciálisan ezek a hurkok konzervatívak (*16;17*), és a szolubilis citoplazmatikus proteinek között az egyik legnagyobb evolúciós családot, a P-*loop* NTPáz családot definiálják. Ezen család fontosabb tagjai a miozinok, kinezinek, dineinek, illetve az ősibb *P-loop* GTPáz család fehérjéi. Mára számos nukleotid és konformációs állapotban határozták meg különböző miozinok atomi szerkezetét (*1;13;14;18-26*). Ezen szerkezetek alapján – hasonlóan a G-proteinekhez – mind a *switch 1* mind a *switch 2* külön-külön nyitott és zárt szerkezetet képes felvenni (*8;27*). A szerkezetek alapján úgy

tűnik, hogy a *switch 1* hurok átalakulása az aktinkötő régiók konformációját befolyásolja, míg a *switch 2* két állapota az erőkar mozgását kialakító régiók konformációját határozza meg.

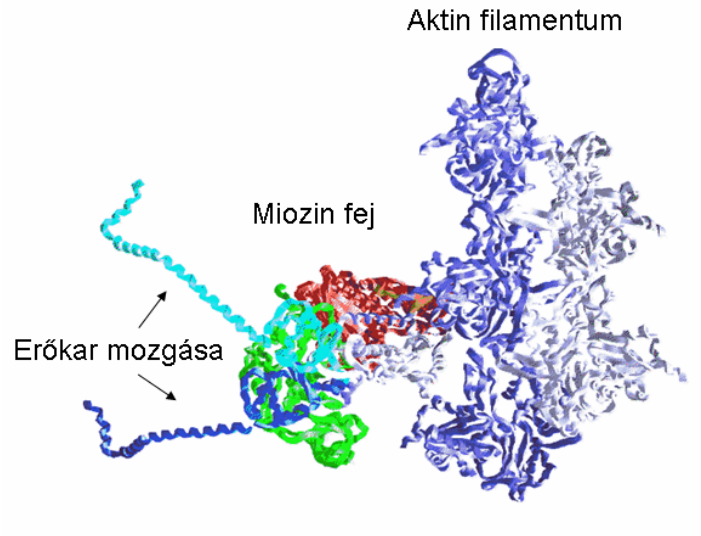


3. ábra A motor domén főbb szerkezeti elemei. A proteolitikus fragmentumok különböző színekkel jelöltem: zöld: 25 kDa fragmentum, piros: felső (aktin árok „feletti") 50 kDa fragmentum, szürke: alsó 50 kDa fragmentum, kék: 20 kDa fragmentum motor doménban található részlete. A 20 kDa fragmentum az erőkar részben folytatódik

2. Az aktinkötő régiót egy hosszú árok választja ketté. Mivel ezt a régiót gyakorlatilag teljes egészében az 50 kDa proteolitikus fragmentum alkotja, ezért az árok „felett" elhelyezkedő részt felső, az az alattit alsó 50 kDa aktinkötő régiónak nevezzük. Az atomi szerkezetek alapján a nyitott aktinkötő árok, amely gyengén köti az aktint, a *switch 1* hurok zárt konformációs állapotával, míg a zárt aktinkötő árok, amely erősen köti az aktint a *switch 1* hurok nyitott konformációjával jár együtt. Az aktin kötésben számos felszíni hurok vesz részt.
3. A relé régió a nukleotidkötő, az aktinkötő és konverter régiókat köti össze szerkezetileg.
4. A konverter régió kapcsolódik a miozin nyaki részéhez, ami az erőkar funkciót szolgáltatja.

Leegyszerűsítve, az erőkar modell alapján a *switch 2* hurok néhány Ångström-ös elmozdulása (nyitott-zárt átmenete) amplifikálódik a relé és a konverter régiókban. Ez a megnövekedett elmozdulás – hasonlóan egy aszimmetrikus kétkarú emelő mozgásához – az erőkarra tevődik át. Mivel az erőkar csapáskor a miozin rigiden kapcsolódik az aktinhoz, az erőkar mozgása hozza létre a miozin és az aktin filamentum relatív elmozdulását (4. ábra).

Az erőkar állása alapján a dolgozat további részében sokszor fogom használni a „fel" (*up*), illetve „le" (*down*) elnevezésű állapotokat. Az atomi szerkezetek alapján „fel" állapotban a *switch 2* zárt, míg „le" állapotban nyitott konformációban van.



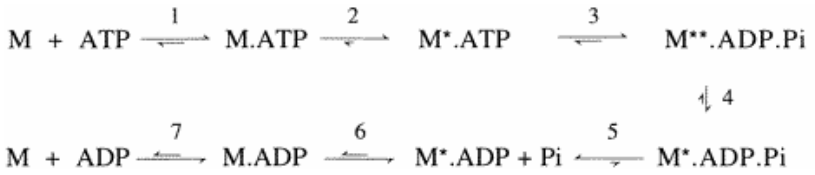
4. ábra Az erőkar mozgásának demonstrációs modellje K. C. Holmes szerint: http://wbp.mpimf-heidelberg.mpg.de/kennethHolmes/newFigures/index.html

2.1.2 A miozin és az aktomiozin ATPáz mechanizmusa

Kiindulási modellként ebben a fejezetben a Bagshaw-Trentham (*28;29*) és a Lymn-Taylor (*30;31*) ATPáz modelleket mutatom be. Az előbbi a miozin, az utóbbi az aktomiozin ATPáz ciklusának kinetikai mechanizmusát írja le. Ezeket a modelleket a hetvenes évek elején állították fel, és alapvetően a mai napig igen jól használhatók kiindulási hipotézisekként a molekuláris mechanizmusok leírására.

2.1.2.1. A Bagshaw-Trentham modell

Clive Bagshaw és David Trentham a hetvenes évek elején igen akkurátus gyorskinetikai méréssorozatok kiértékelése után állította fel az álábbi kinetikai sémát (1. séma).



1. séma A Bagshaw-Trentham kinetikai séma. A csillagok a különböző konformációs állapotokat jelölik, amelyeket eredetileg fluoreszcencia intenzitás alapon különítettek el. A nyilak hosszával az egyes folyamatok reakciósebességi állandójának viszonylagos nagyságát érzékeltetem.

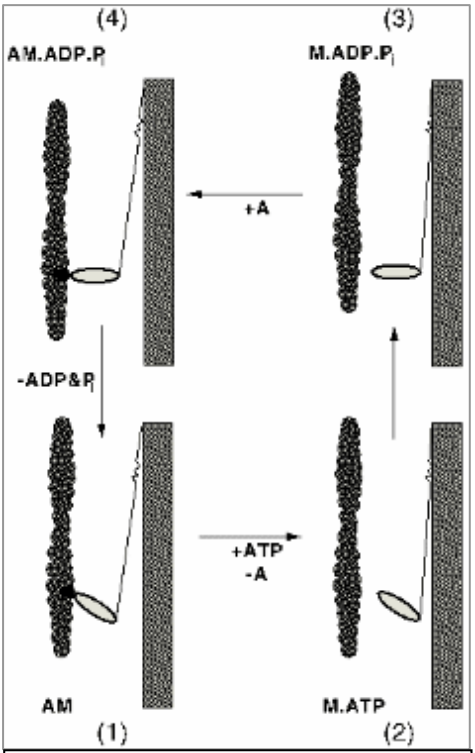
A miozin ATPáz ciklusa egy bonyolult, soklépéses reakciósor. Az ütközési komplex kialakulása után (1. lépés) egy konformációs átmenetet (2. lépés) feltételeztek. Mint látni fogjuk később, ez a lépés igen fontos az aktinnal történő reakcióval összefüggésben, mert ezen konformációátalakulás során a miozin erős aktinkötő tulajdonsága gyenge aktin kötéssé alakul át. Fontos megjegyezni, hogy ez a lépés gyakorlatilag irreverzibilis, aminek az a következménye, hogy az ATP-t a miozin igen erősen köti ($K_{1*}K_2 = 10^8\ M^{-1}$). Ezután a konformációs átmenet után történik az ATP hidrolízise (3. lépés), ami lényegesen lassabb, mint a megelőző lépések, és kis szabadenergia változással jár, vagyis reverzibilis reakció. A hidrolízis lépéssel egy időben egy másik konformációs átmenetet is feltételeztek, amelyet összefüggésbe hoztak a miozin „felhúzásával", amely később, a termékek szekvenciális felszabadulásával relaxálódik (4., 5., 6., 7. lépések), és aktin jelenlétében ez a konformációs relaxáció hozza létre a kontrakciót eredményező konformációs átmenetet (az erőkar csapódását) (lásd alább a Lymn-Taylor modellben). A kinetikai séma egyik fő sajátossága, hogy mivel a termékek sokkal gyengébben kötődnek a miozinhoz ($K_{d\ ADP}$= 5μM, $K_{d\ Pi}$=10-50mM), mint az ATP, ezért a reakció hajtóerejét a kötések szabadenergia különbsége okozza és nem az ATP hidrolízis lépése, amely reverzibilis reakció (3. lépés). Ezt a jelenséget fontos kihangsúlyozni: az ATPáz motorok esetében a szabadenergia változás nem a hidrolízis lépéskor történik! További fontos megjegyzés,

hogy a szerzők azt feltételezték, ADP kötött állapotban a miozin a hidrolízist megelőző enzimatikus állapotban van.

A sémát úgy alkották, hogy nem volt atomi szerkezeti információjuk a miozinról, illetve annak különböző formáiról. Egyik feladatunk éppen az volt, hogy ezeket a kinetikai állapotokat hozzá tudjuk rendelni a kilencvenes évek során feltárt szerkezeti állapotokhoz.

2.1.2.2 A Lymn-Taylor modell, problémafelvetés

Az aktomiozin kemomechanikai transzdukciójának legegyszerűbb (minimál) modellje a hetvenes évek elején publikált Lymn-Taylor modell. Annak ellenére, hogy ez a modell nagyon keveset mond a belső szerkezeti változásokról, mégis igen hasznos kiinduló modell bonyolultabb hipotézisek kialakításához, mert tökéletesen összefoglalja azokat a makroszkopikusan detektálható fizikai és kémiai változásokat, amelyeket az aktomiozin működése során észlelünk.



5. ábra A Lymn-Taylor modell (átvéve (30))

Az 5. ábra sematikusan mutatja be a modellt.

Kiindulási állapotként vegyük az ún. rigor komplexet, amely az aktomiozin nukleotidmentes állapota. Ebben az állapotban a miozin fejek erősen kötődnek az aktinhoz. A miozin ATP kötésekor a fejek disszociálnak az aktinról. Az ATP hidrolízisével kapcsoltan a miozin fejekben konformáció-változás jön létre, a molekulák felhúzott állapotba kerülnek. A termékek felszabadulásakor a miozin fejek erősen visszakötődnek az aktinhoz. Ezt követően (a valóságban ezzel szorosan kapcsoltan) a miozin fejekben az előbbiekben említett konformációváltozással ellentétes alakváltozás történik (az erőkar csapódása), ami maga az erőgenerálás.

Ennek révén a miozin fejek ”meghúzzák” az aktin filamentumot, amelynek következménye a kontrakció. Ezzel a lépéssel a ciklus végére értünk, újabb ATP kötéssel elölről kezdődik a kemomechanikai ciklus.

2.2 Tudományos probléma és kérdés

2.2.1 Tudományos probléma: mi hajtja a motort?

A Lymn-Taylor modell sok, a mai napig érvényes intuitív elemet foglal magában. Az aktomiozin, illetve a motor enzimek alapvető működési mechanizmusát máig ezzel a modellel magyarázzák (lásd pl. Geeves, Holmes 2005-ös összefoglalóját (44)). A modell legfontosabb tulajdonságának kell lennie, hogy magyarázza a motor rendszer funkcionális lépését, vagyis a munkütemet, továbbá azt, hogy ebben a lépésben miért tud munkát végezni a rendszer. Ugyancsak fundamentális kérdés, hogy a ciklust energetikailag melyik lépés hajtja. Vizsgáljuk meg, hogy a Lymn-Taylor modell ciklusát melyik lépés hajtja. Logikus kindulási pontnak tűnik, és Lymn és Taylor is így tett, hogy a nagy energiájú molekula elbomlási lépését, a hidrolízis lépést tekintsük a rendszert hajtó lépésnek. A modellben a hidrolízis lépés a 2. állapotból a 3. állapotba történő átmenet. Mint látható, ebben a lépésben nemcsak a hidrolízis történik, hanem a miozin feje „felhúzott” állapotba kerül. Tehát a fej szerkezetileg olyan helyzetbe kerül, amelyből – az aktinhoz történő visszakötődés után „lecsap”, és így megtörténik a munkaütem. Azonban nemcsak szerkezetileg, hanem energetikailag is felhúzott állapotba kell kerülnie a fejnek, hasonlóan a felajzott íjhoz. Hiszen csak felajzott állapotban, energetikailag feltöltődve tudja a munkát a következő lépésekben elvégezni. Tehát a Lymn-Taylor modell szerint az ATP hidrolízise által a miozin fej „energetizálódik”, amely az aktinhoz történő visszakötődés után a munkaütemben relaxálódik. Ez a modell, mint láthatjuk, teljesen analóg az íj működési mechanizmusával, amikor is az íjat megfeszítjük (és ekkor egyébként a karunk izmaiban egy nagy adag ATP el is hidrolziládódik), majd a nyílvessző vége kölcsönhatásba lép a nyíl húrjával, és a húr elegendésekor annak feszülése relaxál, ezáltál pedig kilövi a nyílvesszőt. Kérdés, hogy valóban így működik-e az aktomiozin – és más molekuláris motorok.

Már két évvel a Lymn-Taylor modell megalkotása után kiderült, hogy az ATP hidrolízis lépés egyensúlyi reakció (29). Ez még nem jelenti feltétlen, hogy ekkor nem történhet a rendszer felhúzása, de mindenképp gyanút keltő. Ebben a dolgozatban ennek a kérdésnek az eldöntése és

bizonyítása az egyik legfontosabb üzenet (lásd 2.4.5. fejezet). Ha sikerül bizonyítani, hogy nem a hidrolízis lépés energetizálja a rendszert, akkor viszont további kérdések merülnek fel. Legfontosabb, hogy hogyan történik a munkaütem. Ennek a kérdésnek a bonyolultságát egy látszólag részletkérdésen keresztül világítom meg: A 3. állapot miért is kötődik vissza az aktinhoz? Ez a kérdés azért is izgalmas, mert a miozin ATP kötött és ADP.Pi kötött atomi szerkezete között nem látunk különbséget. Tehát látszólag semmi oka nincs annak, hogy a miozin feje visszakötődjön az aktinhoz. Ez a kérdés a legutóbbi időkig kérdés maradt. Viszont a visszakötődés nagyon fontos, mert ha a munkaütem (a fej lecsapása) nem aktinkötött állapotban történik, akkor egy haszontalan ciklus játszódik le. A haszontalan ciklusban a miozin úgy használt el egy ATP molekulát, hogy nem húzta meg az aktin filamentumot. Ha erre a kérdésre megkapjuk a választ (lásd 2.4.6.3. és 2.5. fejezetek), akkor igen közel kerülünk a munkaütem mechanizmusának leírásában.

Az utóbbi időkben ezek a problémák nyilvánvalóan egyre forróbakká váltak (pl.(9) illetve (43)). Szerkezeti alapon nem tudták magyarázni az aktinkötés, a termékfelszabulás és a munkaütem kapcsoltságát, amelyre számos spekulatív magyarázat született (pl. (8), (23)). Célul tűztük ki ezen tudományos problémák vizsgálatát. A következő fejezetben részleteiben összefoglalom a tudományos kérdéseket, amelyek e problémák köré kristályosodtak.

2.2.2 Kutatásaim kiindulási kérdései

A Bagshaw-Trentham és a Lymn-Taylor modellre alapozva konkretizálhatjuk azokat a legfontosabb tudományos kérdéseket, amelyek kutatásaink kiindulási pontjaiként szolgáltak az elmúlt 10 esztendőben. Első feldatunk az volt, hogy az újonnan felfedezett szerkezeti állapotokat (*switch 1* zárt és nyitott, *switch 2* zárt és nyitott állapotok) a fenti sémák kinetikai állapotaihoz rendeljük. Azonban önmagukban a kinetikai sémák is felvetnek kérdéseket, illetve a szerkezetek fényében további megoldandó problémák merülnek fel (a kérdéseket olyan sorrendben fogalmaztam meg, ahogy azok a Lymn-Taylor modell egyes lépéseit kövessék):

1. Hogyan magyarázható a nukleotid kötés kinetikája szerkezetileg? Milyen szerkezeti változások jönnek létre a nukleotid kötéskor és milyen a változások időbelisége? Ez a kérdés különösen fontos a Lymn-Taylor modell fényében, mert a nukleotid kötés szorosan kapcsolt az aktin miozinról történő disszociációjával.

2. A Lymn-Taylor modell igen lényeges kérdést feszeget az aktin kötéssel kapcsolatban. A miozinnak két állapota van az aktin kötés szempontjából: az erősen kötődő állapot, amely apo és MgADP formában jön létre, valamint a gyengén kötődő állapot, amely ATP és ADP.P_i formákban tapasztalható. Milyen szerkezeti különbség van a két állapot között, milyen jellemzői vannak a két állapot közötti átmenetnek, és ez az átmenet hogyan kapcsolódik az aktin kötés folyamatához?
3. Mint láttuk fentebb, a nukleotidkötő és az aktinkötő régió szerkezetileg elkülönül, ezért adódik a kérdés, hogy az információ hogyan jut el az egyik helyről a másikra, illetve mi a mechanizmusa az információáramlásnak. Ennek a kérdésnek a jelentőségét emeli az a tény, hogy újabb kutatások arra mutatnak, hogy a GEF-G-fehérje kölcsönhatást a G-fehérje GTP kötése valószínűleg hasonló módon befolyásolja, mint ahogy a miozin ATP kötése az aktin-miozin kölcsönhatást (*11;12*). Tehát, ha utóbbira fel tudunk állítani atomi szintű kinetikai modellt, akkor az alkalmazható lehet a G-fehérjékre (és más *P-loop* NTPázokra) is, és e modell ezáltal további G-fehérje kutatások kiindulópontjává válhat.
4. A Bagshaw-Trentham és a Lymn-Taylor modell szerint az ATP hidrolízise egyidőben történik a miozin fejben létrejövő konformációváltozással, ami a miozin erőkarjának „felhúzását" eredményezi. Kérdés, hogy ezek az események valóban egy lépésben történnek-e, illetve a hidrolízis hogyan hozza létre (ha egy lépésben történnek) vagy befolyásolja (ha külön lépésben) a konformáció változást. Vajon az aktin – mégha gyenge kötése révén is –befolyásolja-e a hidrolízist és/vagy a konformáció változást?
5. További kérdés, hogy az aktin kötés befolyásolja-e a nukleotid kötést, a *switch 2* nyitott-zárt átmenetet, illetve az erőkar mozgását, az ATP hidrolízist és a termékfelszabadulást. Ez a kérdés elsősorban a Lymn-Taylor modell második részére reflektál, hiszen a termékfelszabadulás szorosan kapcsolt mind az aktin visszakötésével, mind az erőgenerálással.
6. A fenti kérdések megválaszolása után fundamentális kérdés, hogy kísérletesen meghatározzuk, melyik lépés a miozin ATPáz sebességmeghatározó lépése. Érdekes, hogy 35 évvel a Bagshaw-Trentham mechanizmus felállítása után mindezidáig nem volt kísérleti bizonyítékunk arra, hogy a foszfát felszabadulás vagy egy azt megelőző konformációs átalakulás-e a sebességmeghatározó lépés. Ez nemcsak azért fontos kérdés, mert egy ezimreakció mechanizmus legfontosabb eleme a sebességmeghatározó lépés, hanem mert az aktin ezt a lépést gyorsítja mintegy százszorosára, továbbá az erőgenerálás valahol a hidrolízis lépés és a foszfát felszabadulás lépés között, vagyis ezekkel a lépésekkel

szorosan kapcsoltan történhet. Ebből máris következik a következő kérdés, vagyis:

7. Felállítható-e egy modell, amely megmagyarázza, miért szükséges a mechanizmusban, hogy az aktin több nagyságrenddel gyorsítsa az ATPáz ciklust? Ezen az úton továbbhaladva a következő kérdés adódik:

8. Az aktin és a miozin kötés az ATPáz ciklus mely lépésével kapcsolt? Mindezek ismerete pedig előrevetíti annak a lehetőségét, hogy kidolgozzunk egy működési modellt az erőgeneráló lépés mechanizmusára.

9. Ha megismerjük az erőgenerálás mechanizmusát, amely az aktin kötés és az erőkar csapódás valamilyen kapcsoltságán keresztül kell, hogy megtörténjen, akkor elérkezhetünk kutatásunk azon szakaszához, hogy az érdeklődésünk az akto-miozin kötés és az erőkar mozgás szinkronizációjára terelődjön:

   a. Mely régiókon keresztül történik a kommunikáció az aktinkötő és a relé/konverter régió között?
   b. A kommunikáció szerkezeti átalakulások sorozatán keresztül történik vagy más jelenség (mobilitás, mechanikai feszültség) megváltozása hozza létre.

10. Végül, de nem utolsó sorban megjegyezem, hogy a fenti kérdésekben feltételezett szerkezeti állapotok specifikus kötési felszínt biztosíthatnak különböző ligandumoknak, amelyek esetleg specifikus inhibítorként is alkalmazhatók. Újabban felfedezték az első miozin II specifikus inhibítort (*blebbistatin*) (*32*), amellyel specifikus sejtfunkciókat lehet gátolni. Ha sikerül megfejteni a fenti mechanizmusokat, az utat nyit azelőtt, hogy megfejthessük a blebbistatin hatásmechanizmusát is. Ez a tudás pedig lehetőséget teremt arra, hogy további specifikus inhibitorokat tervezhessünk.

2.3 A kísérleti objektum, kísérleti módszerek, munkahipotézis

Kísérleti objektumunk a *Dictyostelium* miozin II motor domén rekombináns változata, illetve ennek hely-specifikus mutánsai voltak. Manapság a *Dictyostelium* miozin II és annak rekombináns módszerekkel előállított motor doménje az egyik legáltalánosabban használt kísérleti objektum a miozin kutatásában, mert – ellentétben más miozin II enzimekkel – jól expresszálható, jól kristályosítható, és nagyon hasonló tulajdonságokkal rendelkezik, mint a vázizom, illetve a simaizom miozin. Kísérleti filozófiánk alapja az volt, hogy a molekula különböző szerkezeti, illetve funkcionális régióiba olyan specifikus jel-molekulát inzertáljunk, amely a vizsgált folyamatra (konformáció változásra és/vagy kémiai

változásra) jelentős jelintenzitás változással reagál. További fontos kritériumként kezeltük azt, hogy a jel-bevitel ne okozzon jelentős változást a vizsgált jelenségre vonatkozóan, ezáltal méréseink és a felállított modelljeink könnyen, közvetlenül interpretálhatóak legyenek a vad típusú enzimre is. Nagyon fontos következménye ennek a kísérleti elrendezésnek, hogy egy-egy reakciólépést (pl. az erőkar mozgása, az aktin kötődései, a nukleotid kötése stb.) több funkcionális régióban egymástól függetlenül tudtunk vizsgálni. Tehát ennek a kísérleti megközelítésnek köszönhetően meg tudtuk határozni, hogy egyes reakciólépések mely funkcionális régiókban okoznak változást, valamint azt, hogy ezek a különböző régiókban történő változások milyen sorrendben, milyen ok-okozati viszonyban történnek.

A vizsgált jel legtöbbször az enzimbe inzertált fluorofór fluoreszcencia emissziója volt [4]. A fluoreszcencia emisszió számos specifikus paraméterét (spektrális tulajdonságok, fluoreszcencia életidő, anizotrópia, anizotrópia lecsengés, FRET, excimer fluoreszcencia) használtuk a konformációs állapotok és átalakulások jellemzésére. A jeladó molekulát háromféleképpen juttattuk a fehérjébe:

1. A természetesen előforduló fenilalanin oldalláncokat triptofánná mutáltuk olyan miozin motor doménban, amelyből előzőleg fenilalaninra cseréltük a természetes triptofánokat (*33*). Ezáltal ún. egy-triptofános konstrukciókat kaptunk. Mivel a triptofán fluoreszcenciája specifikusan detektálható a többi fluoreszcens aminosav mellett (tirozin, fenilalanin), és csak egyetlen fordult elő a fehérjében, ezért a fluoreszcencia változás specifikusan tükrözte a triptofán körüli régióban történő konformációs változásokat. Ugyanakkor a mérés jel/zaj aránya jelentősen javult a fluoreszcencia változást nem mutató triptofánok kiirtása miatt. Itt jegyzem meg, hogy a fluoreszcencia emisszió általában nagyon érzékeny a fluorofór környezetében történő változásokra.

2. Előállítottunk cisztein mentes motor domén mutánsokat is (*34*). Ezekbe a kiindulási konstrukciókba specifikus helyekre egy vagy két ciszteint mutáltattunk. Ezeket az új cisztein oldalláncokat maleimido- vagy jódacetamido fluorofórokkal reagáltattunk. Ezek a kémiai csoportok specifikusan reagálnak megfelelő körülmények között ciszteinnel, ezért a fluorofórok bevitele helyspecifikus volt (az egyetlen (vagy a két) ciszteinre).

---

[4] Végeztünk olyan kísérleteket is, amelyekben a párosítatlan spin jelet tartalmazó molekulát inzertáltunk helyspecifikus módon a motor doménba, és EPR spektroszkópiával vizsgáltuk a változásokat. Ezeket a kísérleteket azonban jelen dolgozatban nem tárgyalom.

Az így módosított fehérjén – hasonlóan a triptofán mutásokhoz – fluoreszcencia méréseket tudtunk végezni.

3. Suzuki és mtsi. módszere alapján (*35*) miozin motor domént fuzionáltattunk az N-és C-terminálisán két különböző (pl. sárga és zöld (YFP és GFP)) fluoreszcens fehérjével. A két fluoreszcens fehérje között fluoreszcencia energia transzfer alakult ki, ha a donor fluorofórt gerjesztettük. Suzuki és mtsi. azt feltételezték, hogy a FRET hatásfokát elsősorban a két fluoreszcens fehérje között lévő távolság határozza meg, ezáltal az erőkar mozgása az N-terminális régióhoz képest közvetlenül követhető az ATPáz ciklus folyamán. Hosszú és akkurátus kísérletsorozat során bizonyítottuk, hogy Sutoh és mtsi előfeltételezése nem volt helytálló. Kimutattuk, hogy a két fluoreszcens fehérje dimerizál, és csak néhány Angström az elmozdulás közöttük az enzimciklus során (Suzuki és mtsi. szerint néhány nm). Ugyancsak meghatároztuk kísérletesen azokat a környezeti és szerkezeti paramétereket, amelyek determinálják a FRET hatásfokát. Ezeket a kísérleteket 2006 nyarán publikáltuk (*36*). A miozinra vonatkoztatott megállapításokon túl a cikk jelentősége abban lehet, hogy pontosíthatja az eddigi fluoreszcens párokon végzett FRET kísérletek interpretációit, illetve segítségére lehet további hasonló kísérletek tervezésében, hiszen mind a biokémiai mind mikroszkópos mérésekben, illetve sejt biológiai vizsgálatokban egyre gyakrabban alkalmazott módszer a fluoreszcens fehérje párokon alkalmazott FRET mérése.

A fluorofór bevitel fentebb említett első két módszerét mi alkalmaztuk először a miozin kutatásban.

Az enzimreakció során lejátszódó folyamatokat a fluoreszcencia változás nagy időfelbontású detektálásával követtük. A méréseket a megállított áramlás módszerével (*stopped flow*), illetve hőugrásos és nyomásugrásos perturbációs módszerekkel (*T-jump, p-jump*) végeztük. Ezek a műszerek szubmilliszekundumos, illetve mikroszekundumos időfelbontásban tudják követni a változásokat a reaktánsok igen gyors összekeverése, illetve a fizikai paraméterek ugrásszerű megváltoztatása után.

Kutatásaink kezdetén az egyik sarkalatos kérdés az volt, hogy a triptofánok, illetve a ciszteinek kiirtása nem okoz-e funkcionális változást az enzim mechanizmusában. Mérés-sorozataink egyértelműen kimutatták, hogy a triptofán irtott és az egyedi triptofánokat tartalmazó mutánsok (*steady state* és tranziens) enzimkinetikai paraméterei csak egészen kis mértékben változtak, az enzim hatásmechanizmusát egyáltalán nem befolyásolták, mechanikai, motilitási tulajdonságai is változatlanok maradtak (*33*). A cisztein irtás lassítja az ATP hidrolízis lépés sebességét,

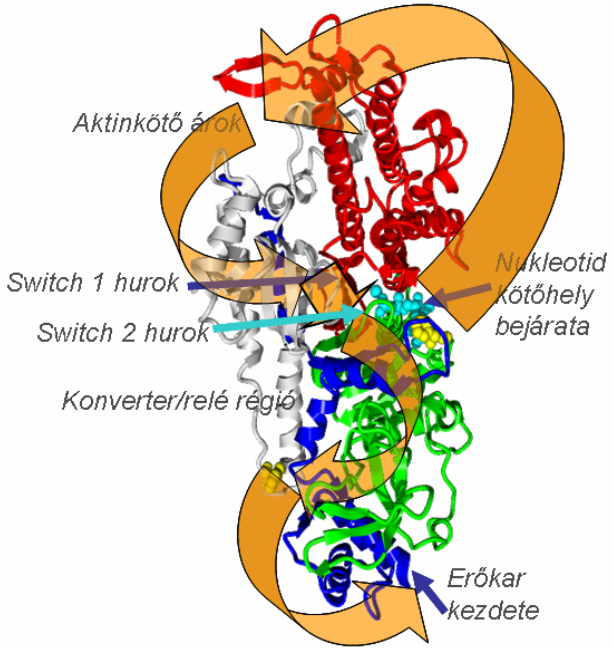
ugyanakkor nem okoz jelentős változást az aktin kötésben , illetve az ezzel összefüggő folyamatokban. Utóbbi konstrukciónál ezeket a tulajdonságokat figyelembe kell venni a kísérlet tervezésekor. Éppen ezért az újabb triptofánok, illetve ciszteinek pozíciójának tervezésekor is számos szempontot figyelembe kellett vennünk: 1. a pozíció érintett legyen a vizsgált konformációs átalakulás által, 2. ne legyen konzervatív aminosav, 3. a kicserélt aminosav mérete és kémiai jellege hasonló legyen az újhoz, 4. ha további kémiai módosítást akartunk végezni a beépített aminosavon (ciszteinen), akkor ne legyen túlságosan eltemetett a fehérjében a hatékony kémiai jelölés érdekében.

A fent leírt kísérleti megközelítésnek az a nagy előnye, hogy eredményeinket szerkezeti és kinetikai szempontból egyidejűleg tudjuk interpretálni. Vagyis a fluorofórt az ismert atomi szerkezet alapján tervezzük, míg az enzimatikus változásokat nagy időfelbontással mérjük, és a megfelelő szerkezeti elemhez rendelhetjük hozzá. Ezt a kísérleti filozófiát a motor enzimek vizsgálatába mi vezettük be 2000 óta.

Egyes reakciólépéseket nemcsak a régióspecifikus jelek időbeli követésével vizsgáltuk. Olyan mutáns motor doméneket terveztünk, amelyekben a mutációk lehetőleg nagy specificitással, egyetlen reakciólépést, konformáció átalakulást vagy funkcionális régiók közötti kommunkációt perturbáljanak. Ezeket a mutációkat előzetes számítógépes modellezések, szimulációk eredményei alapján terveztük. A kísérletek elvégzése után, a mutációk hatásának ismeretében újabb *in silico* modellezéseket végeztünk, és a kísérleti és komputeres eredményeket együttesen értékeltük. Hangsúlyozom, hogy elsősorban azokra a mutánsokra koncentráltunk, amelyekben a mutáció egy-egy folyamatot nagyon specifikusan befolyásolt. A mutációkat olyan motor doménekben fejeztük ki, amelyek régió specifikus szignálokat tartalmaztak (lásd fentebb). Ezeknek a konstrukcióknak a segítségével a mutációk hatását több funkcionális régióban és többféle reakciólépésre vonatkozólag közvetlenül is tanulmányozni tudtuk.

2.4 A legfontosabb tudományos eredményeink és interpretációik a miozin hatásmechanizmusának vizsgálatában

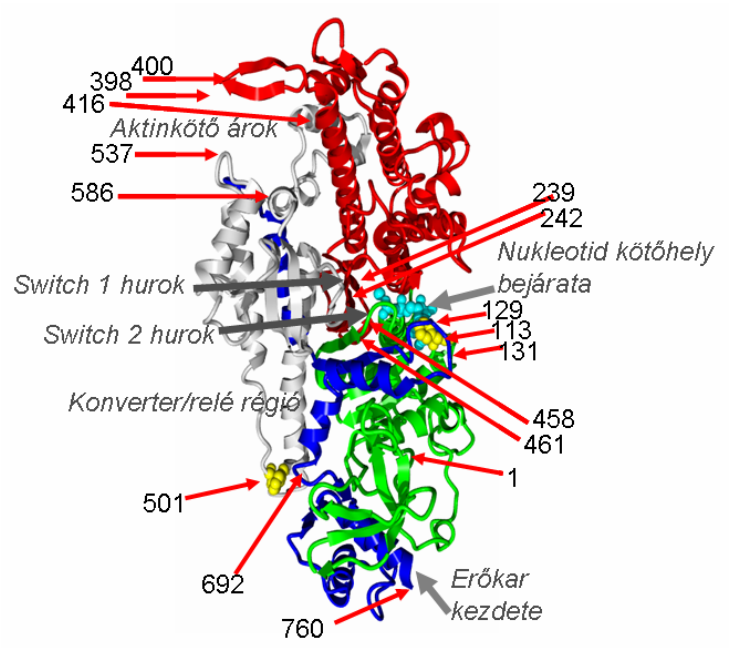
Az alábbiakban a 2.2 fejezetben vázolt tudományos kérdések tematikus sorrendjében kifejtem a legfontosabb tudományos eredményeinket, valamint azok interpretációit. Vagyis tulajdonképp elkezdjük az időbeli utazást. Az Olvasó azonban talán már észre is vette, hogy ez nemcsak egy időutazás, hanem a kérdéseket olyan sorrendben szerkesztettem (és időben is nagyjából így következtek), hogy ez egy utazás magában a motor doménben is. Végigjárjuk az egyes vidékeket, és megnézzük, hogy ezekben a régiókban mik történnek, és hogyan is működnek ezek a szerkezeti/funkcionális régiók.



6. ábra A miozin motor domén főbb funkcionális régiói. A nagy nyilak sorrendjében tárgyaljuk az egyes régiókat. Az utazást a nukleotidkötő régió bejáratánál kezdjük, és az erőkarnál fejezzük be.

Ahogy a 6. és a 7. ábrán összefoglaltam, először a nukleotid régió bejáratát látogatjuk meg, utána az aktinkötő régiót tanulmányozzuk.

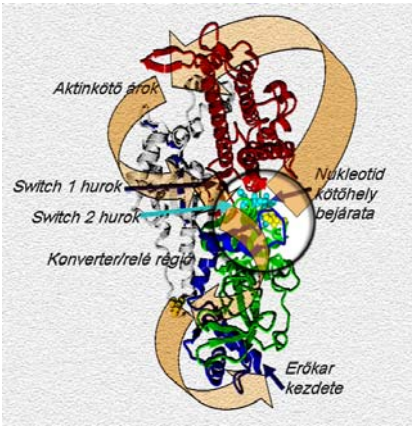
Ezekután a nukleotidkötő zseb belsejében történő eseményeket vizsgáljuk, amely régió a nukleotid és az aktinkötő régió között helyezkedik el. Ezután áttérünk a nukleotidkötő zseb másik oldalára, amely összeköttetést biztosít a relé és a konverter régió felé, amelyek az erőkart mozgatják.



7.ábra A miozin szerkezetében azokat az aminosav pozíciókat jelöltem meg, amelyek helyére konformációérzékeny riporter csoportokat (fluoreszcens szenzorokat) helyeztem.

Az utazás második felében azokat a folyamatokat mutatom be, amelyek a fenti régiók működéseit kötik össze. A régiók harmonizált mozgásai révén valósulhat meg az effektív munkaütem.

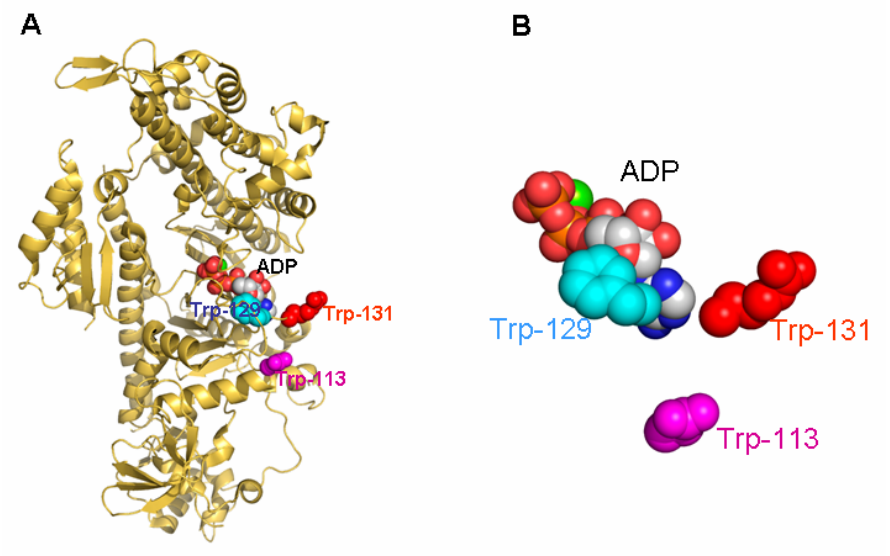
2.4.1 Első állomás: A nukleotid kötés mechanizmusa



Hogyan magyarázható szerkezetileg a nukleotid kötés kinetikája? Milyen szerkezeti változások jönnek létre a nukleotid kötéskor, és milyen a változások időbelisége? Ez a kérdés különösen fontos a Lymn-Taylor modell fényében, mert a nukleotid kötés szorosan kapcsolt az aktin disszociációval.

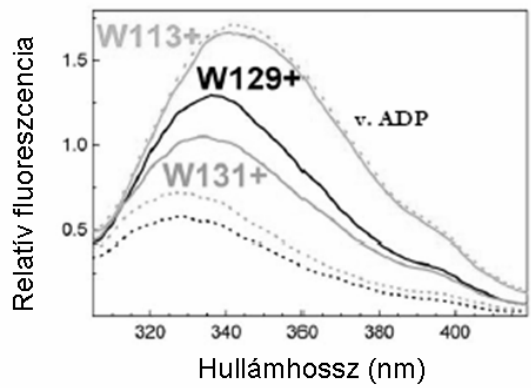
A *Dictyostelium* miozin II motor domén triptofán mentes változatában a nukleotidkötő régió közvetlen közelébe, annak „bejáratához" egyedi triptofánokat helyeztünk a 113., a 131. és a 129. pozíciókba helyspecifikus mutációs technikákkal (*37;38*) (8. és 9. ábrák). Mindhárom mutáns konstrukció enzimkinetikai viselkedése és aktinnal való reakciója megegyezett a vad típusú enzimével.

A W129+ és a W131+ konstrukciók fluoreszcenciája 30-50%-kal csökkent nukleotid (ATP, ADP.Pi és ATP analógok valamint ADP) kötésekor (9. ábra). A fluoreszcencia intenzitásban nem mutatkozott különbség attól függően, hogy milyen nukleotid volt a kötőzsebben. Pirofoszfát kötésre ugyanakkor a Trp-129 60% emisszió növekedést, és jelentős vörös eltolódást mutatott.



8. ábra **A)** A miozin kötőhely köré tervezett triptofán oldalláncok elhelyezkedése a motor doménben és a nukleotid körül. Jól látható, hogy mindhárom oldallánc az adenozin csoport körül, a kötőhely bejáratánál található. **B)** A 113., 129. és 131. aminosavak elhelyezkedése a nukleotid körül. Jól látható, hogy a 129. és a 131. aminosav az adenin csoport közvetlen közelében található.

Kimutattuk, hogy az ATP hidrolíziskor történő konformáció változásra (3. lépés a Bagshaw-Trentham sémában) ezek a triptofánok nem reagálnak (*39*). Tehát a ligandum kötésen túl a konstrukciók fluoreszcenciája érzéketlen az ATPáz ciklus további lépéseire. Ez egyrészt fontos információ a tranziens kinetikai eredmények kiértékelésekor, másrészt szerencsés abból a szempontból, hogy az intenzitás változásokat kizárólag a nukleotid kötéssel összefüggő eseményekkel kell csak összefüggésbe hoznunk.

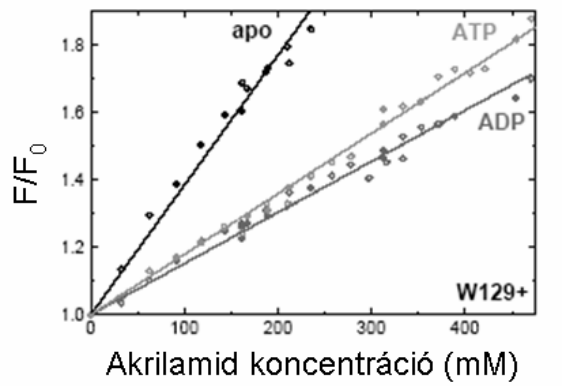


9. ábra. A W129+, a W113+ és a W131+ konstrukciók fluoreszcencia emissziós spektrumai. A gerjesztés 295 nm-en történt. A folyamatos vonallal az egyes konstrukciók nukleotidmentes (apo), a szaggatott vonallal a nukleotiddal komplexált (1mM ADP) emissziós spektrumait jelöltem.

A nukleotid zseb környékén elhelyezett triptofánok fluoreszcencia tulajdonságait oldószer kioltás, életidő és anizotrópia lecsengés módszerekkel is vizsgáltuk.

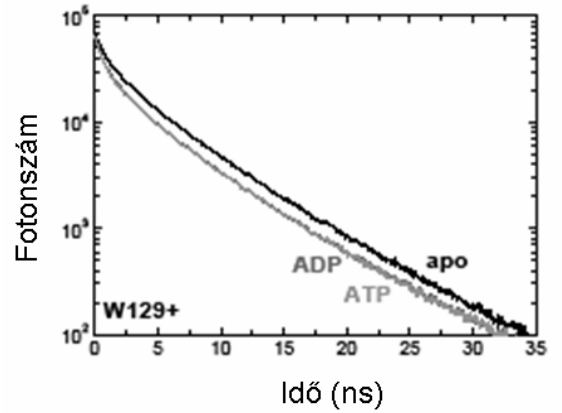
2.4.1.1 A W129+ fluoreszcencia tulajdonságai

Fluoreszcencia kioltás kísérlettel kimutattuk, hogy a Trp-129 oldószer kitettsége jelentősen lecsökkent nukleotid hozzáadására (10. ábra). Ez részben meglepő annak fényében, hogy az emisszió csökken, és ez indikációja lehetne annak, hogy a nukleotid kötéskor a triptofán jobban a felszínre kerül. Másik oldalról a jelentős kék eltolódás a környezeti hidrofóbicitás növekedését jelzi. Összefoglalva, a triptofánok fluoreszcencia változása valószínűleg az adenin csoport kioltó hatásának tulajdonítható.



10. ábra. Fluoreszcencia kioltás kísérlet akrilamiddal a W129+ motor doménben. 10 μM W129+-et titráltunk növekvő koncentrációjú akrilamiddal nukleotid távollétében, 1mM ADP-ben és 3mM ATP-ben. Az adatokat Stern-Volmer grafikonon ábrázoltam. A mérési pontokra a Stern-Volmer összefüggést illesztettem: $F_o/F = 1+K_{SV}$[akrilamid] ($F_o$és F a kioltószer távollétében, illetve jelenlétében mért fluoreszcencia-intenzitás, K_{SV} pedig a dinamikus kioltási állandó).

Annak érdekében, hogy a későbbi kinetikai vizsgálatokat szerkezeti szinten minél pontosabban vizsgálhassuk, a nukleotid kötésre bekövetkező nagy fluoreszcencia változás mechanizmusát tanulmányoztuk a Trp-129-n (*40*). A 11. ábrán bemutatom a Trp-129 fluoreszcencia életidő változását nukleotid kötés hatására.



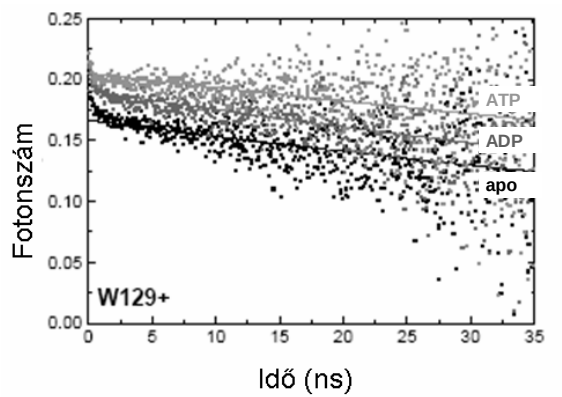
11. ábra. A W129+ fluoreszcencia lecsengési görbéi apo, ATP és ADP állapotokban. A fluoreszcencia lecsengési görbékre kettős exponenciálist illesztettünk, amelyek paraméterei megtalálhatók a függelékben. Az ATP és ADP jelenlétében végzett mérésekben a görbék lefutása gyakorlatilag megegyező.

Látható, hogy ADP és ATP kötött állapotokban nincs eltérés a fluoreszcencia lecsengésben, viszont apo állapotban hosszabb életidő tapasztalható. Kettős exponenciálisokat illesztve a lecsengési mérési görbékre mindhárom esetben 1 és 5 ns körüli életidőket kapunk, ugyanakkor a komponensek arányában lényeges különbséget tapasztalunk (lásd függelék). Apo állapotban a gyors és a lassú fázisok amplitúdóinak relatív aránya 47% , illetve 53%, míg nukleotid kötött állapotban 57% , illetve 43%. Ezeknek az eredményeknek a jellege alátámasztja a nukleotid kötésre létrejövő *steady state* fluoreszcencia intenzitás csökkenést, azonban nem magyarázza meg teljes mértékben, mert a normalizált lecsengési görbék alatti terület nukleotid kötés hatására nem csökken olyan mértékben, mint amilyen mértékben a *steady state* intenzitás. Ebből arra lehet következtetni, hogy mindkét esetben lényeges statikus kioltás is történik, és a statikus komponens arány is jelentősen változik nukleotid kötéskor.

Összességében megállapíthatjuk, hogy a Trp-129 fluoreszcencia intenzitását jelentősen meghatározza az a populáció, amelynek fluoreszcenciája statikusan kioltott. Ez a komponens egyensúlyban van a másik két életidő komponens populációval. Nukleotid kötéskor a fluoreszcencia intenzitás csökkenést nagyrészben a statikusan kioltott populáció részarányának növekedése okozza. A populációk közötti egyensúlyok átalakulási időállandója a fluoreszcencia életidő (5 ns) és a nukleotid kötésre bekövetkező konformációs átalakulás időállandója közé esik (1 ms). Ezek a mérések azt mutatják, hogy apo és nukleotid kötött állapotokhoz nem rendelhetők egyetlen, az oldalláncok körüli konformációk. Ennek a ténynek a dolgozat későbbi, molekuladinamikával foglalkozó részében (lásd 2.5.fejezet) különösen nagy jelentősége lesz.

Kíváncsiak voltunk továbbá, hogy milyen mobilitásúak a nukleotidkötő zsebnél elhelyezett triptofánok. *Steady state* anizotrópiája mind a W129+ mind a W131+ konstrukcióknak viszonylag magas volt (r_{W129+}=0,21, r_{W131+}=0,20), amely értékek nem változtak jelentősen nukleotid hozzáadására. Szintén csak kis változást tapasztaltunk, ha a mérést nagy viszkozitású oldatban, 90% glicerinben végeztük (r=0,23), ugyanakkor az anizotrópia r = 0,1 értékre esett, amikor a fehérjét 6M guanidium hidrokloridban denaturáltuk. Anizotrópia lecsengés kísérletek azt mutatták, hogy a lecsengés jól közelíthető egyetlen exponenciális illesztésével, és a lecsengés időállandója nem változik ligandumok kötésére. ($\varphi_{W129+,\ apo}$= 120 ± 9 ns, $\varphi_{W129+,\ ADP}$= 118 ± 18 ns) (12. ábra). Megjegyzem, hogy az aniztrópia lecsengés időállandója sokkal magasabb, mint a fluoreszcencia életidő, ezért csak 35 ns-nál rövidebb életidejű fotonokat tudtunk kiértékelni. Ez a tény megnöveli a kiértékelés bizonytalanságát. Az

anizotrópia lecsengés értéke egybeesik azzal az értékkel, ami abban az esetben áll fenn, ha a fluorofór egy olyan méretű forgási ellipszoidra immobilizálnánk mint a motor domén, és az emissziós dipólus az ellipszoid hosszabb tengelyével párhuzamos. Méréseinkből arra a következtetésre jutottunk, hogy a fluorofórok minden enzimatikus állapotban meglehetősen immobilisak a motor felszínén.



12. ábra. A W129+ fluoreszcencia anizotrópia lecsengése. A görbékre zéró értékhez tartó exponenciálisokat illesztettünk. A lecsengési időket lásd a függelékben.

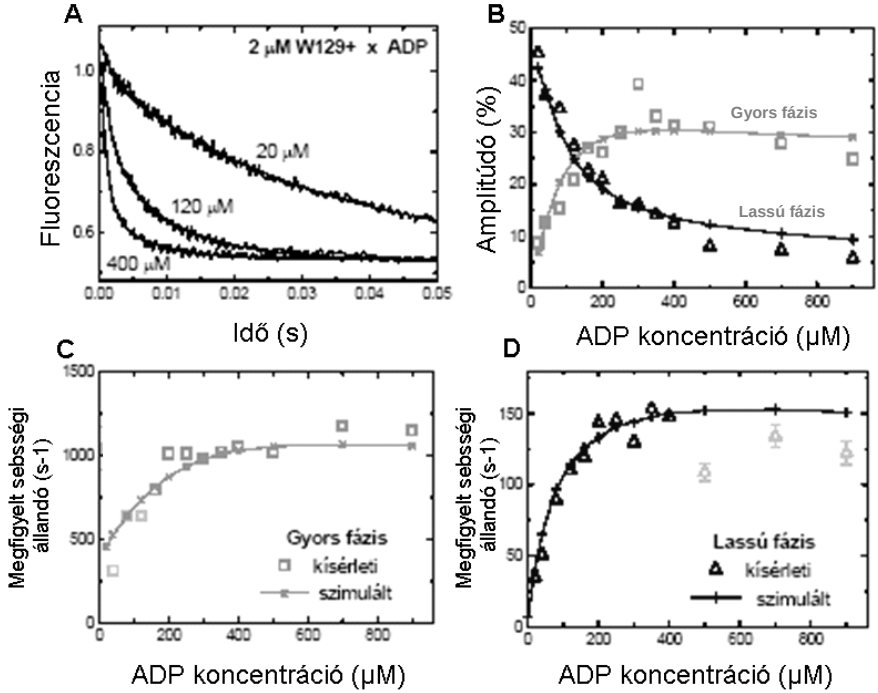
2.4.1.2 A nukleotidkötés kinetikája

Miután jellemeztük a nukleotid zseb bejáratához elhelyezett triptofánok fluoreszcenciáját különböző állapotokban, és megállapítottuk, hogy ezek a jelek kizárólag a ligandumkötésre érzékenyek, tranziens kinetikai mérésekkel megvizsgáltuk a ligandumkötés mechanizmusát.

A Bagshaw-Trentham séma alapján a nukleotid kötés a miozin és az aktomiozin hatásmechanizmusában nagy jelentőségű, mert míg az ATP igen nagy affinitással kötődik ($K_d \approx 10$ nM), addig a termékek csak gyengén (K_d ADP $\approx$ 0.1-1 μM, K_d $P_i \approx$ 10-100 mM). Ha figyelembe vesszük, hogy a hidrolízis lépés reverzibilis (*41;42*), akkor jól láthatjuk, hogy a szabadenergia nem a hidrolízis lépésből származik, amelyet a munkaütem felhasználhat, hanem az enzimatikus ciklust nagyrészt a nukleotid kötés és felszabadulás hajtja. Tehát igen fontos megvizsgálni, hogy ezek a kruciális lépések hogyan zajlódnak le. Ennek érdekében azt vizsgáltuk, hogy a nukleotid kötésre, a nukleotidkötő zseb bejáratánál elhelyezkedő triptofánok fluoreszcenciája, mint a kötődés szenzorai hogyan változnak időben.

Mivel a legnagyobb fluoreszcencia változást a W129+ mutatott, ezért ezt a konstrukciót vizsgáltuk legbehatóbban. Összehasonlító vizsgálataink azonban azt mutatták, hogy a nukleotidkötő zseb bejáratának másik oldalán elhelyezkedő Trp-131 gyakorlatilag ugyanúgy viselkedett, tehát az alább bemutatott jelenségek nem lokális jelenségek, hanem a kötőzseb bejáratánál történő események egészét jellemzik.

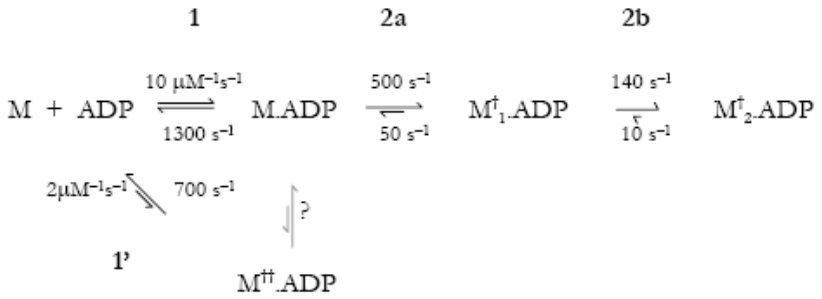
Pszeudoelsőrendű körülmények között 20 º C-on és 5 º C-on ADP-t, illetve ATP-t kevertünk a W129+ konstrukcióhoz *stopped flow* készülékben (13. ábra).



13. ábra. 2 μM W129+-t kevertünk különböző koncentrációjú ADP oldattal *stopped flow*-ban, majd követtük a fluoreszcencia változást (gerjesztési hullámhossz 295 nm, emissziós filter: GB320nm és UG11 kombinációja). A mért fluoreszcencia változás görbékre (**A**) kettős exponenciálisokat illesztettünk. A lassú és a gyors fázisok amplitúdóinak arányát a **B** ábrán ábrázoltam. A két fázis megfigyelt sebességi konstansait az ADP koncentráció függvényében a **C** és a **D** ábrán mutatom be. A **B, C** és **D** ábrákon a 2. séma alapján numerikus szimulációban kapott értékeket is feltüntettem. A **D** ábrán a szürkével jelzett mérési pontok értéke az alacsony amplitudó miatt bizonytalan.

Mivel a készülék holtideje kb. 1,1 ms volt, ezért körülbelül 1000 s^{-1} reakció sebességi tartományig biztonsággal tudtuk meghatározni a megfigyelt sebességi állandókat. Méréseinkben egyértelműen két jól elkülönülő kötési fázist tudtunk megfigyelni. A lassú fázis sebességi állandója az ADP koncentráció növekedésével 150 s^{-1}-nél míg a gyors fázis 1000 s^{-1}-nál telítődött. Mindkét fázis amplitúdója változott a hozzáadott ligandum koncentrációjának függvényében.

Végülis igen komplex kép rajzolódott ki. Jelen dolgozatban nem szeretném az Olvasó türelmét próbára tenni azzal, hogy részleteiben elmagyarázzam, a mechanizmus megfejtése hogyan is történt. Mindezt részletesen több publikációban is leírtuk (*6;27;37*). Annyit jegyzek meg, hogy érzékeltessem a kiértékelés nehézségeit, hogy hárman, Prof. Clive Bagshaw, Kovács Mihály, aki akkor PhD hallgatóm volt, azóta nagyon sikeres saját laboratóriuma van, valamint jómagam külön-külön több mint egy hónapot dolgoztunk kizárólag ezen az elméleti kérdésen reggeltől késő éjjelig. Két-három naponta egyeztettünk, majd kisebb csetepaték után újra nem szóltunk egymáshoz, és csak ezen munkálkodtunk. Végül konszenzusra jutottunk, és létrehoztunk egy minimál kötési sémát (2. séma). Ez a minimál séma véleményünk szerint az a séma, ami még viszonylag egyszerű és felhasználásával végzett szimulációban jól tudjuk közelíteni a mért adatokat (13. ábra).



2. séma A nukleotid kötés párhuzamos útvonalakon, több lépésen keresztül történik.

Amit egyértelműen megállapíthatunk, hogy soklépéses reakcióról van szó, és mindenképpen feltételezni kell párhuzamos reakcióut(ak)at, vagyis a nukleotid kötés egy bonyolult, többlépéses folyamat. A kísérleti eredményeket kielégítő módon egy legalább háromlépéses modellel tudjuk

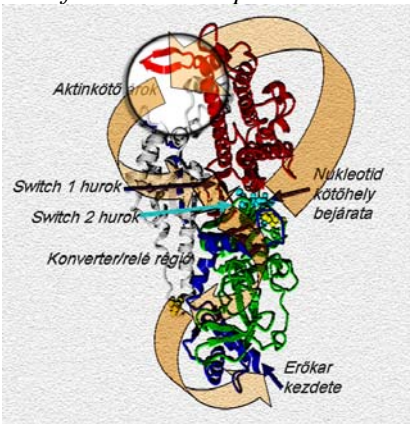
leírni. Ebben a modellben fel kellett tételeznünk egy nem szekvenciális (elágazó) kinetikai lépést is, melynek révén egy – az ATPáz ciklus szempontjából – nem produktív enzimatikus állapot jön létre. Ezeket a változásokat mindhárom konstrukció mutatta, amelyből arra következtetünk, hogy a modellben leírt lépések nem lokális változások, hanem a nukleotid kötésre általánosan jellemzőek. Megállapítottuk, hogy az ATP és az ADP kötés mechanizmusa nagyon hasonló azzal a különbséggel, hogy előbbi valamivel gyorsabban történik.

Kinetikai modellünkent úgy magyaráztuk, hogy a nukleotid és az enzim találkozásakor számos nem-effektív ütközés is történik. Ezek az ütközések vagy megszűnnek, vagy a nukleotid a megfelelő pozícióba befordul, ezáltal a szubsztrát megtalálja a neki megfelelő erős kötéshez szükséges helyet a kötőzsebben. Ezt a reorientációt egy energiatölcsér irányítja. A kötőzsebben elhelyezkedő szubsztrát ezután konformációs átalakulást indukál (*induced fit*).

A nukleotid kötés ezen modelljét általánosan is ki lehet terjeszteni más enzim-szubsztrát komplex képződésekre is. A szubsztrát reorientációs modellünk azért lehet fontos, mert tudomásunk szerint mi mutattuk ki először ezt a jelenséget kísérletileg. Ugyanakkor jelentősége abban rejlik, hogy egy enzim-ligandum kölcsönhatás erősségét nemcsak úgy lehet tervezni, ha csupán a ligandum elhelyezkedését vizsgáljuk a kötőzsebben, hanem azokat a lehetséges útvonalakat is, amelyeken keresztül a szubsztrát az enzim felszínén a kötőzsebbe érkezik. Ezek a másodlagos kötőfelszínek bár lényegesen gyengébb kötések egyenként, mint a ligandum elsődleges kötése, azonban A) összességükben már jelentős kötőerőt képviselhetnek B) a kötés kialakulásának valószínűségét növelik, ezért, ha ezeknek az útvonalaknak a valószínűségét növeljük, akkor a ligandum kötési állandóját (a látszólagos másodrendű sebességi állandón keresztül) is növeljük.

Miután elemeztük a szubsztrát kötés mechanizmusát, vizsgáljuk meg a miozin másik kötőpartnerének, az aktin kötődésének mechanizmusát.

2.4.2 Második állomás: Az aktinkötő régió konformációs állapotai



A Lymn-Taylor modell igen lényeges kérdést feszeget az aktin kötéssel kapcsolatban. A miozinnak két állapota van az aktin kötés szempontjából: az erősen kötődő apo és ADP forma, valamint a gyengén kötődő ATP és ADP.P_i forma. Milyen szerkezeti különbség van a két állapot között, milyen jellemzői vannak a két állapot közötti átmenetnek, és ez az átmenet hogyan kapcsolódik az aktin kötés folyamatához?

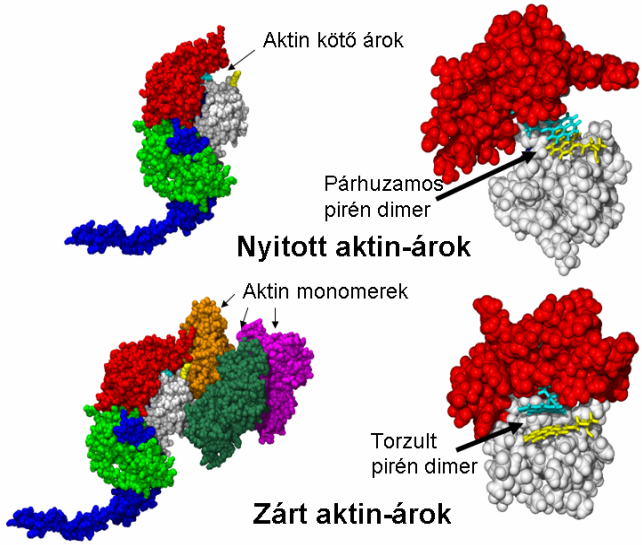
Mind az aktin, mind a miozin atomi szerkezete tizenöt éve ismert, azonban komplexben nem sikerült kristályosítani a két fehérjét. Mivel az aktin és a miozin komplexének erőssége függ a miozinhoz kötött nukleotid jelenlététől, illetve minőségétől, ezért joggal feltételezték, hogy a miozin aktinkötő régiójának szerkezete aktin kötött állapotban más, mint szabadon (*8;9*).

Komputeres szimulációk arra utaltak, hogy az aktin kötés erősebb lehet, ha az aktinkötő árkot bezárják, viszont a nukleotidkötő régió változására nem tudtak hipotézist állítani (*9;43;44*). Igazi áttörést a 2003-as év hozott (lásd Nat. Struct. Biol News and View: (*45*)). Egyidőben négy cikk jelent meg a Nature és a Nature Structural Biology folyóiratokban ennek a kérdésnek a tisztázására. Két röntgenszerkezeti cikk arról számolt be (*26;46*), hogy sikerült kristályosítani a miozint nukleotidmentes állapotban Azt találták, hogy az aktinkötő árok némileg zártabb állapotban van, mint azok a szerkezetek, amelyekben van nukleotid. Némi

ellentmondást sugall az a tény, hogy ADP állapotban is erős az aktin kötés, azonban a miozin-ADP szerkezete egyértelműen nyitott aktin árkot mutat a korábbi atomi szerkezetben (*19*). Ez a látszólagos ellentmondás itt jelentkezett először. ***Ez a probléma ennek a dolgozatnak a további részeiben is még néhányszor utunkba kerül. Az ellentmondás részleges feloldásáról a következő fejezetben (2.4.3. fejezet) lesz szó, míg a 2.4.6. fejezetben azt tárgyalom, hogy ez az „ellentmondás" meglepő, de fundamentális az erőgenerálás mechanizmusában, és hogyan sikerült feloldanunk azt az utóbbi egy évben.***

A harmadik cikkben egy igen nagy felbontású krio-elektronmikroszkópos képet közöltek az aktomiozin komplexről (*47*). Ez a kép azt sugallta, hogy az aktinkötő árok zárt állapotban van az aktomiozin komplexben.

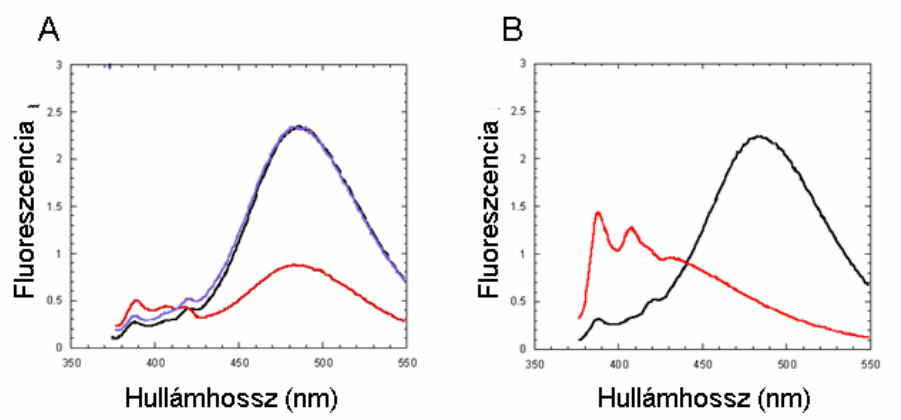
A negyedik cikkben oldatban vizsgáltuk az aktinkötő árok mozgását (*34*). Cisztein irtott miozin motor doménben az aktinkötő árok mindkét oldalára egy-egy ciszteint mutáltunk (S416C/N537C mutációk, a konstrukció neve: MD416-537C). A ciszteineket jódacetamido-pirénnel jelöltük, ezáltal az aktinkötő árok mindkét oldalán volt egy-egy kovalensen kötött pirén, amelyek előfeltételezéseink szerint dimerizáltak (14. ábra).



14. ábra A miozin fej (könnyű láncok nélkül) számítógépes modelljei a kristályszerkezetek alapján aktin kötött állapotban és aktin nélkül. A jobb oldali ábrákon az aktinkötő árok részletet kinagyítottam, amelyen. számítógépes szimulációval a 416. és az 537. pozícióra adduktált pirén molekulák láthatók.

A pirén dimerek egy különleges fluoreszcencia tulajdonsággal rendelkeznek. Ha két pirén gyűrű egymáshoz képest megfelelő parallel orientációban helyezkedik el egymással, akkor ún. excimer (excited dimer) fluoreszcencia emisszió jön létre (*48-50*). Az excimer emisszió hullámhossza a vörös tartomány felé van eltolódva a monomer emisszió hullámhosszához képest, egymástól jól megkülönböztethetőek.

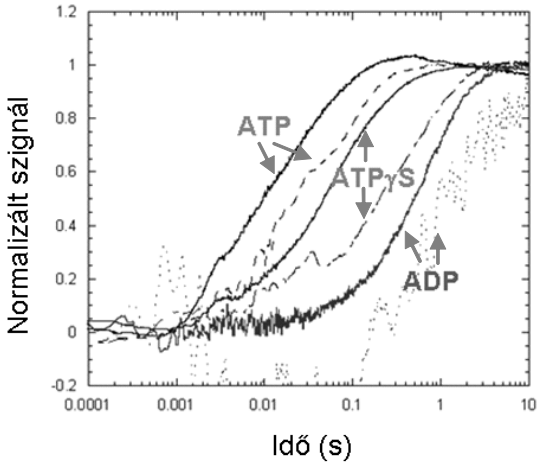
Ugyanakkor az excimer fluoreszcencia emisszió intenzitása nagyon érzékeny a pirén dimerek konformációjára, kis elmozdulás is nagy intenzitásváltozást hoz létre (15. A és B ábra). Továbbá kimutattuk a hullámhossz függvényében végzett fluoreszcencia lecsengés méréssel, hogy a piréndimer formáció viszonylag stabil, és a monomer-excimer egyensúly idő állandója az excimer fluoreszcencia életidejénél (40 ns) lényegesen nagyobb.



15. ábra **A.** A pirénnel jelölt MD416-537C excimer fluoreszcenciája (fekete vonal) és annak változása nukleotid kötésre (1 mM ATP) és aktin hozzáadására (+ aktin) (gerjesztés 350 nm-en). **B.** Az excimer csúcs (natív) eltűnése a fehérje denaturálásának (6 M urea) hatására (denaturált).

Ezt a jelenséget használtuk ki kísérleteinkben is. Apo állapotban a miozin aktinkötő árok két oldalán elhelyezkedő pirének excimer fluoreszcenciája óriási volt (a teljes emisszió 96%-a, ami tudomásunk szerint az eddig publikált legnagyobb arányú excimer fluoreszcencia). Ez azt mutatta, hogy a pirének az aktin árokban „tökéletes” dimert alakítottak ki (14. ábra). Ha ehhez a motor doménhez aktint adtunk, akkor az excimer fluoreszcencia az eredeti 40%-ára esett. Ezt a fluoreszcencia esést a

hozzáadott ATP az eredeti szintre emeli. Ha az ATP-t az aktin nélküli miozinhoz adjuk, akkor az excimer fluoreszcencia 10-15%-kal nő. *Stopped flow* adataink szerint ATP indukált aktin disszociációkor a pirén excimer fluoreszcencia két fázisban változik, valamint a fluoreszcencia változás mindig megelőzi az aktin disszociációját reprezentáló fényszórás változást (16. ábra).



16. ábra. A jódacetamiddal jeölt MD415-537C konstrukció aktinnal komplexált formájának pirén excimer fluoreszcencia változása (folyamatos vonal) és a fényszórás változása (szaggatott vonal) ATP, ATPγS és ADP hozzáadására *stopped flow*ban (gerjesztés: 350 nm-en, emissziós filter: GB 450 nm). A pirén excimer fluoreszcencia az aktinkötő árok szétnyílását, a fényszórás változás az aktomiozin disszociációját követi. A fényszórás változás disszociációkor csökkenést mutat, az ábrán az összehasonlíthatóság kedvéért a görbéket átfordítottam (mínusz egyszeresét ábrázoltam) és az összes görbét egymáshoz normalizáltam. Az ábrán jól látható, hogy az árok

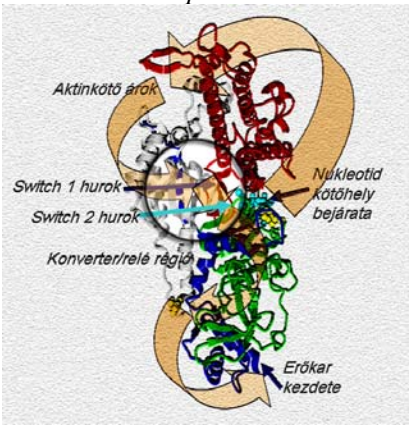
Ezekben a funkcionális kísérletekben közvetlenül bizonyítottuk, hogy A) az aktinkötő árok konformációja megváltozik aktin kötéskor, B) az ATP indukált aktin disszociáció legalább két lépésben történik. Valószínűleg az első lépésben részleges aktin árok nyitódás iniciálja az aktin leválását. Miután levált az aktin, az aktinkötő árok további nyitódása következik be. C) Az ATP némileg (tovább?) nyitja az aktin árkot az apo miozinban.

Összefoglalva, ez a négy, egyszerre megjelenő publikáció jelentős mérföldkő volt az aktomiozin működési mechanizmusának feltárásában,

mert közvetlenül kimutatták, hogy milyen szerkezeti változások jönnek létre aktin kötéskor, illetve ezeket a változásokat a különböző nukleotidok hogyan befolyásolják.

Mindazonáltal továbbra sem kaptunk választ arra, hogy a nukleotid kötés és az aktin kötés milyen folyamatok és szerkezeti változások révén kapcsolódik össze. Miután részletesen leírtuk a nukleotidok kötésének mechanizmusát, illetve az aktinkötő régióban történő változásokat, elérkezett az idő arra, hogy kísérletet tegyünk a két jelenség közötti összefüggések feltárására.

2.4.3Harmadik állomás: A nukleotid- és az aktinkötés kapcsolata



A nukleotidkötő és az aktinkötő régió szerkezetileg elkülönül, ezért a kérdés adódik: Hogyan jut el az információ az egyik helyről a másikra, illetve mi az információáramlás mechanizmusa.

ATP hozzáadására az aktomiozin disszociál. Ennek révén az oldat viszkozitása jelentősen csökken. Miután az összes ATP elhidrolizált, ADP állapotban újra kialakul az aktin és a miozin erős komplexe. Ezt a jelenséget Szent-Györgyi Albert és Banga Ilona Szegeden a negyvenes évek elején egy szerencsés véletlennek köszönhetően fedezték fel. Ez az alapkísérlet vezetett ahhoz a felfedezéshez, hogy a Khüne által kivont és elnevezett fehérjekivonat, a miozin (1859) nem egyetlen fehérjéből áll, hanem két fehérje, az aktin és a (mai értelemben vett) miozin komplexe.

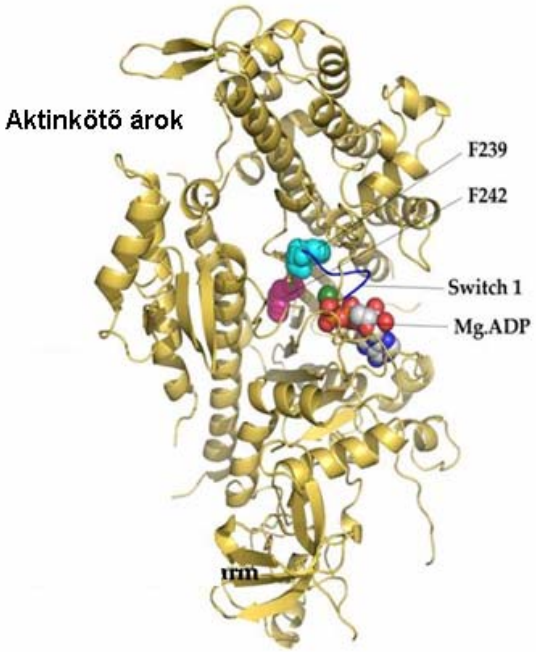
Mindazonáltal már a hetvenes évek elején világossá vált, hogy a nukleotidkötő hely és az aktinkötő régió szerkezetileg elkülönül. Tehát az ATP kötés információjának valamilyen módon el kell jutnia az aktinkötő régióba, ahol olyan konformáció alakul ki, amely gyengíti az aktin kötést.

A G-proteinek *switch 1* régiójának konformációs átalakulásának analógiájára feltételezték, hogy nukleotid (ATP) kötésre a *switch 1* záródása változást indukálhat az aktinkötő régióban, ami gyengíti a partner molekula (aktin) kötését (*51*). Oldatban a miozin nukleotid analógokkal és ATP-vel kötött komplexei az aktinnal gyenge kötést alakítanak ki, míg ADP jelenlétében erős aktin kötés alakul ki. Ugyanakkor 2003-ig, annak ellenére, hogy számos atomi szerkezetet határoztak meg, a *switch 1* régióban (a nukleotidkötő zseb felső, az aktinkötő régióhoz közelebbi része) és az 50 kDa régióban (ahol az aktinkötő régió is van) semmilyen

szerkezeti különbséget nem sikerült felfedezni: a *switch 1* zárt konformációjú, az aktinkötő árok pedig nyitott volt. 2003-ban publikáltak olyan *Dictyostelium* motor domén atomi szerkezetet, amely nem tartalmazott nukleotidot (*26*), illetve miozin V-öt nukleotid-mentes (*52*), és egy évvel később ADP állapotban (*23*). Ezekben már az látszik, hogy a *switch 1* részben vagy egészben nyitott állapotban van, míg az aktinkötő árok részben vagy teljesen bezáródott.

Mindazonáltal továbbra is kérdés maradt, hogy a *switch 1* kinyílása és az aktinkötő árok záródása hogyan függ össze, mi lehet az oka, hogy két különböző állapotban sikerült kristályosítani a miozin ADP komplexét, ha ebben az állapotban a miozin erősen köti az aktint.

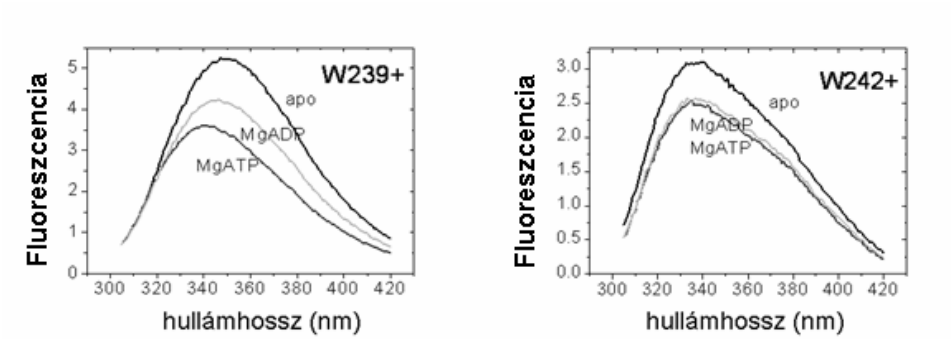
Két olyan egy triptofános miozin motor domén konstrukciót készítettünk, amelyekben a *switch 1* két különböző részére triptofánt mutáltunk (F239W és F242W mutációk, a konstrukciók neve továbbiakban W239+ és W242+) (17. ábra) (*10*).



17. ábra A F239 és a F242 aminosavak elhelyezkedése a miozin motor doménben

2.4.3.1 A W239+ és a W242+ fluoreszcencia változása nukleotidok hatására

Azt vártuk, hogy a *switch 1* esetleges konformációs átalakulását követni tudjuk ezeknek a triptofánoknak a fluoreszcencia intenzitás változásán keresztül. Szerencsénkre mindkét konstrukció esetében nagy fluoreszcencia változás történt ATP és ADP hozzáadására. A W239+ esetében ATP-re 40%, ADP-re 20% csökkenést, W242+ esetében mindkét nukleotidra 30% csökkenést tapasztaltunk (18. ábra). Fontos megjegyezni, hogy W239+ esetében minden esetben az ATP hatására történő változással azonos mértékű fluoreszcencia változást mértünk, ha olyan szubsztrát analógot adtunk a rendszerhez, amely a miozin γ-foszfát kötőhelyét is elfoglalja (AMPPNP, ATPγS, $ADPAlF_4$, $ADPBeF_x$, $ADPVO_4$) (*53*). Ezek a fluoreszcencia változások olyan mértékűek, hogy ezek a W239+ és a W242+ konstrukciók érzékeny kísérleti rendszert szolgáltatnak a *switch 1* konformációs átalakulásának szubmilliszekundumos követésére.



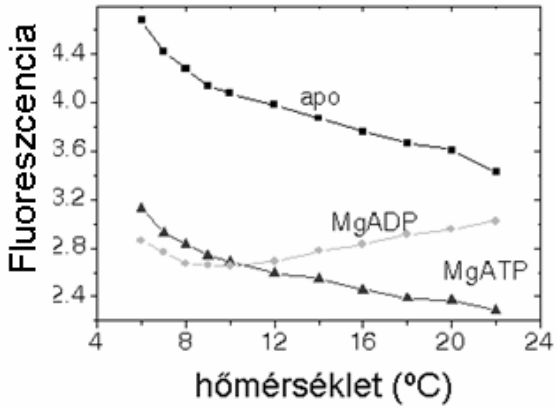
18. ábr18. ábra A W239+ és a W242+ egy triptofánnal rendelkező motor domén konstrukciók fluoreszcencia emissziós spektrumai nukleotid távollétében, illetve 1 mM MgADP és 1 mM MgATP jelenlétében (gerjesztési hullámhossz 295nm).

A W239+ konstrukció kinetikai paramétereiben hasonlóan működik a vad típusúhoz képest, míg a W242+ ATPáz aktivitása jelentősen lecsökkent. Továbbá a fluoreszcencia intenzitás különbség révén a W239+ sokkal jobban megkülönbözteti a különböző nukleotid állapotokat, mint a W242+. Éppen ezért a további kísérletekben előnyben részesítettük a W239+ konstrukciót. Mindazonáltal a W242+ konstrukció azért fontos számunkra, mert azt mutatja, hogy a nukleotid kötés nem lokális, egy aminosav oldalláncra szűkített változást okoz, hanem a változás

kiterjedtebben is érzékelhető a *switch 1* hurokban. Ebből arra a következtetésre jutottunk, hogy ezeknek a triptofánoknak a fluoreszcencia intenzitásai a *switch 1* hurok konformációs állapotait tükrözik. A továbbiakban bemutatott kísérletek a W239+-en történtek.

2.4.3.2 A *switch 1* régió konformációs egyensúlyai

Már a fluoreszcencia intenzitás hőmérsékletfüggése is jelezte (19. ábra), hogy míg apo állapotban, és azokban az állapotokban, amikor a nukleotid kötéskor a γ-foszfát pozíció is betöltött (foszfáttal vagy analóg fémion komplexszel), akkor a *switch 1* hurok egyetlen állapotban van, ezzel szemben ADP jelenlétében legalább két állapot van jelen, amelyek egymással dinamikus egyensúlyban vannak.

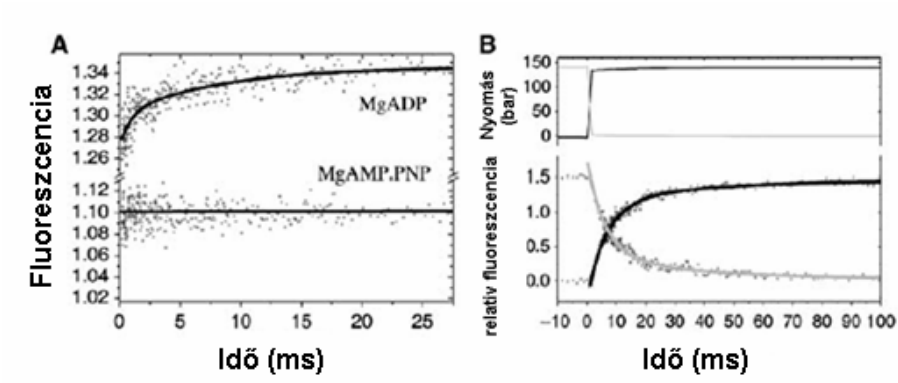


19. ábra A W239+ fluoreszcencia emissziójának hőmérsékletfüggése (gerjesztési hullámhossz 295nm, emissziós hullámhossz 340nm). A fluoreszcencia hőmérsékletfüggése minden esetben azonos volt a MgATP állapotban mérttel, ha olyan nukleotid analógot használtunk, amelyben a miozin γ-foszfát kötőhelye valamilyen foszfát analóg fémkomplexszel betöltött volt. MgATP jelenlétében a motor domén *steady state*-ben van, és a domináns *steady state* populáció a M.ADP.Pi komplex, mert a foszfát felszabadulás a sebességmeghatározó lépés, és a ciklusban ezt megelőző lépések mindegyikének sebességi állandója több mint százszor nagyobb, mint a foszfát felszabadulásé. Az ábrán nem mutatom, de fontos megjegyezni, hogy a NATA (N-acetil-triptofán amid) fluoreszcenciájának hőmérséklet függése megegyezik az apo, illetve a MgATP állapotokéval.

Alacsony hőmérsékleten a MgADP és MgATP-ben mért fluoreszcencia azonossá válik. Ebből arra a következtetésre jutottunk, hogy alacsony

hőmérsékleten MgADP jelenlétében az egyensúly annyira eltolódik az alacsony fluoreszcenciájú állapot felé, hogy az válik dominánssá. Továbbá a kísérlet eredménye arra is utal, hogy az alacsony fluoreszcenciájú MgADP állapot megegyezhet a MgATP állapottal (ez utóbbit más, független kísérlettel bizonyítottuk is).

A motor domén MgADP-vel komplexált formájának két állapotát megerősítettük hőmérsékletugrás (20. A. ábra) és nyomásugrás (20. B. ábra) kísérletekkel is. Az előbbi kísérletben a küvettában lévő fehérjeoldat hőmérsékletét 100 µs alatt kb. 5 ºC-kal emeltük, majd a fluoreszcencia változást detektáltuk. A nyomásugrás kísérletben mintegy 50 µs alatt növeltük, illetve csökkentettük le a nyomást 150 bar-ral. Apo és MgATP, illetve aktin kötött állapotokban nem változott a fluoreszcencia időben, míg MgADP jelenlétében egy egyensúlyi reakcióra utaló változást kaptunk. Ez a kísérlet egyúttal megmutatta a két állapot, egy magas fluoreszcenciájú (*M) és egy alacsony fluoreszcenciájú állapot (†M) közötti[5] egyensúly átalakulási sebességét, ami 100 s^{-1} körül volt.



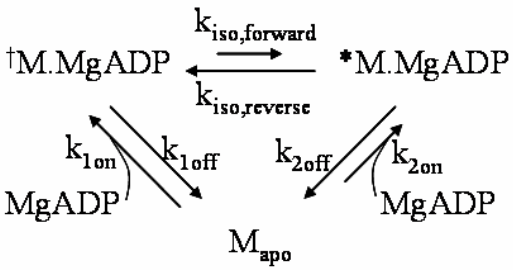
20. ábra. Hőmérséklet- (A) és nyomásugrás kísérletek W239+ konstrukcióval különböző nukleotidok jelenlétében. A). 10 µM W239+ és 1 mM MgADP vagy 300 µM MgAMPPNP jelenlétében 5 ºC hőmérsékletugrás után követtük a fluoreszcencia változást (gerjesztés 295nm-en, emissziós filter GB 320 és UG11 kombináció). B) 10 µM W239+ és 1 mM MgADP oldatban a nyomást hirtelen emeltük (fekete vonal) majd csökkentettük (szürke vonal). Az alsó ábrán a fluoreszcenciaváltozást, a felső ábrán a

[5] Az M elé helyezett *, illetve † a *switch 1* magas és alacsony fluoreszcenciájú állapotait jelzik, míg az M mögé helyezett jelzések a *switch 2* állapotaira utalnak.

2.4.3.3 A *switch 1* konformációváltozásai nukleotidkötéskor

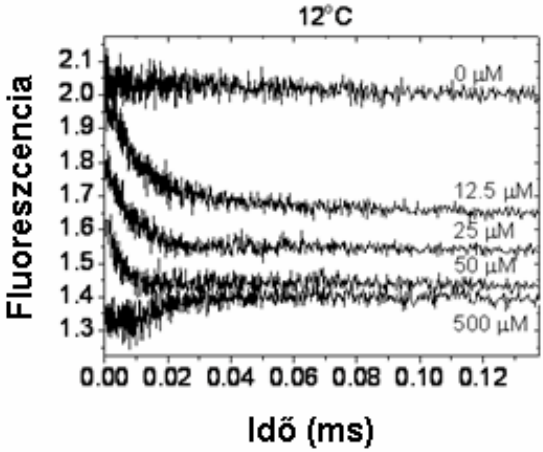
Gyorskinetikai mérésekkel vizsgáltuk, hogy a nukleotid kötés milyen változásokat okoz a *switch 1* régióban, ami önmaga is a nukleotidkötő régió része. Ez azért is volt fontos és érdekes kísérletsorozat, mert korábban már vizsgáltuk a nukleotid kötés mechanizmusát, mint azt fentebb (2.4.1. fejezet) tárgyaltam. Ott a szenzor a nukleotidkötő zseb bejáratánál helyezkedett el, a *switch 1* pedig a zseb legbelső oldala. Ha a két megközelítést egyesítjük, akkor a szubsztrát/ligandum kötés teljes folyamatáról alkothatunk képet. Az a szerencse ért minket, hogy ezt meg is tudtuk tenni. A Trp-129, Trp-113 és Trp-131 szenzorokkal azt láttuk, hogy hogyan közelíti meg a ligandum a zsebet egy bonyolult és gyors mechanizmus révén, míg a Trp-239 révén azt láthatjuk, hogy hogyan foglalja el a helyét a zsebben, amely folyamatok sokkal lassabbak is az előzőeknél. Ráadásul a Trp-239 szenzor által küldött jelek arról is informálnak minket, hogy a nukleotid kötés által kiváltott információk hogyan is terjedhetnek tovább az enzim további funkcionális régiói felé, ezáltal működésbe hozva a rendszert.

Mielőtt ezen legutóbbi kérdést boncolgatnám, térjünk egy pillanatra vissza a ligandum kötés mechanizmusára. Sokrétű gyorskinetikai méréseket végeztünk, hogy a nukleotid kötést jellemezzük a Trp-239 fluoreszcencia változásán keresztül. A mérések részleteibe itt nem bocsátkozom, mert igen hosszúra nyúlna, és elvenné a helyet az utazásaink más, izgalmas (legalábbis számomra izgalmas) részleteitől. Mindazonáltal, akit a mérések részleteiben érdekelnek, megtalálhatja a (*53*) közleményben és annak kiegészítő (Supplementary) tanulmányában. Méréseinkből viszont nagyon érdekes nukleotidkötő mechanizmus bontakozott ki, amelyeket nem lehetett „látni” a Trp-129 szenzor révén. A mechanizmust a 3. séma írja le.



3. séma

A kötőzseb mindkét állapota képes nukleotidot kötni, azonban az alacsony fluoreszcenciájú állapot (†M) gyorsabban és erősebben köti azt, mint az *M állapot. Miután a viszonylag gyors nukleotid kötés megtörtént, a †M és *M közötti egyensúly kialakul. Ez a mechanizmus a 21. ábrán bemutatott *stopped flow* kísérletben a legszembeötlőbb, ahol az MgADP-vel történt gyors összekeverés után először fluoreszcencia csökkenés történik (mert főleg †M köti az MgADP-t), majd a kötés utáni fluoreszcencia emelkedés a †M és *M közötti egyensúly kialakulására utal.

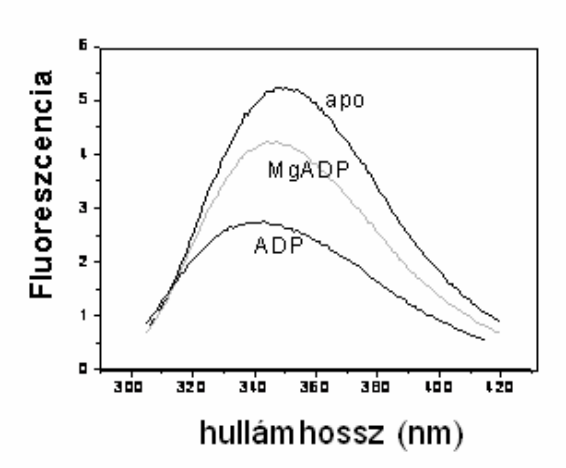


21. ábra 1 µM W239+ motor domént kevertünk össze különböző koncentrációjú MgADP-vel *stopped flow*ban. Az összekeverés holtideje 2 ms. A keverés után az oldat fluoreszcenciáját követtük (gerjesztési hullámhossz 297 nm, emissziós hullámhossz 340 nm (interferencia filter, 10 nm fényáteresztő ablak). Nagy MgADP koncentrációknál a nukleotid kötés annyira gyorssá válik, hogy a fluoreszcencia csökkenés nagy része elvész a mérés holtidejében.

A fenti kép azonban csak MgADP esetében látható. MgATP-vel való összekeverés esetében csak egy fázisú fluoreszcencia csökkenést látunk, ami azért történik, mert ha a γ-foszfát helyet elfoglaljuk, akkor a *M állapot nem tud kialakulni.

2.4.3.4 A Mg^{2+} kötés mechanizmusa

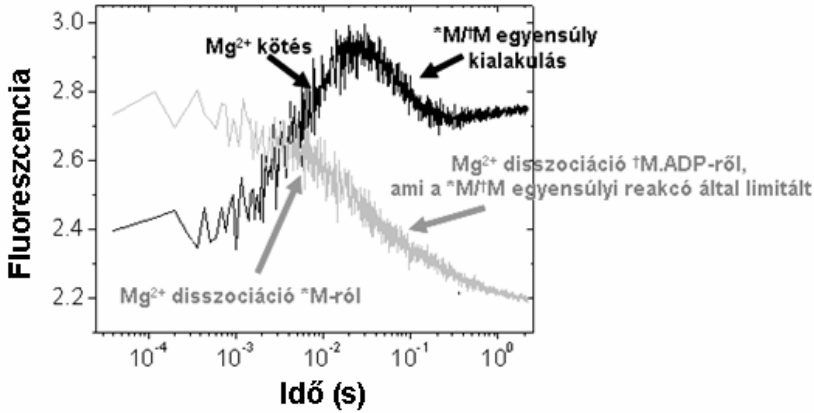
Igen érdekes kép alakul ki, ha megvizsgáljuk a Mg^{2+} kötését is. Azt tapasztaltuk, hogy a Mg^{2+} is befolyásolja a *switch 1* konformációját, és ezeket a változásokat a Trp-239 fluoreszcenciáján keresztül tudjuk követni (22. ábra).



22. ábra A W239+ emissziós spektrumai MgADP és ADP állapotokban (gerjesztési hullámhossz 295 nm). A Mg^{2+} nélküli ADP állapot nem azonos a MgADP állapottal, mert előbbi spektruma a vörös tartomány felé tolódott a W239+.MgADP komplexéhez képest.

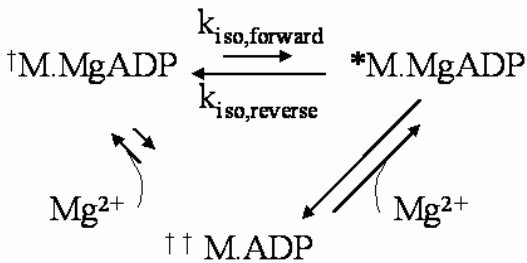
Hasonlítsuk össze a W239+.ADP komplex Mg^{2+} kötésekor történő fluoreszcencia változást azzal, ami a W239+.MgADP Mg^{2+} elvesztésekor történik (23. ábra).

Mg^{2+} disszociációkor csökkenést tapasztalunk, amely két, egy gyors és egy lassú fázisban történik. Attól a mintázattól lényegesen eltérőt láthatunk, ha a W239+.ADP komplex Mg^{2+} kötését vizsgáljuk. Ebben az esetben egy gyors emelkedést viszonylag lassú fluoreszcencia csökkenés követ.



23. ábra Mg^{2+} disszociációja W239+.MgADP komplexről (szürke görbe), és Mg^{2+} kötése W239+.ADP-hez 11ºC-on. Mg^{2+} disszociáció kísérlet: 2 µM W239+ és 1 mM ADP 3 mM $MgCl_2$ jelenlétében összekevertük 5 mM EDTA és 1 mM ADP oldatával *stopped flow*ban. Mg^{2+} kötés kísérlet: 2 µM W239+, 1 mM ADP és 3 mM EDTA oldatát összekevertük 10 mM $MgCl_2$ és 1 mM ADP oldatával *stopped flow*-ban. Minden oldat 20mM Hepes pH 7,2-t, 40 mM NaCl-ot és 1 mM merkaptoetanolt is tartalmazott.

A legegyszerűbb modellt, amelyet ezekből és más kísérletekből összeállítottunk, a 4. séma foglalja össze.



4. séma

A sémában a Mg^{2+} nélküli M.ADP állapotot ††M szimbólummal jelölöm. Ez a mechanizmus azt jelenti, hogy a Mg^{2+} megkötése és disszociációja a túlnyomórészt a *M állapoton keresztül történik. Vagyis Mg^{2+} elvonásakor viszonylag gyorsan disszociál a Mg^{2+} a *M.MgADP állapotról, ami a gyors csökkenő fázist eredményezi a *stopped flow*

kísérletben. Ezt követően a lassú fázis annak eredménye, hogy a további disszociáció sebességét, ami a †M.MgADP-ről történik, az †M.MgADP és a *M.MgADP közötti átalakulás sebessége kontrollálja. Megjegyzem, hogy ez a megfigyelt sebességi állandó kisebb, mint a †M.MgADP=*M.MgADP egyensúly relaxációjának megfigyelt sebességi állandója, amit pl. a 20. ábrán a hőmérsékletugrásos és a nyomásugrásos kísérletben láttunk (vagy a 21. ábrán a lassú emelkedő fázis MgADP kötéskor). Ennek az az oka, hogy az egyensúly relaxációjakor a megfigyelt sebességi állandó $k_{obs}=k_{iso,forward}+k_{iso,reverse}$, míg Mg^{2+} disszociációjakor az átmenetileg kialakuló *M.MgADP állapotot rögtön „elszívja" a Mg^{2+} disszociációs folyamat. Ennek az a következménye, hogy a *M.MgADP populáció mindig alacsony koncentrációban van jelen, ezért a †M.MgADP visszaalakulása elhanyagolható, így a megfigyelt sebességi állandóban a $k_{iso,reverse}$ részaránya is elhanyagolható, vagyis $k_{obs}\approx k_{iso,forward}$.

Érdekes összehasonlítani a MgADP és a Mg^{2+} kötés mechanizmusát. Látható, hogy a MgADP kötése inkább a †M *switch 1* hurok állapotán keresztük történik, míg a Mg^{2+} pedig épp ellenkezőleg, a *M keresztüli útvonalon zajlik. Ebből az következik, hogy a Mg^{2+} kötés és a nukleotid kötés részben függetlenül történik, vagyis a nukleotid zsebben elhelyezkedő Mg^{2+} egyensúlyi dinamikája más, mint a nukleotidé. Elképzelhető, hogy ennek komoly szerepe lehet az ATP hidrolízisének mechanizmusában, esetleg bizonyos konformációs átmenetek iniciációjában. Ezek számomra nagyon érdekes kérdések, azonban megválaszolásukhoz vagy a kérdések megközelítéséhez további, elsősorban szerkezeti kísérletek szükségesek. Valószínűleg NMR vizsgálatok lennének célravezetőek. Sykes és Schriver a hetvenes és nyolcvanas években végeztek foszfor NMR méréseket a foszfát és a Mg^{2+} egyensúlyainak vizsgálatára (*54-56*). Azonban abban az időben a miozin atomi szerkezete és ezek a kinetikai adatok nem álltak rendelkezésükre, ami nagymértékben megnehezítette a kísérletek tervezését és interpretációit. Néhány kérdésben igen fontos és hosszú távon is jelentős megállapításokat tettek, azonban a jelen kérdések megválaszolására kísérleteik nem voltak elegendők. Az új mechanizmusok ismeretében igen izgalmas lenne újabb NMR kísérleteket tervezni és elvégezni.

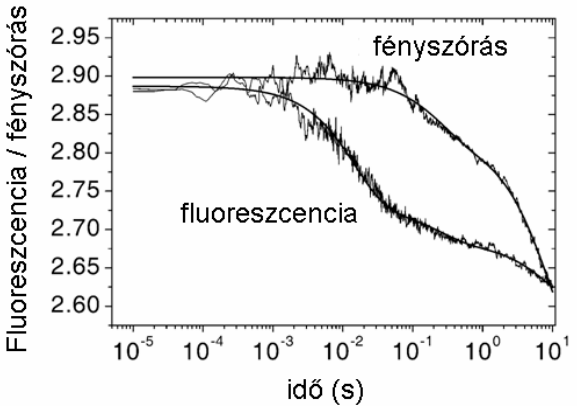
2.4.3.5 A *switch 1* egyensúlyi konformációs állapotai határozzák meg az aktinkötés erősségét

A nukleotid és a Mg^{2+} kötés mechanizmusának felderítése izgalmas kaland volt, és érdekes eredményekre vezetett. Eredeti célkitűzésünk azonban az volt, hogy a nukleotid kötés és az aktin kötés kapcsoltságának mechanizmusát derítsük fel. Kiindulási hipotézisünk, hogy az atomi szerkezet alapján a nukleotidkötő régió és az aktinkötő régió között elhelyezkedő *switch 1* hurok szabályozza a nukleotid kötés és az aktin kötés antagonizmusát. Továbbá arra voltunk kíváncsiak, hogy hogyan lehet az, hogy annak ellenére, hogy az ADP kötött állapot aktinkötő régiójának krisztallográfiás Röntgen szerkezete gyakorlatilag megegyezik azokkal a szerkezetekkel, amelyek a γ-foszfát helyen foszfátot vagy annak analógját tartalmazzák, az előbbi állapot két nagyságrenddel erősebben köti az aktint az utóbbihoz képest. Mint fentebb jeleztem, maga a jelenség, vagyis az aktin- és a nukleotid kötés antagonizmusa már Szent-Györgyi Albert első kísérletei óta ismert, és ez a jelenség minden aktomiozin működési modell alapja, mégsem ismerjük a hátterét. Előre tudunk-e lépni ebben a kérdésben, ha a *switch 1* hurok konformációs átmeneteit vizsgáljuk?

Foglaljuk össze, hogy mit is tudtunk meg a fentebb bemutatott kísérletekből. Kimutattuk, hogy nukleotidok minőségétől, illetve jelenlététől függően a *switch 1* régiónak három állapota van: apo (M), nyitott (*M, magas fluoreszcenciájú) és zárt (†M, alacsony fluoreszcenciájú) állapotok. Ha a nukleotidkötő régió γ-foszfát kötőhelye foszfáttal vagy analógokkal betöltött, akkor a *switch 1* zárt állapotban van. Ugyanakkor ADP jelenlétébenben a *switch 1* zárt és nyitott állapota egyensúlyban van (az egyensúlyi állandó 20 ºC-on K = 0,6). Ez meglepő eredmény, mert ha feltételeznénk, hogy a *switch 1* zárt állapotában nyitott (gyenge aktin kötés), a *switch 1* nyitott állapotában pedig zárt az aktinkötő árok (erős aktin kötés), akkor ADP jelenlétében az aktin kötés erősségének valahol „félúton” kellene lennie az ATP és az apo (rigor) között. Azonban ez nem így van, jelen esetben az ADP komplexált motor domén gyakorlatilag ugyanolyan erősen köti az aktint (Kd = 0,04 μM) mint a nukleotid-mentes (Kd = 0,03 μM), míg ATP-ben gyenge a kötés (Kd ≈ 50 μM). Hogyan magyarázható ez a látszólagos ellentmondás?

Megvizsgáltuk, hogy hogyan változik a *switch 1* konformációja aktin jelenlétében. Első kérdés az volt, hogy a *switch 1* konformációja változik-e aktin kötésre. Mivel aktin hozzáadására 15% fluoreszcencia emelkedést találtunk *stopped flow*-ban (25. ábra) (*53*), azt a választ adhatjuk erre a kérdésre, hogy igen.

Ez önmagagában is fontos eredmény, mert ez az első kísérlet, amely egyértelműen kimutatja, hogy aktin kötésre a *switch* régiókban változás történik. A megfigyelés jelentősége az, hogy szerkezeti és funkcionális magyarázatot ad arra a régóta ismert tényre, hogy az aktin és a nukleotid (ATP) kötés antagonista jelenségek, vagyis nemcsak az ATP csökkenti az aktin kötés erősségét, hanem az aktin is gyengíti az ATP kötést.



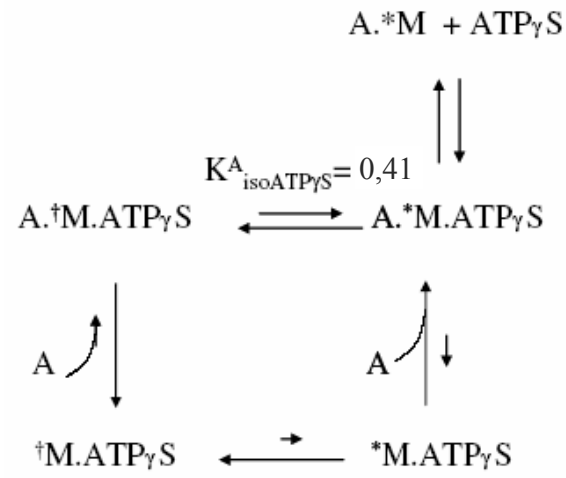
24. ábra Az akto-W239+ komplex fényszórásának és fluoreszcencia időbeli változása MgATPγS nukleotid analóggal történő összekeverés után. 2 μM W239+ és aktin komplexét 100 mM MgATPγS-sel kevertünk össze *stopped flow*-ban 20ºC-on, majd a fényszórást (gerjesztési és az emissziós monokromátor beállítása 297 nm), és a fluoreszcencia emissziót (gerjesztés 297 nm, emisszió 340 nm (interferencia filter)) követtük időben. A két jelváltozás könnyebb összehasonlítása érdekében a fényszórás görbét a fluoreszcencia görbéhez normalizáltuk. A fluoreszcencia változásra három fázis ($k_{obs,fluor1}$ = 68 s^{-1}, $k_{obs,fluor2}$ = 4,3 s^{-1}, $k_{obs,fluor3}$ = 0,10 s^{-1}), míg a fényszórás változásra két fázis illeszthető ($k_{obs,light\text{-}scat1}$ = 4,2 s^{-1}, $k_{obs,light\text{-}scat2}$ = 0,11 s^{-1}). Jól látható, hogy a fluoreszcencia változás jelentősen megelőzi a fényszórás változást, majd a lassú fázisok hasonló sebességgel zajlanak mindkét esetben. Ez arra utal, hogy a *switch 1* hurokban történő átalakulás megelőzi az aktin disszociációját. Megjegyzem, hogy ATP esetében hasonló változás történik, mint MgATPγS-sel, azonban azért használtuk mégis az utóbbit a demonstrációra és számításainkhoz, mert a MgATPγS jelentősen lelassítja az aktin disszociációját az ATP-hez képest, így a két folyamat – a *switch 1* konformációs átalakulás és az aktin disszociáció – jobban szétválasztható egymástól.

Továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy aktin hozzáadására mi történik a miozin.MgADP komplexben talált *switch 1* egyensúllyal. Nyomásugrás, hőmérsékletugrás és *stopped flow* kísérletekkel kimutattuk, hogy az aktin

az egyensúlyt gyakorlatilag teljes mértékben a magas fluoreszcenciájú, nyitott *switch 1* konformáció felé tolja el.

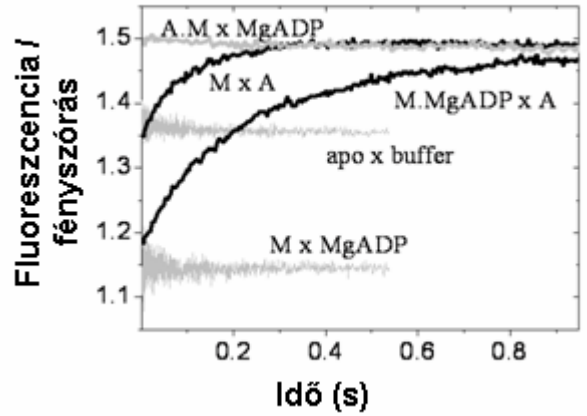
Elvégeztünk egy olyan *stopped flow* kísérletet, amelyben az aktomiozin komplexet ATP-vel, illetve ATPγS-sel disszociáltuk, és mind a fluoreszcencia mind a fényszórás változást követtük. Előbbi a *switch 1* konformációs átalakulását, utóbbi az aktin disszociációját követte közvetlenül (23. ábra).

A kétfázisú fluoreszcencia csökkenés, amelynek első fázisa megelőzte a fényszórás változást míg a második fázis a fényszórás azzal egyszerre történt, azt mutatta, hogy ATP-ben, illetve annak analógja, az ATPγS jelenlétében az aktin kötött miozinban a *switch 1* két konformációs állapota egyensúlyban van (K = 0,41), ahogy azt az 5. séma mutatja.



5. séma

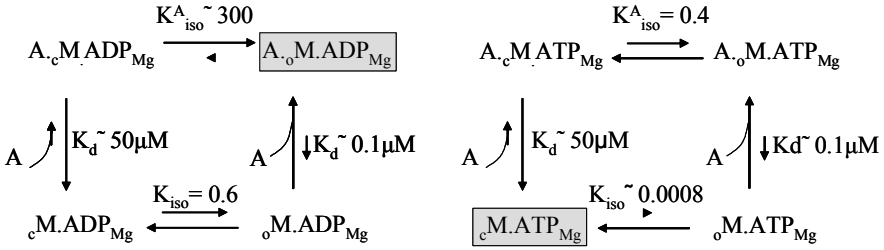
Mint fentebb említettem, aktin távollétében ez az egyensúly gyakorlatilag teljesen a zárt konformáció felé tolódik el ezeknek a nukleotidoknak (ATP, ATPγS) a jelenlétében.
A 25. ábrán összefoglaltam a legfontosabb változásokat, amiket a Trp-239 szenzorral követhetünk.



25. ábra *Stopped flow* kísérletek különböző reaktánsok összekeverése után, amelyekben a Trp-239 fluoreszcencia emisszióját követtük időben. Az egyes görbék mellett jeleztem, hogy mely reaktánsokat kevertük össze a reakció indításakor. A kezdeti és végállapotok fluoreszcencia intenzitásai jól mutatják, hogy a *switch 1* hurok két konformációs állapota között milyenek az egyensúlyi viszonyok aktin jelenlétében és távollétében, illetve különböző nukleotidokban. Fontos megjegyezni, hogy apo állapotban aktin távollétében a fent említett két állapottól eltérő állapotban van a *switch 1* régió.

Jól látható, hogy az aktin a magas fluoreszcenciájú állapot felé tolja el az egyensúlyt, míg az előző kísérletekből tudjuk, hogy az ATP éppen ellenkezőleg, az alacsony fluoreszcenciájú állapot felé húzza a rendszert.

Ezekből az eredményekből egy olyan modellt tudtunk felállítani, amely megmagyarázta azt, hogy a nukleotid minősége (ATP vagy ADP) hogyan határozza meg az aktin kötés erősségét. Ezt a modellt az alábbi termodinamikai sémában mutatom be (6. séma):



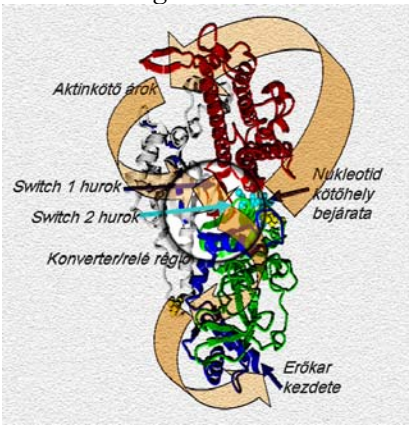
6. séma Az aktomiozin kötés termodinamikai modellje ADP kötött és ATP kötött állapotokban. A szürkével jelzett populációk domináns koncentrációban vannak jelen egyensúlyban, illetve *steady state*-ben. $_{o}$M: nyitott *switch 1* konformációban lévő miozin; $_{c}$M: zárt *switch 1* konformációban lévő miozin.

Ebben a sémában azt a feltételezést tettük a krisztallográfiai adatokra alapozva, hogy a zárt *switch 1* gyengén, a nyitott *switch 1* miozin erősen köti a miozint. Ha a miozin ATP-t köt, akkor *switch 1* konformációja nagyrészt zárt állapotban van. Ha a miozin.ATP komplex aktint köt, akkor a *switch 1* régió két állapotot vesz fel, amelyek egyensúlyban vannak egymással. Ebből az következik, hogy a négy populáció közül a miozin *switch 1* zárt állapot a domináns, tehát ATP-ben az aktin összességében gyengén kötődik a miozinhoz. Ezzel ellentétben ADP jelenlétében a *switch 1* két állapota egyensúlyban van egymással, amely egyensúlyt az aktin nagyrészt a nyitott *switch 1* populáció felé tolja el. A termodinamikai „*box*" következménye az, hogy a domináns populáció az aktin.miozin-*switch 1* nyitott állapot, tehát összességében az aktin erősen kötődik a miozinhoz. Ezzel a modellel többek között azt is megmagyarázhatjuk, miért látható a krisztallográfiai szerkezetekben az miozin.ADP komplex zárt *switch 1* konformációban. Mivel az egyensúlyi állandó alapján a zárt állapot kétszer nagyobb arányban van jelen, mint a nyitott, ezért az a populáció nagyobb eséllyel kristályosodik. Hasonló jelenséget tapasztalhattunk a *switch 2* régióval kapcsolatban is, amikor ADP.BeF_x nukleotid analóggal komplexálva kristályosították a miozint és évekig csak az egyik állapotot sikerült csak kristályosítani. Mindazonáltal az utóbbi néhány évben sikerült miozin V konstrukciót ADP jelenlétében nyitott *switch 1* régióval kristályosítani (1W7I) (*23;24;57;58*). Sőt, néhány hónappal ezelőtt jelent meg az a publikáció, amelyben *Loligo* sp. Miozin S1-et kristályosítottak, amelyben ugyancsak nyitott *switch 1* látható (*59*). További fontos megfigyelés, hogy az eddigi kristályszerkezetekben a

nyitott *switch 1* hurok a zárt aktinkötő árokkal, míg a zárt *switch 1* a nyitott aktinkötő árokkal járt együtt. A mi eddigi kísérleteink sem mondanak annak ellent, hogy a két régió együtt mozoghat, így a *switch 1* irányítása alatt áll az aktinkötő árok mozgása, amely jelentős mértékben meghatározza az aktin kötés erősségét.

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a *switch 1* nyitott és zárt állapotainak egyensúlyi állandója meghatározza az aktin kötés erősségét. Valószínűleg a különböző miozinok esetében pontosan ez az egyensúly határozza meg azt, hogy az aktin kötés erőssége mennyire különböző ATP és ADP jelenlétében. Továbbá számos kísérletet végeztek a G-fehérjék *switch 1* régiójának konformációs állapotainak és a GEF (*guanine nucleotide exchange factors*) partner molekula kötődésének karakterizálására. Roger Goody már évekkel ezelőtt felvetette a két jelenség közötti összefüggést (*11;12*). Eredményeink és a korábbi G-fehérje kutatások fényében azt valószínűsítjük, hogy ebben az enzim családban is a fent leírt mechanizmus irányítja a nukleotid és a partner fehérje kötődésének erősségét. A mechanizmus feltárásának jelentősége a G-fehérjékben az, hogy ezáltal specifikusabban, erre a jelenségre alapozva tervezhetünk olyan kísérleteket, amelyek a sejtbeni jelátviteli folyamatokat specifikusan befolyásolják.

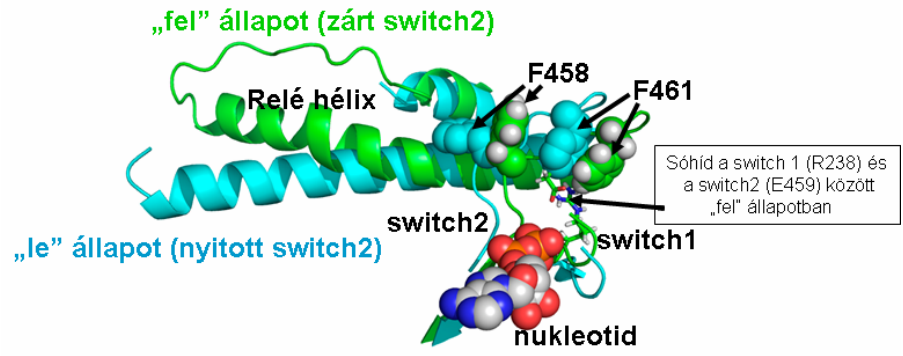
2.4.4 Negyedik állomás: A switch 2 hurok mozgásai



Együtt mozog-e a *switch 2* hurok az erőkarral? A *switch 2* mozgatja az erőkart? Van-e kölcsönhatás a *switch 1* és a *switch 2* hurok között?

Az atomi felbontású szerkezetek azt sugallják, hogy hasonlóan a G-fehérjékhez a *switch 2* hurok állapotai meghatározhatják az erőkar mozgását a relé és a konverter régión keresztül. Holmes és Geeves több elemzésükben (*9;43;44*) is azt feltételezték, hogy a *switch 2* kis elmozdulása amplifikálódik a relé majd a konverter régióban, és ez a mozgás hozza létre végső soron a kb. 10 nm-es erőkar elmozdulást. Az atomi szerkezetek valóban azt mutatják, hogy ADP, AMPPNP valamint $ADPBeF_x$ miozin komplexekben a *switch 2* ú.n. nyitott állapotban van, míg $ADPVO_4$ és $ADPAlF_4$ miozin komplexekben zárt állapotú. A kristályszerkezetek alapján az utóbbi esetben a 459-es és a 238-as aminosav oldalláncok között sóhíd alakulhat ki, ami nyitott állapotban felbomlik.

Mindezek az adatok és megfontolások arra sarkaltak minket, hogy valamilyen módon vizsgáljuk a *switch 2* mozgását működés közben is. A *switch 2* hurokban két fenilalanin oldallánc található, és úgy gondoltuk, hogy ezek triptofánra történő cseréje okozhatja a legkisebb funcionális beavatkozást. Tehát a fluoreszcens triptofán szenzorokat a 458-as és a 461-es pozícióban helyeztük el a triptofánmentes konstrukcióban, hasonlóan a W238+ és a W242+ konstrukciókhoz.



26. ábra A F458 és a F461 aminosavak elhelyezkedése a *switch 2* hurokban. A motor domén relé régióját és a *switch 1* valamint *switch 2* régiókat is feltüntettem. Kékkel a „le” állapot, zölddel a „fel” állapot szerkezetét jelöltem.

A 458-as pozíció mutációja kockázatosabb vállalkozásnak tűnt, mert ebben a pozícióban minden miozinban fenilalanin található. A 461-es a *switch 2* hurok utolsó aminosava, és azért lehet érdekes, mert átmenetet hozhat létre a *switch 2* hurok és a relé régió mozgásai között.

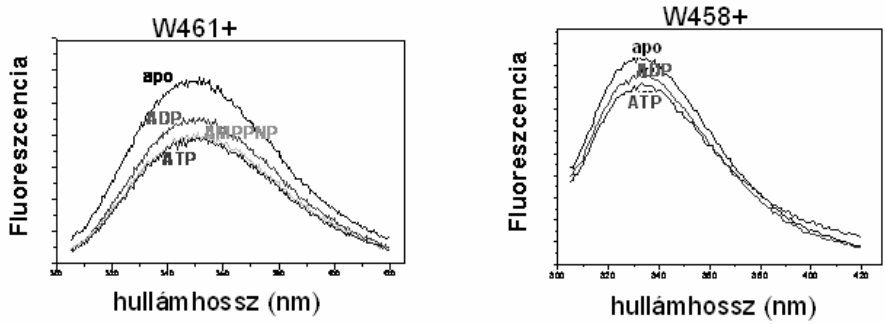
A 458-as aminosav mutációjának esetében igazolódtak félelmeink, és még egy olyan viszonylag enyhe mutációs beavatkozás is jelentősen csökkentette az ATPáz ciklus sebességét, mint a fenilalanin-triptofán csere. A *steady state* aktivitás tizedére csökkent (0,005 s^{-1}), ugyanakkor érdekes, hogy a *quench flow*-ban mérhető foszfát „burst” megmaradt, a „burst” amplitúdója 55%, ami nagyobb érték, mint a vad típusé (20-30%). A „burst” fázis sebességi konstansa nagyon lassú, 0,02 s^{-1}. Azontúl, hogy nem voltunk boldogok, hogy a mutáció így elrontotta az enzimünket, két következtetést azért levonhatunk. 1. Mivel jelentős foszfát „burst” fázis detektáltunk, ezért nagy valószínűséggel az ATPáz ciklus alapvető mechanizmusa, amit a Bagshaw-Trentham sémával (1. séma) írhatunk le, nem változott a mutáció hatására 2. Ugyanakkor a 458-as pozíció enyhe perturbációja is jelentősen befolyásolja az ATPáz ciklus sebességmeghatározó lépését. Ekkor még azt hittük, hogy a sebességmeghatározó lépés a foszfát felszabadulás, ezért annak idején érdekes elméleteket gyártottunk a „*back door*” mechanizmussal összefüggésben. Ebben az időben a tudományos társadalom úgy gondolta a, hogy a foszfát a miozin motor domén ellenkező oldalán távozik, mint ahol a nukleotid belép (*back door*). Mivel ezen az oldalon nincs jól látható kijárat, ezért úgy gondolták, hogy valamilyen „lélegzés” folytán a „*back*

door”-nál néha kinyílik az ajtó. Mivel az ajtónyílás ritka esemény (olyan ritka, hogy nem is láttuk még – tehát ritkább, mint a fehér holló), ez az oka, hogy a foszfát felszabadulás a sebességmeghatározó lépés. Már itt előrevetítem, hogy ez az egyik kérdés, amiben a legutóbbi időben alapvetően új modellt állítottunk fel, amelyet a dolgozat és az utazás vége felé fog megtalálni az Olvasó.

A W461+ konstrukció *steady state* ATPáz aktivitása nem változott a vad típuséhoz képest (0,04 s^{-1}, sebességi konstansa 30 s^{-1}), továbbá foszfát „burst”-öt is sikerült kimérnünk. A „burst” amplitúdója valamivel kisebb volt, mint a vad típusé, de mindenképpen szignifikáns (7%) (sebességi konstansa 15 s^{-1}), ami arra utal, hogy az ATPáz alapvető mechanizmusát nem változtatta meg a mutáció.

2.4.4.1 A W461+ és a W458+ fluoreszcencia változása nukleotidok hatására

Az alapvető karakterizálások után nézzük meg, hogy változik-e a triptofán szenzorok fluoreszcenciája nukleotid kötésre.

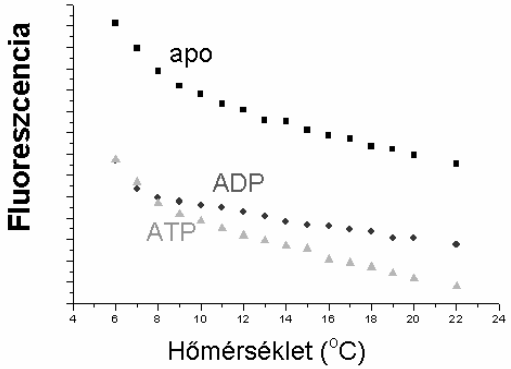


27. ábra A W461+ és a W459+ fluoreszcencia emissziós spektrumai különböző nukleotidok jelenlétében (gerjesztési hullámhossz 295 nm).

A 27. ábrán bemutatom a két konstrukció fluoreszcencia emissziós spektrumait. A W458+ fluoreszcencia ATP és ADP kötésre is szignifikánsan csökken, azonban a csökkenés mértéke csak 9% , illetve 5%. Ennél jóval nagyobb változást tapasztaltunk a W461+ esetében. ADP hozzáadására 23% csökkenést tapasztaltunk, míg ATP esetében még nagyobb, 35% csökkenést kaptunk. A W461+.AMPPNP komplex

fluoreszcenciája alig volt magasabb az ATP jelenlétében mérttől. Annak ellenére, hogy a különbség szignifikáns volt, azonban
nem volt elegendő ahhoz, hogy pontos méréseket tudjunk végezni a kétféle állapot különbségének karakterizálására.

A fluoreszcencia emissziók hőmérsékletfüggése információt szolgáltathat arról, hogy mely nukleotid jelenlétében van a *switch 2* túlnyomórészt egyetlen állapotban, illetve van-e olyan nukleotid állapot, amelyben a *switch 2* legalább két állapota egyensúlyban van. Kicsit meglepődve tapasztaltuk, hogy nukleotid távollétében, illetve ATP jelenlétében egyetlen állapot jelenlétére utal a hőmérsékletfüggés (vagy esetleg olyan egyensúly van, ami nem hőmérsékletfüggő).



28. ábra A W461+ fluoreszcencia intenzitásának hőmérsékletfüggése apo és ADP állapotban, valamint ATP jelenlétében.

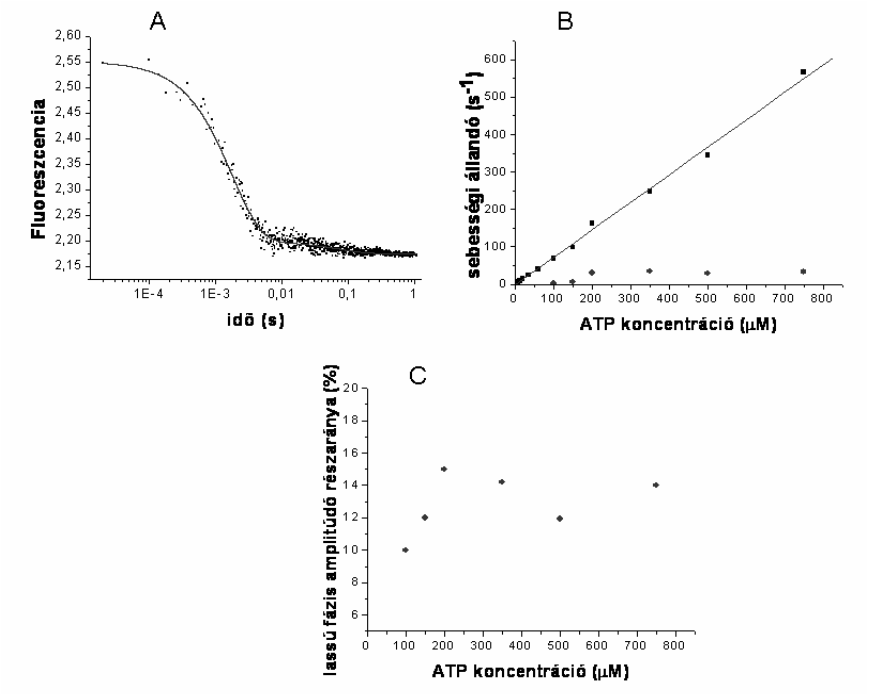
Ugyanakkor ADP jelenlétében hasonló lefutást tapasztaltunk, mint a W239+ esetében. Ez mindenképp meglepő és új fordulat, mert eddig azt gondolták, hogy a *switch 1* és a *switch 2* régiók egymástól függetlenül mozognak. Itt viszont úgy tűnik, hogy a *switch 1* mozgásait valamilyen mértékben érzékeli a *switch 2*.

2.4.4.2 A *switch 2* konformációs átmenetei

Mindazonáltal továbbra is fontos kérdés, hogy a Trp-461 segítségével tudjuk-e detektálni a *switch 2* azon konformációs átalakulását, amit az atomi szerkezetek alapján feltételeztünk. Vagyis tudjuk-e követni a *switch 2* nyitott zárt átmenetét, amely az erőkar mozgásakor jöhet létre. Ez a mozgás a feltételezések szerint a Bagshaw-Trentham séma (1. séma) alapján a 3. lépés, amikor az erőkar „felhúzása" történik (nyitott-zárt átmenet) a hidrolízissel egyidőben, valamint a 4. lépésben, a munkaütemben (zárt-nyitott átmenet). Mindkét lépés tanulmányozása nehézkes lehet, mert a 3. lépés vagy a hidrolízissel együtt jön létre, vagy azzal szorosan kapcsoltan, míg a 4. lépést eleddig nem sikerült senkinek sem a foszfát felszabadulástól elkülönítetten detektálni. Éppen ezért még az is kérdés volt, hogy a munkaütem különálló lépés-e a foszfátfelszabadulástól. Mindezen kérdésekre az utóbbi időkben sikerült választ adnunk, amiket a következő fejezetekben leírok, azonban a W461+ vizsgálatakor ezek még megválaszolatlan kérdések voltak.

Két lehetőségünk volt abban az időben, hogy teszteljük, vajon a *switch 2* érzékeli-e a nyitott zárt átmenetet, pontosabban, ha valóban létezik, akkor tudjuk-e detektálni. Az egyik, ha olyan nukleotid analógot, AMPPNP-t adunk az enzimhez, aminek jelenlétében a feltételezések szerint a nyitott zárt egyensúly kialakul, és az egyensúlyt vizsgáljuk. Sajnos a fluoreszcencia hőmérsékletfüggésének kísérlete AMPPNP-ben túlnyomórészt egyetlen állapot jelenlétére utal, ami vagy azt jelenti, hogy nincs nyitott-zárt egyensúly vagy azt, hogy a mutáció ezt az egyensúlyt annyira eltolja, hogy azt már ebben a hőmérséklettartományban nem lehet jelentősen perturbálni. A másik lehetőség az, ha megnézzük, hogyan változik a fluoreszcencia, ha a W461+-t *stopped flow*-ban összekeverjük ATP-vel. Vad típusú enzimben Bagshaw és Trentham azt a következtetést vonta le, hogy az erőkar felhúzásakor bekövetkező nagy konformációs átalakulás a nukleotidkötés után közvetlenül, a hidrolízis lépéssel egyidőben történik, amelynek sebességi állandója nyúl vázizomban kb. 100 s^{-1} (*28;29*) (ez a lépés *Dictyostelium* miozin esetében kb. 30 s^{-1} (*33;60-62*)). Tehát, ha az ATP hozzáadására a nukleotid kötés után tapasztalunk egy elsőrendű, hasonló sebességi állandójú lépést a Trp-461 fluoreszcenciáján keresztül, az jó jelzés lehet arrra vonatkozóan, hogy a *switch 1*-ben konformációátalakulás történik, ami pedig *per definitio* a nyitott-zárt átmenet. Megjegyzem, hogy a Trp-239 és a Trp-242 fluoreszcencia változásai semmi jelét nem mutatják egy hasonló lépés meglétének.

A 29. A. ábrán látható a W461+ és nagy mennyiségű ATP összekeverése után mért fluoreszcencia változás.



29. ábra *Stopped flow* kísérlet, amelyben a W461+-t különböző koncentrációjú ATP-vel kevertük össze, majd a fluoreszcencia intenzitást követtük (gerjesztési hullámhossz 297 nm, emisszió: 340 nm (interferencia filter)). **A**). 5 μM W461+-t kevertünk 750 μM ATP-vel. A detektált görbére két exponenciálist illesztettünk, amely alapján a gyors fázis sebességi állandója 570 s^{-1}, a lassúé 20 s^{-1}. A lassú fázis amplitúdójának aránya a teljes jelváltozáshoz 14 %. **B**) A lassú és a gyors fázis sebességi állandói az ATP koncentráció függvényében. 100 μM ATP koncentráció alatti tartományban csak egy fázisú exponenciálisokat illesztettünk a mért görbékre. A gyors fázisok sebességi konstansainak ATP koncentráció függésére illesztett egyenes meredeksége: 0,74 $\mu M^{-1}s^{-1}$. **C**). A lassú fázisok amplitúdóinak aránya a teljes jelváltozáshoz képest.

Alacsony ATP koncentrációknál csak egy fázisú változást láttunk, de 100 μM ATP koncentrációtól kezdődően határozottan megjelent egy kb 15%-os amplitúdójú lassú fázis is. Az ATP koncentrációjának függvényében a gyors fázis sebességi állandója folyamatosan emelkedett a mért koncentrációtartományban, és egy másodrendű kötési reakció képét mutatta.

A kötés sebességi állandója körülbelül megegyezik a vad típusú enzim kötési sebességi állandójával. A lassú fázis sebességi állandója 20 s^{-1}, amely gyakorlatilag ugyanakkora, mint a *quench flow*-val mért „burst" fázis sebességi állandója (15 s^{-1}, lásd fentebb). Az eltérés a két módszer különbözőségéből eredhet, mivel mindkét esetben viszonylag kis jelváltozásból kellett meghatározni a sebességi paramétert, és ez némi bizonytalanságot okozhat a paraméter pontosságában. Nagyon fontos megjegyezni, hogy hasonló *stopped flow* kísérletben, amikor a W461+-t ADP-vel kevertük össze, a vizsgált teljes ADP koncentráció tartományban egyetlen fázisú fluoreszcencia változás görbét kaptunk. Ezt azért fontos megállapítani, mert az ADP kísérlet bizonyos szempontból kontroll kísérlete az ATP-vel történő kísérletnek, hiszen ADP hatására természetesen nem is várunk nyitott zárt konformációs átmenetet a *switch 2* régióban. Tehát az ATP és az ADP kötéskor a W461+ ebben a tekintetben különbözőképpen viselkedik. Összességében megállapíthatjuk, hogy a Trp-461 érzékeli a hidrolízis lépéshez kapcsolt nagy konformáció változást, vagyis a *switch 2* hurok nagy valószínűséggel átmegy a nyitott zárt konformációs átmeneten az ATPáz ciklus folyamán. Ez megerősítése a szerkezetekből levont következtéseknek. Ugyanakkor igen meglepő, hogy a *switch 2*-nek ADP jelenlétében is van két állapota, hasonlóan a *switch 1*-hez képest. Ez a jelenség megvalósulhat a már fentebb említett, a *switch 1*-et és a *switch 2*-t összekötő, a 238-as és 459-as aminosavak közötti sóhídon keresztül. Annak a fényében azonban, hogy nyitott *switch 2* konformációban a kristályszerkezetek alapján nincs sóhíd, már meglepő. Itt előrevetítem, hogy mostanában kimutattuk, hogy a sóhíd felbomlása elképzelhető, hogy kristályosítási vagy szerkezet-meghatározási műtermék, és molekula dinamikai szimulációink azt mutatják, hogy a sóhíd a ciklus teljes egésze alatt fennmarad, csak konformációja alakul át a nyitott zárt átmenet folyamán. Ez az eredmény megmagyarázhatja, hogy a *switch 1*-ben történő konformációs átalakulások átterjedhetnek a *switch 2*-re is. Ennek szerkezeti háttere azonban még felderítésre vár.

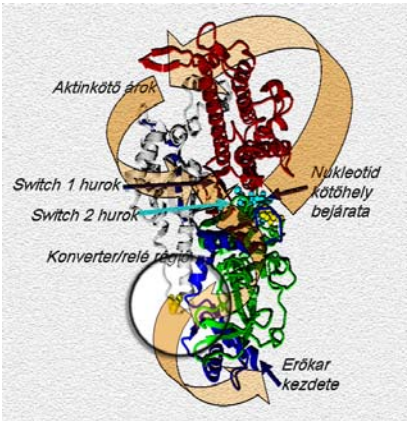
Mindazonáltal, ha a *switch 2* is érzékeli a *switch 1*-ben létrejövő konformációs átmenetet, akkor jogos elvárás, hogy a *switch 2* – a *switch 1*-hez hasonlóan – valamilyen mértékben érzékelje az aktin kötése által kiváltott szerkezeti átalakulást (az aktin árok záródását és a *switch 1* zárt-nyitott átmenetét). *Stopped flow* kísérleteket végeztünk, amelyben a Trp-461-en keresztül próbáltuk detektálni az aktin hatását a *switch 2*-re (*6*). Mivel az aktinkötéskor az oldat fényszórása jelentősen változik, ezért az áteresztő tartományon kívül igen kis transzmittanciájú, és gyakorlatilag

nem fluoreszkáló interferenciaszűrőt használtunk az emissziós oldalon[6]. Ezek a mérések egyértelműen azt mutatták, hogy az aktin kötődése megváltoztatja a *switch 2* konformációját, valószínűleg hasonló módon, mint ahogy az a *switch 1* esetében történik. ATP hozzáadására az akto-W461+ fluoreszcenciája két fázisban csökken, párhuzamosan a fényszórás csökkenéssel. A méréseket még nem végeztük el ATPγS-sel, ami lelassítaná az aktin disszociációját, és így hasonlóan a *switch 1* méréseinkhez itt is láthatnánk, hogy az aktin disszociációját megelőzi-e egy előegyensúly.

Összefoglalóan megállapíthatjuk, hogy a *switch 1* hurok nyitott-zárt konformációs átmenete megtörténik az ATP kötődése után. Meglepő módon azonban nemcsak ez a konformációs átmenet történik meg, hanem ezen túlmenően azok a változások is megtörténnek, mint amik a *switch 1*-ben ADP és aktin kötéskor.

[6] Hasznos gyakorlati megfigyelés lehet az Olvasó számára, ha fluoreszcencia méréseket akar végezni, hogy a „közönségesen" használt fényszűrők fluoreszcenciája igen jelentős. Ez különösen akkor okoz zavart, ha FRET mérést végzünk vagy az oldat fényszórása változik a mérés alatt. Ezekben az esetekben a fényszűrő fluoreszcenciáján keresztül műtermék fluoreszcencia változást detektálhatunk. Ennek lehetőségét könnyen ellenőrizhetjük, ha a mérést megismételjük úgy, hogy az emissziós oldalon lévő filtert a fénydetektorhoz képest közelebb vagy távolabb helyezzük el. Ha a jelintenzitás megváltozik, akkor gyanakodhatunk a filter magas fluoreszcenciájára.

2.4.5 Ötödik állomás: Az ATP hidrolízise és a relé/konverter mozgása



A Bagshaw-Trentham és a Lymn-Taylor modell szerint az ATP hidrolízise egyidőben történik a miozin fejben létrejövő konformáció változással, ami a miozin erőkarjának „felhúzását" eredményezi. Kérdés, hogy ezek az események valóban egy lépésben történnek-e, illetve a hidrolízis hogyan hozza létre (ha egy lépésben történnek), vagy befolyásolja (ha külön lépésben) a konformáció változást.

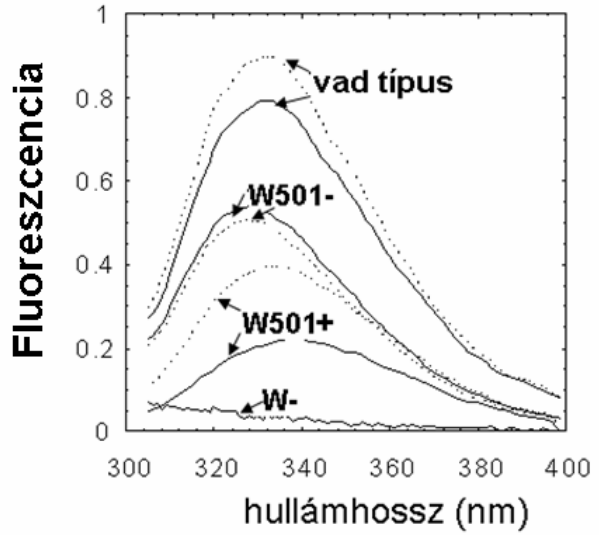
Be kell vallanom, hogy történetileg ez volt az egyik első kérdésünk abban a kutatássorozatban, amelyben a miozin motor domén működését, illetve a funkcionális régiók közötti kommunikációs mechanizmusokat vizsgáltuk. Ennek az az oka, hogy a Bagshaw-Trentham séma felállításakor azon *stopped flow* adatokra támaszkodtak, amelyeket a nyúl vázizom miozin fej (S1 fragmentum) triptofán fluoreszcencia változásának követésével mértek (*28;29*). Ezek az alapvető kinetikai eredmények és modellek már a hetvenes évek óta ismertek, azonban nem tudták, hogy a fluoreszcencia változásért mely triptofán, illetve triptofánok a felelősek. Ennek eldöntésére természetes triptofánokat tartalmazó, illetve triptofán deléciós mutánsokat kellett terveznünk. Értelemszerűen arra voltunk kíváncsiak első lépésben, hogy melyik az a triptofán vagy triptofánok, amely(ek) fluoreszcencia változását Bagshaw és Trentham követte

kísérleteikben. Elsődleges gyanúsítottak a relé régióban található Trp-510 (nyúl miozin vázizom szekvencia), amelynek konzervatív homológja a Trp-501 a *Dictyostelium* miozin II-ben. Ezen túlmenően a nukleotidkötő hely bejáratánál elhelyezkedő Trp-131 és Trp-113 aminosavak, amely pozíciókban, illetve környékükön a *Dictyostelium* miozinban nincs triptofán. Ezen utóbbi pozíciók nagyban segítettek azoknak a *Dictyostelium* motor domén konstrukcióknak megtervezésében, amelyekkel a nukleotid kötés mechanizmusát tártuk fel (2.4.1).

A nyúl miozin S1 triptofán fluoreszcenciájának vizsgálata és az abból megalkotott kinetikai séma igen nagy hatású volt a publikációt követő évtizedekben. Mivel azonban az intenzitás változás ATP hozzáadására a nem változó 5 triptofán miatt csak 15%, ráadásul a jel kevert, mert – mint látni fogjuk hamarosan – egyrészről a Trp-510 és a nukleotidkötő hely bejáratánál elhelyezkedő triptofánok különböző folyamatok révén hozták létre a jelváltozásokat, ezért a helyi konformáció változásokról részletes információt nem lehetett nyerni. Ezek a helyi konformáció változások ugyanakkor igen fontosak lehetnek a miozin motor domén működésében, hiszen a kristályszerkezeti eredmények a kilencvenes évek elejétől fogva világosan mutatták, hogy például a relé régióban történő átalakulások kulcsfontosságúak az erőkar felhúzásában és lecsapódásában (lásd 4. ábra és 26. ábra).

A triptofánmentes *Dictyostelium* miozin motor domén [7] (W-konstrukció) mellett elkészítettük azt a mutánst, amelybe visszahelyeztük a natívan is megtalálható Trp-501-et (W501+ konstrukció), valamint azt a mutánst, amelyben a vad típusú motor doménban mindössze a Trp-501-et cseréltük fenilalaninra (W501- konstrukció). A 30. ábra bemutatja, hogyan változnak az egyes konstrukciók fluoreszcencia emissziós spektrumai ATP hozzáadására.

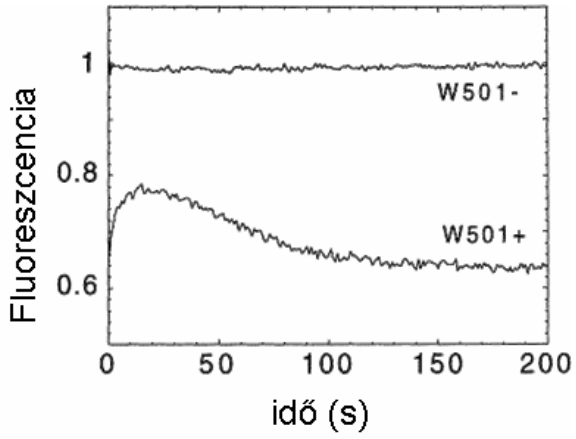
[7] A triptofánmentes konstrukcióban a négy natív triptofán mindegyikét fenilalaninra cseréltük.



30. ábra A vad típusú *Dictyostelium* miozin motor domén és annak triptofán mutáns konstrukcióinak fluoreszcencia emissziós spektrumai (gerjesztési hullámhossz 295 nm) ATP jelenlétében (szaggatott vonal) és távollétében (folyamatos vonal).

A triptofánmentes motor domén (W-) emissziója elhanyagolható azokéhoz képest, amelyek tartalmaznak triptofánt. A W501- fluoreszcencia változása ATP hozzáadására elhanyagolható, amely még szemléletesebben látható a *stopped flow* eredmények összehasonlításakor (31. ábra). A W501+ fluoreszcencia változása a legnagyobb, mivel a háttér triptofánokat ezen körülmények között elhanyagolhatóan fluoreszkáló fenilalaninokra cseréltük.

Ezek az előkísérletek meggyőztek minket arról, hogy a natív triptofánok közül a Trp-501 fluoreszcenciája változik, ráadásul abban a nagy szerencsében volt részünk, hogy ez a változás igen nagy mértékű, ezért jó esélyünk volt arra, hogy a relé régióban történő változásokat nagy pontossággal, alaposan feltárhassuk.



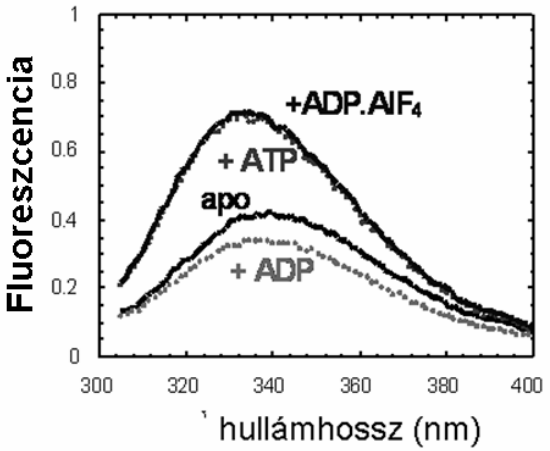
31. ábra A W501- és a W501+ fluoreszcencia intenzitás változása *stopped flow*ban (gerjesztés 297 nm, emissziós filter GB320/UG11). 2 μM enzimet 5 μM ATP-vel kertünk össze a *stopped flow*-ban. A fluoreszcencia emelkedést csökkenés követi amint az összes ATP elhidrolizált, és a gyengén kötődő foszfát felszabadult. A végállapotban az enzim az ADP kötés erősségének (K_d=5 μM) és az ADP koncentrációnak megfelelő arányban ADP kötött és szabad állapotban van.

A nagy lehetőség (értsd: nagy fluoreszcencia változás) birtokában elsőként vizsgáltuk meg, hogy aktin távollétében mely nukleotidokra és hogyan érzékeny a Trp-501. Ezután pedig azt is tanulmányoztuk, hogy a különböző enzimatikus állapotok fluoreszcenciája milyen fluoreszcencia állapotokból tevődik össze. Végül az enzimatikus állapotok átmeneteinek karakterizálása következett. A munka izgalmát növelte, hogy ezeket a kérdéseket egyidőben három jelentős kutatócsoport vizsgálta (*33;63;64*). Igen szerencsésnek mondhatjuk magunkat, hogy a bizonyító erejű kísérleteket nekünk sikerült elsőként publikálnunk (*33;65*).

2.4.5.1 A W501+ fluoreszcencia tulajdonságai

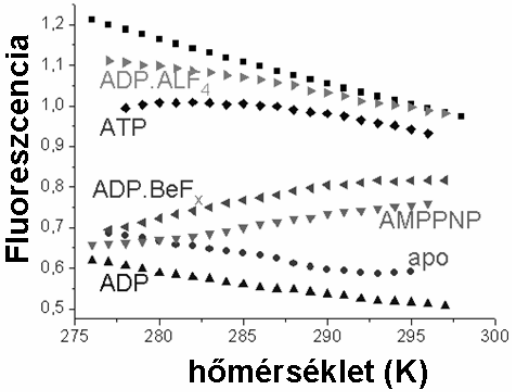
A W501+ konstrukció 80% fluoreszcencia emelkedést mutatott ATP és 20% csökkenést ADP hozzáadására (32. ábra). A köztes fluoreszcenciájú apo állapot nem a magas és az alacsony fluoreszcenciájú állapotok keveréke, mert mind az ATP mind az ADP jelenlétében mért emissziós spektrumok a rövidebb hullámhossz tartomány felé tolódtak az apo állapot spektrumához képest. A W501+ konstrukció fluoreszcencia

tulajdonságait részletesen is tanulmányoztuk fluoreszcencia életidő, anizotrópia és anizotrópia lecsengés módszerekkel, amelyek eredményei a függelékben megtalálhatók. Jelen eszmefuttatás szempontjából a leglényegesebb következtetése ezeknek a kísérleteknek, hogy az összes nukleotid állapotban triptofán életidejének időtartományához viszonyítva kis mobilitású a Trp-501 oldallánc.



32. ábra A W501+ fluoreszcencia emissziós spektrumai nukleotid távollétében, ADP, illetve ATP jelenlétében, valamint ADP.ALF$_4$ nukleotid analóggal komplexben.

Különböző nukleotid analógokkal komplexáltuk a W501+-t. ADP.ALF$_4$ és ADPVO$_4$ analógokkal magas fluoreszcenciájú állapotot kaptunk, míg AMPPNP-vel, ADPBeF$_X$-szel, és ATPγS nukleotidokkal köztes fluoreszcencia értékeket kaptunk. ATP jelenlétében a fluoreszcencia majdnem elérte az ADPAlF$_4$, illetve az ADPVO$_4$ komplexek értékét, de mindig alatta maradt 3-10%-kal. A fluoreszcencia változások hőmérsékletfüggésének meghatározásával arra voltunk kíváncsiak, hogy ezekben a formákban az enzim egy vagy több állapotok között dinamikus egyensúlyban van-e (33. ábra).

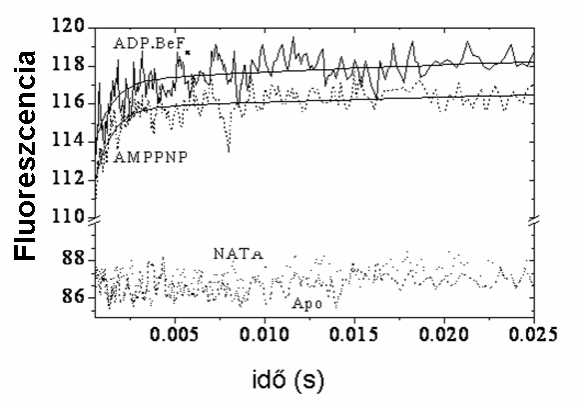


33. ábra A W501+ fluoreszcencia intenzitásának hőmérsékletfüggése különböző nukleotidok és nukleotid analógok jelenlétében (gerjesztési hullámhossz 295 nm). A W501+.ADPVO$_4$ fluoreszcenciája gyakorlatilag megegyezik a W501+.ALF$_4$-ével.A legfelső (■) szimbólummal jelölt görbe a W501+.ADPAlF$_4$-nek a magas hőmérsékleteken mért fluoreszcenciáiból az alacsonyabb hőmérsékletek felé extrapolált pontsorozat. Ez a pontsorozat, valamint az apo és az W501+.ADP görbék párhuzamosak a NATA (N-acetil triptofán amid) fluoreszcenciájának hőmérsékletfüggésével.

Az ábrából szépen kirajzolódik az a kép, hogy ADP és apo állapotokban egyetlen állapot valószínű. Ugyancsak – elsősorban magas hőmérsékleteken – ADPALF$_4$ és ADPVO$_4$ komplexekben is egyetlen állapot van. Tehát nukleotid kötött állapotban megkülönböztetünk egy alacsony és egy magas fluoreszcenciájú állapotot, amelyeket az atomi kristályszerkezetek alapján a *switch 2* nyitott (ADP állapot pdb: 1MMA) és zárt (ADPAlF$_4$ és ADPVO$_4$ komplexek pdb: 1MND és 1VOM) állapotokhoz köthetjük. Mivel azonban kísérleteink arra utalnak, hogy a *switch 2*-nek esetleg több állapota is lehetséges, illetve lehet, hogy a *switch 2* és a relé mozgásai szétkapcsolhatók, ezért az erőkar állásai alapján a magas fluoreszcencia állapotot a „fel” (*lever arm up*), az alacsony floreszcencia állapotot „le” (*lever arm down*) állapotokkal fogom azonosítani.

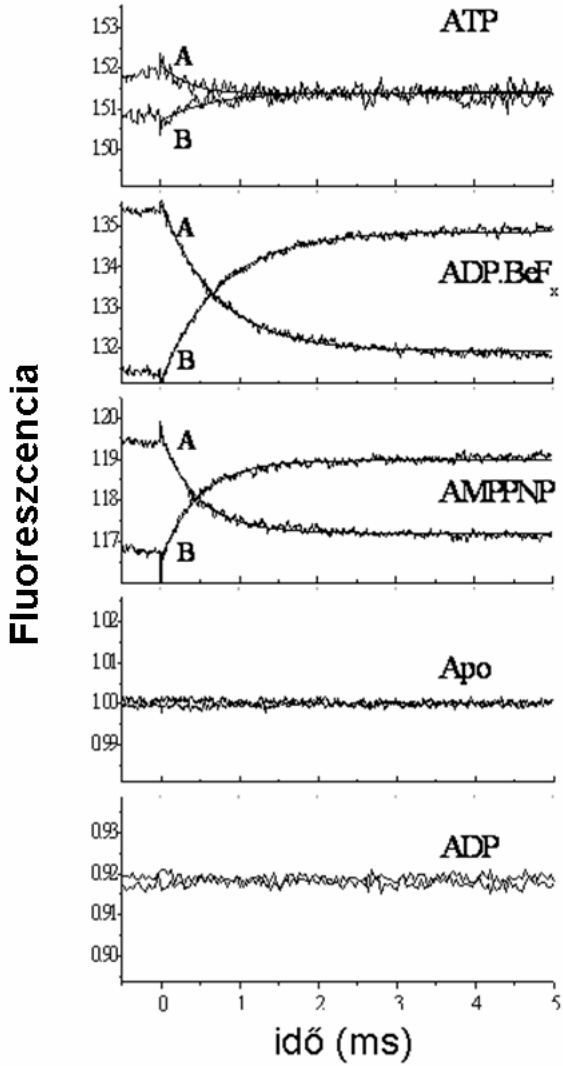
2.4.5.2 A W501+ magas és alacsony fluoreszcenciájú állapotok egyensúlyának jellemzése

Az állapotok közötti átmeneteket megvizsgáltuk kinetikai módszerekkel, hogy megállapíthassuk, azok valóban levezethetők mindössze két állapot átmeneteként. Az egyensúlyok jellemzésére a perturbációs technikák kiválóan alkalmasak, mint ahogy ezeket alkalmaztuk a W239+ egyensúlyainak karakterizálására is (lásd 2.4.3.2. fejezet). Az AMPPNP és az ADP.BeF$_x$ enzimkomplexek hőmérsékletfüggései alapján adódott a lehetőség, hogy a hőmérsékletugrás módszerét használjuk (*65*).



34. .ábra A W501+ egyensúlyainak jellemzése hőmérsékletugrás módszerrel 20 ºC-on. A 100 µs alatt történő kb 5 ºC-os hőmérsékletugrás után a fluoreszcencia változást követtük (gerjesztés 295 nm, az emissziós oldalon 340 nm-es interferencia filtert alkalmaztunk). A körülmények ugyanazok, mint a 20. ábrában leírtaknál. (NATA: N-acetil triptofán amid)

A 34. ábrán látható, hogy hőmérsékletugrással a rendszer perturbálható AMPPNP és ADP.BeF$_x$ nukleotidokkal komplexált W501+ esetében, míg nukleotid-mentes formában és ADP jelenlétében a hőmérsékletugrás után nem történik fluoreszcencia változás. A mért görbékre egy exponenciális illeszthető ($k_{obs} \approx 1000\ s^{-1}$), amely kétállapotú egyensúlyi rendszerre utal. Ennek további ellenőrzésére a nyomásugrás módszerét is alkalmaztuk (35. ábra).



35. ábra Nyomásugrás kísérlet, amelyben a W501+ konstrukciót különböző nukleotidok jelenlétében hirtelen nyomásugrással perturbáltuk, majd a fluoreszcencia változást követtük (gerjesztési hullámhossz 295 nm, emissziós filterek: GB 320 és UG11). Az A jelű görbék esetében a nyomást 80 bar-ra emeltük kb 50 µs alatt, míg a B jelű görbék esetében pedig ugyanennyi idő alatt 3 bar-ra csökkentettük a nyomást. A ciklust 30 ms mérésközökkel 500-szor ismételtük, és a mérési eredményeket átlagoltuk.

Hasonlóan a hőmérsékletugrás kísérlethez, nyomásugrásra is csak az AMPPNP-vel és az ADPBeF$_x$-dal komplexált W501+ esetében tapasztaltunk fluoreszcencia változást. A változások sebességi állandója megegyezett a hőmérsékletugrás kísérletben tapasztalt reakció sebességi állandókkal. A nyomásugrás kísérletet – a minták a műszerbe való betöltését is figyelembe véve – viszonylag rövid idő alatt el tudtuk végezni (néhány perc alatt), ezért megfelelő koncentrációban ATP-t adva *steady state* körülmények között is el tudtuk végezni a kísérletet. *Steady state* körülmények között is tapasztaltunk fluoreszcencia változást, méghozzá ugyanúgy egy fázisú lefutásban és ugyanolyan sebességi állandóval, mint a fenti nukleotid analógok jelenlétében. Ez arra utal, hogy *steady state*-ben, vagyis funkcionális állapotban is jelentős populációban megtalálható ugyanaz a két állapot egymással (kvázi)egyensúlyban, mint a fenti nukleotid analógok jelenlétében.

Foglaljuk össze eddigi eredményeinket az 1. táblázatban, hogy megfogalmazhassuk az erre a tudásra alapozott, következő kísérleti lépéshez vezető kérdést.

nukleotid	**Fluoreszcenci a intenzitás az apo értékéhez képest**	**Fluoreszcenci a állapot**	**A két állapot egyensúlyi állandója: $M^{\dagger} = M^*$ $K=[M^*]/[M^{\dagger}]$**	**Perturbál ható**	**Enzimatikus állapot és pdb kód**
apo	1	M_{apo}	-	nem	Apo, 1q5g
ADP	0,8	$M^{\dagger}$	<0,01	nem	“le”, 1MMA
AMPPNP	1,25	$M^* + M^{\dagger}$	0,8	igen	“le” + “fel”, 1MMN (“le” állapotban)
ADP.BeF$_x$	1,35	$M^* + M^{\dagger}$	1,2	igen	“le” + “fel”, 1MMD (“le” állapotban)
ADP.AlF$_4$	1,8	M*	>100	nem	“fel”, 1MND
ADP.VO$_4$	1,8	M*	>100	nem	“fel”, 1VOM
ATP	1,65	$M^* + M^{\dagger}$	5,7	igen	“le” + “fel”, 1FMW (“le” állapotban)

1. táblázat. A W501+ fluoreszcencia állapotai és a „le” és a „fel” állapotok átmenetének megfigyelt egyensúlyi állandói különböző nukleotidok jelenlétében. Feltüntettem az egyes állapotokhoz tartozó atomi szerkezetek pdb kódjait is.

Tehát két fluoreszcencia és szerkezeti állapotot tudtunk elkülöníteni, amelyek gyors egyensúlyban vannak egymással, és az egyensúlyi állandójuk a nukleotid zsebben elhelyezkedő nukleotid minőségétől függ. Mi lehet a funkcionális szerepe ennek a konformációs átmenetnek/egyensúlynak?

2.4.5.3 Az erőkar felhúzási lépés elkülönítése az ATP hidrolízis lépéstől

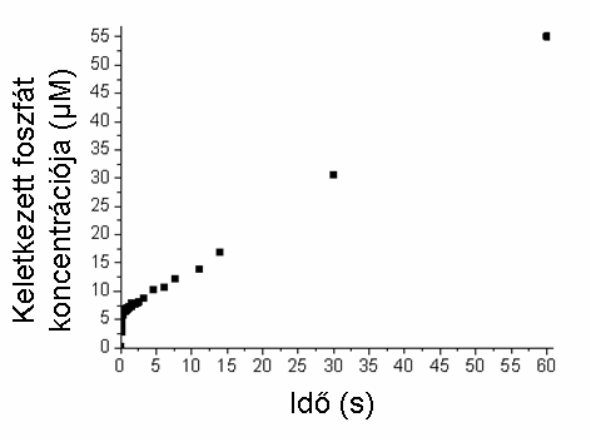
Következő feladatunk az volt, hogy ezt a gyors egyensúlyt el kellett helyeznünk a Bagshaw-Trentham sémában (1. séma). Ilyen gyors, elsőrendű egyensúly nem található az eredeti sémában. Nyilvánvaló, hogy a fent karakterizált egyensúly az ATP kötés (1. és 2. lépés) után és a sebességmeghatározó lépés (foszfát felszabadulás, 5.lépés) előtt található. A pontos hely meghatározására további kinetikai kísérleteket kellett elvégeznünk. Első lépésben *quench flow* kísérlettel a hidrolízis lépést (3. lépés) karakterizáltuk (36. ábra). A *quench flow* kísérletben közvetlenül az ATP hidrolízist tanulmányozzuk, mert a foszfát keletkezését detektáljuk függetlenül attól, hogy a foszfát kötve maradt még az enzimhez vagy már felszabadult onnan.

Amikor sztöchiometrikusan többszörös fölöslegben adtuk az ATP-t az enzimhez viszonyítva (*multiple turnover experiment*) a foszfát keletkezése időben két fázisban történt (36. ábra).

Az első fázist „burst” fázisnak nevezzük, amikor viszonylag gyorsan, „hirtelen” keletkezik foszfát. Ez annak következménye, hogy a sebességmeghatározó lépés a foszfát felszabadulás, és mind a szubsztrát kötése mind a hidrolízis lépés ennél gyorsabban történik. A második, lassú lineáris fázis a *steady state* ATPáz ciklus sebességével azonos sebességet jelez, ez a foszfátfelszabadulási lépésnek felel meg. A „burst” fázis amplitúdója és sebessége fontos paraméter számunkra. A Bagshaw-Trentham séma alapján a „burst” amplitúdóját gyakorlatilag a hidrolízis lépés (3. lépés) egyensúlyi állandója határozza meg, mert az ezt követő sebességmeghatározó lépés nagyságrendekkel lassabban történik. Jelen esetben a „burst” fázis amplitúdója majdnem 40%[8]. A „burst” fázis

[8] A „burst” fázis meghatározása igen nehéz, és amplitúdójának mértéke mérésről mérésre változhat, ezért az irodalomban sokféle értékkel találkozhatunk. *Dictyostelium* miozin II esetében az évek folyamán sok *quench flow* mérést végeztünk különböző enzimpreparátumokkal, különböző műszerekkel és különböző kísérleti körülmények között. A „burst” amplitúdóját 20-40% között kaptuk. Nyúl vázizom S1 esetében is hasonló értékek

sebességi állandóját az alkalmazott ATP koncentrációban a szubsztrát kötése limitálta.



36. ábra W501+ konstrukcióban végzett *quench flow* kísérlet. 15 μM W501+t kevertünk össze 100 μM ATP-vel, majd a különböző időpontokban a reakció gyors, irreverzibilis leállítása és az enzim denaturálása után elemeztük a keletkezett foszfát mennyiségét. A keletkezett foszfát koncentrációját a reakció időbeni leállításának függvényében ábrázoltam.

Ugyanakkor jól látható, hogy az emelkedő fázist megelőzi egy 30-35 ms hosszúságú lag fázis (37. ábra). Ne feledjük, hogy a lag fázis nem feltétlenül jelent egy megelőző gyorsabb lépést, mert abban az esetben is

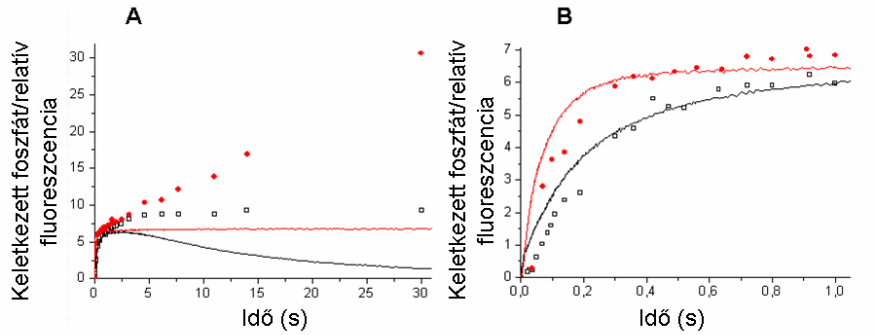
---

között szórnak az eredmények. Összességében a konkrét érték a reakció-mechanizmust nem változtatja meg – a lényeges elem a „burst" megléte-, csak kissé befolyásolja a számított sebességi állandók értékét.

[10] Igen érdekes jelenség, hogy 55 °C-on a gyors fázis amplitúdója csökken hirtelen és nem a lassú fázisé. Ha az enzim összes régiója ugyanolyan stabilitású volna, akkor pontosan fordítva kellene történnie. Ebben a dolgozatban nincs mód kifejteni azokat a kísérleteket, amelyeket régiospecifikus fluorofórokat tartalmazó miozin motor doménekkel végeztünk *T-jump/stopped flow*-ban annak érdekében, hogy megállapítsuk, hogy a régiók milyen sorrendben denaturálódnak, vagyis milyen az egymáshoz viszonyított szerkezeti stabilitásuk (lásd függelék). A kísérleteket elvégeztük különböző ligandumok jelenlétében, és azt tapasztaltuk, hogy a stabilitási sorrend jelentősen megváltozik az egyes ligandumok hatására. Izgalmas kérdés, hogy van-e ennek funkcionális jelentősége, és ha van, akkor mi? Valószínűleg a 44. ábrán bemutatott kísérletben az 55ºC-on a gyors fázis hirtelen leeső amplitúdója is hasonló jelenségre vezethető vissza, vagyis a gyors fázis kialakításáért felelős régió(k) kevésbé stabilak a lassú fázisért felelős régióknál.

látunk lag fázist, ha egy gyors fázist egy lassú követ, de abban az esetben is, ha lassú fázis megelőzi a gyorsabb fázist. Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a *quench flow* kísérletek azt mutatták, hogy 1. a *steady state* fázist, amelynek sebességi konstansa 0,05 s^{-1} egy 10 s^{-1} sebességi állandójú 40 %-os amplitúdójú „burst” fázis előzi meg; 2. a 30-35 ms hosszúságú lag fázis egy 30 s^{-1} sebességi állandójú lépés jelenlétére is utal.

A következő lépésben vizsgáljuk meg, hogy a *quench flow* eredmények hogyan korrelálnak a Trp-501 fluoreszcencia időbeli változásával, ha a W501+-hoz ATP-t adunk. *Stopped flow*-ban ugyanolyan körülmények között, mint a *quench flow* kísérletben összekevertük a W501+-t megfelelő mennyiségű ATP-vel és követtük a fluoreszcencia intenzitás változását. A 37. ábrán összehasonlítottam a *quench flow* és a *stopped flow* kísérlet eredményeit.



37. ábra A *quench flow* és a *stopped flow* kísérletek összehasonlítása. A folyamatos vonalak a *stopped flow*, a szimbólumok a *quench flow* kísérletek eredményeit jelzik. A *stopped flow* kísérletekben a fluoreszcencia változást követtük (gerjesztési hullámhossz 295 nm, emissziós oldalon GB320/UG11 filtereket alkalmaztunk). Pirossal jeleztem, amikor 15 µM W501+-hoz 100 µM ATP-t kevertünk, míg feketével azokat a kísérleteket jelöltem, amikor a reakciót 10 µM ATP hozzáadásával indítottuk. **A**. ábrán a reakció hosszú idejű lefutását ábrázoltam, míg a **B.** ábrán ugyanezen kísérletek kezdeti lefutásai láthatók.

Nagy mennyiségű ATP hozzáadására a fluoreszcencia megemelkedik, majd miután a *steady state* körülmények kialakultak, a mért időtartományban állandó marad. Az ezzel párhuzamosan végzett *quench flow* kísérletben *steady state*-ben folyamatosan hidrolizálja az enzim az ATP-t, ezért a foszfát koncentráció lassú növekedését látjuk. Amikor az enzimhez képest szubsztöchiometrikus mennyiségű ATP-t keverünk, akkor a fluoreszcencia megemelkedik, mert kialakul a nagy fluoreszcenciájú

állapot. Rövid időn belül a fluoreszcencia csökkenni kezd. Mint már korábban említettem (31. ábra és 37. ábra), a csökkenés azért következik be, mert a magas fluoreszcencia állapotot követi a sebességmeghatározó lépés, amelyben a nagyon gyengén kötődő foszfát felszabadul, és az ATPáz ciklus lezajlása után beáll az egyensúly, amelyben a W501+ ADP-t köt, és ez alacsony fluoreszcenciájú állapot. Ha a csökkenő fázisra exponenciális lecsengésű függvényt illesztünk, akkor annak sebességi állandója pontosan megadja a *steady state* sebességi állandót. Ebben az esetben ez az érték 0,048 s^{-1}, amely gyakorlatilag megegyezik az előző oldalon, a *quench flow* kísérletben meghatározott sebességi állandóval (0,050 s^{-1}). A hasonló körülmények között lejátszott *quench flow* kísérletben a fluoreszcencia csökkenését mutató fázisban már nem történik jelentős foszfát termelés, ezért a foszfát koncentráció nem is emelkedik.

Ha a reakciók elejét vesszük szemügyre, akkor látható, hogy a *quench flow* kísérletben látható egy 30 ms hosszúságú lag fázis, ugyanakkor a fluoreszcencia változások lag fázist nem mutatnak. Ha a Bagshaw-Trentham sémával ezt a jelenséget nem tudjuk magyarázni, mert az alapján a két görbe lefutásának ugyanolyannak kellene lennie. Ez a különbség arra utal, hogy a hidrolízis és a fluoreszcencia változás nem azonos időben megtörténő események. A lag fázis hiánya arra is utal, hogy valószínűleg az extra lépés a hidrolízist megelőző lépések egyike. Az eddig bemutatottak közül már két kísérlet – az 1000 s^{-1} konformációs egyensúlyi lépés, és a lag fázis hiánya – is abba az irányba mutat, hogy a hidrolízis lépéstől független reakció a miozin motor domén nagy konformációs átalakulása.

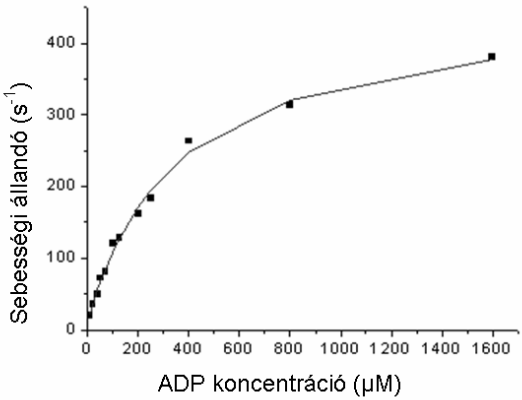
Mielőtt részletesen diszkutálnánk ezeket az eredményeket, vizsgáljuk meg, hogy a Trp-501 fluoreszcencia változása hogyan zajlik le nagy időfelbontásban az ATPáz reakció során.

Elsőként vizsgálunk meg olyan reakciókat, amelyek nem hidrolizálható nukleotidok és a W501+ között történnek. Az ADP-vel történő reakció során a nukleotid kötés mechanizmusát tárjuk fel olyan szempontból, hogy a relé régió mit is „érzékel”, amikor a kötőzsebbe helyet foglal a ligandum. Utána eggyel bonyolultabb mechanizmust tanulmányozunk: mi történik, ha AMPPNP kötődik a zsebbe. A fenti kísérletekből tudjuk, hogy a relé nagy konformáció változása megtörténik, és azt nézzük, hogyan viszonyul ez az izomerizáció a nukleotid kötéshez. Tudjuk azonban, hogy az AMPPNP nem hidrolizál, tehát legkésőbb a hidrolízis lépésnél megáll a reakció. Az AMPPNP-vel történő reakció után pedig az ATP és a W501+ közötti reakciót vizsgáljuk, azt remélve, hogy az

így felépített kísérletsorozat választ ad a fent feltett kérdésekre, és a Bagshaw-Trentham sémát helyesen ki tudjuk egészíteni.

2.4.5.4 A W501+ reakciója ADP-vel

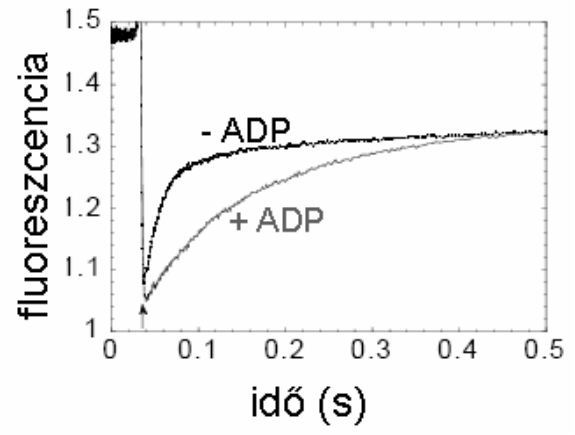
Ha W501+-t pszeudoelsőrendű körülmények között ADP-vel kevejük össze, akkor fluoreszcencia csökkenést tapasztalunk. Alacsony ligandum koncentrációknál a mért reakciósebességi állandó fokozatosan emelkedik, majd 300 μM ADP koncentráció felett telítődik a sebességi állandó értéke 500 s^{-1} –nél (38. ábra).



38. ábra A W501+ ADP kötése. *Stopped flow*-ban az ADP és a W501+ összekeverése után detektált fluoreszcencia változás megfigyelt sebességi állandói az ADP koncentráció függvényében (gerjesztési hullámhossz 297 nm, emissziós oldalon 340 nm-es interferencia filter). A mérési adatokra hiperbolát illesztettünk.

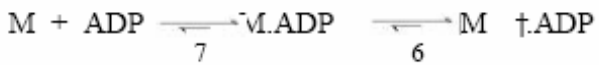
Fontos kiemelni, hogy az alkalmazott ADP koncentrációk mindegyikénél egyfázisú fluoreszcencia emelkedést láttunk. A telítési görbe elejére illesztett egyenes meredeksége 1,4 $\mu M^{-1}s^{-1}$, az y tengelymetszete 9 s^{-1}. Az ADP disszociációját oly módon határoztuk meg, hogy a W501+-t előzőleg telítési koncentrációnál ADP-vel komplexáltuk,

majd *stopped flow*-ban az ADP-t nagy koncentrációjú ATP-vel leszorítottuk. Mivel az ATP kötése két nagyságrenddel erősebb, mint az ADP-é, és reakciója gyorsabb mint az ADP disszociációja, ezért a fluoreszcencia változás időfüggése közvetlenül megadja az ADP disszociációjának sebességét (7,9 s^{-1}) (39. ábra).



39. ábra Az ADP disszociációs sebességi állandójának meghatározása ATP leszorításos kísérlettel. 2 μM W501+-t összekevertünk és előinkubáltunk 500 μM ADP-vel, majd majd ezt az oldatot *stopped flow*-ban 1000 μM ATP-vel kevertük össze és követtük a fluoreszcencia változást (+ADP görbe) (gerjesztési hullámhossz 297 nm, emissziós oldalon 340 nm-es interferencia filter). -ADP görbe: ugyanez a *stopped flow* kísérlet ADP nélkül. A nyíl a *stopped flow* keverés megállását és kvázi a reakció kezdetét jelzi.

Ez az érték gyakorlatilag megegyezik az ADP kötés ADP koncentrációjának függvényében felvett görbe y tengelymetszetével. A disszociáció és a másodrendű kötési sebességi állandó hányadosa az ADP disszociációs állandóját adja meg (5,6 μM), amely érték pontosan megegyezik a független ADP titrálás kísérletben mért értékkel. Ezek a kísérletek egy egyszerű kétlépéses ligandum kötés reakciómechanizmust javasolnak, amelyet a 7. séma mutat be:

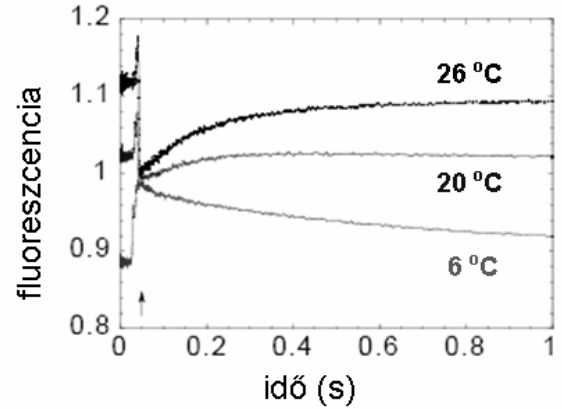


7. séma

A W501+ és az ADP ütközési komplexe nem generál jelváltozást a Trp-501-ben, majd az ütközési komplex kialakulása után konformáció változás jön létre a relé régióban is. Ez a mechanizmus nem mond ellent a korábbi fejezetekben leírt, ennél sokkal bonyolultabb szubsztrát kötési folyamatok leírásával (lásd 2.4.1 fejezet). Azt a következtetést vonhatjuk le, hogy az ADP a relé régióban egylépéses folyamat révén egyetlen konformációs állapotot alakít ki.

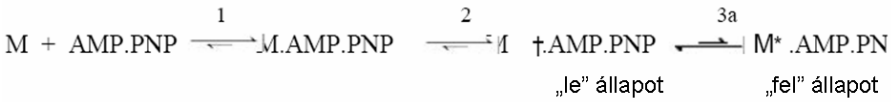
2.4.5.5 A W501+ reakciója AMPPNP-vel

A következő kísérletsorozatban az AMPPNP (nem hidrolizáló ATP analóg) kötődési mechanizmusát vizsgáltuk a W501+ konstrukción. Emlékeztetem az Olvasót, hogy AMPPNP-ben a Trp-501 jel alapján két állapot egyensúlyát tudtuk kimutatni, amely egyensúly gyors, és egyensúlyi állandója erősen hőmérsékletfüggő (33. ábra). Megvizsgáltuk, hogy hogyan változik a W501+ fluoreszcenciája, ha *stopped flow*-ban összekeverjük AMPPNP-vel. Magas hőmérsékleten emelkedést tapasztalunk, azonban 5 ºC-on már csökkenés detektálható (40. ábra), ahogy azt várjuk is a fluoreszcencia hőmérsékletfüggésének meghatározásakor végzett kísérletből is (33. ábra).



40. ábra W501+ reakciója AMPPNP-vel különböző hőmérsékleteken. 1,5 μM W501+-t összekevertünk 60 μM AMPPNP-vel *stopped flow*-ban, és követtünk a fluoreszcencia változást (gerjesztési hullámhossz 297 nm, emissziós oldalon 340 nm-es interferencia filter). A 6ºC-os görbét -0,53, a 20ºC-ost -0,18, a 26ºC-ost -0,06 egységgel toltuk el a függőleges tengelyen azon célból, hogy a reakciók látszólagosan azonos pontból induljanak a könnyebb összehasonlíthatóság kedvéért. Az amplitúdók és a görbék fluoreszcencia szintjei jól egybecsengenek a fluoreszcencia hőmérsékletfüggésével. A reakciósebességeket a viszonylag kis mennyiségben adott AMPPNP kötési folyamata limitálta. A nyíl a *stopped flow* keverésének megállását jelzi.

Ezekből a kísérletekből a W501+ és az AMPPNP reakciójára vonatkozólag a következő legegyszerűbb modellt állíthatjuk fel:



8. séma

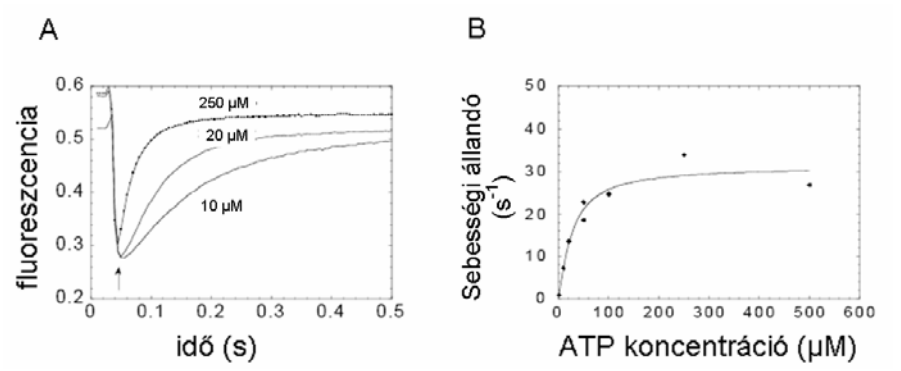
Tehát az AMPPNP kötése hasonló módon zajlik le, mint az ADP kötése, a kötés után azonban kialakul egy gyors (1000 s^{-1}) egyensúly a „le” és a „fel” állapotok között.

2.4.5.6 A W501+ reakciója ATP-vel

Miután sikerült jellemeznünk a motor domén relé régiójában történő folyamatokat a hidrolízist megelőző lépésig, vizsgáljuk meg, ezek a folyamatok valóban megtörténnek-e az ATP-vel történő reakcióban is, és ha igen, akkor ezek a folyamatok hogyan viszonyulnak a hidrolízis lépéshez.

Amikor a W501+-t 20ºC-on ATP-vel kevertünk össze, akkor egyfázisú fluoreszcencia változást figyeltünk meg (41. ábra). Pszeudoelsőrendű körülmények között a reakció amplitúdója gyakorlatilag állandó a teljes ATP koncentráció tartományban, a fluoreszcencia emelkedés – optikai beállításoktól függően – 50-90%. Az alacsony ATP koncentrációknál is változatlan amplitúdók erős ATP kötésre utalnak. Közismert, hogy az ATP kötés disszociációs állandója $K_d \approx 10$ nM. Az ATP koncentráció emelésével a reakció megfigyelt sebességi állandója nőtt, majd ez a paraméter 200 μM koncentráció fölött 30 s^{-1} értéken telítődött. A

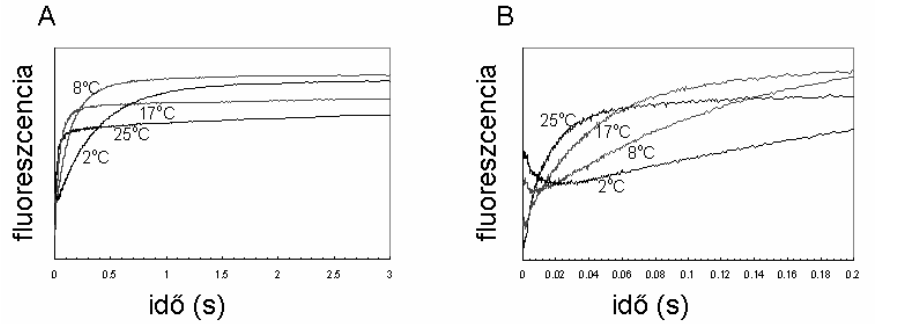
pontokra hiperbolát illesztettünk, amely alapján – egy kétlépéses kötést feltételezve – a másodrendű kötési állandó 1,4 $\mu M^{-1}s^{-1}$, és a maximális sebességi állandó $30s^{-1}$.



41. ábra W501+ reakciója ATP-vel *stopped flow*-ban. A). 2 µM W501+-t kevertünk különböző koncentrációjú ATP oldattal, majd a fluoreszcencia változást követtük (gerjesztési hullámhossz 297 nm, emissziós oldalon 340 nm-es interferencia filter) 20ºC-on. B) A reakció megfigyelt sebességi állandói az ATP koncentráció függvényében. A *stopped flow* görbékre egyszeres exponenciálisokat illesztettünk.

Alaposabb analízissel látható már 20ºC-on végzett méréseknél is, hogy a fluoreszcencia változás kezdetén egy 5-10% relatív amplitúdójú gyors (>500 s^{-1}) „burst" fázis tapasztalható. Éppen ezért megvizsgáltuk a reakció hőmérsékletfüggését is.

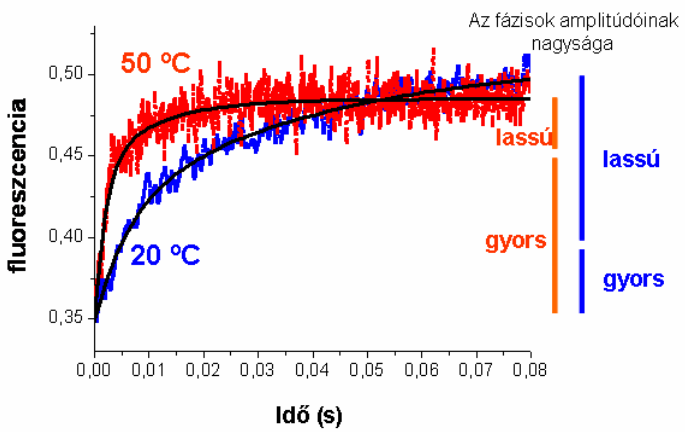
A W501+-t telítési ATP koncentrációjú (1 mM) oldattal kevertünk *stopped flow*-ban különböző hőmérsékleteken (42. ábra).



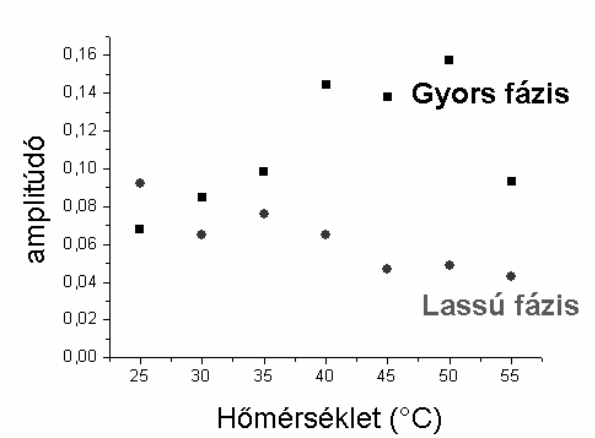
42. ábra 2 μM W501+ reakciója 1 mM ATP-vel különböző hőmérsékleteken *stopped flow*-ban. A reakciókat hasonló körülmények között végeztük, mint az 41. ábrán bemutatott kísérletben. Az **A** és a **B** ábra ugyanazon kísérletek eredményeit mutatja, azzal a különbséggel, hogy az A ábrán a méréseket 3 másodpercig mutatom be, míg a B ábrán a reakció kezdeti fázisát, 0,2 másodpercig.

Természetesen igen fontos kérdés, hogy a hidrolízis lépést, és most már tudjuk, hogy az attól független és azt megelőző miozin erőkart felhúzó lépést (a „le”-„fel” egyensúlyt) az aktin hogyan befolyásolja. Ez akkor is fontos kérdés, ha tudjuk, hogy ezekben a lépésekben az aktin csak igen gyengén kötődik a miozinhoz ($K_d \approx 60$ μM). Sőt teleologikus gondolkodás alapján ezekben a lépésekben nem is nagyon kötődhet a miozin az aktinhoz, mert ha az erőkar felhúzása aktinkötött állapotban zajlana, akkor az akadályozná a miozin hatékony előremozgását az ciklus során, és „haszontalan” (futile) ciklus jönne létre.

Telítési ATP koncentrációnál tizedmásodperces időfelbontásban a fluoreszcencia változás sebessége a hőmérséklet függvényében fokozatosan csökken, ami nem meglepő eredmény. Ha azonban nagyobb időfelbontásban tekintünk a görbékre, akkor érdekes jelenséget tapasztalunk. Alacsony hőmérsékleten egy gyors csökkenő fázis jelenik meg, amely megelőzi az emelkedő, egy exponenciálissal jellemezhető fázist. Emelkedő hőmérséklettel a csökkenő fázis relatív amplitúdója fokozatosan csökken, és 18ºC-on eltűnik. Ezen a hőmérsékleten egyetlen 27 s^{-1} sebességi állandóval jellemezhető emelkedő fázis látható. Ha a hőmérsékletet tovább emeljük, akkor egyre nagyobb relatív amplitúdójú gyors „burst” fázis jelenik meg. Mivel 25-30ºC-on a motor domén néhány perc alatt elveszti aktivitását, ezért magasabb hőmérsékleteken konvencionális *stopped flow*-val nem lehet enzim kinetikai méréseket végezni (a minta betöltése, és a mérés során „tönkremegy” az enzim). Egy általunk újabban kifejlesztett műszerrel (lásd függelék), amelyet *T-jump/stopped flow*-nak neveztünk el, extrém magas hőmérsékleteken is követni tudjuk az enzimreakciókat (*66*). Módszerünkkel tranziens enzimreakciókat akár a fehérje denaturációs hőmérséklete fölött is tudunk követni. A *T-jump*/*stopped flow*-val a W501+ és az ATP reakcióját 60ºC-ig tudtuk vizsgálni (a motor domén denaturációs hőmérséklete, amelyen az enzim néhány másodperc alatt elveszti *steady state* enzimaktivitását kb. 40 ºC) Ezeknek a méréseknek a segítségével a kezdeti gyors fázist meg tudtuk erősíteni, illetve részletesen elemezni (43. ábra és 44. ábra).



43. ábra W501+ reakciója ATP-vel *T-jump/stopped flow* készülékben 20ºC-on és 50ºC-on. 50 µM W501+- et kevertünk össze 1 mM ATP-vel 15ºC-on, és a keveréssel egyidőben emeltük a hőmérsékletet 20ºC-ra, illetve 50ºC-ra. A keverés és a hőmérsékletugrás 1 ms alatt történt. A keverés és a hőmérsékletugrás után követtük a reakcióelegy fluoreszcenciáját (gerjesztési hullámhossz 297 nm, emissziós filter 340 nm-es interferencia filter). A fekete görbék a mérésekre illesztett kettős exponenciálisok. Jól látható, hogy a hőmérséklet emelkedésével a gyors fázis amplitúdóaránya is emelkedik.



44. ábra A W501+ és az ATP reakciójakor történő fluoreszcencia változás fázisainak amplitúdói. A reakciókörülmények megegyeznek a 41. ábrán ismertetettekkel. Látható, hogy 55ºC-on az összamplitúdó már jelentősen csökken, ami a viszonylag gyors denaturáció következménye.

A gyors fázis amplitúdója fokozatosan emelkedik, és dominánssá válik. 55ºC-on a denaturáció sebessége összemérhetővé a kezdeti reakciólépések sebességeivel[10], majd 60ºC-on a denaturáció már gyorsabb, mint a kezdeti lépések sebességei, ezért nem látunk jelentős jelváltozást.

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy 18-20ºC körüli hőmérsékleten csak a „véletlennek köszönhetően" látunk egyfázisú reakciót, amikor a W501+-et összekeverjük nagy koncentrációjú ATP-vel. Mind alacsonyabb, mind magasabb hőmérsékleteken a reakció kétfázisúvá válik. Hogyan magyarázhatjuk ezt a jelenséget? Emlékeztetem az Olvasót, hogy az apo forma fluoreszcenciája 20%-kal magasabb a „le" állapoténál (ADP kötött komplex), míg a „fel" állapoté 80%-kal (ADP.ALF_4 komplex) magasabb. ATP-vel történő reakciókor a kétfázisú fluoreszcencia változás a *steady state* fluoreszcencia szintet megelőző előegyensúlyra utal. Ez a jelenség jól illeszkedik az AMPPNP-vel végzett kísérlet eredményével, ahol a nukleotid analóg megkötődése után ugyancsak egy gyors egyensúly kialakulását tapasztaljuk. Hasonlóan az ATP kísérlethez, AMPPNP esetében is alacsony hőmérsékleten fluoreszcencia csökkenés, magasabb hőmérsékleteken emelkedés történik. Tehát ATP kötődésekor is ki kell alakulnia egy előegyensúlynak, amely a nukleotid kötést követi, és hidrolízis lépést megelőzi. Mindezen megfontolások alapján a Bagshaw-Trentham semába egy új, egyensúlyi lépést illesztettünk, amelyet a 9. séma ír le (az ATPáz ciklust csak a hidrolízis lépésig mutatom be):

9. séma

Látható, hogy a Bagshaw-Trentham séma 3., hidrolízis lépése elé szúrtuk be az új lépést, amelyet 3a lépésnek, míg a valódi hidrolízis lépést 3b-nek neveztük el. Az ütközési komplex kialakulása után kialakul az alacsony fluoreszcenciájú „le" állapot. Ez a folyamat kvázi irreverzibilis, vagy összességében erős ATP kötést eredményez, valamint gyors (k_2 = 800-1000 s^{-1}). Ezt követi a 3a lépés, amely egyensúlyi lépés, és az egyensúly relaxációjának sebességi állandója hasonló a nukleotid kötéséhez (k_{3a+} + k_{3b-} = 800-1000 s^{-1}. Ezt az egyensúlyi lépést követi a viszonylag lassú hidrolízis lépés.

Vizsgáljuk meg, az ezen séma alapján lejátszódó folyamatokat és hasonlítsuk össze a kísérleti eredményeinkkel. Magas ATP koncentrációnál, alacsony hőmérsékleten a 2. és a 3a lépés sebessége hasonló, és a 3a

egyensúly erősen a $M^{\dagger}$.ATP állapot felé van eltolva. A W501+ és az ATP összekeverése után a ligandum kötés és a 3a egyensúly kialakulása gyorsan megtörténik, és a 3a lépés egyensúlyi állandója miatt, és amiatt, mert a 3b hidrolízis lépés viszonylag lassú, egy olyan előegyensúly alakul ki a 10. ms-ra, amelyben a $M^{\dagger}$.ATP populáció koncentrációja jóval meghaladja a M*.ATP koncentrációját. Ez a folyamat pedig fluoreszcencia csökkenéssel jár, mint azt a kísérletben is láttuk. A hidrolízis lépés sebességét (és nem a sebességi állandóját(!)) a 3b sebességi állandó és a M*.ATP koncentrációja határozza meg. Vagyis minél jobban a $M^{\dagger}$.ATP felé van eltolva a 3a egyensúly, annál kisebb a hidrolízis sebessége. Ennél fontosabb kérdés, hogy miért látunk lassú emelkedő fázist alacsony hőmérsékleten, ha a M*.ATP és a M*ADP.P_i fluoreszcenciája azonos? Amint kialakult az előegyensúly, a hidrolízis sebessége eléri maximumát, és egyre több M*.ADP.P_i keletkezik. Ez pedig azzal jár, hogy az előegyensúlyból folyamatosan pótlódik az elhasználódó M*.ATP. Mivel a M*.ADP.P_i-t követő lépés (4.) az ATPáz ciklus sebességmeghatározó lépése (amelyet a következő fejezetben bizonyítok), és sebessége több nagyságrenddel kisebb, mint az azt megelőző lépéseké, ezért az M*.ADP.P_i nagy fluoreszcenciájú populáció koncentrációja nő, amely folyamat a $k_{obs} =(k_{3b+} \times K_{3a}/(K_{3a} +1)) + k_{3b-}$ sebességi állandóval jellemezhető. A hőmérséklet emelésével a K_{3a} egyensúlyi állandó értéke nő, azért az ATP kötést követő előegyensúlyban (3a) nagy fluoreszcenciájú M*.ATP aránya nő a M†.ATP rovására, ezért a csökkenés amplitúdója egyre csökken. Amikor elérjük a 18ºC-ot, akkor a M*.ATP és a M†.ATP aránya pont akkora, hogy az egyensúlyi keverékük fluoreszcenciája a reakció kiindulási, apo enzim fluoreszcenciájával lesz azonos. Ebben az esetben tehát az ATP kötés után se gyors csökkenés, se gyors emelkedés nincs, hanem a fluoreszcencia a fent megadott sebességi állandóval jellemzett folyamatban emelkedik (k_{obs}=30 s^{-1}). Ha a hőmérsékletet tovább emeljük, akkor a kötés után közvetlenül (kinetikailag gyakorlatilag egyidőben) az előegyensúly úgy alakul ki, hogy a M*.ATP aránya a $M^{\dagger}$.ATP- hez képest olyan nagy lesz, hogy az előegyensúlyi keverék fluoreszcenciája magasabb, mint a kiindulási, apo populációé. Ennek kialakulása gyors (>500 s^{-1}), ezért a *stopped flow* kísérletben egy gyors emelkedést látunk, majd pedig a valódi hidrolízis a már fentebb említettek szerint zajlik, és kialakítja a tapasztalt viszonylagosan lassabb fázist.

A modellünket megerősítette az a kísérlet is, amikor olyan mutánsokban (K84M, R704E mutáns konstrukciók) mértük a 3a lépés egyensúlyi állandóit, amelyekben specifikusan, a szubdomének közötti kölcsönhatások erősítésével akadályoztuk a konverter domén relatív

elmozdulását a motor domén N-terminális szubdoménjéhez képest, és azt tapasztaltuk, hogy valóban csökkent a K_{3a} értéke (lásd függelék és (*67*)).

Remélhetőleg az Olvasó kedvét nem vettem el a továbbiaktól ezzel a fejtegetéssel, Azt akartam bemutatni, hogy a tudományos kritériumok alapján a folyamatokat a lehető legegyszerűbb modellel kell leírni (Occam borotvája elv szerint), valamint azt, hogy egy ilyen lehető legegyszerűbb folyamat levezetése és megértése odafigyelést igénylő intellektuális tevékenység. Azt is kiemelném, hogy a folyamatok pontos átgondolása azért is fontos, mert igen könnyen tévútra kerülhetünk, ha nem vagyunk körültekintőek. A fenti esetben könnyen ilyen tévútra kerülhettünk volna, ha azt állítjuk, hogy alacsony hőmérsékleten azért van fluoreszcencia csökkenés, mert a kötéskor kialakuló alacsony fluoreszcenciájú populáció előbb keletkezik, mint a magas fluoreszcenciájú M*.ATP. Pedig pont arról van szó, hogy ezzel kinetikailag egyidőben alakul ki az előegyensúly[11]. Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a *switch2*/relé/konverter/erőkar komplexum felhúzása az ATP kötődése után történik meg, de megelőzi a hidrolízis lépést. Ez a lépés valódi, stabil szerkezeti állapot. Kialakulása egyrészt azért fontos, hogy szerkezetileg felhúzott állapotba kerüljön a miozin erőkarja. Másrészről pedig Rayment és mti (*18*) kimutatta, hogy kizárólag a M* állapot képes hidrolizálni az ATP-t, az $M^{\dagger}$ állapot nem. Ugyanakkor a későbbiek szempontjából két fontos dolgot szeretnék az Olvasó emlékezetébe vésni: 1. az erőkar felhúzása nem „energetizálja” a miozint, hiszen a 3a egyensúly alacsony szabad energia különbségű ($K_{3a} \approx 1$) 2. Ez az egyensúly, vagyis a miozin nagy konformációs átalakulása az ATP-komplexben igen gyors egyensúly, a ciklus egyik leggyorsabb lépése.

Részletesen megvizsgáltuk az aktin hatását az erőkar felhúzó (3a) és a hidrolízis (3b) lépésekre. Jelen dolgozatban nem részletezem azokat a

---

[11] Természetesen nem akarok itt demonstrálni egy hibás levezetést – amelyet mindenki maga megtehet annak érdekében, hogy lássa, mindez hova vezet –, hanem arra szeretném felhívni a figyelmet, hogy a folyamatokat folyamatokként kell tekinteni, és nem pedig igen-nem történésekként (pl. egy egyensúly kialakulása tipikusan egy nem igen-nem esemény). Sajnos a mai molekuláris biológiában és a szerkezeti szemlélet által átitatott biokémiában, enzimológiában nagyon gyakran igen-nem válaszokkal törődnek csak, és nem folyamatában szemlélik az eseményeket. Erre jó példát szolgáltatnak azok az enzimciklusokat leíró folyamatábrák, amelyek egymás mögött feltüntetik az egyes szerkezeteket, és kizárólag ezen keresztül próbálnak biokémiai folyamatokat magyarázni. Különösen félrevezető, amikor ezeknek a szerkezeteknek az egymás után rakásából filmet készítenek. Nem szakterületem, de az az érzésem, hogy a szignáltranszdukciós folyamatok, kaszkádok leírását is nagyon erősen limitálja, hogy az egyes elemeket csak úgy veszik figyelembe, hogy azok be vannak-e kapcsolva vagy nincsenek.

kísérleteket, amelyekkel ezt megtettük, mert igen bonyolult, hosszadalmas és nagy kitartást igénylő kísérletsorozat volt (*68*). Kiemelem viszont a kísérletek konklúzióját, amely az alább ismertetendő kísérletek szempontjából nagyon is fontos. Arra az eredményre jutottunk, hogy az aktin a 3a és a 3b lépést (9. séma) nem befolyásolja lényegesen, hatása kisebb, mint kettes faktorral jellemezhető hatás. Ebből az is következik, hogy az ATP kötéstől a hidrolízis befejeztéig (1-től 3b lépésig) aktin nélkül és aktinnal is ugyanolyan mechanizmussal zajlanak a folyamatok a relé-konverter régióban (*68;69*).

Mint a bevezetőben írtam, előállítottunk olyan kiméra motor domén konstrukciókat, amelyek az N- és C-terminálison különböző hullámhosszal emittáló fluoreszcens proteineket tartalmaztak. Ezeket a kísérleteket részleteiben nem mutatom be ebben a dolgozatban, mert olyan technikai problémák sorozatát kellett megoldanunk amelyek meghaladják ezen írás kereteit (*36*). Mindazonáltal azt a konklúziót levonhattuk, hogy az erőkar mozgása és a relé régió mozgása szorosan kapcsolt. Ezt a kijelentést tökéletesen alátámasztják a motor domén atomi szerkezetei is, mert a relé/konverter régió egységes, közös hidrofób klaszterrel rendelkező szerkezeti blokkot alkot az erőkar gyökerével.

Körbeutaztuk a motor domént, és megvizsgáltuk, hogy az egyes funkcionális régióknak milyen állapotaik vannak, ezek az állapotok milyen egyensúlyi viszonyokat alakítanak ki. Ezekben a folyamatokban sok funkcionális folyamatot jellemeztünk, és megértettük ezek együttműködését.

A legfontosabb volt ebből a szempontból, hogy részleteiben megismertük a *switch 1* és az aktin kötés összefüggését, ezáltal megértettük, hogy ADP jelenlétében miért erős az aktin kötődése a miozinhoz, és ATP-ben miért válik ez a kötés gyengévé.

Továbbá kirajzolódott, hogy aktin távollétében mi a különbség a *switch 1* és a *switch 2* régió mozgásai, konformációs egyensúlyai között. A *switch 1*-ben ADP jelenlétében (vagyis amikor a γ-foszfát kötőhely üres) egyensúly alakul ki két állapot között, míg a *switch 2* hurok és a hozzá kapcsolódó konverter/relé régiók akkor alakítanak ki két állapot (nyitott-zárt, „le”-„fel” állapotok) közötti egyensúlyt, amikor a kötőhelyben ATP vagy ADP.P_i van. Ilyen értelemben antagonisztikus a két hurok működése aktin távollétében. Azonban aktin kötésekor a *switch 1*-ben megváltoznak az egyensúlyi viszonyok, és ATP-ben alakul ki a nyitott-zárt egyensúly, míg az ADP forma egyetlen állapotúvá válik. Tehát aktin távollétében a két

hurok működése antagonisztikus, míg az aktin kötődése után működésük hasonlóvá válik.

A mechanizmus szempotjából ugyancsak egy nagyon fontos megállapítást tehetünk: A hidrolízis lépés és az azt megelőző „felhúzási lépés egyensúlyi folyamatok, tehat ezeken keresztül a miozin nem kerül felajzott álapotba mint a nyíl húrja a megfeszítéskor (lásd 2.2.1. fejezet). Tehát a Lymn Taylor modell ebből a szempontból nem állja meg a helyét, a folyamatokat más mechanizmusok hajtanak. Melyek ezek a folyamatok, erre kapunk választ a következő fejetekben.

Ezekután feltehetjük a kérdést, hogy hogyan is történik az aktomiozin rendszer legfontosabb lépése, a munkaütem?

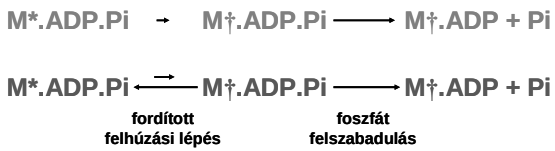
2.4.6 Hatodik állomás: A munkaütem mechanizmusa

Mostanáig nem volt közvetlen kísérleti megközelítésünk és eredményünk a hidrolízist követő és a foszfát felszabadulást megelőző lépésekről, azok mechanizmusáról. A kérdést szerkezeti oldalról sem sikerült megközelíteni, nem sikerült egyetlen szerkezetet sem közvetlenül ezekhez az állapotokhoz rendelni. Igazából azonban ez nem is szerkezeti probléma, mert amíg nem ismerjük a mechanizmust, nem is tudjuk, minek a szerkezetét keressük.

Mik is a munkaütem mechanizmusával kapcsolatos kérdéseink, és mi ezeknek a kérdéseknek a jelentősége? Már 1972-ben Bagshaw és Trentham feltételezte, hogy a hidrolízis lépést egy konformáció változás követi [12], és ez a lépés a foszfát felszabadulástól elkülönülő lépés. Mindazonáltal a legutóbbi időkig semmilyen közvetlen kísérleti bizonyítékunk nem volt ennek létére. Ha létezik is ez a lépés, akkor is több lehetőség létezik arra, hogy a fordított felhúzási lépés hogyan viszonyul a foszfát felszabadulás lépéshez. Azt tudjuk, hogy a két lépés (ha kettő

[12] Ezen a helyen új nomenklatúrát kell bevezetnünk, mert eleddig komoly ellentmodásokat okozott a régi. A 3a lépést erőkar felhúzási lépésnek (*recovery step*) nevezzük. Az 4. lépés elvileg a 3a lépés megfordítottja, azonban mégsem nevezhetjük munkaütemnek, mert munkaütem csak aktinhoz kötött állapotban értelmezhető. Mint később látni fogjuk, aktin nélkül az 4. lépésben nem is lehet erőt generálni. Éppen ezért ezt a lépést fordított felhúzási lépésnek (*reverse recovery step*) nevezzük. Az ezzel analóg lépést munkaütemnek kizárólag aktinkötött állapotban hívjuk ezentúl. Megjegyzem, hogy azzal, hogy a 3a és az 4. lépést lépésnek (*step*) nevezzük és a munkaütemet ütemnek (*working stroke*), azzal azt fejezzük ki, hogy előbbiek nem generálnak mechanikai erőt vagyis nem végeznek munkát, utóbbi pedig képes erre.

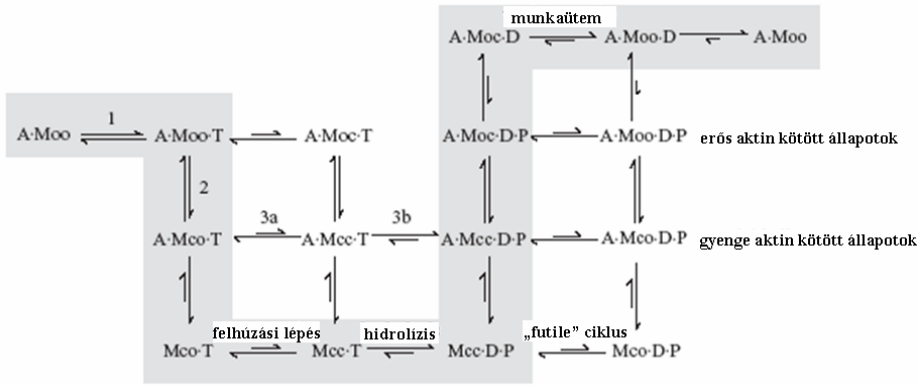
létezik) közül az egyik, vagy a kettő valamilyen egyensúlyi kombinációja az ATPáz ciklus sebességmeghatározó lépése. Például az alább látható két séma (10. séma) gyakorlatilag ekvivalensen működik, ha az ATPáz ciklust *steady state* körülmények között vagy akár tranziens módszerekkel vizsgáljuk.



10. séma

Az első esetben a fordított felhúzási lépés a sebességmeghatározó lépés, amely az eddigi megközelítésekkel kísérletesen megkülönböztethetetlen a második esettől, amikor a fordított felhúzási lépés egy gyors M*.ADP.P_i felé eltolt egyensúly, amit irreverzibilis foszfát felszabadulás követ. Ezektől az esetektől ugyancsak nem megkülönböztethető az sem, ha a két esemény nem különálló, hanem egyetlen lépésben történik. Nyilvánvalóan a legfontosabb kérdés egy enzimciklus mechanizmusában, hogy melyik a sebességmeghatározó lépés. A miozin esetében azért is fundamentális kérdés, mert az aktin az ATPáz ciklus sebességét két nagyságrenddel megnöveli, és ez a gyorsítás (miozinos szlengben aktiválás) nyilvánvalóan a sebességmeghatározó lépésnél történik. A kérdés érdekessége, hogy mindezideig nem tudtunk még spekulatív magyarázatot sem adni arra az általános jelenségre, hogy a miozin (és a legtöbb *P-loop* NTPáz motor) ATPáz ciklusát miért gyorsítja az aktin (illetve a partner fehérje). Olyan általános jelenségről van szó, hogy ez nem lehet véletlen. Végül, de nem utolsó sorban, azért is fontos az ATPáz ciklus ezen szakaszának megfejtése, mert nem tudjuk, hogy az aktin mikor és hogyan kötődik a miozinhoz. Hiszen effektív munkaütem csak aktinhoz kötött formában történhet.

Az alábbi séma (11. séma) leírja azt, hogy hogyan képzeltük el az ATPáz ciklust és a munkaütem mechanizmusát. A miozin mellett elhelyezkedő indexek első tagja a *switch 1*, a második a *switch 2* állapotát jelzi (o = nyitott, c = zárt).



11. séma (A: aktin, M: miozin, T: ATP, D:ADP, c: zárt állapot, o: nyitott állapot. Az M utánio indexben az első betű a switch1 a második betű a switch2 hurok állapotát jelzi)

A sémában a szürke sáv az ATPáz ciklus fő útvonalát mutatja, ahogy azt mostanáig a legtöbb kutató gondolta.. Az általános elképzelés az volt, hogy az aktin közvetlenül a foszfát felszabadulást gyorsítja, és a munkaütem akár az ADP állapotban akár az ADP.Pi állapotban történik, de erős aktinkötött állapotban. Harmadik tulajdonsága az elképzelésnek, hogy az egyes állapotok egymásutániságát, hogy azok az effektív ciklusnak megfelelő sorrendben következzenek a termodinamikai egyensúlyok biztosítják.

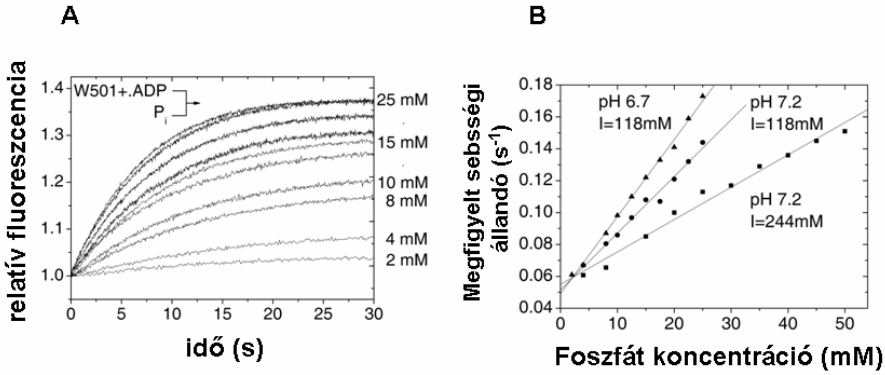
2.4.6.1 Az ATPáz ciklus lejátszása visszafele

A fenti lépések vizsgálatára új kísérleti megközelítést alkalmaztunk. Úgy gondoltuk, hogy ha elég nagy koncentrációban adunk inorganikus foszfátot és ADP-t a motor doménhoz, akkor az ATPáz ciklus lejátszatható visszafele. Különösen annak fényében reméltünk sikert arra vonatkozóan, hogy az 4. és 5. (Bagshaw-Tranthem séma, 1. séma) lépést elkülöníthetjük, hogy a konformáció változásra óriási fluoreszcencia változással reagáló W501+ konstrukciót használjuk. Ez a nagy érzékenységű rendszer még az esetlegesen kismértékű reakció kimutatására is alkalmas. Továbbá a W129+ konstrukcióval is terveztük a kísérletek lejátszását, ezáltal külön tudjuk nagy érzékenységgel, specifikusan kimutatni a ligandum kötődést, és mellette detektálni a relé konformáció változását a Trp-501-en keresztül.

A reakció visszafele lejátszódását Goody és Mannherz a hetvenes években sikeresen bizonyította radioaktív foszfát segítségével (*41;42*). Kimutatták, hogy még a hidrolízis lépés is lejátszódik visszafele, és újonnan szintetizált miozinhoz kötött ATP-t mutattak ki. Természetesen ezeket a folyamatokat nem tudták konformációlépésekhez rendelni, a mechanizmusról csak annyit sikerült mondaniuk, hogy a foszfátkötés másodrendű folyamat révén történik, és nem láttak további elsőrendű folyamatot (*42*).

Első kísérletünkben vizsgáljuk meg, hogy hogyan változik a fluoreszcencia, ha W501+-t összekeverünk különböző koncentrációjú foszfát oldattal *stopped flow*-ban. A foszfátot 2-50 mM-os koncentrációtartományban adjuk a miozinhoz, amely foszfát mennyiség már nagymértékben befolyásolja az oldat ionerejét. Éppen ezért a kísérletben gondoskodnunk kell az ionerő állandóan tartásáról, mert a foszfátkötést jelentősen befolyásolja az ionerő (*42;70*)(45. B ábra)[13].

[13] További gondot jelentett, hogy ha a miozint összekevertük nagyobb koncentrációjú foszfáttal, akkor a miozin aktivitása megváltozott oly módon, mintha valamilyen szubsztancia lett volna a foszfát oldatban, ami kompetitíven gátolta az enzimet. Nagy mennyiségű ATP-t nem tudott leszorítani ez az anyag, de a nagyságrendekkel gyengébben kötődő ADP-t igen. Ez a probléma sok fejtörést okozott számunkra. A foszfát oldat kis koncentrációban tartalmaz a miozinhoz igen erősen kötődő pirofoszfátot, ami gátolta az ADP kötést. Ezt ki is mutattuk foszfát NMR kísérletekkel, és kidolgoztunk egy egyszerű módszert a kis mennyiségű pirofoszfát eliminálására. Ennek részletes leírását megtalálja az Olvasó a (*70*) közleményben. Annyit fontos megjegyezni, hogy mivel a foszfátkötés igen általános és fontos jelensége különböző enzimfolyamatokban, és a foszfát általában gyengén, míg a pirofoszfát legtöbbször erősen kötődik ezekhez az enzimekhez, ezért ilyen típusú kísérleteknél érdemes gondolni a nyomnyi mennyiségben jelenlévő pirofoszfátra, hogy elkerüljük az esetleges műtermék eredményeket, illetve az ezekből levont téves interpretációkat.

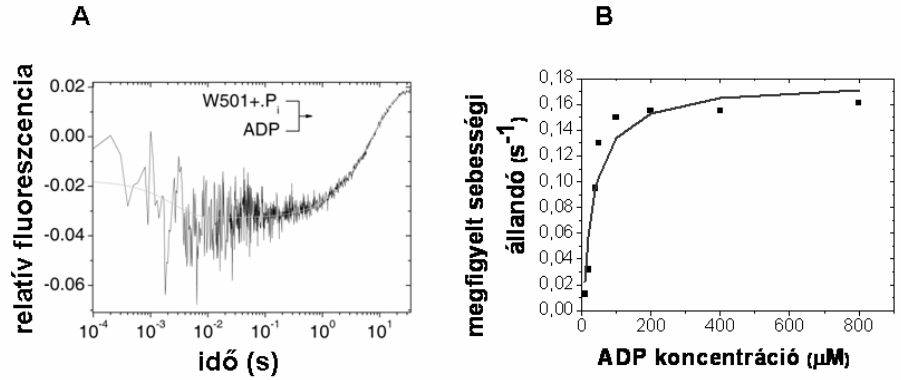


45. ábra W501+.ADP komplex reakciója inorganikus foszfáttal. **A.** 2 μM W501+-t előinkubáltunk 1 mM ADP-vel, majd különböző koncentrációjú foszfát oldattal kevertük össze *stopped flow*-ban, és követtük a fluoreszcencia változást I = 118 mM ionerőn és 20ºC-on (gerjesztési hullámhossz 297 nm, emissziós filter 340 nm-es interferencia filter). A kísérletek során az ionerőt végig állandó szinten tartottuk, az összekeverendő két oldat ionereje is megegyezett. A különböző ionerejű foszfát oldatokhoz annyi NaCl oldatot adtunk, hogy az ionerő 118 mM , illetve 244 mM-os legyen. Ennek következtében a maximális foszfát koncentráció 25 mM , illetve 50 mM lehetett. Az oldatok ezenkívül tartalmaztak 10 mM HEPES pH 7,2-t (, illetve pH 6,7), 5 mM $MgCl_2$-ot és 1 mM merkaptoetanolt. A fluoreszcencia emelkedés görbékre egyszeres exponenciális függvények illeszthetők. **B.** A függvényillesztésekből származtatott megfigyelt sebességi állandók a foszfát koncentráció függvényében 118 mM ionerőn, pH 6,7-en, 118 mM ionerőn, pH 7,2-n , illetve 244 mM ionerőn, pH 7,2-n.

10 mM-os koncentráció nagyságrendben foszfátot keverve a W501+.ADP-hez jelentős (40%) fluoreszcencia emelkedést láthattunk (45. ábra) (ha ADP nélküli W501+-hez kevertünk foszfátot, akkor enyhe fluoreszcencia csökkenés történik (adatokat nem mutatom)). A kísérletek tehát azt mutatták, hogy sikerült visszafele lejátszatni az ATPáz ciklust, és annak előrehaladását a Trp-501 szenzoron keresztül követnünk. A fluoreszcencia emelkedés a mért koncentráció tartományban egyfázisú. Az amplitúdó és a megfigyelt sebességi állandók nőnek a foszfát koncentráció emelkedésével. A megfigyelt sebességi állandó a mért foszfátkoncentráció tartományban nem telítődött, ezért koncentrációfüggésére egyenest illeszthetünk, habár magas koncentrációtartományban némi jele mutatkozik, hogy a sebességi állandó valamilyen értékhez tart (0,2 s^{-1}). Ez a tartomány azonban nem volt elegendő, hogy ezt bizonyossággal állíthassuk, arra pedig végképp nem, hogy meg is határozzuk ezt az értéket. Az amplitúdó növekedés hiperbolát ír le. Ebben a foszfát koncentrációban mért

paraméterek összkaraktere alapján mindössze egy egylépéses, másodrendű foszfátkötést tudunk leírni, amelyben a foszfát disszociációs állandója K_d = 14,5 mM, a foszfátkötés sebességi állandója 0,0036 $mM^{-1}s^{-1}$, disszociációjának sebességi állandója 0,052 s^{-1} (részletesen lásd a függelékben). Azontúl, hogy a relé mozgását is detektáltuk a foszfátkötés során, a paramétereket illetően ezzel a kísérlettel ott tartottunk, ahol annak idején Goody és Manherz (*41;42;70*).

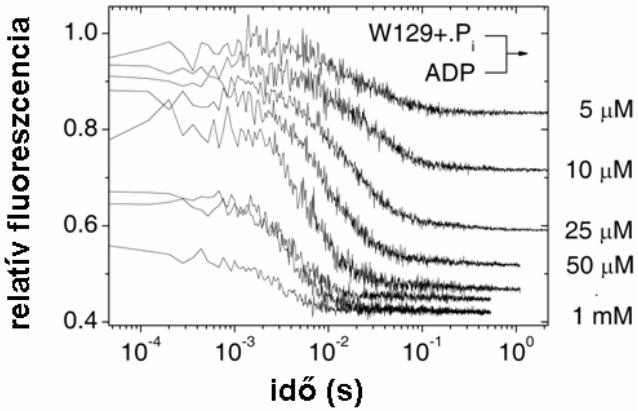
Mivel mi a konformációváltozásokat detektáltuk, ezért a kísérleti rendszerünk megengedte, hogy a kísérlet inverz módját is elvégezzük. Ez alatt azt értem, hogy a W501+ előinkubációja nem ADP-vel, hanem foszfáttal történt, és azután a W501+.Pi komplexet ADP-vel kevertük össze *stopped flow*ban (46. ábra).



46. ábra W501+.Pi komplex reakciója ADP-vel. **A.** 2 μM W501+-t előinkubáltunk 25 mM foszfáttal pH 7,2-n, I = 118 mM ionerőn 20ºC-on. Ezt az oldatot 500 μM ADP-vel kevertük *stopped flow*-ban és követtük a fluoreszcencia változást (gerjesztési hullámhossz 297 nm, emissziós filter 340 nm-es interferencia filter). **B.** A fenti reakciót különböző ADP koncentrációknál elvégeztük. A mérési görbékre két exponenciális függvényt illesztettünk, egy gyorsabb csökkenő és egy lassabb növekvő fázist. Az ábrán a növekvő fázisok megfigyelt sebességi állandóit ábrázoltam az ADP koncentráció függvényében. Az így kapott pontokra hiperbolát illesztettünk (fekete vonal).

A mérési görbék karakterisztikája igen érdekes és informatív. Egy gyors (~500 s^{-1}) kb. 10% csökkenő fázist követ egy lassú fluoreszcencia emelkedés. Az ADP koncentráció függvényében az emelkedő fázis amplitúdója is és a sebességi állandó is növekszik. A sebességi állandó 0,2 s^{-1} körüli értéken telítődik. Mielőtt ezekből a kísérletekből elkezdjük felépíteni a modellünket, nézzük meg, hogy a ligandum kötés hogyan történik. Ennek tanulmányozására a W129+ konstrukciót használhatjuk. Ha a W129+-t előzőleg 25 mM foszfáttal inkubáltuk, majd ADP-vel

összekevertük *stopped flow*ban, egyfázisú fluoreszcencia csökkenést kaptunk (47. ábra).

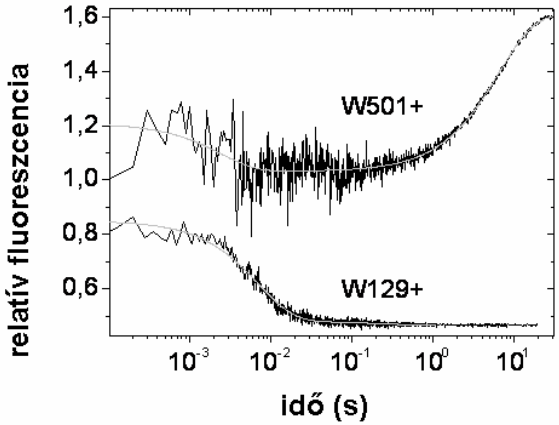


47. ábra W129+.Pi reakciója ADP-vel. A 44. ábrán bemutatott kísérlettel megegyező körülmények között végeztük el a kísérletet W129+-on. Mind az amplitúdó, mind a reakció sebessége nőtt az ADP koncentrációjának növelésével. Megjegyzem, hogy nagy ADP koncentrációknál a reakciósebesség olyan mértékű, hogy az amplitúdó jelentős része elvész a mérés holtideje alatt. A mérés számolt paraméterei megtalálhatók a függelékben.

Tehát jól tudjuk követni az ADP kötést foszfát jelenlétében a W129+ jelváltozásának segítségével. A foszfát és az ADP kötést részletesen feltérképeztük (70) (illetve Függelék F.9). Ezeket az eredményeket jelen dolgozatban nem taglalom, hogy ne veszítsük szem elől a célt: meghatározni a fordított felhúzási lépés mechanizmusát.

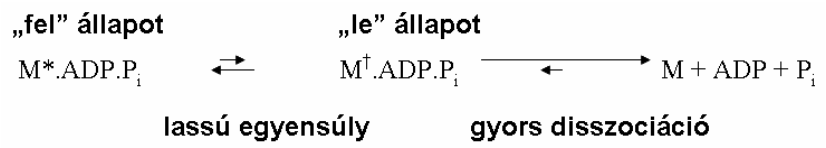
2.4.6.2 A fordított felhúzási lépés

Tehát ugyanazt a reakciót, vagyis az ATPáz ciklus fordított lejátszását két különböző régióban elhelyezkedő szenzorral követtük. Itt az ideje, hogy összehasonlítsuk a két eredményt. A 48. ábrán ugyanazon a grafikonon mutatom be a két reakció lefutását.



48. ábra A Trp-501 és a Trp-129 fluoreszcencia változásainak összehasonlítása ugyanolyan reakció körülmények között visszafele lejátszatott ATP-áz reakcióban. A reakciókörülmények megegyeznek a 46. és a 47. ábrán leírtakkal.

Jól látható, hogy a mindkét szenzor érzékeli a nukleotid kötést, mint azt régebbről is tudjuk, amikor az ADP és az ATP kötését vizsgáltuk foszfát jelenléte nélkül. Ugyanakkor nagyon érdekes, hogy a W501+ nagy fluoreszcencia emelkedése, ami a relé/konverter „le” állapotba kerülését jelzi, igen lassú reakció, a *steady state* ATPáz sebességi állandójához hasonló, habár annál valamivel gyorsabb. Mindebből levonhatjuk a következtetést, hogy a visszafelé lejátszódó ATPáz ciklus a következő mechanizmus szerint zajlik:



12. séma

Vagyis a ligandumok kötődése[14] után egy lassú izomerizáció jön létre, amelyet csak a relé-ben elhelyezkedő Trp-501 érzékel. Független kísérletekkel meghatároztuk ennek a lépésnek az egyensúlyi állandóját, ami K = 0,33. Mivel ismerjük az egyensúlyi állandót és ennek a lepésnek a megfigyelt relaxációs sebességét, abból kiszámítható, hogy a „le" → „fel" irányú sebességi állandó 0,15 s^{-1}, míg a „fel" → „le" irányú 0,05 s^{-1}. Ez utóbbi majdnem megegyezik a *steady state* ATPáz reakció sebességi állandójával.

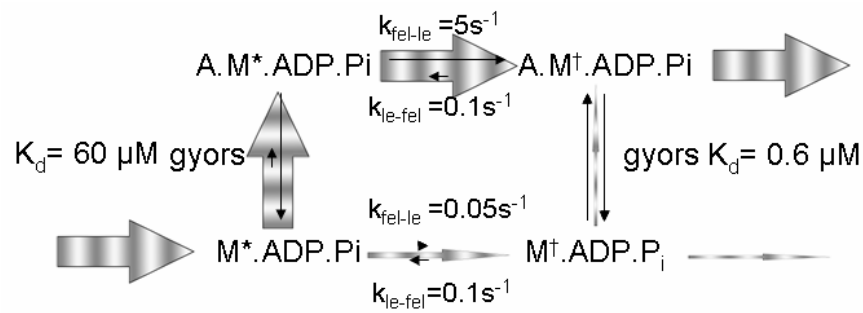
Mindezzel el is érkeztünk arra pontra, hogy felderítettük, mi az ATPáz ciklus sebességmeghatározó lépése, az hogyan kapcsolódik más folyamatokhoz. A hidrolízis lépés után egy lassú konformációs egyensúly következik, amelynek előre irányuló reakciójának sebességi állandója 0,05 s^{-1}. Ez a lépés határozza meg a ciklus *steady state* sebességi állandóját, mert a $M^{\dagger}.ADP.P_i$ populáció koncentrációja elhanyagolható *steady state*-ben, hiszen alacsony foszfát koncentrációnál igen gyors disszociáció (250 s^{-1}) következik be, és az alacsony foszfát kötési állandó (<100 M^{-1}) miatt foszfát visszakötődés sem történik. Mint már tudjuk, *steady state*-ben a $M^*.ADP.P_i$ relatív mennyisége ~80% a teljes enzimmennyiséghez képest, ezért a sebességmeghatározó lépés megfigyelt sebességi állandója 0,8×0.05 s^{-1} = 0,04 s^{-1}, ami megegyezik a *steady state* ATPáz sebességi állandóval. Tehát a sebességmeghatározó lépés nem a foszfát felszabadulás, hanem az azt megelőző „fel" → „le" konformációs egyensúlyi lépés, vagyis a fordított felhúzási lépés. Érdemes itt megjegyeznem, hogy ez a lépés nem lehet munkaütem, mert nem jár jelentős szabadenergia változással, tehát munkavégzésre nem alkalmas. Ezzel arra a régi kérdésre is választ kaptunk, hogy aktin távollétében képes lehet-e a miozin az erőkarján keresztül erőgenerálásra, illetve munkavégzésre. Ebből is látható, hogy az 4. lépést miért nem neveztem munkaütemnek, és helyette miért is választottam a kicsit nyakatekert – de logikus – elnevezést, a fordított felhúzási lépés nomenklatúrát.

---

[14] Az ADP és a foszfát kötésének, illetve leválásának mechanizmusát is meghatároztuk ezekből a kísérletekből. A mechanizmus sémáját a függelékben bemutatom (F.9.). Itt annyit jegyzek meg, hogy ennek a mechanizmusnak az a jelentősége, hogy megmutatja, hogy a foszfát vagy az ADP disszociál-e le előbb az ATPáz ciklus során. Ennek eldöntésére eddig csak közvetett kísérletek szolgáltak. Igen meglepő módon azt tapasztaltuk, hogy a *Dictyostelium* miozin II esetében az ADP disszociál le először és csak utána a foszfát. Ebből viszont az következik, hogy az utóbbi években spekulált „*backdoor*" mechanizmus – ami a korábbi foszfát felszabadulást akarta szerkezeti alapon magyarázni – újragondolásra szorul.

2.4.6.3 A lassú konformációátmenet következményei

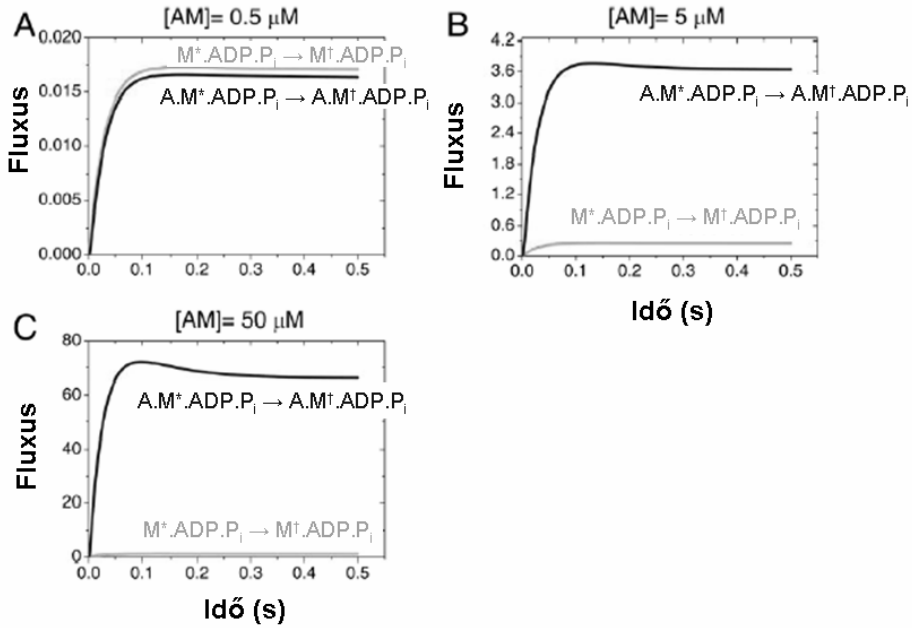
Elérkeztünk arra a pontra, hogy megvizsgáljuk, hogy mi az aktin hatása a sebességmeghatározó lépésre. Régóta ismerjük, hogy az aktin legalább két nagyságrenddel gyorsítja a *steady state* aktivitást ($k_{max} = 5\ s^{-1}$). Akkurátus mérésekkel ugyancsak meghatároztuk, hogy a M*.ADP.AlF_4 komplex – amely analógja a M*.ADP.P_i komplexnek – aktin kötése gyenge, K_d = 60 μM (a mérés részletes leírását lásd (*70*)). Az M*.ADP.AlF_4 és a M*.ADP.P_i hasonló aktinkötési tulajdonságát megerősíti az a tény, hogy a domináns populáció aktomiozinban is a M*.ADP.Pi, és az aktin aktiválási reakció aktin koncentrációra vonatkoztatott K_M értéke ugyancsak ~ 60 μM. Azt is tudjuk, hogy az aktin kötése gyors folyamat (>100 s^{-1}). A fenti kísérleteinkből egyértelműen levonhatjuk azt a következtetést, hogy az aktin a sebességmeghatározó lépést, vagyis a M*.ADP.P_i = $M^{\dagger}$.ADP.P_i egyensúlyt gyorsítja és tolja el a jobb oldali irányba. Írjuk fel a legegyszerűbb mechanizmust, ami ezekből a megfontolásokból következik (13. séma).



13. séma

A vékony nyilak mérete hozzávetőlegesen jelzi a sebességi állandó viszonylagos nagyságát, míg a vastag nyilak szélessége a reakció fő útvonalát mutatja. Mi határozza meg a reakció lefutásának fő fluxusát? Mint látjuk, az M*.ADP.P_i komplex csak igen gyengén köti az aktint. Hogyan lehetséges mégis, hogy aktinkötött állapotban történik meg a munkaütem? Ennek az az oka, hogy aktin távollétében a konformációs átalakulás sebessége sokkal-sokkal lassabb, mint az aktin kötés, illetve az aktinkötött állapotban történő munkaütem. Tehát annak ellenére, hogy termodinamikailag kedvezőtlen a munkaütem felé venni az irányt (gyenge az aktinkötés), kinetikai okok miatt mégis a reakció fő fluxusa ebbe az

irányba halad még kis aktinkoncentráció esetében is. A fenti mechanizmust komputeren is szimuláltuk, amelynek eredményét a 49. ábra mutatja be:



49. ábra A 13. sémában bemutatott mechanizmus komputeres szimulációja különböző aktin koncentrációknál. A szürke görbék a M*.ADP.Pi = $M^{\dagger}$.ADP.Pi, a fekete görbék a A.M*.ADP.Pi = A.$M^{\dagger}$.ADP.Pi folyamatok fluxusának időbeli lefutását mutatják az ATP miozinhoz történő keverése után 0,5 μM, 5 μM és 50 μM aktin jelenlétében.

Látható, hogy annak ellenére, hogy az aktin csak K_d=60 μM disszociációs állandóval kötődik a miozinhoz, már ennél az értéknél két nagyságrenddel kisebb aktin koncentrációnál (0,5 μM) is a fluxus 50%-a az aktin kötött formákon keresztül történik. 5 μM aktin jelenlétében ez az arány 95%, míg 50 μM aktin koncentrációnál >99%.

Ennek a mechanizmusnak három közvetlen következménye van:

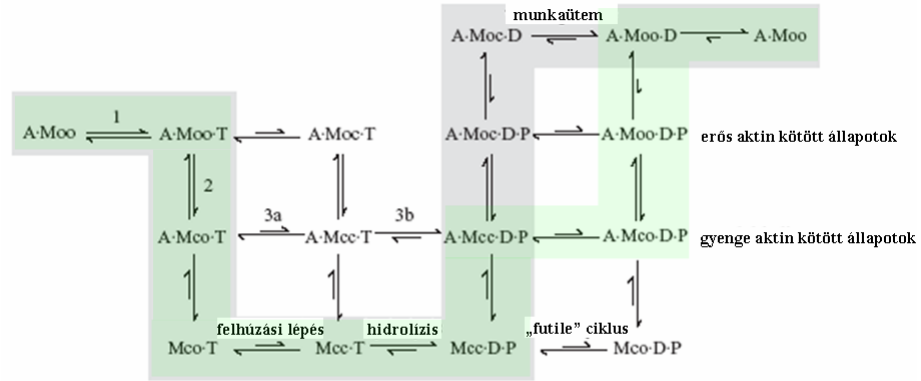
Az első az – és ebben rejlik egyik szépsége is –, hogy amiatt, hogy a munkaütem előtt a rendszer egy termodinamikailag kedvezőtlen irányba van kényszerítve, a rendszert ez a jelenség a munkaütemre legalább 11 kJ/mol szabadenergia növekedéssel „energetizálja”, amely energia a munkaütemben szabadul fel, hiszen az aktinkötés lépésről lépésre erősebb

lesz (lásd az aktin kötés értékeket a 13. sémában). Régen is sokszor hangoztatták, hogy az aktin kötése a rigor állapotban, illetve a miozin ADP komplexéhez olyan erős, hogy az valahogy felhasználódik az erőgenerálásban, de nem tudták, hogyan.

A másik következmény, hogy megmagyarázza, mi is az „értelme” az aktin aktiválásnak.

A harmadik következmény pedig az, hogy magyarázatot ad arra, miért nem kötődik a miozin az aktinhoz a felhúzási lépésben (3a), hiszen gyakorlatilag szerkezetileg és aktinkötési tulajdonságban azonos miozin formák vesznek részt a 3a lépésben és az 5. lépésben. Ennek az az oka, hogy a felhúzási lépés igen gyors (a leggyorsabb a ciklusban), ezért a folyamat nem irányítódik az aktinkötött formák felé, mint a 4. lépésnél. Ha a kedves Olvasó hajlandó volt végigrágódni a fejtegetéseken eddig a pontig, akkor most láthatja, miért is volt fontos megfejteni a felhúzási lépés és a hidrolízis lépés mechanizmusát. Az izgalmas a kutatásban az, hogy ezt mi is csak most láthattuk meg, a legutóbbi időkben nyílt ki az egész jelenségkör szépsége előttünk.

Összefoglalásként tekintsük át röviden, hogy hogyan működik az aktomiozin rendszer munkaüteme, és milyen változásokat hoztak kísérleteink a korábbi elképzelésekhez képest. Az alábbi (14.) sémába zöld sávval berajzoltam az új útvonalat, amelyen végighalad az ATPáz reakciósor.



14. séma

A fundamentális különbség szembeötlő a régi (11. séma) és az új modell között. Korábban úgy képzelték, hogy kizárólag az egyes reakciók egyensúlyi viszonyai határozzák meg az útvonalat (szürke sáv), míg kísérleteink azt mutatják, hogy a munkaütem felé a rendszert kinetikai okok

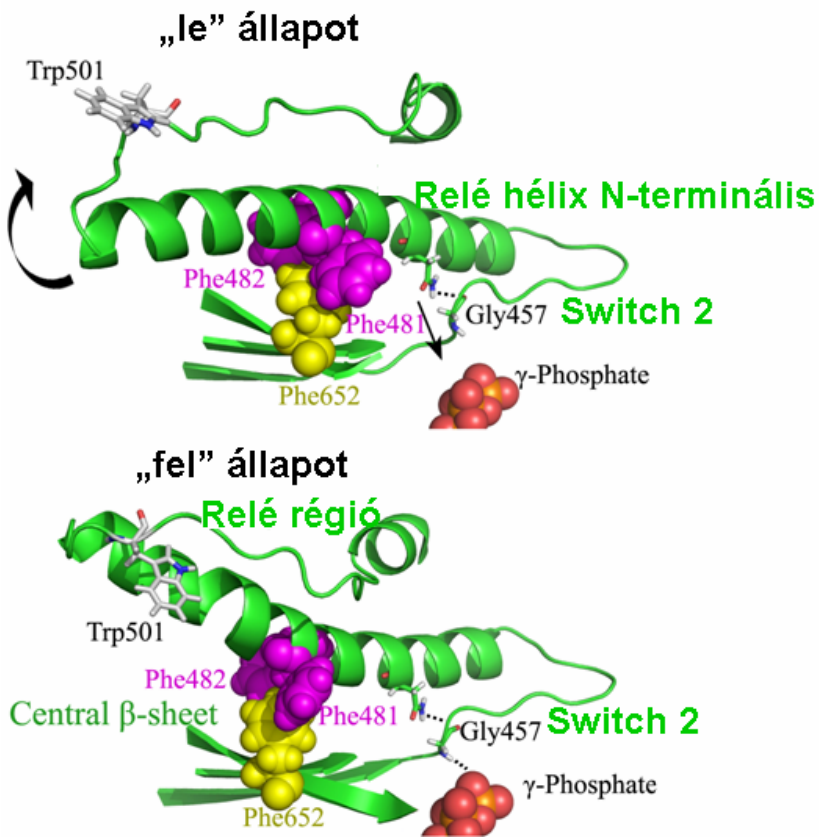
hajtják a termodinamikailag kedvezőtlenebb molekula-komplex populációk felé. Az új modell szépsége abban rejlik, hogy jól látszik, hogy a molekuláris motorok nem úgy működnek, ahogy azt egy mérnök megtervezné. Ha elképzelünk egy autót, akkor abban nincs analóg folyamat ahhoz, hogy a rendszert termodinamikailag kedvezőtlen helyzetbe hozva „energetizáljam” azt. Egy ember által tervezett motorban ok-okozati viszonyok vannak, míg egy molekuláris motorban az egyik legfontosabb eseményt statisztikus folyamatok vezérelnek. Számomra igen izgalmas kérdés az, hogy mi ennek az oka. Vajon ennek a különbségnek szükségszerűen oka-e, hogy az autó makroszkopikus szinten épült, míg a molekuláris motor atomi szinten működik, ahol a statisztikus, véletlenszerű molekuláris mozgások dominálnak?

2.5 Mi hajtja a motort?

A legközvetlenebb kérdés, ami a fenti kísérletekből, eredményekből és modellekből következik az, hogy a funkcionális régiók közötti kommunikáció milyen molekuláris mechanizmusokkal zajlik. Ezeknek a mechanizmusoknak a feltárása nemcsak a motorfehérjék szempontjából lehet fontos, hanem úgy gondolom, hogy ezekből kiindulva a nem-motor fehérjékre is érvényes, általános modellek építhetők.

Az enzimen belüli jelátvitel triviális módja lehet az, hogy egy régió konformációs változása konformációváltozást hoz létre egy szomszédos régióban. Ez egyszerű modellnek tűnik, habár ha belegondolunk a jelenség folyamatába, akkor nem is olyan egyszerű. Az egyik helyen történő alakváltozás feszültséget generál a szomszéd területeken, amelyek relaxálódnak, és így tovaterjed az átalakulás. Igen ám, de létrejönnek-e az enzimekben nagy területeket átfogó mechanikai feszültségek, és ha igen, akkor ezek a feszült, magasabb energiájú állapotok mennyire stabilak? Sok enzimben ez a kérdés nem szembeötlő, viszont a motor enzimekben a funkciójukból következően létre kell jönnie ilyen jelenségnek. Hiszen a motor enzim funkcióját úgy is megfogalmazhatjuk, hogy a motor olyan enzim, amelyben feszültségek az enzimatikus ciklus során úgy rendeződnek át, hogy legalább egy állapotban az erőkart mozgató régióban feszültség keletkezik, amely a munkaütemben relaxálódik, ezáltal pedig valamilyen külső ellenállással szemben munkát végez. Ebből az is következik, hogy a motor enzimek ideális kísérleti objektumok a fellépő intramolekuláris feszültségek és azok átrendeződéseinek vizsgálatára.

Legújabb kísérleteinkben az aktin kötést és a munkaütemet szinkronizáló kommunikációs útvonalat tanulmányozzuk. Olyan nagy specificitású mutánsokat szeretnénk létrehozni, amelyek ennek a kommunikációnak lehetőleg csak egy-egy elemét, lépését befolyásolják. Természetesen kritérium az is, hogy ezek a változások kísérletesen jól detektálhatók legyenek, vagyis valamilyen jelentős, jól mérhető jelváltozás történjen. Néhány éve S. Fischer és K. Holmes számítógépes szimulációval modellezte a motor domén felhúzási lépését (*2;71-74*). Elsősorban a relé régióban történő változásokra koncentráltak. Arra a következtetésre jutottak, hogy a relé hélix közepén elhelyezkedő fenilalaninok (F481 és F482) egy klasztert képeznek a F652 fenilalninnal, ahogy azt a 50. ábra mutatja.

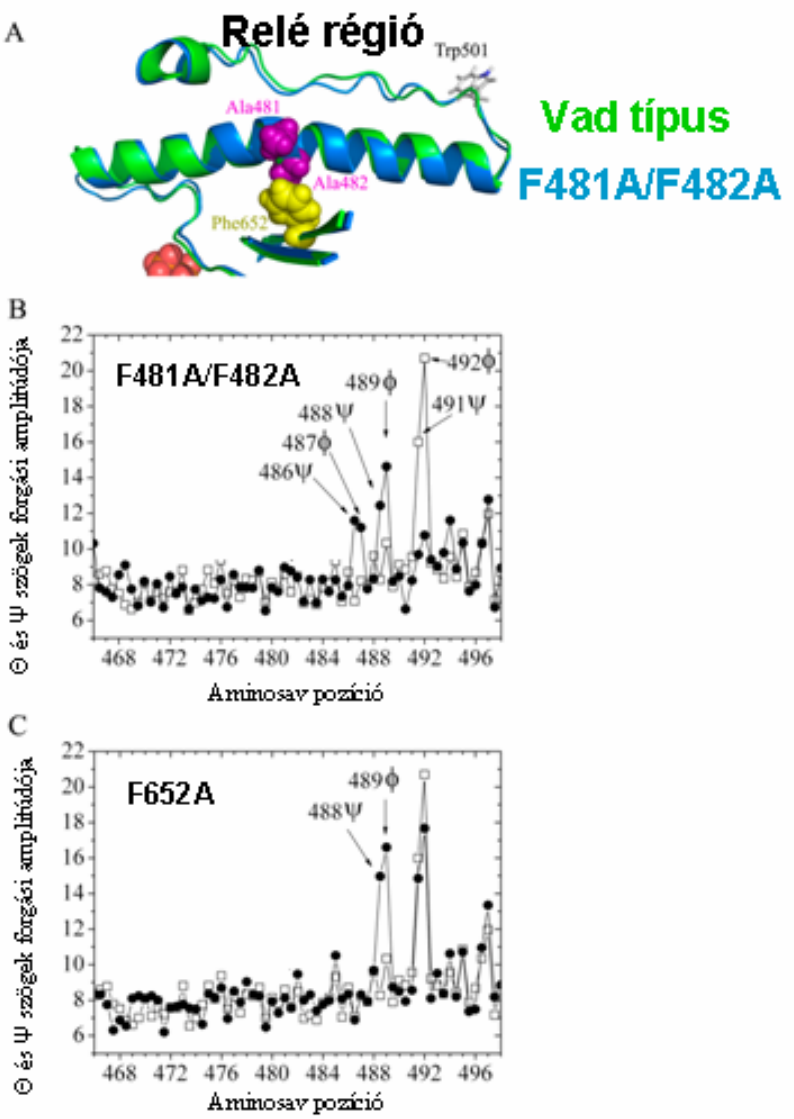


50. ábra Az általunk végzett „elasztikus szalag” módszerrel végzett szimuálció eredménye, amelyben a felhúzási lépést szimuláltuk. A fenilalanin klaszter szerkezete a „le” és „fel” állapotokban. A relé hélix mozgásának libikóka modellje szempontjából szimulációnk hasonló eredményre jutott, mint S Fischer és Holmes (*2*).

A konformációs átmenet során a klaszteren, mint alátámasztási ponton billen a relé hélix, majd a folyamat második szakaszában a hélix disztális fele elhajlik, ezáltal a hélix végpontján még nagyobb kitérést biztosítva. A klaszter egyes fenilalaninjait alaninra mutáltuk a W501+ konstrukcióban. Azt reméltük, hogy a mutációk által specifikusan tudjuk a relé hélix mozgását befolyásolni, és a mozgást nagy érzékenységgel követhetjük a Trp-501 fluoreszcenciáján keresztül. Anélkül, hogy eredményeinket részletesen bemutatnám, kiemelem közülük, hogy óriási szerencsénkre valóban nagy specificitással a relé elmozdulását gátoltuk. A

mutációk (F481A/F482A, illetve F652A) nem befolyásolták az apo és a „le” állapotok szerkezetét és a köztük lévő enzimatikus átmenetet. Tehát a W501+/F481A/F482A , illetve W501+/F652A konstrukciókhoz ATP-t adva az apo szerkezet gyakorlatilag ugyanolyan módon megy át a „le” állapotba, mint a vad enzim, vagyis az 1. és a 2. lépés változatlan formában lezajlik. Azt is kimértük, hogy a hidrolízis (3b) és az aktinkötési mechanizmusok is gyakorlatilag változatlanok. Ugyanakkor a 3a lépés nem megy végbe a szokásos módon, a Trp-501 által detektált konformáció változás csak igen kis részben zajlik le, és a „fel” állapot szerkezete a mutációtól disztális irányban (a konverter felöli részben) erősen perturbált. Mivel tudjuk, hogy a hidrolízis lépés csak akkor alakul ki, ha a *switch 2* és a zseb egyéb részei a „fel” (zárt) állapotnak megfelelő konformációban vannak, ezért egy olyan izgalmas mutáns konstrukciót sikerült előállítanunk, amely a mutációtól disztálisan egy bizonyos enzimatikus lépést erősen megváltoztat, ugyanakkor a mutációtól „fölfele”, az nukleotid zseb és az aktinkötő régió felé nem okoz változást.

Számítógépes modellezéssel megvizsgáltuk a mutáns „le” állapot szerkezetét, és azt tapasztaltuk, hogy tökéletesen megegyezik a vad típuséval. Akkor miért nem tud a 3a lépés lezajlani, honnan tudja az enzim, hogy a „fel” állapot felé nem tud elindulni, ha a szerkezet változatlan? A motor enzimek körében eddig egyedülálló, de igen egyszerű módszerrel vizsgáltuk meg, hogy vajon a relé aminosavjainak dinamikai állapota is változatlan maradt-e. A mutáns és a vad relaxált „le” állapotának szerkezetén elindítottunk néhány száz pikomásodperces szimulációt, majd a relé hélixben minden aminosav Ψ és Θ szög mozgásának átlagos kitérését ábrázoltam az 51. ábrán.

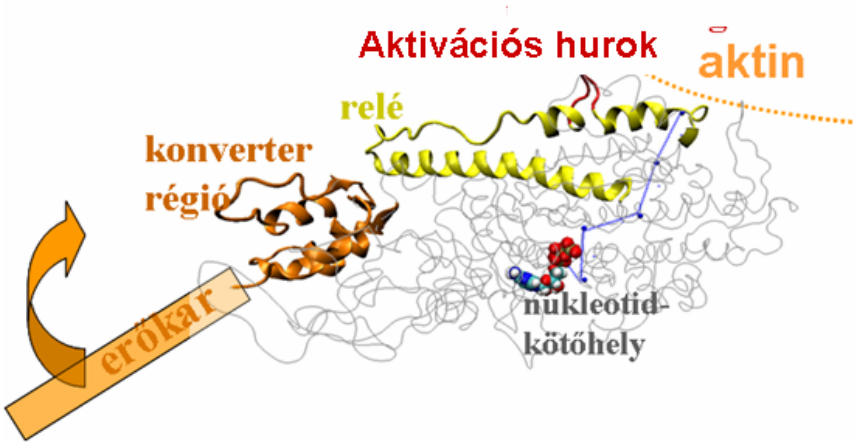


51. ábra A relé hélix Ψ és Θ szögelfordulásainak átlagos amplitúdója 100 ps alatt a vad és a F481A/F481A (**B**) és a F652A (**C**) mutáns konstrukciókban. A teli szimbólum a mutáns, az üres szimbólumok a vad enzim mobilitását jelzik. Az A ábra a relé hélixet mutatja. A hélix aminosavainak pozíciói (468-496.) megfelelnek a grafikonok X tengelyén látható számozásnak.

Az eredmény meglepő és egyúttal csodaszép. A mutációnál (F481/F482) és közvetlen környezetében nincs változás a dinamikai tulajdonságokban, azonban specifikusan, kizárólag a négy és a hat aminosavval arrébb lévő aminosavak (486. és 488. pozíciók) mozgásának amplitúdója megduplázódott, míg még három aminosavval odébb (491. pozíció) jóval rigidebbé vált a mutánsban a vadhoz képest. Hangsúlyozom, hogy mindez változatlan szerkezet mellett történik. További részletek mellőzésével azt szeretném kiemelni, hogy ezek az eredmények arra reflektálnak, hogy a szerkezeti tulajdonságok mellett a dinamikus tulajdonságoknak alapvető szerepük van a konformációs átmenet kialakításában. Azok a mutációk pedig igen izgalmasak, amelyekkel specifikusan csak a nehezebben vizsgálható dinamikai tulajdonságokat változtatjuk meg. Ahhoz, hogy a relé hélixben az elmozdulás létrejöjjön, a hélixen végigfutó mechanikai feszültségnek minden bizonnyal át kell rendeződnie. A fenti mutációk valószínűleg a „le" állapotban kialakuló feszültségek eloszlását változatta meg, amely a peptidgerinc egyes szakaszainak dinamikájának megváltozásában is megmutatkozik.

Legújabban a relé hélix felső régiójában is izgalmas jelenségre bukkantunk. A mai napig kérdéses, hogy a gyenge aktinkötéskor hogyan, milyen szerkezeti elemeken kersztül érzékeli a relé hélix az aktinkötést, annak érdekében, hogy a munkaütem megkezdődhessen. Sokan az aktinkötő árok záródásán keresztül az árok alján húzódó *switch 1* régión keresztüli útvonalra gyanakodnak. Az az érzésem azonban, hogy ha ennek van is szerepe, az csak részleges lehet, mert a gyenge aktinkötéskor az aktinárok alig záródik be, és ezt a *switch 1* nem nagyon érzékeli. Észrevettük, hogy a relé hélix aktinkötő régióhoz közeli részén a hélixet megtöri (miozin fajtától függően) egy vagy néhány prolin (52. ábra).

Ezt a szerkezeti elemet aktivációs huroknak neveztük el. Szekvenciája csak annyiban hasonló a miozinok között, hogy legalább egy prolint tartalmaznak. Viszont az összes ismert miozin szekvencia (beleértve az összes családot) alapján kijelenthetjük, hogy ez a hélixtörő hurok mindegyik miozinban megtalálható. Úgy gondolom, hogy ez nem lehet véletlen, ráadásul ezt hurkot meglepő módon még senki nem vizsgálta.



52. ábra A prolingazdag hurok elhelyezkedése a *Dictyostelium* miozin II-ben.

Kapóra jött a vizsgálata, mert a szerkezet alapján elképzelhető, hogy pont az aktinkötő régió és a relé/konverter régió kommunikációjában játszhat szerepet. Számítógépes szimulációk segítségével mutációk sorozatát terveztük, amelyekben úgy távolítottuk el az aktivációs hurkot, hogy a relé hélix regisztere ne változzon, a hurokdeléciós mutánsban ezen a helyen törésmentes, stabil hélix legyen. Az első eredmények minden várakozásunkat felülmúlták: Aktin távollétében a mutáns (Δ519-523) minden kinetikai paramétere ugyanolyan, mint a vad enzimé, és a hurok deléciójának nincs hatása az aktomiozin kötésre, valamint az ATP indukált aktin disszociációra sem. Egyetlen tulajdonságban történt változás: az aktin egyáltalán nem gyorsítja a mutáns miozin ATPáz aktivitását. Kérdés, hogy az aktivációs hurok az aktin mely régiójához kapcsolódik, és hogyan jön létre az aktin aktiváció? Ez a kérdés azért is fontos, mert az eredmények a munkütem mechanizmusának részletes feltárásához vezethetnek.

Az aktivációs hurok minden miozinban tartalmaz egy pozitív töltésű aminosavat. Ezt az arginint aszparaginsavra cseréltük. Ez a mutáns teljesen úgy viselkedett minden paraméterében mint a fentebb leírt Δ519-523 mutáns. Irodalmi analízünk egy régen „elfelejtett”, ritkán idézett cikket fedezett fel. Emil Reisler csoportja azt találta, hogyha az aktin negatív töltésű N-terminális aminosavait eltávolítják vagy semlegesekre cserélik, akkor a mutáns aktin nem tudja aktiválni a miozin ATPáz aktivitását, viszont minden más tulajdonságát megőrzi. Ekkor még nem ismerték a

miozin szerkezetét, ezért nem tudták magyarázni az eredményeiket. Így némileg megelőzték ezzel az eredménnyel korukat, és ezért feledésbe is merültek ezek a kísérletek. Viszont ez az aktin mutáns működésében a miozin aktivációs hurok mutánsok párja. Az aktin atomi szerkezeti modellekből hiányzik az N-terminális első négy aminava, amelyeket Reislerék mutáltak. Éppen ezért a Holmes féle aktomiozin szerkezeti modellből is hiányzik ez a pár aminosav. Ez az oka, hogy nem vették észre, hogy az aktin N-termiális régiója (amely minden aktinban negatív töltésű) sóhidat képez az aktivációs hurok konzervatív pozitív töltésű aminosav oldalláncával. Ennek az eredménynek köszönhetően elkészíthettük az aktomiozin atomszerkezeti modelljét. Ez az állapot a ciklus szempontjából nagyon fontos, mert a munkütemkiindulási állapota.

Összefoglalva kirajzolódott egy konzisztens kép arról, hogyan zajlódik le a munkaütem. A hidrolízis lépést megelőzően az erőkar „fel" és „le állapota gyors egyensúlyban van egymással, és olyan állapotban van, amely csak kis valószínűsűggel tud kötődni az aktinhoz. ATP-t csak a „fel" állapotú miozin képes hidrolizálni, ezáltal a hidrolízis révén kis mértékben a „fel" állapotú ADP.Pi-tartalmazó miozin állapot stabilizálódik. Ez annak is köszönhető, hogy aktin távollétében az ezt követő „fel" –„le" átmenet a ciklus sebességmeghatározó lépése. A „fel" állapotú miozin fej is csak kismértékben kötődik az aktinhoz. Viszont, ha kis valószínűséggel hozzákötődik a miozin az aktinhoz ebben az állapotban, akkor kölcsönhatás alakul ki a miozin aktivációs hurok és az aktin N-terminális régiója között is. Ennek a kölcsönhatásnak köszönhetően az aktin mintegy „meghúzza" a relé régiót, és felgyorsul az erőkar lecsapás lépése, elindulhat a munkaütem. A munkaütem révén az aktinkötés is fokoztosan erősebbé válik, amely kötődés az ezeket az eseményeket követő gyors foszfát és ADP disszociáció révén tovább erősödik. Tehát a munkaütem iníciációjának kinetikai és nem termodinamikai oka van (lásd 13. séma). A munkaütemet energetikailag egyrészről az aktinkötődés hajtja, másrészről pedig a termékek felszabadulása „húzza". Tehát nem alakul ki egy olyan nagy energiával rendelkező állapot, amely a munkaütem teljes energiáját tartalmazza, ahogy azt a Lymn-Taylor modell javasolja (2.2.1. fejezet).

Az utóbbi években igen nagy vita alakult ki arról, hogy a motor enzimek aktív módon lépdelnek vagy racsniként (*ratchet*) működnek. Fenti modellünk erre is választ ad, nevezetesen mindkét tábornak igaza van. Egyrészt egy részben magasabb energiájú állapotból képes munkát végezni a miozin fej, azonban az energiafelszabadítás nagyobb része a munkütemet

követő gyors lépésekben következik be, amely révén már visszafele nem tud haladni a rendszer.

2.6 A jelen és a jövő - új kérdések, új megközelítések

Milyen intramolekuláris mechanikai feszültségek keletkeznek az enzimműködés során? Hogyan rendeződnek át ezek a feszültségek az enzimciklus egyes lépéseiben? Mik ezeknek a feszültségeknek a szerepe, és mennyire általánosíthatók ezek a szerepek a nem-motor enzimekben?

A jelen a múlt és a jövő része. A fenti bekezdésekben erről beszéltem. Most röviden áttérek a jövőre, további terveinkre. A tudományos kérdés, amit körül akarunk járni az, hogy az enzimben fellépő és a működés során átrendeződő mechanikai feszültségek hogyan befolyásolják, illetve határozzák meg az enzimműködést. Ennek vizsgálatára olyan kísérleti elrendezéseket tervezünk, amelyekben az enzimbe különböző típusú molekuláris rugókat építünk, és ezzel perturbáljuk mechanikusan az enzimműködést. Mind passzív, mind aktív rugók beépítését tervezzük motor és nem-motor enzimekbe. Az ismert „rugóállandójú" passzív rugókat az egymáshoz képest elmozduló régiók közé helyezzük, és a régiók elmozdulását akadályozzuk különböző mértékekben. Az aktív rugók olyan molekulák, amelyek különböző hatásokra (pl. fényaktiválással) izomerizációra képesek, ezáltal pedig a molekula két végpontja közötti távolság megváltozik. Ilyen aktív rugókat helyezünk a különböző enzimrégiók közé. A rugók fényaktiválásával a két régió között erőperturbációt hozunk létre, és vizsgáljuk ennek hatását az enzimreakcióra. A rugók beépítését a dolgozatban tárgyalt régióspecifikus konformációs szenzorokat tartalmazó motor doménekbe (pl. W501+) tervezzük, így az egyes enzimatikus lépéseket és azok helyspecifikus változásait nagy érzékenységgel tudjuk követni. Ezek a módszerek reményeink szerint hatékonyan ötvözik az egyedi molekuláris erőmérés és a kinetikai módszerek előnyeit.

Ebbe a kutatásba igen nagy elszántsággal és nagy reményekkel vágunk. Igen büszkék vagyunk arra, és óriási bátorítást ad, hogy a *European Research Council* (ERC) IDEAS programjának bizottsága is

izgalmasnak tartotta ezeket a kérdéseket, és az ERC támogatásával nagyobb esélyünk lehet a sikerekre.

A siker nekem azt jelenti, hogy az úton haladunk, és néha választ kapjunk egy-egy kérdésünkre, amely újabb kérdéseket ébreszt.

3. Függelék

A függelékben röviden összefoglalom az alkalmazott lényegesebb módszereket, enzimkonstrukciókat. Táblázatokban közlöm a legfontosabb számszerű eredményeket, amelyeket a gördülékenység érdekében hagytam ki a szövegtestből. Ezután vázolom azokat a kutatási eredményeket, amelyeket a miozin és más enzimek konformációs átmeneteinek vizsgálatában folytattunk. Ezeknek a vizsgálatoknak nagy része közvetlenül is kapcsolódik a dolgozat fő témájához, azonban kifejtésükkel nem akartam megtörni a gondolatok fonalát.

3.1 Fontosabb anyagok és módszerek

3.1.1 Enzimkonstrukciók

A 2. táblázatban összefoglaltam a fontosabb alkalmazott enzimkonstrukciókat. Az enzimkonstrukciók részletes leírása a táblázatban ugyancsak megtalálható közleményekben olvasható.

	Motor domén konstrukció	**A vizsgált régió**	**Referencia**
1.	W113+	A nukleotid zseb bejárata	(*6;37;38;68;70*)
2.	W129+		
3.	W131+		
4.	W239+	*Switch 1* hurok (nukleotid zseb alja)	(*34;53*)
5.	W242+		
6.	W458+	*Switch 2* hurok (nukleotid zseb alja)	(*75*)
7.	W461+	*Switch 2* relé régió határa	
8.	W501+(native Trp)	Relé régió	(*6;27;33;38;65;66;68;70;75-78*)
9.	W129/501+	Nukleotid kötés és relé mozgás	(*6;37*)
10.	W692+	Konverter	(*6*)

		régió	
11.	W501/692+	Relé és converter régió	(*6*)
12.	W501+/R84/M	Erőkar és relé mozgása	(*78;79*)
13.	W501+/K704E		
14.	W501+/R84E		
15.	W- (Trp less)		(*6;33*)
16.	416C/537C	Aktinkötő árok mozgásai	(*34;80*)
17.	400C/537C		
18.	416C/586C		
19.	398C/537C		
20.	W501+/F481A/F482A	Relé region és a libikóka felfüggesztése	
21.	W501+/F652A		
22.	W501+/365Q	A 4. aktinkötő hurok (*loop* 4) mozgásai és aktinkötő tulajdonságai	(*76*)
23.	W501+/F359A		
24.	W501+/E360-V368/GGG		
25.	W501+/Δ519-523	A prolin gazdag hurok és a relé helix mozgásai /kommunikáci ós útvonal az aktinkötő region és a relé között	
26.	W501+/S510L		
27.	W501+/541Q		
28.	W501+/S510L/N541Q		
29.	W501+/S510L/N541Q/ Δ519-523		
30.	R520E		
31.	GFP-W501+-YFP	Az erőkar mozgása / az erőkar és a relé együttes mozgásai	(*36*)
32.	YFP-W501+-GFP		
33.	BFP-W501+-GFP		

F.1. táblázat

3.1.2 Enzimkonstrukciók előállítása

Az enzimeket kódoló DNS konstrukciókat és mutációkat PCR alapú technikákkal vagy különböző mutegenzis kit-ek felhasználásával állítottuk elő. A DNS inzertek előállításának leírása megtalálható az F.1 táblázatban feltüntetett közleményekben. A miozin motor domén konstrukciók a *Dictyostelium* miozin II 761-ig aminosaváig tartottak. A motor domén C-terminálisához 8 hisztidinből álló HisTag címkét illesztettünk. Az inzerteket a pDXA-3H alapú pDXA-M761 (*81;82*) vektorba klónoztuk. A vektorokat Prof. Dietmar Mansteintól kaptuk, amiért hálás köszönet jár részünkről. A motor domén konstrukciókat Dictyostlium orf+ sejtekben expresszáltuk, és Ni-NTA affinitás kromatográfia segítségével izoláltuk.

3.1.3 Tranziens és steady state kinetikai módszerek

Stopped flow módszerek A megállított áramlásos (*stopped-flow*) kísérleteket (lásd 9. ábra) KinTek 2006, BioLogic SFM300 (ELTE Biokémiai Tanszék), és részben Applied Photophysics SX18MV készüléken végeztük (Department of Biochemistry, University of Leicester). Fényforrásként Xe lámpát használtunk, 295 nm gerjesztési hullámhosszal (rés-szélesség: 2-4 nm). A fluoreszcencia-emissziót GB320 (vagy GB335) és UG11 optikai szűrőkön keresztül detektáltuk. A műszer holtidejének (a reakció számított kezdőpontja és a megfigyelés kezdete között eltelt idő) méréséhez a NATA (5 μM) N-bromo-szukcinimiddel (NBS, 50-400 μM) történő reakciójának tranzienseit vettük fel (37). Kétféle mintacellát alkalmaztunk (térfogat: 20 illetve 5 μl), amelyekkel 1,5 illetve 0,2 ms holtidőt (BioLogic SFM300) határoztunk meg. Az 5 μl-es cella használata a gyors (> 5000 s^{-1}) folyamatok jobb felbontását teszi lehetővé a háromszor rövidebb holtidő jóvoltából, figyelembe véve azt is, hogy jelszintje csak 40 %-kal alacsonyabb a 20 μl-es cellához képest.

Az adatokat logaritmikus időbeosztású mintavételezéssel (rekordonként 1000-8000 pont) vettük fel annak érdekében, hogy a többlépéses folyamatok valamennyi fázisának analíziséhez elegendő adatpont álljon rendelkezésre. A lökések idő-profilját a készülékbe épített, a dugattyú pozícióját jelző potenciométer segítségével ellenőriztük. A megállított áramlásos kísérletek leírásakor mindig a reakciócellabeli koncentrációkat említem.

Hőugrás A hőugrásos (*temperature-jump*) kísérleteket Hi-Tech Scientific TJ-64 műszerrel végeztük. A mintát 297 nm-en gerjesztettük 75 W-os Hg-Xe lámpával (Hamamatsu Photonics), 297FS 10-25 interferencia-szűrőn (Androver Corp.) keresztül. A fluoreszcencia-emissziót G320 és UG11 filtereken kresztül detektáltuk. 100 µl-es mintacellát használtunk, 3 mm-es fényúttal. A hőugrást a cellán keresztüli 10 kV-os elektromos kisüléssel indukáltuk, amely kb. 5°C-nyi ugrást eredményezett (kiindulási hőmérséklet: 16°C). Ahhoz, hogy a minta elektromos és hővezetése megfelelő legyen, a többi kísérlethez képest nagyobb ionerősségű mérési puffert kellett használni (60 mM NaCl, 1 mM $MgCl_2$, 20 mM TES pH 7,5). Ilyen körülmények között a hőugrás 50-100 µs alatt következett be. A minta hűlésének „féléletideje" 3 s körüli érték volt (a hűlés lecsengése nem volt egyfázisú exponenciális). A hőugrásokat 150 s-onként ismételtük a mintán.

Nyomásugrás A nyomásugrásos (*pressure-jump*) mérőműszer (Research School of Biosciences, University of Kent at Canterbury) Clegg és Maxfeld eredeti konstrukciója alapján került összeállításra, azonban annál kisebb mintakamrát (50 µl) és két kis térfogatú nyomásszelepet tartalmaz. A mintakamra egy 2 mm belső és 5 mm külső átmérőjű zafír gyűrű, amelynek egyik végét egy nyomás-szenzor (Kistler 601A), másik végét pedig egy vékony membrán (0,003'' Kaptan V, Du Pont), illetve egy piezo-elektromos nyomásgenerátorhoz (Physik Instrumente P245.30) csatolt dugattyú zárja le. A kamrában 80-200 bar-os nyomásugrás kb. 80 µs alatt zajlott le mind növekvő, mind csökkenő irányban. Az adatfelvétel idejétől függően, maximum 30 Hz frekvenciával indukáltuk a nyomásugrásokat. A 100 W-os Hg-Xe lámpával 297 nm-en (2,5 nm rés-szélességnél) gerjesztett minta fluoreszcenciáját WG320 filteren keresztül detektáltuk.

3.1.4 Fluoreszcencia módszerek

***Steady-state* fluoreszcencia-mérések** A *steady-state* fluoreszcencia-méréseket SLM 48000 spektrofluoriméteren és Edinborugh Instrument Fluorimeter 900 készüléken végeztük, termosztált mintatartóval, 5 mm úthosszú küvettában. Fényforrásként 200 W-os Hg-Xe, illetve 450 W-os Xe lámpát alkalmaztunk. Azokban az esetekben, ahol a jó jel-zaj arány eléréséhez nagy intenzitású gerjesztő fényre volt szükség, a Hg-Xe lámpát használtuk, míg a hosszabb ideig tartó méréseknél a Xe lámpát alkalmaztuk, annak jobb intenzitás-stabilitása miatt. A fehérjemintában (3-10 µM) lévő triptofánokat 297 nm-en gerjesztettük, 1 nm széles rés alkalmazásával. A fluoreszcencia-emisszió intenzitását monokromátoron (4 nm rés-

szélességgel), vagy WG320 és UG11 optikai szűrőkön (Comar Instruments) keresztül detektáltuk. A fluoreszcencia hőmérsékletfüggésének vizsgálatakor a mintát vízcirkulációval, kb. 1°C/perc sebességgel hűtöttük. Az ATP-áz reakció *steady-state* szakaszában végzett fluoreszcencia-mérések után ellenőriztük, hogy a szubsztrát a mérés alatt nem fogyott olyan mértékben, ami befolyásolná a kapott eredményeket.

Steady-state anizotrópia-mérések A *steady-state* fluoreszcencia-anizotrópia méréséhez Glan-Thomson prizma polarizátorokat alkalmaztunk. Mind T-, mind L-formátumban végeztünk méréseket. A vertikálisan polarizált fénnyel gerjesztett minta fluoreszcencia-emissziójának vertikális (Ivv) illetve horizontális (Ivh) komponenseit a T-formátumú mérés esetén egyidejűleg detektáltuk, 335 nm-re állított (16 nm rés-szélesség) monokromátoron illetve WG320 – UG11 filter-kombináción keresztül. Az L-formátumú mérés során a vertikális és horizontális komponenseket egymás után mértük meg, az említett optikai filterek alkalmazásával. Az anizotrópia (r) értékeket G-faktor korrekció alkalmazásával számítottuk: r = (Ivv-G*Ivh)/(Ivv+2*G*Ivh). A G-faktor értékét a horizontálisan polarizált fénnyel gerjesztett minta emissziójának vertikális (Ihv) illetve horizontális (Ihh) komponenseiből határoztuk meg (G = Ihv/Ihh), és úgy állítottuk be a fotodetektorok érzékenységét, hogy ez 1-hez közeli érték legyen.(*„magic angle”*).

Időfelbontott fluoreszcencia-mérések Az időfelbontott fluoreszcencia-méréseket időkorrelált egyfoton-számlálásos (*time-correlated single photon counting,* TC-SPC) módszerrel (Central Laser Facility, Rutherford Appleton) és Edinborugh Intrument Fluorimeter 900 készüléken (ELTE Biokémiai Tanszék) mértük.

Fényforrásként egy frekvencia-kétszerezett, dinamikus kicsatolású, módus-szinkronizált, szinkron-pumpált festéklézert (Spectra-Physics Modell 3500) használtunk, amely a fehérjeminták (5-25 μM) 296 nm hullámhosszon való gerjesztését tette lehetővé. Az alkalmazott pulzusok frekvenciája 4 MHz, szélessége 10 ps volt. A fluoreszcencia-emissziót WG335 és UG11 szűrőkön keresztül detektáltuk, MCP-PMT (Hamamatsu, R3809U), 85 ps válaszidejű fotoelektron-sokszorozó csővel. Az időfelbontott anizotrópiát film-polarizátor (Halbo Optics, DPUV-25) segítségével mértük. A vertikális és horizontális emisszió-komponenseket egymás után vettük fel. A fotoelektron-sokszorozónak a különböző irányban polarizált fényre való eltérő érzékenységét kiküszöbölendő a film-polarizátor és a detektor közé él-depolarizátort helyeztünk, így méréseink során 1 volt a G-faktor értéke. Az életidő-mérésekhez a fluoreszcencia-

emisszió teljes intenzitását I_v+2I_h alapján számítottuk. Az adatokat 1024 csatornába gyűjtöttük (csatorna-szélesség: 40 ps) SPC-700 PC-kártya modul segítségével (Becker and Hickl GmbH, Berlin), amely az egyfoton-számlálásos mérés standard funkcióinak (TAC (time-to-amplitude converter), CFD (constant fraction discriminator), irányítását is ellátta.

3.2 A dolgozatban szereplő enzimatikus folyamatok általunk kimért kinetikai paraméterei, és egyéb fontosabb kvantitatív kísérleti eredmények táblázatos összefoglalása

F.2 Táblázat Az enzimatikus lépések a módosított Bagshaw-Trentham sémában

	Enzimatikus lépés	*Sebességi állandó*		*A forward lépések kezdeti és végállapota (erőkar pozíció/nukleotid komplex)*	
K_1	ATP-kötés ütközési lépés	k_1	forward	apo	ATP- kötés
		k_{-1}	reverse	ütközési komplex ATP-vel	
K_2	ATP-kötés indukált konformáció változás	k_2	forward	ütközési komplex ATP-vel	
		k_{-2}	reverse	„le” ATP állapot	
K_{3a}	felhúzási lépés	k_{3a}	forward	„le” ATP állapot	effektív hidrolízis lépés
		k_{-3a}	reverse	„fel” ATP állapot	
K_{3b}	hidrolízis lépés	k_{3b}	forward	„fel” ATP állapot	
		k_{-3b}	reverse	„fel” ADP.P_i állapot	
K_4	fordított felhúzási lépés	k_4	forward	„fel” ADP.P_i állapot	
		k_{-4}	reverse	„le” ADP.P_i állapot	
K_4'	munkaütem	k_4'	forward	aktin kötött „fel” ADP.P_i állapot	
		k_{-4}'	reverse	aktin kötött „le” állapot	

F.3. Táblázat

A nyitott-zárt átmenet és az ATP-hidrolízis lépés kinetikai és termodinamikai paraméterei a W501+ motor doménen végzett kísérletek alapján (folytatás a 121. oldalon)

Paraméter	*Ligand*	*Melyik mérésből*	*Számítás módja*	*Mérték-egység*	*Érték*				
					5ºC	*10ºC*	*15ºC*	*20ºC*	*25ºC*
$^{app}K_{oc}(=K_{3a})$	AMP.PNP	A	$^{app}K_{oc}=(F-F_0)/(F_c-F)$	-	0,11	0,25	0,49	0,82	1,06
	ADP.BeF$_x$				0,20	0,46	0,85	1,43	1,74
$^{app}K_{oc}[=K_{3a}(1+K_{3b}]$	ATP				3	7	14	32	45
$^{app}K_{oc}(=K_{3a})$	AMP.PNP	B	$^{app}K_{oc}$= 1 az amplitúdó maximális értékénél		<0,1	0,16	0,32	1	1
	ADP.BeF$_x$				0,43	0,55	1,0	2,3	2,6
$^{app}K_{oc}[=K_{3a}(1+K_{3b}]$	ATP				1,9		4,6	5,7	
K_{3a}	ATP				0,2		0,3	0,4	
ΔG_0 (nyitott-zárt)	AMP.PNP	A	$\Delta G_0=-RT\ln{}^{app}K_{oc}$	kJ/mol	5,2	3,3	1,7	0,49	-0,14
	ADP.BeF$_x$				3,8	1,8	0,38	-0,87	-1,4
	ATP				-2,6	-4,4	-6,4	-8,4	-9,4
ΔH_0 (nyitott-zárt)	AMP.PNP				132	96	68	66	60
	ADP.BeF$_x$				133	94	78	60	58
	ATP				117	92	96	114	82
k_{+3a}	AMP.PNP	C	$k_{obs}= k_{+3a}+ k_{-3a}$ $K_{3a}= k_{+3a}/ k_{-3a}$	s^{-1}		92	210	460	1000
	ADP.BeF$_x$				30	70	180	250	370
	ATP				54		150	350	

k_{-3a}	AMP.PNP					370	420	570	950
	$ADP.BeF_x$				150	150	140	170	210
	ATP				270		490	870	
K_{3b}	ATP	A ($^{app}K_{oc}$), D (K_{3a})	$K_{3b}= (^{app}K_{oc}/K_{3a})-1$	-	14		45	79	
		B ($^{app}K_{oc}$), D (K_{3a})			8		14	13	
k_{+3b}		D (k_{obs}, K_{3a}) K_{3b} ld fentebb	$k_{+3b}= k_{obs}/\{[K_{3a}/(1+K_{3a})]+ 1/K_{3b}\}$	s^{-1}	17-20		53-63	90-110	
k_{-3b}			$k_{-3b}= k_{+3b}/K_{3b}$		1,2-2,5		1,2-4,5	1,1-8,5	

A steady-state flureszcencia hőmérsékletfüggés
B nyomásugrásos kísérlet amplitúdójából
C nyomásugrásos kísérlet megfigyelt sebességi állandója (k_{obs})
D *stopped flow* mérés

F.4. Táblázat

A nyitott-zárt egyensúly termodinamikai paraméterei a W501+, W501+/K84M és W501+/R704E mutánsok steady-state fluoreszcenciájának hőmérsékletfüggése alapján

Paraméter	*ATP*			*AMP.PNP*			*ADP.BeF$_x$*		
	W501+	*W501+/ K84M*	*W501+/ R704E*	*W501+*	*W501+/ K84M*	*W501+/ R704E*	*W501+*	*W501+/ K84M*	*W501+/ R704E*
ΔG_0 (10ºC) (kJ/mol)	-0,90	-1,41	1,63	6,49	6,39		3,37	3,50	4,20
ΔG_0 (15ºC) (kJ/mol)	-1,92	-3,13	0,31	4,99	5,03		2,03	2,43	3,78
ΔG_0 (20ºC) (kJ/mol)	-3,03	-5,06	-1,02	3,76	3,83	7,28	0,95	1,38	2,57
ΔG_0 (25ºC) (kJ/mol)	-3,59	-6,85	-2,05	2,70	2,70	5,92	0,00	0,62	1,95
ΔH_0 (kJ/mol)	63	106	78	79	75	95	72	63	47

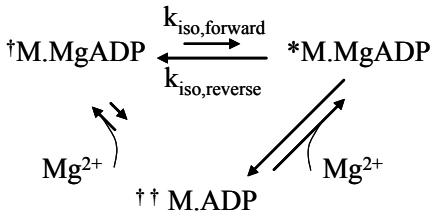
Mutáns	*Ligand*	*Fluor. Intenzitás*[a]	*Fluor. változás (%)*[b]	*Eltolódás (nm)*[b]	*Q*	*Ksv (M^{-1})*[c]	r_{ss}	r_0	*φ (ns)*	τ_1 *(ns)*	τ_2 *(ns)*	*Életidő-komponensek (%)*		
												τ_1	τ_2	*statikus*
W501+	**apo**	1,00			0,058	4,18	0,21	0,209	59 ± 4	1,00	4,92	12	17	71
	ATP		+85	-7	0,095	2,72	0,22	0,191	59 ± 2	1,11	4,78	10	30	60
	ADP		-18	-4	0,047	3,10	0,21	0,194	54 ± 2	0,91	4,74	11	13	76
	ADP. AlF_4		+88	-7	0,095		0,22	0,203	68 ± 4	1,37	4,82	10	30	60
W129+	**apo**	0,56			0,056	3,86	0,20	0,167	120 ± 9	0,93	5,00	14	16	70
	ATP		-57	-7	0,021	1,80	0,21	0,205	169 ± 24	0,75	4,74	8	6	86
	ADP		-55	-7	0,026	1,52	0,21	0,191	118 ± 14	0,71	4,66	9	7	84
	PP_i		+57	+4										
W131+	**apo**	0,45			0,029		0,18							
	ATP		-32	-6	0,016		0,20							
	ADP		-31	-6	0,016		0,20							
W113+	**apo**	0,72												
	ATP		+5	+3										
	ADP		+3	+1										
W129+/ W501+	**ATP**		+50											
	ADP		-30											

F.5 Táblázat Egy triptofános motor domén konstrukciók fluoreszcencia tulajdonságai Q: kvantumhatásfok, K_{SV}: Stern-Volmer állandó, r_{ss}: steady-state anizotrópia, r_0: a lecsengési görbéből t = 0 időpontra extrapolált anizotrópia, φ: anizotrópia-lecsengési idő, τ: életidő [a]apo állapotban, W501+ -hoz képest , [b]apo állapothoz képest, [c]akrilamiddal

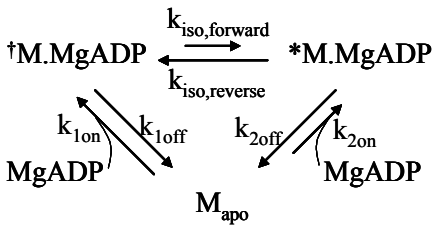
F.6 Táblázat A W239+ fontosabb kinetikai paraméterei.

Kinetikai paraméter	*Elemzett adat*	*20°C*	*12°C*	*5°C*
$k_{iso,\ forward}$ (s^{-1})	Mg^{2+} kötés / disszociáció[1]	20	6	≈1
$k_{iso,\ reverse}$ (s^{-1})		29	18	12
K_{iso}		0,7	0,3	≈0,1
$k_{iso,\ forward}$ (s^{-1})	MgADP kötés[2]	-	23	3
$k_{iso,\ reverse}$ (s^{-1})		-	32	29
k_{1on} ($\mu M^{-1}s^{-1}$)		3,8	3,5	3,3
k_{2on} ($\mu M^{-1}s^{-1}$)		2,7	0,57	≈0,15

[1]Mg^{2+} kötés sémája:



[2]MgADP kötés sémája:



Aktin	*Kinetikai paraméter*	*Nukleotid*	*W239+*	*W242+*
-	$K_{turnover}$ (s^{-1})	MgATP	0,17	0,2
-	$K_1 \times k_2$ ($\mu M^{-1}s^{-1}$)		0,87*	0,2*
-	k_2 (s^{-1})		450*	400*
-	k_{-6}/K_7	MgADP	4**	-
-	$k_{-6}+k_6$ ($\mu M^{-1}s^{-1}$)		<1000**	-
-	K_d (μM)		7,6**	-
+	$K_1 \times k_2$ ($\mu M^{-1}s^{-1}$)	MgATP	0,5	-
+	k_2 (s^{-1})		350	-
+	k_{+A} (s^{-1})	-	1,6	2
+	K_{dA} (μM)	ADP	0,02	-

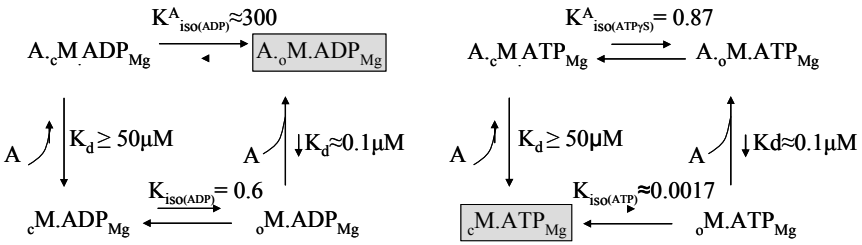
F.7 Táblázat A W239+ és W242+ fontosabb kinetikai paraméterei aktinban és aktin nélkül

A mérések 20 ºC-on, 5ºC-on (*) illetve 12ºC-on (**) történtek. Az aktin nélküli kinetikai paraméterek jelölése megegyezik a Bagshaw-Trentham séma (1. séma) jelöléseivel.

k_{+A}
K_{dA} aktin disszociáció állandója ADP-ben

F.8 Táblázat A W239+ egyensúlyi viszonyai aktinnal és MgADP-vel

Nukleotid	*Aktin*	K_{iso}
MgATP	-	0,0017
MgADP	-	0,7
MgADP	+	350
MgATPγS	+	0,87

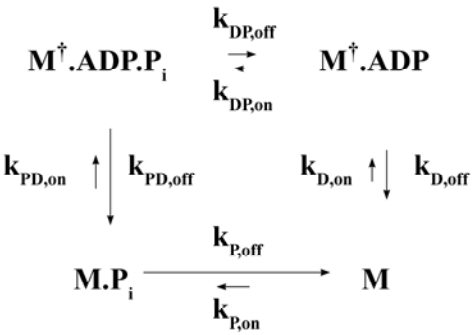


F.9 Táblázat Az ATPáz reakció fordított lejátszásakor mért paraméterek aktinban és aktin nélkül. A paramétereket a táblázat alatti és a Bagshaw-Trentham séma alapján jelöltem. (folytatás a 128. és a 129. oldalon)

	Mért konstansok
W501+.ADP x P_i	
Pi féltelítés (I=118 mM pH 6.7)	12 mM
Pi féltelítés (I=118 mM pH 7.2)	14,2 mM
Pi féltelítés (I=244 mM pH 7.2)	23 mM
$k_{on,Pi}$ (I=118 mM pH 6.7)	0,0048 $mM^{-1}s^{-1}$
$k_{on,Pi}$ (I=118 mM pH 7.2)	0,0036 $mM^{-1}s^{-1}$
$k_{on,Pi}$ (I=244 mM pH 7.2)	0,0020 mM^{-1} s^{-1}
$k_{off,Pi}$ (I=118 mM pH 6.7)	0,049 s^{-1}
$k_{off,Pi}$ (I=118 mM pH 7.2)	0,052 s^{-1}
$k_{off,Pi}$ (I=244 mM pH 7.2)	0,055 s^{-1}
$k_{max,Pi}$ (I=118 mM pH 7.2)	~0,2 s^{-1}
$K_{d,app,Pi}$ (I=118 mM pH 7.2)	14,2 mM
W501+.P_i x ADP	
$K_{d,app,ADP}$	45 µM
$K_{on,ADP}$	0,011 $\mu M^{-1}s^{-1}$
$k_{max,ADP}$	0,2 s^{-1}
W129+.P_i x ADP	
ADP, féltelítés	15 µM
$k_{PD,on}$	1,6 $\mu M^{-1}s^{-1}$
$k_{PD,off}$	19 s^{-1}
$k_{max,ADP}$	370 s^{-1}
W129+.ADP x P_i	
k_{obs}	7,5 ± 1 s^{-1}
W129+ x P_i	
$K_{gyors,on,Pi}$	50,3 $mM^{-1}s^{-1}$
$k_{gyors,off,Pi}$	35,0 s^{-1}
$k_{gyors,max,Pi}$	300 s^{-1}
$k_{lassú}$	5 s^{-1}

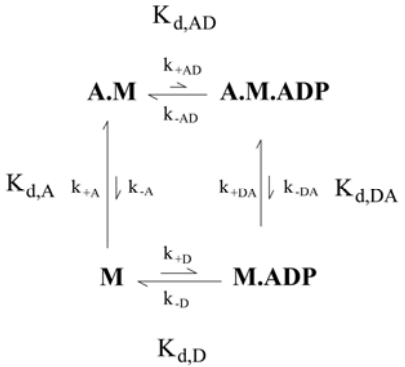
W129+ x ATP	
$k_{ATP,\ gyors}$	1140 s^{-1}
$k_{ATP\ lassú}$	350 s^{-1}
W129+.P_i x ATP	
$k_{P,off}$	260 s^{-1}
W501+.dmADP x ATP	
k_{obs}	2,5 s^{-1}
W501+.dmADP.Pi x ATP	
k_{gyors}	5,8 s^{-1}
$k_{lassú}$	0,04 s^{-1}
$A_{gyors}/A_{lassú}$	0,50
W501+ x ADP	
$k_{D,on}$	1,2 μM^{-1}
$k_{D,off}$	7 s^{-1}
K_D (K_{dD})	0,17 μM^{-1} (5,8 μM)
W501+.ADP.AlF4 x PyA	
$K_{d,\ A.M^*.ADP.Pi}$	57 μM

	Sebességi állandó	*Egyensúlyi/disszociációs állandó*
$K_{ATP\text{-kötés}}$		120 μM^{-1} (8 nM)
k_{3a}	350 s^{-1}	
k_{-3a}	870 s^{-1}	
K_{3a}		0,40 (2,5)
K_{3b}		82 (0,012)
K_{DP} ($K_{d,DP}$)		0,024 mM^{-1} (42 mM)
$k_{PD,on}$	1,6 $\mu M^{-1}s^{-1}$	
$k_{PD,off}$	19 s^{-1}	
K_{PD} ($K_{d,PD}$)		0,084 μM^{-1} (12 μM)
$k_{P,off}$	260 s^{-1}	
$k_{D,on}$	1,2 $\mu M^{-1}s^{-1}$	
$k_{D,off}$	7 s^{-1}	
K_D ($K_{d,D}$)		0,17 μM^{-1} (5,8 μM)
k_4	0,05 s^{-1}	
k_{-4}	0,15 s^{-1}	
K_4		0,33
$K_{d,\ A.M^*.ADP.Pi}$		57
$K_{d,\ A.M^\dagger.ADP.Pi}$		0,7
$K_{d,\ A.M^\dagger.ADP}$		0,12
$K_{d,\ A.M}$		0,03



F.10 Táblázat A Loop4 mutánsok fontosabb kinetikai jellemzői

Mutáns	k_{-D} (s^{-1})	k_{+D} ($\mu M^{-1}s^{-1}$)	$K_{d,D}$ (μM)	k_{-A} (s^{-1})	k_{+A} ($\mu M^{-1}s^{-1}$)	$K_{d,A}$ (μM)	k_{-DA} (s^{-1})	k_{+DA} ($\mu M^{-1}s^{-1}$)	$K_{d,DA}$ (μM)	$K_{d,AD}$ (μM)
W501+	8,2 ± 0,071	1,2 ± 0,033	7,1	0,047 ± 0,0020	1,6 ± 0,044	0,030	0,027 ± 0,0021	0,22 ± 0,016	0,12	33 ± 1,1
E365Q	9,8 ± 0,15	2,0 ± 0,023	5,0	0,057 ± 0,0019	1,6 ± 0,039	0,036	0,049 ± 0,0020	0,17 ± 0,0075	0,30	50 ± 2,4
ΔAL	14 ± 0,21	1,5 ± 0,043	9,3	0,087 ± 0,0060	1,4 ± 0,026	0,064	0,077 ± 0,0039	0,18 ± 0,0086	0,43	37 ± 1,1



3.3 Egyéb fontosabb kutatásaink

3.3.1. A blebbistatin miozin II inhibitor hatásmechanizmusa és kötőhelye

Ebben a fejezetben bemutatjuk, hogy milyen gyakorlati jelentősége van annak, ha pontosan ismerjük egy enzimrendszer működési mechanizmusát. Sikerült megfejtenünk az első miozin II specifikus inhibitor (blebbistatin) hatásmechanizmusát, és ezen keresztül szerkezeti predikciót adtunk az inhibitor kötési helyére (*77*). A szerkezet és a hatásmechanizmus ismerete utakat nyit további inhibitorok kifejlesztésére.

A 2003-ban felfedezett blebbistatin a sejtosztódási barázda kialakulását gátolja anélkül, hogy megszakítaná a mitózis egyéb folyamatait (*32;77*). Kimutatták, hogy hatását a nemizom miozin II gátlásával éri el. További kísérletek kimutatták, hogy a blebbistatin specifikusan a miozin II enzim család tagjait gátolja, míg más miozinokhoz nem vagy gyengén kötődik. Kovács Mihállyal kollaborációban kiterjedt kinetikai méréseket végeztünk, hogy megállapítsuk, hogyan hat a blebbistatin, és miért csak a miozin II család tagjait gátolja.

Megállapítottuk, hogy a blebbistatin nagy affinitással csak a miozin azon állapotához kötődik, amelyben a *switch 2* zárt állapotban van, és ezt az állapotot stabilizálja. Ennek következménye, hogy a ciklus ebben az állapotban gyakorlatilag megáll, ráadásul ebben az állapotban az aktinhoz csak gyengén kötődik a miozin, tehát a blebbistatin a rendszert relaxált állapotba tartja (*77*). *In silico* kísérletekkel modelleztük a kötőhelyet, azt a számítási feltételt alkalmazva, hogy a blebbistatin a miozin II csak zárt állapotban kötődik és más miozinokhoz pedig egyáltalán nem. Számításaink szerint a blebbistatin az aktinkötő árok mélyén kötődik. Egy évvel később Ivan Rayment laboratóriuma meghatározta a miozin-blebbistatin komplex atomi szerkezetét, és megerősítette számításainkat (*83*). Ugyanakkor modellünk kimutatta azt, hogy a blebbistatin kötésekor *induced fit* történik. Ez a változás közvetlenül nem látható az atomi szerkezetből, mert egy aminosav oldallánc kinyílása történik a kötés során, amely visszazáródik, amikor a blebbistatin elfoglalja végleges helyzetét.

A blebbistatin egyelőre az egyetlen miozin család specifikus inhibitor, azonban a hatásmechanizmus valamint az inhibitor kötéskor történő *induced fit* mechanizmusának ismerete elősegítheti további inhibitorok tervezését.

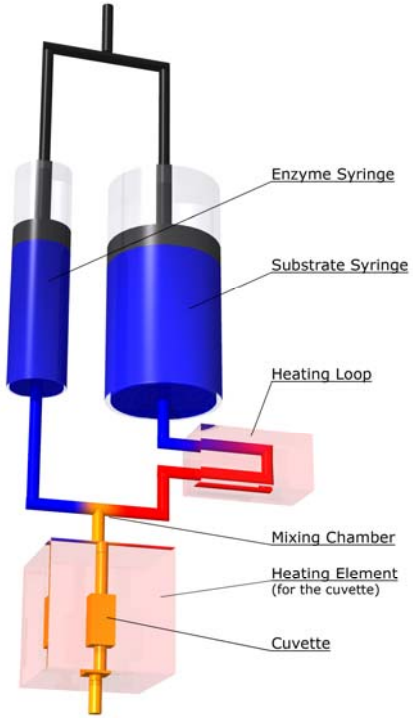
3.3.2 Enzimaktivitás vizsgálata denaturációs hőmérséklet felett: egy új módszer kifejlesztése

Az utóbbi években egy alapvetően új gyors kinetikai módszert, illetve eszközt fejlesztettünk ki: az ún. *temperature-jump/stopped flow*-t (*84*).

A módszer lényege az, hogy a *stopped flow*-ban a reaktánsok szubmilliszekundum alatt történő keverésével egy időben a reakció elegy hőmérsékletét emeljük gyakorlatilag tetszőleges mértékben. A keverés és a hőmérsékletugrás ugyanolyan gyorsan, egyidejűleg történik. A rendszer további előnye, hogy a hőmérséklet szenzitív reaktáns (pl. az enzim) a hőmérsékletugrás előtt végig natív hőmérsékleten van, ugyanakkor a kevésbé hőmérséklet szenzitív reaktáns (pl. a szubsztrát) is csak néhány másodpercig van magas hőmérsékleten a keverés és a hőmérsékletugrás előtt.

3.3.2.1 A *temperature-jump/stopped flow* működési elve és szerkezete

A műszer működésének elvét az 51. ábra mutatja. A *temperature-jump/stopped flow*-ban három különböző hőmérsékletű tér van: 1. a fecskendőket megfelelően alacsony (natív) hőmérsékleten tartjuk 2. a küvettaházat arra a hőmérsékletre fűtjük, amelyen a reakciót akarjuk lejátszatni 3. a nem hőmérséklet szenzitív anyagot a meleg cső-hurkon vezetjük keresztül. Ennek a huroknak a hőmérsékletét úgy állítjuk be, hogy amikor az alacsony (natív) hőmérsékletű enzimmel a megfelelő arányban keverjük a nem hőmérséklet szenzitív anyagot, akkor az elegy hőmérséklete pontosan a küvetta (a reakciótér) hőmérsékletét adja. Ha a magas hőmérsékletű reaktáns keverési térfogata nagyobb, mint az enzimé (pl. 5:1), akkor a meleg hurok hőmérséklete jóval közelebb lesz a küvetta hőmérsékletéhez, mint az enzim kezdeti hőmérséklete. Ennek az előnye az, hogy ezáltal akár a 100 ºC-hoz közeli reakcióhőmérsékletet is elérhetünk.



F.1. ábra A *temperature-jump/stopped flow* működési vázlata

A három különböző hőmérsékletű tér hőmérsékleti beállítását egymáshoz kalibrálhatjuk bármilyen fluorofór alkalmazásával. A fluoreszcencia emisszió általános jellemzője az, hogy a hőmérséklet emelésével az emisszió intenzitása csökken. Tehát, ha a hideg és a forró fluorofór keverékének hőmérséklete kisebb, mint a küvettaházé, akkor a keverék hőmérséklete a küvettában nő, tehát a fluoreszcenciája csökken. Ellenkező esetben a fluoreszcencia nő, míg ha a keverék hőmérséklete pontosan annyi, mint a küvettaházé, akkor nem változik. A hőmérsékleti relaxáció sebességi állandója τ = 1,2 s. A három különböző hőmérsékletű tér hőmérsékletét úgy kell egymáshoz képest beállítani, hogy a keverés után a fluoreszcencia ne változzon. A kalibrációsor a műszerre jellemző, ezért a hőmérsékleti kalibrálást csak egyszer kell elvégezni.

3.3.2.2 A módszer alkalmazási területei, legfontosabb eredmények

A módszert számos esetben alkalmazhatjuk. Az egyik legizgalmasabb alkalmazási lehetőség az, amelyben az enzimreakciót az enzim denaturációs hőmérséklete fölött vizsgáljuk. Ebben a kísérletben minden olyan enzimreakció lépést tudunk követni, amelynek sebességi állandója nagyobb, mint a denaturációé. Mivel a denaturáció másodperces skálán történik általában (lásd alább) és az enzim reakciólépések nagy általánosságban szubmásodperces időskálán játszódnak le, ezért a módszer a legtöbb enzim esetében alkalmazható. Újabban miozin motor domén W501+ konstrukción végeztünk ilyen irányú kísérleteket. Különböző reakciólépéseket tudtunk tanulmányozni jóval a miozin denaturációs hőmérséklete felett (*66*). Ebben a dolgozatban nincs lehetőség kitérni részleteiben a vizsgált jelenségekre, azonban jelezzük, hogy ezek a jelenségek az enzimek hőstabilitásával függnek össze. Ezek megértése , illetve tanulmányozása pedig közelebb visz például hőstabil enzimek tervezéséhez, amelyek ipari jelentősége igen nagy.

A módszer további fontos alkalmazási lehetősége, hogy humán fehérjék *in vitro* kinetikáját fiziológiai hőmérsékleten is tudjuk tanulmányozni. A legtöbb humán enzim 37ºC-on instabil, ezért enzimkinetikai paramétereik csak 20ºC körüli hőmérsékleten ismertek. Emiatt pedig ezek a paraméterek csak nehezen vethetők össze a fiziológiai kísérletek eredményeivel. A *temperature-jump/stopped flow* alkalmazása ezt a problémát megoldja, hiszen a mérés közben a humán fehérjét a fecskendőben tárolhatjuk azon a hőmérsékleten, amelyen stabil, míg a mérést a hőmérsékletugrással fiziológiás hőmérsékleten végezhetjük el.

A *temperature-jump/stopped flow* egyik legfontosabb alkalmazási területe a fehérjék stabilitásának és unfoldingjának vizsgálata lehet. A *temperature-jump/stopped flow* különösen hasznos olyan fehérjék unfolding folyamatainak termodinamikájának vizsgálatában, amelyek irreverzibilisen denaturálódnak, mert differenciál pásztázó kalorimetriával (DSC) ezek a mérések nem végezhetők el. Szerkezet specifikus szignál (pl. egyedi triptofán) alkalmazásával a fehérjék egyes régióinak unfoldingját is vizsgálni lehet hőmérséklet indukált denaturáció során. Kimutattuk, hogy a különböző régiókban elhelyezett szignálok különböző kinetikai profilt mutatnak a hődenaturáció során. Ezen kísérletek révén meghatározható az a régió, amely a leggyengébb „láncszem”, ahol a hődenaturáció iniciálódik. Ennek a régiónak a megtalálása azért fontos, mert leghatékonyabban ebben a régióban elhelyezett változtatás révén stabilizálhatunk egy fehérjét. A

temperature-jump/stopped flow mind elméleti, mind gyakorlati szempontból nagy lépést jelenthet fehérjék hőstabilitásának tervezésében.

3.3.3 A fehérjék belső súrlódásának hatása az enzimreakciók sebességére

Az enzimreakciók során bekövetkező konformáció változások sebességét az Arrhenius egyenlet írja le:

$$k = A \times e^{-Ea/RT}$$

Az egyenlet alapján látható, hogy a reakció sebességét az aktiválási energia (E_a) és a preexponenciálisban elhelyezkedő állandó (A) nagysága határozza meg. Utóbbi paraméter fizikai hátterének magyarázata nem egyszerű feladat. Eltekintve jelen dolgozatban az erre vonatkozó különböző elméletek részletes elemzésétől, Kramers elméleti alapon kimutatta, hogy a közeg súrlódása (továbbiakban a pontosság kedvéért *friction*-t használok) alapvetően meghatározza a preexponenciális értékét. Számos próbálkozás történt az utóbbi évtizedekben a *friction* jelenségének kimutatására fehérjék esetében, azonban meggyőző eredménnyel mindez csak extrém alacsony hőmérsékleten sikerült mioglobin esetében (*85*). Ansari és mtsi. ugyanakkor kimutatták, hogy nemcsak a közeg *friction*-ja (*external friction*), hanem a fehérje belső *friction*-ja (*internal friction*) is meghatározó paraméter (*86*).

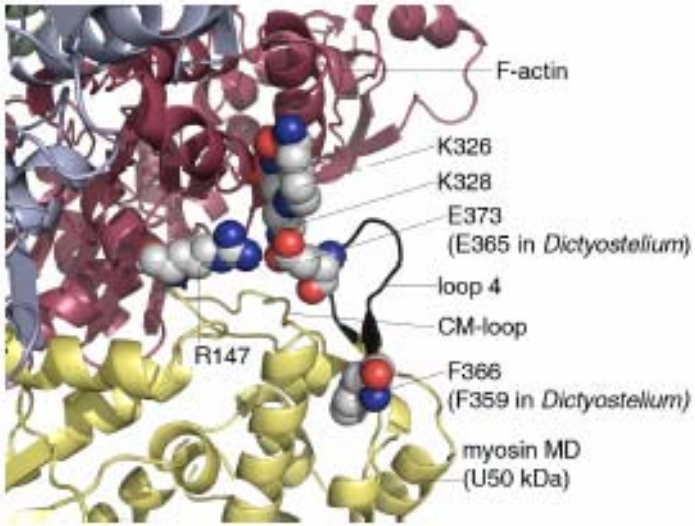
Tripszinben és miozinban sikerült kimutatnunk natív hőmérsékleten is az *internal friction* jelenségét (*87;88*). Továbbá egyedülálló módon olyan tripszin mutánsokat sikerült terveznünk és előállítanunk, amelyekben specifikusan ezt a paramétert változtattuk meg (*87;89*). Bemutattuk, hogy ha olyan aminosav pozícióba helyezünk mutációt, amely körül a konformáció átalakulás történik (jelen esetben ez egy glicin), és a mutációval a csukló szabadsági fokát korlátozzuk, akkor a molekula *internal friction* paraméterét specifikusan lehet növelni. Ezeknek a kísérleteknek a kivitelezésében különösen nagy szerepe volt a *temperature-jump/stopped flow* módszernek.

Reményeink szerint ezek a kísérletek fontos alapot nyújthatnak abban, hogy kidolgozhassuk azt az elméletet, amely megmagyarázza a fehérjék *internal friction* paraméterének fizikai hátterét, illetve azt, hogy hogyan határozza meg az *internal friction* a konformációs átalakulások sebességi konstansát.

3.3.4 A Loop 4 szerepe az aktinkötésben

A miozin enzimatikus ciklusában fontos szerepet tölt be az aktinnal való kölcsönhatása, amely stimulálja a miozin aktivitását. Mindkét fehérjén kiterjedt kölcsönhatási felület található, amelyek közül számos felszíni hurokról bebizonyították, hogy fontos szerepet játszanak az aktomiozin kölcsönhatásban. Mindmáig nem tisztázott azonban egyértelműen, hogy a miozinon elhelyezkedô *loop 4* szerepet játszik-e az aktinkötésben, illetve az aktomiozinkomplex stabilitásában. A kérdés eldöntésére mutációkat terveztünk egy egy-triptofánt tartalmazó (W501+) *Dictyostelium* motordomén konstrukcióba: a kölcsönhatásban feltételezhetően nagy szerepet játszó glutaminsavat glutaminra (E365Q) cseréltük, illetve a teljes hurokszekvenciát 3 glicinnel helyettesítettük (ΔAL). Széleskörű fluoreszcens és gyorskinetikai vizsgálatot alkalmaztunk felhasználva a fehérjék belsô fluoreszcenciáját, a pirénjelölt aktinfluoreszcenciát, továbbá a fényszórásváltozásból származó jelváltozást. Kísérleteink bizonyították, hogy mindkét mutáció gyengíti az aktomiozin-kölcsönhatást, amelyet a megnövekedett disszociációs állandó (K_d) értékek mutatnak mind apo, mind ADP kötött állapotban, mely hatást elsôsorban a leválási sebességi állandók (k_{off}) növelésén keresztül fejtik ki. A mutációk jelentôsen emelik az ATP indukálta aktomiozindisszociáció sebességét. Továbbá az aktinindukált ATPáz-aktivitás K_M értékét egy nagyságrenddel növelik. A ΔAL mutáns aktin csúsztatási sebessége 2,2-szeresére emelkedett az *in vitro* motilitásteszben. További fontos megfigyelés, hogy a mutánsok jelentősen csökkentett hajlamot mutattak az aktinfilamentumok törésére. Bebizonyítottuk tehát, hogy a *loop 4* funkcionális aktinkötő régió, amely az aktomiozinkomplex stabilitásáért felelős, továbbá elsődleges meghatározója az aktomiozin tapadási súrlódásának.

A fenti konstrukciókkal bizonyítottuk, hogy a *loop 4*-nak fontos szerepe van az aktinkötés mechanizmusában. Azt találtuk, hogy a *loop 4* elsősorban a gyenge aktin kötés stabilizációjában vesz részt, ami azért fontos, mert ezzel a lépéssel iniciálódik a munkaütem - mint azt a dolgozatban kimutattam.



F.2 ábra. A *loop 4* elhelyezkedése a motor doménban és feltételezett helye az aktin kötésben. A mutációkat külön kimeletem.

3.3.5 MIF, új módszer a gyógyszermolekulák hatásspektrumának predikciójához

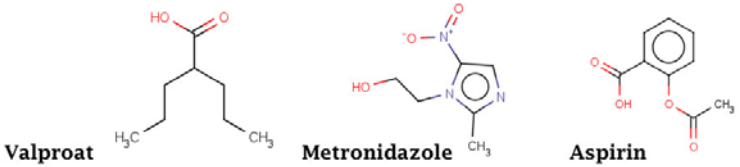
A gyógyszerek engedélyezésének nem feltétele a gyógyszer hatásmechanizmusának pontos ismerete: első lépésben elegendő, ha egy vegyület hatásos. Még a legígéretesebb gyógyszerjelölt molekuláknál is előfordulhat azonban, hogy nemkívánatos mellékhatások lépnek föl, melyek végül annak elvetéséhez vezetnek. Az FDA által 2004-ben kiadott jelentés szerint (Innovation or Stagnation? Challenge and Opportunity on the Critical Path to New Medical Products. FDA Report,) a biomedikai kutatásokba áramló növekvő mennyiségű erőforrások nem eredményeztek hasonló tendenciát az új gyógyszerek piacra kerülésében, sőt, 2000 környékén lassú csökkenés indult be az új kémiai szerkezettel rendelkező gyógyszerek (NME – *new molecular entity*) számában. Az aggasztó helyzetet látva az FDA az alapkutatás és a transzlációs kutatás mellett egy új irányvonal követését szorgalmazta *(Critical Path Research)*, mely a gyógyszerfejlesztési folyamat hatékonyabbá tételét helyezi középpontba. Ma is aktuális jelentésükben kiemelik az *in silico* eljárások alkalmazásának jelentőségét a prototípus-tervezési és a preklinikai fázisokban, mivel ezek költséghatékonysága jóval nagyobb, mint az *in vitro / in vivo* teszteké. Ezzel összhangban indítottuk 2005 őszén a Molekuláris Interakciós Ujjlenyomat *(Molecular Interaction Fingerprint, MIF)* projektet, melynek célja a gyógyszerjelölt molekulák várható hatásainak és mellékhatásainak predikciója egy olyan ujjlenyomat segítségével, melyet molekuláris dokkolások sorozatának segítségével állítunk elő. Ezt az ujjlenyomatot a prototípus-tervezés és a preklinikai fázisok két dimenziójában, a biztonság és a gyógyászati hasznosság vizsgálatának területén is lehet alkalmazni, hiszen segítségével információ nyerhető a gyógyszerjelölt molekula toxicitásáról, nem tolerálható mellékhatásairól és orvosi szempontból jelentős hatásairól is, amikor még csak „képlet formájában” létezik a szer. Kutatásunk ily módon teljes mértékben összhangban van a mai biomedikai trendekkel, mindamellett egyedi módszertana, megközelítése okán komoly újdonságértéket is hordoz.

Vizsgálatunk alapjául Hetényi és munkatársai cikke szolgált {Hetenyi, 2003 288 /id}, melyben a szerzők 39 aromás molekulát dokkoltak 31 fehérjére, és bevezették a molekuláris interakciós ujjlenyomat fogalmát (lásd később). Ezt a megközelítést továbbgondolva munkánk során összegyűjtöttük az FDA által elfogadott kismolekulájú gyógyszerhatóanyagok és ezek (nagyrészt humán) célfehérjéinek térszerkezeti és egyéb adatait (többek között a gyógyszerek hatásait,

mellékhatásait). Az ismert térszerkezetű, dokkolásra alkalmas célfehérjékre (89 db a kb. 600-ból) dokkoltunk 981 kismolekulát (melyek nem tartalmaztak fémiont és szabad rotációik száma nem haladta meg a 24-et), ami megközelítőleg százezer dokkolást jelent. A dokkolásokból kapható legalacsonyabb kötési szabadentalpiákat egy mátrixba rendezve megállapítható, hogy a kismolekulák kölcsönhatási energiaértékei minden esetben jellegzetes, egyedi mintázatot alkotnak. Az említett mátrixban az egy ligandumhoz tartozó energiaértékek alkotta 89 elemű vektor adja a molekuláris interakciós ujjlenyomatot (MIF). A MIF vektorok hasonlósága arra utal, hogy azok a kismolekulák potenciálisan hasonló kölcsönhatási partnerekkel rendelkeznek, amiből pedig a várható hatásokra, mellékhatásokra (bioaktivitási spektrum) lehet következtetni. A predikció első lépése ennek megfelelően az új, gyógyszerjelölt molekula végigdokkolása a fehérjekészleten. Az így generált MIF-nek az ismert ujjlenyomatokkal való összevetése, továbbá az utóbbiakhoz társítható bioaktivitásokkal történő, adott függvény szerinti korreláltatása képezi az előrejelzés alapját.

Megközelítésünk egyedisége abban rejlik, hogy a dokkolásokat nem mint egyedi vizsgálatokat értelmezzük, szemben Chen módszerével, aki az adott molekulával erős kölcsönhatást kialakító fehérjék funkciójának vizsgálatával kívánta megjósolni a várható hatásspektrumot (93). Figyelembe véve, hogy a gyógyászatilag fontos fehérjék, főleg membránreceptorok háromdimenziós szerkezetei nagyrészt nem megoldottak, továbbá a gyógyszerek hatásainak egy részéért várhatóan fehérjékkel/fehérjekomplexekkel kialakított tranziens, gyenge kölcsönhatások felelősek, belátható, hogy Chen eljárásának hasznosíthatósága korlátozott. A MIF szemlélete sokkal közelebb áll a Fliri és munkatársai által képviselthez (94, 95, 96), akik *in vitro* vizsgálták 1000 gyógyszermolekula kötéserősségét (inhibíciós százalék) 100 humán fehérjén, melyek a gyógyszer-célpontként ismert proteinek reprezentatív keresztmetszetét adják. Azt találták, hogy az inhibíciós értékek molekuláris deszkriptorokként viselkednek, és alkalmasak a molekulaszerkezet jellemzésére. Az egy gyógyszerre 100 fehérjén kapott értékek összességét nevezték biospektrumnak (94). Kimutatták, hogy a biospektrum több információt hordoz, mint ami az egyedi mérési eredményekből következik: egyes célfehérjék eltávolítása és a biospektrumok újragenerálása nincs komoly hatással a gyógyszerek szerkezetileg helyes klasszifikációjára (95). Emellett összefüggést fedeztek fel a biospektrumok és az ismert mellékhatások között (96). Módszerük azonban annak költségigénye miatt

nem alkalmazható a gyógyszerfejlesztés kezdetét jellemző nagy áteresztőképességű vizsgálatokban, szemben az *in silico* megközelítésekkel. Megállapítottuk, hogy a MIF adatbázisra is jellemző a biospektrumnál leírt robosztusság, noha itt még kifejezettebb, hiszen rengeteg célfehérje eleve nem is szerepelhetett a dokkolási célpontok között a korrekt 3D-s szerkezet ismeretének hiánya miatt – ebből következően a gyógyszerek döntő többsége egyáltalán nem az ismert célfehérjéire lett dokkolva. Itt ragadnám meg az alkalmat, hogy kiemeljem a MIF egyik legfontosabb sajátosságát: azt, hogy a dokkolásra használt fehérjekészlet mint diszriminátorfelület szerepel a vizsgálatainkban. Elsődleges funkciója az, hogy elkülönítse egymástól az esetleg igen hasonló szerkezetű kismolekulákat.



Gen Name	Ch Name	Cas	Mol	Similarity	Fingerprint
Valproic	2-propylpentanoic	99-66-1	-	-	
Divalproex	sodium	76584-70-8	APRD00066	0.67	
Metronidazole	2-(2-methyl-5-nitro-1H-imidazol-1-yl)	443-48-1	APRD00631	2.52	
Aspirin	2-acetyloxybenzoic	50-78-2	APRD00264	2.83	
Clavulanate	3-(2-hydroxyethylidene)-7-oxo-4-oxa-)	58001-44-8	APRD00049	2.96	
Mesalamine	5-amino-2-hydroxy-benzoic	89-57-6	APRD01098	3.01	
Captopril	(2S)-1-[(2S)-2-methyl-3-sulfanyl-pro)	62571-86-2	APRD00164	3.15	
Tinidazole	1-(2-ethylsulfonylethyl)-2-methyl-5-)	19387-91-8	APRD01260	3.35	
Isosorbide	8-nitrooxy-2,6-dioxabicyclo[3.3.0]oc)	16051-77-7	APRD00528	3.42	
Aminosalicylic	4-amino-2-hydroxy-benzoic	65-49-6	APRD00749	3.42	

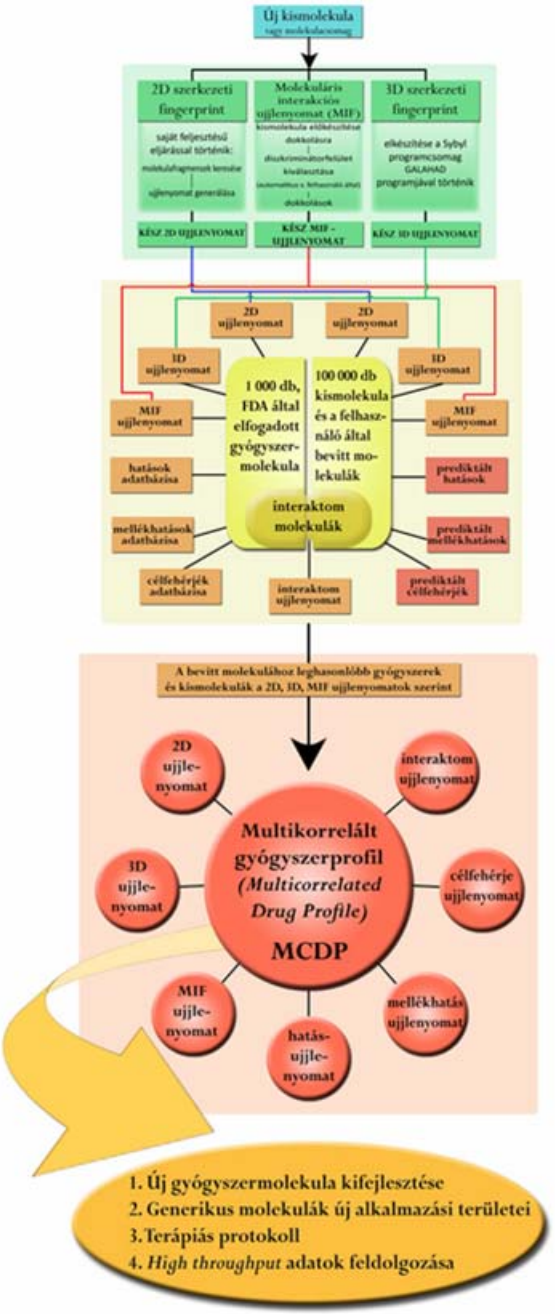
F.3. ábra: A MIF webes szolgáltatásának egyik képernyőképe, mely a Valproat, a Metronidazole és az Aspirin közötti MIF-összefüggést mutatja meg. A jobb alsó képrész mutatja az egyes gyógyszerek MIF ujjlenyomatait, a Valproattal kezdve, sorrendben az egyre távolibb szerekkel. A kölcsönhatások erősségét zöld-piros színskála jelzi. Az ujjlenyomatok előtt látható a hasonlósági index számszerű értéke, mely a kiindulási szertől mért MIF-távolságot adja meg. Értéke 160-ig terjedhet, az ábrán látható szerek tehát igen szoros rokonságot mutatnak egymással. Közülük a Metronidazole-t és az Aspirint vizsgáltuk meg alaposabban. A Valproattal összehasonlítva őket megállapítható, hogy számos ponton hasonlítanak: erős pszichiátriai hatások/mellékhatások, ízérzékelés megváltozása, rohamok előidézése, renális hatások, hepatotoxicitás, antimikrobiális hatás, antikonvulzív hatás, CYP 2C9 izoenzim inhibíció. A Valproat 30 legközelebbi rokona közül 14 nem szteroid típusú gyulladáscsökkentő, ami arra utal, hogy a Valproatnak COX-gátló hatása van, ami bizonyított is.

A mi szempontunkból az egyedi kölcsönhatások kevés jelentőséggel bírnak, a bioaktivitás előrejelzésében direkt módon nem vesznek részt. A MIF-vektorokat tehát mint egységeket értelmezzük, nem vizsgáljuk építőköveiket, az egyedi dokkolási kísérleteket. Ebből a

megfontolásból fakad, hogy akár mesterségesen generált diszkriminátorfelületeket is használhatnánk a MIF-ek létrehozására – ezen hipotézis vizsgálatára a következő években kerül sor.

Eddigi eredményeink szerint a MIF-ek összehasonlításával releváns információ nyerhető a meglévő gyógyszerek bioaktivitásáról (F.3. ábra), sőt, amennyiben az adatbázisban nem szereplő új molekula MIF-jét elkészítjük, majd összevetjük az ismert gyógyszerek ujjlenyomataival, módszerünk költséghatékony predikcióra is alkalmassá válik. Eljárásunkat egy 2008 első felében induló webes szolgáltatás keretében kívánjuk közreadni. A szolgáltatás keretében lehetőség nyílik a forgalomban lévő szerek vizsgálatára és új szerek bioaktivitási spektrumának előrejelzésére.

Módszerünk felhasználásával a közeljövőben egy új, nagyszabású ujjlenyomat-rendszer kiépítését tervezzük. A multikorrelált gyógyszerprofil (*Multicorrelated Drug Profile*, MCDP – lásd F.4. ábra) alapja a MIF-adatbázis, de ez kiegészül egy kétdimenziós és egy háromdimenziós kémiai szerkezeti adatbázissal, valamint a célfehérjék, hatások, mellékhatások adatbázisával. A kismolekulák készletét kibővítjük további 100000 (nem gyógyszer) vegyülettel, továbbá interaktomikai módszerek alkalmazásával egy interaktom ujjlenyomatot is kidolgozunk a molekulák egy részére. Az MCPD mint komplex bioinformatikai szolgáltatás segítségével gyógyszerek alkalmazási sorrendjének megállapítását megkönnyítő terápiás protokoll is készíthető majd.



F.4 ábra Az MCDP szolgáltatás elve

4. Irodalomjegyzék

1. **Houdusse, A., Szent-Gyorgyi, A. G., and Cohen, C. (2000) Three conformational states of scallop myosin S1, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 97*, 11238-11243.**
2. **Fischer, S., Windshugel, B., Horak, D., Holmes, K. C., and Smith, J. C. (2005) Structural mechanism of the recovery stroke in the myosin molecular motor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 102*, 6873-6878.**
3. **Kishino, A. and Yanagida, T. (1988) Force measurements by micromanipulation of a single actin filament by glass needles, *Nature 334*, 74-76.**
4. **Spudich, J. A. (1990) Optical trapping: Motor molecules in motion, *Nature 348*, 284-285.**
5. **Toyoshima, Y. Y., Kron, S. J., McNally, E. M., Niebling, K. R., Toyoshima, C., and Spudich, J. A. (1987) Myosin subfragment-1 is sufficient to move actin filaments in vitro, *Nature 328*, 536-539.**
6. **Wakelin, S., Conibear, P. B., Woolley, R. J., Floyd, D. N., Bagshaw, C. R., Kovacs, M., and Malnasi-Csizmadia, A. (2002) Engineering Dictyostelium discoideum myosin II for the introduction of site-specific fluorescence probes, *J. Muscle Res. Cell Motil. 23*, 673-683.**
7. **Yildiz, A., Forkey, J. N., McKinney, S. A., Ha, T., Goldman, Y. E., and Selvin, P. R. (2003) Myosin V walks hand-over-hand: single fluorophore imaging with 1.5-nm localization, *Science 300*, 2061-2065.**
8. **Holmes, K. C., Schroder, R. R., Sweeney, H. L., and Houdusse, A. (2004) The structure of the rigor complex and its implications for the power stroke, *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci. 359*, 1819-1828.**
9. **Holmes, K. C. and Geeves, M. A. (2000) The structural basis of muscle contraction, *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci. 355*, 419-431.**
10. **Kintses, B., Gyimesi, M., Pearson, D. S., Geeves, M. A., Zeng, W., Bagshaw, C. R., and Malnasi-Csizmadia, A. (2006) Switch 1 loop movement of myosin determines actin interaction: common implications for P-loop NTPases, submitted ed..**
11. **Goody, R. S. and Hofmann-Goody, W. (2002) Exchange factors, effectors, GAPs and motor proteins: common thermodynamic and kinetic principles for different functions, *Eur. Biophys. J. 31*, 268-274.**
12. **Klebe, C., Prinz, H., Wittinghofer, A., and Goody, R. S. (1995) The kinetic mechanism of Ran--nucleotide exchange catalyzed by RCC1, *Biochemistry 34*, 12543-12552.**
13. **Fisher, A. J., Smith, C. A., Thoden, J. B., Smith, R., Sutoh, K., Holden, H. M., and Rayment, I. (1995) X-ray structures of the myosin motor domain of Dictyostelium discoideum complexed with MgADP.BeFx and MgADP.AlF4-, *Biochemistry 34*, 8960-8972.**

14. **Rayment, I., Rypniewski, W. R., Schmidt-Base, K., Smith, R., Tomchick, D. R., Benning, M. M., Winkelmann, D. A., Wesenberg, G., and Holden, H. M. (1993) Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor, *Science 261*, 50-58.**
15. **Balint, M., Sreter, F. A., Wolf, I., Nagy, B., and 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.**
16. **Kull, F. J., Vale, R. D., and Fletterick, R. J. (1998) The case for a common ancestor: kinesin and myosin motor proteins and G proteins, *J. Muscle Res. Cell Motil. 19*, 877-886.**
17. **Kull, F. J., Sablin, E. P., Lau, R., Fletterick, R. J., and Vale, R. D. (1996) Crystal structure of the kinesin motor domain reveals a structural similarity to myosin, *Nature 380*, 550-555.**
18. **Bauer, C. B., Holden, H. M., Thoden, J. B., Smith, R., and Rayment, I. (2000) X-ray structures of the apo and MgATP-bound states of Dictyostelium discoideum myosin motor domain, *J. Biol. Chem. 275*, 38494-38499.**
19. **Gulick, A. M., Bauer, C. B., Thoden, J. B., and Rayment, I. (1997) X-ray structures of the MgADP, MgATPgammaS, and MgAMPPNP complexes of the Dictyostelium discoideum myosin motor domain, *Biochemistry 36*, 11619-11628.**
20. **Smith, C. A. and Rayment, I. (1996) X-ray structure of the magnesium(II).ADP.vanadate complex of the Dictyostelium discoideum myosin motor domain to 1.9 A resolution, *Biochemistry 35*, 5404-5417.**
21. **Smith, C. A. and Rayment, I. (1995) X-ray structure of the magnesium(II)-pyrophosphate complex of the truncated head of Dictyostelium discoideum myosin to 2.7 A resolution, *Biochemistry 34*, 8973-8981.**
22. **Menetrey, J., Bahloul, A., Wells, A. L., Yengo, C. M., Morris, C. A., Sweeney, H. L., and Houdusse, A. (2005) The structure of the myosin VI motor reveals the mechanism of directionality reversal, *Nature 435*, 779-785.**
23. **Coureux, P. D., Sweeney, H. L., and Houdusse, A. (2004) Three myosin V structures delineate essential features of chemo-mechanical transduction, *EMBO J. 23*, 4527-4537.**
24. **Coureux, P. D., Wells, A. L., Menetrey, J., Yengo, C. M., Morris, C. A., Sweeney, H. L., and Houdusse, A. (2003) A structural state of the myosin V motor without bound nucleotide, *Nature 425*, 419-423.**
25. **Houdusse, A., Kalabokis, V. N., Himmel, D., Szent-Gyorgyi, A. G., and Cohen, C. (1999) Atomic structure of scallop myosin subfragment S1 complexed with MgADP: a novel conformation of the myosin head, *Cell 97*, 459-470.**

26. **Reubold, T. F., Eschenburg, S., Becker, A., Kull, F. J., and Manstein, D. J. (2003) A structural modell for actin-induced nucleotide release in myosin, *Nat. Struct. Biol. 10*, 826-830.**
27. **Zeng, W., Conibear, P. B., Dickens, J. L., Cowie, R. A., Wakelin, S., Malnasi-Csizmadia, A., and Bagshaw, C. R. (2004) Dynamics of actomyosin interactions in relation to the cross-bridge cycle, *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci. 359*, 1843-1855.**
28. **Bagshaw, C. R., Eccleston, J. F., Eckstein, F., Goody, R. S., Gutfreund, H., and Trentham, D. R. (1974) The magnesium ion-dependent adenosine triphosphatase of myosin. Two-step processes of adenosine triphosphate association and adenosine diphosphate dissociation, *Biochem. J. 141*, 351-364.**
29. **Bagshaw, C. R. and Trentham, D. R. (1974) The characterization of myosin-product complexes and of product-release steps during the magnesium ion-dependent adenosine triphosphatase reaction, *Biochem. J. 141*, 331-349.**
30. **Taylor, E. W. and Lymn, R. W. (1972) Enzyme kinetics and the mechanism of muscle contraction, *Muscle Biol. 1*, 47-69.**
31. **Lymn, R. W. and Taylor, E. W. (1971) Mechanism of adenosine triphosphate hydrolysis by actomyosin, *Biochemistry 10*, 4617-4624.**
32. **Straight, A. F., Cheung, A., Limouze, J., Chen, I., Westwood, N. J., Sellers, J. R., and Mitchison, T. J. (2003) Dissecting temporal and spatial control of cytokinesis with a myosin II Inhibitor, *Science 299*, 1743-1747.**
33. **Malnasi-Csizmadia, A., Woolley, R. J., and Bagshaw, C. R. (2000) Resolution of conformational states of Dictyostelium myosin II motor domain using tryptophan (W501) mutants: implications for the open-closed transition identified by crystallography, *Biochemistry 39*, 16135-16146.**
34. **Conibear, P. B., Bagshaw, C. R., Fajer, P. G., Kovacs, M., and Malnasi-Csizmadia, A. (2003) Myosin cleft movement and its coupling to actomyosin dissociation, *Nat. Struct. Biol. 10*, 831-835.**
35. **Suzuki, Y., Yasunaga, T., Ohkura, R., Wakabayashi, T., and Sutoh, K. (1998) Swing of the lever arm of a myosin motor at the isomerization and phosphate-release steps, *Nature 396*, 380-383.**
36. **Zeng, W., Seward, H. E., Malnasi-Csizmadia, A., Wakelin, S., Woolley, R. J., Cheema, G. S., Basran, J., Patel, T. R., Rowe, A. J., and Bagshaw, C. R. (2006) Resonance Energy Transfer between Green Fluorescent Protein Variants: Complexities Revealed with Myosin Fusion Proteins, *Biochemistry 45*, 10482-10491.**
37. **Kovacs, M., Malnasi-Csizmadia, A., Woolley, R. J., and Bagshaw, C. R. (2002) Analysis of nucleotide binding to Dictyostelium myosin II motor domains containing a single tryptophan near the active site, *J. Biol. Chem. 277*, 28459-28467.**

38. **Malnasi-Csizmadia, A., Kovacs, M., Woolley, R. J., Botchway, S. W., and Bagshaw, C. R. (2001) The dynamics of the relay loop tryptophan residue in the Dictyostelium myosin motor domain and the origin of spectroscopic signals, *J. Biol. Chem. 276*, 19483-19490.**
39. **Kovacs, M., Malnasi-Csizmadia, A., Woolley, R. J., and Bagshaw, C. R. (2002) Analysis of nucleotide binding to Dictyostelium myosin II motor domains containing a single tryptophan near the active site, *J Biol. Chem. 277*, 28459-28467.**
40. **Kovacs, M., Malnasi-Csizmadia, A., Woolley, R. J., and Bagshaw, C. R. (2002) Analysis of nucleotide binding to Dictyostelium myosin II motor domains containing a single tryptophan near the active site, *J Biol. Chem. 277*, 28459-28467.**
41. **Mannherz, H. G., Schenck, H., and Goody, R. S. (1974) Synthesis of ATP from ADP and inorganic phosphate at the myosin-subfragment 1 active site, *Eur. J Biochem. 48*, 287-295.**
42. **Mannherz, H. G. and Goody, R. S. (1976) Proteins of contractile systems, *Annu. Rev. Biochem. 45*, 427-465.**
43. **Geeves, M. A. and Holmes, K. C. (1999) Structural mechanism of muscle contraction, *Annu. Rev. Biochem. 68*, 687-728.**
44. **Geeves, M. A. and Holmes, K. C. (2005) The molecular mechanism of muscle contraction, *Adv. Protein Chem. 71*, 161-193.**
45. **Goody, R. S. (2003) The missing link in the muscle cross-bridge cycle, *Nat. Struct. Biol. 10*, 773-775.**
46. **Coureux, P. D., Wells, A. L., Menetrey, J., Yengo, C. M., Morris, C. A., Sweeney, H. L., and Houdusse, A. (2003) A structural state of the myosin V motor without bound nucleotide, *Nature 425*, 419-423.**
47. **Holmes, K. C., Angert, I., Kull, F. J., Jahn, W., and Schroder, R. R. (2003) Electron cryo-microscopy shows how strong binding of myosin to actin releases nucleotide, *Nature 425*, 423-427.**
48. **Lehrer, S. S. (1997) Intramolecular pyrene excimer fluorescence: a probe of proximity and protein conformational change, *Methods Enzymol. 278*, 286-295.**
49. **Lehrer, S. S. (1995) Pyrene excimer fluorescence as a probe of protein conformational change, *Subcell. Biochem. 24*, 115-132.**
50. **Lehrer, S. S. and Fasman, G. D. (1965) Excimer fluorescence in liquid phenol, p-ethylphenol, and anisole, *J Am. Chem. Soc. 87*, 4687-4691.**
51. **Holmes, K. C. and Schroder, R. R. (2003) Switch 1 opens on strong binding to actin. Molecular and cellular aspects of muscle contraction, *Adv. Exp. Med. Biol. 538*, 159-166.**
52. **Coureux, P. D., Wells, A. L., Menetrey, J., Yengo, C. M., Morris, C. A., Sweeney, H. L., and Houdusse, A. (2003) A structural state of the myosin V motor without bound nucleotide, *Nature 425*, 419-423.**
53. **Kintses, B., Gyimesi, M., Pearson, D. S., Geeves, M. A., Zeng, W., Bagshaw, C. R., and Malnasi-Csizmadia, A. (2007) Reversible**

movement of switch 1 loop of myosin determines actin interaction, *EMBO J. 26*, 265-274.

54. Shriver, J. W. and Sykes, B. D. (1982) Energetics of the equilibrium between two nucleotide-free myosin subfragment 1 states using fluorine-19 nuclear magnetic resonance, *Biochemistry 21*, 3022-3028.

55. Shriver, J. W. and Sykes, B. D. (1981) Energetics and kinetics of interconversion of two myosin subfragment-1.adenosine 5'-diphosphate complexes as viewed by phosphorus-31 nuclear magnetic resonance, *Biochemistry 20*, 6357-6362.

56. Shriver, J. W. and Sykes, B. D. (1981) Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance evidence for two conformations of myosin subfragment-1.nucleotide complexes, *Biochemistry 20*, 2004-2012.

57. Rosenfeld, S. S., Houdusse, A., and Sweeney, H. L. (2005) Magnesium regulates ADP dissociation from myosin V, *J Biol. Chem. 280*, 6072-6079.

58. Sweeney, H. L. and Houdusse, A. (2004) The motor mechanism of myosin V: insights for muscle contraction, *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci. 359*, 1829-1841.

59. Yang, Y., Gourinath, S., Kovacs, M., Nyitray, L., Reutzel, R., Himmel, D. M., O'Neall-Hennessey, E., Reshetnikova, L., Szent-Gyorgyi, A. G., Brown, J. H., and Cohen, C. (2007) Rigor-like structures from muscle myosins reveal key mechanical elements in the transduction pathways of this allosteric motor, *Structure. 15*, 553-564.

60. Kurzawa, S. E., Manstein, D. J., and Geeves, M. A. (1997) Dictyostelium discoideum myosin II: characterization of functional myosin motor fragments, *Biochemistry 36*, 317-323.

61. Woodward, S. K., Geeves, M. A., and Manstein, D. J. (1995) Kinetic characterization of the catalytic domain of Dictyostelium discoideum myosin, *Biochemistry 34*, 16056-16064.

62. Ritchie, M. D., Geeves, M. A., Woodward, S. K., and Manstein, D. J. (1993) Kinetic characterization of a cytoplasmic myosin motor domain expressed in Dictyostelium discoideum, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 90*, 8619-8623.

63. Batra, R. and Manstein, D. J. (1999) Functional characterisation of Dictyostelium myosin II with conserved tryptophanyl residue 501 mutated to tyrosine, *Biol. Chem. 380*, 1017-1023.

64. Park, S. and Burghardt, T. P. (2000) Isolating and localizing ATP-sensitive tryptophan emission in skeletal myosin subfragment 1, *Biochemistry 39*, 11732-11741.

65. Malnasi-Csizmadia, A., Pearson, D. S., Kovacs, M., Woolley, R. J., Geeves, M. A., and Bagshaw, C. R. (2001) Kinetic resolution of a conformational transition and the ATP hydrolysis step using relaxation methods with a Dictyostelium myosin II mutant containing a single tryptophan residue, *Biochemistry 40*, 12727-12737.

66. **Kintses, B., Simon, Z., Gyimesi, M., Toth, J., Jelinek, B., Niedetzky, C., Kovacs, M., and Malnasi-Csizmadia, A. (2006) Enzyme kinetics above denaturation temperature: a temperature-jump/stopped-flow apparatus, *Biophys. J. 91*, 4605-4610.**
67. **Malnasi-Csizmadia, A., Toth, J., Pearson, D. S., Hetenyi, C., Nyitray, L., Geeves, M. A., Bagshaw, C. R., and Kovacs, M. (2007) Selective perturbation of the myosin recovery stroke by point mutations at the base of the lever arm affects ATP hydrolysis and phosphate release, *J Biol. Chem. 282*, 17658-17664.**
68. **Conibear, P. B., Malnasi-Csizmadia, A., and Bagshaw, C. R. (2004) The effect of F-actin on the relay helix position of myosin II, as revealed by tryptophan fluorescence, and its implications for mechanochemical coupling, *Biochemistry 43*, 15404-15417.**
69. **White, H. D., Belknap, B., and Webb, M. R. (1997) Kinetics of nucleoside triphosphate cleavage and phosphate release steps by associated rabbit skeletal actomyosin, measured using a novel fluorescent probe for phosphate, *Biochemistry 36*, 11828-11836.**
70. **Gyimesi, M., Kintses, B., Bodor, A., Perczel, A., Fischer, S., Bagshaw, C. R., and Malnasi-Csizmadia, A. (2008) The mechanism of the reverse recovery-step, phosphate release, and actin activation of Dictyostelium myosin II, *J Biol. Chem.***
71. **Koppole, S., Smith, J. C., and Fischer, S. (2007) The structural coupling between ATPase activation and recovery stroke in the myosin II motor, *Structure. 15*, 825-837.**
72. **Mesentean, S., Koppole, S., Smith, J. C., and Fischer, S. (2007) The principal motions involved in the coupling mechanism of the recovery stroke of the myosin motor, *J Mol. Biol. 367*, 591-602.**
73. **Koppole, S., Smith, J. C., and Fischer, S. (2006) Simulations of the myosin II motor reveal a nucleotide-state sensing element that controls the recovery stroke, *J Mol. Biol. 361*, 604-616.**
74. **Schwarzl, S. M., Smith, J. C., and Fischer, S. (2006) Insights into the chemomechanical coupling of the myosin motor from simulation of its ATP hydrolysis mechanism, *Biochemistry 45*, 5830-5847.**
75. **Malnasi-Csizmadia, A., Dickens, J. L., Zeng, W., and Bagshaw, C. R. (2005) Switch movements and the myosin crossbridge stroke, *J. Muscle Res. Cell Motil. 26*, 31-37.**
76. **Gyimesi, M., Tsaturyan, A. K., Kellermayer, M. S., and Malnasi-Csizmadia, A. (2008) Kinetic characterization of the function of myosin loop 4 in the actin-myosin interaction, *Biochemistry 47*, 283-291.**
77. **Kovacs, M., Toth, J., Hetenyi, C., Malnasi-Csizmadia, A., and Sellers, J. R. (2004) Mechanism of blebbistatin inhibition of myosin II, *J. Biol. Chem. 279*, 35557-35563.**

78. **Kovacs, M., Toth, J., Malnasi-Csizmadia, A., Bagshaw, C. R., and Nyitray, L. (2004) Engineering lysine reactivity as a conformational sensor in the Dictyostelium myosin II motor domain, *J. Muscle Res. Cell Motil. 25*, 95-102.**
79. **Malnasi-Csizmadia, A., Toth, J., Pearson, D. S., Hetenyi, C., Nyitray, L., Geeves, M. A., Bagshaw, C. R., and Kovacs, M. (2007) Selective perturbation of the Myosin recovery stroke by point mutations at the base of the lever arm affects ATP hydrolysis and phosphate release, *J. Biol. Chem. 282*, 17658-17664.**
80. **Malnasi Csizmadia,A., Gyimesi, M., Song, L., Sen, I., Fajer, P G (2007) Myosin cleft closure by double electron-electron resonance and dipolar EPR, *J Phys Condens Matter 19*, 285208.**
81. **Manstein, D. J., Schuster, H. P., Morandini, P., and Hunt, D. M. (1995) Cloning vectors for the production of proteins in Dictyostelium discoideum, *Gene 162*, 129-134.**
82. **Manstein, D. J. and Hunt, D. M. (1995) Overexpression of myosin motor domains in Dictyostelium: screening of transformants and purification of the affinity tagged protein, *J Muscle Res. Cell Motil. 16*, 325-332.**
83. **Allingham, J. S., Smith, R., and Rayment, I. (2005) The structural basis of blebbistatin inhibition and specificity for myosin II, *Nat. Struct. Mol. Biol. 12*, 378-379.**
84. **Kintses, B., Simon, Z., Gyimesi, M., Toth, J., Jelinek, B., Niedetzky, C., Kovacs, M., and Malnasi-Csizmadia, A. (2006) Enzyme kinetics above denaturation temperature: a heat-jump/stopped-flow apparatus, pp in print.**
85. **Frauenfelder, H. and Wolynes, P. G. (1985) Rate theories and puzzles of hemeprotein kinetics, *Science 229*, 337-345.**
86. **Ansari, A., Jones, C. M., Henry, E. R., Hofrichter, J., and Eaton, W. A. (1992) The role of solvent viscosity in the dynamics of protein conformational changes, *Science 256*, 1796-1798.**
87. **Toth, J., Simon, Z., Medveczky, P., Gombos, L., Jelinek, B., Szilagyi, L., Graf, L., and Malnasi-Csizmadia, A. (2006) Site directed mutagenesis at position 193 of human trypsin 4 alters the rate of conformational change during activation: role of local internal friction in protein dynamics, submitted ed..**
88. **Kovacs, M., Toth, J., Pearson, D. S., Hetenyi, C., Nyitray, L., Geeves, M. A., Bagshaw, C. R., and Malnasi-Csizmadia, A. (2006) Demonstration of the effect of intramolecular friction on the rate of an enzymatic process , submitted ed..**
89. **Toth, J., Gombos, L., Simon, Z., Medveczky, P., Szilagyi, L., Graf, L., and Malnasi-Csizmadia, A. (2006) Thermodynamic analysis reveals structural rearrangement during the acylation step in human trypsin**

4 on 4-methylumbelliferyl 4-guanidinobenzoate substrate analogue, *J. Biol. Chem. 281*, 12596-12602.

90. Bodis, E., Strambini, G. B., Gonnelli, M., Malnasi-Csizmadia, A., and Somogyi, B. (2004) Characterization of f-actin tryptophan phosphorescence in the presence and absence of tryptophan-free myosin motor domain, *Biophys. J. 87*, 1146-1154.

91. Nagy, A., Cacciafesta, P., Grama, L., Kengyel, A., Malnasi-Csizmadia, A., and Kellermayer, M. S. (2004) Differential actin binding along the PEVK domain of skeletal muscle titin, *J. Cell Sci. 117*, 5781-5789.

92. Hetényi C, Maran U, Karelson M: A comprehensive docking study on the selectivity of binding of aromatic compounds to proteins. *J Chem Inf Comput Sci. 2003 Sep-Oct;43(5):1576-83*

93. .Chen YZ, Zhi DG: Ligand-protein inverse docking and its potential use in the computer search of protein targets of a small molecule. *Proteins 2001;43:217-226*

94. Fliri AF, Loging WT, Thadeio PF, Volkmann RA: Biological spectra analysis: Linking biological activity profiles to molecular structure. *Proc Natl Acad Sci USA.2005 Jan 11;102(2):261-6*

95. Fliri AF, Loging WT, Thadeio PF, Volkmann RA: Biospectra analysis: modell proteome characterizations for linking molecular structure and biological response. *J Med Chem. 2005 Nov 3;48(22):6918-25*

96. Fliri AF, Loging WT, Thadeio PF, Volkmann RA: Analysis of drug-induced effect patterns to link structure and side effects of medicines. *Nat Chem Biol. 2005 Dec;1(7):389-97*