

DR. MÁLNÁSI-CSIZMADIA ANDRÁS

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar

Biokémiai Tanszék

Utazás a motor domén körül:

Konformációs átalakulások és intramolekuláris kommunikációs

útvonalak a miozinban

Doktori értekezés tézisei

Pályázat a Magyar Tudományos Akadémia Doktora

tudományos címre



2008

Vizsgálataim középpontjában az áll, hogy egyes enzimek funkcionális régiói között hogyan jön létre az intramolekuláris kommunikáció, amely biztosítja az enzim hatékony működését. Kérdésünk, hogy mik a régiókban létrejövő folyamatok egymásutánisága, ok-okozati összefüggései, és milyen fizikai jelenségek állnak a kommunikáció hátterében.

Ennek vizsgálatára a motor enzimek nagyon jó objektumok, mert funkciójukban és szerkezetben jól elkülönülő funkcionális régiók harmonikus 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. 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, ún. haszontalan ciklus („futile cycle”) alakul ki az enzimreakció során. Mint később bemutatom, mi is ki tudtuk mutatni, hogy az egyes funkcionális régiók enzimatis reakciói 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.

I. Kutatásaim legfontosabb kiindulási kérdései

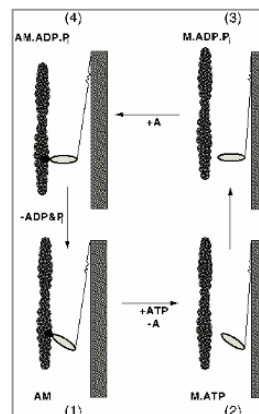
A Lymn-Taylor (1. ábra) és a Bagshaw-Trentham (2. ábra) modellre alapozva konkretizálhatjuk azokat a legfontosabb tudományos kérdéseket, amelyek kutatásaink kiindulási pontjaiként szolgáltak. Első feladatunk az volt, hogy az újonnan felfedezett atomi

1. ábra Az aktomiozin működésének Lymn-Taylor féle kinetikai modellje

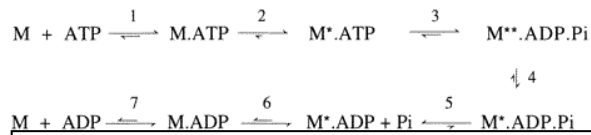
felbontású röntgen-szerkezeti állapotokat a fenti sémák kinetikai állapotaihoz rendeljük.

Azonban önmagukban a

kinetikai sémák is felvetnek kérdéseket, illetve a szerkezetek fényében további megoldandó problémák merülnek fel:



1. Hogyan magyarázható a nukleotid kötés kinetikája szerkezetileg? Milyen szerkezeti változások jönnek létre a nukleotid kötéskor és milyen a változások



2. ábra A miozin működésének Bagshaw-Trentham kinetikai modellje aktin távollétében

időbelisége? Ez a kérdés különösen fontos a Lymn-Taylor modell fényében, mert a nukleotid kötés szorosan kapcsolt az aktin miozinnal 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. A nukleotidkötő és az aktinkötő régió szerkezetiileg elkülönül, ezért adódik a kérdés, hogy az információ hogyan jut el az egyik helyről a másikra, illetve mi a mechanizmusa az információ-áramlásnak. Ebben a folyamatban mi a szerepe az ún. *switch 1* huroknak, amely a nukleotidkötő régió aktinkötő régió felőli részét alkotja. 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. 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 – még ha gyenge kötése révén is – befolyásolja-e az ATP hidrolízist és/vagy a konformáció változást.

5. További kérdés, hogy az aktin kötés befolyásolja-e a nukleotid kötést, a nukleotid régió egyik elemének, a *switch 2* hurok nyitott-zárt átmenetét, amely pedig erőkar mozgását hozhatja létre. Vajon az aktinkötés befolyásolja-e az ATP hidrolízist és a termékek (ADP és foszfát) felszabadulását. 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 felállítását követően

mindeközéig 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 enzimreakció mechanizmus legfontosabb eleme a sebességmeghatározó lépés, hanem mert az aktin ezt a lépést gyorsítja mintegy százszorosára (*aktin aktiváció*), továbbá az erőgenerálás valahol a hidrolízis lépés és a foszfát felszabadulás lépés között, vagyis ezekkel a lépésekkel szorosan kapcsolatosan 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 az:

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 aktin-miozin kötés és az erőkar mozgás szinkronizációjára terelődjön:

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

II. Kísérleti megközelítések, legfontosabb módszerek

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 a vázizom, illetve a simaizom miozinhoz nagyon hasonló tulajdonságokkal rendelkezik. 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 kötődése, a nukleotid kötése stb.) több funkcionális régióban egymástól függetlenül tudunk 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 inzerált fluorofór fluoreszcencia emissziója volt. A fluoreszcencia emisszió számos specifikus paraméterét (spektrális tulajdonságok, fluoreszcencia élettípus, 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, amelyben előzőleg fenilalaninra cseréltük a természetes triptofánokat. 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.

2. Előállítottunk cisztein mentes motor domén mutánsokat is. 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 bevitelére helyspecifikus volt (az egyetlen (vagy a két) ciszteinre). Az így módosított fehérjén – hasonlóan a triptofán mutásokhoz – fluoreszcencia méréseket tudunk végezni.

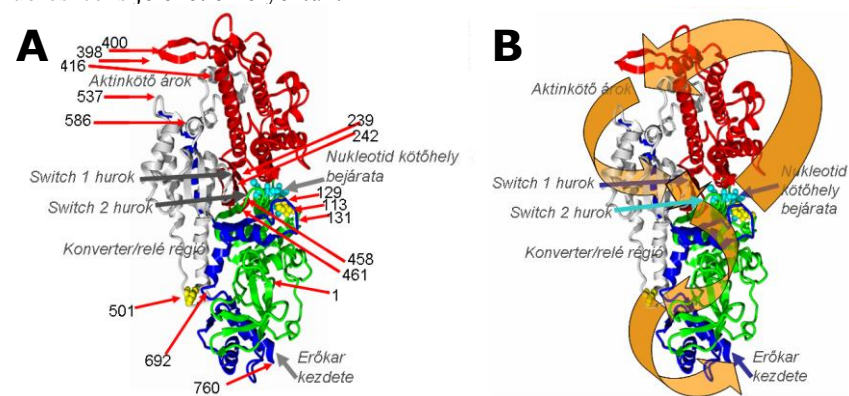
3. A miozin motor domén N-és C-terminálisához két különböző (pl. sárga és zöld (YFP és GFP)) fluoreszcens fehérjét fuzionáltattunk. A két fluoreszcens fehérje között fluoreszcencia energia transzfer alakult ki, ha a donor fluorofórt gerjesztettük. A két fluoreszcens fehérje közötti FRET (Förster Rezonancia Energia Transzfer) változásával követtük az erőkar relatív elmozdulását.

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 módszerek szubmilliszekundumos, illetve mikroszekundumos időfelbontásban tudják követni a változásokat a reakciók igen gyors összekeverése, illetve a fizikai paraméterek ugrásszerű megváltozása után.

A fent leírt kísérleti megközelítésnek az a nagy előnye, hogy eredményeinket szerkezeti és kinetikai szempontból egyidejűleg tudjuk interpretálni. Vagyis a fluorofór beépítését az ismert atomi szerkezet alapján tervezzük, míg az enzimátikus változásokat nagy időfelbontással mérjük, és a megfelelő szerkezeti elemhez rendelhetjük hozzá. Ezt a kísérleti filozófiát a motor

enzimek vizsgálatába mi vezetjük be. A 3.A ábrán a miozin motor domén szerkezetén jelöltem azokat a fontosabb régiókat és aminosav pozíciókat, ahová a fluoreszcens jeleket elhelyeztük.



3. ábra A) A motor domén régiói és azok az aminosav pozíciók, amelyekben fluoreszcens jelet helyeztünk el. **B)** A miozin azon funkcionális régiói tematikus sorrendben, amelyekben a lezajló változásokat vizsgáltuk.

Jól látható, hogy ezek a helyek reprezentálják a motor domén összes funkcionális régióját, így ezekkel a jel-molekulákkal képletesen körbeutazhattuk az enzimet, és megvizsgálhattuk, hogy milyen folyamatok zajlanak le az egyes régiókban az ATPáz ciklus során, és ezek a folyamatok hogyan kapcsolódnak egymáshoz. A tudományos kérdéseket és a kísérleteket a dolgozatomban olyan sorrendben tárgyalom, ahogy a 3.B ábra bemutatja ezt az utazást. A nukleotid kötőhely bejáratától indulunk, majd az aktin kötő régió változásait vizsgáljuk, innen tovább lépve a nukleotid kötőhely mélyén lévő két funkcionális régiót, a *switch 1* és a *switch 2* hurkot tanulmányozzuk. Valószínűleg a két hurokban történő változások iniciálják az enzim további régiójára kiterjedő konformációváltozásokat. Végül az erőkart közvetlenül mozgó relé és konverter régiókat tanulmányoztuk.

Az egyes reakciólépéseket nemcsak a régióspecifikus jelek időbeli követésével vizsgáltuk. Olyan mutáns motor doméneket terveztünk, amelyekben a mutációk lehetőleg nagy specificitással csak egyetlen reakciólépést, konformáció átalakulást vagy funkcionális régiók közötti kommunikációt perturbálnak. 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 mutációkra koncentráltunk, amelyekben a mutáció egy-egy folyamatot nagyon specifikusan befolyásolt. A mutációkat olyan motor doménekből fejeztük ki, amelyek régió

specifikus szignálokat tartalmaztak. Ezeknek a konstrukcióknak a segítségével a mutációk hatását több funkcionális régióban és többféle reakciólépésre vonatkozólag közvetlenül is tanulmányozni tudtuk.

III/a. A legfontosabb eredmények tételes felsorolása a fenti kérdések sorrendjében

a) A miozin és az aktomiozin hatásmechanismusának vizsgálatára új, helyspecifikus fluoreszcens szignálokon alapuló gyorskinetikai módszereket dolgoztunk ki.

b) A nukleotidkötés hatásmechanismusa

i. Olyan egyedi triptofánt tartalmazó *Dictyostelium* motordomén mutánsokat állítottunk elő, amelyekben a triptofán (a fluoreszcens jel) a nukleotidkötő zseb bemeneténél található (a 113., 129. illetve 131. pozíciókban)

ii. Kimutattuk, hogy az ATP- és ADP-kötés egy többlépéses folyamat, amelyben a kötésekor történő szubsztrát reorientációnak jelentős szerepe van a kötés erősségében és kinetikájában

iii. Az ún. irreverzibilis ATP-kötés nem egy lépésben alakul ki, hanem reverzibilis lépések sorozata.

c) Az aktinkötő régió konformációs állapotai

i. Előállítottunk egy olyan rekombináns miozin motordomén konstrukciót, amely két ciszteint tartalmaz az aktinkötő árok két oldalán. A két ciszteint pirén-jódacetammiddal jelöltük. A két piréngyűrű dimerizálódott, és erős *excimer* fluoreszcenciát mutatott (a teljes fluoreszcencia 96%-át). Az *excimer* fluoreszcencia változása reflektált az aktinkötő árok mozgására.

ii. Elsők között mutattuk ki, hogy a miozin aktinkötő árka bezáródik az aktinkötés hatására.

iii. Az aktin ATP-indukált disszociációjakor az aktinárók nyitódása két lépésben történik. Első lépésben az aktin disszociációja iniciálódik, míg az aktin leválásával az árok tovább nyílik.

iv. Ebből következik, hogy az aktindisszociáció és a nukleotidkötés nem egyidőben történő események, hanem kinetikailag kapcsolt reakciók.

d) A nukleotidkötés és az aktinkötés kapcsolata

i. A nukleotidkötés és az aktinkötés kapcsolatának vizsgálatára egyetlen triptofánt tartalmazó miozin motordomén mutánsokat állítottunk elő. A triptofánokat a *switch 1* régióban lévő 239-es illetve 242-es pozíciókba helyeztük. A triptofánok fluoreszcencia változása a *switch 1*-ben bekövetkező változásokra reflektál.

ii. Elsőként mutattuk ki, hogy aktinkötésre a nukleotidkötő régióban (a *switch 1*-ben) szerkezeti átalakulás történik.

iii. Aktinmentes közegben ATP jelenlétében, illetve ha a γ -foszfát kötőhely telített, a *switch 1* zárt állapotban van, míg ADP-komplex esetében a nyitott és a zárt állapot egyensúlya jön létre.

iv. Aktin hozzáadására az ATP-komplex esetében nyitott-zárt egyensúly alakul ki, míg ADP-komplexben a rendszer teljes mértékben a nyitott *switch 1* állapot felé tolódik el.

v. Ezekre az eredményekre alapozva olyan kinetikai és termodinamikai modellt állítottunk fel, amely kimondja, hogy az aktinkötés erősségét a *switch 1* régió nyitott-zárt állapotának egyensúlyi állandója determinálja. Ebből a modelltől implicit módon levezethető, hogy az aktin is befolyásolja a nukleotidkötés erősségét.

vi. Továbbá megállapítottuk, hogy a *switch 1* régió mozgása nem szerkezeti kapcsolt az aktinkötő árok mozgásával, hanem közöttük kinetikai, illetve termodinamikai kapcsoltság áll fenn.

vii. Modellünk a G-fehérjéken történt vizsgálatokkal összevetve nagy valószínűséggel a P-hurok NTPáz enzimes család tagjaira általánosítható és alkalmazható.

e) A switch 2 hurok mozgásai

i. A 458 és a 461 pozícióba helyezett triptofánok fluoreszcencia változásával követtük a *switch 2* régió mozgásait.

ii. Az ATP kötődése után a *switch 2* régió konformációs mozgásai szorosan kapcsoltak mind a relé régió átalakulásaival mind a *switch 1* régió konformációváltozásaival.

f) Az ATP hidrolízise és az erőkar mozgása

i. Előállítottunk olyan egy triptofánt tartalmazó miozin motordomén mutánst, amelyben a triptofán a relé régióban, az 501-es pozícióban található.

ii. Az 501-es triptofán fluoreszcenciája a Bagshaw-Trentham-sémában az ATP-hidrolízis lépésnek jelzett folyamat közben változik. Ezen eredmények tükrében a széleskörben alkalmazott, a miozin ATPáz kinetikáját leíró Bagshaw – Trentham modellt szerkezeti aspektusba lehetett helyezni.

iii. Kimutattuk, hogy a Bagshaw-Trentham modellben hidrolízislépésnek jelzett lépés két független reakciólépésből áll, amelyek kinetikailag kapcsoltak. Az ATP kémiai hidrolízisét megelőzi egy nagy, viszonylag gyors konformációs átalakulás. Ez a konformációváltozás a miozin erőkarjának „felhúzása”.

iv. Mind a gyors konformációs átalakulás, mind a kémiai hidrolízis egyensúlyi reakciók, kis szabadenergia változással járó lépések.

v. Kimutattuk, hogy az aktin viszonylag kis mértékben lassítja az ATP-kötést.

vi. Az aktin mindössze 2-3-szoros mértékben változtatja meg az ATP-hidrolízis lépés és az azt megelőző konformációs átalakulás sebességi állandóit.

g) Az ATPáz ciklus sebsségmeghatározó lépése és az aktin aktiváció

i. Elsőként sikerült tanulmányoznunk közvetlen módszerekkel az ATPáz ciklus sebesség-meghatározó lépéseinek mechanizmusát azáltal, hogy a ciklust fordított irányban játsztuk le.

ii. Kimutattuk, hogy nem a termékfelszabadulás a sebességmeghatározó lépés, hanem az azt megelőző nagy konformációs átalakulás (*fordított felhúzási lépés*).

iii. Ez azért fontos megállapítás, mert ebből következik, hogy az aktin aktiváció ezen lépés sebességének gyorsításával történik, míg a foszfát felszabadulás sebessége nem változik jelentősen aktin hatására.

iv. Felállítottunk egy modellt, amely magyarázza, miért szükséges az aktin aktiváció. Ez a modell arra is választ ad, hogy az aktinkötődés hogyan növeli a rendszer szabadenergiáját, ami azonnal fel is használandó a rákövetkező munkakütemben.

h) Az aktinkötőhely, a nukleotid kötőhely és a relé/konverter régió közötti kommunikációs útvonal

i. Legújabbban sikerült olyan mutációkat létrehozunk, amelyek specifikusan szétkapcsolják a fenti három régió közötti kommunikációs útvonalat.

ii. Megtalltuk azt a régiót (*prolin-gazdag hurok*), amely valószínűleg a legfontosabb abból a szempontból, hogy érzékeli az aktinkötést, és a kötődés információját közvetíti a relé/konverter régió felé.

iii. Kimutattuk, hogy a régiók közötti kommunikációban nem elsősorban a konformációs átmenetek játszanak szerepet, hanem specifikus aminosavak mobilitás változásai. Azt valószínűsítjük, hogy a kommunikáció egyik alapja a régiókat átívelő mechanikai feszültségek átrendeződése.

III/b. A kutatási eredmények jelentősége, hasznosítása

A motor enzimek hatásmechanizmusának tematikus és részletes feltárását végeztük az utóbbi nyolc évben. Új kísérleti megközelítésekkel, a kinetikai és a szerkezeti módszerek egyesítésével az eddigi ismereteket néhány alapvető ponton sikerült gazdagítanunk. Ezek közül kiemelem azt, hogy elsőként mutattuk ki, hogy az aktin milyen konformációs átalakulást hoz létre a miozinban, milyen mechanizmus révén kapcsolt a nukleotid-és az aktinkötés. Meghatároztuk, hogy valójában nem a foszfát felszabadulás, hanem az azt megelőző konformációátalakulás (*fordított felhúzási lépés*) a sebességmeghatározó lépés, és az aktin közvetlenül ezt a lépést gyorsítja, valamint felállítottunk egy modellt, amely pontosan leírja az aktin aktivációt, és megmagyarázza, miért szükséges az aktin aktiváció a hatékony energiaterjesztéshez (a kémiai energia munkává alakítása). Mivel a fenti modellek alapvető jelenségeket írnak le, ezért jelentőségüket növeli, hogy nemcsak a miozin és a motor enzimek

hatásmechanizmusának megértéséhez járulnak hozzá, hanem általánosíthatók a P-loop NTPáz család többi enzimének (pl. G-fehérjék, egyes kinázok stb.) működésére is, ezáltal ezeken a területeken újabb kérdéseket és kísérleteket iniciálnak.

III/c. A jelen a múlt és a jövő része. Terveink

A legfontosabb tudományos kérdés, amit körül akarunk járni az, hogy az enzimek fellépő és a működés során átrendeződő mechanikai feszültségek hogyan befolyásolják, illetve határozzák meg az enzimműködést. Ennek vizsgálatára olyan kísérleti elrendezéseket tervezünk, amelyekben az enzimek 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 „rugóállandó” 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 enzimegységek közé. A rugók fényaktiválásával a két régió között erőperturbációt hozunk létre, és vizsgáljuk ennek hatását az enzimek működésére. A rugók beépítését a dolgozatban tárgyalt régióspecifikus konformációs szenzorokat tartalmazó motor doménekbe (pl. W501+) építjük, így az egyes enzimikus 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 sikerül választ kapnunk egy-egy kérdésünkre, amely újabb kérdéseket ébreszt.

IV. Az ismertett kutatások témakörében megjelent publikációk

1. Gyimesi M, Kintsés B, Bodor A, Perczel A, Fischer S, Bagshaw CR, Málnási-Csizmadia A The mechanism of the reserve recovery-step, phosphate release and actin activation of Dictyostelium myosin II *J BIOL CHEM* Epub ahead in press 2008 Jan 21
2. Gyimesi M, Tsaturyan A, Kellermayer M, Málnási-Csizmadia A Kinetic characterization of the function of myosin loop 4 in the actin-myosin interaction. *BIOCHEMISTRY-US* 47(1):283-291 (2008)

3. Malnasi-Csizmadia A, Toth J, Pearson DS, Hetenyi C, Nyitray L, Geeves MA, Bagshaw CR, Kovacs M 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(24): 17658-17664 (2007)

4. Song L, Sen I, Gyimesi M, Malnasi Csizmadia A, Fajer P G Myosin cleft closure by double electron–electron resonance and dipolar EPR **J PHYS CONDENS MATTER** 19: 285208 (10pp) (2007)

5. Kintses B, Gyimesi M, Pearson DS, Geeves MA, Zeng W, Bagshaw CR, Malnasi Csizmadia A Reversible movement of switch 1 loop of myosin determines actin interaction. **EMBO J** 26: (1) 265-274 (2007)

6. Zeng W, Seward HE, Malnasi Csizmadia A, Wakelin S, Woolley RJ, Cheema GS, Basran J, Patel TR, Rowe AJ, Bagshaw CR Resonance energy transfer between green fluorescent protein variants: complexities revealed with myosin fusion proteins. **BIOCHEMISTRY-US** 45: (35) 10482-10491 (2006)

7. Kintses B, Simon Z, Gyimesi M, Toth J, Jelinek B, Niedetzky C, Kovacs M, Malnasi Csizmadia A Enzyme kinetics above denaturation temperature: a temperature-jump/stopped-flow apparatus. **BIOPHYS J** 91: (12) 4605-4610 (2006)

8. Malnasi Csizmadia A, Dickens JL, Zeng W, Bagshaw CR Switch movements and the myosin crossbridge stroke. **J MUSCLE RES CELL M** 26: (1) 31-37 (2005)

9. Zeng W, Conibear PB, Dickens JL, Cowie RA, Wakelin S, Malnasi Csizmadia A, Bagshaw CR Dynamics of actomyosin interactions in relation to the cross-bridge cycle. **PHILOS T ROY SOC B** 359: (1452) 1843-1855 (2004)

10. Kovacs M, Toth J, Hetenyi C, Malnasi Csizmadia A, Sellers Jr Mechanism of blebbistatin inhibition of myosin II. **J BIOL CHEM** 279: (34) 35557-35563 (2004)

11. Kovacs M, Toth J, Malnasi Csizmadia A, Bagshaw CR, Nyitray L Engineering lysine reactivity as a conformational sensor in the Dictyostelium myosin II motor domain. **J MUSCLE RES CELL M** 25: (1) 95-102 (2004)

12. Conibear PB, Malnasi Csizmadia A, Bagshaw CR 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-US** 43: (49) 15404-15417 (2004)

13. Bodis E, Strambini GB, Gonnelli M, Malnasi Csizmadia A, Somogyi B Characterization of f-actin tryptophan phosphorescence in the presence and absence of tryptophan-free myosin motor domain. **BIOPHYS J** 87: (2) 1146-1154 (2004)

14. Conibear PB, Bagshaw CR, Fajer PG, Kovacs M, Malnasi Csizmadia A Myosin cleft movement and its coupling to actomyosin dissociation. **NAT STRUCT BIOL** 10: (10) 831-835 (2003)

15. Wakelin S, Conibear PB, Woolley RJ, Floyd DN, Bagshaw CR, Kovacs M, Malnasi Csizmadia A Engineering Dictyostelium discoideum myosin II for the introduction of site-specific fluorescence probes. **J MUSCLE RES CELL M** 23: (7-8) 673-683 (2002)

16. Kovacs M, Malnasi Csizmadia A, Woolley RJ, Bagshaw CR Analysis of nucleotide binding to Dictyostelium myosin II motor domains containing a single tryptophan near the active site. **J BIOL CHEM** 277: (32) 28459-28467 (2002)

17. Malnasi Csizmadia A, Kovacs M, Woolley RJ, Botchway SW, Bagshaw CR The dynamics of the relay loop tryptophan residue in the Dictyostelium myosin motor domain and the origin of spectroscopic signals. **J BIOL CHEM** 276: (22) 19483-19490 (2001)

18. Malnasi Csizmadia A, Pearson DS, Kovacs M, Woolley RJ, Geeves MA, Bagshaw CR 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-US** 40: (42) 12727-12737 (2001)

19. Malnasi Csizmadia A, Woolley RJ, Bagshaw CR Resolution of conformational states of Dictyostelium myosin II motor domain using tryptophan (W501) mutants: implications for the open-closed transition identified by crystallography. **BIOCHEMISTRY-US** 39: (51) 16135-16146 (2000)

Az értekezés témakörében megjelent PhD dolgozatok:

1. Gyimesi Máté: A novel mechanism of actin activation: actin directly accelerates the power-stroke of myosin II. Doktori értekezés, ELTE TTK Biokémiai Tanszék, témavezető. Malnasi-Csizmadia András (2008).

2. Tóth Júlia: Egy agyi szerin proteáz, a humán tripszin 4 funkcionális vizsgálata Doktori értekezés, ELTE TTK Biokémiai Tanszék, témavezető. Malnasi-Csizmadia András (2006).

3. Kovács Mihály: Lépésről lépésre – egy molekuláris motor működésének kinetikai megközelítése. Doktori értekezés, ELTE TTK Biokémiai Tanszék, témavezető. Malnasi-Csizmadia András (2002).