A motorfehérjék hatékonyságának molekuláris háttere

Szakdolgozat

Biológia alapszak, biológus szakirány

Készítette:

IMRICH VANDA

Témavezető:

MÁLNÁSI-CSIZMADIA ANDRÁS

Egyetemi docens

Biokémia Tanszék

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR
BIOLÓGIAI INTÉZET

Budapest, 2013

Tartalomjegyzék

Rövidítésjegyzék **4**

A miozin molekula szerkezeti elemeinek reprezentatív ábrája **5**

Bevezetés 6

1. **Az izom kontrakció biokémiájának korai történelme** 7

1.1 A miozin és az aktin felfedezése 7

1.2 A miozin szerkezetének felderítése 9

1.3 Tropomiozin-troponin komplex 11

A miozin motorfehérje **13**

2. **A miozin fej negyedleges szerkezete** 13

2.1 A könnyűláncok 14

2.2 A miozin nehézláncai 15

2.2.1 A 25 kDa-os amino- terminális 15

2.2.2 A 50 kDa-os centrális fragmentum 15

2.2.3 A 20 kDa-os karboxil-terminális 16

2.3 Az atinkötő hely 17

2.4 Az aktívhely 17

2.5 A foszfát felszabadulás lehetséges útvonalai 18

2.5.1 A miozin „hátsó ajtajának” szerepe az ADP kioldás során 18

3. **Miozin izoformák** 20

3.1 Miozin-I 21

3.2 Miozin-II 22

3.3 Miozin-V 22

3.4 Miozin-VI 23

3.5Processzivitás 23

Az aktin architektúrájának áttekintése **25**

4. **A aktin szubdomének** 25

5. **A nukleotid-kötőhely** 26

6. **Kalcium-kötőhely** 26

7. **Miozin-kötőhely** 27

8. **A szubdomének konformációi és összeköttetésük** 27

A kontrakció mechanizmusa **29**

9. **Bagshaw és Trentham modell** 29

10. **Lymn-Taylor modell** 29

10.1 Lymn-Taylor modell és a miozin régiók 31

11. **Az erőkifejtés kulcsa: aktivációs hurok** 32

11.1 Egy új aktomiozin interakciós hely felfedezése 32

11.2 *In vivo* szerepe az aktivációs huroknak 33

11.3 Egy kis kitekintés további *in vivo* kísérletek felé 34

12. **A *powerstroke* és a „*return stroke*"** 35

13. **Az aktomiozin határfelület** 36

13.1 Az S1 és AC3 közötti kölcsönhatás 37

13.2 Az S1 és AC1 közötti kapcsolat 38

14. **A kontrakció kinetikájának vázlata** 39

14.1 A haszontalan erőkarcsapás kinetikai gátlása 39

14.2 Az akitn és a *powerstroke* 40

14.3 A három effektív útvonal 41

Hipertrófiás kardiomiopátia és a motorfehérjék mutációja **43**

15. **A motorfehérjék hatékonysága** 43

16. **Hipertrófiás kardiomiopátia kezelésének nehézségei** 43

Összefoglalás 47

Summary 48

Irodalomjegyzék 49

Köszönetnyilvánítás 51

Rövidítésjegyzék

AC3: A lánc harmadik aktin monomere.

AC1: Az első aktin monomer a láncban.

Dd: *Dictyostelium discoideum*

ELC: Esszenciális könnyűlánc (*essential light chain*)

GFP: Zölden fluoreszkáló fehérje (*Green Fluorescent Protein*)

HCM: Hipertrófiás kardiomiopátia

HMM: Nehéz meromiozin (*heavy meromyosin*)

LC: Könnyű lánc (*light chain*)

LMM: Könnyű meromiozin (*light meromyosin*)

L50: Alsó 50 kDa miozin alegység (*lower 50 kDa subunit*)

MDFF: *Molecular Dynamics Flexible Fitting*

Myo-3: Testfalban kifejeződő, miozin-2 minor izoformát kódoló gén.

Myo-4: A fő testfal izmot alkotó miozin-2 gén (más néven: *unc-54*).

RLC: Regulátor könnyűlánc (*regulatory light chain*)

S1: Szubfragmentum-1

S2: Szubfragmentum-2

SZBK: Szegedi Biológia Kutatóközpont

TA: Terhelési arány (*duty ratio*)

TnC: Troponin-C

TnI: Troponin-I

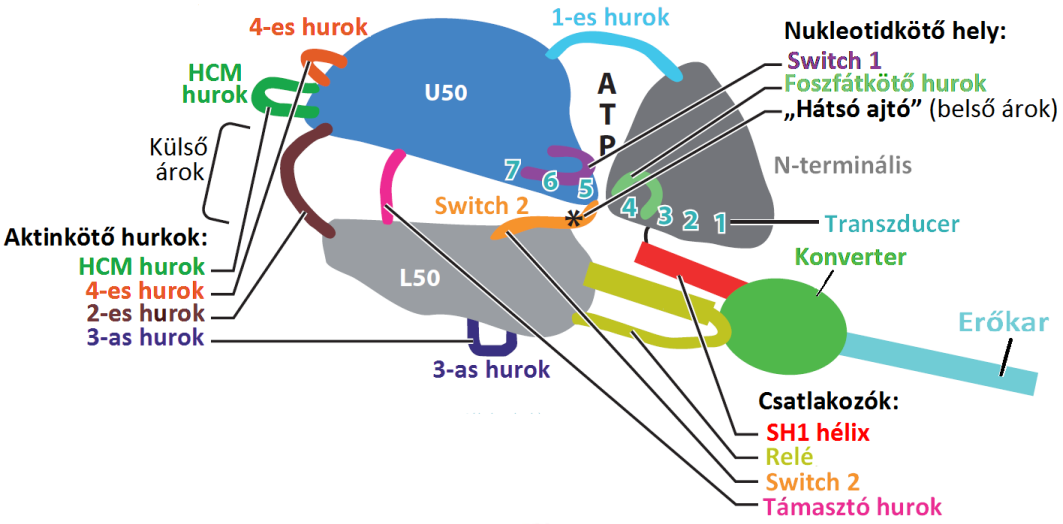
TnT: Troponin-T

unc-54: Más néven myo-4 gén, mely a testfal izmot alkotó fő miozin-2-t kódolja.

UNC-54: A *myo-4* gén által kódolt fehérje

U50: Felső 50 kDa miozin alegység (*upper 50 kDa subunit*)

Miozin V: poszt-rigor (MgATP)



A miozin molekula szerkezeti elemeinek reprezentatív ábrája. Az illusztráció H.L. Sweeney és A. Houdusse: *Structural and Functional Insights into the Myosin Motor Mechanism* (2010) cikkből származik.

Bevezetés

A mozgásnak, mint nélkülözhetetlen és alapvető életjelenségnek számos formája ismert, mint például az izom összehúzódás, valamint a sejt motilitás. Ez utóbbi talán kevésbé szembetűnő, de ugyanolyan esszenciális. A mozgásjelenség, továbbá a motorfehérjék hatékonyságának interpretálását érdemes a sejtváz két komponensével kezdeni, vagyis az aktinvázzal és a mikrotubulus hálózattal, illetve a hozzájuk kapcsolódó motor-és szabályzó molekulákkal. A vázelemeknek két szerepük lehet; egyrészt funkcionálhatnak sínként, melyeken a speciális, mozgást gerjesztő motorfehérjék gurulnak végig. Mivel a váz polimereknek plusz-mínusz végeik vannak, ezek egyúttal meg is határozzák a mozgás irányát, ugyanis ezeket felismerve, a motorproteinek ennek megfelelően fognak haladni. Ezenfelül a vázelemek maguk is létrehozhatnak mozgást a polimerizációjukkal, de a továbbiakban csak az előbbi szerepükről lesz szó (Kovács és mtsai, 2009).

Három fő motorfehérje van: a kinezin ill. a dinein a mikrotubuláris vázzal, míg a miozin az aktin hálózattal együtt található meg. Ezek számtalan attribútumban különböznek, de van néhány közös jellegzetességük. Többek között, hogy az ATPáz aktivitásuk azáltal indukálható, hogy reverzibilisen kötődnek a váz polimerekhez, és az ezekhez való affinitásuk ciklikusan változik az ATP lebontás közben. Emellett a motorfehérjék többnyire rendelkeznek globuláris motor doménnel. Ennek a konformációja, illetve a molekula többi részéhez viszonyított helyzete ismétlődően változik a hidrolitikus körfolyamatban. Magát a mozgást is ennek az elhajlása, majd visszalendülése idézi elő minden ciklusban, melyet később részletesen kifejtek (Kovács és mtsai, 2009).

A legfontosabb szerepüktől eltekintve, az erő generálásának kulcs elemei még mindig nehezen megfoghatók. A hatásos erőkifejtésnek, angolul *powerstroke*[1]-nak akkor kell történnie, amikor a miozin aktinhoz kötött, viszont paradox módon a folyamat akkor tud csak elkezdődni, ha miozin nagyon alacsony aktin affinitású állapotban van (Málnási-Csizmadia és Kovács, 2010). Tehát ATP hiányában a miozin erősen kötődik az aktinhoz, és egy úgynevezett *rigor állapot*[2] jön létre. Azonban, ha ATP-t adunk a

[1] A kontrakció erőgenerálás lépése. Ekkor a miozin visszaköt az aktinhoz, és a felhúzással (angolul *recovery step*) ellentétes irányú erőkar lengést végez. Az átrendeződés során a hidrolitikus termékek felszabadulnak, miközben az aktin egyre szorosabban köt a miozinhoz.

[2] A kontrakciót generáló kereszthíd-ciklus azon állapota, mely során nincs jelen nukleotid a komplexben, és az aktin erősen kötődik a miozinhoz. A komplexben a miozin *switch1* ill. *2* eleme nyitott állapotban, míg az aktinkötő árok zárt állapotban található, és a relé hélixben törés figyelhető meg.

rendszerhez, az leszorítja az aktint a miozinról. Az aktin az ATP hidrolízis után fog visszakötni a miozin-ADP-P_i komplexhez, mely következtében a nukleotid-foszfát leválik, és így szabad lesz az ATP-kötőhely, ahova az új ATP bekapcsolódhat. A ciklus addig ismétlődik, amíg a citoplazmatikus Ca^{2+} koncentráció le nem csökken a megfelelő szintre. Ekkor megkezdődik a relaxáció. A vékony filamentum struktúrája átrendeződik, és ezzel a minimálisra csökkenti annak az esélyét, hogy kontrakciót generáló kapcsolat alakuljon ki a vastag filamentummal (Kovács és mtsai, 2009).

1. Az izom kontrakció biokémiájának korai történelme

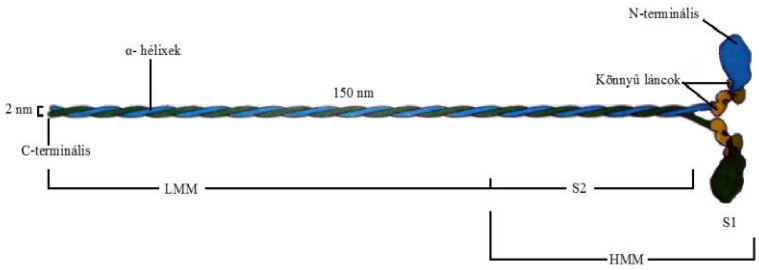
A tudósok már nagyon régóta tanulmányozzák a harántcsíkolt izomzatot. Az izom kontrakció mechanizmusának megértésében, talán három elengedhetetlen felfedezést emelhetünk ki, amelyek kulcsfontosságúnak bizonyultak. Egyrészt, hamar felismerték, hogy a kontrakcióban több fehérje, nevezetesen az aktin és a miozin játszik főszerepet, valamint, hogy az ATP molekulának is kulcs szerepe van ebben a folyamatban. A másik nagyszerű meglátás a *csúszó filamentum modell*[3] volt, mely rávilágított arra, hogy maguknak, a több száz molekulából álló aktin és miozin szálaknak a hossza nem változik; a rövidülés és az erő generálás ezeknek a filamentumoknak az interakciójából származik. Végül a fehérjék kristályosítása lehetővé tette a szerkezetek atomi szintű leírását, amely segítette az összehúzódás hatékonyságát befolyásoló, molekuláris struktúraváltozások keresését (Szent-Györgyi, 2004).

1.1 A miozin és az aktin felfedezése

A motorfehérjék kutatásának kezdetét talán 1864-re tehetjük, amikor W. Kühne tömény sóoldat segítségével egy nyúlós fehérjét izolált, és arra a következtetésre jutott, hogy ez a protein felelős az izom rigor állapotáért. Ezt a fehérjét miozinnak nevezte el. Ezt követően 1939-ben, alapos tanulmányozás után, V. A. Engelhardt és M. N. Lyubimova beszámolt arról, hogy a miozin ATPáz aktivitással rendelkezik, melynek fontossága abban rejlett, hogy előzetes következtetések azt mutatták, hogy az ATP lehet az energiaforrása a kontrakciónak. Azt az elméletet, miszerint a miozin egy ATPáz aktivitással rendelkező protein, nem fogadta szívesen a közönség, de az ezt cáfoló kísérlettek sorra elbuktak.

[3] Ez a modell leírja, hogy a vékony aktin filamentumok elcsúsznak a vastag miozin filamentumokhoz képest, és ez az az esemény, amely a kontrakció alatt megfigyelhető.

Szent-Györgyi Albert és kollégái belevetették magukat a miozin kutatásokba és hamarosan jelentős eredményeket értek el, annak ellenére, hogy a háború miatt a tudományos kommunikáció szinte teljesen megakadt, és az elérhető tudományos műszerek is elég kezdetlegesek voltak. I. Banga és A. Szent-Györgyi 1942-ben végezte el azt a kísérletet, mely rámutatott arra, hogy nem egy fehérje felelős a kontrakcióért. Darált izmot magas só koncentrációnak tettek ki 20 percig, illetve egy egész éjszakán át. A következőt figyelték meg; a rövidebb ideig inkubált protein alacsony viszkozitású volt, míg hosszabb inkubáció után magas viszkozitású fehérjét kaptak (az előbbit miozin A-nak, az utóbbit miozin B-nek nevezték el). A miozin B viszkozitását ATP hozzáadásával tudták csökkenteni, de a miozin A-ra hatástalan volt. Már ekkor megfogalmazódott bennük az az alternatíva, hogy a miozin molekulának az aszimmetriájában bekövetkezett reverzibilis változás, melyért az ATP felelős, valószínűleg a molekula rövidüléséhez, vagy a miozin molekulák által formált micellák közötti interakció megváltozásához vezet. Szent-Györgyi és Straub később tisztázták a különbséget a kétféle miozin között, miszerint az egyikben jelen volt egy „aktin" nevű molekula is, és ez volt a felelős a magas viszkozitásért, illetve a kontrakcióért. Ezt a B miozint így elnevezték *aktomiozin komplexnek*[4]. Straub már 1943-ban bejelentette a frissen felfedezett aktinról, hogy kétféle formában létezik. Fellelhető egy globuláris, G-aktin alakban, mely só hiányában fordul elő, illetve megjelenik fibrilláris, F-aktin formában, mely a megfelelő két vegyértékű kationok jelenlétében polimerizálódik az előbbiből. Az aktomiozin ATPáz aktivitású, melyet magnézium hoz működésbe. Szent-Györgyi azt is demonstrálta, hogy az ATP-nek kettős funkciója van, mely függ az ionerőtől. Alacsony ionerőnél a kontrakciót, míg magasnál az aktin miozintól való disszociációját indukálja (Szent-Györgyi, 2004).



1.Ábra

A miozin molekula vázlatos szerkezete (Szent-Györgyi, 2004).

[4] Nukleotidmentes rigor-szerű állapota a fehérje komplexnek.

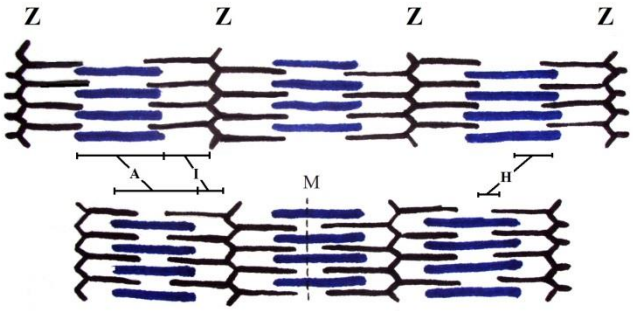
1.2 A miozin szerkezetének felderítése

Ma már tudjuk, hogy a miozin több adottsággal is rendelkezik, mint például filamentum kialakítás, ATPáz aktivitás, továbbá az aktinnal való reverzibilis egyesülés. Proteolitikus enzimek segítségével fényt derítettek arra, hogy a miozin molekula egyes régiói, mely funkciókért felelősek. Különböző kísérleteket folytattak 1953-ban, hogy rájöjjenek vajon az ATPáz aktivitás szétválasztható-e a miozintól. Ezek eredményeként, két fő alkotóelemet találtak a proteinben, melyek ülepedése eltérő volt. A gyorsan ülepedő alkotórész megtartotta mind az ATPáz aktivitását, mind az aktinnal való egyesülés képességét. Ez a komponens a nehéz meromiozin, angolul *heavy meromyosin* (HMM), míg a lassabban ülepedő alkotóelemet könnyű meromiozinnak, azaz *light meromyosin* (LMM) hívják (**1. ábra**). Az LMM és HMM közötti összekötő régió néhány proteolitikus enzimnek elérhető, így például a tripszinnek és a kimotripszinnek. Ezek emésztés után hasonló fragmentumokat eredményeznek, mint a meromiozinok. Mivel az egyes darabok funkciója így külön-külön is tanulmányozhatóvá vált, néhány évvel később a szerepek megosztása az LMM és HMM között tisztázódott. Az LMM az oligomerizálódásért, filementummá való összeszerelődésért felel, míg a HMM tartalmazza a fej- ill. a nyak domént, ami az ATPáz aktivitásért, továbbá az aktinhoz való kötődésért felelős.

A ’60-as években már egyre pontosabb képet kaptak a miozin molekuláról. A nehéz meromiozint tovább hasították papainnal, majd megfigyelték, hogy itt is meg lehet különböztetni egy lassabban ülepedő, homogénebb részt, ez a szubfragmens-1 (S1), valamint egy a sokkal heterogénebb komponenst, mely a szubfragmens-2 (S2). Később, 1967-ben egy elektron mikroszkópos kép rávilágított arra, hogy a miozin két, gömbszerű fejben végződik. Ezzel végérvényesen bebizonyították azt is, hogy két parallel peptidláncból áll a miozin és nem háromból, ahogy ezt néhány korábbi tanulmány írta. Így már tudtak a miozin molekuláról egy vázlatot készíteni, amely alapján a HMM egy két fejű molekula, mely az LMM-hez az S2-n keresztül kapcsolódik, az LMM és S2 együtt pedig a molekula kar része, mely α-hélix spirálként tekeredik. A további kutatások kimutatták, hogy a LMM adja a filamentum centrumát, és a hajlékony S2 szakasz engedi a miozin fejnek az elmozdulást, hogy ez által elérje az aktin filamentumokat. Tehát a nehéz meromiozin két, rövid karral kapcsolódó kereszthidat tartalmaz, amelyeknek ATPáz aktivitásuk, illetve aktin kötő régiójuk is van.

További kutatások folytak annak érdekében, hogy kiderüljön, még milyen fragmentumok különíthetők el a miozinon belül, melyek eredményeképpen kétféle könnyű láncról számoltak be. Az egyik, lítium-kloriddal eltávolítható az ATPáz aktivitással együtt. Ezt nevezik esszenciális könnyű láncnak. A másik könnyűlánc csoportot a megfelelő kezeléssel reverzibilisen le tudták választani szignifikáns ATPáz aktivitás csökkenés nélkül. Ezek, mivel közvetlenül részt vesznek az ATPáz aktivitás szabályozásában a regulátor könnyű láncok nevet kapták. Egy mól miozinban két mól regulátor és két mól esszenciális könnyű láncot találtak. Ezeknek a láncoknak elengedhetetlen szerepük van a miozin működésének szabályozásában.

Elektron mikroszkóp segítségével láthatóvá vált, hogy a harántcsíkolt izomzat szarkomerekbe rendeződve, 2-3 µm hosszú ismétlődő egységekből áll (**2. ábra**). Már 1953-ban H. E. Huxley leírta, hogy ezek a struktúrák kétfélé filamentumból állnak; egy 1,6 µm hosszú, vastag filamentumból, mely az A-sávban található, illetve egy 1 µm hosszú, vékony filamentumból ami a Z-sávtól a H-zónáig nyúlik. Huxley és J. Hanson magas só koncentráció és ATP jelenléte mellett azonosították a miozint a szarkomeren belül, azáltal, hogy sikeresen eltávolították ezt a motorfehérjét, és nem meglepő módon az, az A-sávnak felelt meg. Ezután, 'csupán' magát a mechanizmust kellett megérteni.



2.Ábra

A szarkomer szerkezetének vázlata. Az I-szakasz közepén található a Z-vonal (Zwieschenscheibe), ahol az aktin szálak összeérnek. Az A-tag közepén a világos H-zóna (Hensen-féle zóna) van, melynek közepén pedig a sötét M-vonal (Mittelscheibe) található. Az A-sáv maga a vastag filamentum, és a H-zóna az aktin mentes része. Két Z-vonal közé eső rész a szarkomer. (Saját ábra)

A csúszó filamentum teóriája azon a megfigyelésen alapult, hogy az A-sáv hossza konstans, míg az I-sáv rövidül a kontrakció alatt. Rendkívül fontos volt ennek a felismerése, hiszen addig az volt az elfogadott nézett, hogy az izom összehúzódást, a molekulák rövidülése okozza. A két Z-sáv között a párhuzamos aktin szálak úgy helyezkednek el, hogy a negatív végük a szarkomer belseje felé néz, és a kontrakció alatt a szarkomer középpontja felé mozdul el. Ez teszi szükségessé, hogy a szarkomer két felén, különböző legyen az irányultsága ezeknek a filamentumoknak. A vastag filamentumok bipolárisak és antiparallel elrendezésben, a farkuknál fogva vannak összekapcsolva az

LMM frakciók, éppen ezért a fejek az ellenkező irányba, a Z-sáv felé mutatatnak. Huxley eredményei szerint a vastagszál a miozin fejektől mentes, központi régiója mindössze 0.2 µm hosszú, mivel a többi részen az ellenkező irányba néző globuláris motor domének találhatóak.

A kontrakciót, a kereszthíd aktinnal való interakciója hajtja. Huxley volt, aki először felismerte a lehetséges mechanikai kapcsolatot a kereszthíd mozgása és az izom mechanikus tulajdonságai között. Ezt tisztázta 1958-ban, majd a mai modellekhez hasonló, mechanikai kereszthíd ciklust bevezette. Széles körben támogatott volt Huxley kilendülő kereszthíd modellje, miszerint az aktinhoz kötődés alatt a miozin fejekben bekövetkezett szögváltozás áll a kontrakció hátterében. Mindazonáltal még sok évbe telt, hogy közvetlen bizonyítékkal alátámasszák ezt a lengő kereszthíd modellt (Szent-Györgyi, 2004). Az első közvetlen, *in vitro* demonstrációját az aktin filamentumok miozinhoz viszonyított elcsúszásának 1986-ban S. J. Kron és J. A. Spudich írta le (Kron és Spudich, 1986). A kísérlet során a miozin filamentumokat egy üvegfelszínhez rögzítették, így immobilizálták azokat, míg az aktin szálakat fluoreszcens falloidinnel megjelölték, amelyek így láthatóvá váltak a fluoreszcens mikroszkóp segítségével. A mozgékonyság mértéke aránylag független volt attól, hogy milyen típusú aktint használtak, ellenben a miozin típusa befolyásolta a sebességet. Úgy gondolták, hogy az aktinnak passzív szerepe van, az interakció során csupán katalizátorként aktiválja a miozin működését.

1.3 Tropomiozin-troponin komplex

Az izom kontrakcióban ugyancsak résztvevő fehérjét, a tropomiozint, K. Bailey fedezte fel és izolálta 1946-ban. A nem sokkal később megjelenő cikkében, ugyan nem tudta még a pontos funkcióját, de miozin prototípusként írta le (Bailey, 1948). Ahogy teltek az évek, egyre pontosabb képet kaptak a fehérjéről. Már a ’70-es évek elején tudták, hogy a molekula magas α-hélix tartalommal rendelkezik, illetve, hogy az aminosav szekvenciájában minden harmadik vagy negyedik tagon, a nem poláris oldalláncok jelenléte indukálja, a kettős szálú *coiled-coil*[5] szerkezetet. A tropomiozin a vékony filamentum két szála által formált síkon fekszik. Az értekezések során felismerték a tropomiozin 396 Å ismétlődő periódusát, ami abból adódik, hogy ez a fehérje teljesen beborítja az aktint, és nagyjából hét aktin alegységet fed le. A troponin molekulákkal összeállva egy, kalcium-függő komplexet képez, amely a vékony filamentum

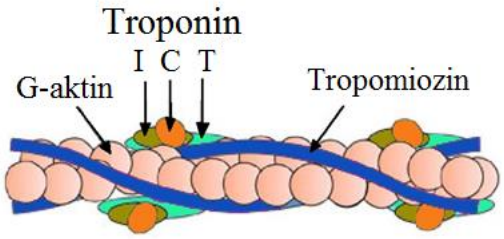
[5] Két hélixből álló csavart csavar motívum.

szabályozásáért felelős, mivel blokkolja azokat az aktin helyeket, amelyekhez kötődne a miozin (Szent-Györgyi, 2004).

A különböző aktomiozin preparátumok kalcium érzékenységének változását A. Weber és S. Winicur figyelte meg 1961-ben, és felismerték azt is, hogy ez, az aktin különböző preparálási módszereivel függ össze. A relaxáció tropomiozint követel, ráadásul az, csak natív alakban hatékony. A tropomiozin hossza, illetve menetemelkedése lehetővé teszi az aktin tökéletes beborítását, ha azzal összeköt. Ez a tökéletes lefedés elárulja, hogy a fehérje a regulációs rendszer tagja, illetve, hogy Bailey „miozin prototípus" hasonlata sem állt messze a valóságtól. Minden tropomiozin molekula köt egy troponin nevű fehérjét, amely szintén mutat periodicitást, továbbá három különböző alegységből áll (**3. ábra**). A troponinC (TnC) köti a kalcium molekulákat és a kalmodulinhoz kapcsolódik. A troponinI (TnI) egy gátló alegység, ami a TnC-hez és az aktinhoz köt, míg a troponinT (TnT) Ca^{+2}-függő módon köt a tropomiozinhoz (Szent-Györgyi, 2004).

3.Ábra

Az aktin és a tropomiozin-troponin komplex sematikus felépítése. A troponin egy három alegysége fehérje, melynek nagy szerepe van a vékony- ,illetve a vastag filamentum interakciójában. Az ábra F. Matsumoto et al., *Conformational Changes of Troponin C within the Thin Filaments Detected by Neutron Scattering,* (2004) cikkből van.



A relaxált izomban a szabad kalcium koncentráció alacsony, megközelítőleg 10^{-8} M vagy kevesebb, így erős a TnC és a TnI közötti affinitás, ezért az aktin miozinkötő oldala a tropomiozin által takarva van. Tehát a tropomiozin és a troponin kalcium hiányában az interakció inhibitoraként viselkedik. Az aktiváció során a szarkoplazmából Ca^{2+} szabadul fel és ez által megnő a szabad koncentrációja a miofibrillumban nagyjából 10^{-5}-10^{-4} M-ra. A kalcium kötésbe kerül a TnC-vel, így a TnI és a TnC közötti kötés gyengül. Ennek hatására a tropomiozin elmozdul oldalirányba, így szabaddá válnak az aktin miozin kötőhelyei, és az aktin-miozin interakció következtében az izom összehúzódik. Amit a kutatók érdekesnek találtak, hogy a troponinnak a vékony filamentum mentén csaknem 400 Å-n át kell elhelyezkednie ehhez, mégis képes a közbeeső régióban az összes aktin monomer aktivációját gátolni az izom relaxáció alatt, illetve az izom összehúzódásakor pedig bekapcsolni őket (Huxley, 1973).

A miozin motorfehérje

A kontrakció hátterében álló molekuláris változások felderítése akkor lehetséges, ha az erőgenerálásban résztvevő fehérjék szerkezete, valamint a szerkezetükben lezajló transzformáció pontosan ismert. A tudomány, illetve a technika fejlődésével az eszközök tárháza egyre csak bővül, ráadásul, ha ehhez megfelelő fantázia társul, szinte a végtelennel lesz egyenlő a műszerek felhasználásának lehetősége. Ezt alá is támasztja a ’90-es években leírt miozin háromdimenziós szerkezeti modellje is.

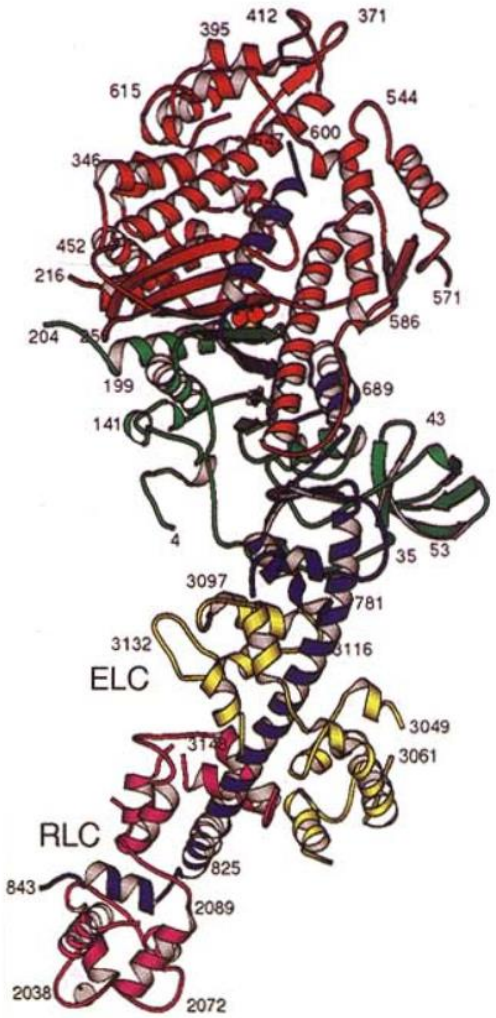
A röntgensugár-krisztallográfiás módszer, a kristályon belüli atomok elrendeződésének meghatározására szolgál, melyben a röntgensugarak a kristállyal ütköznek, és ez a fénysugarak különböző irányba való szóródását eredményezi. Az elhajlott sugárnyalábok szögéből és intenzitásából, a krisztallográf képes egy 3-dimenziós képet alkotni a kristályon belüli elektronsűrűségről. Ebből az elektronsűrűségből többek között az atomok fő pozíciója határozható meg a kristályban, illetve, hogy milyen kémiai kötésben vannak, és milyen a rendezettségük. Ezzel a módszerrel nagyszerűen fel tudták térképezni a miozin molekula másodlagos szerkezetét, melyről I. Rayment két cikkében is ír (Rayment és Holden, 1993; Rayment és mtsai, 1993). Ebben a fejezetben ezt a két cikket foglalom össze.

2. A miozin fej negyedleges szerkezete

A miozin egy igencsak aszimmetrikus fehérje, 165Å hosszú, 65Å széles és nagyjából 40Å vastag. A miozin fejet proteolitikus emésztéssel három részre lehet elkülöníteni. Ennek a három alkotórésznek a meghatározása Bíró Endre, Bálint Miklós és Szent-Györgyi Albert nevéhez fűződik, akik az ELTE Biokémiai Csoport, majd Tanszék munkásságában álltak. A felszíni 1-es, és 2-es hurok hasításával kapták ezeket az egységeket, amikről azt gondolták, hogy a miozin molekula doménjei. Ma már tudjuk, hogy ez így nem pontos, mivel ezek az alegységek külön-külön nem képesek felvenni a megfelelő térszerkezetet. A hasítással tehát kapunk egy 25 kDa-os N-terminális nukleotidkötő régiót, egy 50 kDa-os középső részt, továbbá a C-terminális fragmentumot, amely pedig 20 kDa molekulasúlyú (**4. ábra**). Az esszenciális és regulátor könnyűláncok a nehézlánc köré szerveződnek. A meghatározó strukturális sajátsága a miozin fejnek egy hosszú α-hélix (85 Å), ami kinyúlik a molekula vaskosabb részéből, le a nehézlánc karboxil-terminálisa felé. Ez az α-hélix képezi a nehézlánc könnyűlánc-kötő régióját.

2.1 A könnyűláncok

Mind az esszenciális, mind a regulátor könnyűláncok tartalmaznak hasonló aminosav szekvenciát, mint a troponin-C és a kalcium modulált kalmodulin, azonban a nyolc lehetséges, két vegyértékű kation-kötőhely közül csak egy maradt meg a regulátor LC-n. Az RLC a S1 végénél helyezkedik el, távol a nukleotid kötőhelytől. Két doménből áll, és mind a kettő figyelemre méltó strukturális homológiát mutat a már említett kalmodulinnal és a TnC-vel. A regulátor LC-nek az N-terminálisa úgy helyezkedik el a miozin nehézlánca körül, hogy annak a C-terminálisa köré tekeredik az Asn825 és a Leu842 között, míg a C-terminálisa, a Glu808 és Val826 közötti aminosav régióval áll interakcióban. Az esszenciális könnyűlánc, a miozin nehézláncának egy csaknem egyenes, hosszú α-hélix szakasza körül helyezkedik el a Leu783 és a Met806 között. A RLC és az ELC elrendeződése viszonylagos a nukleotidkötő zsebhez és az aktin-kötőhelyhez képest, ami arra enged következtetni, hogy az egyik funkciója ezeknek a láncoknak a *powerstroke* felerősítése azáltal, hogy hosszabb molekulát hozzanak létre.



4. Ábra
A miozin szubfragmentum-1 szalag ábrázolása. A zöld, piros és kék elemek, a miozin nehézláncának 25, 50 és 20 kDa molekulasúlyú alegységeit reprezentálják, míg a sárga és a rózsaszínű komponensek az esszenciális, illetve regulátor könnyűláncok (Rayment és Holden, 1993).

2.2 A miozin nehézláncának szerkezete

A HC két ellentétes felén található a nukleotid kötőhely, illetve az aktin-kötőhely. A molekulának ez a része a másodlagos strukturális elemek komplex elrendeződését mutatja, melyeknek középpontjában egy nagy, főleg parallel lefutású hétszálú β-lemez található, melynek az első és a hatodik szála többi öt szállal ellentétesen fut.

2.2.1 A 25 kDa-os N-terminális

A nehézláncnak ezen a végén található az Asp4, mely hozzávetőleg a miozin molekula közepénél helyezkedik el. Szomszédos az ELC-vel, és a nukleotidkötő régió egyik oldalát formálja. A lánc ezután a molekula másik szélére fut, ahol a Lys35 és a Met80 között egy kicsi, 6-szálú antiparallel β-lemezt képez (**4. ábra**). Ez a domén kissé kiáll a molekulából és elég független a fej többi katalitikus egységétől. A funkciója ismeretlen, bár nem úgy tűnik, hogy létfontosságú a mozgáshoz, mivel jó néhány miozin-I típusból hiányzik. Követve a motívumot, a HC egy nagy, 3-szálú β-lemezt formál, ahol az egyes szálakat α-hélixek kötnek össze. A negyedik szálat követően az úgynevezett foszfátkötő-hurkot, (angolul: *P-loop)* találjuk. Ezután a hurok után a Lys185 és az Ile199 között egy α-hélixhez érünk, mely a nukleotidkötő zseb alapját alkotja. Ezt a szekvenciát követően, törés figyelhető meg az elektron sűrűségben a Glu204 és az aktív-zseb túlsó végén található Gly216 között. Ez a hiányzó szakasz a 25 kDa és 50 kDa molekulasúlyú nehézlánc egység között van, és valószínűleg egy konstitutív rugalmas hurkot alkot.

2.2.2 Az 50kDa-os centrális rész

Ennek a centrális résznek a szerkezetét egy hosszú, keskeny árokkal két nagy doménre lehet bontani. Ez az árok a miozin fej távolabbi egyharmadát osztja két régióra, melyeket az orientációjuk szerint felső-, illetve alsó 50 kDa szubdoménnek nevezünk. A polipeptidlánc itt α-hélixként folytatódik, melynek az kiindulópontja a 216-os helyen lévő glicin. Ez a hélix a nukleotidkötő zsebnek egy részét formálja. Ezután a lánc közel a foszfátkötő-helyhez hurkokat képez, majd, mint 6-os és 7-es β-szálakkal csatlakozik a nagy β-lemez struktúrához. Később a lánc a Glu271 és az Asp327 között random módon tekeredik, néhány rövid hélixet is produkálva. Ez a régió közel fekszik a nukleotid kötőhelyhez, valamint itt található a Ser324 is, melyet már előzetes értekezésekben, mint aktívhelyet azonosítottak. Az Asp327-től az Ile340ig egy α-hélix található, mely a nukleotidkötő zsebnek a tetejét alkotja. A szekvencia ezután hélixek sorozatával kialakítja

a miozin fej végét, majd visszatér az 5-ös β-szálat kialakítva. Ez a szál random tekeredik, majd átfut a felső szubdoménből az alsó 50 kDa-os szubdoménbe. A felső és az alsó szubdomén közötti centrális régió aminosav szekvenciája (Tyr457-Gly516) rendkívül konzervatív az összes miozinban. Pontosabban maga az árok tartalmaz sok egyedi, erősen konzervált aminosavat, melyek benyúlnak a két szubdomén közötti térbe.

Az alsó 50 kDa szubdomén néhány, hosszú α-hélixből áll, melyek közül az utolsó a Pro529 aminosav miatt tartalmaz egy hidrofób kitüremkedést. Az ezt követő szakaszt a Lys553-ig az aktin kötőhely egyik felszínének tartják. A random kanyarulatok egy eleme (Lys600-Leu603), a hasítékon keresztül elhagyja az alsó szubdoményt, és hélix-kanyar-hélix mintát alkotva a felső szubdomén külső felszínére feküdve Tyr626-ban végződik. Az ábrán hiányzik a Gly627 és Phe646 közötti aminosav szakasz, mivel itt nem mérhető elektron sűrűség. Ez a részlet nemcsak az 50- és a 20 kDa-os régió kereszteződése, de itt található a tripszines emésztés második jelentősebb helye is. Az elsődleges szekvenciája ennek a rendezetlen régiónak arra utal, hogy ez is a molekula egy rugalmas régiója.

2.2.3 A 20kDa-os rész

A HC 20 kDa molekulasúlyú eleme a legkiterjedtebb a három proteolitikus fragmentum közül. Hosszú α-hélix-szel indul a molekula vastag vége felől, majd tesz egy kitérést az aktívhely közelébe. Végül a LC-kötő régió után a S1 nehézlánc karboxil-terminálisával ér véget. Ez a 20 kDa-os rész alakítja ki a kevert β-lemez a harmadik szálát, tehát a fej központi motívuma mindhárom elemből tartalmaz. A β-lemez után a polipeptidlánc egy nagy felszíni hurokban folytatódik, amely a nukleotidkötő zseb tetejét képezi. A következő két α-hélix ez alatt kötőhely alatt fekszik. Ez az aminosav szakasz erősen konzervált, tartalmazza a két reaktív szulfhidril csoportot, a Cys697 és a Cys707-et, melyeket SH1-nek és SH2-nek hívunk. Ha jelen van a nukleotid, ez a két tiol képes keresztkötést létesíteni, így tehát ez a kovalens kapcsolat a Mg^{2+}-ADP csapdába ejtését szolgálja az aktívhelyen. Meglepő eredményként kapták, hogy ez a két reaktív csoport nem egymás mellett található, hanem egy α-hélix választja el őket egymástól. Az a tény, hogy a Cys697-nek és a Cys707-nek az Cα nagyjából 18Å távolságra található egymástól, arra utal, hogy a nukleotid kötésekor kell történnie a régió átrendeződésének, konformációs változásának. A régió a jelentőségét sejteti az is, hogy a molekulának ez a része erősen konzervált aminosav szekvenciából áll.

A szulfhidril csoportot követően két rövid hélix-szel összekötött, 3-szálú antiparallel β-lemez található. A miozin nehézlánc ezután a Leu771-től a Val826-ig tartó, 85Å hosszú α-hélix-ben folytatódik. Végül a Lys843-nál ér véget, közvetlenül egy nagyjából merőleges, rövid α-hélix után.

2.3 Az aktinkötő hely

A háromdimenziós modell felfedi ezt a fehérje-fehérje interakciós határfelületet is. Az aktinkötő zseb a felső és alsó 50 kDa szubdoménből áll, melyeket gyenge aktinkötő állapotban egy rés választ el egymástól. Ez csak az erős kötési állapotban záródik (Várkuti és mtsai, 2012). A modell vizsgálata elárulta, hogy az aktomiozin határfelület a nukleotidkötő zsebtől nagyjából 35Å-re fekszik. Az aktin kötésben résztvevő számos felszínről a későbbiekben írok.

2.4 Az aktívhely

A domén atomi szerkezetét megvizsgálva, látható, hogy a nukleotidkötő zsebet szekvenciálisan elég távoli részek alkotják. A két C_α között mért távolság alapján a zseb szélessége 15 Å, és a két felszíne által bezárt szög körülbelül 40°. Az árok alapja a miozin fej C-terminálistól nagyjából 90Å-ra helyezkedik el. A miozin kötési állandója, valamint az árok mindkét oldalán fotokémiailag jelölt aminosavak alapján, elég valószínű, hogy a zseb akkor záródik, amikor a nukleotid beköt az aktívhelyre. Feltételezve, hogy az aktinkötő felszín mozdulatlan marad, a nukleotidkötő zseb záródása során a miozin fej C-terminálisa a körülbelül 50-60 Å-ös elmozdulást mutat. A legfontosabb hurkok ebben a régióban, melyek szerkezetileg igen konzervatívak az ún. *switch 1*, *switch 2*[6] valamint a foszfátkötő hurok.

Különböző forrásokból, valamint az aktívhelyen különböző ATP analógot felhasználva számtalan kereszthíd szerkezetet sikerült a kutatóknak megfejteni, amelyek struktúrájukat tekintve két osztályba sorolhatók. Különbség a kettő között az, hogy a relé hélix tartalmaz-e a közepén törést vagy sem, ill. a *switch 2* milyen pozícióban található. Erős korreláció van a két dolog között, ugyanis *switch 2* zárt, ha van törés, és nyitott, ha a relé egyenes. Az osztályokat a kereszthíd ciklus két állapotával is szokták jellemezni,

[6] A *switch 1* a miozin S1 felső 50 kDa egységben található, míg a *switch 2* az alsó és felső 50 kDa elemeket köti össze. Mind a kettő képes felvenni nyitott és zárt szerkezetet, egymástól függetlenül. Az előbbi az aktinkötő régiók szerkezetét, míg az utóbbi az erőkar mozgásáért felelős régiók konformációját szabályozza.

úgymint, *pre-powerstroke*[7], valamint poszt-rigor[8] állapot. Mindazonáltal, a miozin-V nukleotidmentes szerkezete úgy tűnik sokkal közelebb áll ahhoz az állapothoz, amelyben a miozin rigor komplexben található. Ez az új osztály a fentebb írt paradigmát ledönti, mivel itt relé hélix egyenes, de a *switch 2* elem zárt. Így ezt, rigor-szerű állapotnak nevezik (Sweeney és Houdusse, 2010).

2.5. A foszfát felszabadulás lehetséges útvonalai

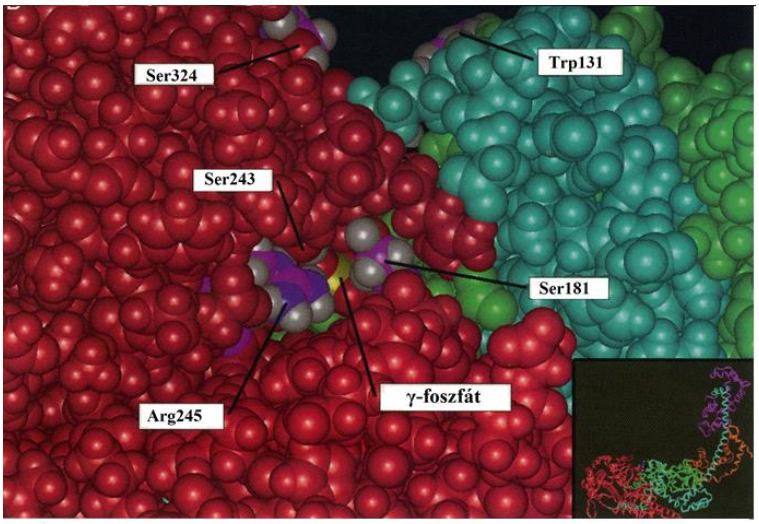
A miozin P_i elbocsátásának lehetséges útvonalairól Cecchini és mtsai. 2010-es cikkéből (Cecchini, Alexeev, Karplus, 2010) széleskörű áttekintést nyerhetünk, melyeket szimulációs analízisek segítségével határoztak meg. A miozin-II izoformában zajló foszfát felszabadulás szimulálása azt mutatta, hogy az többféle útvonalon keresztül történhet, de mindegyik szerkezetben csak az egyik út a meghatározó. A számítások arra utalnak, hogy a miozin P_i elbocsátása különböző molekuláris mechanizmusokat foglal magában aktin jelenlétében, illetve annak hiányában. Az adatok azt is jelzik, hogy magas aktiválási gát jellemzi a *pre-powerstroke* állapotban történő P_i felszabadulást, míg a rigor-szerű és a poszt-rigor állapotokra sokkal alacsonyabb gát jellemző. Azoknak a „sikeres" pályáknak szemrevételezése, ahol a P_i elhagyja a fehérjét, rámutatott arra, hogy a ligandumnak számos „menekülési útvonala" létezik mindegyik fehérje szerkezetnél. A megfigyelt pályákat hat csoportba lehet sorolni, melyeket a foszfát nukleotidkötő zsebből való távozása alapján neveztek el. Érdekes módon, ugyan mind a három vizsgált miozin állapotban megtalálható az összes lehetséges távozási útja a P_i-nek, de igen különböző valószínűséget mutatnak. Ennek ellenére, az összesre jellemző egy domináns pálya. A *pre-powerstroke* és a poszt-rigor állapotban a „hátsó ajtón", míg a rigor-szerű állapotban a „2-es számú hátsó ajtón" a legvalószínűbb a P_i távozása.

2.5.1 A miozin „hátsó ajtajának" szerepe az ADP kioldása során

A felső és alsó 50 kDa-os régió közötti hosszú, keskeny nyílás a csatlakozik az aktívhely alsó feléhez. Ez azt sugallja, hogy az aktin kötése asszociálva van a nukleotid kötés által kiváltott konformációs változásokkal, ami ezáltal az alapja lehet a miozin és az aktin kötés affinitásának módosításában (Rayment és mtsai, 1993). Bizonyítékok a miozin „hátsó ajtajának" létezésére, az ATP nélküli S1 térkitöltős modellek alapos vizsgálatából,

[7] Ebben az állapotban, a miozin erőkar állása alapján „fel" (up) állapotban található, és alacsony aktin affinitással rendelkezik, tehát az aktinkötő árok nyitva van.
[8] A *powerstroke* végén erős ATP kötött miozin forma, mely ennek hatására levált az aktinról. Az erőkar „le" (down) állasból „fel" konformációba mozdul.

és számos kinetikai tanulmányokból származnak, noha kísérleti alátámasztást az útvonal ez idáig még nem nyert.



5.Ábra
A miozin szubfragmentum-1 "hátsó ajtaja". Az ATP trifoszfát csoportja az aktívhely alja felé mutat a kötődés során, ami látható is a motor domén felszínén. A foszfátcsoport felszabadulásának ez az egyik, legvalószínűbb útvonala, mely során a Pi képes úgy távozni, hogy az ADP kötött állapotban marad (Yount, Lawson és Rayment, 1995).

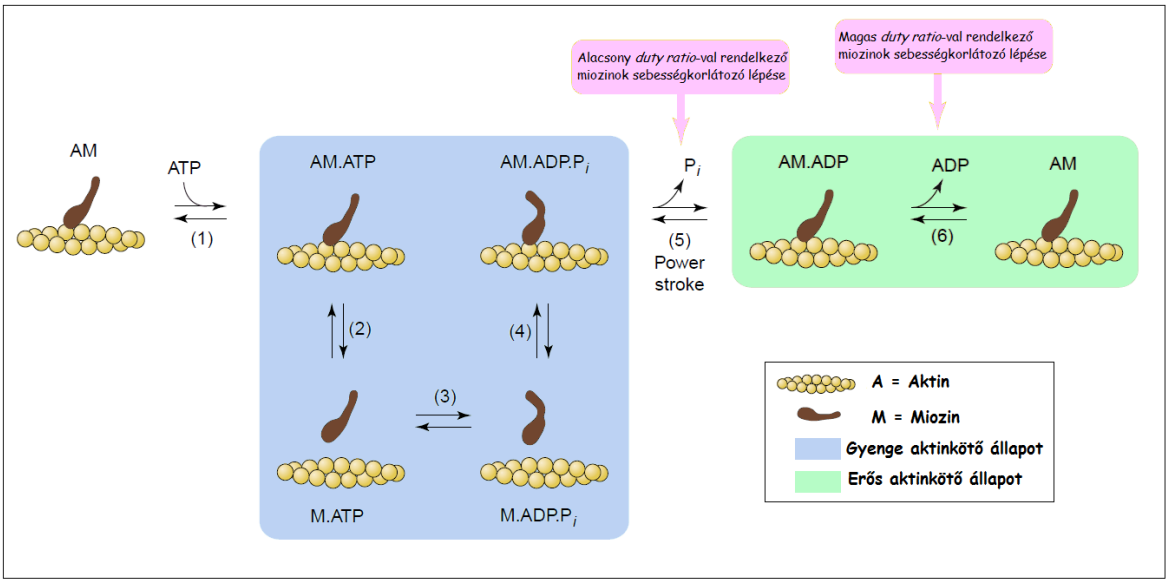
Az ATP kötés során a trifoszfát-csoport az aktívhely alja felé mutat, míg a felszínhez legközelebb az adenin gyűrű található, a Trp131 aminosav mellett (**5. ábra**). A már említett Ser324-nek is fontos szerepet tulajdonítanak, mivel ennek az Cα-ja szomszédos a bekötött ATP-vel, és ezért ezt tartják a reakció legvalószínűbb helyének. Ezenfelül a modell helyességét alátámasztja az is, hogy az ATP-nek a γ-foszfátja a Ser181 és a Ser243 mellett fekszik. Amiképp az S1 „hátsó oldalát" illusztráló ábrán is megfigyelhető, a γ-foszfátcsoport egy része látható a felszínről. A néhány angströmös nyílás elég ahhoz, hogy a víz bejusson a molekulába, de nem elég nagy a P_i elszökéséhez. A foszfátkötő hurok, mely tartalmazza Ser181, Ser243, avagy az Arg245 aminosav valamelyikét, 3-4 Å-ös elmozdulása viszont elegendő lenne, hogy a P_i távozzon. Tehát a „hátsó ajtó" mechanizmus megengedi a P_i távozását és újra bekötését, a kötött ADP elveszítése nélkül (Yount, Lawson, Rayment, 1995).

Számos kinetikai tanulmány kimutatta már, hogy először a P_i távozik, és csak utána fog az ADP. Valószínű, hogy az ATP hasadásából keletkezett P_i feladata még a távozása előtt, hogy megakadályozza az 50 kDa-os árok mozgását, ill. bezáródását. Azáltal, hogy P_i a hátsó ajtón keresztül távozik, az ADP kötésben maradhat, amíg a keresztíd-ciklus és a mozgás be nem fejeződik. Ezt követően az ADP elől távozik és kicserélődik egy új ATP-re, majd kezdődhet elölről a ciklus. Ráadásul, ez a mechanizmus számos egyéb jelenséget is megmagyaráz, mint például, hogy az acto-S1 katalizálja a P_i kicserélődését az ATP γ-foszfátjára. Azonban csak az ATP hidrolízisből, és kötésből származó ADP vehet részt a cserében, az exogén ADP hatástalan (Yount, Lawson, Rayment, 1995).

3. Miozin izoformák

Az aktin alapú molekuláris motoroknak, a miozin szupercsaládnak legalább 35 tagja van (Sweeney és Houdusse, 2010), melyek a változatos sejtszintű tevékenységekhez adaptálódtak. Például néhány miozin nagy makromolekulává szerelődik össze, és így az izom kontrakcióban vesz részt, míg mások kis számban az egyes organellumok áthelyezéséért felelősek. De La Cruz és Ostap cikkében (De La Cruz és Ostap, 2004) jól össze van foglalva a miozin szupercsalád néhány családjának jellemzése, illetve azok ATPáz ciklusának biokémiája. Ezekről lesz szó a következőkben.

A különböző miozin izoformákban az ATPáz ciklus mechanizmusa meglehetősen konzervatív. Az útvonalának egy mechanikus modellel kapcsolt sémája a **6. ábrán** látható. A ciklus intermediereit az aktin affinitásuk szerint határozzák meg. A M.ATP és a M.ADP.P_i állapotban gyenge kötésű intermedierekről beszélünk, melyek (szubmikroszekundumos skálán mérhetően) hozzákapcsolódnak, illetve leválnak az aktin filamentumról. Alacsony (mikromólos) aktin affinitásuk van, és nem kötődnek sztereospecifikusan a vékony filamentumhoz. A gyenge aktinkötő állapot teszi lehetővé a miozinnak, hogy felvehesse a megfelelő térszerkezetet, amíg nem kapcsolódik az aktinhoz,



6.Ábra
Az aktomiozin konzervált ATPáz ciklusa. ATP hiányában a miozin szorosan kötődik az aktinhoz. Azonban ATP kötődés (1. lépés) hatására konformációs változás történik, és a miozin alacsony aktin affinitású lesz, melynek következtében, az aktin leválik a miozinról (2. lépés). A további konformációs változás lehetővé teszi az ATP elhidrolizálását, így ADP és anorganikus foszfát keletkezik (3. lépés), melyek továbbra is miozinhoz kötve maradnak.Az aktin filamentum ismét hozzákapcsolódik a M.ADP.P_i komplexhez (4.lépés), és erőgeneráló *powerstroke* kíséretében a foszfát felszabadul (5.lépés). Később az ADP is távozik, és a ciklus megismétlődik ATP kötéskor (De La Cruz és Ostap, 2004).

így megelőzi a fordított *powerstroke*-ot (3. lépés). Az AM és az AM.ADP állapotban erős kötésű intermedierekről beszélünk. Ilyenkor a miozinok sztereospecifikusan kötődnek az aktin filamentumokhoz, magas (azaz szubmikromólos) affinitással, éppen ezért erőhordozó intermediereknek is hívjuk őket.

A két fontos paraméter van hatással a miozin mechanikus sajátságára és motilitására; az erős kötésben lévő intermedierek életideje és a terhelési aránya (*duty ratio)*. A miozin osztályok és izoformák között ez a két faktor jelentős mértékben variálhat. A terhelési arány az ATPáz ciklusnak az a hányada, mely során egy önálló miozin fej aktinhoz kötött állapotban van. A kötött motorok lehetnek *pre-* vagy *poszt-powerstroke* állapotban is, viszont amikor miozinról beszélünk, a terhelési arányt általában az erős kötésben lévő csoportra értjük. Például, az alacsony terhelési aránnyal rendelkező miozinok az idejük nagy részét M.ATP és M.ADP.P_i állapotban töltik, míg a magas TA-sok pedig az AM és AM.ADP állapotban. Egyszerű kinetikai feltételek mellett, a 4. illetve az 5. lépés a sebesség meghatározó az alacsony TA-s miozinoknál, míg a magas TA-soknál az 1. illetve a 6. lépés. Mivel a karakterizált miozinok TA-ja függ az erős aktinkötő állapotba való be- és kilépések arányától, így függ az aktin és a nukleotid koncentrációtól is.

3.1 Miozin-I

A miozin-I izoformák egyfejű, membrán asszociált tagjai a miozin szupercsaládnak, melyek megtalálhatók a legtöbb eukarióta sejtben. Esszenciális szerepük van a membrán dinamikában, citoszkeleton szervezésében, a mechanikus jelátvitelben, illetve a vezikuláris transzportban. Ez a miozin család a motor domén szekvencia alapján két alcsaládból áll. Az egyik alosztály tartalmazza az ’amoeboid’ vagy hosszú farkú miozin-I fehérjéket, míg a másik alosztály a ’rövid farkú’ miozinokat, többek között a hámsejtek kefeszegélyében előforduló myo1a-t foglalja magába.

3.2 Miozin-II

Ez a konvencionális fehérjecsalád a fő kontraktilis protein az izomban, de számos funkcióval rendelkezik az izomszöveten kívül is. A miozin-II két motor domént tartalmaz és bipoláris filamentumba szerveződik. Mint a miozin-I családnál, a motor domének filogenetikai elemzése által itt is több alcsaládot tudunk megkülönböztetni. A szív-, sima-, illetve a vázizomban előforduló, valamint a nem-izom típusú alcsaládok mindegyike több

izoformát is tartalmaz. Az összes miozin-II izoformára hasonló egységes erő és elmozdulás jellemző; tehát egy vázizomban található miozin-II molekula ugyanakkora erőt és elmozdulást eredményez, mint egy simaizomban előforduló. Amiben viszont nagy változatosságot mutatnak, az az intermedierek életideje és a TA, melyek így fontos mechanikai különbségeket, illetve a funkcionális sokszínűséget biztosítanak a családnak. A simaizomban található miozin TA-a szignifikánsan hosszabb, mint a vázizomban találhatóé. Valószínűleg ezek a kinetikus különbségek felelősek a simaizom lassúbb, de nagyobb erejű összehúzódásáért.

3.3 Miozin-V

A miozinok közül ez felelős az intracelluláris transzportért. Ez a kétfejű molekula a vezikulumokat nagy távolságon át, az aktin filamentum mentén szállítja. A miozin-V processzív motor, mivel a vékony filamentumon aránylag nagy utat képes megtenni, mielőtt disszociálna róla. A fehérje azért képes erre, mert lépegetve halad, azaz a dimer egyik fele mindig aktinhoz kötött stádiumban van, míg a másik leválik, majd előrelép. Míg a miozin-I családban található miozinok inkább a lassabb szállításra specializálódtak, a miozin-V gyors transzportra alkalmas. Az aktin nagyjából 36 nm-enként biztosítja a kötőhelyeket, melyek az egyenes vonalú haladáshoz megfelelő orientációban találhatók, és ez azt jelenti, hogy a miozin lépéshosszának is legalább ennyinek kell lennie (Kovács, 2009; De La Cruz és Ostap, 2004).

3.4 Miozin-VI

Számos sejten belüli feladat elvégzéséhez szükség lehet olyan miozinra, mely visszafelé, azaz az aktin mínusz-vége felé lépeget. Ilyen molekulák találhatóak ebben a családban, amelyek többszörös kinetikai és szerkezeti adaptáción estek át. Efféle, család specifikus szerkezeti elem a két részből álló *insert-2*[9]. A molekula konvencionális IQ eleméhez csupán egy CaM képes kötődni, ami azért különös, mert az aktinon való haladása során legalább akkorákat lép, mint a miozin-V, mégis ez utóbbinak hat CaM-kötő IQ eleme is van. Azonban hasonlít abban a két típus, hogy mindkettő processzív motorfehérje, magas TA-val. A miozin-VI családnak szerepe van többek között az endocitózisban, a

[9] Az egyik az az α-hélix, mely a konverter után található, és az emelőkar nagyjából 120°-os meghajlásáért felel. Ez a régió elegendő a miozin molekula fordított irányultságához, feltéve, ha ezt egy minimális hosszúságú emelőkar követi. Ez utóbbit fordított fogaskeréknek is hívják, amely biztosítja az *insert-2* másik részét, egy nem szokványos CaM-kötőhelyet.

Golgi működésben, citokinézisben, sejt adhézióban, valamint a tumorgenezisben is (Sweeney és Houdusse, 2010).

3.5. Processzivitás

A magas TA szükséges a motorfehérjék folyamatos mozgásához. A miozin-I és a legtöbb miozin-II izoforma alacsony TA-val rendelkezik, ezért sok motornak kell egyszerre dolgoznia, hogy biztosítva legyen a folyamatos csúszás, angolul *sliding*. A miozin-V, illetve miozin-VI molekulák processzív motorok, ezért mindegyik lépés ATP hidrolízissel kapcsolt, így tudnak nagy távolságot megtenni az aktinon. Az is releváns, hogy a processzív miozinok minden motorjának magas TA-val kell rendelkeznie, ugyanis növelniük kell annak valószínűségét, hogy legalább az egyik motor domén aktinhoz kötött állapotban van, különben a szállítómolekula vagy a szállított csomag szétszóródik (De La Cruz és Ostap, 2004).

Az aktin architektúrájának áttekintése

A vékony filamentum (más néven F-aktin) helikális polimer, melyet az igencsak konzervatív aktin molekulák építenek fel. Az izomban F-aktin formában fordul elő, melyet az ATP teljes elhidrolizálása után, általában miozinnal együtt vonnak ki. A polimerizált aktin, só jelenlétében hosszú kettősszálú hélixet alkot, mely 360Å periodicitást mutat, ellenben nukleotidmentes környezetben denaturálódik. Ezek az aktin monomerek globuláris fehérjék, melyek ATP-t felhasználva gyorsan polimerizálódnak. A 36 nm-es fordulat 13 monomerből áll, melyek egyenként nagyjából 42 kDa molekulasúlyúak, és az általuk kialakított lánc emelkedése alegységenként körülbelül 2.75 nm. A vékony filamentumok mellett mindig található olyan aktin csoport, mely monomer formában van jelen. A monomereknek azt az egyensúlyi koncentrációját, amely alatt az aktin már nem képes polimerizálódni, kritikus koncentrációnak nevezzük, melynek értéke több paramétertől is függ, mint például a nukleotidok és a kationok koncentrációjától (Holmes és Geeves, 1999).

A globuláris fehérje két fő doménből áll, melyek hasonló szerkezetűek. Mindkettő tartalmaz 5-szálú β-lemezt α-hélix-szel asszociálva. A foszfát része a nukleotidnak, a fiziológiás magnéziummal (vagy kalciummal) együtt, a két β-lemezes domén közé a kation- és nukleotidkötő hasítékban köt. A két domén tovább osztható két-két szubdoménre. Az egyiknek az aktin-aktin interakcióban van szerepe, a másik pedig a nukleotidkötő zseb felsőrészét alakítja ki. Az aktin a polimerizáció során konformációs változáson esik át, mely a szerkezet finomítása érdekében megengedett. A legfigyelemreméltóbb a szubdomének mozgása, melyek 0.3-0.4 nm-t közelednek egymáshoz az F-aktinban, így elzárják az ATP/ ADP –kötőhelyet, mely nagyon lassú nukleotid cseréhez vezet. A polimerizáció után, a nukleotid szerepe az F-aktinban inkább strukturális, mint metabolikus (Holmes és Geeves, 1999).

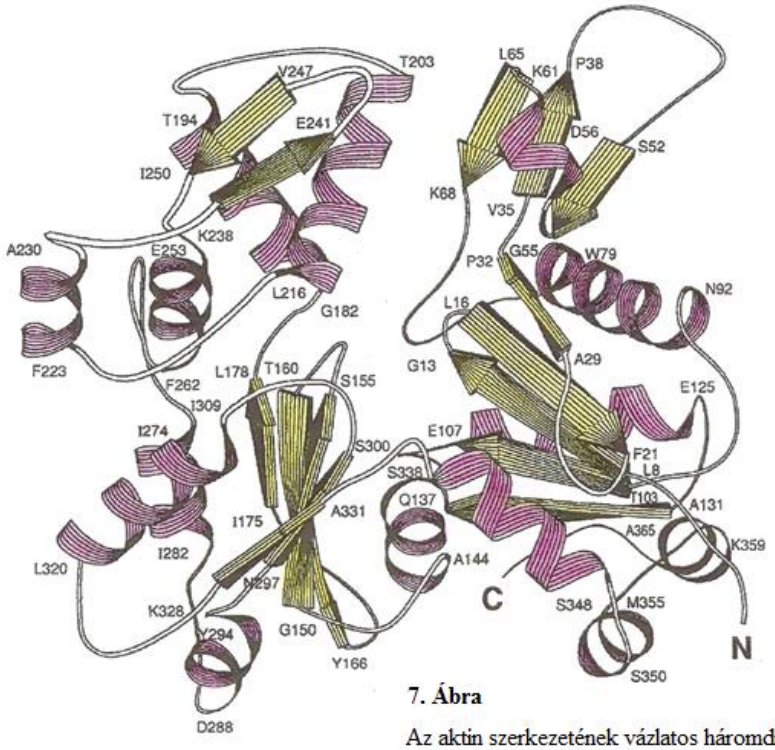
A G-aktinnak a teljes aminosav szekvenciáját meghatározták a szarvasmarha pankreatikus deoxiribonukleáz I (DNáz I) segítségével (**7. ábra**). A 375 aminosavból álló aktin 5 szabad szulfhidril csoportot tartalmaz, a 10, 217, 275, 285, és a 374-es helyeken. A monomer másodlagos szerkezetéből látszik, hogy az belefér egy 55Å-55Å-35Å oldalhosszúságú téglatestbe. Az aktin két doménjét történelmi okok miatt nagy és kis doménnek nevezték el, bár valójában majdnem ugyanakkorák. A kis domén tartalmazza a *szubdomén-1*-et (1-32, 70-144, 338-372 as.), és a *szubdomén-2*-t (33-69 as.), míg a nagy

domén részei a *szubdomén-3* (145-180, 270-337 as.), illetve a *szubdomén-4* (181-269 as.). Az amino- és a karboxil-terminális is a kis doménben található meg (Kabsch és mtsai, 1990).

4. Az aktin szubdomének

A szubdomén-1 tartalmaz egy 5-szálú hajtogatott lemezt és egy jobbkezes βαβ egységet, melynek a topológiája azonos a hexokinázban találhatóval. A lemez 5 hélix-szel van körülvéve. Az egyik hélix két hidrofób aminosavat tartalmaz, az Ile345 és a Leu346, melyek hozzáférhetőek az oldószer számára, míg az ezeket megelőző hidrofil Ser344 teljesen el van temetve a molekulában. Ez a hélix valószínűleg részt vesz az aktinkötő proteinekkel történő interakciókban, esetleg a miozinnal vagy tropomiozinnal (Kabsch és mtsai, 1990).

A szubdomén-2 egy három-szálú antiparallel lefutású β-redőt és egy összekötő hélixet tartalmaz (Kabsch és mtsai, 1990). Az első és a második szálat összekötő hurok, a *D-loop*, azaz a DNáz I kötő hurok (Oda és mtsai, 2009).



7. Ábra

Az aktin szerkezetének vázlatos háromdimenziós ábrázolása. A hélixek és lemezek első és utolsó aminosavai fel vannak tüntetve. Az ábrától eltérően a Glu253 és a Phe262 közötti hélix mintázatát megszakítja a Pro258 (Kabsch és mtsai, 1990).

A szubdomén-3 tartalmaz egy 5-szálú β-lemezt, mely három hélix-szel van körbevéve. A lemez topológiája azonos a szubdomén-1-ben található. A rengeteg másodlagos szerkezetbeli megegyezés arra utal, hogy az aktin génduplikáció révén fejlődött, bár az aminosav szekvencia nem mutat semmi belső hasonlóságot. Az feltételezhető, hogy a génduplikáció után nem sokkal a domének úgy tökéletesedtek, hogy különböző funkciókat láthassanak el. Az az ötlet, miszerint az aktin mindkét doménje egy közös ősi fehérjéből alakult ki, úgy tűnik alátámasztást nyert egy hibrid molekula által, mely tartalmazza az 1-134 közötti aminosav részletét az aktinnak és a tirozin specifikus protein kináznak (Kabsch és mtsai, 1990).

A szubdomén-4 kétszálú antiparallel β-lemezt és 4 hélixet tartalmaz. Később ezt a hélixet egy hurok és egy másik hélix (274-282 as.) követi a szubdomén-3-ban. Felfogható úgy is, hogy a két hélix egy nagy, 40 Å-ös hélix részei lennének, középen egy hurokkal megosztva. A szubdoménben található a Cys217 és a Cys257-es kénatomok közötti távolság nagyjából 3.8Å, és mind a kettő hozzáférhetetlen az oldószer számára. A nagy hélixet megtörő hurokban pedig az oldószer számára hozzáférhető három hidrofób aminosav van, a Phe266, Ile267, és a Met269. Az az elterjedt vélemény, hogy az F-aktinban ez a hurok tartja a kapcsolatot más aktin monomerekkel (Kabsch és mtsai, 1990).

5. Nukleotid kötőhely

Az adenin nukleotid a nagy és a kis domén közötti árokba köt, ezért érthető, hogy csökkent a nukleotid kicserélődésének sebessége ebben a komplex formában. Az adenin bázis a Lys213, Glu214, Thr303, Met305, Tyr306 és a Lys336 által formált zsebbe illeszkedik, de nincs semmilyen specifikus interakció ezek között az aminosavak és az adenin között. A nukleotid ribóz gyűrűje 2'- endo konformációban van jelen a komplexben. A ribóz 2'- és 3'- hidroxilcsoportjai a Glu214 és Asp157-es karboxilcsoportok oxigénjeivel hidrogénkötéseket alakítanak ki. A nukleotid foszfátcsoportjai pedig nagyszámú interakcióban vesznek részt (Kabsch és mtsai, 1990).

6. Kalcium-kötőhely

Négy kalciumiont határoztak meg, mely az aktin-DNáz I komplexben jelen van. Ebből három a DNáz I-ben köt, és ezek közül kettő, aktin jelenléte nélkül is megtalálható itt. Az egyetlen kalciumion az aktin molekulán belül egy mély, hidrofil zsebben ül. Ezt a

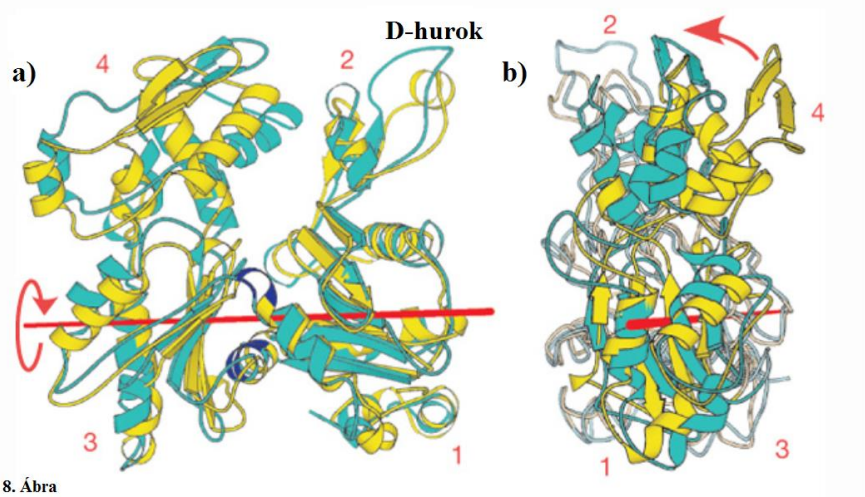
zsebet az adenin nukleotid foszfát csoportjai és az aktin Asp11, Gln137, illetve Asp154 aminosavak alkotják. Ezeknek az aminosavaknak, csak közvetett szerepük van a kalciumkoordinálásban. Az aktinnak egyetlen nagy affinitású helye van a kétértékű kationok számára, és számos alacsony affinitású az egy-, két-, és háromértékű kationoknak (Kabsch és mtsai, 1990).

7. Miozin-kötőhely

Az egyedülálló orientációjú monomerek az F-aktinban úgy helyezkednek el, hogy tengelytől távolabb, nagyobb sugárban találhatók a kis domének. A szomszédos monomerrel való kapcsolatban mind a négy szubdomén részt vesz. A háromdimenziós képrekonstrukciók segítségével egyértelmű lett, hogy a miozin S1 része az aktin kis doménjéhez köt, és a filamentum tengelyétől elmutat. Ezt a nézetet számos megfigyelés is alátámasztják, sőt láthatóvá vált, hogy az aktin részek, melyek a miozin kötésben szerepet játszanak, mind a kis doménben találhatóak (Kabsch és mtsai, 1990).

8. A szubdomének konformációi és összeköttetéseik

A konformációs változás, mely a globuláris aktin, fibrilláris aktinná alakulása alatt történik, valamint a kísérő ATPáz aktiváció sokáig homályos volt. Majd új technikák alkalmazásával egy olyan modellt írtak le (Oda és mtsai, 2009), mely rámutatott az esszenciális különbségre a G- és az F-aktin között, nevezetesen a két fő domén relatív 20°-os rotációjára, mely így az F-aktin alegységnek lapos konformációt ad. Ez a lapos konformáció úgy tűnik közös jellemzője az aktin homológok polimerjeinek. A másik különbség a szubdomén-2-ben, a DNáz I kötő hurokban van, mely nyitott konformációt vesz fel. Ez az új modell alapot nyújt az F-aktin szerkezeti stabilitásának megértéshez is.



8. Ábra
Az aktin monomer konformációjának változása a polimerizáció során elülső (a), valamint oldalsó (b) nézetben. A sárga színnel a G-aktinként felvett szerkezet, míg kék színnel az F-aktinban felvett monomer forma van illusztrálva (Oda és mtsai, 2009).

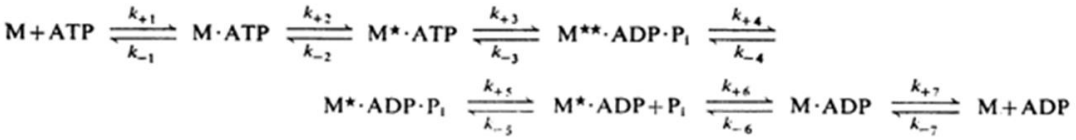
Azt aktin nukleotidkötő árka a két fő domén által zárva van. Szinte minden kristályos aktin szerkezetben a hasíték zárva van, és a két domén propellerszerűen csavarodik egymás köré. Ez a G-aktin konformációnak egy jellemzője (**8. ábra**). Az F-aktin modellben olyan lapos konformációt találtak, melyet előtte nem ismertek. Itt a hasíték továbbra is zárva található, emellett, a két domén kicsavart állapotban van. Ez a két szerkezet egymással kapcsolatban áll. A tengely, amely körül 20°-ban elfordult a két fő domén, a szubdomén-1 elülső és a szubdomén-3 oldalsó részén halad végig. A két domén viszonylagos forgása a 141-142, ill. 336-337 aminosavak torziós szögeinek rotációjával érhető el. Az F-aktin alegységek másik jellemzője a kiterjedt D-hurok, mely a szál mentén a szomszédos, felső alegység felületére illeszkedik.

.

A kontrakció mechanizmusa

9. A Bagshaw- Trentham modell

Annak ellenére, hogy nem állt a rendelkezésükre a miozin atomi szerkezete, Clive Bagshaw és David Trentham a miozin ATP hidrolízis biokémiai mechanizmusát számos kinetikai mérés után definiálta. Ezt, a Lymn-Taylor modell után pár évvel készült sémát, *Bagshaw-Trentham modell*nek hívjuk. A szerzők a mérések során a különböző konformációs állapotokat fluoreszcencia intenzitás alapján tudták megkülönböztetni (Holmes és Geeves, 1999).



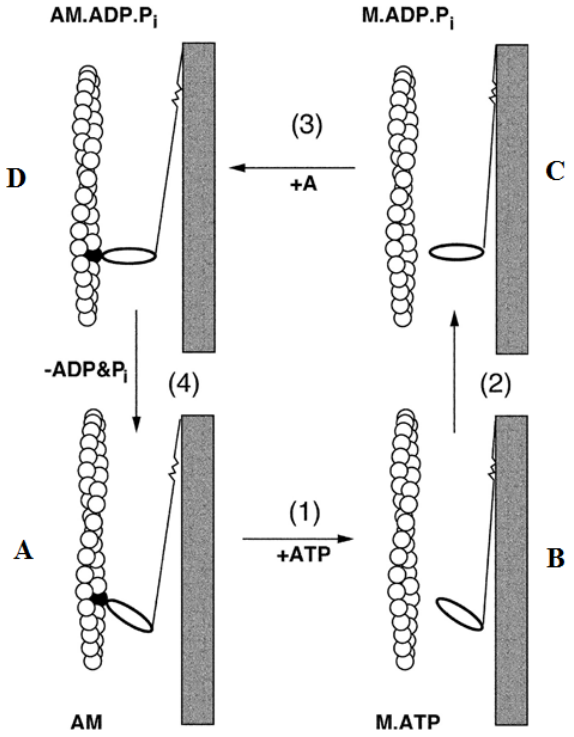
1. vázlat
Bagshaw-Trentham modell

A miozin ATPáz mechanizmusa számost lépést magában foglaló komplex reakció. A miozin ATP kötése kétlépéses folyamat, amely során az ütközési komplex kialakulása után (1), a gyakorlatilag irreverzibilis, konformációs tranzíció lépése kezdődik (2). Ennek következtében az ATP-t igen erősen köti a miozin. Ezt követően történik a reverzibilis ATP hidrolízis (3), mely a miozinnak egy további fluoreszcens állapotát eredményezi (M**). Ez a folyamat az előzőnél jóval lassabb, és mivel kicsi a szabad energiaváltozás, reverzibilis. Ebben a lépésben még egy konformációs változás is történik, nevezetesen, a miozin „feltöltése". Ez a feltöltött miozin erőkar a termékek felszabadulása által fog lazulni. Ráadásul, aktin jelenlétében ez a relaxáció olyan erőkar lecsapáshoz vezet, melynek következtében a szarkomer összehúzódik (4,5,6,7). Az ADP kétlépéses disszociációja előtt gyors P_i távozás figyelhető meg. Mivel a poszthidrolitikus termékek sokkal gyengébben kötődnek a miozinhoz, mint az ATP, magát a ciklust, a különböző miozin-nukleotid komplexek közötti különböző szabadenergia hajtja, és nem pedig az ATP hidrolízise.

10. Lymn-Taylor modell

A miozin globális szerkezeti változásának, illetve az aktinnal való interakciójának vázlatos leírása R. Lymn és E. Taylor nevéhez kötődik. Ezt a modellt 1971-ben jellemezték, mielőtt még rendelkezésükre álltak volna a miozin és az aktin nagy felbontású

röntgent szerkezeti képei. Azonban ez a kereszthíd-ciklus modell a mai napig eredményesen összefoglalja azokat a fizikai, ill. kémiai változásokat, melyek az aktin és a miozin interakciója során megfigyelhetünk (Szent-Györgyi, 2004; Cecchini, Alexeev, Karplus, 2010). Az S1 kinetikai analízisei azt jelezték, hogy számos ATP és számos ADP állapot létezik. Ezek az analízisek azt is demonstrálták, hogy az ATP kötések egyensúlyban vannak az ADP kötésekkel és az anorganikus foszfátok mennyiségével. Eme két alapvető eredmény alapján jutott el ehhez a modellhez Lymn és Taylor. Bizonyítékot találtak arra, hogy az ATP hidrolízis leválasztott állapotban történik, amikor a miozin nem köt az aktinhoz. Azt is kimutatták, hogy a miozinhoz való ATP adás, az ATP hidrolízis kitörését okozza, mely közel sztöchiometrikus arányban van a miozin fejek mennyiségével. A kitörés akkor történik, amikor az aktívhely lakatlan, ezért ez az eredmény arra mutatott rá, hogy az ADP disszociáció a limitáló lépés a ciklusban.



9. Ábra

A Lymn-Taylor modell. A miozin fej az aktinhoz köt és így a rigor komplexben 45°-os *'le'* állapotot vesz fel (A). Az ATP kötődés az aktin gyors disszociációjához vezet (B). Az ATP hidrolízise ADP és P_i termékké, a miozin kereszthídjának 90°-os *'fel'* állapotához vezet (C), ami ezután újra köt az aktinhoz (D). Ennek hatására pedig a hidrolízis termékek felszabadulnak, így az aktomiozin újra a kiinduló rigor állapotba kerül (Szent-Györgyi, 2004).

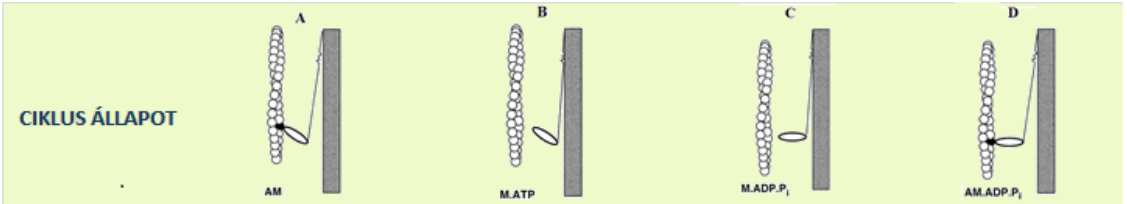
A 9. képen a négy állapotban ábrázolt Lymn-Taylor modell látható. Az aktinnal nem kötött állapotban a miozin szerkezeti átalakuláson megy keresztül (2. lépés), így a molekulák „felhúzott" állapotba kerülnek. Ez konformáció változás kapcsoltan történik az ATP hidrolízisével. A miozin kereszthídjaiban olyan konformáció változás történik az aktin kötése után (3. lépés), amely előre csúsztatja az aktint (4. lépés). Az erőgenerálás, tehát az erőkar lecsapódása asszociálva van a termékek felszabadulásával. Ennek következtében kialakul a rigor komplex, amely tulajdonképpen a nukleotidmentes állapota az aktomiozinnak. Az ADP felszabadulása lehetővé teszi az új ATP kötését, amely viszont a miozin aktin affinitását jelentősen csökkenti, így a miozin leválik az aktinról, és a

folyamat kezdődhet elölről. Ez az egyszerűsített modell számos intermediert elhagy, de a ciklus esszenciális lépéseit kiválóan leírja, így ez a mai napig használható.

10.1. Lymn-Taylor modell és a miozin régiók

Az aktin filamentum és a miozin közti kölcsönhatás során, kezdetben mivel még az aktinkötő árok nyitva van, az S1 alsó 50 kDa szubdomén kötődik gyenge, sztereospecifikus interakció révén a vékony filamentumhoz. Eszerint, a felső 50 kDa szubdomén kezdetben nem vesz részt az interakcióban. A rigor komplex erős kötése során viszont a felső 50 kDa szubdomén hirtelen körülleng, így a kardiomiopátiás hurok is érintkezni tud az aktin felszínével. A nukleotidkötő hely *switch 1* eleme a felső 50 kDa doménben található, és az aktinhoz való erős kötés ennek az elemnek nagyjából 6-9 Å-ös elmozdulásához vezet. Úgy tűnik tehát, hogy ez a mozdulat kinyitja a nukleotidkötő zsebet, de ez a *powerstroke* alatti *switch 2* kinyílásától elhatárolható (Holmes és mtsai, 2003).

A tanulmányok azt mutatták, hogy az aktinkötő hasíték záródása mechanikailag kapcsolva van a *switch 1* nyitásával. Az már bizonyított, hogy a *pre-* és poszt-*powerstroke* állapotok kapcsoltak a *switch 2* kinyílásával és záródásával. A *switch 1* és a *switch 2* szerkezetváltozásainak kombinálásával négy állapotot kapunk. Ezek az állapotok megfeleltethetők a Lymn-Taylor modell négy állapotával (**1. táblázat**).



CIKLUS ÁLLAPOT	rigor-szerű komplex / *powerstroke*	poszt-rigor állapot / *post-powerstroke*	pre-powerstroke komplex / hidrolízis	aktin újra kötés
MIOZIN RÉGIÓK				
switch 1	nyitott	zárt	zárt	nyitott
switch 2	nyitott$_1$	nyitott$_2$	zárt	zárt
aktinkötő árok	zárt	nyitott	nyitott	zárt
relé	törés	törés	egyenes	egyenes
konverter	"le"	"le"	"fel"	"fel"
foszfátkötő-hurok	"fel"	"le"	"le"	"le"

1. Táblázat

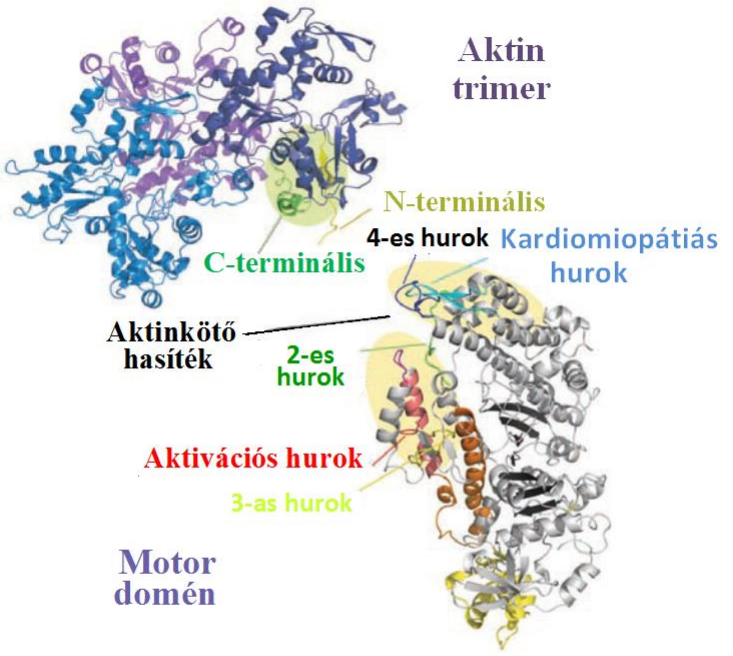
A miozin régióiban zajló szerkezeti átalakulásuk a Lymn-Taylor modell egyes állapotai szerint. A *switch 2* nyitott$_1$ és nyitott$_2$ szerkezete arra utal, hogy azok egymástól különböznek, tehát feltehetőleg létezik egy harmadik konformációban is. A táblázat Holmes és mtsai, (2003) *Electron cryo-mycroscopy shows how strong binding of myosin to actin releases nucleotid* cikke alapján készült.

A miozin motor mechanizmus szerkezetét és működését igen részletesen leírja H.L. Sweeney és A. Houdusse egy cikke (Sweeney és Houdusse, 2010), melyben sokat foglalkoznak az aktin aktiválta P_i felszabadulással. Itt azt is megemlítik, hogy a *switch 2*

nem ugyanabban a nyitott konformációban található a rigor ill. a poszt-rigor szerkezetben. Valószínűleg sem a *switch 1*–ben, sem a *switch 2*-ben nem pusztán egy egyszerű nyitott-zárt állapot változás történik a szerkezet átrendeződés alatt. Ellenben az biztos, hogy ezt az átszerveződést az aktin váltja ki, és általa stabilizálódik.

11. Az erőkifejtés kulcsa: aktivációs hurok

A már említett aktin általi aktiváció az összes miozin izoformánál jelen van, bár még a molekuláris mechanizmusa és a fiziológiás szerepe a folyamatnak nem teljesen világos. Nemrég leírtak egy konzervált, miozin aktinkötő régiót, melynek az 'aktivációs hurok' nevet adták. Ez a régió interakcióba lép az aktin N-terminálisával. Ebben a cikkben (Várkuti és mtsai, 2012), hogy tisztázzák az aktomiozin interakció szerkezeti részleteit, a molekuláris mechanizmusát, illetve ezek hatását a mechanikai teljesítményre, három dolgot mutattak be. Újra mintázták az aktomiozin komplexet gyenge, ill. erős aktinkötő állapotban, és azonosították a már fent említett új, aktinkötő hurkot a miozinon (**10. ábra**). Ezt követően kísérletiesen feltárták ennek a huroknak a miozin ATPáz aktin aktivációjában betöltött specifikus szerepét; s végül tesztelték az aktin aktiváció *in vivo* szerepét transzgénikus *C. elegans*-ban.



10. Ábra

Az aktin trimer (kék, lila, sötétkék) és a miozin (szürke) szerkezeti rajza. A miozin alsó és felső 50 kDa alegységek sárgával vannak kiemelve, míg az aktin szubdomén-1 világoszölddel. A pirossal jelölt aktivációs hurok az aktin N-terminálisáva kerül kölcsönhatásba (Várkuti és mtsai, 2012).

11.1 Egy új aktomiozin interakciós hely felfedezése

Habár a szerkezete és a funkciója nem ismert az aktin N-terminálisának, az biztos, hogy ennek az igen flexibilis, evolúciósan konzervált, negatívan töltött régiónak döntő jelentősége van a miozin *pre-powerstroke* (vagyis „fel" erőkar) állapotában történő aktomiozin komplex kialakításában. Annak érdekében, hogy feltárják a régiók interakcióját, létrehoztak egy új *in silico* aktomiozin szerkezeti modellt erős, ill. gyenge

aktinkötő állapotban, beleértve a miozin erőkar „fel”, és „le” állapotát is. (A továbbiakban sokat fogom használni az *fel* és *le* kifejezéseket, ugyanis az atomi szerkezet alapján az előbbi megfelel a *switch 2* zárt, míg az utóbbi, a nyitott konformációjának.)

Homológ aktin monomerek segítségével kiegészítették az aktin alegység hiányzó N-terminálisát (1-Asp-Glu-Asp-Glu-4), beleértve az acetil csoport is. Azt találták mind a három állapotban (rigor komplex, gyenge aktomiozin kötés az emelőkar *fel* ill. *le* állapotában), hogy az aktin negatív töltésű N-terminálisa sóhíd kötést alakít ki a miozin motor doménjében található Arg520-val, vagy a *Dictyostelium discoideum*-ban az ezzel homológ Lys528-as aminosavval. Ezek az aminosavak egy kicsi hurkon találhatóak a felső relé hélixen, amely maga az aktivációs hurok. Szekvencia összehasonlítások alapján, az 5-10 aminosav hosszú aktivációs hurok megtalálható az összes miozin izoformában. Ez a hurok mindig tartalmaz egy pozitívan töltött aminosavat az összes változatban, ugyanabban a pozícióban. Mivel ez a részlete a molekulának elfelé, vagyis az oldat felé irányul, valószínűtlen, hogy egy másik miozin lánccal kerüljön interakcióba. További elemzéseket folytattak a hurok szerepének vizsgálata érdekében, és azt találták, hogy az összes kinetikai perturbációt a hurok mutációja okozta, mely asszociálva van az aktin kötéssel. Ez további bizonyíték arra, hogy a miozin aktivációs hurok és az aktin közötti interakció létezik. Sőt, az a hurok specifikusan a miozin ATPáz ciklus aktin általi aktivációjáért felelős. Kinetikai, illetve *in vitro* mozgásképességi vizsgálatok azt is kimutatták, hogy az aktin általi aktivációt és a motilitást szét lehet választani. Ehhez, az interakciót kell megakadályozni az aktivációs hurok és az aktin N-terminálisa között. Ilyenkor kizárólag a kötési állandó nagysága, valamint az aktin koncentrációja határozza meg az effektív *powerstroke* gyakoriságát.

11.2 In vivo szerepe az aktivációs huroknak

A frissen felfedezett hurok *in vivo* szerepének vizsgálatához olyan transzgénikus *C. elegans* törzseket terveztek, melyeknek a testfalmiozin aktivációs hurkába mutációkat vittek be. A fonalférgekben négy különböző miozin-2 gén található, melyek közül csak kettő fejeződik ki a testfal izomban. A *myo-3* kódolja a minor izoformát, mely esszenciális a vastag filamentum kialakításához. A *myo-4*, azaz *unc-54* a testfal izmot alkotó fő proteint kódolja, mely a test mozgását váltja ki.

Azok a *C. elegans* törzsek, melyekben hibás az UNC-54 fehérje, szinte megbénultak, és a mozgásuk sebessége csupán a vadtípusú törzsek sebességének 20%-a.

A kísérletek során négyféle törzset hasonlítottak össze. Volt egy testfalmiozin *unc-54* null mutáns törzs (*Δunc-54*), valamint egy olyan törzs, melyben ezt a null mutációt helyreállították egy GFP-vel jelölt *unc-54* génnel (*Δunc-54;unc-54::gfp*). Ezek mellett, hogy teszteljék miként hat az izom funkcióra, és a féreg mozgására az aktivációs hurokban történő mutáció, létrehoztak egy konstrukciót (*Δunc-54;unc-54*$_{K525E}$*::gfp),* melyben kicserélték az 525-ik helyen található lizint glutaminsavra (mely homológ a *Dd* Arg520-val). Ezt a három mutáns törzset hasonlították össze a vadtípussal. A fő anatómiai tulajdonságok, például a testméret és a morfológia, valamint a vitális paraméterek, mint az élettartam és a lárvák fejlettsége mind hasonló volt az összes törzsben. Az *Δunc-54* férgekben viszont láthatóan satnya és szervezetlen volt a szarkomer szerkezete, mivel hiányzott a fő *myo-4* izoforma.

A férgek sebességét vizsgálva, azt találták, hogy az *Δunc-54;unc-54*$_{K525E}$*::gfp* férgek határozottan lassabbak voltak, mint a vadtípusú törzs férgei, de 2.2-szer olyan gyorsan mozogtak, mint az *Δunc-54* férgek. Tehát a különböző mérések segítségével világossá vált, hogy az aktin aktiváció blokkolása a miozin aktivációs hurok mutációjával csökkenti, de nem szünteti meg teljesen a férgek mozgását.

Egy új technikát, az atomerőmikroszkópot használva azt is megmérték, mekkora erőt képesek kifejteni az egyes *C.elegans* törzsek. Az átlag érték 20-szor nagyobb volt a vadtípusú és az *Δunc-54;unc-54::gfp* törzsekben, mint az *Δunc-54;unc-54*$_{K525E}$*::gfp,* illetve az *Δunc-54* törzsben. Azonban az aktivációs hurok mutáns férgek alig voltak erősebbek, mint azok, melyekből hiányzott az UNC-54 testfalmiozin. Az aktin aktiváció mutációs kimerülése drasztikusan gyengíti az izom kontrakciót, annak ellenére, hogy „terheletlen” motilis funkció megmarad.

11.3. Egy kis kitekintés további in vivo kísérletek felé

A fentebb leírt modell, miszerint a miozin ATP bontó képességét megnöveli az aktin negatív töltésű N-terminális régiója és a miozin aktivációs hurkának egy pozitív aminosava között kialakuló kapcsolat, kiválóan látható volt a transzgenikus *C.elegans* törzsekkel folytatott *in vivo* kísérletekben. A Szegedi Biológia Kutatóközpont (SZBK) tudományos tanácsadója és laborvezetője Dr. Mihály József a folyamat mélyrehatóbb kinetikai vizsgálata érdekében egy másik modellorganizmus, a *Drosophila melanogaster* alkalmazásával hasonló kísérletbe kezdett.

A céljuk az volt, hogy létrehozzanak mutációt tartalmazó aktin, illetve miozin géneket, hogy mutáns aktin/miozin fehérjéket expresszáló törzseket kapjanak. A mutációnak, olyan helyen kell érintenie a fehérjéket, mely a pozíciójukból adódóan részt vesznek az aktiváció folyamatában, így tehát, az aktin negatív töltésű N-terminálisában és a miozin egy pozitív töltésű lizinjében lokalizált. Az én munkám volt a mutációt tartalmazó aktin gének létrehozása.

Az első feladat az aktin negatív N-terminális farki régiójának semlegesítése volt. Az eredetileg Cys-Asp-Asp-Ala régiót mutáció segítségével tudtam semlegesíteni, és létrehoztam Cys-Asn-Asp-Asn és Cys-Asn-Asn-Asn aminosav szekvenciájú aktin N-terminálist. A megválaszolandó kérdések között ott szerepel az is, hogy vajon, milyen mértékben befolyásolja az aktivációt az aktin negatív töltése, illetve annak hiánya. Természetesen ez a kérdés érvényes a miozin aktivációs hurok pozitív töltésének szerepére is, azonban ennek a mutációnak a génbe való bevitelét az SZBK-ban végezték.

A semleges töltések mellett, pozitív töltéssel rendelkező aktin N-terminális konstrukciót is kellett készíteni. Hasonló módon és technikával Cys-Lys-Asn-Lys, és Cys-Lys-Lys-Lys aminosavakat tartalmazó enyhén, ill. teljesen pozitív szekvenciát alkottam. A kísérlet kezdetekor felmerült kérdések közül talán a legizgalmasabb, hogy vajon mi történik akkor, ha felcseréljük a két fehérje töltését? Vajon hasonló aktiváció megy végbe, ha a miozin aktivációs hurka a negatív töltésű, és az aktin N-terminális a pozitív? Lehet-e látni fenotípusos különbséget a vadtípusú, illetve a felcserélt töltéseket tartalmazó törzsek között? Esetleg, akárcsak a null mutáns törzsek ezek is röpképtelenek lesznek? Mivel a kísérletek még folynak Szegeden, így ezekre a kérdésekre sajnos nem tudok megfigyelésekkel alátámasztott válaszokkal szolgálni.

12. A powerstroke és a „return stroke”

K.C. Holmes egy cikkében (Holmes és mtsai, 2004) azt írja, nagyon úgy tűnik, hogy a *powerstroke* esszenciája a relé hélixben rejlik. Pontosabban, a hélixben található törés megléte, majd a relé hélix egyenesítése a meghatározó. Ez a folyamat, mely során a törés megjelenik, avagy éppen kiegyenesedik, a konverter domén egy 60°-os rotációjához vezet, ami pedig az erőkar forgására gyakorol hatást.

A relé hélixben jelen van a törés a *pre-powerstroke* állapotban, ellenben a poszt-rigor ill. rigor-szerű állapotokban a relé egyenes. Az ATP kötés a *pre-powerstroke*

állapotot kedveli, mivel ilyenkor a *switch 2* és a nukleotid γ-foszfát interakcióba kerülhet, mely segíti a *switch 2* záródását. Ráadásul ebben az állapotban a miozin, mint aktív ATPáz formában működik. A relé távolabbi végének a rotációjához vezet a közepénél található törés, amely pedig az aktin filamentum síkjában elforgatja a konverter domént kb. 60°-val. Ez valószínűleg a miozin fejnek a *powerstroke*-ból való visszatérése („*return stroke*"), azaz a feltöltése.

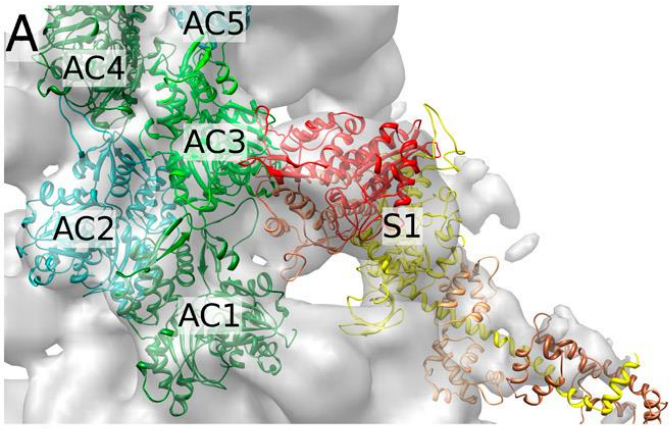
Azt a feltételezik, hogy a *pre-powerstroke* konformációban lévő miozin aktinhoz kötődése, a törés kiegyenesítése által visszafordítja ezt a folyamatot. Ez ugyanis, az erőkar ellentétes irányba történő 60°-os rotációjához vezet (*powerstroke*). A kényszer, amely hatására a törés megjelenik a relé hélixen, eltávolítható például a *switch 2* bezárásával. Mindazonáltal, a nukleotid-mentes miozin V szerkezete azt mutatja, hogy ez úgy is feloldható, hogy a *switch 2*-t közel zárt konformációban hagyjuk, és a β-lemezeket hajlítjuk meg. Tehát két mechanizmus is van a relé hélix kiegyenesítésére. A *switch 2* zárása úgy tűnik a *powerstroke*-ból való visszatérés, azaz a „return stroke" útvonala. Maga a *powerstroke* valószínűleg a *switch 2* észrevehető kinyílása nélkül zajlik, mivel az, zárva van a *pre-powerstroke* ill. a rigor-szerű állapotban is

13. Az aktomiozin határfelület

Az interakció pontos mechanizmusának a megértéséhez, ismernünk kell atomi részletességgel a miozin erős-kötési állapotának szerkezetét. A felső és alsó 50 kDa szubdomének elemei a flexibilis 2-es hurok tagjai, ami a két szubdomén között található az S1-ben. Ez a hurok az aktin-DNáz I kötő hurokkal együtt esszenciális részét képezik a határfelületnek. Továbbá megjegyzendő, hogy az S1-ben található 4-es hurok (364-380 as. szekvencia) és a kardiomiopátiás hurok (400-418 as. szekvencia) egymáshoz közel helyezkednek el, valamint a 3-as hurok (567-577 as. szekvencia) elmozdul az aktinkötő felület felé. Ezek sejtetését, az akto-S1 komplex MDFF módszer finomítása meg is erősítette, nevezetesen, hogy az interakció nemcsak egy aktin monomerrel történik. A **11. ábrán** is látható, hogy a nagyobb határfelület az S1 és az AC3 között van, de az S1 és AC1 is kölcsönhatásban áll egymással, mely megnöveli az érintkezési felületet, ezáltal talán stabilizálva az erős kötést (Holmes és mtsai, 2004; Lorenz és Holmes, 2010).

13.1 Az S1 és AC3 közötti kölcsönhatás

A stabil érintkezési felület a S1 és az AC3 között kb. 1,385 Å, mely számos, potenciális elektrosztatikus interakciót és H-kötést jelez. A jelentősebb érintkezési felületet a miozin alsó 50 kDa szubdoménje biztosítja, nevezetesen, az interakció a szubdomén 499-532-es aminosav szakasza és az aktin 337-351, valamint 140-149 közötti hélix között valósul meg. Az aktin aminosavak melyeknek szerepe van az kölcsönhatásban; Leu140, Tyr143, Ile341, Ile345, Leu349, Phe352 és feltehetőleg a Phe375. A miozin V aminosavai, melyek részt vesznek; Lys502, Met503, Glu511, Lys514, Met515, Pro516.



11. Ábra

Aktin-S1 komplex szerkezete. Az F-aktin öt alegysége (AC1-AC5) zöld színekkel van ábrázolva, míg a miozin felső és alsó 50 kDa szubdoménje pirossal, valamint narancssárgával van jelölve. A miozin többi része, a konverter és az erőkar is sárga színű, míg a könnyűláncok barna színűek. A két aktin monomer, amellyel kölcsönhatásban áll a miozinm, az AC3 és az AC1 (Lorenz és Holmes, 2010).

A kardiomiopátiás hurok az aktin Pro333-Tyr337 közötti aminosav szakaszával, valamint az Ala26-Ala29-es résszel áll interakcióban. A miozin V osztályban a kardiomiopátiás hurok megfelelő irányultságban fekszik, így nem kell jelentősen átrendeződnie az interakció során, sőt az is lehetséges, hogy a 4-es hurok (ami a miozin V-ben a 342-349-ig található aminosav szakasz) átrendeződik, és ennek a kötőhelynek a részévé válik. Mind a két kötőhely ugyanazon az aktin monomeren fekszik. Ellenben a miozin V 3-as hurok régiója (540-544 as.) úgy tűnik, gyenge szekunder kapcsolatot alakít ki a szomszédos aktin monomerrel. Megjegyzendő az is, hogy a 2-es hurok alapvető aminosavakat tartalmazó N-terminális vége, közel található az aktin szubdomén-1 savas aminosavaihoz (1-4, 24-25 as.). Ugyan a rendezetlen 2-es hurok jelentősen hozzájárul az aktinnal való interakcióhoz, még nem világos, mennyire specifikus, illetve mennyire kritikusak ezek az interakciók a rigor határfelület kialakításában.

Több hidrofób interakció is történik a két fehérje kölcsönhatása során, a kardiomiopátiás hurok a Glu411 aminosavon keresztül közvetlen elektrosztatikus kölcsönhatásban van az aktin 336-os lizinjével. Igen kritikus 405-ös arginin glutaminná mutálódása (az emberben ezt a 403-as argininnel azonosították), mely a familiáris

hipertrófiás kardiomiopátiában az aktin aktiválta miozin ATPáz csökkenését eredményezi. Ez az aminosav ugyan nem a határfelületen található, elfordul az aktintól, mindazonáltal valószínűleg sóhidat képez a Glu631 aminosavval, amely a 2-es hurok része. Éppen ezért, hatással van az aktin-miozin asszociációra, talán a 2-es hurok konformációjának stabilizálásán keresztül (Holmes és mtsai, 2004; Lorenz és Holmes, 2010).

A kutatók egy új H-kötésről is beszámoltak a S1 Asn410 és az aktin (AC3) Tyr337 között, sőt egy esetleges kapcsolatot is találtak a 4-es hurok és az aktin között, mely a C-hurok nevet kapta. A HMM három régiójába mutációt vittek (ez a hidrofób régió, kardiomiopátiás hurok, és 2-es hurok területeit érintette), és mindegyiknél szignifikánsan csökkent vagy akár teljesen megszűnt az aktin aktiválta miozin ATPáz működés. Az összes akto-S1 érintkező felületén található mutációt megtalálták, mely lehetséges kapcsolatot létesít az aktin aminosavaival (**2. táblázat**).

2.Táblázat

A lehetséges elektrosztatikus interakciók és H kötések a miozin S1 és az AC3, valamint AC1 aktin monomer között (Lorenz és Holmes, 2010).

Lehetsége elektrosztatikus interakciók		Lehetséges H kötések	
AC3 – S1	AC1 – S1	AC3 – S1	AC1 – S1
ASP24 – GLU629	LYS50 – GLU576	GLY23 N – LYS637 O	LYS50 NZ – ASN552 OD1
ASP25 – LYS640	ARG95 – GLU576	ASP24 N – GLY635 O	ARG95 NE – PRO570 O
ARG28 – GLU629	GLU99 – LYS569	LYS328 NZ – ARG371 O	ARG95 NH1 – ALA575 O
ARG147 – GLU373		TYR337 OH – ASN410 OD1	ARG95 NH2 – LYS572 O
GLU167 – LYS544		SER348 OG – LYS637 O	GLY46 O – LYS553 NZ
ASP311 – ARG371		THR351 N – PRO529 O	GLY48 O – LYS553 N
LYS328 – GLU372		THR351 OG1 – PRO529 O	GLN49 OE1 – SER549 OG
GLU334 – LYS642		GLY23 O – GLY638 N	TYR91 O – ALA571 N
ARG335 – GLU372		ARG28 O – ASN410 ND2	
LYS336 – GLU411		SER145 O – GLY643 N	
		GLU167 O – LYS544 NZ	
		GLN314 OE1 – ARG371 NH1	
		ILE329 O – ARG371 NH2	
		GLU334 O – LYS642 NZ	

13.2 A S1 és AC1 közötti kapcsolat

A szubfragmens-1 jelentős kapcsolatot létesít az AC3 mellett az AC1 aktin monomerrel is. Ronald Milligan vetette fel az interakció lehetőségét a 3-as hurok (567-577 as.) és az aktin között. Több kísérlet és kinetikai tanulmány is támogatta azt az elképzelést, miszerint a határfelület területen van egy luk, és alatta egy ún. miozin „ujj” kerül interakcióba az aktinnal. Erre az attribútumra „milligan összeköttetésként” szoktak hivatkozni.

Ugyanezekben a cikkekben (Holmes és mtsai, 2004; Lorenz és Holmes, 2010) leírtak más lehetséges AC1 és a S1 közötti H kötést is. Az egyik a miozin 543-554 aminosav szakasz és az aktin DNáz I kötő hurok között van, míg a másik a3-as hurok,

illetve a Tyr91 és Arg35 között található. Mindazonáltal, a jelentős kapcsolatot a Milligan összeköttetés adja a Glu576 és az aktin Arg91 (AC1), valamint a Lys569 és a Glu99 (AC1) között.

14. A kontrakció kinetikájának vázlata

A parallel útvonalakon zajló biokémiai reakcióknál, bizonyos feltételek között ki kell választani egyet a hatékony biológiai funkció érdekében. Elméletileg az útvonal szelekció lehet termodinamikai vagy kinetikai. A termodinamikai útvonal szelekcióról akkor beszélhetünk, amikor a rendszer a legkisebb szabad energia útját követi. Kinetikai útvonal szelekció kizárólag nem-egyensúlyi helyzetekben történhet, mikor akadályozva van a legkisebb szabad energia útján keresztüli áramlás, így a rendszer kénytelen egy magasabb szabad energiájú, alternatív útvonalat használni. Ez a szelekció a biokémiai rendszerek által gyakran használt „kapcsoló" mechanizmus, ahol a reakciókat a hasztalan útvonal helyett, az effektív felé vezetik. Az aktomiozin interakció során éppen ez a szelekció a magyarázat, melyet A. Málnási-Csizmadia és M. Kovács cikke (Málnási-Csizmadia és Kovács, 2010) alapján ebben a fejezetben összefoglalok.

14.1 A haszontalan erőkarcsapás kinetikai gátlása

A miozin ATP kötése után, egy gyors konformációs egyensúly alakul ki a *le* és az *fel* állapotok között, melyek az atomi szerkezetük alapján a már említett *switch 2* zárt, ill. nyitott konformációjának felelnek meg. Ezt ATP hidrolízis követi (**12. ábra**), melyre a miozin kizárólag *fel* állapotban képes. Így mind a ciklus, mind a miozin feje „feltöltött" állapotba kerül. Aktin hiányában a ciklus sebesség meghatározó lépése a *fel*-ből a *le* állapotba történő hasztalan karlecsapás. Ez a miozin-ADP-P_i komplexben zajlik, és nem a P_i felszabadulás után, mint ahogy korábban gondolták. A P_i távozása csak *le* állapotban lehetséges, és a termék szabadon bocsátása több nagyságrenddel gyorsabb, mint a sebességet meghatározó *fel-le* szerkezeti átalakulás.

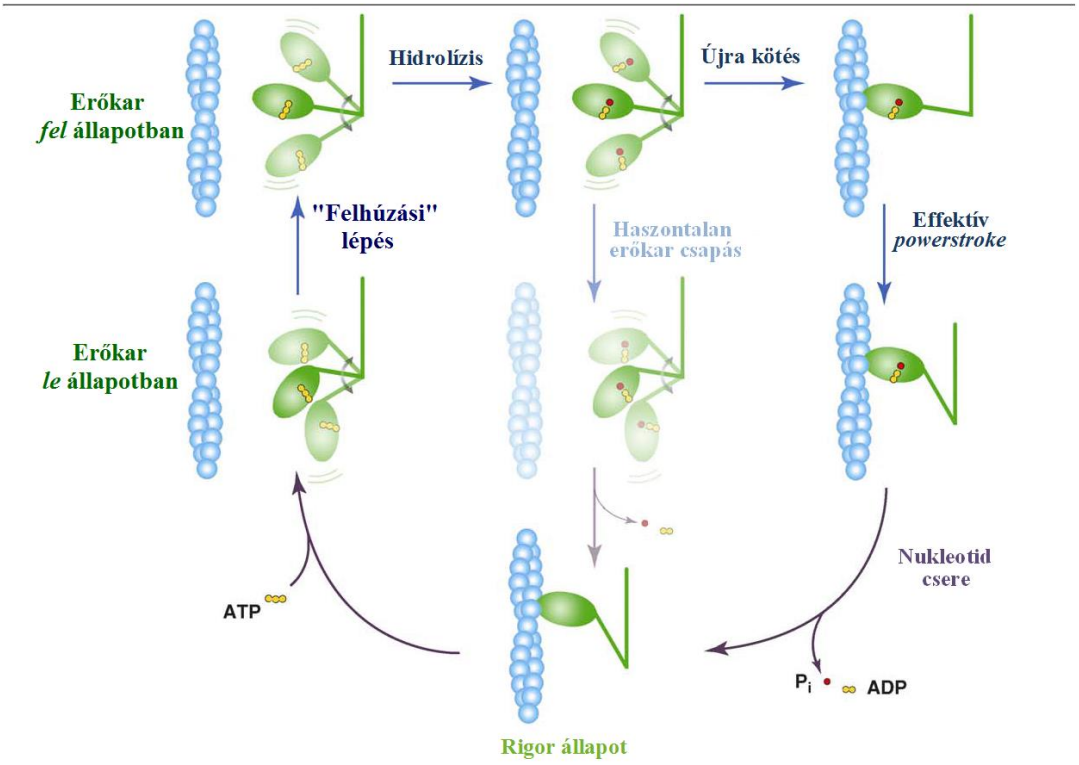
Az ATP és az ADP-P_i állapotok közti erőkar lengése, valamint a *switch 2* konformációs változása kapcsolva van. Ez a motor domén hosszú relé hélixének libikóka-szerű mozgásával jár. A relé hélix közepén egy fenilalanin csoport egyfajta alátámasztást formál, valószínűleg a billenés itt történik. Ez a csoport szerkezetileg a relé/konverter és a transzducer[10] régióval áll kapcsolatban. Az utóbbi szerkezeti elem fontos szerepet tölt be a

[10] A miozin S1-ben található 7 szálas β-lemez a kapcsolódó hurkokkal.

kar lengésében. A változás a transzducer β-lemez torziós törzsében talán hozzájárul a szabadentalpia változással zajló *powerstroke*-hoz. Ez a modell azt is magában foglalja, hogy a nem aktin-kötött állapotban az erőkar lengésének konformációs útvonala különbözik attól, amely a *powerstroke* alatt történik. A haszontalan erőkar lengés a „feltöltési lépés" fordítottja, azzal a nagy különbséggel, hogy az előbbi ADP-P_i kötött, míg az utóbbi az ATP kötött miozinban zajlik. Attól függetlenül, hogy még nem teljesen egyértelmű az, hogy miért lassabb négy nagyságrenddel a haszontalan erőkar lengése, mint a feltöltési lépés, ez a kinetikus különbség, döntő jelentőségű a hatékony erőgeneráláshoz.

14.2 Az aktin aktiválás és a powerstroke

Az aktin legalább két nagyságrenddel felgyorsítja az ADP-P_i-kötött miozin erőkar lengését. Ez elég nagy kontrasztot mutat a feltöltési lépés aktinkötött formájához képest,



12. Ábra

Az aktomiozin motor mechanokémiai ciklusa. A miozin fej és az aktin filamentum zölddel, ill. kékkel van jelölve. A hasznos munka ciklus alatt, az erősen kötött aktomiozin rigor komplexet ATP kötés választja szét (alul középen). A felhúzási lépés alatt, mely ATP- miozin kötött formában történik, a miozin erőkar a *le* állapotból *fel* pozícióba mozdul (bal szélső). A post-hidrolitikus, *fel* erőkar állapotú komplexből (felül középen) kétfelé folytatódhat a ciklus. Ha az erőkar visszaleng, amíg nem kötődik aktinhoz, akkor haszontalan ciklus lesz végeredmény, mivel elhasznált egy ATP-t tényleges erőgenerálás nélkül (középen). Az effektív *powerstroke* során az erőkar mozgása akkor történik, mikor a miozin újra kötődik az aktinhoz. Miután az erőkar lecsapása befejeződött, a hidrolízis termékei kicserélődnek egy új ATP molekulára (Málnási-Csizmadia és Kovács, 2010).

ahol csupán csekély a hatása az aktinnak. Ebből kifolyólag az aktin aktivációnak meghatározó szerepe van a rendszer effektív (azaz aktinkötött) *powerstroke*-on keresztül zajló irányításában, még akkor is, ha kezdetben alacsony aktin affinitású (ADP-P_i) állapotban volt. A reakció áramlása elsősorban az aktinkötött állapotban történő erőkarcsapás felé van terelve, a kinetikus útvonal szelekción keresztül. Mivel a nem aktinkötött állapotban zajló haszontalan ciklus kinetikailag blokkolva van, az uralkodó reakcióáramlás az aktinkötött állapot felé terelődik, annak ellenére, hogy az útvonal termodinamikailag kevésbé kedvező a már említett miozin-ADP-P_i komplex alacsony aktin affinitása miatt.

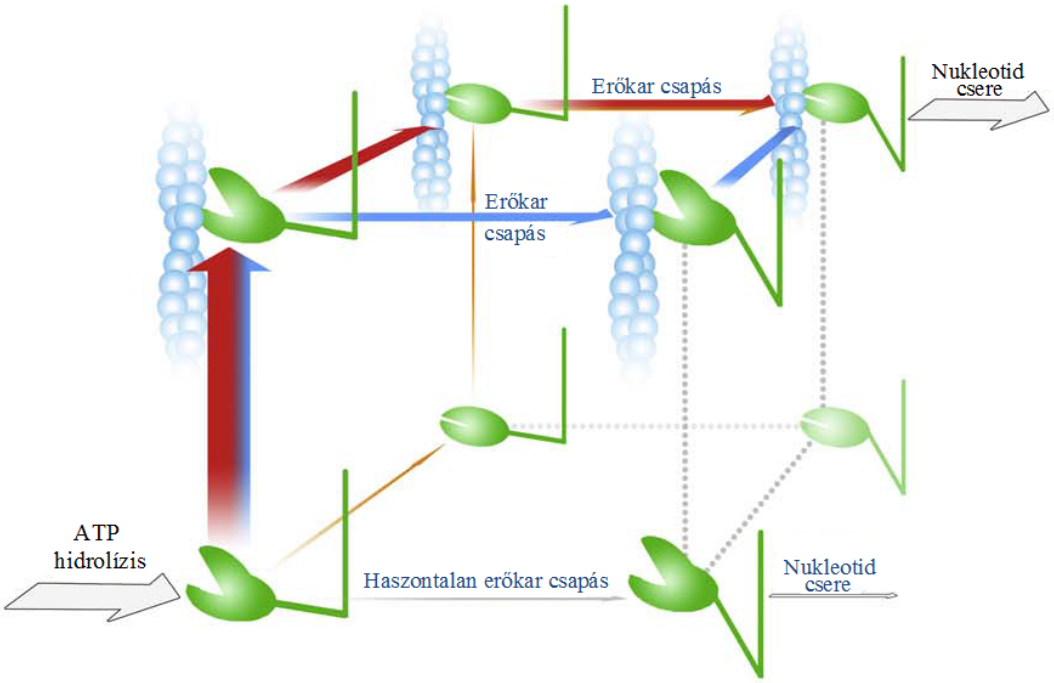
14.3. A három effektív útvonal

Hatásos mechanikai lépés csak akkor zajlik, ha az erőkar lengése, akkor történik mikor a miozin fej az aktinhoz kötött. Mindamellett, számos útvonal van, melyek képesek hatékony *powerstroke*-ot produkálni. Ennek három kulcs eseménye; az aktin kötése, szerkezeti változás során az erős aktin kötés (összekapcsolva az árok záródásával), és az erőkar lecsapódása. A folyamat gyenge aktinkötő (nyitott árokkal), *fel* miozin állapotból indul, míg a végén egy erős aktinkötött (zárt árokkal), *le* erőkar helyzetben végződik. Számos eredmény azt mutatja, hogy az erőgenerálása (így a fő erőkar lengés) a P_i felszabadulás előtt történik, így az összes részlépés akkor zajlik, mikor a miozin fej ADP-P_i komplexben van. A powerstroke eseményt a nukleotid csere követi, mely gyakorlatilag irreverzibilis a következő ATP molekula szoros kötésének köszönhetően, így az a következő mechanokémiai ciklus felé húzza a rendszert.

A három lehetséges effektív útvonal közül mindegyiknél meg kell előznie az aktinkötésnek az erőkar lecsapódását. A döntő szerepe az aktin aktivációnak, hogy megakadályozza a haszontalan ciklus felé történő áramlást, feltéve, ha a sebességi állandója az utóbbinak legalább 100-szor alacsonyabb, mint annak az erőkar lengésnek, amelynél a miozin aktinkötött formában van.

Az hatékony *powerstroke* felé vezető útvonalak közül az egyik az aktinkötő árok záródásával kezdődik. Ez alatt a lépés alatt erős aktinkötő állapotban kerül a miozin fej, mely így ezután az aktinhoz tud kötődni, és elvégzi az erőkar lengését (**13. ábrán** a narancssárga nyíl). Mindazonáltal az áramlás ezen az útvonalon keresztül elég csekély, mivel az első lépés igen kedvezőtlen, ugyanis az árok nyitott-zárt átmenete a nem aktinkötött miozin komplexben történik.

A másik két effektív powerstroke felé vezető útvonal, aktinhoz való kötődéssel kezdődik, mely így gyengén csatolt, *fe* állapotú aktomiozin komplexhez vezet. Ebből az állapotból a két út elválik. Az egyik gyors árok záródással folytatódik, melyet pedig az erőkar lecsapódása követ (**13. ábrán** a piros nyíl). A hármadik útvonal során, az erőkar lengése megtörténhet, míg a miozin fej gyengén köt az aktinhoz (**13. ábrán** kék nyíl). Az aktomiozin interakció utólagos megerősítése a *poszt-powerstroke* intermedier stabilizálásában játszik szerepet, feltéve, hogy az árok gyorsabban záródik, mint ahogy az aktin leválik. A rendelkezésre álló kinetikai és termodinamikai adatok alapján, az utóbbi két útvonal jelentős áramlást képes közvetíteni. Így a hatásos *powerstroke* valószínű párhuzamos reakciós utakon halad keresztül.



13. Ábra

Powerstroke útvonalak. Az ATP hidrolízist követően a miozin fej gyenge aktinkötő, *fel* erőkar állapotban van (bal, alsó sarok). Három lehetséges útvonal vezet hatásos *powerstroke*-hoz, melyek narancssárga, piros és kék nyilakkal vannak feltüntetve. A narancssárga útvonalnál a három kulcs esemény sorrendje a következő: az árok záródása, aktin kötés, majd az erőkar lecsapása. A két másik útvonalnál az első lépés az aktin kötés, melyet a piros útvonalnál az árok záródása, majd az erőkar lecsapása követ. A kék nyíllal jelölt útvonalnál viszont az erőkar mozgása nyitott árokkal történik (azaz gyenge aktinkötő állapotban), melyet a hasíték záródása stabilizál. A haszontalan ciklus felé vezető erőkar mozgását a szürke nyíl szemlélteti (Málnási-Csizmadia és Kovács, 2010).

A motorfehérjék mutációja és a hipertrófiás kardiomiopátia

15. A motorfehérjék hatékonysága

A fentebb található *A miozin motorfehérje* c. fejezetben már szó volt a miozin szupercsalád rendkívüli alkalmazkodó képességéről. Azért rendkívüli, mert az igen különböző feladatokra evolválódott osztályok, ezeket a változatos funkciókat annak ellenére tökéletesen ellátják, hogy az alapfelépítésük megegyezik. Például, ha megnézzünk egy vezikulumot szállító és egy kontrakcióban résztvevő miozint, rögtön szembetűnik, hogy teljesen más sajátossággal kell rendelkezniük, hogy hatékonyan ellássák a feladatukat. Maguknak a fehérjéknek a hatékonysága röviden abban rejlik, hogy a vastag filamentumba szerveződő miozin-II (MYOII) fejek terhelési aránya más, mint az aktin mínusz vége felé lépegető miozin-VI-nak.

A MYOII alacsony terhelési aránnyal rendelkezik. Mivel a vastag filamentum mentén sok fej található, az a célravezető, ha ezek csak rövid ideig vannak aktinkötött állapotban, hogy ne gátolják egymást. Ha sok fej kötődne a vékony filamentumhoz, vagyis sok miozinkötő hely lenne foglalt, a többi motordomén nem tudna hova kötődni és nem tudna kontrakciót eredményező erőkar lecsapást végezni. Éppen ezért, ennek a miozin izoformának a sebesség meghatározó lépése maga a fej erőgeneráló lecsapása, azaz a *powerstroke*.

Ezzel szemben, ha a miozin-V vagy miozin-VI motorok alacsony TA-osok lennének, nem lennének képesek hatékonyan ellátni a feladatukat. Ezek a lépegető szállító miozinok két motor doménnel rendelkeznek, éppen azért, hogy az egyik mindig aktinkötött állapotban legyen, ezzel megakadályozva a „sínről” való disszociációt, valamint, a szállított vezikulum elvesztését. Ebből következik, hogy az ilyen típusú miozinoknak magas TA-val célszerű rendelkezniük, mert ez biztosítja ezeknek a processzív motoroknak, hogy valamelyik fej mindenképp aktinkötött állapotban legyen, és így nagy távolságot tudjanak megtenni az aktin filamentum mentén.

16. Hipertrófiás kardiomiopátia kezelésének nehézségei

Láthatjuk tehát, hogy rendkívül összetett folyamatok állnak a motorfehérjék működésének hátterében. Ennek következtében, ha bármiféle probléma merül fel a fehérjék interakciójában, annak súlyos következményei lesznek az emberi szervezet

számára. Naponta több ezer mutáció történik a sejtjeinkben, például a fehérje expresszió során, melyek nagy részét, különböző javító molekulák detektálnak, és helyre hoznak. Azonban előfordulnak olyanok is, melyek átjutnak ezeken a védelmi rendszereken. Lehetséges, hogy nem okoznak semmilyen betegséget, de az is előfordul, hogy komoly kóros állapotot indukálnak. Ebben a fejezetben a szívizomban előforduló mutáció által indukált betegségről lesz szó.

Az emlősök szívében két miozin izoforma expresszálódik, az α- és β- kardiális miozin. Az előző fejezet alapján nem meglepő, hogy a szívizomban alacsony terhelési aránnyal rendelkező fehérjék találhatóak. Ezek relatív aránya változik fajok, fejlettség, és hormonális állapot szerint. Az egészséges emberi szív 10%-ban α-kardiális miozinból, valamint 90%-ban β-kardiális miozinból áll, és annak ellenére, hogy ezek aminosav szinten 93%-ban megegyeznek, funkcionálisan távol állnak egymástól. Tanulmányok azt is kimutatták, hogy a két kardiális izoformát különböző arányban tartalmazó szívek különböző kontrakciós sebességgel rendelkeznek, vagyis a kifejeződésük relatív szintje közvetlenül szabályozza az izom összehúzódását.

Kardiomiopátia (CMP) azoknak a szívbetegségeknek az összefoglaló neve, melyek a szív pumpafunkciójának gyengüléséhez vezetnek, és ez visszavezethető az izom saját betegségére. A hipertrófiás kardiomiopátia (HCM) a leggyakoribb örökölt kardiovaszkuláris betegség. Világszerte a HCM minden ötszáz emberből egyet érint, és megnyilvánulhat csökkent életminőségtől kezdve akár korai, hirtelen szívmegállásban is. A hipertrófiás kardiomiopátiát (azaz a szívkamra megnagyobbodást) eredményező pontmutációk 30%-a a *MYH7*-ban lokalizált, amely a humán β-kardiális miozin nehézláncát kódoló gén (β-MyHC). Ennek a betegségnek a klinikai fenotípusa tehát különféle lehet, de tipikus morfológiai elváltozás a balkamra hipertrófiája. Ez a hipertrófia a szarkomer kontraktilis fehérjéinek helytelen funkciójából származik. Annak ellenére, hogy a kardiomiopátia genetikai alapjait már értjük, jelenleg specifikus gyógyszeres kezelés nem létezik, amely mérsékelné a szarkomer funkcionális zavarának forrását, nevezetesen, nincs olyan orvosság, mely helyreállítaná maguknak a szarkomer proteineknek a működését. A fő pillérei a gyógyszeres terápiának a béta-, és kalciumcsatorna blokkolók, valamint a dizopiramid.

Terápiás szempontból, ha megcélozzuk az *upstream*[11] elemét a potenciális jelátviteli útvonalnak, mely az izom szarkomer funkciójáért felelős, ugyan elnyomhatja a miokardiális hipertrófiát, de nem foglalkozik a kontraktilis apparátus mögöttes kóros működésével. A probléma egyik megoldása az lenne, ha kismolekula kezelésekkel közvetlenül megcéloznánk a kontraktilis apparátust. A Cytokinetics Inc által kifejlesztett potenciális szívbénulás elleni gyógyszer, mely a specifikusan köt a β-kardiális miozinhoz, és aktiválja annak erőgenerálás képességét, erre tökéletes példa.

Visszaveti a hatásos kezelések kifejlesztését, hogy a HCM mutáns proteinek ugyan a szarkomer részei, de rendkívül változatos funkciókat láthatnak el. Többek között rendelkezhetnek enzimatikus, erőgeneráló szerepekkel (pl.: β-MyHC és az asszociált LC-k), valamint szerkezeti és regulációs funkciókat is elláthatnak (pl.: tropomiozin, troponin és a miozinkötő protein C). Szintén nehezíti a kezelést, hogy egy pontmutáció hatását a β-kardiális miozin erőgenerálására, illetve kinetikájára, nem lehet megjósolni közvetlenül a fehérjén belüli elhelyezkedéséből. Klinikai szempontból azokat a mutációkat, melyek csökkentik a kontraktilis erőt, másképp kell kezelni, mint azokat, melyek növelik azt. Mindenesetben tudnunk kell, hogy a kettő közül, mely nagy kategóriába sorolható a mutáció, mivel ez teszi lehetővé a célzott kezelést. Azokat a fontos információkat, melyek szükségesek a legjobb terápiás módszer kiválasztásához, az egymolekula, valamint egysejt módszerek kombinálása biztosítja. Ezeket a technikákat rendkívül jól összefoglalja egy pár éve megjelent cikk (Sivaramakrishnan és mtsai, 2009), melyek közül néhányat alábbiakban kiemelek.

Az *in vitro* motilitás teszt erőssége abban rejlik, hogy egyszerű kísérleti felszerelés és kis mennyiségű (<1 μg) tisztított fehérje kell hozzá. Kitűnő első szűrő a pontmutáció hatásának azonosításához, de ezt a motor funkciók tanulmányozásához használni, terhelés hiányában a legalkalmasabb.

A *steady-state* ATPáz mérések nagyobb mennyiségű (~1 mg) fehérjét igényelnek. Ez a *stop flow* kinetikai mérésekkel együtt széles körben használt technika. Ezzel elemezik az egyes lépések kinetikáját, melyek az aktomiozin kinetikus ciklusa folyamán játszódnak le. Előnye ennek a jól megalapozott vizsgálatnak, hogy az ATP ciklus idejére és a látszólagos aktin, illetve ATP affinitásra kifejtett hatását jellemzi a mutációnak.

[11] Az útvonalban elöl található elem. Egy biokémiai útvonalban fenotípusosan megnyilvánuló mutáció *upstream* helyezkedik el, hiszen az itt található tud csak hatni a többire, mert a kifejeződés az útvonalon *downstream* halad.

Az optikai csipesz fontossága abban rejlik, hogy közvetlenül meg tudja mérni a miozin funkcióját érintő mechanikai terhelés, valamint a miozin erőgenerálását befolyásoló mutáció hatását is. Hátránya, hogy igen kifinomult műszerek szükségesek a kétsugaras optikai csapdához és a felszereléshez. Megjegyzendő, hogy ezzel a technikával mutatták, ki azt is, hogy az α-kardiális miozin, a β- izoforma által kifejtett erőnek csupán felét képes produkálni.

Az egysejt módszerek használatának jelentősége abban rejlik, hogy molekuláris szintű eredményeket értelmezni tudjuk az izom *in vivo* funkciójának szintjén is. Ma már akár egyetlen szívizomsejt által előidézett kontraktilis erőt is meg tudunk mérni. A *single cell dynamic force-length measurement* (egyedi sejt dinamikus erő-és hossz mérése) során, a mutáció egyetlen szívizomsejtre kifejtett hatását lehet vizsgálni. Ráadásul szarkomer szinten a pontmutációk hatása is igen jól jellemezhető ezzel a technikával. Azonban, ehhez a vizsgálathoz is kifinomult műszerek szükségesek, és mivel a sejt előkészítése kényes, így a reprodukálható mérés érdekében műszakilag hozzáértő egyént igényelnek.

Amennyiben elég fiatal korban képesek lennénk az erőgenerálást optimalizálni, ezeknek a pont mutációknak a *downstream* pleiotróp hatása[12], melyek hipertrófiához és halálhoz vezetnek, enyhíthető lenne. A minél pontosabb ismerete az aktomiozin kemomechanikai ciklus egyes lépéseiben fellépő változásoknak, melyeket a mutációk okoznak, kulcs fontosságú a potenciális gyógyszerjelöltek specificitásában. Például, ha a mutáció fokozza az ADP távozást, az a TA csökkenéséhez vezet, és ezért fogyni fog az átlagos száma az aktinkötött állapotban lévő miozin fejeknek minden egyes kontrakció alatt, mely végül a szarkomer erőgenerálásnak csökkenéséhez vezet. Más részről, ha a mutáció a P_i távozását serkenti, növeli a TA-t, és ezáltal fokozza a szarkomer általi erőgenerálást. A hatóanyagok szűrése annak érdekében, hogy minél pontosabban visszaállítsák a mutációk miatt megváltozott kinetikai lépéseket, remélhetőleg hamarosan elérik a kívánt terápiás hatást.

[12] Mivel gének többségének van másodlagos, illetve járulékos hatása, így több tulajdonság, fenotípus kialakításában játszanak szerepet, és ezt a jelenséget nevezik pleiotrópiának.

Összefoglalás

Az izomszövet kutatása már az 19. században elkezdődött, és a 20. század második felében a kezdetleges eszközöket felváltották a korszerűsített mikroszkópos technikák. A fehérjék kristályosítása felfedte a miozin enzimatikus ciklusa alatt zajló aktomiozin molekuláris konformáció változásait. Az izom kontrakció felderítésében több magyar kutatónak, mint Szent-Györgyi Albertnek, Bíró Endrének és Bálint Miklósnak is nagy szerepe volt.

Az aktomiozin interakció számos részletére fény derült az alapos szerkezeti és kinetikai vizsgálatok során. Nagyszerű meglátás volt a kontrakció azon kritériuma, hogy az erőgenerálásához szükséges miozin erőkar lecsapásnak akkor kell történnie, mikor a miozin aktinhoz kötött állapotban van. Azonban vannak nem teljesen tisztázott folyamatok is az aktomiozin kemomechanikai ciklusban, mint például az ATP hidrolíziséből származó foszfát felszabadulásának útvonala a nukleotidkötő helyről.

Az eddig ismert összes miozin izoforma meglehetősen konzervatív ATPáz ciklussal rendelkezik, csupán oly sajátos módosítások figyelhetőek meg, melyek lehetővé teszik a különböző funkciók ellátását. A ciklus intermediereit az aktin affinitásuk szerint határozzák meg. Attól függően, hogy egy miozin izoforma mennyi időt tölt alacsony, illetve magas aktin affinitású állapotban, a motorfehérjét alacsony vagy magas terhelési aránnyal (*duty ratio*) jellemezhetjük. Ez a paraméter fontos mechanikai különbségeket, és funkcionális sokszínűséget biztosít ezen fehérje családnak, amely így alkalmas rendkívül változatos feladatok hatékony elvégzésére.

Annak ellenére, hogy a miozin régóta tanulmányozott motorfehérje, nem ismerjük az aktinnal való interakciójának számos alapvető részletét. Többek között nem tudjuk, hogy az aktin aktiváció molekuláris hátterében mi zajlik, pedig ez a miozin enzimatikus ciklusnak alapvető molekuláris mechanizmusa. Minél részletesebben ismerjük a ciklus egyes lépéseit, annál több kérdés merül fel a miozin szerkezetváltozásával, illetve ennek a változásnak a hátterében álló molekuláris mechanizmusokkal kapcsolatban. Ha tisztában lennénk az egyes mutációknak a kontrakcióra kifejtett hatásával, akkor az izomszövet betegségeit, illetve kóros elváltozásait célzott módon lehetne kezelni. Mindemellett, ha elég fiatal korban optimalizálni tudnánk a hibás fehérje erőgenerálását, a szervezetet érintő káros hatása a mutációknak enyhíthető lenne.

Summary

Research on muscle contraction has already started in the 19th century. At the second half of the 20th century the rudimentary tools were replaced by advanced microscopic techniques. By the crystallization of the proteins, actin myosin molecular conformational changes that occur during the enzymatic cycle of myosin could be revealed. There were several Hungarian researchers, like Albert Szent-Györgyi, Endre Bíró and Miklós Bálint who had crucial roles in the muscle discoveries.

Several substeps of muscle contraction were revealed by the detailed investigation of actomyosin interaction by structural and kinetic techniques. An important finding was that the criterion of muscle contraction is that the swing of the myosin lever arm has to occur during actin attached state, which leads to powerstroke. Additionally, there are some unrevealed processes within the actomyosin chemomechanical cycle, for example the pathway of the phosphate release from the nucleotide-binding pocket that follows the hydrolysis.

The actomyosin ATPase cycle appears to be conserved for all myosin isoforms, with specific modifications that serve the different functional adaption of the isoforms. The intermediates of the actomyosin cycle are defined by weak-or strong actin-binding states, according to their affinities for actin. Depending on how much time a myosin isoform spends at low or high actin affinity states throughout the cycle, the isoform is characterized as a low-duty-ratio or high-duty-ratio myosin, respectively. This parameter is defines the mechanical differences and functional diversity of myosin isoforms to perform effectively in a wide variety of tasks.

Myosins have long been studied, yet we do not know important details of their interactions with actin. For example we have no knowledge of the molecular background of actin activation, which is the most fundamental aspect of myosin's enzymatic cycle. Despite revealing more and more substeps of the cycle, more and more questions arise about the structural changes in myosin and the molecular mechanism behind these changes. If we were aware of the effects of each mutation that occur in myosin altering its mechanical performance, the diseases of the muscle tissue or pathological deformations could be treated in a targeted manner. Nevertheless, if we were able to optimize the force producing capability of defective motor proteins at a young enough age, the harmful effects on the body caused by mutations, could be alleviated.

Irodalomjegyzék

1. Bailey, K., (1948) : Tropomyosin: a New Asymmetric Protein Component of the Muscle Fibril. Biochemical Laboratory, University of Cambridge, Vol. **43**, 271-279.
2. Cecchini, M., Alexeev, Y., Karplus, M., (2010): Pi Release From Myosin: A Simulation Analysis of Possible Pathways.NIH-PA Author Manuscript, **18(4)**: 458-470.
3. De La Cruz, E.M., Ostap, E.M., (2004): Relating biochemstry and function in the myosin superfamily. Curr. Opin. Cell Biol. **16**, 61-67.
4. F. Matsumoto et al., Conformational Changes of Troponin C within the Thin Filaments Detected by Neutron Scattering, J. Mol. Biol., 342 (4), 1209 (2004).
5. Holmes, K.C., Angert, I., Kull, F. J., Jahn, W., Schröder, R.R., (2003): Electron cryo-mycroscopy shows how strong binding of myosin to actin releases nucleotid. Nature, Vol **425**,423-427 .
6. Holmes, K.C., Geeves, M. A., (1999): Structural mechanism of muscle contraction. Annu. Rev. Biochem. **68**: 687-728.
7. Holmes, K.C., Schröder, R.R., Sweeney, H.L., Houdusse, A.,(2004): The structure of the rigor complex and its implications for the power stroke. Phil. Trans. R. Soc. B **359**, 1819-1828.
8. Huxley, H.E., (1973): Structural Changes in the Actin- and Myosin-containing Filaments during Contraction. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. **37**, 361-376 .
9. Kabsch, W., Mannherz, H.G., Suck, D., Pai, E.F., Holmes, K.C.,(1990): Atomic structure of the actin: DNase I complex. Nature Vol. **347**, 37-44 .
10. Kovács J., (2009): Molekuláris motorok-sejtváz motorfehérjéi, In: Szabó G. (szerk.) *Sejtbiológia* 2. kiadás, Budapest, Medicina Könyvkiadó, (280-286)
11. Kron, S.J., Spudich, J.A. (1986): Fluorescent actin filaments move on myosin fixed to glass surface. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol **83**, 6272-6276.
12. Lorenz, M., Holmes, K.C., (2010): The actin-myosin interface. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **107**, 12529-12534
13. Málnási-Csizmadia, A., Kovács, M., (2010): Emerging complex pathways of the actomyosin powerstroke. Trends Biochem. Sci. **35**, 684-690.
14. Oda, T., Iwasa, M., Aihara, T., Maéda, Y., Narita, A., (2009): The nature of the globular-to fibrous- actin transition. Nature Vol.**457**, 441-445.

15. Rayment, I., Holden,H.M., (1993): Myosin subfragment-1: structure and function of a molecular motor. Curr. Opin. Struct. Biol. **3**, 944-952.
16. Rayment, I., Rypniewski, W. R., Schmidt-Base, K., Smith, R., Tomchik,D. R., Benning, M. M., Winkelmann, D.A., Wesenberg, G., Holden, H.M., (1993): Three-Dimensional Structure of Myosin Subfragment-1: A Molecular Motor. Science Vol. **261**, 50-58.
17. Sivaramakrishnan, S., Ashley, E., Leinwand, L., Spudich, J.A., (2009): Insights into Human β-Cardiac Myosin Function from Single Molecule and Single Cell Studies. J.of Cardiovasc.Trans. Res.
18. Sweeney, H. L., Houdusse, A., (2010): Structural and Functional Insights into the Myosin Motor Mechanism. Annu.Rev.Biophys. **39**, 539-557.
19. Sweeney, H.L., Houdusse, A., (2010): Myosin VI Rewrites thr Rules for Myosin Motors. Cell, **141**, 573-582.
20. Szent-Györgyi, A., (2004): The Early History of the Biochemistry of Muscle Contraction. The Rockefeller University Press, Vol.**123**,631-641
21. Várkuti, B.H., Yang, Z., Kintses, B., Erdélyi, P., Bárdos-Nagy, I., Kovács, A.L., Hári, P., Kellermayer, M., Vellai, T., Málnási-Csizmadia, A., (2012): A novel actin binding site of myosin required for effective muscle contraction. Nat. Struct. Mol. Bio., **19(3)**, 299-306.
22. Yount, R.G., Lawson, D., Rayment, I., (1995): Is Myosin a „Back Door" Enzyme? Biophisical Journal, **68**, 44-49.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Málnási-Csizmadia Andrásnak, aki tanácsaival és kritikáival segített a szakdolgozat megírásában. Köszönet illeti a Málnalab tagjait, kifejezetten Várkuti Boglárkát, aki rengeteget áldozott rám idejéből. Végül, de nem utolsó sorban köszönettel tartozom családomnak, akik lehetővé tették tanulmányaim elvégzését.

NYILATKOZAT

Név:

Neptun azonosító:

ELTE Természettudományi Kar, **biológia alapszak**

Szakdolgozat címe:

A szakdolgozat szerzőjeként fegyelmi felelősségem tudatában kijelentem, hogy a dolgozatom önálló munkám eredménye, saját szellemi termékem, abban a hivatkozások és idézések standard szabályait következetesen alkalmaztam.

Tudomásul veszem, hogy plágiumnak számít:

– szó szerinti idézet közlése idézőjel és hivatkozás megjelölése nélkül;
– tartalmi hivatkozás a forrás megjelölése nélkül;
– más személy publikált gondolatainak saját gondolatként való feltüntetése.

Kijelentem továbbá, hogy a szakdolgozat leadott nyomtatott példányai és elektronikus változata szövegükben, tartalmukban megegyeznek.

Budapest, 2013 _____

a hallgató aláírása