

PhD értekezés tézisei

# A humán miozin-7a molekuláris regulációs mechanizmusai

**Holló Alexandra**

Doktori Iskola: Interdiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola  
Doktori Iskola Vezetője: Prof. Dr. Gallyas Ferenc  
Doktori Program: Funkcionális fehérjedinamika vizsgálata biofizikai módszerekkel (B-130)  
Doktori Program Vezetője: Prof. Dr. Nyitrai Miklós  
Témavezetők: Dr. Kengyel András Miklós  
Dr. James R. Sellers



Pécsi Tudományegyetem  
Általános Orvostudományi Kar  
Biofizikai Intézet

Pécs  
2024

## Absztrakt

A humán miozin-7a aktin alapú motorfehérje nélkülözhetetlen az egészséges látáshoz és a halláshoz. létfontosságú szerepet játszik az aktinban gazdag sztereocíliumok fejlődésében és működésében. A *Drosophila* homológjával végzett korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy az alapvetően monomer miozin-7a magas munkaciklus-arányú motorfehérje, amely dimerizáció után képes processzív mozgásra is. A teljes hosszúságú emlős miozin-7a jellemzése azonban kihívást jelentett a stabil, intakt fehérje előállításának nehézségei miatt.

Munkánkban beszámolunk a teljes hosszúságú funkcióképes humán miozin-7a holoenzim előállításáról és tanulmányozzuk az intra- és intermolekuláris szabályozási mechanizmusokat. A humán miozin-7a regulatorikus könnyű láncot, a kalmodulint és a kalmodulin-szerű fehérje 4 (CALML4) könnyű láncot köt. A CALML4-ről nemrég fedezték fel, hogy magas koncentrációban megtalálható a sztereocíliumokban, és a veleszületett süketiséget okozó gének egyik lehetséges jelöltjeként is azonosították. Kutatásaink azt mutatták, hogy a CALML4 döntő szerepet játszik a kalmodulin miozin-7a-hoz való dinamikus kötődésének szabályozásában  $Ca^{2+}$  szignál hatására. A csigában két miozin-7a splicing variáns található meg, amelyek csak egy rövid N-terminális extenzióban különböznek egymástól. *In vitro* motilitási esszék és biokémiai vizsgálatok segítségével kimutattuk, hogy az N-terminális extenzió jelentős hatással van az emlős miozin-7a mechanikai és enzimikus tulajdonságaira. Hipotézisünk szerint, a szőrsejtek mechanoszenzitivitását a miozin-7a két izoformájának eltérő expressziós szintje szabályozza. Az egyedi molekula motilitási kísérleteink azt mutatták, hogy *in vitro* a teljes hosszúságú miozin-7a önmagában nem képes az aktin filamentumok mentén elmozdulni. A MyRIP miozin-7a kötő fehérje jelenlétében azonban processzív mozgást mutat. A motor-kötőpartner komplex alacsony sebességgel halad az aktin filamentumokon, azonban hosszú ideig kötődik és nagy távolságot képes megtenni.

Eredményeink arra utalnak, hogy a vizsgált szabályozási mechanizmusok komplex hálózata együttesen felelős a miozin-7a aktivitásának, szerkezetének, lokalizációjának, oligomer állapotának és funkciójának finomhangolásáért. Munkánk a retinasejtek és a belső szőrsejtek molekuláris szintű működésének megértéséhez is hozzájárul.

## Bevezetés

### Miozin motorfehérjék

A miozinok aktin alapú motorfehérjék, melyek elengedhetetlenek a különböző típusú sejtmozgásokhoz, mint például a citokinézis, a fagocitózis, a sejtszervecske mozgások vagy a sejt alakjának fenntartása. Az emberben 39 miozin gént azonosítottak, amelyeket motor és farok-szerkezetük alapján 12 osztályba lehet sorolni [2, 3]. A miozin szupercsalád tagjai több alegységből, nehéz- és a könnyűláncokból épülnek fel. A nehézláncok általában három funkcionális doménből állnak. A motor- vagy fejdómén felelős az aktin filamentum, valamint ATP kötésért és hidrolízisért. A motor régió központi szekvenciája minden miozin osztályban konzervált. Az egyes osztályokban megtalálható N-terminális extenziók hossza változatos, és olyan osztályspecifikus tulajdonságokért felelősek, mint a membránkötés vagy a kináz-aktivitás [2]. A nyaki domén általában egy vagy több konszenzus szekvenciájú IQ-motívumot tartalmaz, amelyek a könnyű láncokhoz való kötődésért felelősek [2, 4]. A miozin holoenzim stabilitását a könnyű láncok biztosítják, amelyek lehetővé teszik, hogy nyaki domén a munkacsapás (az ún. *powerstroke*) végrehajtásához nélkülözhetetlen merev erőkaroként szolgáljon. Ezek a könnyű láncok szabályozó hatással lehetnek a miozin mechano-enzimikus aktivitására is [5, 6]. A holoenzim akkor alakul ki, amikor a könnyű láncok nem-kovalens módon kötődnek a nehézláncokhoz. A farok domének mutatják a legnagyobb változatosságot a miozin osztályok között mind szekvenciában, mind hosszban. A nem-konvencionális miozinok sokféle funkcióval rendelkeznek, és számos sejt folyamatban vesznek részt. Sokféleségük a szerkezetük és motor tulajdonságaik változatosságán keresztül figyelhető meg [7, 8].

### Miozinok enzim-aktivitása

Bár a miozin izoformáknak határozott szerkezeti különbségei vannak, közös bennük az ATP-hidrolizáló mechanizmus [9]. ATP hiányában a miozin fej szorosan kötődik az aktin filamentumhoz, ún. *rigor* állapotban. ATP kötődése csökkenti a miozin fej és az aktin filamentum közötti kötés erősségét, ezáltal a miozin fej leválását okozza az aktinról. A miozin fej az ATP-t ADP-re és szervetlen foszfátra hidrolizálja, ami konformációs változást eredményez, és az erőkar felhúzott állapotba kerül, lehetővé téve az aktin filamentum újrakötését. A szervetlen foszfát felszabadulása megkönnyíti az aktin és a miozin közötti erős kötődés kialakulását. Az ADP felszabadulás hatására az erőkar végrehajtja a munkacsapást, ami a szorosan kötött aktin filamentum előre irányuló mozgásához vezet. A *rigor* állapot helyreáll, és a ciklus egy újabb ATP-molekula kötődésével folytatódik [9-11].

## **Miozinok szabályozása**

A miozinok sokféleségük és az őket expresszáló sejttípusok különbözősége miatt szigorú szabályozást igényelnek. A miozinokat a sejt több szinten szabályozza annak érdekében, hogy aktivitásukat, konformációjukat, sejten belüli lokalizációjukat, oligomer állapotukat és általános működésüket összehangolja. Ennek eléréséhez a sejtek különböző mechanizmusokat alkalmaznak [5, 12]. Az alternatív splicing számos variánst eredményezhet, amelyek eltérő jellemzőkkel, sejten belüli lokalizációval és sejt/szövet-specifikus funkciókkal rendelkeznek. Sok miozin esetében splicing szabályozza az izoformák eltérő N-terminális extenzióját, melyek méretükben és funkciójukban is különbözhetnek. Az extenzió befolyásolhatja az aktin vagy nukleotid kötődést, a fehérje-fehérje kölcsönhatásokat, a hidrolizált termék disszociációt vagy az erőkar mozgását/forgását [5, 6, 12]. Számos monomer miozin szorosan zárt konformációt vesz fel, ami alacsony aktin-affinitást és ATPáz aktivitást eredményez. Ezt az auto-inhibíciós állapotot szüntethetik meg például kötőpartnerek, foszforiláció vagy kationok bekötése. A kétértékű kationok, mint például a  $\text{Ca}^{2+}$  és az  $\text{Mg}^{2+}$ , többféleképpen befolyásolják a miozin működését, beleértve a holoenzim konformációs változásait és motoros aktivitását. Bizonyos miozin könnyű láncok képesek kationokat kötni, és a holoenzim szabályozása a könnyű láncok specifikus kötődésén keresztül valósul meg [5, 6, 12]. Számos nem-konvencionális miozin fontos transzporterként működik. A szállítandó kargót adapter fehérjék kötik a molekuláris motor kargó-kötő doménjéhez. A miozin és a kargó közötti kölcsönhatások szabályozzák a motorkomplex mechanokémiáját, oligomerizációját és lokalizációját. A kargó kötése a miozin nehézláncainak dimerizációját vagy oligomerizációját okozhatja, és elősegítheti a miozin processzivitását [5, 6, 12]. A fent említett különböző szabályozó mechanizmusok összehangoltan, egymással kölcsönhatva vesznek részt a motorfehérje működésének alakításában.

## **Miozin-7a**

A miozin szupercsalád egyik fontos tagja a miozin-7, ami nélkülözhetetlen az egészséges látás és a hallás folyamataiban [13-16]. Emlősökben a miozin-7a számos szövetben megtalálható, például a herében, a vesében és a tüdőben, de különösen fontos szerepet töltenek be a belső fülben: a belső fül szőrsejtjeinek sztereocíliumaiban, valamint a retinában: a fotoreceptorokban és a retina pigment epitélumában. A miozin-7a mutációi sükettséghez, vesztibuláris diszfunkcióhoz és retina degenerációhoz vezethetnek [15, 17]. A teljes hosszúságú miozin-7a motor doménből, 5 IQ-motívumot tartalmazó rövid nyaki régióból, és farokdoménből áll, amelyben két MyTH4-FERM-motívumot egy SH3 motívum választ el egymástól [18].

*Drosophila* homológ fehérjén végzett korábbi kutatások kimutatták, hogy a miozin-7a magas munkaciklus-arányú, monomer motor, amely nem képes processzív mozgásra az aktin filamentumokon [19, 20]. A teljes hosszúságú emlős miozin-7a jellemzése kihívást jelentett a stabil, intakt fehérje expressziójának és tisztításának nehézségei miatt. Egy korábbi tanulmány feltárta, hogy a csiga szőrsejtjei alternatív splicing révén két myosin-7a izoformát expresszálnak, amelyek csak egy rövid N-terminális extenzióban különböznek egymástól. A kanonikus hosszú izoforma, amely tartalmazza a 11 aminosav hosszú (MVILQQGDHVW) extenziót, egységesen expresszálódik a belső szőrsejtekben, de tonotopikusan a külső szőrsejtekben [21, 22].

Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy a humán miozin-7a IQ-motívumai képesek a regulatórikus (RLC) és az esszenciális könnyűlánc (ELC) kötésére [23], míg a CALML4 azonosítása a miozin-7b endogén könnyű láncaként pedig felvetette a miozin-7a kötődésének lehetőségét [24, 25]. A miozin-7a MyTH4-FERM-motívumai számos fehérjével képesek kölcsönhatásba lépni [26-28]. Ezen partner-fehérjék, valamint a miozin-7a zavara együttesen felelős az Usher-szindróma kialakulásáért, amely egy recesszív genetikai rendellenesség, látó- és hallószervi károsodással, amely a kombinált siketség-vakság elsődleges oka. A myosin-7a defektusai a sztereocílium kötegek dezorganizációját, valamint a transzdukciós és adaptációs folyamatok megváltozását eredményezhetik, emellett más sztereocílium-fehérjék szállítása is károsodhat [29]. A miozin-7a pontos élettani szerepe még nem teljesen ismert. A dimerizált motor valószínűleg képes kargót szállítani az aktin citoskeleton mentén, de a legújabb bizonyítékok arra utalnak, hogy a belső fül mechano-elektromos transzdukciójában is részt vesz rögzítés és a feszültség generálása révén [21, 26, 30]. A miozin-7a számos szerteágazó funkciója a belső fülben és a neuroretinában komplex szabályozási folyamatokat igényel. Munkánk célja, hogy megvizsgáljuk a szabályozásért felelős specifikus mechanizmusokat.

## Kérdésvetés

Ahhoz, hogy a humán miozin-7a betöltse fiziológiai szerepét, többféle szabályozó mechanizmus szükséges. Ezek a mechanizmusok mind intra-, mind intermolekulárisan szabályozzák a miozin lokalizációját, konformációját, oligomer állapotát és enzim-aktivitását. A disszertáció célja egyes kiválasztott mechanizmusok megértése. A következő kérdésekre kívántunk választ adni:

- **Hogyan lehet expresszálni és tisztítani a teljes hosszúságú humán miozin-7a-t?** A humán miozin-7a motoros funkcióinak vizsgálatára eddig csak farok-domént nem tartalmazó, rövid konstrukciókat használták, mivel a stabil, intakt, teljes hosszúságú fehérje expresszálása és tisztítása nehézségekbe ütközött. Célunk egy olyan protokoll kidolgozása és optimalizálása volt, amellyel a teljes hosszúságú miozin-7a stabilan tisztítható.
- **Mely könnyűláncokat köti a humán miozin-7a?** Bár a humán miozin-7a-t eddig kalmodulinnal expresszálták és tisztították, tanulmányok kimutatták, hogy más könnyűláncok is képesek kötődni a miozin-7a IQ-motívumaihoz. Célunk a miozin-7a pontos könnyűlánc-összetételének meghatározása volt.
- **Milyen hatást gyakorol a kalcium a miozin-7a szerkezetére és működésére?** A kalcium kulcsfontosságú szabályozó kation a belső fülben. A mechano-elektromos transzdukció során kalcium áramlik a szőrsejtekbe. Célunk az volt, hogy feltárjuk a kalcium lehetséges hatását a miozin szerkezetére és enzimikus funkciójára.
- **Mi a szerepe az N-terminális extenzióknak?** A miozinok gyakran rendelkeznek N-terminális extenzióval, amely módosítja a motor funkciót. Kutatásunk célja, hogy megvizsgáljuk a miozin-7a rövid N-terminális extenziójának a motoros funkcióra gyakorolt hatását.
- **Milyen motilitási tulajdonságokkal rendelkezik miozin-7a?** A monomer miozinok számos esetben aktiválhatók és dimerizálhatók kötőpartnerek segítségével. Ebben a tanulmányban azt vizsgáltuk, hogy a MyRIP, a miozin-7a egyik ismert kötőpartnere hogyan indukálja a motorfehérje processzivitását. Emellett mesterséges dimerizáció segítségével felmértük a miozin-7a intrinszik motilitását is dimer állapotban.

## Módszerek

### Miozin-7a klónozása

A munka során több különböző DNS-konstrukciót tartalmazó vektort hoztunk létre, valamint több különböző hosszúságú miozin-7a konstrukciót állítottunk elő. A teljes hosszúságú humán miozin-7a expressziójára és tisztítására tett kezdeti kísérleteink során, amikor több bakulovírus (nehézlánc, három különböző könnyűlánc) együttes transzfektálása történt, a tisztítási hozam nagyon alacsony volt, ezért áttértünk a MultiBac rendszerre, amelyet nagy, multimer fehérjekomplexek rovarsejtekben történő előállítására terveztek [31].

### Miozin-7a tisztítása

A FLAG-taggal ellátott miozin-7a rekombináns fehérjét *Sf9* rovarsejtekben expresszáltuk, amelyeket előzőleg pACEBac1-Multi plazmiddal vagy különböző, a nehézláncot és a könnyű láncot tartalmazó pFastBac1 plazmidokkal együttesen fertőztük. A holoenzimet FLAG-affinitás kromatográfiával tisztítottuk a sejtlyázátumból.

### Egyéb fehérjék tisztítása

A C-terminális mCherry-taggal és FLAG-taggal ellátott MyRIP-konstrukciót pFastBac1 plazmidba klónoztuk. A tisztítási folyamat hasonló volt a miozin-7a esetében leírtakhoz. A CALML4 pET15b-MHL vektorba klónoztuk, majd KRX sejteket (Promega) transzformáltunk a plazmiddal. A könnyű láncot a sejtlyázátumból His-affinitás kromatográfiával tisztítottuk. GFP-RLC-t pFastBac1 plazmidba klónoztuk és *Sf9* rovarsejtekben expresszáltuk, majd anioncserélő kromatográfiával tisztítottuk. Az aktint nyúl izom acetonporból (Pel Freeze Biologicals) tisztítottuk, és a standard protokoll szerint állítottuk elő [32]. A kalmodulint a korábban közzétett protokollok szerint tisztítottuk [33].

### In vitro motilitási esszé

Az *in vitro* aktin motilitási esszé információt szolgáltat a felszínhez kötött miozinok aktin mozgatására való képességéről. A mikroszkópos tárgylemezeken kialakított folyadékcellába 0,2 mg/ml miozin 7a-t juttattunk, és 1 percig inkubáltuk, hogy a miozin megtapadjon a nitrocellulózzal bevont felületen. Alapos mosási lépések után rodamin-falloidinnal jelölt aktint (20 nM) juttattunk a cellába. Az egy-molekulás *in vitro* motilitási próba információt szolgáltat az egyedi miozin molekulák processzivitásáról, amint a felszínhez kötött aktin filamentumok mentén haladnak. A PEG-borítású mikroszkóplemezeken kialakított folyadékcellát NeutrAvidinnel mostuk, majd aktinnal töltöttük fel. ~ 0,01 mg/ml miozint juttattunk a cellába.

A felvételeket inverz Nikon Eclipse Ti-E mikroszkóppal gyűjtöttük, amelyhez H-TIRF modul tartozékot, CFI60 Apochromat TIRF 100x olaj immerziós objektívet és EMCCD kamerát használtunk. A processzív motilitást az ImageJ TrackMate plugin segítségével elemeztük. A hisztogramokat a GraphPad Prism 7 szoftverrel készítettük. A sebesség-hisztogramok Gauss-illesztését használtuk az átlagos sebesség meghatározásához. A karakterisztikus futáshosszokat és futási időtartamokat a megfelelő hisztogramok exponenciális illesztésével határoztuk meg.

### **Steady-state ATPáz esszé**

A miozin steady-state ATPáz aktivitást különböző F-aktin-koncentrációk mellett SpectraMax ID3 mikrolemes olvasóval mértük 37°C-on. Az ATP-hidrolízis sebességét a NADH oxidációja által okozott 340 nm-es abszorbancia csökkenésből számoltuk ki Michaelis-Menten kinetika alapján, és a miozin koncentrációra normalizáltuk. A kinetikai paraméterek meghatározásához az ATP-áz sebességét az F-aktin koncentrációjával szemben ábrázoltuk, és az adatpontokra Michaelis-Menten-görbét illesztettünk.

### **Negatív festésű elektronmikroszkópia és képfeldolgozás**

A hígított fehérjéket UV-kezelt és szénnel bevont elektronmikroszkóp-rácsra vittük fel, majd azonnal 1%-os uranyl-acetáttal festettük. A mikrofelveleket JEOL 1200EX mikroszkópon rögzítettük AMT XR-60 CCD-kamerával 60000x nagyítás mellett. A referencia nélküli képillesztést és a K-középosztályozást a SPIDER szoftver segítségével végeztük el.

### **Tömegfotometria**

Az egy-molekulás mérési adatok megszerzéséhez Refeyn One MP tömegfotométert használtuk. Minden egyes mintából vagy keverékből 20 nM-t töltöttünk a cellába. Az adatgyűjtést 1 percig végeztük szobahőmérsékleten, a képeket pedig a gyártó által biztosított szoftverrel (Refeyn, UK) dolgoztuk fel. A molekulatömeg és a kontraszt közötti kalibrációt ismert molekulatömegű fehérjestandardok segítségével állapítottuk meg [34]. A mérés során kapott eredményeket hisztogramon ábrázoltuk és Gauss-illesztést alkalmaztunk.

### **Izoterm Titrációs Kalorimetria**

Az izoterm titrációs kalorimetria (ITC) kísérleteket MicroCal ITC-200 műszerrel (Malvern) végeztük. A reakciócellába 260  $\mu$ M CALML4-et helyeztünk, az ITC fecskendőbe 8 mM  $\text{Ca}^{2+}$ -t töltöttünk. A titrálás 20 injekcióból állt. Az adatelemzést a beépített szoftverrel végeztük el, a kalcium-puffer mérést használva kontrollként.



### **Mikroskálás Termoforézis**

Az mikroskálás termoforézis (MST) méréseket Monolith NT.115 készülékkel végeztük. A Monolith NT<sup>TM</sup> His-Tag jelölő készletet használtuk a His-CALML4 és a His-kalmodulin jelölésére RED-tris-NTA festékkel. A kötési affinitásvizsgálatokat 16 koncentrációjú kalciumhígítási sorozat (kalmodulin: 5 mM - 150 nM, CALML4: 2 M - 60 μM) felhasználásával végeztük. Minden hígítást Monolith<sup>TM</sup> kapillárisokba töltöttünk (~5-7 μl). Az adatok illesztését a beépített Nanotemper szoftver segítségével a KD modell alapján számoltuk ki.

### **Tömegspektrometria**

A mintákat NuPage<sup>TM</sup> 4-12%-os Bis-Tris gélen választottuk szét, Coomassie Blue-val festettük, majd desztillált vízzel öblítettük. A DTT-vel és IAD-vel történő redukcióra és alkilezésre való előkészítéshez a gél bi-karbonát és metanol oldat segítségével víztelenítettük és dehidratáltuk. A peptideket 5%-os hangyasavval és 50%-os acetonitrillel extraháltuk egy éjszakán át tartó tripszin emésztés után. Ezután C<sub>18</sub> gyöngyöt tartalmazó ZipTip-ekkel tisztítottuk őket. LC-MS/MS segítségével a peptideket koncentráltuk és elemeztük.

### **ARPE19 transzfecció**

Az ARPE 19 sejtvonalat az ATCC-től szereztünk be (CRL 2302<sup>TM</sup>). A sejteket 25 cm<sup>2</sup>-es tenyésztőlombikokban 10% FBS-t tartalmazó DMEM:F12 tápfolyadékban tenyésztettük, 37 °C-on és 5% CO<sub>2</sub> mellett. A transzfecció előtt az alacsony passzázs-számú sejteket kamrák fedőüvegekbe (*In vitro* Scientific) juttattuk. Az Avalanche transzfecció reagens (EZ Biosystems) és a CMV plazmid DNS-t Opti-MEM I redukált szérumos közegben (Gibco<sup>TM</sup>) hígítottuk, majd óvatosan, cseppenként adagoltuk minden egyes kamrába. A transzfecció oldatot 5 órás, 37 °C-on, CO<sub>2</sub> inkubátorban végzett inkubációs időszakot követően eltávolítottuk. A sejtmegfigyeléseket 48 órával a transzfecció után végeztük el.

## Eredmények

### A teljes hosszúságú miozin-7a sikeres expressziója és tisztítása

A M7a-5IQ különböző könnyű láncokkal való együttes expressziója során több könnyű láncot tudtunk azonosítani, amelyek kötődtek a miozin-7a nehézlánchoz, ezért a MultiBac rendszer segítségével olyan konstrukciót állítottunk elő, amely a teljes hosszúságú miozin-7a nehézláncot, kalmodulint, CALML4-et és RLC-t is tartalmazza. Ez a módszer végül nagy mennyiségű, tisztított miozin-7a holoenzimet eredményezett, amelyben a nehézlánc és a háromféle könnyűlánc is jól elkülöníthető a gélen.

### A motor funkciót a C-terminális domén szabályozza

Negatív festésű elektronmikroszkópiát alkalmazva megfigyeltük a humán miozin-7a alacsony ionerősségnél kialakuló zárt konformációját, amelyben a fark domén visszahajlik a motor doménre. A  $20,7 \pm 1,9$  nm-es kontúr összhangban van az erőkar várható hosszával 5IQ motívumok esetén (~19 nm). Mivel az SAH domén várhatóan további ~9 nm-t ad a kar hosszához, feltételezzük, hogy az SAH domén nem járul hozzá az erőkar hosszához, hanem inkább a visszatérő oldal részét képezi a farkdomén többi motívumával együtt. A sókoncentráció növelése egy nyitott konformációt eredményezett, ami a fark domén nagyfokú rugalmasságát is mutatja.

A fark és a motor domén kölcsönhatása az enzimfunkció drasztikus csökkenését eredményezi. A teljes hosszúságú miozin-7a aktin-aktivált steady-state ATPáz aktivitását NADH-csatolt teszttel mértük. A maximális reakciósebesség ( $v_{\max}$ )  $0,2 \text{ s}^{-1}$ , a félmaximális reakciósebességhez tartozó substrát koncentráció ( $K_{\text{ATPáz}}$ )  $54 \mu\text{M}$  értékeket adott. Ezzel szemben a csak a motor domént és az első IQ domént tartalmazó M7a-S1 miozin ~7,5-szer magasabb maximális reakciósebességgel rendelkezik ( $1,5 \text{ s}^{-1}$ ) és a  $K_{\text{ATPáz}}$  ~5-ször kisebb ( $11 \mu\text{M}$ ) a teljes hosszúságú miozinhoz hasonlítva. Az alacsonyabb  $K_{\text{ATPáz}}$  nagyobb affinitást jelent az aktinhoz.

### A humán miozin-7a elsődlegesen monomer

Az expresszált rekombináns miozin-7a-S1 molekulásúlya a tömegfotometriás kísérletek során 103 kDa-nak adódott, amely leginkább egy nehézlánc (~89 kDa) és egy könnyű lánc (RLC, ~20 kDa) összegének felel meg. A teljes hosszúságú miozin-7a molekulásúlya 325 kDa-nak aódot, amely megegyezik egy nehézlánc (~255 kDa) és négy könnyűlánc molekulásúly összegével (egy RLC: ~20 kDa, három kalmodulin és CALML4: ~17 kDa), ami azt jelzi, hogy a teljes hosszúságú miozin-7a nehézlánc monomer. Nem volt megfigyelhető olyan magasabb

molekula súlyú csúcs, amely dimernek vagy multimernek felelt volna meg. Ezzel szemben a mesterségesen dimerizált miozin-7a-S1SAH (a miozin-7a motor és nyak doménje, amelyet egy Leucin-zipzár motívum követ) egy körülbelül 406 kDa molekulásúlyt formált, amely megfelel két nehézlánc (~141 kDa) és hat-nyolc könnyűlánc molekulásúly összegének. A tömegfotometria felbontása nem teszi lehetővé, hogy a könnyűláncok pontos számát megadjuk.

### **A CALML4 kritikus könnyűlánc a miozin-7a-nak**

Az *Sf9* sejtekben expresszált teljes hosszúságú humán miozin-7a nehézlánc fehérje minősége jelentősen javult a CALML4 együttes expressziójával. Anti-CALML4 antitestet és tömegspektrometria segítségével igazoltuk a CALML4 jelenlétét a tisztított miozin-7a mintákban. Továbbá, a kalmodulin csak akkor tisztult együtt a M7a-S1 nehézlánccal, ha a CALML4 is jelen volt, ami arra utal, hogy a CALML4 elősegíti a kalmodulin kötődését. Ezt a hipotézist alátámasztja az is, hogy endogén *Sf9* kalmodulint detektáltunk tisztítás után a nehézlánchoz kötve, olyan kísérletekben, ahol nem volt exogén kalmodulin az expresszióhoz vagy a sejtlyázathoz adva, viszont CALML4 jelen volt az expresszió során.

### **CALML4 elektroforetikus sebessége nem változás kalcium hatására**

A kalmodulin és a CALML4 aminosav összetétele 44%-ban azonos. Ha a CALML4 aminosav-szekvenciáját összehasonlítjuk a humán kalmodulinéval, a  $\text{Ca}^{2+}$ -kelát képzéshez szükséges döntő fontosságú aminosavak hiányoznak a CALML4 mindegyik EF-kéz motívumából. Néhány konzervált aminosav jelenléte a CALML4 negyedik EF-kéz motívumában arra utal, hogy az részben megőrizheti a kalcium megkötésének képességét. Tisztított kalmodulin és CALML4 felhasználásával elektroforetikus mobilitási sebesség vizsgálatot végeztünk a CALML4 kalcium-kötő képességének közvetlen vizsgálatára.  $\text{Ca}^{2+}$  jelenlétében a kalmodulin megváltozott elektroforetikus mobilitást mutatott a kalcium-függő konformációs változás hatására, míg ugyanezen körülmények között a CALML4 mobilitása nem változott  $\text{Ca}^{2+}$  hozzáadását követően.

### **CALML4 alacsony affinitással köt kalciumot**

A  $\text{Ca}^{2+}$  által kiváltott változások vizsgálatára izoterm titrációs kalorimetria kísérleteket végeztünk a CALML4 mintákon 8 mM  $\text{Ca}^{2+}$  alkalmazásával. Az adatok illesztése rámutatott egy potenciális kötődésre ( $K_A = 700 \pm 1730 \text{ M}^{-1}$ ) azonban a rendellenesen magas standard deviáció és a nem reális kötési sztöchiometria ( $N_{\text{CALML4-Calcium}} = 5,56 \pm 3,23$ ; míg  $N_{\text{CaM-Calcium}} = 4$ ) kétségeket ébresztett a kötési esemény valódiságával kapcsolatban. A CALML4 molekuláris hidratációs héjában, töltésében vagy méretében bekövetkező kalcium-indukált

változások nyomon követésére mikroskálás termoforézist alkalmaztunk.  $10^{-2}$  M (10 mM) és  $10^{-5}$  M (10  $\mu$ M) kalcium koncentráció tartományban a CALML4 minták a kalmodulinhoz képest kisebb kalcium-affinitást mutattak. Az 1 M kalciumkoncentrációt használva a CALML4 kalcium-affinitását szigmoidális illesztéssel  $K_D = \sim 350$  mM-ra becsültük. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a CALML4 egy olyan EF-kéz motívummal rendelkező fehérje, amely elvesztette  $Ca^{2+}$ -kötődési képességét.

### **A könnyű láncok kötődése miozin-7a-hoz kalcium függő**

A tömegfotometria segítségével a holoenzimben bekövetkező változásokat is meg tudtuk figyelni. 1  $\mu$ M EGTA hozzáadásával a teljes hosszúságú miozin-7a egy 325 kDa molekulású csúcsot mutatott, ami egy nehézláncnak és négy könnyű láncnak felel meg.  $Ca^{2+}$  hozzáadásakor egy kisebb,  $293 \pm 25$  kDa molekulású csúcs felé történő elmozdulást figyeltünk meg, amely egy nehézláncnak és egy 38 kDa tömegnek felel meg. Mivel az RLC és a CALML4 inert a kalciummal szemben, ezt a 38 kDa tömeget egy RLC és egy CALML4 együttes jelenlétének tulajdonítjuk. A tömegfotométer nem érzékeli a 25 kDa-nál kisebb fehérjéket, így ebben a kísérletben nem tudtuk kimutatni a disszociált, szabad könnyű láncokat.

### **A kalcium befolyásolja a miozin-7a ATPáz aktivitását és aktin affinitását**

Mivel úgy tűnik, hogy a kalciumkötés elősegíti bizonyos könnyű láncok disszociációját a holoenzimről, megvizsgáltuk a kalciumnak az enzimaktivásra gyakorolt hatását. A NADH kapcsolt ATPáz esszét megismételtük 500 nM kalcium jelenlétében. A  $Ca^{2+}$  hozzáadását követően a teljes hosszúságú miozin-7a maximális reakciósebessége  $0,98 \pm 0,27$  s $^{-1}$  növekedett.

### **Az aktin mozgatósi sebesség lecsökken kalcium jelenlétében**

TIRF-mikroszkópia segítségével *in vitro* aktin motilitási esszét végeztünk, hogy megvizsgáljuk a kalcium hatását a miozin motoros aktivitására. A felszínhez kötött miozin molekulák  $\sim 22$  nm/s sebességgel mozgatták a fluoreszcensen jelölt aktint,  $Ca^{2+}$  jelenlétében azonban a sebesség  $\sim 7$  nm/s-ra csökkent, ami arra utal, hogy a miozin motilitása a kalmodulin holoenzimről való disszociációja következtében károsodott, annak ellenére, hogy szabad kalmodulin jelen volt az esszé során.

### **Az N-terminális extenzió befolyásolja a miozin-7a lokációját és aktivitását**

A csigában két miozin-7a nehézlánc izoforma expresszálódik, egy kanonikus hosszú N-terminális és egy rövid N-terminális miozin-7a, amelyből hiányzik a motor domén előtti tizenegy aminosav hosszú N-terminális extenzió [21]. Az N-terminális extenzió szerepének

feltárása érdekében expresszáltuk és tisztítottuk a két izoformát. Farok-csonkított konstrukciókat (M7a-5IQ) használtuk, hogy elkerüljük a farok domén auto-inhibíciós hatását. Ezenkívül az N-terminális pozícióban lévő GFP-tag általános használata kérdéseket vet fel az N-terminális extenzió szabályozó funkciójára gyakorolt lehetséges hatásával kapcsolatban. Ezért egy hosszú N-terminális konstrukciót is létrehoztunk, amely egy GFP-t is tartalmazott az N-terminális régió előtt.

*In vitro* aktin motilitási esszében a kanonikus hosszú izoforma magasabb aktin mozgatási sebességet mutatott ( $3 \pm 1,6$  nm/s), mint a rövid izoforma ( $1,3 \pm 0,95$  nm/s). Hasonló eredményeket tapasztaltunk a steady-state ATPáz esszében is, ahol a hosszabb izoforma aktin-aktivált ATPáz aktivitása magasabbnak bizonyult ( $0,84 \pm 0,14$  s<sup>-1</sup>), mint a rövidebb izoformaé ( $0,24 \pm 0,06$  s<sup>-1</sup>). Érdekes módon az N-terminális GFP-tag jelenléte a hosszú izoformán szintén alacsonyabb sebességértékeket ( $1,6 \pm 0,9$  nm/s) és alacsonyabb ATPáz-aktivitást ( $0,11 \pm 0,07$  s<sup>-1</sup>) eredményezett a jelöletlen hosszú N-terminális izoformához képest.

### **A mesterségesen dimerizált miozin-7a processzív mozgásra képes**

A miozinok intrinszik processzivitásának mechanisztikus tanulmányozásához egyedi-molekulás *in vitro* motilitási kísérleteket végeztünk, amelyben TIRF-mikroszkópiával tudtuk megfigyelni az egyes miozin molekulák processzivitását. A folyadékcella felszínén rodamin-falloidinnal jelölt aktin filamentumokat immobilizáltunk majd a GFP-vel jelölt, leucin-zipzárral mesterségesen dimerizált miozin-7a-S1SAH-Zipper konstrukciót a kamrába mostuk, végül ATP hozzáadásával aktiváltuk a motorfehérjéket. 150 mM NaCl és 5 mM ATP jelenlétében a dimerizált miozin-7a elmozdult a felülethez kötött aktin filamentumok mentén. A FiJi TrackMate segítségével a motilitás részletes jellemzése kimutatta, hogy a miozin-7a lassan mozog az aktin filamentumokon (~ 4,2 nm/s), azonban hosszú ideig (136 s) fenntartja a kötődést és nagy távolságot (379 nm) tesz meg. Korábbi tanulmányok vizsgálták a dimerizált miozin-7a processzivitását sejt kultúrákban, de nem az ARPE19 humán retina pigment epitélium (RPE) sejtvonalban [35]. Az ARPE19 sejtek dimerizált konstrukcióval történő tranziens transzfekcióját követően bőséges filopódium képződést figyeltünk meg. A GFP-vel jelölt motor a filopódiumok mentén mozgott, és a csúcsokban halmozódott fel. A mozgó molekulákat FiJi segítségével manuálisan nyomon követve meg tudtuk mérni a dimerizált konstrukciók sebességét. A mozgó GFP-miozin-7a-S1SAH-zipper átlagos sebessége (n = 5) 10 nm/s volt.

### **A rekombináns MyRIP monomer, globuláris fehérje**

A teljes hosszúságú miozin-7a-kötő MyRIP fehérjét N-terminális mCherry taggel és C-terminális FLAG tisztító taggel (mCherry-MyRIP) pFastBac vektorba klónoztuk, és bakulovírus/*Sf9* rendszerben expresszáltuk, majd anti-FLAG affinitás kromatográfiával tisztítottuk. A negatív festésű elektronmikroszkópos felvételek alapján MyRIP egy monomer, globuláris fehérje, amit a tömegfotometriás mérések is megerősítettek. A 117 kDa molekulású csúcs megközelíti az mCherry-vel jelölt MyRIP monomer elméleti molekulásúlyát (~120 kDa).

### **MyRIP kötődés hatására a miozin-7a képes processzíven mozogni**

A miozin-7a processzivitásának mechanikai vizsgálatára egyedi-molekulás *in vitro* motilitási esszét használtunk. A teljes hosszúságú miozin-7a önmagában nem processzív; azonban MyRIP jelenlétében processzívvá válik. mCherry-jelölt MyRIP és miozin-7a kolokalizálódtak és együtt haladtak az aktin filamentum hálózat mentén. A motilitás részletes jellemzése azt mutatja, hogy a motor-kötőpartner komplex lassan, kb. 7,8 nm/s sebességgel mozog az aktinon. A karakterisztikus futási hossz 552 nm, az aktinhoz való karakterisztikus kötési idő pedig kb. 156 s. Nagyobb koncentrációban (~1  $\mu$ M miozin-7a és ~1  $\mu$ M MyRIP) megfigyeltük a mozgó molekulák csoportosulását. Számos fluoreszcens molekula képes volt együtt mozogni, ami nagyobb számú komplexek kialakulására utal.

Ezen kölcsönhatás további tanulmányozásához ARPE19 sejteket tranziens módon transzfektáltunk GFP-jelölt teljes hosszúságú miozin 7a-val. A GFP-jel a miozin egész sejten át diffúz lokalizációját mutatta, amely arra utal, hogy a motor auto-inhibíciós állapotban van, ellentétben a mesterségesen dimerizált miozin-7a esetével, amikor a motor a filopódiumok csúcsaiba való mozgását figyelték meg kötőpartner jelenléte nélkül is. A sejteket mCherry-MyRIP konstrukcióval transzfektálva a MyRIP az aktin citoskeleton mentén lokalizálódik, és vörös fluoreszcens szignált figyeltünk meg mozgó vezikulákon. Amikor mCherry-MyRIP és GFP-jelölt teljes hosszúságú miozin-7a-t együtt transzfektáltuk ARPE19 sejtekben, bőséges filopódium képződést figyeltünk meg, és a motor-kötőpartner komplex a filopódiumok csúcsába vándorolt. A MyBD, MyRIP miozin-kötő egysége viszont önmagában nem képes elősegíteni a miozin-7a processzív mozgását.

## Összefoglalás

Kutatásaink során sikeresen tisztítottunk teljes hosszúságú humán miozin-7a-t és vizsgáltuk *in vitro* tulajdonságait:

- kidolgoztunk egy módszert az intakt, teljes hosszúságú miozin-7a expresszáására és tisztítására MultiBac rendszer segítségével
- a miozin-7a túlnyomórészt monomer és fiziológias körülmények között auto-inhibíciós állapotban van
- az inaktív miozin-7a kalciummal aktiválható
- kalcium hozzáadásakor a kalmodulin könnyűláncok disszociálnak a miozinról, ami megváltoztatja az erőkar merevségét, ami lassabb aktin motilitási sebességet eredményez
- kimutattuk, hogy a CALML4 könnyűlánc nem kalcium-függő és kritikus a miozin-7a számára
- a kanonikus (hosszú) izoforma nagyobb ATPáz aktivitással és aktin motilitási képességgel rendelkezik, mint a rövid izoforma
- a miozin N-terminális extenziójának blokkolása csökkent aktivitást eredményezett
- a mesterségesen dimerizált miozin-7a *in vitro* motilitási sebessége lassú, de a motor hosszú ideig kötődött az aktin filamentumokon miközben nagy távolságot tett meg
- ARPE19 sejtekben a mesterségesen dimerizált miozin-7a jelenléte elősegítette a filamentumok képződését, a dimerizált motor a filopodiák mentén mozgott, a csúcsokban felhalmozódva
- a teljes hosszúságú miozin-7a MyRIP hatására dimerizálódik, az *in vitro* motilitási esszé során processzív mozgást végez, miközben nagy távolságokat tesz meg és hosszú ideig rögzítve marad
- ARPE19 sejtekben a teljes hosszúságú miozin-7a önmagában diffúz eloszlást mutatott, míg a MyRIP az aktin citoskeleton mentén lokalizálódott; a motor és a kötőpartner együttes transzfektálásával filopódiumok kialakulását figyeltük meg, és a miozin-7a és a MyRIP a filopódiumok mentén haladt a csúcsok irányába
- a MyBD nem elegendő a miozin-7a processzivitásának elősegítéséhez

## Megbeszélés

A motorfehérje hatékony működéséhez többféle szabályozó mechanizmusra van szükség. A humán miozin-7a már évek óta kutatás tárgyát képezi, de számos kérdés megválaszolatlan maradt a funkcionálisan aktív holoenzim előállításának bonyolultsága miatt. Ebben a tanulmányban a humán miozin-7a aktivitását, konformációját, oligomer állapotát, sejten belüli lokalizációját és általános működését szabályozó intramolekuláris és intermolekuláris szabályozások vizsgálatát tűztük ki célul.

A rekombináns humán miozin-7a-t baculovírus/*Sf9* rendszerben expresszáltuk és FLAG-affinitás kromatográfiával tisztítottuk. A különböző számú IQ-motívumot tartalmazó konstrukciók különböző könnyűláncokkal történő koexpresszálasával sikeresen feltártuk a miozin-7a komplex könnyűlánc-összetételét. *In vitro*, a humán miozin-7a előnyben részesíti a kalmodulint és a kalmodulinszerű fehérje 4-et, miközben a regulatórikus könnyűláncához is kötődik.

A miozin szerkezeti elemzése kimutatta, hogy *in vitro* körülmények között túlnyomórészt monomer, és alacsony ionerősség mellett az elektronmikroszkópos felvételeken kompakt szerkezetet mutat. Ezen megfigyeléssel összhangban a tömegfotometriás mérések is azt igazolták, hogy a teljes hosszúságú miozin nehézláncok monomer formában vannak. A molekulasúly eloszlás csúcsa leginkább egy négy könnyűláncot megkötött holoenzimnek felel meg, ami valószínűsíti, hogy az önszabályozott, kompakt konformációban az ötödik IQ-motívum nem képes könnyűláncot kötni. A miozin-7a-S1 103 kDa-nál egy határozott csúcsot mutatott, amely a motor doménből és az első IQ-motívumból, valamint egy regulatórikus könnyűláncból álló molekula súlyát közelíti meg. A Leucin Zipper-motívumot tartalmazó konstrukció a tömegfotometriás mérések során egy dimernek megfelelő molekulasúly csúcsot formált.

A kalmodulin egy jól ismert kalciumkötő fehérje. A miozin-7a holoenzim részeként a kalmodulin lehetővé teszi a kalcium általi szabályozást. Kalcium jelenlétében végzett steady-state ATPáz vizsgálat a miozin megnövekedett ATPáz aktivitását mutatta ki, viszont csökkent a motor aktin motilitási képességét. A kalcium megkötése konformációs változást okoz a humán kalmodulinban, ami a látszólagos molekulatömeget 17 kDa-ról 14 kDa-ra változtatja. A tisztított CALML4 minták esetében ez a mobilitási eltolódás nem volt megfigyelhető. A kalmodulin disszociációja magas kalcium koncentráció esetén megváltoztathatja a kar flexibilitását és ezáltal a miozin motoros tulajdonságait, lehetővé téve a kalcium-érzékeny szabályozást.



A csigában a miozin-7a több izoformája expresszálódik alternatív transzkripció és transláció kezdőhelyek által. A szőrsejtek eltérő expressziós mintázatot mutatnak a két izoformára nézve. Az külső szőrsejtekben a két izoforma expressziós mintázata fordítottan korrelál, a kanonikus hosszú N-terminális miozin-7a főként a csúcsban, míg a rövid N-terminális miozin-7a a csiga alapjában expresszálódik. A belső szőrsejtekben feltehetően csak a kanonikus hosszú N-terminális izoforma expresszálódik [21]. A két izoforma csak az N-terminális doménjükben különbözik, a kanonikus izoforma rendelkezik egy 11 aminosav hosszú extenzióval a motor domén előtt. *In vitro* aktin motilitási kísérletekben az aktin filamentumok ~2-szer gyorsabban mozogtak a hosszú N-terminális izoformán mint a rövid izoformán. Figyelemre méltó, hogy a GFP-jelölt hosszú izoforma, ahol a GFP-tag a miozin-7a N-terminálisán található, a rövid izoformához hasonló motilitási tulajdonságokat mutatott. A miozin-7a izoformák aktin aktivált ATPáz-aktivitásának értékelésére során megfigyeltük, hogy a kanonikus hosszú izoforma nagyobb ATPáz-aktivitást mutat a rövid izoformához képest. A motilitási próbához hasonlóan a GFP-vel jelölt hosszú izoforma alacsonyabb ATPáz-aktivitást mutatott, amely szorosan megegyezett a rövid izoforma aktivitásával. A szerkezeti előrejelzések szerint a miozin-7a N-terminális extenziója szorosan a motor domén nukleotid kötő zsebének közelében helyezkedik el [22].

Megfigyeléseink arra utalnak, hogy az extenzió szerepet játszhat az ATP-hidrolízis allosztérikus szabályozásában, valószínűleg az ADP vagy a foszfát felszabadításában. A miozin-7a feltehetően közvetlenül szabályozza a sztereocíliumok közötti tip-link nyugalmi feszültségét, és ezáltal szabályozza az ioncsatorna nyitását a mechano-elektromos transzdukció során [21]. Érdekes módon a sztereocílium kötegek mechanikájával kapcsolatos legújabb tanulmányok a külső szőrsejtek tip-link feszültségének tonotopikus változását mutatták ki, ahol a feszültség fokozatosan növekszik az alap felé [36]. A rövid N-terminális izoforma, amelynek koncentrációja hasonlóan növekszik a bázis felé, alacsonyabb ATPáz aktivitást mutat, azonban nagyobb affinitással kötődik az aktinhoz, mint a hosszú N-terminális izoforma. Ezek a megfigyelések együttesen arra utalnak, hogy a két miozin-7a izoforma eltérő mechanokémiával rendelkezhet, amely hozzájárul a tip-link feszültség tonotópikus gradienséhez. Az egyedi expressziós mintázat és az eltérő enzimatis aktivitás alapján azt feltételezzük, hogy a szőrsejtek mechanoszenzitivitását a két miozin-7a izoforma expressziós szintjének beállításával szabályozza. Ennek az N-terminális extenzióknak a süketséggel kapcsolatos jelentősége még nem ismert.

A miozin-7a motilitási tulajdonságainak tanulmányozására és a hatékony transzportoz szükséges processzivitás megfigyelésére *in vitro* és ARPE19 sejt kultúrákban alkalmazott

egyedi-molekulás motilitási vizsgálati módszereket alkalmaztunk. A processzivitás általában megköveteli, hogy a motorfehérje dimerizálódjon vagy több miozin motor összehangoltan működjön. A rövid alfa-hélix motívum önmagában nem képes dimerizálni a miozin-7a-t. A monomer motorfehérjék dimerizációja partnerfehérjék kötődésével is lehetséges. Annak érdekében, hogy a miozin intrinszik motilitását tanulmányozzuk, egy GFP-jelölt, farokcsonkolt Leucin-zipzárral dimerizált konstrukciót hoztunk létre. A dimerizált miozin kinetikai tulajdonságainak tanulmányozására egyedi-molekulás *in vitro* motilitási esszéket végeztünk TIRF-mikroszkópia segítségével. A mesterséges dimerizált motor lassan (~ 4,4 nm/s) mozgott az egyes aktin filamentumok mentén, nagy távolságot megtéve, miközben hosszabb ideig kötődve maradt. Az ARPE19 sejtek dimerizált konstrukcióval történő tranziens transzfekcióját követően bőséges filopódiumképződést figyeltünk meg, a GFP-vel jelölt motor a filopódiumok mentén mozgott és a csúcsokban halmozódott fel. Tekintettel a nyúlványok nagyfokú rugalmasságára és mobilitására, csak kevés motorfehérje sebességét tudtuk megfigyelni és mérni. Számításaink (~10 nm/s) azonban jó összhangban vannak a korábbi megfigyelésekkel.

Mivel a miozin-7a C-terminális FERM-doménje visszahajlik a motorra, az ezt a területet célzó molekulák várhatóan képesek lesznek feloldani az inhibíciót. MyRIP, a miozin-7a és a Rab27a ismert kötőpartnere *in vivo* adatok alapján képes aktiválni a miozint [37]. A miozin-7a önmagában nem mutatott processzivitást az egy-molekulás *in vitro* motilitási vizsgálatokban. A MyRIP hozzáadásával azonban a miozin-7a processzív viselkedést mutatott. A teljes hosszúságú miozin-7a és a MyRIP motilitási vizsgálatának elemzése azt mutatja, hogy a motor és a kötőpartner a rögzített mozgás teljes időtartama alatt alacsony sebességgel (~ 7,8nm/s) mozgott együtt. Nagyobb koncentrációknál nagyobb fluoreszcens komplexeket figyeltünk meg. Érdekes módon a komplex más motor-kötőpartner klaszterek részévé vált, ahogy az aktin filamentumok mentén haladt, amíg el nem érte az adott filamentum végét. Ez a megfigyelés a miozin-7a oligomerizációjának lehetőségére utal, bár nem találtunk további bizonyítékot nagyobb miozin komplexek kialakulásának megerősítésére. Eredményeink azt is jelzik, hogy a teljes hosszúságú miozin-7a nem mozog processzíven a MyBD jelenlétében.

Az ARPE19 sejtek teljes hosszúságú miozin 7a-val történő tranziens transzfekcióját követően megfigyeltük a GFP-jelölt motorfehérje diffúz lokalizációját. A filopódium képződés hiánya és a megfigyelt motilitás hiánya arra utal, hogy a miozin auto-inhibált konformációban van. A MyRIP tranziens transzfektálása után az mCherry-taggal jelölt fehérje a citoskeleton mentén lokalizálódott és vörös fluoreszcens jelet figyeltünk meg mozgó vezikulákon is. Az mCherry-MyRIP és a GFP-jelölt teljes hosszúságú miozin-7a együttes transzfektálásakor ARPE19 sejtekben filopódiumok bőséges képződését és ezt követően a motor-kötőfehérje

komplex transzlokációját figyeltük meg a filopódiumok csúcsaiba.

A miozin-7a számos funkcióban vesz részt a belső fülben és a neuroretinában. Egy általánosan elfogadott elmélet alapján a miozin motor a két sztereocílium közötti tip-linken keresztül a feszültség beállításában vesz részt. Egy lassú miozin, mint például a miozin-7a kiváló jelölt erre a feladatra, mivel képes erőt kifejteni a sztereocíliákat összekötő tip-linkeken, miközben az aktin filamentumok mentén transzlokálódik. Ráadásul a miozin-7a izoformák tonotópikus eloszlása a csigában segít fenntartani a változó feszültséget. A melanoszómák fontos védelmi szerepet játszanak a retinában. A melanoszómák eloszlása a RPE-ben a világossötét fényciklus során változik, ezért a melanoszómák megfelelő mozgása szükséges az élettani működéshez. A melanoszómák transzportjához egy háromrészes komplexre van szükség, amely a Rab27a és a MyRIP kötőfehérje által összekapcsolt miozin-7a komplexből áll.

A mérések többségét *in vitro*, illetve kisebb mértékben modellsejteken végeztük. A kinetikai mérések célja a belső fül szőrsejtjeiben lejátszódó folyamatok szimulálása volt, míg a processzivitási vizsgálatok elsősorban a retinális melanoszómák transzportjának modellezésére irányultak. Természetesen a vizsgált rendszerek nem feleltethetők meg a humán sejtek komplexitásának, ahol a miozin-7a működését más tényezők is befolyásolhatják. Vizsgáltuk a könnyű láncok, a  $Ca^{2+}$ -szabályozás, az izoformákból adódó különbségek és a MyRIP kötődés szerepét, azonban az Usher-komplex számos más fehérjéje is társulhat a miozin-7a-hoz, és valószínűleg szabályozza azt. Eredményeink azt mutatják, hogy a szabályozási mechanizmusok komplex hálózata szinkronban működik, hogy finomhangolja a miozin-7a aktivitását, szerkezetét, lokalizációját, oligomer állapotát és funkcióját. Némi betekintést nyertünk ezekbe a mechanizmusokba, azonban sok kérdés megválaszoltalan maradt. Az intakt és funkcionális teljes hosszúságú humán miozin-7a sikeres előállítása lehetővé teszi, hogy a jövőbeni vizsgálatok során megismerjük a miozin-7a mutációi által okozott látás- és halláskárosodás molekuláris részleteit. Eredményeink hozzájárulnak a retinasejtek és a belső szőrsejtek működésének molekuláris szintű megértéséhez is, ami megkönnyítheti a további sejtes vagy *in vivo* vizsgálatokat.

## Közlemények jegyzéke

### Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

**Holló A**, Billington N, Takagi Y, Kengyel A, Sellers JR, Liu R. Molecular regulatory mechanism of human myosin-7a. *J Biol Chem*. 2023 Oct;299(10):105243. doi: 10.1016/j.jbc.2023.105243. Epub 2023 Sep 9. PMID: 37690683; PMCID: PMC10579538.

Impact Factor: 5.4

### Az értekezés eredményeit bemutató előadások és posztterek

1. **Holló, A.**, Billington N., Kengyel, A., Sellers, JR, Liu, R. (2021): Molecular Regulatory Mechanisms of Human Myosin-7a. *ASCB Cell Bio Virtual*. Virtual, USA, December 2021, Mol. Biol. Cell 28, page 546 (Abstract #P908)
2. **Holló, A.**, Billington N., Kengyel, A., Sellers, JR, Liu, R. (2022): Molecular Regulatory Mechanisms of Human Myosin-7a. *66<sup>th</sup> Annual Meeting of the Biophysical Society*, San Francisco, CA, USA, February 2022, 1406-Plat
3. **Holló, A.**, Billington N., Kengyel, A., Sellers, JR, Liu, R. (2022): Molecular Regulatory Mechanisms of Human Myosin-7a. *Cytoskeletal Motors Gordon Research Seminar and Conference*, Dover, VT, USA, July 2022.
4. **Holló, A.**, Billington N., Kengyel, A., Sellers, JR, Liu, R. (2022): Mechanistic Insight into the Regulation of Human Myosin 7a. *ASCB Cell Bio*. Washington DC, USA, December 2022, Mol. Biol. Cell 33, page 485 (Abstract #P1801)
5. **Holló, A.**, Billington N., Kengyel, A., Sellers, JR, Liu, R. (2023): Mechanistic Insight into the Regulation of Human Myosin 7a. *67<sup>th</sup> Annual Meeting of the Biophysical Society*, San Diego, CA, USA, February 2023, 1258-Pos
6. **Holló, A.**, Billington N., Kengyel, A., Sellers, JR, Liu, R. (2023): Human myosin-7a has multiple distinct regulatory mechanisms that makes it an excellent candidate as tension adaptation motor. *ASCB Cell Bio*. Boston, MA, USA, December 2023, Mol. Biol. Cell 35, page 518 (Abstract # P1833)

## Referenciák

1. Sebe-Pedros, A., et al., *Evolution and classification of myosins, a paneukaryotic whole-genome approach*. *Genome Biol Evol*, 2014. **6**(2): p. 290-305.
2. Berg, J.S., B.C. Powell, and R.E. Cheney, *A Millennial Myosin Census*. *Molecular Biology of the Cell*, 2001. **12**(4): p. 780-794.
3. Peckham, M. and P.J. Knight, *When a predicted coiled coil is really a single  $\alpha$ -helix, in myosins and other proteins*. *Soft Matter*, 2009.
4. Odronitz, F. and M. Kollmar, *Drawing the tree of eukaryotic life based on the analysis of 2,269 manually annotated myosins from 328 species*. *Genome Biol*, 2007. **8**(9): p. R196.
5. Heissler, S.M. and J.R. Sellers, *Various Themes of Myosin Regulation*. *J Mol Biol*, 2016. **428**(9 Pt B): p. 1927-46.
6. Heissler, S.M. and J.R. Sellers, *Myosin light chains: Teaching old dogs new tricks*. *Bioarchitecture*, 2014. **4**(6): p. 169-88.
7. Mermall, V., P.L. Post, and M.S. Mooseker, *Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction*. *Science*, 1998. **279**(5350): p. 527-33.
8. O'Connell, C.B., M.J. Tyska, and M.S. Mooseker, *Myosin at work: motor adaptations for a variety of cellular functions*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1773**(5): p. 615-30.
9. De La Cruz, E.M. and E.M. Ostap, *Relating biochemistry and function in the myosin superfamily*. *Current Opinion in Cell Biology*, 2004. **16**(1): p. 61-67.
10. Uzman, A., *Molecular Cell Biology, Sixth Edition*. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 2010. **38**(1): p. 60-61.
11. Maffei, M., et al., *Actomyosin interaction at low ATP concentrations*. *European Biophysics Journal*, 2017. **46**(2): p. 195-202.
12. Fili, N. and C.P. Toseland, *Unconventional Myosins: How Regulation Meets Function*. *Int J Mol Sci*, 2019. **21**(1).
13. Hasson, T. and *Molecular motors: Sensing a function for myosin-VIIa*. 1999.
14. Wolfrum, U., et al., *Myosin VIIa as a Common Component of Cilia and Microvilli*.
15. Mathur, P. and J. Yang, *Usher syndrome: Hearing loss, retinal degeneration and associated abnormalities*. *Biochim Biophys Acta*, 2015. **1852**(3): p. 406-20.
16. Chen, Z.-Y., et al., *Myosin-VIIb, a Novel Unconventional Myosin, Is a Constituent of Microvilli in Transporting Epithelia*. *Genomics*, 2001. **72**(3): p. 285-296.
17. Sahly, I., et al., *Expression of myosin VIIA during mouse embryogenesis*. *Anatomy and Embryology*, 1997. **196**(2): p. 159-170.
18. Chen, Z.-Y., et al., *Molecular Cloning and Domain Structure of Human Myosin-VIIa, the Gene Product Defective in Usher Syndrome 1B*. 1996. **36**: p. 440-448.
19. Liu, R., et al., *A binding protein regulates myosin-7a dimerization and actin bundle assembly*. *Nature Communications*, 2021. **12**(1): p. 563.
20. Watanabe, S., R. Ikebe, and M. Ikebe, *Drosophila myosin VIIA is a high duty ratio motor with a unique kinetic mechanism*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(11): p. 7151-60.
21. Li, S., et al., *Myosin-VIIa is expressed in multiple isoforms and essential for tensioning the hair cell mechanotransduction complex*. *Nat Commun*, 2020. **11**(1): p. 2066.
22. Moreland, Z.G. and J.E. Bird, *Myosin motors in sensory hair bundle assembly*. *Curr Opin Cell Biol*, 2022. **79**: p. 102132.
23. Sakai, T., et al., *Structure and Regulation of the Movement of Human Myosin VIIA*. *J Biol Chem*, 2015. **290**(28): p. 17587-98.
24. Choi, M.S., et al., *The small EF-hand protein CALML4 functions as a critical myosin light chain within the intermicrovillar adhesion complex*. *J Biol Chem*, 2020. **295**(28): p. 9281-9296.

25. Kapustina, M. and R.E. Cheney, *A new light chain for myosin-7*. J Biol Chem, 2020. **295**(28): p. 9297-9298.
26. Yu, I.M., et al., *Myosin 7 and its adaptors link cadherins to actin*. Nat Commun, 2017. **8**: p. 15864.
27. Kuroda, T.S. and M. Fukuda, *Identification and Biochemical Analysis of Slac2-c/MyRIP as a Rab27A-, Myosin Va/VIIa-, and Actin-Binding Protein*, in *Methods in Enzymology*. 2005, Academic Press. p. 431-444.
28. Whatley, M., et al., *Usher Syndrome: Genetics and Molecular Links of Hearing Loss and Directions for Therapy*. Front Genet, 2020. **11**: p. 565216.
29. Stauffer, E.A., A. Lelli, and J.R. Holt, *Hair Cell Transduction and Adaptation: Physiology and Molecular Mechanisms*, in *The Senses: A Comprehensive Reference*, R.H. Masland, et al., Editors. 2008, Academic Press: New York. p. 263-292.
30. Grati, M. and B. Kachar, *Myosin VIIa and sans localization at stereocilia upper tip-link density implicates these Usher syndrome proteins in mechanotransduction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(28): p. 11476-81.
31. Sari, D., et al., *The MultiBac Baculovirus/Insect Cell Expression Vector System for Producing Complex Protein Biologics*. Adv Exp Med Biol, 2016. **896**: p. 199-215.
32. Pardee, J.D. and J.A. Spudich, *Purification of Muscle Actin*, in *Methods in Cell Biology*, L. Wilson, Editor. 1982, Academic Press. p. 271-289.
33. Guzik-Lendrum, S., et al., *Mammalian Myosin-18A, a Highly Divergent Myosin*. Journal of Biological Chemistry, 2013. **288**(13): p. 9532-9548.
34. Wu, D. and G. Piszczek, *Standard protocol for mass photometry experiments*. European Biophysics Journal, 2021. **50**(3): p. 403-409.
35. Sato, O., et al., *Human myosin VIIa is a very slow processive motor protein on various cellular actin structures*. J Biol Chem, 2017. **292**(26): p. 10950-10960.
36. Tobin, M., et al., *Stiffness and tension gradients of the hair cell's tip-link complex in the mammalian cochlea*. Elife, 2019. **8**.
37. Sakai, T., et al., *Cargo binding activates myosin VIIA motor function in cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(17): p. 7028-33.