

Doktori értekezés

Foszforilációs és defoszforilációs szabályozási folyamatok vizsgálata konvencionális miozin II és nem-konvencionális miozin XVI motorfehérjék esetén

Dr. Kengyel András Miklós



Témavezetők:

Prof. Dr. Nyitrai Miklós

James R. Sellers, Ph.D

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM
Általános Orvostudományi Kar
Biofizikai Intézet

Pécs, 2016

Interdiszciplináris Doktori Iskola: D93

Doktori Iskola Vezetője: Prof. Dr. Sümegi Balázs

Doktori Program: B-130

Funkcionális fehérjedinamika vizsgálata biofizikai módszerekkel

Doktori Program Vezetője: Prof. Dr. Nyitrai Miklós

Témavezetők: Prof. Dr. Nyitrai Miklós

James R. Sellers, Ph.D

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akiknek segítségével hozzájárult a tudományos pályán elért eredményeimhez.

*Köszönöm **Ifj. Kellermayer Miklósnak**, hogy témavezetőként elindított a kutatói pályán.*

*Köszönöm **James R. Sellersnek**, hogy lehetőséget biztosított a National Institutes of Health-ben végzett kutatásokhoz és megismertette velem a miozinok szerteágazó családját.*

*Köszönöm **Nyitrai Miklósnak**, hogy témavezetésével folytathattam a miozinok kutatását és belevághattam a rendkívül izgalmas miozin 16 projektbe.*

*Köszönöm kollégáimnak a rengeteg segítséget, amit a mindennapi munka során megkaptam, akik megismertették velem a kutatási módszereket és akikhez bármikor bizalommal fordulhattam: **Nagy Attilának, Grama Lászlónak, Pasquale Bianconak, Harry Takaginak, Yi Yangnak, Fang Zhangnak** és **Amy Hongnak**.*

*Köszönöm a **Biofizikai Intézet** minden munkatársának a segítséget és a baráti légkört.*

*Köszönöm a sikeres együttműködést a Debreceni Egyetem kutatóinak: **Erdődi Ferencnek, Kónya Zoltánnak** és **Bécsi Bálintnak**.*

*A kutatás részben a **National Institutes of Healths** (Bethesda, MD, USA) Graduate Partnership Program posztgraduális ösztöndíja révén, valamint az **OTKA 112794** pályázat támogatásával valósult meg.*

TARTALOMJEGYZÉK

Köszönetnyilvánítás	3
Tartalomjegyzék.....	4
Rövidítések jegyzéke	6
1 Bevezetés.....	8
1.1 Konvencionális miozin II	9
1.1.1 Nem-izom miozin II izoformák	11
1.1.2 A miozin ATPáz ciklus	12
1.2 Foszforiláció és defoszforiláció.....	13
1.2.1 Könnyűlánc foszforiláció.....	13
1.2.2 Nehézlánc foszforiláció	14
1.2.3 Miozin defoszforiláció	15
1.3 Nem-konvencionális Miozin XVI	16
1.3.1 Egy új miozin család felfedezése	16
1.3.2 Miozinok N-terminális extenzióval	17
1.3.3 Miozin XVI szerkezete	17
1.3.4 Miozin XVI feltételezett funkciói	20
1.3.5 Miozin 16b homológia a MYPT-tel	22
1.3.6 Ankyrinek	22
1.4 GFP-jelölt miozinok.....	24
2 Kérdésvetetés.....	25
3 Módszerek	26
3.1 Bioinformatikai analízis	26
3.2 Rekombináns fehérjék tervezése és előállítása.....	26
3.2.1 Klónozás	26
3.2.2 NmHMM2A expressziója és tisztítása bakulovírus/Sf9 rendszerben.....	27
3.2.3 My16Ank expressziója és tisztítása <i>E. coli</i> rendszerben	28
3.2.4 A kísérletek során felhasznált többi fehérje előállítása	29
3.3 Kinetikai mérések	29
3.3.1 Steady-state ATPáz esszé	29
3.3.2 Foszforilációs esszé	30
3.4 <i>In vitro</i> motilitási próba	31
3.5 Fehérje-fehérje kölcsönhatási vizsgálatok	32

3.5.1	Koszedimentációs esszé	32
3.5.2	Anizotrópia és polimerizációs teszt	33
3.5.3	Felületi plazmon rezonancia.....	33
3.6	Enzim aktivitás mérés	34
3.7	Statisztikai módszerek	34
4	Eredmények	36
4.1	GFP-RLC hatása a nmHMM2A működésére	36
4.1.1	GFP-nmHMM2A tisztítása	36
4.1.2	GFP-RLC hatása az ATPáz aktivitásra	37
4.1.3	GFP-RLC hatása a foszforiláció dinamikájára	38
4.1.4	<i>In vitro</i> motilitási próba	41
4.2	My16Ank hatása a motor domén aktivitására	42
4.2.1	My16Ank tisztítása	42
4.2.2	My16Ank fokozza a vázizom miozin ATPáz aktivitását	43
4.2.3	My16Ank hatása a foszforiláció regulált nmHMM2B ATPáz aktivitására	45
4.2.4	My16Ank köti a vázizom miozint.....	46
4.2.5	My16Ank nem köti az aktint.....	48
4.3	My16Ank/PP1c defoszforilációs komplex vizsgálata.....	50
4.3.1	My16Ank–PP1c kötés vizsgálata	50
4.3.2	PP1 enzimaktivitás mérés.....	52
5	A témában elért új eredmények összefoglalása	54
6	Megbeszélés.....	56
6.1	GFP hatása az RLC működésére.....	56
6.2	A miozin 16 ankyrin domén biokémiai karakterizálása	59
7	Kitekintés	63
8	Közlemények jegyzéke	64
8.1	Az értekezés alapjául szolgáló közlemények	64
8.2	Az értekezés eredményeit bemutató előadások és poszterek.....	64
8.3	Egyéb tudományos közlemények.....	66
8.4	Idézhető absztraktok:	67
8.5	Egyéb poszterek és absztraktok	67
9	Referenciák	69

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

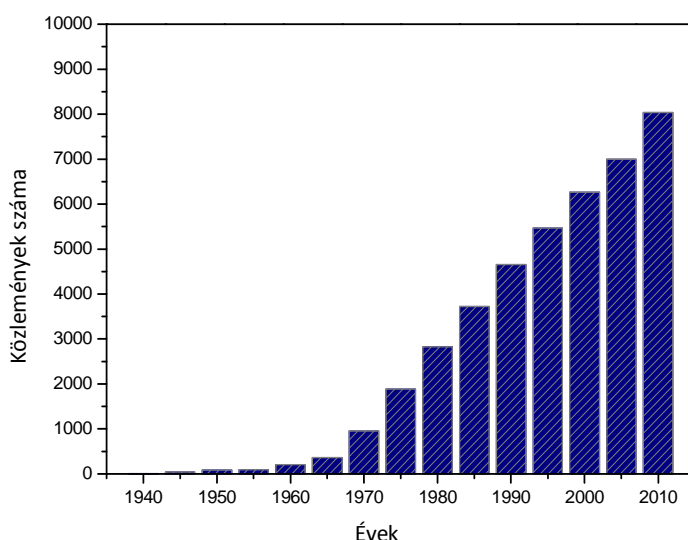
Arp2/3	<i>actin related protein</i>
BSA	<i>bovin</i> szérum albumin
CaM	kalmodulin
CDK	ciklin dependens kináz
DTT	ditiotritol
ELC	esszenciális könnyűlánc
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
GFP	zöld fluoreszcens fehérje (<i>green fluorescent protein</i>)
GSH	redukált glutation
GST	glutation-S-transzferáz
HC	miozin nehéz lánc (<i>heavy chain</i>)
HMM	nehéz meromiozin (<i>heavy meromyosin</i>)
IAEDANS	jodoacetyl-amino-etil-amino-naftalén-1-szulfonsav
IAF	jodoacetamido-fluoreszcein
IPTG	izopropil- β -D-tiogalaktozid
LB	Luria-Broth
LMM	könnyű meromiozin
MEA	β -merkaptóetanol
MLCK	miozin könnyűlánc kináz
MLCP	miozin könnyűlánc foszfatáz
Myo16	miozin 16
MyPhoNE	miozin foszfatáz N-terminális elem
MYPT	miozin foszfatáz célzó alegység
NES	nukleáris export szignál
NLS	nukleáris lokalizációs szignál
nmHMM2	nem-izom miozin nehéz meromiozin 2
NYAP	<i>neuronal tyrosine-phosphorylated adaptor for the PI3K</i>
OD	optikai denzitás
PAGE	poliakrilamid gél elektroforézis
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCNA	proliferáló sejtmag antigén
PI3K	foszfoinozítid-3-kináz
PKC	protein kináz C

PMSF	fenilmetilszulfonilfluorid
PP1c	protein foszfatáz 1 katalitikus alegység
RLC	miozin regulatórikus könnyűlánc
RT	szobahő
S1	miozin szubfragmentum 1
S2	miozin szubfragmentum 2
SDS	nátrium-dodecilszulfát
skHMM	vázizom nehéz meromiozin
skMyo2	teljes hosszúságú vázizom miozin
TCA	triklórecetsav (<i>trichloro-aceticacid</i>)
TEV	<i>tobacco etch virus</i>
UC	ultracentrifuga
WT	vad típus

1 BEVEZETÉS

Több mint 150 éve annak, hogy 1864-ben Wilhelm Friedrich Kühne német fiziológus először izolált izomszövetből egy magas sókoncentráció mellett oldhatóvá váló különleges fehérjét, amit – annak izomból származó eredetére utalva – „miozinnak” nevezett el (1). Bizonyára nem tudhatta még, hogy egy óriási, az élő szervezet szinte minden életfolyamatában szerepet játszó fehérjecsalád első tagját írta le. A miozinokat sokáig csak a harántcsíktott izomrostokban betöltött esszenciális szereppel, a kontraktilis funkcióval azonosították, ám előbb kiderült, hogy a simaizmokban is, később, hogy szinte valamennyi sejt típusban előfordul ez a mozgásért és mozgatásért felelős nagyméretű fehérje. Az utóbbi évtizedekben újabb és újabb miozinokat ismertek meg, amelyek szerkezetükben, funkciójukban, szabályozásukban is jelentősen eltértek egymástól; egy közös pont azonban mindig maradt: a fehérjék motoros tulajdonsága.

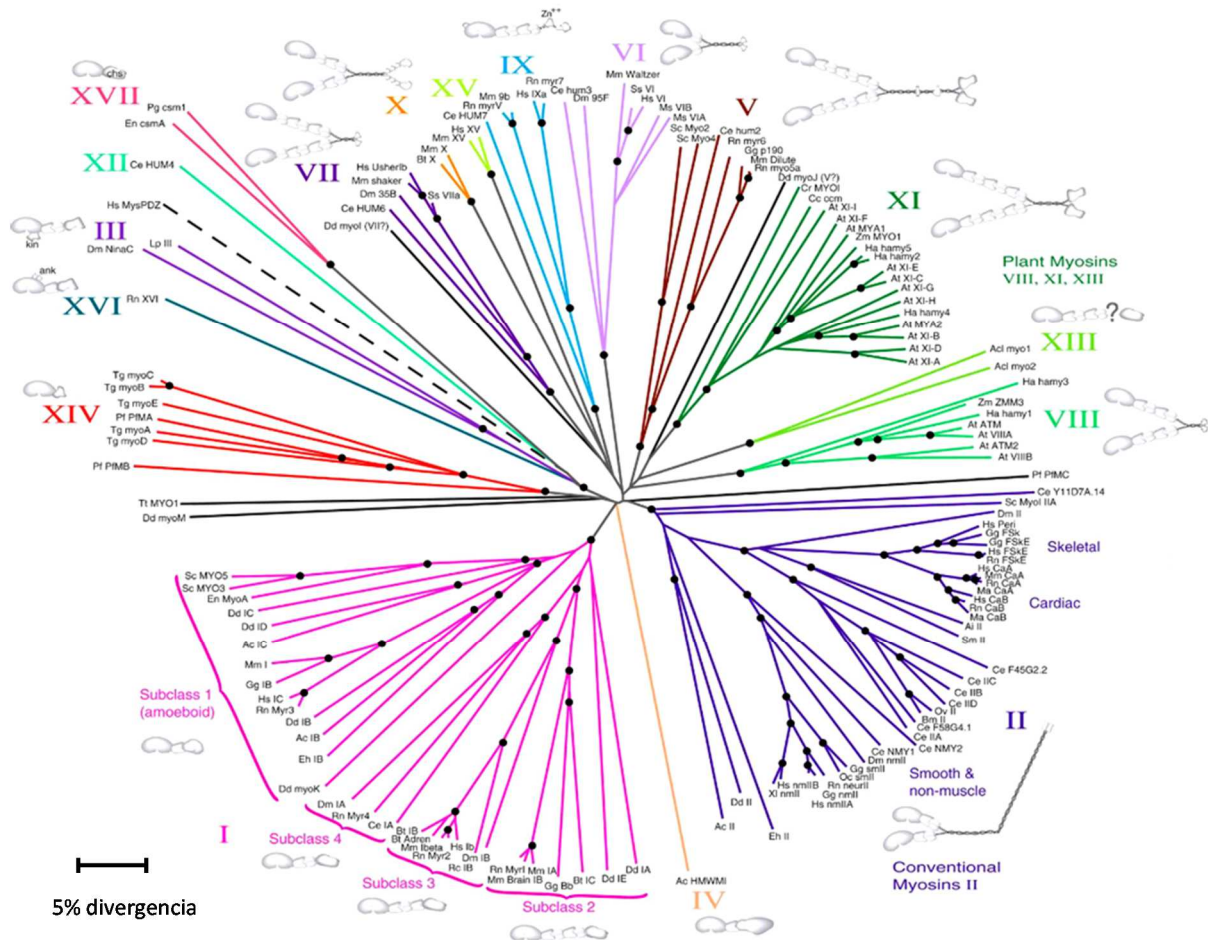
A miozinok megismerése azt követően gyorsult fel, hogy 1942-ben Straub F. Brúnó, a Szegedi Egyetem biokémikusa felfedezte a harántcsíktott izomrost, egyben az eukarióta sejt váz egyik legfontosabb alkotóelemét, az „aktin” fehérjét (2). A miozinok kutatása azóta dinamikusan fejlődik, évről-évre egyre több új ismerettel gazdagodik a tudományos közélet (1. *Ábra*). 1973-ban Thomas Pollard és Edward Korn leírta az első nem konvencionális miozint, az egy motor doménnel rendelkező *Acanthamoeba* miozin I-t (3), amit további számos, immár több, mint 30 különböző családba sorolt miozin leírása követett (4).



1. Ábra. Miozinal foglalkozó, újonnan megjelent tudományos közlemények száma egymást követő öt éves periódusokban 1940-től napjainkig, Pubmed-en elérhető adatok alapján.

A miozinok nagy és szerteágazó szuperfamíliájába tartozó aktin alapú motorfehérjék nélkülözhetetlen alkotói a különféle celluláris folyamatoknak. Részt vesznek többek között a sejtosztódásban, sejtmozgásban, a stressz rostok és a lamellipodium kialakításában, citoskeletális

fehérjék rögzítésében vagy a vezikuláris transzportban (5–7). Miozinok minden eukarióta sejtben megtalálhatóak kezdve az amőbáktól és az élesztőktől a növényeken át az emlősökig és egy sejtben belül a miozin izoformák száma az evolúciós fejlettségi szinttel arányosan növekszik (8). Az utóbbi időben több kísérlet történt az egyre gyarapodó és jelenlegi ismereteink szerint több, mint kétezer leírt miozin izoforma (9) csoportosítására: a legutóbbi, 2014-es filogenetikai klasszifikáció már XXXIV különálló csoportba osztotta a miozinokat (4). A miozinok egy egyszerűbb, de szemléletesebb családfáját mutatja a **2. Ábra**.



2. Ábra. A miozinok filogenetikai családfája különböző miozin szekvenciák összevetésével készült, Clustal-W távolság mátrix analízissel (10).

1.1 KONVENCIONÁLIS MIOZIN II

A miozinok közös tulajdonsága, hogy aktin filamentumokat kötnek és az ATP hidrolízis kémiai energiáját felhasználva mechanikai erőt képesek generálni. Szerkezetükre általánosságban jellemző a három fehérjerégió: (a) az ATP-t hidrolizáló és az aktint ATP-függő módon kötő motor domén, (b) a könnyűláncok kötéséért felelős nyaki régió, valamint (c) a változatos megjelenésű és funkciójú fark

domén. A motor domén a molekula leginkább konzervált része, ez alól kivételt csak néhány felszíni hurok illetve az esetleges N-terminális extenzió jelent. A nyaki vagy könnyűlánc-kötő domén ismétlődő IQ-szekvencia motívumokat tartalmaz, miozin típustól függően 1–7 közötti számban, amihez kalmodulin, vagy kalmodulin-szerű könnyűláncok kötődnek (11). A fark domén mind hosszát, mind szekvenciáját tekintve igencsak eltérő a különböző miozincsaládok esetén: állhat részben vagy egészében coiled-coil-t formáló szekvenciából, ami a miozin dimerizálódását illetve polimerizációját határozza meg; ezen kívül tartalmazhat speciális funkciójú doméneket, vagy lehet teljesen rendezetlen szerkezetű (12–14).

Miozint először harántcsíkt izomrostból izolálták, de a típust később miozin II osztálynak¹ nevezték, utalva a molekula dimer megjelenésére, szemben a később felfedezett monomer miozin I-gyel (3). Azokat a miozinokat, amelyek hasonlóan a vázizom miozinhoz, dimerizálódnak és filamentumokat képeznek konvencionális miozinoknak hívjuk. Ebbe a csoportba tartozik a simaizom, valamint a celluláris nem-izom miozin 2A, 2B és 2C, továbbá a különleges szabályozó funkciót ellátó miozin 18 (15, 16).

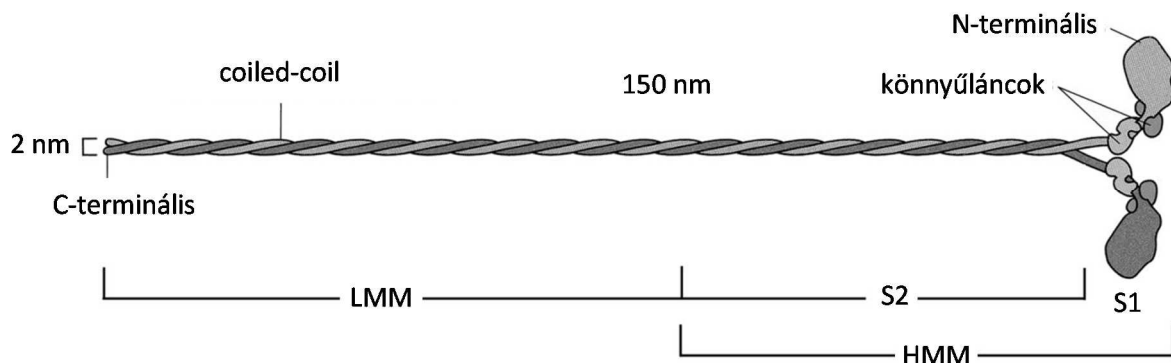
A többi osztályba tartozó, úgynevezett nem-konvencionális miozinok, eltérő mennyiségben fordulnak elő a különféle sejttípusokban. Szerkezetük igen változó, némelyek közülük egy rövid coiled-coil segítségével dimerizálódnak (pl. miozin V), de a többségük monomer formában funkcióképes. Szerepük igen szerteágazó lehet: a rögzítéstől, a transzportfolyamatokon át a szabályozó feladatokig (17).

A konvencionális miozinok hexamer felépítésű fehérjék. A motor domént és a nyaki régiót is magába foglaló két identikus nehéz lánc fark doménje egymásba csavarodva úgynevezett coiled-coil szerkezetet alkot, létrehozva ezáltal a miozin dimert. A nyaki régiókhöz két-két kis mólsúlyú könnyű lánc kapcsolódik: a szabályozásért felelős, ~20 kDa-os regulatórikus könnyűlánc (RLC), illetve a nehéz lánc stabilizálásában szerepet játszó, egyelőre még kevésbé ismert funkciójú, ~17 kDa-os esszenciális könnyűlánc (ELC).

A vázizom miozin vizsgálatát nehezítette, hogy fiziológias ionerő mellett a miozin molekulák filamentumokká álltak össze és csak magas sókoncentráció (0,6 M KCl) mellett maradtak oldhatóak. A kinetikai vizsgálatok szempontjából nagy előrelépést jelentett annak felismerése, hogy tripszines emésztést követően létrejött egy funkcionálisan aktív, de amellet oldható fragmentum: az úgynevezett nehéz meromiozin (HMM), amely a két motor domént tartalmazta egy rövid coiled-coil szakasszal összekapcsolva, valamint a könnyűláncokat. A fark domén oldhatatlan, disztális része a

¹ A miozinok nómenklatúrája nem egységes az irodalomban és különböző szerzők eltérő rövidítéseket használnak. Jelen írásban az általánosságban jellemzett miozin családokat római számmal (pl. miozin XVI osztály), míg a konkrét fehérjéket arab számmal jelöljük (pl. miozin 16b, nmHMM2A).

könnyű meromiozin (LMM) (18, 19). A HMM enzimatikusan tovább emészthető a motor domént tartalmazó S1 és a motor domént az LMM-mel összekötő S2 fragmentumokra (20) (**3. Ábra**). Jóllehet a limitált proteolízisnek még mindig van létjogosultsága (elsősorban a vázizom) HMM előállítása során, a mai molekuláris biológiai technikák lehetővé teszik rekombináns HMM, vagy HMM-szerű fragmentumok klónozását és egyszerű előállítását, például bakulovírus/Sf9 expressziós rendszerben (21, 22).



3. Ábra. Konvencionális miozin II sematikus szerkezeti képe. Módosítva (23, 24) alapján.

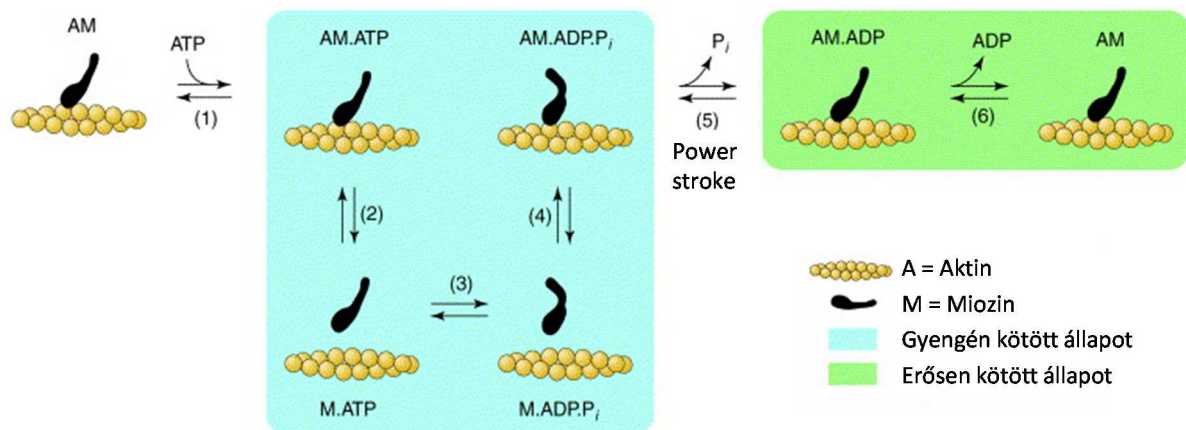
Kísérleteinkben, a konvencionális miozinok közül, teljes hosszúságú vázizom miozint (skMyo2) és HMM-t (skHMM), illetve rekombináns nem-izom miozin 2A és 2B (nm2A, nm2B) HMM-t használtunk.

1.1.1 Nem-izom miozin II izoformák

A nem-izom miozin II az állati sejtek egyik legfontosabb alkotója, az aktin citoskeleton átrendeződésében kulcsszerepet játszó, a sejtek minden életszakaszában meghatározó jelentőséggel bíró motorfehérje. Elnevezése ellenére a harántcsíkolt izomrostokban is megtalálható, csak kisebb mennyiségben, mint a vázizom vagy szívizom miozin. Gerincesekben három izoformája ismert, úgymint nm2A, nm2B és nm2C, amelyek különböző génekről íródnak át (25, 26), ezek közül a nm2A vagy a nm2B hiánya súlyos fejlődési rendellenességhez és embrionális letalitáshoz vezet (27). Jóllehet az egyes izoformák nagyfokú szekvencia homológiát mutatnak és bizonyos körülmények között képesek átvenni egymás funkcióját, a vitális folyamatokban betöltött szerepük, valamint a sejten belüli lokalizációjuk különbözik egymástól, amihez eltérő kinetikai tulajdonságok is társulnak. A nm2A és nm2B egyaránt részt vesz a sejtek adhéziójában, morfogenezisében, a sejtosztódás folyamatában, a sejtek migrációjában vagy a vezikuláris transzportban (28). Bizonyos sejtípusokban azonban szelektíven fordulnak elő az izoformák: vérlemezkékben vagy a lépben kizárólag nm2A, míg például idegszövetben túlnyomórészt nm2B található (29, 30).

1.1.2 A miozin ATPáz ciklus

A miozinok közös tulajdonsága, hogy katalizálják az ATP hidrolízisét és az így felszabaduló energiát mechanikai munka végzésére fordítják. Az ATP hidrolízis, az aktin kötés és az erő generálás több kinetikai lépésen keresztül valósul meg (**4. Ábra**), amelyek sebességi állandói jelentős eltérést mutatnak az egyes miozinok között. Az ATP kötése a miozinhoz nagy szabadenergia változással járó folyamat, ami alapján ez a reakció gyakorlatilag irreverzibilis (31, 32), a kötött ATP minden esetben hidrolizál ADP-re és szervetlen foszfátra (P_i). A hidrolízis termékei közül először a P_i , majd az ADP kerül kibocsátásra (33).



Current Opinion in Cell Biology

4. Ábra. Az aktomiozin ATPáz ciklus: ATP kötés (1); aktin disszociáció (2); ATP hidrolízis (3); aktin kötés (4); P_i kibocsátás, erő generálás (5); ADP kibocsátás (6). Módosítva (34) alapján

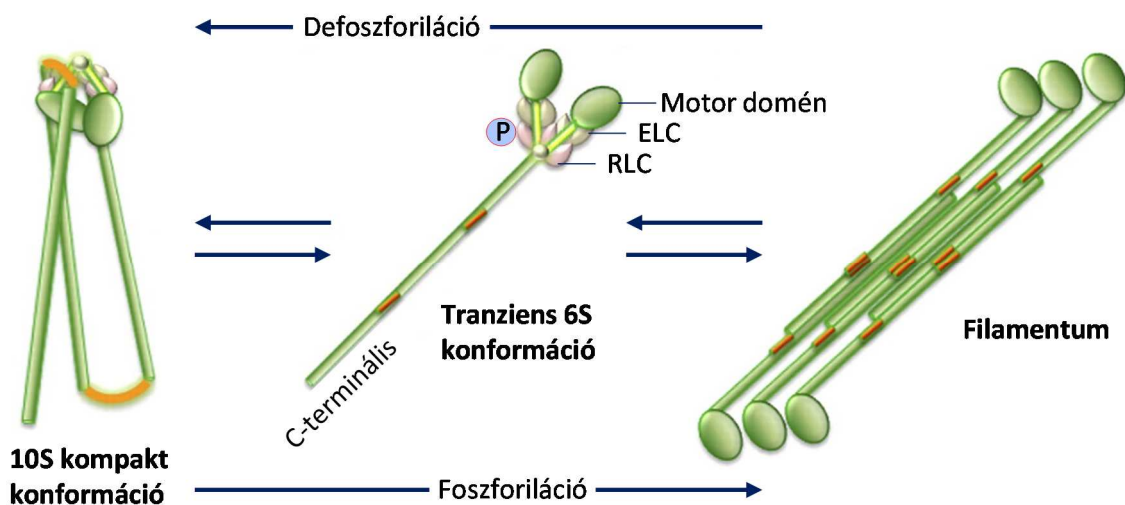
Aktin kötése a miozinhoz nagyságrendekkel megnöveli az ATPáz ciklus reakciósebességét. ATP hiányában az aktin és a miozin szoros komplexet alkot (ez az úgynevezett *rigor* állapot). ATP kötése lecsökkenti a miozin affinitását az aktinhoz, a fehérjék disszociálnak és a miozin fej konformáció változással az aktin filamentumra merőleges állapotba kerül (*pre-powerstroke*). Az ATP hidrolízise újra lehetővé teszi az aktin kötését, ami aztán egy alternatív kinetikai utat biztosít a hidrolízis termékeinek kibocsátására, fokozva ezáltal a miozin ATPáz aktivitását. A P_i kibocsátással egyidőben az eddig gyengén kötött aktin erősen kötött állapotba kerül a miozinnal és megtörténik az erő generálás (*power stroke*): a miozin fej konformáció változása elmozdítja a hozzá kapcsolódó aktin filamentumot. Végül az ADP kibocsátásával az aktin-miozin komplex újra rigor állapotba kerül és felszabadul az ATP-kötő zseb (34, 35).

1.2 FOSZFORILÁCIÓ ÉS DEFOSZFORILÁCIÓ

1.2.1 Könnyűlánc foszforiláció

A miozinok megfelelő működését az élő sejtben számos szabályozási folyamat teszi lehetővé. A vázizom miozinok funkcióját elsősorban a vékony filamentáris rendszerben található Ca^{2+} aktivált troponin-tropomiozin rendszer szabályozza (36), a simaizom és nem-izom miozin II regulációjában pedig a foszforilációnak és defoszforilációnak van kiemelt jelentősége. Ezen miozinok ATP hidrolizáló aktivitását elsősorban a regulatórikus könnyűlánc Ser19 aminosavának foszforilációja szabályozza, ami konformáció változást indukál a könnyűláncon és a konverter doménon, megnövelve ezáltal a miozin aktin-aktivált Mg ATPáz aktivitását és elősegíti a miozin filamentumok kialakulását (37, 38).

Fiziológias ionerő és ATP jelenlétében a foszforilálatlan állapotú simaizom és nem-izom miozin 10 S szedimentációs állandójú kompakt konformációt vesz fel, amely megakadályozza az aktin kötődését és a miozinok filamentumokká szerveződését. A RLC foszforilációja hatására a miozin fark doménje kiegyenesedik, 6 S konformációba megy át (5. *Ábra*). Ez az állapot lehetővé teszi a miozin molekulák összekapcsolódását, valamint az aktin kötődés révén az ATPáz aktivitás megnövekedését és erő generálását (39, 40).

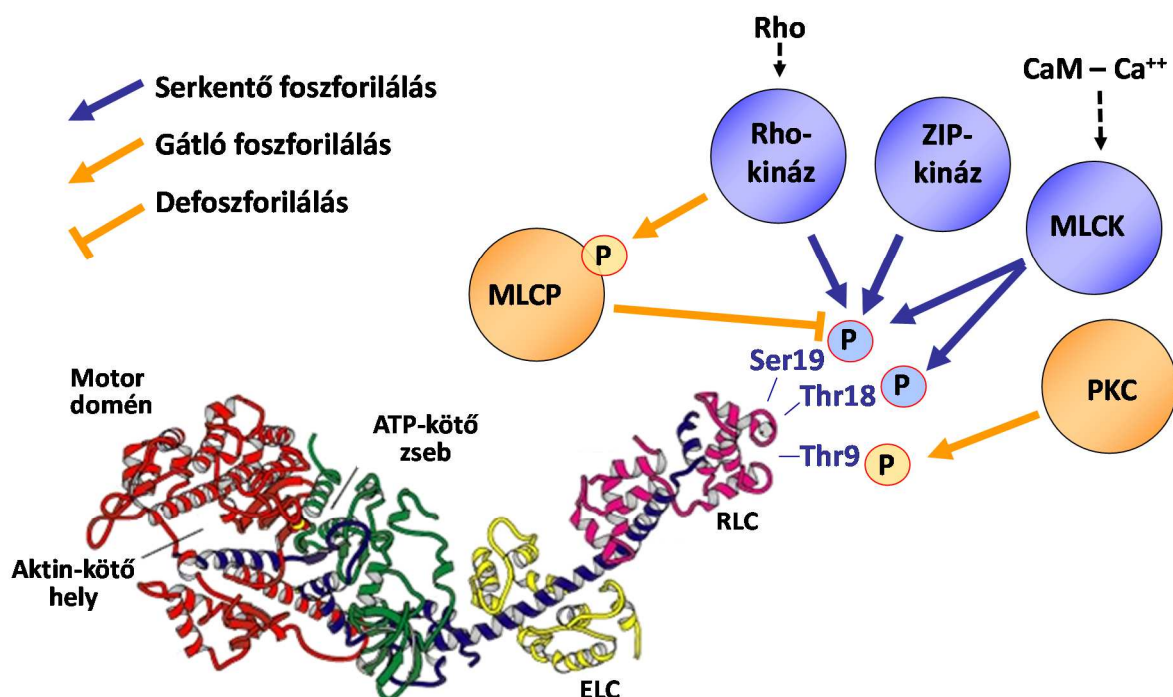


5. *Ábra*. Nem-izom miozin sematikus konformációs állapotai foszforiláció és defoszforiláció hatására. Módosítva (39) alapján.

Az aktiválásért több kináz enzim is felelős, amelyek közül az egyik legfontosabb a Ca^{2+} és kalmodulin (CaM) függő miozin könnyűlánc kináz (MLCK) (38), emellett Rho-kinázok, citron-kinázok ZIP-kinázok (41) is szerepet játszanak. Foszforiláció a kulcsfontosságú Ser19 mellett máshol is létrejöhet: a Thr18 foszforilációja tovább növeli az ATPáz aktivitást a telítés alatti aktin koncentrációk esetén (de nem növeli a V_{max} -ot) (42, 43). A foszforilációs folyamatok összetettségét jól példázza a Rho-

kináz, ami egyrészt foszforilálja, ezáltal aktiválja a miozint, másrészt foszforilálja, de ezáltal gátolja a miozin defoszforilálásáért, vagyis inaktiválásáért felelős miozin könnyűlánc foszfatázt (MLCP) (44, 45). Végeredményben az eltérő jelátviteli utak effektor enzimei agonista vagy antagonistá-gátló hatásuk révén képesek fokozni a miozinok aktivitását.

A foszforilációnak nemcsak aktiváló, hanem gátló funkciója is lehet a miozinra nézve: a protein kináz C például a Thr9 foszforilálásával csökkenti a Ser19-foszforilált miozin affinitását az aktinhoz, valamint gátolja a MLCK hozzáférését a regulatórikus könnyűlánchoz (46, 47). A nem-izom miozinok *in vivo* regulációja a foszforiláció és defoszforiláció komplex egyensúlyán alapul a különböző kinázok és a miozin könnyűlánc foszfatáz, illetve az azokat szabályzó hatások között (6. Ábra).



6. Ábra. A nem-izom miozin szabályzásában részt vevő fontosabb agonista (kék) és antagonistá (narancssárga) enzimek. Felhasználva a miozin S1 szerkezeti képét (48).

1.2.2 Nehézlánc foszforiláció

A regulatórikus könnyűlánc mellett a miozin nehézlánc is képes több ponton foszforilálódni. Miozin II foszforilációja a coiled-coil farok doménon megakadályozza a filamentumok kialakulását és partner fehérjékkel való intrakcióját (49). Egyes miozinoknál a motor domén foszforilációja is fontos szabályozó tényező lehet: pl. az *Acanthamoeba* miozin II foszforilációja az aktin-kötő hurok felszínén allosztérikusán lassítja a P_i felszabadulást, ezáltal az ATPáz aktivitást (50). Ennél is érdekesebb az N-terminális kináz doménnal rendelkező miozin III, amely a motor domén autofoszforilációja révén szabályozza az aktin affinitást és a munkaciklus arányt (51, 52). A nehézlánc foszforilációja a miozin16b

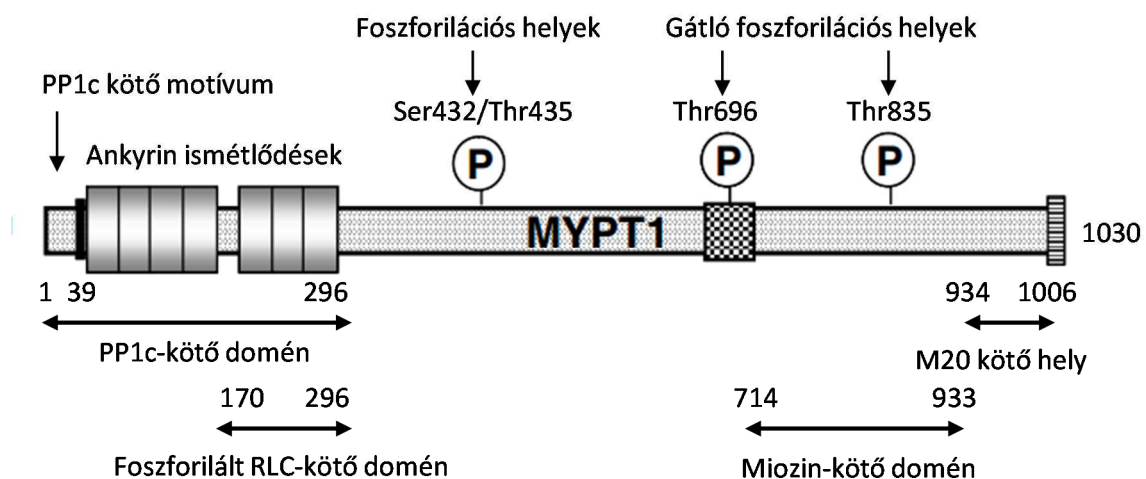
esetén is fontos funkcionális szereppel bír: elősegíti partner fehérjék kötődését, ezáltal aktiválja az IP3 jelátviteli utat (lásd alább).

1.2.3 Miozin defoszforiláció

A foszforilációhoz hasonlóan a vele ellentétes hatású defoszforiláció ugyanannyira esszenciális a sejt megfelelő működéséhez. A foszforilált Ser és Thr aminosavakat defoszforiláló protein foszfatáz enzimek két típusba, úgymint: PP1 és PP2 lehet sorolni a termostabil foszfatáz inhibitorral szembeni érzékenységük alapján (53). Általánosságban a protein foszfatáz holoenzim három alegységből áll: egy defoszforilációs aktivitásért felelős katalitikus alegységből (pl: PP1c), egy regulatórikus (más néven célzó) alegységből, valamint egy kis molsúlyú esszenciális alegységből.

Annak ellenére, hogy az élő sejtben alig néhány PP1c altípus fordul elő, a defoszforiláció nagyon specifikus és szigorúan szabályozott folyamat. A katalitikus alegység specificitásáért a nagy célzó alegység felelős, amelynek kanonikus kötőhelye magához köti a PP1c-t, illetve ezzel egyidőben a molekula másik része a szubsztrátot köti meg. A célzó alegység révén fizikai közelségbe kerülő enzim és szubsztrát között több nagyságrenddel felgyorsul a kémiai reakció (54).

A miozin foszfatáz (MLCP) heterotrimer holoenzim a miozin regulatórikus könnyűlánc defoszforilálását végzi, szerepe esszenciális például a simaizmok relaxációjához (55) és a miozin II filamentumok dinamikus mozgásához (56). A miozin foszfatáz a 38 kDa-os 1-es típusú katalitikus alegységből (PP1c), a 110 kDa-os nagy célzó alegységből (MYPT1) (7. Ábra) és egy 20 kDa-os esszenciális alegységből (M20) épül fel.



7. Ábra. A MYPT1 sematikus felépítése, foszforilációs- és fehérje-kötő helyei, az aminosav pozíciókkal. Módosítva (55) alapján.

A PP1c katalitikus alegység öt izoformája ismert, amelyek három génről íródik át: PP1 α_1 , PP1 α_2 , PP1 γ_1 , PP1 γ_2 és PP1 δ (más nomenklatura szerint PP1 β). Az izoformák az N- és C-terminálisukban

különböznek, középső régiójuk nagyfokban konzervált (55). *In vitro* az összes katalitikus alegység képes kötődni a MYPT1 célzó alegységhez, de az élő sejten belül a PP1c izoformáknak megvan a preferált lokalizációja. PP1c δ a miofibrillumokban a MYPT1-gyel komplexben a regulatórikus könnyűlánc defoszforilálásáért felelős, megtalálható továbbá a sejtmagban és a fokális adhéziókban is, de más célzó alegységgel komplexben. PP1c α a stressz rostokba lokalizálódik a MYPT1-gyel (57).

A MYPT1 regulatórikus alegység számos szövetben előfordul, legnagyobb mennyiségben simaizomban található (**7. Ábra**). A fehérje N-terminális vége 7 ankyrin ismétlődést tartalmaz (lásd később), amit megelőz a négy aminosavból álló KVxF kanonikus PP1c kötő motívum és az úgynevezett MyPhoNE szakasz, ezek így együttesen felelősek a PP1c kötéséért. Az ankyrin ismétlődések C-terminális végén található a defoszforilálható célmolekulát, vagyis a foszforilált miozin RLC-t rögzítő kötőhely. A MYPT1 azáltal, hogy interakciós felszint biztosít, egyrészt fizikai közelségbe hozza az enzimet és a szubsztrátot elősegítve ezáltal a katalitikus reakciót, másrészt a foszforilált RLC megkötése megnöveli a PP1c affinitását a szubsztráthoz (55). A miozin foszfatáz aktivitását szintén foszforiláció szabályozza: a MYPT1 foszforilációja az ankyrin ismétlődések területén gátolja az RLC-hez való kötődést, illetve további gátló foszforilációs helyek találhatóak a fehérje C-terminális felén.

1.3 NEM-KONVENCIONÁLIS MIOZIN XVI

A nem-konvencionális miozin XVI osztályba tartozó fehérje több szempontból is az érdeklődésünk középpontjába került. Egyrészt azon kevés miozinok egyike, amelyik a sejtmagban is megtalálható, ezért feltételezzük, hogy a sejtmag aktin hálózatának dinamikus átrendezésében, esetleg nukleáris transzportfolyamatokban játszhat szerepet. Másfelől a miozin XVI fehérjék N-terminális része nagyfokú hasonlóságot mutat a MYPT1 szerkezetével, ezért valószínűsíthető a részvétele a defoszforilációs szabályozó folyamatokban.

1.3.1 Egy új miozin család felfedezése

2001-ben Patel és munkatársai sejt motilitásért felelős motorfehérjéket kerestek migráló cerebelláris neuronokban és asztrocitákban, amikor egy új, nem-konvencionális miozint azonosítottak. A sejtvonalakból készített cDNS könyvtárakból PCR segítségével amplifikáltak szakaszokat, amihez a miozin motor domén konzervált régiója ellen tervezett degenerált primereket használtak. Az amplifikációt restriktions hasítás, illetve szekvenálás követte. Az eredményeket összevetve a mizonok korábban leírt filogenetikai családfájával (10), találtak – számos ismert miozin izoforma mellett – egy új szekvenciát, ami egyik ismert miozinnal sem mutatott homológiát, kivéve a konzervált motor

domént. Az új fehérjét először, mint „myr8a” tartották számon (patkány 8. nem-konvencionális miozin rövidítéseként), majd később besorolták, mint új miozin osztályt és a „miozin XVI” nevet kapta (58).

Ahogy az ezt követő vizsgálatok megállapították, a miozin XVI-nak két splicing variánsa fordul elő. A rövidebb citoplazmatikus izoformát miozin 16a-nak (Myo16a) nevezték. A miozin XVI család predomináns izoformája a mintegy 590 aminosavval hosszabb miozin 16b (Myo16b), aminek a C-terminális elongációja felelős a nukleáris lokalizációért (59). Miozin 16b legnagyobb mennyiségben az agyban és néhány perifériás idegszövetben található meg, azon belül is leginkább a fejlődési időszakokban. A vizsgálatokat döntően patkányokon végezték, ahol a Myo16b az 1–2. posztnatális héten expresszálódik, ami egybeesik a neuronális migrációval, az axonok hosszabbodásával és a dendritok elaborációjával (58).

1.3.2 Miozinok N-terminális extenzióval

A legtöbb miozin szerkezete a motor doménnel kezdődik a polipeptid lánc N-terminálisán, de néhány típus rendelkezik a motor domén előtt található N-terminális extenzióval. Ilyen szerkezeti elem csak a III, IX, XII, XV és XVI osztályú miozinoknál fordul elő (4), és ezek között is nagy eltérések találhatóak mind szekvenciában, mind a feltételezett funkcióban.

Miozin IX esetén az N-terminális extenzió horgonyként rögzíti a monomer miozint az aktin filamentumhoz, elősegítve ezáltal annak processzív mozgását (60). A miozin XV PDZ-doménje a fehérje-fehérje interakciókért felelős (61), ezenkívül a pre-motor domén részt vehet jelátviteli folyamatokban (62), vagy az intracelluláris szabályozásban, mint például a miozin III kináz doménje (63).

Miozin XVI N-terminális extenziója eltér minden korábban leírt pre-motor doméntól: a mintegy 400 aminosav hosszúságú szekvencia – miozinok között egyedülállóan – ankyrin² ismétlődéseket tartalmaz. A miozin XVI legnagyobb hasonlóságot a miozin III osztállyal mutatja. A DNS szekvencia kezdő ATG kodonja megfeleltethető a miozin III osztály Met1 kodonjának a lokalizációjával. A Met251 megfeleltethető a miozin IX osztály, míg a Met385 a miozin I osztály kezdő ATG kodonjával.

1.3.3 Miozin XVI szerkezete

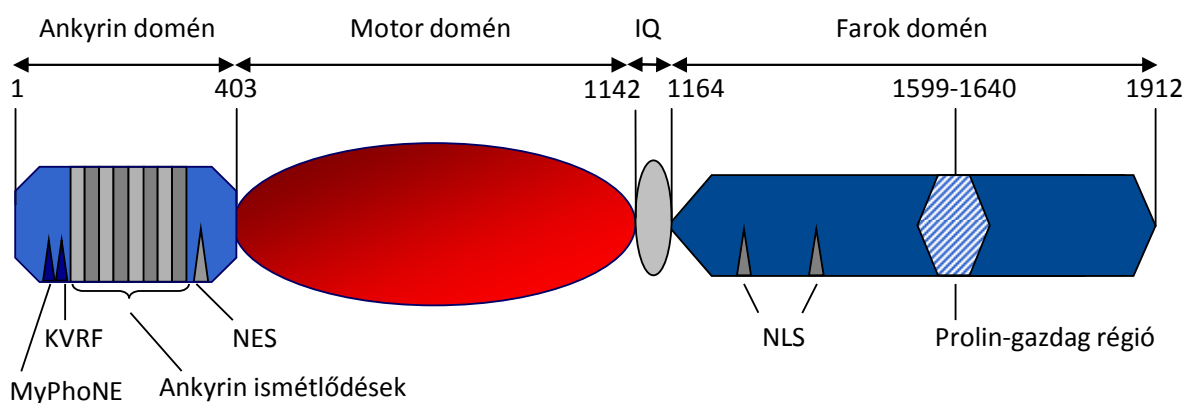
A Myo16a, a rövidebb izoforma DNS szekvenciája 3969 bázispárból áll, ami 1322 aminosavnak felel meg, míg a hosszabb miozin 16b 590 aminosavval hosszabb a polipeptid lánc C-terminálisán (összesen

² Félreértések elkerülése végett jelen írásban az „ankyrin” a membrán alatti nagyméretű fehérjék családját jelenti. Az általunk vizsgált fehérje a „miozin 16b ankyrin-tartalmú domén”, röviden „ankyrin domén” vagy „My16Ank”, ami mindkét fehérjében előforduló konzervált „ankyrin ismétlődéseket”, másnéven „ankyrin motívumokat” tartalmaz.

5736 bázispár, 1912 aminosav), de a szekvencia többi része identikus a Myo16a-val. Ez alapján kijelenthető, hogy a Myo16a tulajdonképpen a Myo16b farok nélküli variánsa (**8. Ábra**).

Néhány miozin család rendelkezik speciális funkciójú N-terminális extenzióval a motor domén előtt. A miozin XVI pre-motor doménje eltér minden korábban leírt miozinban megtalálható doméntól, ugyanis egyedülálló módon nagyfokú hasonlatosságot mutat az ankyrin membrán alatti fehérje domén szerkezetével: tartalmaz nyolc nagymértékben konzervált ismétlődő szekvencia elemet, úgynevezett *ankyrin ismétlődéseket* (lásd később).

Közvetlenül megelőzve az ankyrin ismétlődéseket egy négy aminosavból álló KVxF motívum található, ami a protein foszfatáz 1 katalitikus alegységének (PP1c) a kanonikus kötőhelye, a polipeptidlánc N-terminálisán pedig egy másik motívum az úgynevezett MyPhoNE (miozin foszfatáz N-terminális elem) található. Az utolsó ankyrin ismétlődés egy feltételezett szumoilációs szignált (LKAE aminosav négyes) tartalmaz, amit a Sumosp 2.0 prediktor program segítségével találtunk (64), illetve az ankyrin ismétlődés és a motor domén között egy nukleáris export szignál (NES) is megtalálható.



8. Ábra. Miozin 16b sematikus szerkezeti képe az aminosav pozíciókkal.

A motor domén hasonló a többi ismert miozinhoz, tartalmazza az ATP- és az aktin-kötő helyeket. Ahogy korábban leírták: patkányagy sejtizátummal végzett koszedimentáció eredményeként a Myo16b ATP függő módon ülepedik az aktin filamentumokkal (58).

A rövid nyaki régió egyetlen IQ motívumot tartalmaz, ami – más miozinok esetén – általában kalmodulein kötésére szolgáló hely (11). Jelenleg nem áll rendelkezésünkre információ arról, hogy mi lehet a miozin XVI könnyűlánc, pedig ennek az ismerete a szabályozás megértése szempontjából elengedhetetlen lenne. Legutóbbi kutatások azt látszanak alátámasztani, hogy a nem-konvencionális miozinokban megtalálható IQ motívum nem kizárólagosan kalmodulein kötésért, hanem például miozin regulatórikus könnyűlánc (RLC) kötésért is felelős lehet (65, 66).

Általában a farok domén a leginkább eltérő a különböző miozin osztályok között. A Myo16b farok doménje nem tartalmaz coiled-coil motívumot (kimutatva Paircoil2 bioinformatikai program segítségével (67)), ami alapján valószínűsíthető, hogy ez a miozin nem képes dimerizálódni és

monomerként funkcióképes. A farok domén tartalmaz egy hosszabb prolin-gazdag régiót, ami feltételezhetően a profilin aktin-kötő fehérje rögzítésére szolgál (68), valamint két nukleáris lokalizációs szignált (NLS), amelyeknek azonban nincs szerepe a Myo16b magba történő bejuttatásában. A farok domén magas prolin tartalma, ami a teljes farok doménre 15,5 %, de a Pro-gazdag régióban megközelíti az 50 %-ot (Expasy, (69)), eleve lehetetlenné teszi stabil másodlagos szerkezet kialakítását a polipeptidláncon. Bioinformatikai analízis alátámasztotta, hogy nagy valószínűséggel – néhány kisebb szakaszt leszámítva – a teljes farok domén rendezetlen szerkezetű (IUPRED, (70)). A fontosabb szekvenciaelemek pozíciója és aminosav motívuma az **1. Táblázat**ban található.

Aminosav pozíció	Motívum	Funkció
1-1912		Miozin 16b
1-1322		Miozin 16a
1-402		Pre-motor domén
1	M	hasonló pozíció, mint a miozin III. osztály kezdő Met
251	M	hasonló pozíció, mint a miozin IX. osztály kezdő Met
385	M	hasonló pozíció, mint a miozin I. osztály kezdő Met
24-31	RxxQIKxY	MyPhoNE szekvencia
53-55	SQK	PKC foszforilációs hely*
55-58	KVxF	PP1c kötő motívum
59-316		Ankyrin ismétlődések (8)
305-308	LKAE	SUMOilációs hely*
340-349	LxxLxxLxL	Nukleáris export szignál (NES)
403-1142		Motor domén
497-504	GERGSGT	ATP kötő hely
1061-1069	LxxLxxLxL	Nukleáris export szignál (NES)
1034-1044	SPHFILCVKPN	Aktin kötő hely
1153-1164	CQKVIRGFLARQ	IQ motívum
1165-1912		Farok domén
1289-1295	PPPKPKR	Nukleáris lokalizációs szinál (NLS)
1340-1346	PPPKPKR	Nukleáris lokalizációs szinál (NLS)
1441	Y	Foszforilálható Tyr
1599-1640		Prolin-gazdag régió
1616-1912		Nukleáris lokalizációra képes legrövidebb szakasz

1. Táblázat. Myo16b aminosav szekvenciája, R. norvegicus, Q9ERC1.1 (*prediktált funkció)

1.3.4 Miozin XVI feltételezett funkciói

Egyelőre kevés információval rendelkezünk arról, hogy a közelmúltban felfedezett miozin XVI, egyedi szerkezeti elemei révén, milyen élettani folyamatokban játszhat szerepet. A miozin XVI a törzsfajlódás során az emlősökben jelent meg, ott is viszonylag későn (71), ez is valószínűsíti, hogy szerepe inkább speciális funkciók ellátására alakult ki.

A predomináns Myo16b izoforma legnagyobb mennyiségben az agyban és néhány perifériás idegszövetben expresszálódik, azon belül is elsősorban az idegrendszer érési időszakában (patkányoknál ez az utolsó embrionális és 1–2. posztnatális hetekre esik, ami a neuronális migráció, az axonok hosszabbodásának és a dendritek elaborációjának az időszaka (58). Az idegsejtekben a Myo16b két populációba rendeződik: egy membránhoz kötött, valamint egy citoplazmatikus frakció különíthető el.

1.3.4.1 Lokalizáció az élő sejtben

A Myo16b élő sejtben belüli elhelyezkedését Cameron és munkatársai vizsgálták (59). Modell rendszerként Cos7 sejteket transzfektáltak GFP-fúzionált Myo16b-vel, illetve annak különböző fragmentumaival. Kísérleteik eredménye azt mutatta, hogy a Myo16b megtalálható a citoplazmában, ahol a plazmamembránhoz és a perinukleáris citoplazmába lokalizálódik, valamint a sejtmagban, ahol felhalmozódik a sejtciklus G1, S és G2 fázisában, de nem asszociálódik sem kromoszómákhoz, sem a mitotikus orsóhoz. A fark nélküli Myo16a szinte kizárólag citoplazmában fordul elő.

Az ankyrin domén eltávolítása esetén a maglokalizáció fokozódott, de érdekes módon önmagában az ankyrin domén szinte kizárólag a sejtmagba illetve a magvacskába lokalizálódott. Ez alapján az ankyrin doménnek kettős szerepet feltételeztek: a citoplazmában gátolja a nukleáris importot, míg a sejtmagban a nukleoluszba irányítja a Myo16b-t. Az ankyrin ismétlődések és a motor domén között található konszenzus leucin-gazdag régiót nukleáris export szignálként (NES) azonosítottak. Amikor leptomicin B-vel gátolták az exportint, ami a NES-tartalmú fehérjék sejtmagból történő kiszállításáért felelős (72), a Myo16b mennyisége növekedett a sejtmagban, ami arra enged következtetni, hogy a Myo16b nukleocitoplazmatikus lokalizációja regulált folyamat eredménye.

A különböző hosszúságú Myo16b fragmentumok transzfektálásának az eredménye azt mutatta, hogy a legrövidebb szakasz, ami még önállóan is képes a nukleáris lokalizációra: a fark domén utolsó mintegy 300 aminosava. Ez egyfelől magyarázza a Myo16a kizárólagos citoplazmatikus elhelyezkedését, másfelől azt is jelenti, hogy a két nukleáris lokalizációs szignál (NLS) az 1289-1295 és 1340-1346 aminosav pozíciókban funkcionálisan inaktív, azok nem szükségesek a nukleáris importoz.

1.3.4.2 Sejtciklus szabályozás

A sejtmag különböző alkotóelemeit vizsgálva, a Myo16b kolokalizációt mutatott a proliferáló sejt nukleáris antigénnel (PCNA) és a ciklin A-val. A PCNA számos fontos nukleáris funkció központi eleme: részt vesz többek között a DNS replikációban, a sejtciklus kontrollálásában vagy a kromatin átrendeződésében (73). A PCNA a sejtciklus S-fázisában gyűlik a magba, ahol a ciklin A-val asszociálódik, ami szintén részt vesz a DNS megkettőződésében (74). Amennyiben a Myo16b-t túlexpresszálják: a sejtek nagyobb része marad S-fázisban és késik a G2 fázisba történő átmenet (59). Ezek alapján valószínűsíthető, hogy a Myo16b-nek jelentős szerepe lehet a sejtproliferációban és a sejtciklus szabályozásában.

1.3.4.3 Aktin/profilin kötés

Amint az a miozinok egyik esszenciális tulajdonsága: a miozin XVI motor domén ATP függő módon képes kötődni az aktin filamentumokhoz. Patel és munkatársai agyszövetből készített lizátumot koszedimentáltattak aktin filamentumokkal és a Myo16b csak abban az esetben ülepedett le, amikor az ATP-t hexokináz segítségével elvonták a rendszerből (58).

Sejtkultúrán végzett kísérletekben a motor domén mellett az izoláltan bejuttatott farok domén is kolokalizálódott a filamentáris aktin struktúrákkal. A Myo16b farok domén középső része prolinban gazdag régiót tartalmaz, ami a kanonikus profilin kötő hely (68). A Myo16b kolokalizációt mutatott a profilinnal is, sőt valószínűsíthető, hogy a Myo16b farok domén a profilinen keresztül képes kötődni az aktinhoz. Cameron és munkatársai feltételezték, hogy a Myo16b egyik lehetséges funkciója az aktin polimerizációs dinamikájának szabályozása a profilin kötésén keresztül.

1.3.4.4 Jelátvitel és foszforiláció

Egyre több adat támasztja alá azt a feltételezést, hogy a Myo16b fontos szerepet játszhat az idegsejtek fejlődési szakában. Korábban már leírták, hogy a Myo16b legnagyobb mennyiségben a posztnatális időszakban expresszálódik, elsősorban a központi idegrendszer szöveteiben (58). Újabban kiderült, hogy a Myo16b a NYAP fehérjecsaládba tartozik: ezen fehérjék közös tulajdonsága, hogy tirozinon foszforilálódva aktiválják a foszfoinozítid-3-kináz (PI3K) közvetítette jelátviteli utat.

A Myo16b a farok doménjén található két tirozin (Tyr1415 és Tyr1441) foszforilációját követően adaptor fehérjékhez kapcsolódva szabályozza a PI3K jelátviteli utat, együttesen aktiválva a WAVE-komplexet, ami az aktin citoskeletális hálózat átrendeződéséhez vezet, elsősorban az Arp2/3-függő aktin polimerizáció révén (75).

1.3.4.5 Miozin 16 szerepe humán kórképek hátterében

A PI3K jelátviteli út alapvető fontosságú az idegrendszer megfelelő működéséhez, zavara számos neurológiai és pszichiátriai kórkép hátterében fellelhető (76). A fentiek alapján joggal feltételezték a

Myo16 szerepét az idegrendszer korai fejlődésével összefüggő kórképekben. Genetikai vizsgálatok szignifikáns összefüggést mutattak ki a Myo16 gén variációja és a skizofrénia között (77), míg a Myo16 gén delécióját autizmus hátterében írták le (78).

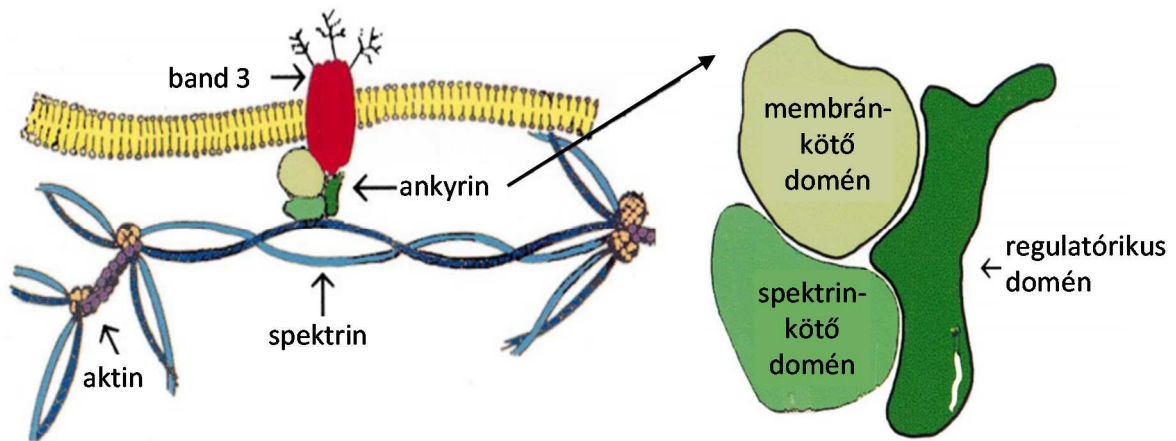
1.3.5 Miozin 16b homológia a MYPT-tel

A miozin XVI osztályba tartozó fehérjék N-terminális pre-motor extenziója számos, más miozinnál nem található szekvenciaelemet tartalmaz: miozin foszfatáz N-terminális elemet (MyPhoNE), KVxF konszenzus motívumot, nyolc ankyrin ismétlődést, valamint egy PKC foszforilációs helyet. Jóllehet ez az ankyrin domén más miozinokkal nem, viszont a miozin foszfatáz holoenzim célzó alegységével nagyfokú hasonlóságot mutat. Patel és munkatársai in vivo koimmuno-precipitációval kimutatták, hogy a Myo16b (amint az a szekvencia homológia alapján várható volt) kötődik a miozin foszfatáz katalitikus alegységeihez: a PP1 α és PP1 γ -hoz. Feltételezésük szerint a Myo16b szállíthatja a PP1c alegységeket a sejtmagba (58).

1.3.6 Ankyrinek

A miozin XVI osztályba tartozó fehérjék N-terminális doménje ankyrin ismétlődéseket tartalmaz. Jóllehet a miozin családok között ez egyedülállóan csak itt található meg, az élővilágban ez a harmadik leggyakoribb konzervált motívum, ami a vírusoktól az emberig minden élőlényben előfordul. Megtalálhatóak többek között a ciklin-dependens kináz (CDK) inhibitorokban, a transzkripció szabályozásban, citoskeletális átrendeződésért felelős fehérjékben, fejlődési folyamatok irányításában, vagy éppen a toxinokban; előfordulnak a sejtmagban és a citoplazmában éppúgy, mint az extracelluláris milióban (79). Ha jellemezni szeretnénk a Myo16b ankyrin doménjét, amivel közvetve az egész fehérje funkciójára következtethetünk, szükséges megismernünk az ankyrin motívumok szerkezetét és tulajdonságait.

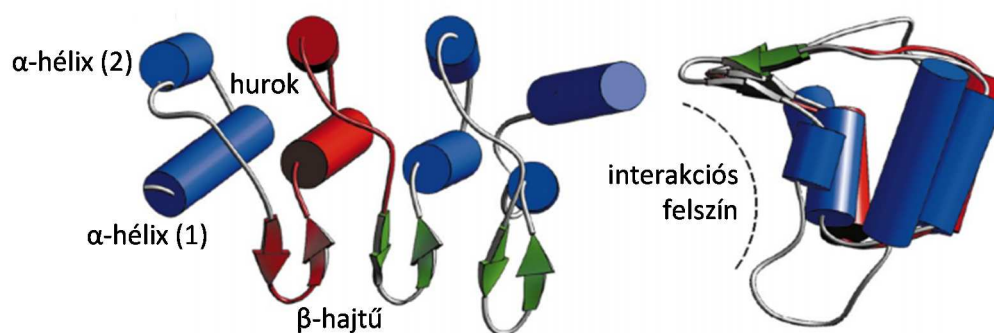
Az ankyrin ismétlődéseket először az ankyrin nevű, nagy méretű membrán alatti fehérjecsaládban írták le. Az ankyrin fehérje, mely nevét a görög „ankyra”, azaz „horgony” szóból kapta, a szubmembranózus régióban rögzíti a membránfehérjéket a citoskeletális hálózathoz (80). A mintegy 206-220 kDa-os, multi-domén szerkezetű fehérje N-terminális doménje 24 ankyrin ismétlődést tartalmaz és ez felelős a membránfehérjék, például a Na-csatornák, Na⁺/K⁺ ATPáz, ryanodin receptor, PKC vagy egyéb sejt adhéziós molekulák rögzítéséért a spektrin-aktin hálózathoz, az intermedier filamentumokhoz vagy a mikrotubulusokhoz (81).



9. Ábra. Az ankyrin fehérje sematikus képe és elhelyezkedése a membrán alatti régióban (81).

Az ankyrin ismétlődések alapegysége az élővilágban előforduló egyik leggyakoribb fehérje szekvencia motívum. A konszenzus ankyrin motívum 33 aminosavból épül fel, amelyek közül 15 nagyfokban konzervált: GXTPLHXAAXXGHXXXV/AXXLLXXGAXXN/DXXXXX, térszerkezete jellemzően β -hajtú – α -hélix – hurok – α -hélix elrendeződést mutat. Az ankyrin motívumok klaszterekbe szerveződve fordulnak elő, a tandemszerű ismétlődések száma a különböző fehérjék között 2 és 20 között változhat. A fő funkciója ennek a konzervált motívumnak a fehérje-fehérje interakciók elősegítése (82, 83). Jóllehet az ankyrin ismétlődések szerkezete meglehetősen konzervált, a kötő partnerek tekintetében nagyfokú variabilitást mutat, aminek oka a térszerkezet kialakításával magyarázható.

A tandemszerűen elrendezett ankyrin motívumok kialakítanak egy interakciós felszínt, ahol a variábilis szerkezetű β -hajtú régió játsza a legfontosabb szerepet a különböző fehérjék specifikus felismerésében és megkötésében (10. Ábra).



10. Ábra. 4 tandem motívumot tartalmazó ankyrin ismétlődés sematikus térszerkezeti képe „felülnézetben” és „oldalnézetben”. Módosítva (79) alapján.

1.4 GFP-JELÖLT MIOZINOK

A különböző fehérjék *in vivo* sejten belüli elhelyezkedését gyakran vizsgálják fluoreszcens fehérjékkel fuzionált konstrukciók bejuttatásával. Ezeknek a vizsgálatoknak a feltétele, hogy a fluoreszcens, fúziós fehérje élettani tulajdonságaiban megegyezzen a natív analógjával. Miozinok *in vivo* nyomkövetésére alkalmazhatnak GFP-vel (vagy rokon fehérjékkel) fuzionált nehézláncot (84), de elterjedt a könnyűlánc jelölése az N- vagy a C-terminálisokon. Mivel a könnyűlánc univerzális a miozin II családban, a könnyűlánc jelölésének az előnye, hogy különböző nehézláncokat illetve azok mutációit is jelölni lehet egyetlen fluoreszcens konstrukcióval. Bakulovírus expressziós rendszerben pedig a miozin nehéz lánc koexpresszálható és kopurifikálható a különböző könnyűláncokkal. Nem-izom miozin II vizsgálata esetén a sejtekbe bejuttatott GFP-fúziós RLC tranziensen expresszálódik és kicserélve az endogén RLC-t követhetővé válik a miozinok lokalizációja vagy mozgása (85–88). Kimutatták, hogy a C-terminális GFP-jelölt RLC képes *in vivo* foszforilálódni, foszforiláció hatására aktiválódni és beépülni a miozinokba (86). Nem vizsgálták viszont, jóllehet alkalmazták (87), az N-terminális GFP-fúziós RLC-t tartalmazó miozinok kinetikai tulajdonságait. Munkánkban többek között arra voltunk kíváncsiak, vajon a 28 kDa-os GFP, fuzionálva a 20 kDa-os regulatórikus könnyűlánc N-terminálisára, befolyásolja-e a nem-izom miozin II normális működését és regulációját.

2 KÉRDÉSFELVETÉS

Munkánk során a különböző családba tartozó miozinok foszforilációs/defoszforilációs szabályozási folyamatainak néhány fontos aspektusát tanulmányoztuk.

Elsőként a nem-izom miozin II-t vizsgáltuk úgy, hogy a szabályozásért felelős regulatórikus könnyűláncot GFP-vel fúzionáltuk az N-terminálison. Azt szeretnénk volna megérteni, hogy:

- hogyan befolyásolja a GFP-RLC a miozin motor funkcióját;
- megfelelő szubsztrát-e a GFP-RLC a foszforilációért elsősorban felelős MLCK-nak.

Kutatásainkban a nem-konvencionális miozin XVI biológiai funkcióját is vizsgáltuk, abból a szempontból, hogy az N-terminális ankyrin domén (My16Ank) hogyan vesz részt a szabályozási folyamatokban. A következő kérdésekre kerestük a választ:

- hogyan vesz részt a My16Ank a miozin motor funkció szabályozásában?
- köti-e közvetlenül a My16Ank a miozint illetve az aktint?
- milyen a My16Ank interakciója a PP1c izoformáival?
- hogyan befolyásolja a My16Ank a PP1c defoszforilációs aktivitását?

3 MÓDSZEREK

3.1 BIOINFORMATIKAI ANALÍZIS

Kísérleteink során felhasznált fehérjék moláris tömegét és extinkciós koefficiensét az ExpASY szerver ProtParam programjával határoztuk meg (<http://web.expasy.org/protparam/>) (69). Szekvencia homológiát ismert célmolekulák között NCBI Blast webes applikáció segítségével kerestünk (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) (89).

A My16Ank konstrukció megtervezéséhez felhasználtuk a NCBI Protein adatbázisban elérhető szekvencia információt (UniProtKB: Q9ERC1.1, GI #: 81868287). A My16Ank kódoló DNS szekvenciát (Gene ID: 192253) OptimumGene™ kodon optimalizáló program segítségével adaptálták az *E. coli* expressziós rendszer tRNS kodon készletéhez (GenScript, Piscataway, NJ, USA) (90).

A Myo16b lehetséges szerkezetének és funkciójának előzetes becslését bioinformatikai programokkal végeztük. Dimerizálódó miozinokra jellemző coiled coil motívumot Paircoil2 program segítségével kerestünk (<http://groups.csail.mit.edu/cb/paircoil2/>) (67). A fark domén rendezetlen szerkezetét IUPRED program valószínűsítette (<http://iupred.enzim.hu/>) (70). Poszt-transzlációs módosításokat és ismert motívumokat PROSITE programmal kerestünk (<http://prosite.expasy.org/>) (91, 92). Feltételezett SUMOylációs helyet SUMPsp web szerver segítségével találtunk (<http://sumosp.biocuckoo.org/>) (64). A predikciós eredmények nagyrészt a bevezetésben kerültek említésre, a Myo16b szerkezeti leírásánál.

A fehérjék térszerkezeti képét a PDB adatbázisból vettük és Cn3D 4.3.1 programmal szerkesztettük (93).

3.2 REKOMBINÁNS FEHÉRJÉK TERVEZÉSE ÉS ELŐÁLLÍTÁSA

3.2.1 Klónozás

A GFP-nmHMM2A konstrukcióhoz szükséges miozin regulatórikus könnyűláncot (RLC) egér cDNS könyvtárból nyertük ki PCR amplifikációval, a felhasznált 5' primer BglII, míg a 3' primer PstI restriktív helyeket tartalmazott. A BglII-RLC-PstI fragmentumot pEGFP-C1 (Clontech) plazmidba klónoztuk BamHI és PstI helyek közé. Az így kapott GFP-SGLRS(linker)-RLC fúziós szekvenciát pFastBac1

(Invitrogen) bakulovírus shuttle plazmidba klónoztuk. A végső plazmid konstrukción elvégzett DNS szekvenálás igazolta, hogy a PCR amplifikációk nem változtatták meg az RLC szekvenciáját³.

A koexpresszióhoz szükséges nmHMM2A-t, illetve ELC-t tartalmazó pFastBac1, valamint a vad típusú RLC-t és ELC-t együttesen tartalmazó pFastBac-Dual plazmid, illetve a belőlük létrehozott bakulovírus törzsoldatok a rendelkezésünkre álltak⁴. A vírus törzsoldatokból plakk tisztítás segítségével új klónt izoláltunk, amit P4-P5 generációig felszaporítottuk (4-5 passzázs), majd plakk esszé segítségével titráltuk (Invitrogen protokoll).

A miozin 16b ankyrin domén (My16Ank) DNS szekvenciáját (Gene ID: 192253, *Rattus norvegicus*, aminosav pozíció: 1–402) *E. coli* expressziós rendszerhez való optimalizálás után pGS21a plazmidba klónozva rendeltük (GenScript, Piscataway, NJ, USA). Az egyszerűbb tisztíthatóság érdekében a rekombináns My16Ank szekvenciát átklónoztuk GST-taget tartalmazó pGEX-6P-1 expressziós plazmidba. A 3' primer egy Sall, az 5' primer egy EcoRI restrikciós hasító helyet tartalmazott valamint egy TEV proteáz felismerési mintázatot: ExxYxxQG/S, esetünkben ENLYFQG aminosav szekvenciát. Az így kapott GST-(TEV)-My16Ank fúziós DNS szekvenciát tartalmazó plazmidot ER25.66 kompetens sejtekbe transzformáltuk.

3.2.2 NmHMM2A expressziója és tisztítása bakulovírus/Sf9 rendszerben

A GFP-fúziós RLC-t tartalmazó nem-izom miozin HMM2A-t (GFP-nmHMM2A) bakulovírus/Sf9 expressziós rendszerben állítottuk elő. A log fázisú (~1-2 x 10⁶ /ml sejtszámú, > 95% viabilitású) Sf9 sejt kultúrát három különböző: a nehézláncot és a kétféle könnyűláncot tartalmazó bakulovírussal fertőztük, a vírus oldatok optimális mennyiségét a korábban megállapított titerük alapján számítottuk. GFP-nmHMM2A konstrukcióhoz humán nem-izom miozin HMM2A nehézláncot koexpresszáltunk egér GFP-RLC-vel valamint szarvasmarha ELC-vel. A kontrollként használt vad típusú HMM2A (WT-nmHMM2A) esetén a nehézláncot vad típusú RLC-t és ELC-t együtt tartalmazó bakulovírussal koexpresszáltuk (94). A fertőzött sejteket 72 óra elteltével szedimentáltuk (1000g, 10 perc, RT) és folyékony nitrogénben történő fagyasztás után –80 °C-on tároltuk.

HMM2A tisztításakor a korábban leírt protokollt követtük (22). Az egyszerű és hatékony tisztítás érdekében a HMM2A nehézlánc C-terminálisa Flag epitópot (DYKDDDDK aminosav szekvencia) tartalmazott. A felolvasztott sejt pelletet lízis pufferben (0,5 M NaCl, 10 mM MOPS (pH 7,3) 10 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 3 mM NaN₃, 2 mM ATP, 0,1 mM PMSF, 0,1 mM DTT, 5 µg/ml leupeptin és proteáz inhibitor keverék (Invitrogen)) extraháltuk és homogenizáltuk. A sejttörmelékét ultracentrifugálással

³ A GFP-RLC konstrukciót Wendy A. Wolf készítette (NIH) (143)

⁴ A Flag-tagelt nmHMM2A, valamint az RLC/ELC-t együttesen tartalmazó bakulovírus konstrukciókat Kovács Mihály (NIH) készítette (123)

(46.000 g, 20 perc, 4 °C) választottuk el az oldható komponensektől, amely a HMM2A-t is tartalmazta. A könnyűláncokat tartalmazó HMM2A-t Flag affinitás kromatográfia segítségével választottuk el a többi fehérjétől. Az M2 Flag-antitesteket tartalmazó affinitás gél (Sigma) specifikusan megkötötte a Flag epitópokat (1 óra óvatos rázatás, 4 °C-on) , majd 0,5 M NaCl-t és 2 mM ATP-t tartalmazó HMM-puffer (10 mM MOPS, pH 7,3, 1 mM EGTA, 1 mM DTT) segítségével eltávolítottuk az aspecifikusan kötődő fehérjéket valamint a miozinhoz esetlegesen kapcsolódó aktint. Az affinitás gél HMM-pufferrel történő többszöri mosása után a HMM2A-t 0,3 mg/ml Flag peptiddel eluáltuk a gyöngyökről, majd MonoQ-Sepharose ioncserélő kromatográfiával koncentráltuk, FPLC segítségével (Akta, Amersham). A peak frakciókat HMM-pufferben dializáltuk és felhasználásig jégen tároltuk.

3.2.3 My16Ank expressziója és tisztítása *E. coli* rendszerben

GST-(TEV)-My16Ank fúziós fehérjét tartalmazó pGEX-6P-1 plazmidot ER25.66 *E. coli* kompetens sejtekbe transzformáltuk, majd a plazmidot felvett sejteket 1 µg/ml Ampicillint tartalmazó LB-táppoldatban szaporítottuk 37 °C-on. Amikor a sejtszuszpenzió elérte a 0,5 OD₆₀₀ abszorbancia értéket, a sejteket gyorsan lehűtöttük, majd 0,1 mM IPTG-vel történő indukciót követően 16 °C-on expresszáztattunk. Kb. 20 óra elteltével a sejteket lecentrifugáltuk (6000 g, 10 perc, 4 °C), PBS-pufferrel átmostuk, majd folyékony nitrogénben fagyasztottuk és felhasználásig –80 °C-on tároltuk.

A fehérje tisztítás minden lépése 4 °C-on történt. A fagyasztott pelletet felolvasztás után Lizis pufferben (PBS-puffer, pH 7,4, komplettálva: 140 mM NaCl, 1 mM DTT, 0,2 mM PMSF és 1 % triton X-100 detergenssel) extraháltuk és homogenizáltuk. Majd szonikálást (4x1 perc, 1 s impulzusok, 80 % amplitudo) követően 20 µg/ml DNázst és 10 mM MgCl₂-t adtunk a mintához és két órán keresztül rotorackon ráztattuk. A sejtörmelékét ultracentrifugálással távolítottuk el (20000 g, 20 perc), majd a felülúszóhoz GSH-gyöngyöket és 5 mM DTT-t adtunk (~ 6 ml / 1 l sejtszuszpenzió) és 3 órán keresztül óvatosan ráztattuk. 3 óra múlva a gyöngyöket oszlopra töltöttük és Mosó-pufferrel (PBS, pH 7,4, 1 mM DTT, 0,2 mM PMSF) öblítettük, majd az oszlopra kötött fehérjét redukált GSH-t tartalmazó Eluáló-pufferrel (50 mM Tris, pH 8,0, 10 mM GSH) oldottuk le és gyűjtöttük frakciókba. Az abszorbancia mérés alapján meghatározott peak frakciókhoz TEV proteázt⁵ adtunk 50:1 OD arányban és éjszakán át emésztettük (95).

A GST-tagról levágott My16Ank-t anioncserélő kromatográfiával választottuk el a GST-től és a TEV proteáztól. A Q-sepharose oszlopra FPLC (Biorad) segítségével vittük fel a mintát és eluáltuk emelkedő NaCl grádiens segítségével. A My16Ank peak frakciókat Amicon koncentráló csövekkel bekoncentráltuk, HMM-pufferben vagy 5 mM Tris pufferben dializáltuk és felhasználásig jégen tároltuk.

⁵ A His-taget tartalmazó rekombináns TEV proteázt Huber Tamás (PTE) expresszálta és tisztította

3.2.4 A kísérletek során felhasznált többi fehérje előállítása

Aktin és vázizom miozin HMM (skHMM) kinyerése és tisztítása nyúl m. psoas és m. longissimus dorsiból a korábban leírt és rutinszerűen alkalmazott módszerekkel történt (96, 97). Rekombináns nem-izom miozin HMM2B (nmHMM2B) előállítása baculovírus/Sf9 expressziós rendszerben történt, korábban leírt módon (98). Rekombináns His-tagelt PP1c δ (99) és Flag-tagelt PP1c α (100) *E. coli*-ban expresszáldott MnCl₂ jelenlétében és denaturáló feltárást, majd renaturációt követően Ni-sepharose oszlopon tisztították (101, 102). Az RLC foszforilálása során alkalmazott MLCK nyúl vázizomból lett izolálva (103).⁶

Spektroszkópiai vizsgálatokhoz fluoreszcensen jelölt fehérjéket használtunk. Anizotrópia mérésekhez IAEDANS-jelölt F-aktint (104, 105), illetve IAF-jelölt monomer G-aktint (106, 107) használtunk, melyek előállítása korábban leírt és rutinszerűen alkalmazott módszerekkel történt.

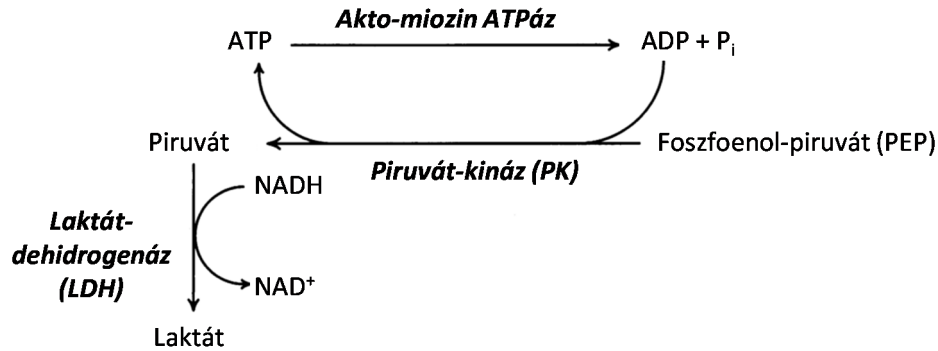
3.3 KINETIKAI MÉRÉSEK

3.3.1 Steady-state ATPáz esszé

A miozinok steady-state ATPáz aktivitását NADH-csatolt esszével mértük változó szubsztrát koncentrációk mellett, alacsony ionerejű pufferben, 22 °C-on (108). A reakció pufferkörülményei: 10 mM MOPS, (pH 7,0), 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0,3 mM CaCl₂, 0,15 mM EGTA, 2 mM ATP, 40 U/ml laktát-dehidrogenáz (LDH), 200 U/ml piruvát-kináz (PK), 1 mM foszfoenol-piruvát (PEP), 200 μ M NADH.

ATP hidrolízis során a felszabaduló ADP részt vesz a PEP piruváttá alakításában, amit a PK enzim végez. A képződött piruvát a LDH enzim hatására 1 NADH oxidálódása révén laktáttá alakul. Végeredményben 1 ATP molekula hidrolízise 1 NADH molekula oxidációjához vezet, tehát a NADH mennyiségének csökkenése, amit 340 nm-en mért abszorbancia méréssel tudunk követni egyenesen arányos a motor domén ATP hidrolizáló képességével (**11. Ábra**). Az ATP hidrolízis mértéke az időfüggő OD₃₄₀ abszorbancia görbe meredeksége, osztva a NADH moláris extinkciós együtthatójával, (6220 M⁻¹ cm⁻¹) és a miozin koncentrációval (109).

⁶ Aktin és skHMM izolálásában Brunner Jánosné (PTE) segített. NmHMM2B-t Nagy Attila (NIH) készítette. PP1c alegységek tisztítását Kónya Zoltán (DE) végezte. A kísérletek során felhasznált MLCK-t részben Mary-Ann Conti (NIH) izolálta, részben Mitsuo Ikebe (University of Massachusetts) bocsátotta rendelkezésünkre.



11. Ábra. A NADH-csatolt esszé enzimreakcióinak sematikus szerkezete (109).

Nem-izom miozin aktiválásához a RLC-t foszforilálni kellett 10 nM MLCK-val, 0,1 μ M CaM, 0,2 mM CaCl₂ és 0,2 mM ATP jelenlétében (98). A foszforiláció vagy a mérés kezdete előtt történt (15 perc preinkubáció, RT) vagy a mérés kezdete után követlenül a küvettában. A mérési adatok gyűjtése Beckman, Jasco, illetve Cary 4000 UV-Vis spektrofotométerekkel történt.

Az adott szubsztrát koncentrációhoz tartozó reakciósebesség értékekre illesztett Michaelis–Menten egyenlet megadta a maximális reakciósebességet (V_{max}) és a félmaximális reakciósebességhez tartozó szubsztrát koncentráció, vagyis a K_M konstans értékét (110).

3.3.2 Foszforilációs esszé

A vad típusú, illetve GFP-jelölt nmHMM2A RLC foszforilációjának időfüggését különböző MLCK koncentrációkon végeztük, 25 °C-on a reakciópufferben, ami 10 mM MOPS, pH 7,3, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0,2 mM CaCl₂, 0,1 mM EGTA, 0,1 μ M calmodulin, 1 mM DTT és 0,2 mM ATP-t tartalmazott. Az alkalmazott nmHMM2A koncentráció 0,9 μ M. A reakció MLCK hozzáadásával történő indítása után különböző időpontokban (30 másodperc és 20 perc között) mintát vettünk és a fehérjéket jéghideg acetonnal kicsapatva haladéktalanul megállítottuk a reakciót. A mintákat centrifugálással leüleptítettük (16.000 g, 5 perc), majd visszaoldottuk 8 M ureát és 0,54 M MEA-t tartalmazó SDS-mentes tris-glicin pufferbe (pH 8,6). A foszforilált és foszforilálatlan RLC elektroforézissel elválasztható egymástól 40% glicerint tartalmazó 10%-os poliakrilamid gélen (111). Az RLC időfüggő foszforilációs állapotát denzitometriás méréssel, Licor Odyssey szoftverrel vizsgáltuk, meghatározva egy mintán belül a foszforilált RLC arányát az összes RLC mennyiségére vonatkoztatva.

Az RLC foszforiláció időbeliségét hasonló reakció körülmények között vizsgáltuk másik technikával, 0,2 mM radioaktivan jelölt [γ -³²P]ATP felhasználásával (47). A reakció 0,9 μ M HMM hozzáadásával indult, majd különböző időpontokban (30 másodperc és 40 perc között) 20 μ l mintát vettünk, amit Whatman Grade3 (Φ 23mm) szűrőpapírra cseppentettünk. A szűrőpapírt 5% triklór-ecetsavat és 2% nátrium-pirofoszfátot tartalmazó oldatba merítve precipitáltuk a fehérjéket a

membránra, egyidejűleg megállítva az enzimátikus reakciót. A szűrőpapírokat 4x 10 percig mostuk a fenti oldatban, majd 100% etanolban, végül acetóban, hogy minden aspecifikusan kötődő foszfátot eltávolítsunk és csak a kicsapódott miozinhoz kovalensen kötődő foszfátcsoportok maradjanak. A szűrőpapírokat szárítás után szcintillációs folyadékba helyeztük és a minta aktivitását Beckman LS6500 szcintillációs számlálóval mértük. A fehérjébe épült ³²P mennyiségét a [γ -³²P]ATP specifikus aktivitásának ismeretében határoztuk meg, az (1) és (2) egyenletek felhasználásával.

$$\text{Specifikus Aktivitás (SA)} = \frac{\text{átlagos beütésszám (cpm)} \times \text{higítás}}{[\text{ATP}^*](\text{mol/l}) \times \text{térfogat (l)}} = (\text{cpm/mol}) \quad (1)$$

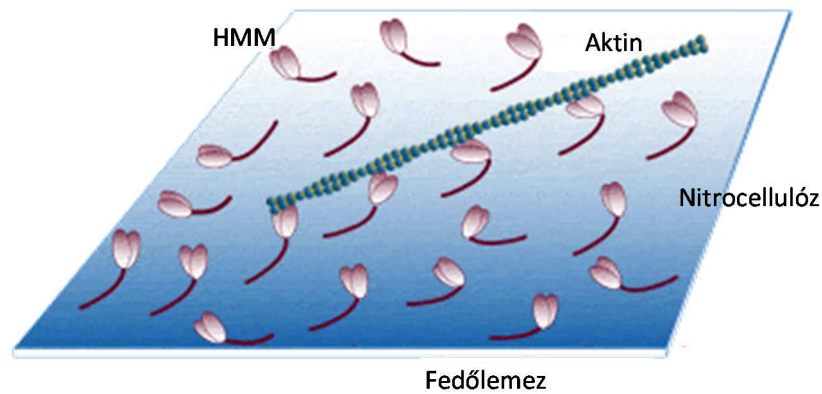
$$\frac{\text{ATP}^*}{\text{miozin fej}} = \frac{\text{mért beütésszám (cpm)}}{\text{SA (cpm/mol)} \cdot n_{\text{miozin}} (\text{mol})} \quad (2)$$

Hasonló mérési elrendezésben vizsgáltuk a foszforiláció kinetikáját 0,1 nM MLCK, de változó koncentrációjú HMM2A szubsztrát jelenlétében. Minden egyes HMM2A koncentráció esetén a reakcióelegyből 60, 120, 180 és 240 másodperc elteltével mintát vettünk és a fent leírt protokoll szerint meghatároztuk a minta aktivitását. Az adatpontokra illesztett egyenes meredekségéből meghatározható a foszforilációs reakció kezdeti sebességi állandója.

3.4 IN VITRO MOTILITÁSI PRÓBA

In vitro motilitási próba során a felszínhez rögzített miozin fejek aktin mozgató képességét vizsgáltuk (112–114). A reakciót megelőzően 1-2 mg/ml miozint koszedimentáltunk 5 μ M falloidin-stabilizált F-aktinnal 1 mM MgATP jelenlétében (470.000g, 7 perc) és a felülúszót használtuk az esszében. Az eltávolított funkcióképtelen miozin fejek kötődnek ugyan az F-aktinhoz, de ATP hatására nem képesek azt elengedni, ezáltal blokkolják az aktin filamentumok szabályos motilitását.

Az esszé során nitrocellulózzal borított folyadékcellába 0,1-0,2 mg/ml miozint juttattunk, amit 1 percig inkubáltunk, hogy a miozinok a felszínhez kötődjenek. A miozinnal nem borított felszíneket 1 mg/ml BSA tartalmú MB-pufferrel fedtük (50 mM KCl, 20 mM MOPS (pH 7,4), 0,1 mM EGTA, 5 mM MgCl₂), elkerülendő az aktin aspecifikus letapadását a folyadékcellához. MB-pufferrel történő átmosás után 20 nM TRITC-jelölt, falloidinnal stabilizált F-aktint juttattunk a folyadékcellába. Végül a folyadékcellát nagy viszkozitású, anti-fotobleaching hatású GOC-oldattal öblítettük át (MB-puffer, 0,35 % metilcellulóz, 50 mM DTT, 1 mM ATP, 2,5 mg/ml glükóz, 0,05 mg/ml glükóz-oxidáz és 2 μ g/ml kataláz) (12. Ábra). Nem-izom miozin motilitást csak abban az esetben figyelhettünk meg, ha az RLC-t foszforiláltuk 0,2 mM CaCl₂, 0,1 μ M calmodulin és 28 nM MLCK-t tartalmazó GOC oldattal. Video felvételeket Zeiss Axioplan mikroszkóppal készítettünk és korábban leírt módon analizáltuk (115).



12. Ábra. Az *in vitro* motilitási próba sematikus elrendezése. Módosítva D. Warshaw nyomán⁷.

3.5 FEHÉRJE-FEHÉRJE KÖLCSÖNHATÁSI VIZSGÁLATOK

3.5.1 Koszedimentációs esszé

Aktin-My16Ank koszedimentációs esszében 1 μM F-aktint inkubáltunk különböző My16Ank koncentrációkkal 0–15 μM tartományban, skHMM jelenlétében vagy anélkül, 1 órát RT, vagy éjszakán át 4 °C-on. Inkubáció után a mintákat ultracentrifugáltuk (470.000 g, 40 perc, 4 °C).

SkMyo2–My16Ank koszedimentációs esszében a teljes hosszúságú vázizom miozint (skMyo2) alacsony ionerejű pufferben (10 mM MOPS (pH 7,4), 0,1 mM EGTA és 1 mM DTT) dializáltuk, változó My16Ank koncentráció mellett. Alacsony ionerő mellett a miozin coiled-coil farok régióján keresztül filamentumokat formált és precipitálódott. A koprecipitálódott mintákat ultracentrifugálással (470.000 g, 40 perc, 4 °C) választottuk el.

A felülúszót óvatosan dekantálva az átöblített pelletet a felülúszóval megegyező térfogatú Laemmli elektroforézis pufferben duzzasztottuk, majd vortexeltük (116). A mintákat SDS-PAGE segítségével szeparáltuk, a megfestett mintákat SynGene denzitométerrel analizáltuk. A koprecipitálódott és koszedimentálódott My16Ank mennyiségét ábrázolva a szabad My16Ank koncentráció függvényében meghatározható az egyensúlyi állandó és a telítési arány (117). Az ábrázolást és a statisztikai analízist Origin szoftver segítségével végeztük.

⁷ <http://physioweb.uvm.edu/warshaw-lab/techniques/in-vitro-motility-assay/>

3.5.2 Anizotrópia és polimerizációs teszt

Fluoreszcencia anizotrópia méréseket Horiba Jobin-Yvon fluoriméteren végeztük. A fluoreszcensen jelölt mintát polarizált fényvel gerjesztettük és az emittált fényt vertikális és horizontális irányú polarizációs szűrőkön keresztül detektáltuk. Az aktin–My16Ank kötési kísérletekben 1 μM IAEDANS-jelölt monomer G-aktint vagy 5 μM IAF-jelölt filamentális F-aktinhoz (a jelölési arány $\sim 20\%$ -os volt mindkét esetben) kevertünk különböző koncentrációjú My16Ank-t, 0,3–5 My16Ank / aktin mól-arányban. Az anizotrópiát 20 °C-on mértük, ~ 10 percen át és a mérési pontokat átlagoltuk.

Polimerizációs esszé során az IAEDANS-jelölt G-aktin anizotrópia változását követtük, különböző My16Ank koncentrációk jelenlétében (0–20 μM között). A polimerizációs reakciót 100 mM KCl és 2 mM MgCl_2 hozzáadásával indítottuk és ~ 30 percig követtük. Az eredményeket Origin szoftver segítségével ábrázoltuk és analizáltuk.

3.5.3 Felületi plazmon rezonancia

Felületi plazmon rezonancia módszer segítségével nagy érzékenységgel, jelölés mentesen vizsgálhatjuk a makromolekulák interakcióit. A módszer alapja egy speciális fémréteg reflektivitása, ami rendkívüli mértékben érzékeny az egyik oldalán elhelyezkedő médium optikai változásaira. A felületi plazmonok a fémfelszínen kialakuló töltéssűrűség hullámok. Ha a vékony fémréteg, aminek a dielektromos állandója eltérő a két felszíne között, például egy üvegfelületen helyezkedik el, akkor az üveg felől ráeső fény, megváltoztatja a túlsó felszín tulajdonságait is és bizonyos beesési szögnél fellép a felületi plazmon rezonancia jelensége. A rezonanciát kialakító beesési szög nagyfokban érzékeny a fémfelszín túloldalán történő változásokra, ezért a detektált rezonancia jel jól alkalmazható a felszín (illetve a felszínre kötött molekula réteg) és az oldatban elhelyezkedő molekulák interakciójának a jellemzésére (118, 119).

Felületi plazmon rezonancia segítségével vizsgáltuk a My16Ank interakcióját skHMM illetve PP1c izoformákkal⁸. A méréseket Biacore-3000 készüléken végeztük (Biacore AB, Sweden). A CM5 szenzorchip négy független folyadékcellát tartalmazott, amelyek közül az egyikbe My16Ank, a másikba GST-My16Ank került, kettő pedig kontrollként szolgált. My16Ank-t kovalens amin-csatolással rögzítettük a szenzorchip felszínére, a GST-My16Ank pedig a felszínre előzőleg kovalensen rögzített anti-GST antitestekhez kötődött. A kontroll cellák felszínének aktív csoportjait etanolaminnal vagy GST-vel blokkoltuk, ezt követően a mintákkal megegyező módon kezeltük. Az egyik interakciós partner immobilizálása után a másik partner fehérjét (PP1 α , PP1 δ , illetve skHMM) a mozgó fázisban áramoltattuk a felszínnek felett és detektáltuk a rezonancia szignált az idő függvényében.

⁸ Felületi plazmon rezonancia méréseket a Debreceni Egyetem Orvosi Vegytani Intézetében végeztük

A kinetikai paraméterek meghatározásához az asszociációt 7 percig mértük, majd a mozgó fázisban lévő fehérje elvonása után a disszociációt 5 percig követtük. A kontroll felszíneken mért rezonancia jelet levontuk a minták által szolgáltatott jelből, elkerülendő ezáltal az aspecifikus kötődés hatását (99). Az asszociációs és disszociációs sebességi állandókat a kapott szenzogramok alapján BIAevaluation szoftver segítségével határoztuk meg, 1:1 sztöchiometriát feltételezve.

3.6 ENZIM AKTIVITÁS MÉRÉS

A PP1c izoformák enzimatisz aktivitását 1 μM radioaktív [γ - ^{32}P]ATP-vel foszforilált simaizom miozin regulatórikus könnyűlánc (^{32}P -RLC) defoszforilálásán keresztül vizsgáltuk 20 mM Tris-HCl (pH 7.4) – 0,1% MEA pufferben (99). A PP1c előzetesen 10 percig preinkubálódott különböző koncentrációjú My16Ank jelenlétében, majd a reakció a szubsztrát hozzáadásával indult. A defoszforilációs reakciót 200-200 μl 6%-os BSA és 20%-os TCA hozzáadásával termináltuk. A precipitálódott fehérjék centrifugálása után a felülúszóban található szabad $^{32}\text{P}_i$ aktivitását szcintillációs számlálóval (Perkin) mértük. A kísérletekhez rekombináns PP1 α -t, PP1 δ -t, valamint szövetből izolált natív PP1c-t használtunk⁹.

3.7 STATISZTIKAI MÓDSZEREK

A mérési eredmények kiértékelése során mindig az adatok összehasonlítására legmegfelelőbb statisztikai módszert alkalmaztuk. Az egyszerű statisztikai paramétereket (átlag, szórás) Origin program segítségével, míg a szignifikancia meghatározásához szükséges valószínűségeket Excel programmal számoltuk.

Kis elemszámú minták esetén (pl. az ATPáz aktivitás V_{max} és K_{ATPase} értéke) a vad-típusú mintától való eltérés szignifikanciáját kétmintás Student t-próbával határoztuk meg (120).

Normál eloszlású, ismert varianciájú, független minták (pl. *in vitro* motilitási próba sebesség értékei) összehasonlításakor két-mintás z-próbával dolgoztunk, az alábbi (3) egyenlet alapján:

$$z = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{\sigma_1^2}{n_1} + \frac{\sigma_2^2}{n_2}}} \quad (3)$$

ahol \bar{x} a minta átlaga, σ a standard deviáció és n a minta elemszáma.

⁹ A defoszforilációs méréseket a Debreceni Egyetem Orvosi Vegytani Intézetében végeztük

A kinetikai folyamatok összehasonlítását Khi-négyzet próbával végeztük a (4) összefüggés alapján, ahol azonos kísérleti körülmények között *Obs* a megfigyelt, míg *Exp* a várható (vagyis a kontrol minta) értéke:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^n \frac{(Obs - Exp)^2}{Exp} \quad (4)$$

A számított paramétereket a szignifikancia táblázat szabadsági fokoknak megfelelő értékével hasonlítottuk össze (121).

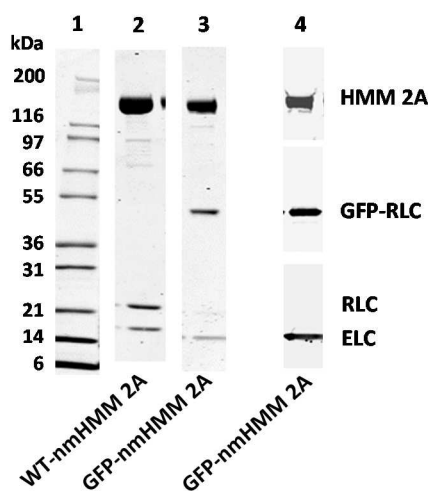
4 EREDMÉNYEK

4.1 GFP-RLC HATÁSA A NMHMM2A MŰKÖDÉSÉRE

4.1.1 GFP-nmHMM2A tisztítása

Kísérleteink során egy korábban már sikerrel alkalmazott rekombináns fehérjével, a bakulovírus/Sf9 rendszerben előállított nem-izom miozin 2A-val dolgoztunk. A kontroll mérésekhez mindig a vad típusú miozin 2A HMM fragmentumot használtuk (WT-nmHMM2A), ami tartalmazta a regulatórikus könnyűláncot (WT-RLC) és az esszenciális könnyűláncot (ELC) (94). A GFP hatásának a vizsgálatához hasonló rendszerben koexpresszáltuk a nmHMM2A nehéz láncot ELC-vel, valamint a GFP-fúzionált RLC-vel (GFP-nmHMM2A). A GFP az RLC N-terminálisához kapcsolódott, a nmHMM2A nehéz lánc pedig Flag epitóppal volt jelölve a fehérje C-terminálisán az egyszerű tisztítás érdekében.

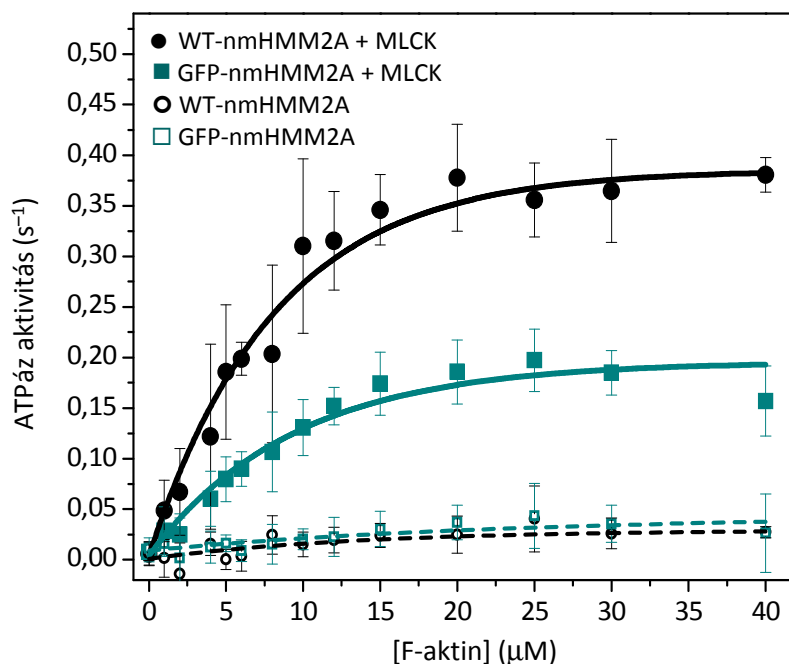
A tisztítás során 10^9 Sf9 sejtől mintegy 5 mg fehérje volt kinyerhető, ami jégen tárolva, legkevesebb egy hétig nem mutatott degradációs jeleket. Ennek megfelelően a kísérleteket mindig frissen tisztított és felhasználásig jégen tárolt miozin fehérjékkel végeztük. A tisztítás eredményességét elektroforézissel és Western blottal igazoltuk, amihez anti-Flag (Sigma), anti-GFP (Proteus Biosciences) és anti ELC (AbCam) monoklonális antitesteket használtunk (**13. Ábra**). A denzitometriás mérések igazolták, hogy a GFP-nmHMM2A pontosan összeépült, sztöchiometriai arányban egy nehéz láncra egy-egy ELC illetve GFP-RLC jutott. Ugyanakkor rendszeresen megfigyelhető volt egy kis mennyiségű (az össz RLC mennyiség < 5 %-a) fehérje a WT-RLC magasságában, ami feltehetően vagy a GFP-RLC hasítási terméke volt, vagy pedig endogén RLC, amit az expresszió során kötött magához a nehézlánc.



13. Ábra. A kísérleteinkben használt nmHMM2A fehérjék elektroforetogramja (2.-3. oszlop) és Western blot analízise (4. oszlop).

4.1.2 GFP-RLC hatása az ATPáz aktivitásra

A GFP-RLC hatását a miozin enzimatis aktivitására steady-state MgATPáz aktivitás mérésén keresztül vizsgáltuk, emelkedő aktin koncentráció függvényében. A II-es típusú miozinok közös tulajdonsága, hogy ATPáz aktivitásuk aktin jelenlétében jelentősen emelkedik. A simaizom és a nem-izom miozin II esetén ezenkívül az RLC foszforilálása is elengedhetetlen az aktiváláshoz (122). Foszforilátlan állapotban a GFP-nmHMM2A bazális (aktin nélkül mért) aktivitása megegyezett a kontroll WT-nmHMM2A aktivitásával: $\sim 0,03 \pm 0,01 \text{ s}^{-1}$. MLCK-val való foszforilálás után az ATPáz aktivitás jelentősen megemelkedett és az aktin koncentráció függvényében $V_{\max} = 0,20 \pm 0,02 \text{ s}^{-1}$ (átlag \pm SE, $n=9$ független mérési sorozat eredménye alapján) maximális reakciósebességet ért el. Ez a V_{\max} érték azonban lényegesen elmaradt a WT-nmHMM2A esetében mért és korábban közölt (123) értéktől, ami a jelen mérési sorozatban $0,39 \pm 0,02 \text{ s}^{-1}$ -nak adódott (átlag \pm SE, $n=8$) (14. *Ábra*). Az eltérés szignifikáns: kétmintás t-próbával $p \ll 0,001$. A reakciók $K_{\text{ATPáz}}$ értékében, ami a félmaksimalis reakciósebesség eléréséhez szükséges szubsztrát koncentrációt – leegyszerűsítve az enzim és a szubsztrát egymáshoz való affinitását – jelenti, nem mutatkozott szignifikáns eltérés: a GFP-nmHMM2A $K_{\text{ATPáz}}$ értéke $9,53 \pm 1,37 \mu\text{M}$ míg a kontroll érték $7,97 \pm 0,84 \mu\text{M}$ -nak adódott (kétmintás t-próbával $p > 0,1$). Az eredményeket a 2. *Táblázat* foglalja össze.



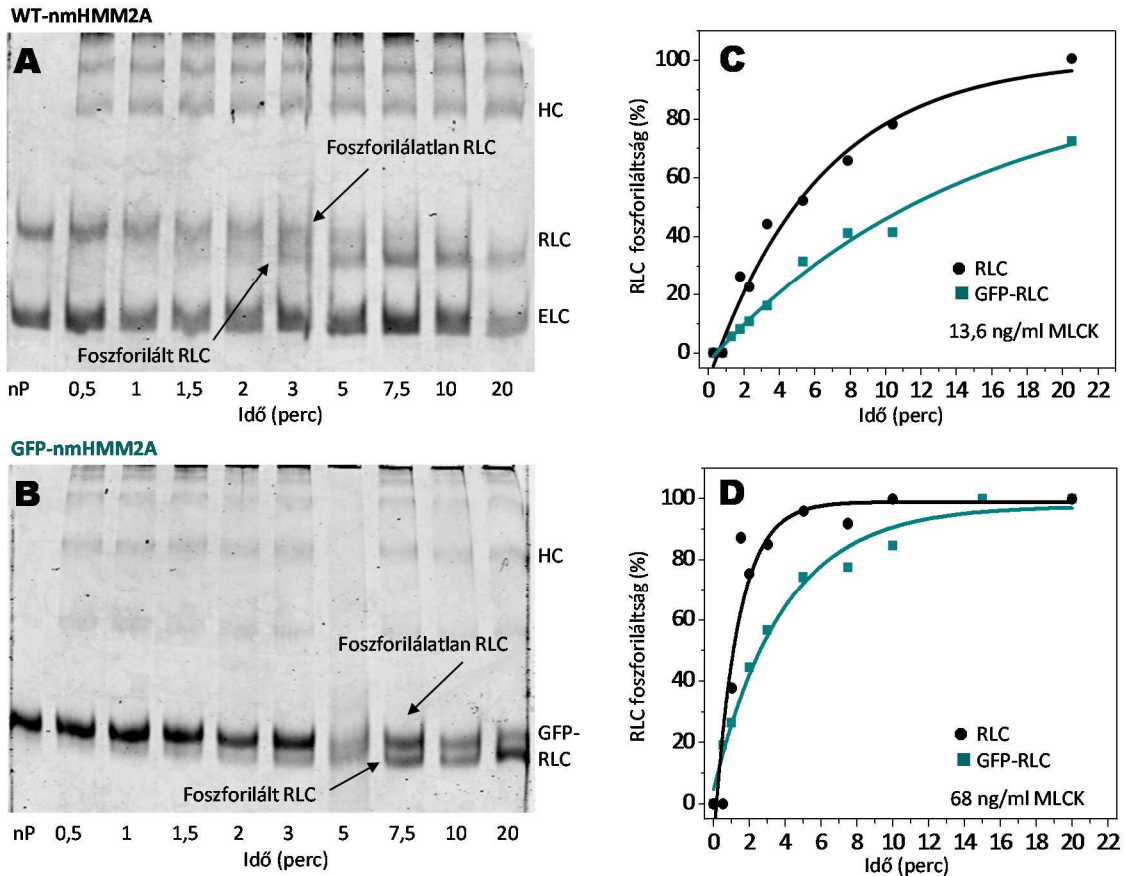
14. *Ábra*. Steady-state aktin-aktivált ATPáz aktivitás (átlag \pm SE, $n=8$).

	Foszforilátlan		Foszforilált (3,6 µg/ml MLCK)		
	– Aktin	+ Aktin	– Aktin	+ Aktin	
	V_{\max} (s ⁻¹)	V_{\max} (s ⁻¹)	V_{\max} (s ⁻¹)	V_{\max} (s ⁻¹)	$K_{\text{ATPáz}}$ (µM)
WT-nmHMM2A	0,006 ± 0,01	0,026 ± 0,01	0,006 ± 0,01	0,39 ± 0,016*	7,97 ± 0,84
GFP-nmHMM2A	0,004 ± 0,002	0,029 ± 0,007	0,003 ± 0,005	0,20 ± 0,02*	9,53 ± 1,37

2. Táblázat. Steady-state aktin-aktivált MgATPáz aktivitás eredményeinek összefoglalása a kinetikai görbékre illesztett exponenciális függvények alapján. Értékek megjelenítése átlag ± SE formában, n=8 független mérés alapján, *szignifikáns eltérés.

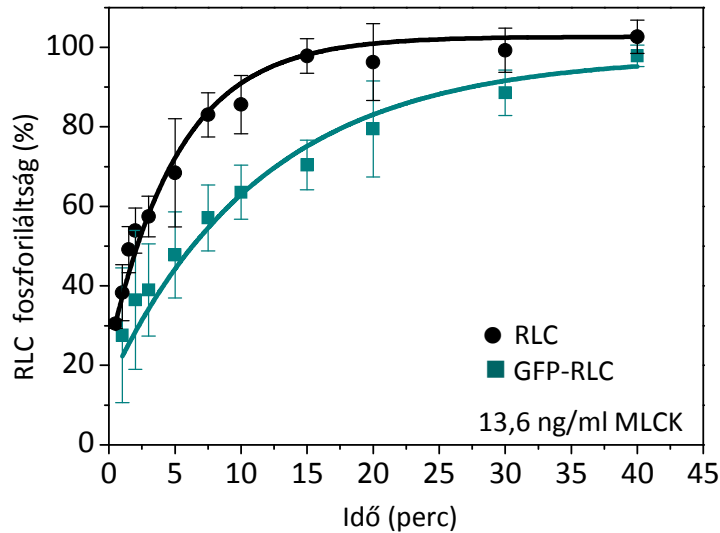
4.1.3 GFP-RLC hatása a foszforiláció dinamikájára

A következőkben azt vizsgáltuk, hogy vajon a RLC foszforilációja, amit fiziológias körülmények között a miozin könnyűlánc kináz (MLCK) végez, megváltozik-e a GFP-fúzió hatására. A foszforiláció mértékét, és sebességét különböző módszerekkel vizsgáltuk, összehasonlítva a kontrollként alkalmazott WT-RLC-vel. Elsőként a foszforilációs reakció indítását követő különböző időpontokban vett és 8 M ureával denaturált mintákat 40 % glicerint tartalmazó poliakrilamid gélen megfuttattuk, ami lehetővé tette a foszforilált RLC elválasztását a foszforilátlantól, annak töltése – ezáltal gyorsabb elektroforetikus mozgékonyasága révén. Az eredmények azt mutatták, hogy a GFP-RLC teljes mértékben képes foszforilálódni (ez magas MLCK koncentrációt alkalmazva látszik egyértelműen), de lassabb kinetikával, mint a WT-RLC (**15. Ábra**).



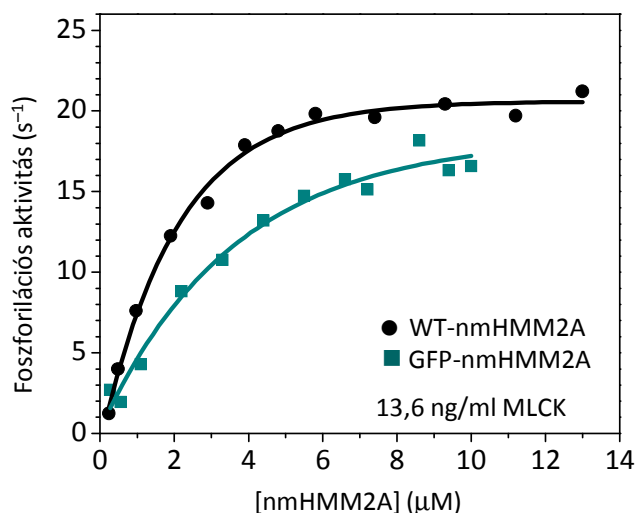
15. Ábra. Foszfórlációs esszé. Vad-típusú RLC (A) ill. GFP-RLC (B) foszfórláció időbeli követése glicerín-urea elektroforézissel, 13,6 ng/ml MLCK kezelés után és a denzitogramok alapján számolt relatív foszfórlátság kinetikája (C). Nagyobb MLCK koncentrációt (68 ng/ml) alkalmazva elérhető a teljes foszfórláció (D), (nP: nem foszfórlált).

A másik kísérleti elrendezésben az enzímreakció során az MLCK $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ felhasználásával foszfórlálta a nmHMM2A regulatórikus könnyűláncát, radioaktív $^{32}\text{P}_i$ -t kapcsolva a miozinhoz. A reakció kezdetétől különböző időpontokban vett minták aktivitása korrelált a foszfórláció mennyiségével. Az eredmények ez esetben is igazolták, hogy a GFP-RLC képes teljes mértékben foszfórlálódni, de lassabban, mint a WT-RLC (16. Ábra).



16. Ábra. RLC foszforilációs esszé radioaktív [γ - ^{32}P]ATP felhasználásával (átlag \pm SE, n=4).

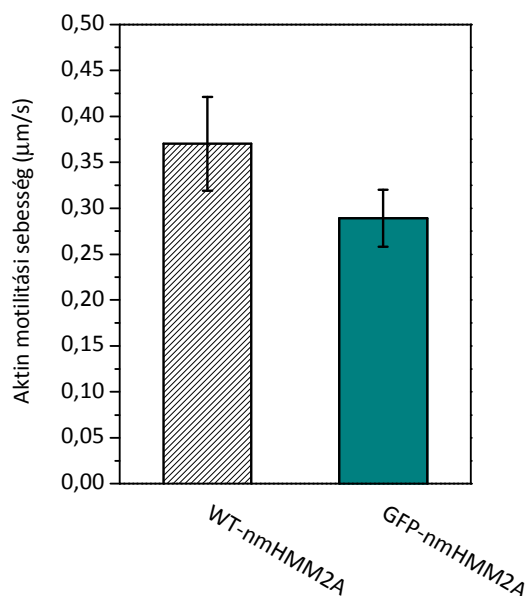
A foszforiláció kinetikáját radioaktív [γ - ^{32}P]ATP beépülésén keresztül vizsgáltuk, különböző HMM szubsztrát koncentrációk mellett. A különböző szubsztrát koncentrációkhoz tartozó kezdeti reakciósebességet a 13,6 ng/ml MLCK iniciálta foszforilációs reakció első szakaszában mért időfüggő aktivitás görbékhöz húzott érintő segítségével határoztuk meg. A kezdeti reakciósebesség értékekre illesztett Michaelis–Menten egyenlet megadta a maximális reakciósebességet (V_{\max}) és a félmaximális reakciósebességhez tartozó szubsztrát koncentráció, vagyis a K_M konstans értékét. Az eredmények nem mutattak jelentős különbséget a V_{\max} értékekben ($20,6 \pm 0,3 \text{ s}^{-1}$ a vad típus, $18,4 \pm 1,9 \text{ s}^{-1}$ a GFP-RLC esetén), viszont a K_M értéke kis mértékben növekedett a GFP-RLC foszforilálása esetén a WT-RLC-hez képest ($2,1 \pm 0,2 \mu\text{M}$ a WT-RLC, $3,6 \pm 0,6 \mu\text{M}$ a GFP-RLC esetén). Ez a különbség a Khi-négyzet próbát elvégezve azonban nem bizonyult szignifikánsnak ($\chi^2(60) = 18,96$; $p > 0,05$). Azt viszont tükrözik az eredmények, hogy alacsony HMM koncentráció esetén a GFP-RLC-t tartalmazó nmHMM2A lassabban foszforilálódik, mint a WT-nmHMM2A (17. Ábra).



17. Ábra. Foszforylációs kinetika WT és GFP-nmHMM2A esetén.

4.1.4 *In vitro* motilitási próba

A miozin motor funkcióról fontos információkkal szolgál a motor fehérjét egyedi molekula szintjén vizsgáló *in vitro* motilitási próba. A felszínhez kötött nem-izom miozin fehérjék csak akkor képesek a fluoreszcensen jelölt aktin filamentumokat transzlokálni, ha az RLC foszforylálódik a Ser19 aminosavon. ATP jelenlétében, de MLCK kezelés nélkül nem volt megfigyelhető motilitás sem a WT-nmHMM2A, sem a GFP-nmHMM2A esetén. Foszforylációt követően az aktin filamentumok elmozdultak a felszínre rögzített miozin fejek mentén $0,35 \pm 0,06 \mu\text{m/s}$ sebességgel a WT-nmHMM2A ($n=79$ egyedi filamentum mozgását analizálva) és $0,29 \pm 0,05 \mu\text{m/s}$ a GFP-nmHMM2A ($n=155$) esetén. Habár a különbség kicsi, mégis szignifikánsnak bizonyult a két mintás z-próbával kiértékelve ($p<0,01$) (18. Ábra).



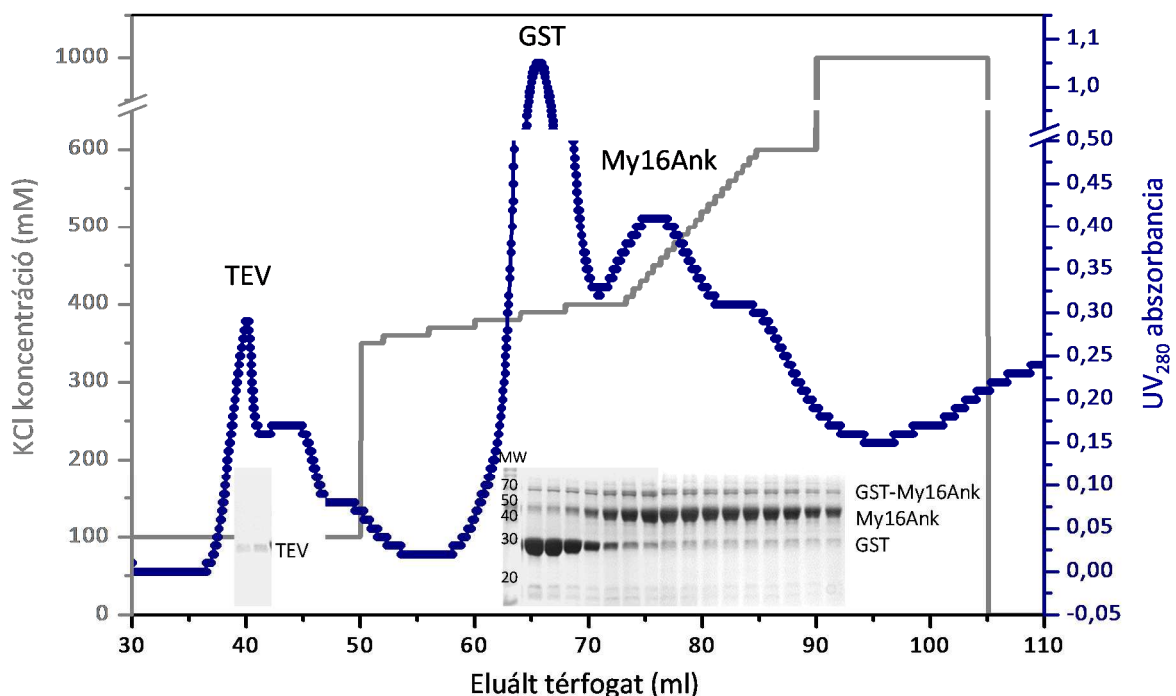
18. Ábra. Aktin filamentumok motilitási sebessége (átlag \pm SE, $n=79$) WT-nmHMM2A és GFP-nmHMM2A borította felszíneken, *in vitro* motilitási próbával vizsgálva.

4.2 MY16ANK HATÁSA A MOTOR DOMÉN AKTIVITÁSÁRA

A nem-konvencionális miozin 16 funkciója még kevésbé ismert. Azt azonban az eddigi vizsgálatok is valószínűsítik, hogy fontos szerepe lehet a foszforilációs szabályozási folyamatokban, elsősorban a N-terminális domén, a miozinok között egyedülállóan csak itt megtalálható ankyrin domén (My16Ank) révén, amely nagyfokú hasonlóságot mutat a miozin foszfatáz holoenzim regulatórikus alegységével (MYPT). Vizsgálataink tárgya a rekombináns, izolált My16Ank, amely azonban nemcsak a foszforiláció/defoszforiláció folyamatában vesz részt, hanem, ahogy nem várt eredményeink mutatták, a miozin motor funkció szabályozásában is.

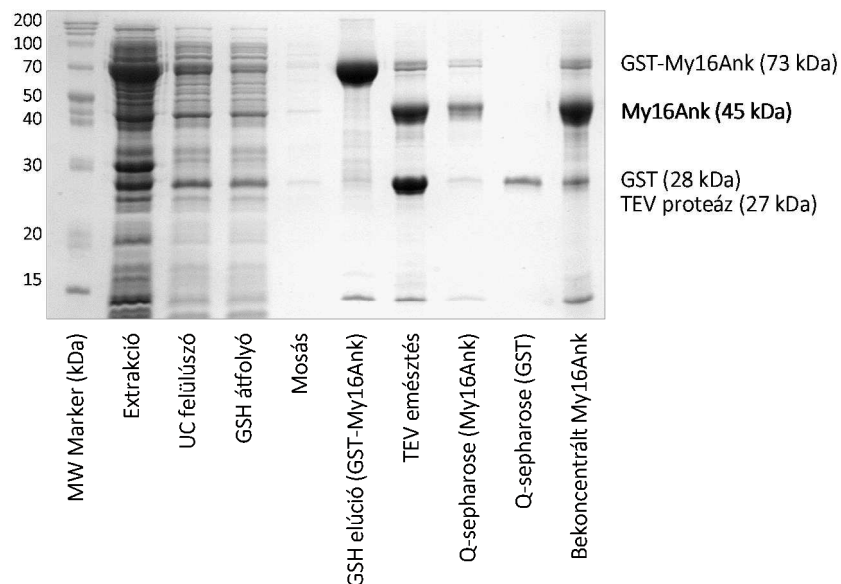
4.2.1 My16Ank tisztítása

A rekombináns GST-vel fúzionált My16Ank *E. coli* expressziós rendszerben termelődött, IPTG indukciót követően. 2000 ml sejt kultúra mintegy 7 g sejt pelletet eredményezett, amit folyékony nitrogénben azonnal lefagyasztottunk és további felhasználásig $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. A fehérjét natív körülmények között izoláltuk. A tisztítási lépések során vett elektroforézis minták tanúsága szerint a fehérje nagy része a lízis utáni ultracentrifugálást követően a sejt pelletben maradt, de a felülúszóban maradó rész elegendő volt a megfelelő mennyiségű fehérje izolálásához.



19. Ábra. My16Ank elválasztása anioncserélő Q-sepharose oszlopon a GST-, ill. TEV proteáztól FPLC segítségével. Beszűrés: az eluált frakciók PAGE képe.

A GST-My16Ank fúziós fehérjét GSH oszlopra kötve tisztítottuk, majd TEV proteáz enzim segítségével távolítottuk el a GST-tagot. A My16Ank és a GST elválasztása anioncserélő Q-sepharose oszlopon történt emelkedő KCl grádiens alkalmazásával (**19. Ábra**). Mivel a My16Ank izoelektromos pontja ($pI = 4,95$) közel található a GST-hez ($pI = 5,45$) az eluált frakciókban átfedés mutatkozott a két fehérje között és a végső, bekonzentrált My16Ank minta is tartalmazott kis mennyiségben GST-t, illetve emésztetlen GST-My16Ank fúziós fehérjét (**20. Ábra**). Ezeket anti-GST Western blottal is igazoltuk. A kis mennyiségű szennyező fehérje minden preparálás végén jelen volt, nagyjából változatlan arányban, és további tisztító lépések (pl. gélszűrés, eltérő iongrádiens) segítségével sem sikerült teljesen megszabadulni tőlük. A tisztítási procedúra végén tipikusan 4–6 mg, $\sim 45 \mu M$ (~ 2 mg/ml) töménységű fehérjét nyertünk. Kontroll vizsgálatokhoz – ahol erre szükség volt – az eluált GST frakciót használtuk. A fehérje jégen tárolva stabil maradt legalább 3 hétig, degradáció nem volt megfigyelhető.



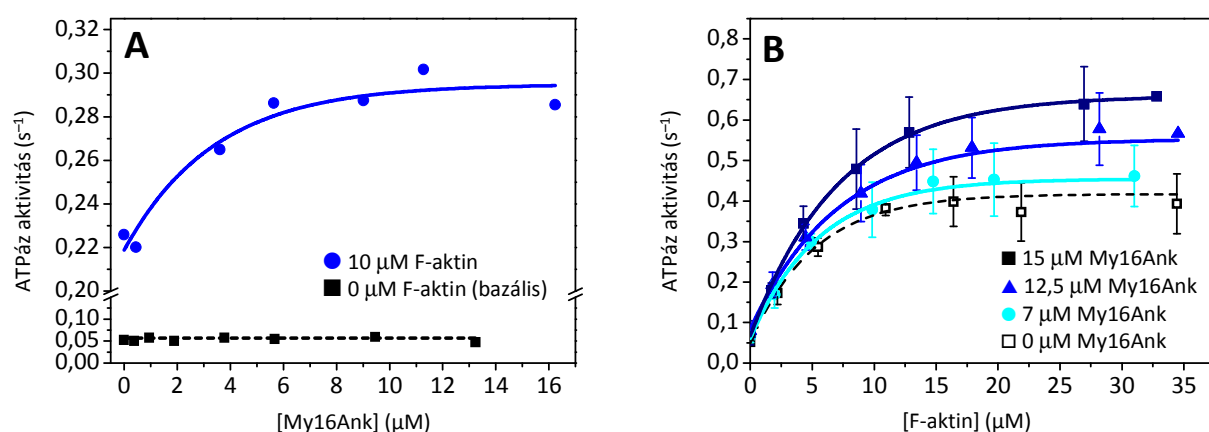
20. Ábra. My16Ank tisztításának főbb lépéinek elektroforetogramja.

4.2.2 My16Ank fokozza a vázizom miozin ATPáz aktivitását

Jóllehet, a My16Ank szerepe a Myo16 fiziológias működése során nem volt teljes körűen ismert, a motor doménhez való fizikai közelsége okán feltételeztük, hogy szerepe lehet a motor funkció szabályozásában. Ezt a hipotézist próbáltuk alátámasztani annak érdekében, hogy kiderítsük a My16Ank milyen módon befolyásolhatja a motor domén működését. Köztudott, hogy a miozinok alapvető tulajdonsága az ATP hidrolízis és az így felszabaduló energia hasznosítása mozgás vagy feszülés fenntartása során. Elsőként azt vizsgáltuk, hogy vajon a My16Ank befolyásolja-e a miozin ATP hidrolizáló aktivitását. Mivel a miozin 16 motor domén nem áll rendelkezésünkre, ezért modell rendszerként vázizom miozin HMM (skHMM), valamint nem-izom miozin 2B HMM (nmHMM2B)

fragmentumokat használtunk. A HMM, vagyis a nehéz meromiozin, a miozin molekula proteolitikus fragmentuma, amely hexamer formában tartalmazza a két motor domént egy rövid coiled-coil régióval összekötve és a két pár könyűláncot, általánosan használt a miozin kinetikai vizsgálataiban során. A disztális coiled-coil fragmentum hiánya miatt a molekula fiziológiai sókoncentráción is oldható, nem képez filamentumokat, megtartva emellett a teljes motor funkciót és a szabályozást. A vázizom miozin motor domén ~52%-os hasonlóságot mutat a Myo16 motor doménnel, az aktin és az ATP kötő régiók pedig nagy mértékben konzerváltak. (A meghatározás NCBI Blast bioinformatikai analízissel történt, *Rattus norvegicus* vázizom miozin szekvenciát alkalmazva referenciaként, NCB Accession # NP_001128630.1.)

Az ATPáz aktivitás méréséhez standard NADH-csatolt esszét alkalmaztunk. A My16Ank önmagában nem rendelkezik ATPáz aktivitással. Méréseink során a skHMM bazális aktivitása az irodalmi adatoknak megfelelően, My16Ank nélkül $0,05 \text{ s}^{-1}$ -nak adódott (124), a lassú folyamat követése érdekében a skHMM-t viszonylag magas koncentrációban ($2 \mu\text{M}$) alkalmaztuk. A bazális aktivitás nem változott a növekvő koncentrációjú, maximálisan $13 \mu\text{M}$ My16Ank hozzáadására sem. **(21. Ábra (A))** Mivel a miozinok legfontosabb partner fehérjéje a filamentális aktin (F-aktin), amelynek kötődése nagymértékben fokozza a miozinok ATPáz aktivitását, megvizsgáltuk a My16Ank hatását a skHMM aktin-aktivált MgATPáz aktivitására. A $0,2 \mu\text{M}$ skHMM-t különböző koncentrációjú ($0\text{--}35 \mu\text{M}$) F-aktinnal kevertük össze, ATP hozzáadásával indítottuk a reakciót, majd ezt követően több lépésben My16Ank-t adtunk az elegyhez $0\text{--}15 \mu\text{M}$ végkoncentrációban. Az ATPáz aktivitást az ADP felszabadulást követő NADH abszorbancia csökkenés meredekségéből határoztuk meg, majd az F-aktin koncentráció függvényében ábráztuk és Michaelis–Menten egyenlet illesztését követően határoztuk meg a kinetikai paramétereket **(21. Ábra (B))**.



21. Ábra. Vázizom HMM ATPáz aktivitás My16Ank jelenlétében.

A steady-state MgATPáz reakció maximális reakciósebessége My16Ank nélkül $V_{\max} = 0,41 \text{ s}^{-1}$ -nak adódott, ez megfelel a standard relaxáló körülmények között, Ca^{2+} mentes környezetben mért

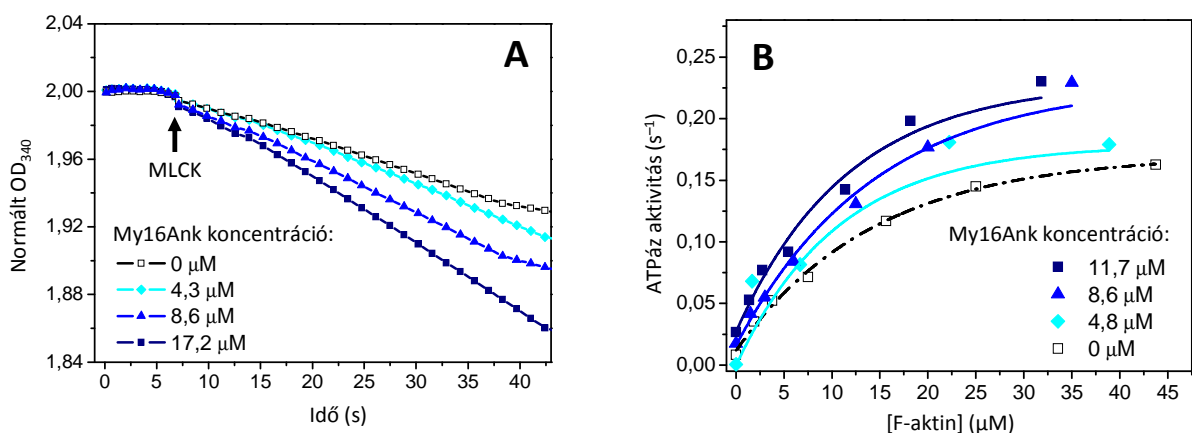
értéknek (125). Ugyanakkor a MgATPáz aktivitás 15 μM My16Ank hozzáadására 0,66 s^{-1} -ra növekedett, miközben a hozzátartozó Michaelis konstans (K_M) értéke 5,1 \pm 0,7 μM -ról 7,1 \pm 0,4 μM -ra nőtt. Az ATPáz mérések eredményeit a nem-izom miozinnal végzett mérési eredményekkel együtt a **3. Táblázat** foglalja össze.

4.2.3 My16Ank hatása a foszforiláció regulált nmHMM2B ATPáz aktivitására

A vázizom miozin motor doménnel végzett mérések után elvégeztük a kísérleteket nem-izom miozin 2B fragmentummal (nmHMM2B) is. Választásunk azért esett erre a miozin típusra, mert aktiválásához nem elég az aktin jelenléte, hanem (akárcsak a nmHMM2A esetén) a regulatórikus könnyűlánc (RLC) foszforilációja is szükséges (38). Másfelől, a nmHMM2A a Myo16-hoz hasonlóan szintén elsősorban idegszövetben fordul elő. A foszforilált regulatórikus könnyűlánc pedig a miozin foszfatáz holoenzim szubsztrátja, aminek célzó alegységével a My16Ank homológiát mutat.

Első kísérletünkben a My16Ank hatását vizsgáltuk a nmHMM2B foszforilációjára. Ehhez 0,2 μM foszforilálatlan nmHMM2B-t kevertünk össze 20 μM F-aktinnal és változó koncentrációjú (0–17,2 μM) My16Ank-nel. Megfigyeléseink szerint a My16Ank jelenléte nem befolyásolta a foszforilálatlan nmHMM2B aktivitását, a bazális aktivitásban nem mutatkozott eltérés. A My16Ank nem zavarta meg a foszforilációs folyamatot sem: MLCK, Ca^{2+} és CaM hozzáadására az RLC foszforilálódott és az ATPáz aktivitás jelentősen megnőtt, mégpedig a My16Ank koncentrációjának függvényében (**22. Ábra (A)**).

Ezt követően, a V_{max} és a $K_{\text{ATPáz}}$ meghatározása céljából, különböző aktin koncentrációk mellett végeztük el a méréseket. A kísérleti elrendezésben 0,2 μM előzetesen foszforilált nmHMM2B-t kevertünk össze különböző koncentrációjú (0–45 μM) F-aktinnal, majd az ATP hozzáadásával indított reakcióelegyhez szekvenciálisan adtunk hozzá emelkedő koncentrációban My16Ank-t (0–11,7 μM). Az OD változából számolt aktivitásokat korigáltuk a térfogat növekedésből származó koncentráció csökkenéssel (**22. Ábra (B)**).



22. Ábra. Nem-izom HMM2B ATPáz aktivitása. (A) My16Ank fokozza az MLCK foszforiláció hatására beinduló ATPáz aktivitást. (B) Különböző aktin és My16Ank koncentráción mért ATPáz aktivitások.

A nmHMM2B ATPáz aktivitását ábrázolva az F-aktin, mint szubsztrát, koncentráció függvényében, majd a mérési pontokra exponenciális függvényt illesztve meghatároztuk V_{\max} és a K_{ATPase} értékeket. Eredményeink azt mutatták, hogy az alapesetben mért – és az irodalmi adatokkal megegyező (108) – $0,17 \text{ s}^{-1}$ aktivitás My16Ank hozzáadására jelentősen, $V_{\max} = 0,22 \text{ s}^{-1}$ -re növekedett. Ezzel szemben a $K_{ATPáz}$ érték nem változott meg szignifikánsan. Az eredményeket a **3. Táblázat** foglalja össze. A My16Ank hatását illetően a nem-izom miozinnal végzett mérések hasonló eredményre vezettek, mint a vázizom miozinnal tapasztalt megfigyelések.

ATPáz aktivitás					
Vázizom HMM			Nem-izom HMM2B		
[My16Ank]	$V_{\max} (\text{s}^{-1})$	$K_{ATPáz} (\mu\text{M})$	[My16Ank]	$V_{\max} (\text{s}^{-1})$	$K_{ATPáz} (\mu\text{M})$
0 μM	$0,45 \pm 0,03$	$2,97 \pm 0,93$	0 μM	$0,17 \pm 0,06$	$14,36 \pm 1,51$
7 μM	$0,54 \pm 0,038$	$4,01 \pm 1,07$	4,7 μM	$0,19 \pm 0,02$	$12,78 \pm 4,30$
12,5 μM	$0,66 \pm 0,038$	$4,76 \pm 1,03$	8,6 μM	$0,23 \pm 0,01$	$14,38 \pm 1,26$
15 μM	$0,77 \pm 0,044$	$5,22 \pm 1,02$	11,7 μM	$0,23 \pm 0,01$	$11,60 \pm 1,22$

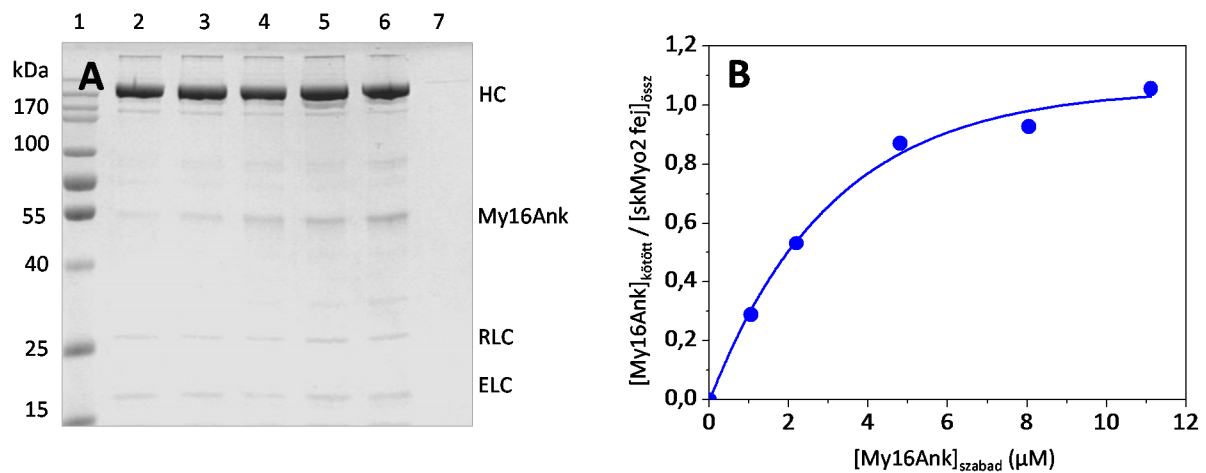
3. Táblázat. Steady-state ATPáz esszé kinetikai paramétereit, exponenciális illesztés alapján. Értékek megjelenítése átlag \pm SE formában, $n=4$ független mérés vázizom miozin esetén.

4.2.4 My16Ank köti a vázizom miozint

A My16Ank hatása a miozin motor domén ATPáz aktivitására csak úgy valósulhat meg, ha a My16Ank kölcsönhatásba kerül vagy a miozinnal, vagy az aktinnal, esetleg mindkettővel egyszerre. Ezek a kölcsönhatások kötődésen keresztül jöhetnek létre. Elsőként a My16Ank és a vázizom miozin kölcsönhatását vizsgáltuk. Kísérleteinkben a teljes hosszúságú vázizom miozint (skMyo2), illetve annak szolubilis fragmentumát, a nehéz meromiozint (skHMM) használtuk. A két modellrendszer lehetővé tette, hogy eltérő kísérleti stratégiák mentén végezzük a méréseket.

Ismert, a skMyo2 alacsony ionerő mellett (<140 mM KCl, pH 8-on) filamentumokat képez és kicsapódik (126). Ezt a tulajdonságot kihasználva megvizsgáltuk, hogy vajon a My16Ank képes-e kötődni és koszedimentálódni a skMyo2-vel, miközben a miozin oldatban tartáshoz szükséges 0,5 M KCl-t lassan elvonjuk. Az éjszakán át tartó dialízist követően a koprecipitálódott mintát ultracentrifugáltuk, majd a pelletet és szupernatánst SDS-PAGE-vel analizáltuk. Eredményeink azt mutatták, hogy a My16Ank koszedimentálódott a sMyo2-vel, míg önmagában oldatban maradt, igazolva, hogy a My16Ank képes kötődni a teljes hosszúságú vázizom miozin molekulához (**23. Ábra (A)**). A kötődés erősségének a meghatározása érdekében a kísérletet több My16Ank koncentráción (0–13,4 μM) is elvégeztük, 1,1 μM skMyo2 jelenlétében. A gékép alapján számolt kötött My16Ank koncentrációjának a miozin fejek koncentrációjára vonatkoztatott arányát ábrázoltuk a szabad

My16Ank koncentráció függvényében. A mérési pontokra illesztett hiperbola magas My16Ank koncentrációnál mutatott szaturációt, körülbelül 1:1 sztöchiometriai aránynál. A disszociációs egyensúlyi állandó (K_D) értéke $3,01 \pm 0,20 \mu\text{M}$ -nak adódott (**23. Ábra (B)**).

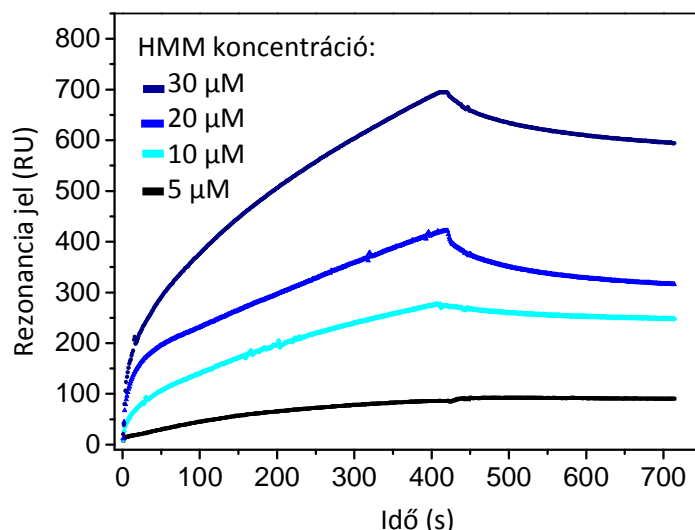


23. Ábra. (A) Ultracentrifugálást követő pellet SDS-PAGE képe: molsúly marker (1), skMyo2 koszedimentációja 0; 1,7; 3,4; 6,7; 10; 13,4 μM My16Ank-nel (2–6), My16Ank önmagában nem ülepedik (7). (B) Hiperbolikus illesztés a mérési pontokra.

A következőkben megvizsgáltuk, hogy a My16Ank a teljes hosszúságú miozin melyik részéhez kötődve fejt ki hatását. Ehhez a vázizom miozin HMM fragmentumát használtuk, ami alacsony ionerő mellett is oldatban tartható. Az interakció igazolására felületi plazmon rezonancia módszert alkalmaztunk¹⁰. A kísérleti elrendezésben a My16Ank-t kovalensen kötöttük a szenzorchip felszínére, majd különböző koncentrációjú (5–30 μM) tisztított skHMM-t áramoltattunk az immobilizált My16Ank fölött, és detektáltuk az asszociációt és disszociációt követő rezonancia jelet (**24. Ábra**). Ez utóbbit úgy, hogy elvontuk a skHMM-t az áramló fázisból. A szenzogramokat BIAevaluation szoftver segítségével analizáltuk és a görbe mindkét fázisára exponenciális egyenest illesztve meghatároztuk az asszociációs (k_a) és a disszociációs (k_d) sebességi együtthatókat. A k_d és k_a hányadosa megadja a My16Ank domén és a skHMM disszociációs egyensúlyi állandóját (K_D), aminek átlagértéke $2,4 \pm 1,4 \mu\text{M}$ -nak adódott. Ez az eredmény jól egyezik a korábbi méréseknél kapott értékkel ($3,01 \pm 0,2 \mu\text{M}$), amit a My16Ank és a skMyo2 koszedimentációja alapján mértünk.

Megfigyeléseink alapján arra következtettünk, hogy a My16Ank képes kötődni a vázizom miozinhoz. Mivel a kötődést a HMM fragmentumnál is tapasztaltuk, feltételezhetjük, hogy a My16Ank kötőhelye a miozin motor doménon vagy a regulatórikus és esszenciális könnyűláncot tartalmazó nyaki régióban található.

¹⁰ A felületi plazmon rezonancia mérést a Debreceni Egyetem Orvosi Vegytani Intézetében Bécsi Bálint végezte



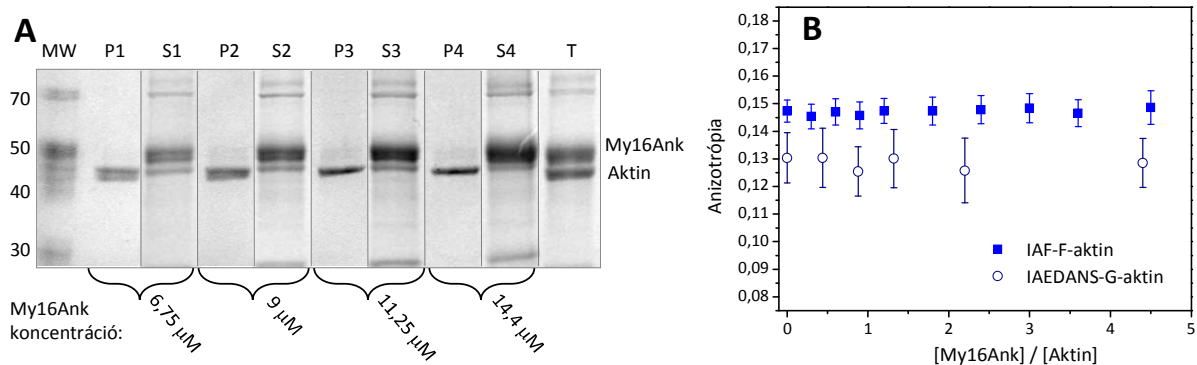
24. Ábra. My16Ank és skHMM kötődése felületi plazmon rezonancia módszerrel vizsgálva. A szenzogramok felszálló szára a kötődést, leszálló szára a disszociációt követi.

4.2.5 My16Ank nem köti az aktint

Egyes miozin családok rendelkeznek speciális funkciót ellátó pre-motor doménnel. Ismert, hogy például az egyfejű miozin 9 N-terminális extenziója aktin filamentumot képes kötni, ezáltal, mintegy „mankóként” elősegíteni a miozin motorfehérje processzív mozgását az aktin filamentumon (127). Ezt a tényt összevetve azokkal a korábbi megfigyeléseinkkel, hogy a miozin 16 N-terminális extenziója befolyásolja mind a vázizom, mind a nmHMM2B aktin-aktivált ATPáz aktivitását felveti annak a lehetőségét, hogy a My16Ank közvetlenül is képes lehet aktint kötni.

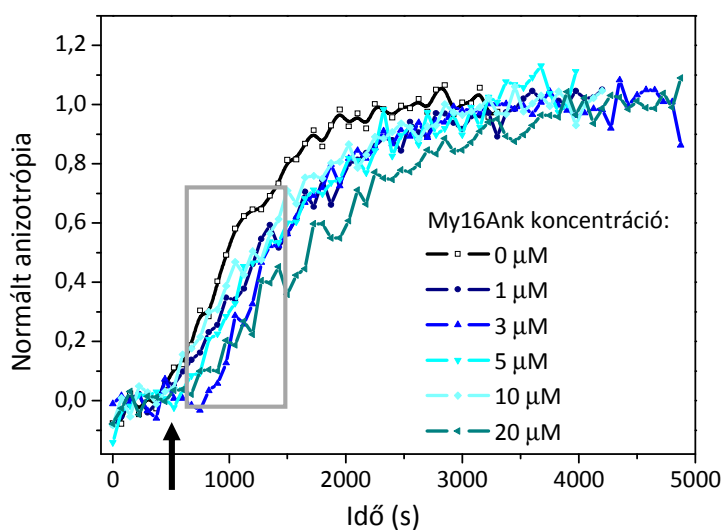
Első kísérletünkben koszedimentációs esszé segítségével vizsgáltuk a My16Ank és az F-aktin kölcsönhatását. 1 μM F-aktint inkubáltunk különböző koncentrációjú (6,75–14,4 μM) My16Ank-nel, majd ultracentrifugálás után elektroforézis segítségével vizsgáltuk a pelletet és a szupernatánst. Ahogy a géleképeken is látható, a My16Ank nem koszedimentálódik F-aktinnal, valószínűsíthetően nem kötődik hozzá (**25. Ábra (A)**).

Ezt a megfigyelést steady-state fluoreszcencia anizotrópia mérések segítségével ellenőriztük, valamint az is vizsgáltuk, hogy a filamentózus aktin helyett a My16Ank esetleg kötheti-e a monomer aktint. Eredményeink azt mutatták, hogy mind az IAF-jelölt F-aktin, mind az IAEDANS-jelölt G-aktin anizotrópiája változatlan maradt a növekvő My16Ank hozzáadása esetén (**25. Ábra (B)**), megerősítve a korábbi megfigyeléseket, hogy a My16Ank közvetlenül nem kötődik aktinhoz.



25. Ábra. My16Ank nem kötődik aktinhoz. (A) Koszedimentációs esszét követő SDS-PAGE, MW: mólsúly marker, P: pellet, S: szupernatáns, T: össz fehérje. (B) Aktin anizotrópia My16Ank jelenlétében.

Végül azt is megvizsgáltuk, hogy My16Ank-nak van-e hatása az aktin polimerizációs sebességére. 6 μM IAEDANS-jelölt G-aktin polimerizációját anizotrópia változáson keresztül követtük 100 mM KCl és 2 mM MgCl₂ hozzáadását követően, különböző My16Ank koncentrációk (0–20 μM) mellett. A polimerizációs görbéket normáltuk a plató szintjére és az emelkedés kezdeti lineáris szakaszának meredekségéből meghatároztuk a polimerizáció sebességi együtthatóját (26. Ábra). Adataink azt mutatták, hogy a My16Ank nem befolyásolja az aktin polimerizációjának a sebességét (4. Táblázat).



26. Ábra. Aktin polimerizáció My16Ank jelenlétében IAEDANS-G-aktin anizotrópián keresztül követve, nyíl: polimerizáció iniciálása. A sebességi állandókat a kezdeti lineáris fázis (keretezés) meredekségéből határoztuk meg.

[My16Ank] (μM)	k (*10 ⁻³ s ⁻¹)
0	0,47 ± 0,034
1	0,53 ± 0,028
3	0,49 ± 0,038
5	0,58 ± 0,028
10	0,52 ± 0,026
20	0,49 ± 0,036

4. Táblázat. Polimerizáció sebességi együtthatói.

Ezek a megfigyelések mind arra utalnak, hogy a My16Ank közvetlenül nem lép interakcióba az aktinnal és a miozin motor aktin-aktivált ATPáz aktivitásában tapasztalt változások a My16Ank és a miozin közötti kapcsolattal magyarázhatóak.

4.3 MY16ANK/PP1C DEFOSZFORILÁCIÓS KOMPLEX VIZSGÁLATA

4.3.1 My16Ank–PP1c kötés vizsgálata

Korábbi vizsgálataiban Patel és munkatársai leírták, hogy a posztnatális patkány kisagy lizátumban található Myo16 koimmunprecipitálódik a protein foszfatáz katalitikus alegységeivel: a PP1 α és PP1 γ izoformákkal (de nem a PP1 δ -val) (58). A kölcsönhatás ténye önmagában nem volt meglepő annak tükrében, hogy a Myo16 N-terminális régiója, az ankyrin domén (My16Ank) fehérje szekvenciája homológiát mutat a protein foszfatáz 1 regulatórikus alegységével (MYPT1). Az elvégzett összehasonlítás az általunk vizsgált *R. norvegicus* miozin 16 (NCB Accession # NP_620248) és a *R. norvegicus* protein foszfatáz 1 regulatórikus alegység 12A (NCB Accession # NP_446342) fehérje szekvenciái között 33%-os identikusságot és 49%-os hasonlóságot mutatott. A véletlenszerű egyezés valószínűsége ilyenfokú hasonlóság mellett igen kicsi ($E = 3 \cdot 10^{-34}$) (27. Ábra).

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
130 bits(327)	3e-34	Compositional matrix adjust.	104/315(33%)	157/315(49%)	17/315(5%)
My16Ank	20	VRRM CEQIKAY YER E KV F Q K Q EG LL KRI K PG KS Q KVRF GLADMIQDAIIHHHDK EVLQ L	79	++ R EQ+K + E + ++KR K KV+F + A EVL+L	
MYPT1	6	AK Q K R NE Q L KRW IG S ETD L E PP -- VV K R Q K ---- T KV K F DDGAVFLAACSSGD T D EVL KL	59		
My16Ank	80	I K EGADPH T LVSSGG S LL L HCARY D N V F I A E V L IDRGV V N H Q E D F W A P M I A C A C D N P	139	L GAD + G + LH DNV + + L++ G N+N D + W P+H A +C	
MYPT1	60	I H R G A D I N Y A N V D G L T A L H Q A C I D D N V D M V K F L V E N C A N I N Q P I N E G W I P L H A A S C G Y L	119		
My16Ank	140	D I V L L L I L A G A N V L L Q D V N E N I P L D Y A V E G T E S S A I L L A Y L D E N G V D L N S L R Q I K L Q R P L	199	DI LI GA+V + G+ PLD A E +L ++ GVD+ + R+ +	
MYPT1	120	D I A E F L I G Q G A H V G A V N S E G D T P L D I A E --E A M E E L L Q N E V N R Q G V D I E A A R K---E E E R	175		
My16Ank	200	S M L T D V R H F L S S G-- G D V NE K N D D G V L L H M A C A S G Y K E V V L L L L E H G D L N G M D D G Y W T	257	ML D R +L+SG DV G T LH+A A GY EV+ LL++ G D+N D WT	
MYPT1	176	I M L R D A R Q W L N S G H I S D V R H A K S G G T A L H V A A K G Y T E V L K L L I Q A G Y D V N I K D Y D G W T	234		
My16Ank	258	P L H L A A K Y Q T T L V K L L A H Q A N P H L V N C N E K P S D I A A S E ---S I E E M L L K A E - I A W E E	313	PLH AA +G+ ++L+ + + VN G+ D+A + +EE+ K + E+	
MYPT1	235	P L H A A A H W K E E A C R I L V D N L C D M E T V N K V Q T A F D V A D E D I L G Y L E E L Q R K Q N L L H S E K	294		
My16Ank	314	R M K E S S V P S L A Q E E	328	R K+SP + S A E	
MYPT1	295	R D K S P L I E S T A N M E	309		

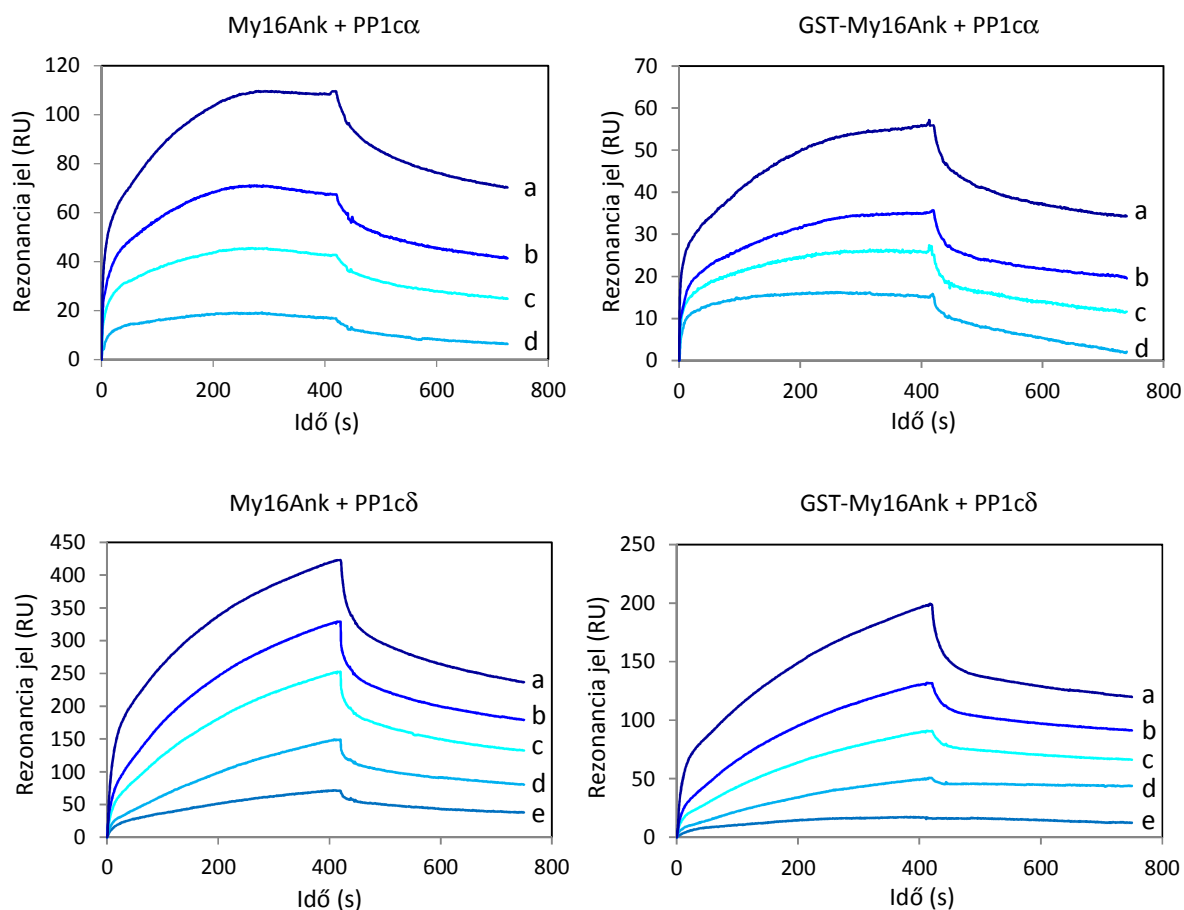
27. Ábra. My16Ank és MYPT1 szekvenciák összehasonlítása NCBI Blast program segítségével, keretelve a MyPhoNE és a KVxF elemek, piros: identikus, sárga: homológ aminosavak.

Mivel a fehérje funkcióját elsősorban meghatározó térszerkezet kialakításáért felelős aminosavak azok, amelyek nagyobb mértékben konzerválódnak, 25%-os szekvencia homológia felett nagyfokú hasonlóságot találunk a funkcióban is. Emellett a My16Ank tartalmaz két PP1c kötésért felelős szekvencia elemet: a KVxF motívumot (55–58 aminosav pozícióánál), ami a kanonikus PP1c kötőhely, valamint a kötés stabilizálásában szerepet játszó RxxQIKxY motívumot (24–31 aminosav pozícióánál), az ún. MyPhoNE elemet.

Hogy meghatározhassuk a My16Ank szerepét a foszfatáz komplex aktiválásában, *in vitro* körülmények között vizsgáltuk a My16Ank és a különböző PP1c izoformák kölcsönhatását. A méréseket felületi plazmon rezonancia módszerrel végeztük. Mivel a fehérje felszínhez való rögzítésének módja befolyásolhatja az interakciót, kísérleteinkben kétféle My16Ank konstrukciót használtunk, amelyeket eltérő módon rögzítettünk a felszínre. A GFP-fúzionált My16Ank-t anti-GST antitesttel, míg a GST-től TEV proteázzal megfosztott My16Ank-t az amin ($-NH_2$) oldalláncainál direkt kovalens kötéssel rögzítettük a szenzorchip felszínére. Ezt követően különböző koncentrációjú (0,5–5 μ M) tisztított PP1c α és PP1c δ oldatokat injektáltunk az immobilizált My16Ank felszín fölé és detektáltuk az asszociációt, majd a – szabad PP1c elvonását követő – disszociációt jellemző rezonancia jelet (**28. Ábra**). Az eltérő rögzítési módszerekkel kapott eredmények teljes mértékben megfeleltethetőek voltak egymásnak, így kizártuk annak a lehetőségét, hogy az interakciós felszín elfedettsége a mérési eredmények torzulásához vezetett volna¹¹.

Eredményeink alapján a tisztított My16Ank domén szubmikromoláris affinitással, erősen köti mind a PP1c α ($K_D = 540 \pm 209$ nM), mind a PP1c δ ($K_D = 606 \pm 173$ nM) izoformákat. A GFP-fúzionált My16Ank hasonló affinitást mutatott ($K_D = 405 \pm 267$ nM PP1c α , illetve $K_D = 329 \pm 252$ nM PP1c δ esetén). A szenzogramok alapján meghatározott kinetikai paramétereket az **5. Táblázat** foglalja össze. Ezek az értékek ellentmondanak a korábban közölt mérési eredményeknek, amelyek szerint, hogy a miozin 16b koimmunoprecipitál a PP1c α és PP1c γ izoformákkal, de nem kötődik a PP1c δ izoformához (58).

¹¹ A felületi plazmon rezonancia mérést a Debreceni Egyetem Orvosi Vegytani Intézetében Bécsi Bálint végezte



28. Ábra. Felületi plazmon rezonancia szenzogram PP1c izoformák kötődésekor immobilizált My16Ank-hoz. PP1c koncentrációk: 5 μM (a); 3 μM (b); 2 μM (c); 1 μM (d); 0,5 μM (e).

	My16Ank			
	k_a ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_A (M^{-1})	K_D (M)
PP1c α	$3,22 \pm 1,67 \cdot 10^3$	$1,74 \pm 0,2 \cdot 10^{-3}$	$1,85 \pm 0,81 \cdot 10^6$	$5,40 \pm 2,28 \cdot 10^{-7}$
PP1c δ	$1,41 \pm 0,18 \cdot 10^3$	$8,54 \pm 1,55 \cdot 10^{-3}$	$1,65 \pm 1,93 \cdot 10^6$	$6,06 \pm 2,49 \cdot 10^{-7}$
	GST-My16Ank			
	k_a ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_A (M^{-1})	K_D (M)
PP1c α	$4,44 \pm 2,26 \cdot 10^3$	$1,80 \pm 0,41 \cdot 10^{-4}$	$2,47 \pm 0,97 \cdot 10^6$	$4,05 \pm 1,25 \cdot 10^{-7}$
PP1c δ	$1,44 \pm 0,66 \cdot 10^3$	$4,73 \pm 1,86 \cdot 10^{-4}$	$3,04 \pm 1,76 \cdot 10^6$	$3,29 \pm 2,85 \cdot 10^{-7}$

5. Táblázat. Felületi plazmon rezonancia szenzogramokból számított asszociációs (k_a) és disszociációs (k_d) sebességi együtthatók, valamint az egyensúlyi állandók (K_A , K_D).

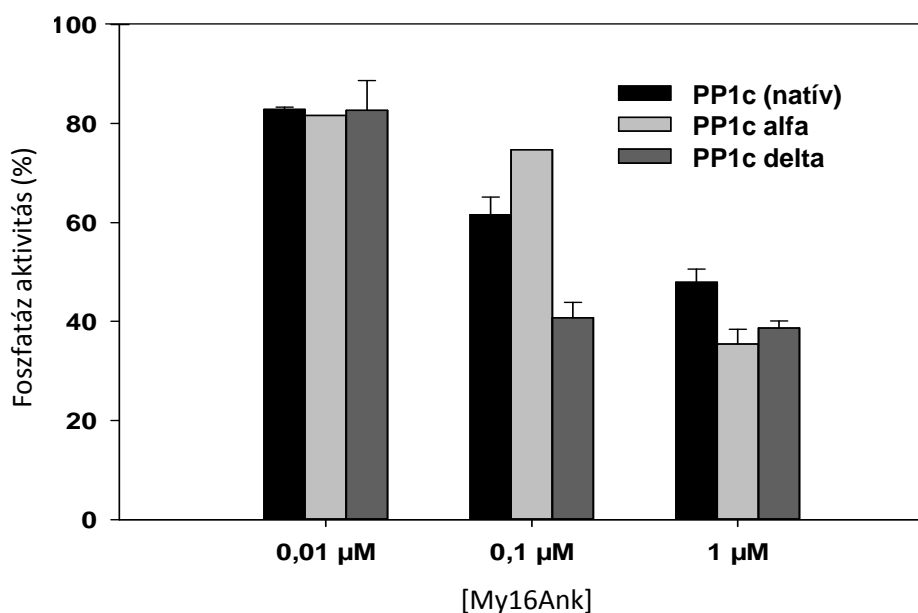
4.3.2 PP1 enzimaktivitás mérés

A protein foszfatáz holoenzim (PP1) defoszforilációs aktivitásáért a katalitikus alegység (PP1c) felelős, szabályozásáért pedig a regulatórikus alegység. A regulatórikus (más néven: célzó) alegység

kapcsolódása a katalitikus alegységhez egyrészt fokozhatja az enzimaktivitást és biztosítja a specifikus szubsztrát megfelelő közelségét, másrészt viszont gátolhatja azoknak a szubsztrátoknak a defoszforilációját, amelyeket elsősoban a szabad PP1c defoszforilál. Például a miozin foszfátáz holoenzim esetén a MYPT1 regulatórikus alegység kötődése a PP1c katalitikus alegységhez jelentősen fokozza a foszforilált miozin regulatórikus könnyű lánc (P-RLC) defoszforilálását, viszont gátolja a glikogén-foszforiláz enzim defoszforilációját (99).

A My16Ank valamint a a MYPT1 között fennálló homológia alapján feltételeztük, hogy a My16Ank kötődése a PP1c-hez fokozhatja a simaizom P-RLC defoszforilációját. A méréshez szükséges radioaktív ^{32}P -RLC szubsztrátot Ca^{2+} - és CaM-függő MLCK segítségével állítottuk elő, $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ felhasználásával. A PP1c aktivitását a defoszforiláció során felszabaduló $^{32}\text{P}_i$ mérésén keresztül követtük. A vizsgálatok során különböző PP1c izoformákat teszteltünk, úgymint rekombináns PP1c α -t és PP1c δ -t, valamint nyúl vázizomból izolált, többféle izoforma keverékét tartalmazó natív PP1c-t¹².

A várakozásokkal ellentétben azonban a My16Ank domén jelenléte koncentrációtól függően, szignifikánsan csökkentette a PP1c összes izoformájának katalitikus aktivitását. 1 μM My16Ank hozzáadása esetén mintegy 40%-ra mérséklődött a kiindulási – My16Ank mentes – referencia aktivitás (29. *Ábra*). Az eredmények azt mutatták, hogy a My16Ank komplexet alkotva a PP1c-vel gátolja a P-RLC defoszforilációját, aminek lehetséges magyarázata, hogy a My16Ank elfedi a kötő felületet a PP1c felszínén.



29. *Ábra.* Különböző PP1c alegységek foszfátáz aktivitása My16Ank jelenlétében.

¹² A defoszforilációs méréseket a Debreceni Egyetem Orvosi Vegytani Intézetében Kónya Zoltán végezte

5 A TÉMÁBAN ELÉRT ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

Kutatásaink során megállapítottuk, hogy az N-terminális GFP-fúziós regulatórikus könnyű láncot tartalmazó nem-izom miozin 2A (GFP-nmHMM2A):

- koexpresszálható és tisztítható a bakulovírus/Sf9 rendszerben – hasonlóan a korábban már leírt, kontrollként használt vad típusú WT-nmHMM2A-hoz
- a GFP-nmHMM2A regulációját a GFP nem akadályozza, az RLC defoszforilált állapotában a miozin inaktív
- foszforiláció hatására a GFP-nmHMM2A aktin aktivált steady-state MgATPáz aktivitása megnövekszik, de a V_{max} ($0,20 \pm 0,02 \text{ s}^{-1}$) értéke elmarad a WT-HMM2A esetében mérttől ($0,39 \pm 0,016 \text{ s}^{-1}$), miközben az aktin affinitást kifejező $K_{ATPáz}$ értéke szignifikánsan nem változik
- a GFP-RLC szubsztrátja a MLCK enzimnek és képes teljes mértékben foszforilálódni, de a foszforiláció lassabb kinetikával játszódik le
- a GFP-RLC kevésbé alkalmas szubsztrátja az MLCK-nak, mint a WT-RLC, a K_M érték, habár nem szignifikánsan, de magasabb ($3,6 \pm 0,6 \mu\text{M}$ a GFP-RLC, $2,1 \pm 0,2 \mu\text{M}$ a WT-RLC esetén)
- egyedi molekulák szintjén vizsgálva a GFP-nmHMM2A aktin filamentumokat mozgó *in vitro* motilitási sebessége $0,29 \pm 0,05 \mu\text{m/s}$ szignifikánsan elmarad a WT-nmHMM2A esetén mért $0,35 \pm 0,06 \mu\text{m/s}$ sebességtől.

A nem-konvencionális miozin XVI motorfehérje N-terminális ankyrin doménjének (My16Ank) kinetikai vizsgálata során, modell rendszerként vázizom, illetve nem-izom miozin 2B-t használtunk.

Megállapítottuk, hogy a My16Ank:

- képes kötődni a modell rendszerként használt skMyo2-höz ($K_D = 3,01 \pm 0,2 \mu\text{M}$) és a skHMM fragmentumhoz ($K_D = 2,4 \pm 1,4 \mu\text{M}$)
- nem változtatja meg a skHMM bazális aktivitását, viszont fokozza a skHMM aktin-aktivált steady-state ATPáz aktivitását, $15 \mu\text{M}$ My16Ank jelenlétében a V_{max} $0,66 \pm 0,009 \text{ s}^{-1}$ -ra növekszik a My16Ank mentes rendszerben mért $0,42 \pm 0,012 \text{ s}^{-1}$ értékről
- nem befolyásolja nmHMM2B foszforilációját

- fokozza a foszforiláció regulált nmHMM2B aktin-aktivált steady-state ATPáz aktivitását, 11,7 μM My16Ank jelenlétében a V_{max} $0,23 \pm 0,008\text{s}^{-1}$ -ra növekszik a My16Ank mentes rendszerben mért $0,17 \pm 0,06 \text{s}^{-1}$ értékről
- nem kötődik sem a globuláris, sem a filamentáris aktinhoz és nem befolyásolja az aktin polimerizáció dinamikáját
- ~50% homológiát mutat a miozin foszfatáz regulatórikus alegységével (MYPT)
- erősen kötődik a PP1 α ($K_D = 540 \pm 228 \text{nM}$) és PP1 δ ($K_D = 606 \pm 249 \text{nM}$) izoformákhoz
- csökkenti a különböző PP1c izoformák defoszforilációs aktivitását a foszforilált RLC szubsztrát irányában (a kiindulási aktivitás ~ 40%-ra).

6 MEGBESZÉLÉS

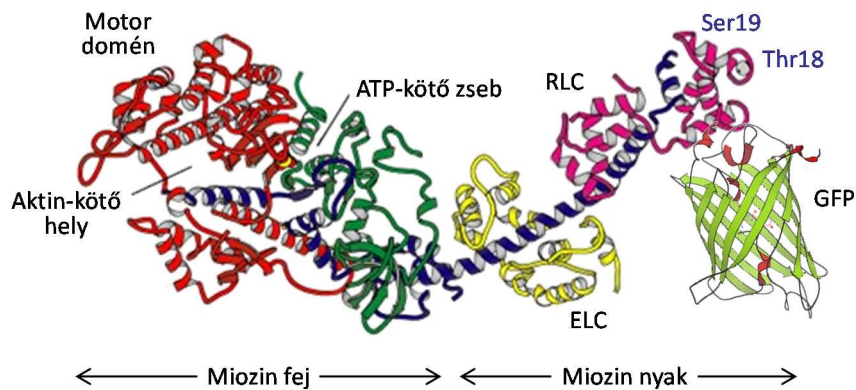
Az élő sejt egyik legfontosabb szabályozó és jelátvivő mechanizmusa a foszforiláció és a vele ellentétes defoszforiláció. A miozinok működésében is alapvető jelentőségű mind a regulatórikus könnyűlánc, mind a nehéz lánc foszforilációja és az ezekhez szükséges enzimek megfelelő működése és egyensúlya. Munkánk során a miozinok szabályozásában szerepet játszó foszforilációs-defoszforilációs folyamatok néhány aspektusát vizsgáltuk különböző típusú miozinok esetén. Első kísérletsorozatunkban a konvencionális miozin II motorfehérje foszforilációs dinamikáját vizsgáltuk a regulatórikus könnyűlánc fluoreszcens GFP-vel történő jelölése esetén. Második projektünk a nem-konvencionális miozin XVI speciális ankyrin doménjének a karakterizálása volt, amely a protein foszfatáz katalitikus alegységéhez kötve feltételezhetően részt vesz az intracelluláris fehérjék célzott defoszforilálásában.

6.1 GFP HATÁSA AZ RLC MŰKÖDÉSÉRE

A kísérleteinkhez használt nmMyo2A motorfehérje szolubilis fragmentumát a nmHMM2A-t bakulovírus/Sf9 rendszerben koexpresszáltuk ELC-vel és GFP-RLC-vel, illetve a kontroll mérésekhez vad típusú WT-RLC-vel. Az így módon előállított, majd tisztított rekombináns miozinok kinetikai tulajdonságait vizsgáltuk, valamint azt, hogy mennyire alkalmas szubsztrátjai a MLCK enzimnek. Mérési adataink kismértékű eltérést mutattak ki a GFP-RLC-t tartalmazó, valamint a vad típusú nmHMM2A között, de emellett az RLC miozin regulációjában betöltött szerepét a GFP-fúzió alapvetően nem befolyásolta. Az *in vitro* vizsgálataink eredményei alapján feltételezzük, hogy a GFP-RLC kiméra könnyűláncot tartalmazó nem-izom miozin *in vivo* viselkedése megfeleltethető a vad típusúnak, ami megerősíti azt a korábbi gyakorlatot, hogy fluoreszcens markerként alkalmazva a GFP-RLC jelölje a miozin lokalizációját a sejtbiológiai vizsgálatokban.

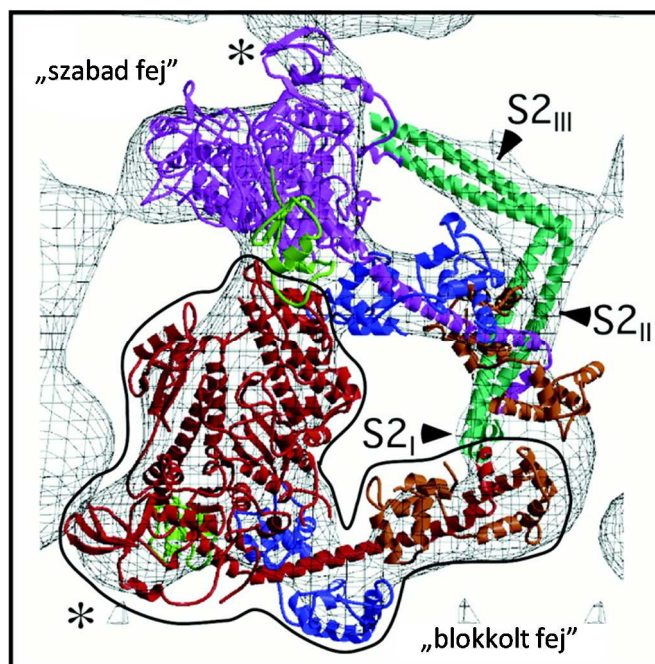
A nmMyo2A motorfehérje tulajdonságait és élettani funkcióit intenzíven vizsgálták az utóbbi évtizedekben, számos különböző *in vitro* és *in vivo* technika felhasználásával. Az egyik ígéretes, könnyen alkalmazható technika a nmMyo2A *in vivo* követésére a fluoreszcens fehérjével fuzionált RLC expressziója a sejtekben, ami asszociálódik az endogén nmMyo2A-hoz és beépül a filamentumokba (30. *Ábra*). Ezekben a kísérletekben a GFP-t az RLC N-, vagy C-terminális régiójával fuzionálták. Gyakrabban alkalmazott technika a GFP fúziója az RLC C-terminálisához, amiről simaizom miozinnal végzett *in vitro* mérésekkel igazolták, hogy ezt a konstrukciót, akár csak a vad-típusú RLC-t, a foszforiláció szabályozza és teljesen foszforilált állapotában normál enzimatikus tulajdonságokkal rendelkezik (86). Az MLCK foszforiláció kinetikáját azonban ezen konstrukció esetén sem vizsgálták. Más konstrukciókat, ahol a GFP-t az RLC N-terminálisára fuzionálták, szintén alkalmaztak tranziens transzfekciós kísérletekben, ahol a könnyűlánc beépült a stressz-rostokba, a miozin nehézláncával való

asszociáció révén (87). Nem vizsgálták viszont azt, hogy ez a GFP-RLC fúziós fehérje az endogén könnyűláncához hasonlóan viselkedik-e a miozin enzimatis aktivitásának és motilitásának szabályozásában.



30. Ábra. *Nem-izom HMM2A hipotetikus szerkezeti képe GFP-fúziós könnyűláncsal. Felhasználva a miozin S1 szerkezeti képét (48).*

A nem-izom miozin 2A regulatórikus könnyűláncának foszforilációja nemcsak az enzimaktivitást szabályozza, hanem a miozin filamentumok összeszerelődését is (128). Defoszforilált állapotban, fiziológias ionkoncentráció mellett a nmMyo2A ATP hiányában filamentumokat képez. ATP hozzáadására a filamentumok depolimerizálódnak és a szolubilis miozin kompakt szerkezeti állapotot vesz fel, melyben a farki rész visszahajlik a miozin fejéhez, kialakítva az ultracentrifugával 10S szedimentációs állandójú inaktív off-konformációt (128–130). Az RLC foszforilációja stabilizálja a miozin filamentumokat ATP jelenlétében is. A 10S konformáció részletes szerkezetvizsgálata simaizom miozin esetében (31. Ábra) azt jelezte, hogy a miozin két feje aszimmetrikus konformációt vesz fel, amiben az egyik fej aktin kötő doménje („blokkolt fej”) a másik fej bázisához kötődik („szabad fej”) (40, 130–133). A simaizom RLC elektron paramágneses spektroszkópiai és célzott spin jelöléses vizsgálatai alapján feltételezhető, hogy foszforiláció hatására az RLC N-terminális foszforilációs doménje konformáció változást szenved, ami fokozza a helikális rendezettségét és belső dinamikáját (134, 135). A foszforiláció által indukált rendezettebb állapotba történő átmenet valószínűsíthetően csökkenti a két miozin fej közötti interakciót, ezáltal aktiválja a motor domént.



31. Ábra. Foszforilátlan simaizom HMM szerkezeti képe. Az aszimmetrikus elrendeződésű miozin nehéz láncok közül a „blokkolt fej” (vörös) aktinkötő helye gátolt, a „szabad fej” (lila) ATP-kötő helyéhez kapcsolódik, gátolva annak ATP-hidrolizáló aktivitását. Konverter régió (zöld), RLC (barna), ELC (kék) (133).

Joggal feltételezhetjük, hogy ha a regulatórikus könnyűlác amino-terminálisára egy nagyméretű GFP molekulát kapcsolunk – aminek molsúlya csaknem másfélszer akkora, mint az egész regulatórikus könnyűlác – akkor az megzavarhatja a miozin normális működését. Például elrejtetheti a Ser19 aminosavat az MLCK foszforilálása elől, megakadályozhatja a miozin off-konformáció kialakulását vagy más módon interferálhat a miozin normális enzimatis vagy mechanikai funkciójával. Vizsgálataink azt mutatták, hogy a foszforilátlan GFP-RLC-t tartalmazó miozin MgATPáz aktivitása aktin jelenlétében is nagyon alacsony. Ez a sebességi állandó nagyon hasonló a WT-nmHMM2A esetén mért értékekhez, ami azt valószínűsíti, hogy a GFP-jelölt fehérje is képes felvenni a kompakt off-konformációt. Továbbá, a foszforilátlan GFP-nmHMM2A nem mozgatta az aktin filamentumokat. A nmHMM2A-hoz kötött GFP-RLC, mint az MLCK szubsztrátja, nagyjából hasonló maximális sebességgel (V_{max}), viszont magasabb $K_{ATPáz}$ értékkel foszforilálódott, mint a WT-nmHMM2A. Ez a némiképp csökkent affinitás az MLCK enzim és a GFP-RLC szubsztrát között azt is jelentheti, hogy alacsony miozin koncentráción a foszforiláció lényegesen lassabban játszódhat le, mint a WT-nmHMM2A esetén, míg magas miozin koncentráció esetén a különbség nem jelentős.

A GFP-nmHMM2A MgATPáz aktivitását a foszforiláció jelentősen növelte, ami ismételtlen alátámasztotta, hogy a kiméra fehérje a foszforiláció révén jól szabályozott. A GFP-nmHMM2A aktin-aktivált MgATPáz aktivitás maximális reakciósebessége azonban lecsökkent a WT-nmHMM2A-hoz viszonyítva, annak csak mintegy a felét érte el, míg a HMM és az aktin közötti affinitást jellemző $K_{ATPáz}$

értéke szignifikánsan nem tért el a különböző könnyűláncok használata esetén. A GFP-nmHMM2A-val borított felszínen elmozduló aktin filamentumok motilitási sebessége is lassult a WT-nmHMM2A-hoz képest. Az a megfigyelésünk, hogy az aktin-aktivált MgATPáz aktivitást nagyobb mértékben csökkentette a GFP fúziója a könnyűláncsal, mint az aktin filamentumok motilitását, magyarázható azzal, hogy a két folyamatot az ATPáz ciklus eltérő kinetikai lépései szabályozzák. A nmHMM2A aktin-aktivált MgATPáz aktivitását a foszfát kibocsátás (94), míg az aktin filamentumok mozgását az ADP kibocsátás (136) sebessége limitálja.

Azok a különbségek, amiket a GFP-fúziós RLC kinetikájában és foszforilációs dinamikájában találtunk, álláspontunk szerint nem olyan jelentősek, hogy megkérdőjelezzék ennek a fúziós fehérjének a használatát a sejtbiológiai vizsgálatokban. Korábbi vizsgálatok bizonyították, hogy jónéhány miozint érintő mutáció, ami az *in vitro* funkciót megváltoztatta, *in vivo* körülmények között mégis – bizonyos mértékben – biztosítani tudta a normális működést. Például egy egér kísérletben, ahol az endogén miozin 2B-t kicserélték egy mutáns fehérjére, aminek az *in vitro* körülmények között mért MgATPáz aktivitása mindössze 25%-a volt a normál értéknek, az állat életképes maradt, csekély fenotípusbeli eltéréssel (137, 138). Hasonlóképpen számos, a *Dictyostelium* miozin 2-t érintő, *in vitro* funkciót megváltoztató mutáció esetén az élőlény életképes maradt, gyakran minimális fenotípusos elváltozásokkal (139). Az a tény, hogy a jelen munkánkban vizsgált GFP-nmHMM2A enzimikus aktivitását a foszforiláció szabályozza, nagymértékben valószínűsíti, hogy az intracelluláris környezetben GFP-RLC-t tartalmazó teljes hosszúságú nem-izom miozin 2A is képes off-állapotba kerülni és valószínűleg felvenni a 10S konformációt, ami elengedhetetlen feltétele a miozinok sejten belüli dinamikus átrendeződésének. Végeredményben, az N-terminális GFP-vel jelölt RLC drasztikusan nem befolyásolja a nem-izom miozin *in vitro* tulajdonságait, ezáltal igazolható ennek a fluoreszcens fúziós fehérjének a használata a miozinok intracelluláris követésére.

6.2 A MIOZIN 16 ANKYRIN DOMÉN BIOKÉMIAI KARAKTERIZÁLÁSA

Eddigi ismereteink a miozin 16b (Myo16b) funkciójáról azt valószínűsítik, hogy ez a motorfehérje kulcsszerepet játszhat fontos élettani folyamatokban. Patel és munkatársai fejlődő idegsejtekben írták le először a Myo16b-t, ami legnagyobb mennyiségben az újszülött és korai posztnatális időszakban termelődik. Érdekes módon, a Myo16b képes bejutni a sejtmagba, ahol szerepe lehet a sejtciklus szabályozásában: a Myo16b túlexpresszállása a sejtekben késlelteti az S-fázisból G2-fázisba történő átmenetet (91, 92). Számos nyitott kérdés vár még megválaszolásra a Myo16b szerkezetét és kölcsönhatásait illetően, hogy alaposabban megértsük ennek a motorfehérjének a sejtekben betöltött

szerepét. Jelen munkánk a miozin XVI család egyedi szerkezeti elemét, a ~45kDa-os N-terminális ankyrin domént (My16Ank) vizsgálta részletesebben.

Kísérleteinkhez rekombináns My16Ank domént a biokémiai mérésekhez megfelelő mennyiségben expresszáltuk és tisztítottuk. Elsőként a My16Ank lehetséges szabályozó hatását vizsgáltuk a motor funkcióra vázizom miozin (skHMM) és nem-izom miozin (nmHMM2B) modell rendszerekben. Eredményeink azt mutatták, hogy a My16Ank nem befolyásolta a miozin bazális ATPáz aktivitását, de meglepő módon, az aktin-aktivált ATPáz aktivitást jelentősen fokozta. Az aktin koncentrációtól függő V_{max} értékek növekedése arra enged következtetni, hogy a My16Ank felgyorsíthatja az aktin-aktivált ATPáz ciklus sebességmeghatározó lépését. Elvileg az aktin-aktivált ATPáz ciklus bármelyik kinetikai lépése lehet sebesség meghatározó: akár az ATP hidrolízis termékeinek disszociációja, akár az aktin disszociációja a miozinnal. Mivel a $K_{ATPáz}$ érték szignifikánsan nem változott My16Ank jelenlétében, ezért az aktin-miozin kapcsolat fellazulása, és emiatt egy gyorsabb disszociáció nem valószínűsíthető. Ezért feltételezzük, hogy az ATP hidrolízis valamelyik termékének a kibocsátása lehet az a megváltoztatott kinetikai lépés, aminek eredményeként magasabb V_{max} értékeket találtunk a növekvő My16Ank koncentráció mellett. Természetesen még további kinetikai mérések lesznek szükségesek a folyamat részleteinek pontos megértéséhez.

Többféle módszerrel is kimutattuk, hogy a My16Ank képes kötődni a miozinhoz, jóllehet ez a kapcsolat meglehetősen gyenge. Az eredmények értelmezésekor két fontos szempontot nem szabad figyelmen kívül hagyni. Egyrészt a vizsgálatok során modell rendszereken (vázizom, illetve nem-izom miozinon) dolgoztunk, mivel Myo16 motor domén a kísérletek idejében még nem állt rendelkezésünkre, ezért a fiziológiailag releváns affinitás értékek ettől eltérőek lehetnek, valószínűleg erősebbek. Másrészt, natív állapotában a Myo16 egyazon polipeptid lánc tartalmazza az ankyrin domént és közvetlen utána a motor domént. Ezesetben a My16Ank domén közvetlenül a motor doménhez rögzített, így annak látszólagos koncentrációját szerkezeti tulajdonságok és a geometriai elrendeződés, nem pedig a tényleges anyagmennyiség határozza meg. Egy példával szemléltetve: tételezzük fel, hogy ha a My16Ank 1 nm-es linkerrel kötődik a motor doménhez, akkor 1 My16Ank molekula tartózkodik 1 nm sugarú térrészben, ami megközelítőleg 0,4 M látszólagos koncentrációnak felel meg. Mindezek alapján arra következtettünk, hogy a gyenge kötődés mindenképpen azt jelzi, hogy a miozin rendelkezik My16Ank kötőhellyel, ami a skHMM-mel végzett mérések alapján feltehetőleg a motor doménon vagy a könnyűláncokon található (kevésbé valószínű, de egyértelműen még nem kizárható a konverter régió, ami a HMM nehéz láncán található proximális coiled-coil szakasz).

Kimutattuk, hogy a My16Ank nincs hatással a miozin bazális MgATPáz aktivitására, ami arra utal, hogy a My16Ank nem változtatja meg a motor doménon a nukleotid kötő zseb körüli struktúrát. Azt is igazoltuk, hogy a My16Ank nem köti az aktint sem monomer, sem filamentáris formában, így azt is

kizártuk, hogy a My16Ank az aktinon lévő miozin-kötő helyet módosítaná. Megfigyeltük továbbá, hogy az aktin jelenléte szükséges ahhoz, hogy a My16Ank kifejtse hatását a miozin ATPáz aktivitásra. Mindezeket összevetve, az aktin-aktivált ATPáz aktivitás növekedése magyarázható azzal, hogy a My16Ank az aktin-miozin csatolást módosítja, hatékonyabbá téve a fehérje-fehérje kölcsönhatást. Ennek elérésére több lehetőség is kínálkozik a fehérje szerkezet szintjén. Az egyik lehetőség, hogy a My16Ank beépül a motor doménbe és részévé válik az aktin-kötő felszínnek. A My16Ank részvétele ebben a kötésben speciális szerkezeti elrendeződés révén valósulhat meg, hiszen a My16Ank önmagában nem köti az aktint. Ez magába foglalja annak a lehetőségét, hogy a natív Myo16 szerkezetében az ankyrin domén fontos szerepet játszhat az aktin és a miozin interakció kialakításában.

A protein foszfatáz (PP1) enzimek meghatározó jelentőségűek a fehérjék foszforilációs-defoszforilációs szabályozási ciklusaiban. A foszfatázok katalitikus alegységének (PP1c) célba juttatásáért és gyakran az enzimatis aktivitásuk fokozásáért is az úgynevezett regulatórikus alegység felelős, ilyen például a miozin foszfatáz holoenzim nagy célzó alegysége (MYPT1), ami a foszforilált miozin RLC defoszforilálásának specificitásáért felelős. Érdekes felismerés volt, hogy a My16Ank mintegy 50% aminosav szekvencia homológiát mutat a MYPT1 fehérjével. *In vitro* kísérleteinkkel kimutattuk, hogy az izolált My16Ank domén erősen kötődött a PP1 α és PP1 δ alegységekhez, nagyjából azonos affinitással. Számos kérdés vár még megválaszolásra a My16Ank és a PP1c kapcsolódásának élettani szerepét illetően, de általánosságban már most megállapítható, hogy a My16Ank a PP1c alegységgel komplexben protein foszfatáz holoenzimként viselkedhet.

A Myo16b több feltételezett foszforilációs helyet is tartalmaz, amiket PROSITE bioinformatikai program segítségével találtunk (70). Ezek a helyek többek között PKC, kazein kináz 2 vagy cAMP-függő protein kináz célpontjai lehetnek. Ezen ismeretek birtokában először azt feltételeztük, hogy az ankyrin domén kapcsolódása a PP1c-hez egy auto-defoszforilációs szabályozási folyamat része lehet, amelyben vagy a nehézlánc, vagy a könnyűlánc defoszforilálódik. A feltételezés igazolásához legelőször azt kell tesztelni, vajon a My16Ank kötődése a PP1c-hez képes-e elősegíteni a megfelelő szegmentumok defoszforilálását. Jelenleg nincs információnk arról, hogy a miozin XVI családba tartozó fehérjék milyen könnyű láncsal rendelkeznek. A nyaki részen található konszenzusos IQ szekvencia motívum nagy valószínűséggel kalmodulin könnyű lánc kötésére szolgál (11), de az utóbbi idők egyik érdekes felfedezése alapján más könnyű láncok (RLC vagy ELC) kötődése sem tekinthető kizártnak (140). Épp ezért, kísérletünkben foszforilált regulatórikus könnyű láncot (P-RLC) használtunk, mint a My16Ank–PP1c komplex lehetséges szubsztrátja. A P-RLC nem mellesleg a MYPT1–PP1c komplex természetes szubsztrátja is. Méréseink azonban azzal a meglepő eredménnyel végződtek, hogy My16Ank jelenlétében a (rekombináns vagy natív módon előállított) összes különböző PP1c preparátum enzimaktivitása szignifikánsan csökkent a P-RLC szubsztrát irányába. Ez egyfelől azt jelenti, hogy a P-RLC nem a preferált szubsztrátja a My16Ank–PP1c komplexnek. Szerkezeti oldalról viszont

magyarázhatjuk úgy ezt a megfigyelést, hogy a My16Ank kompetál a P-RLC-vel a PP1c-n található kötőhelyekért. Ezt a feltételezést természetesen még további kísérletekkel kell alátámasztani. A lecsökkent PP1c enzimaktivitás a My16Ank jelenlétében mindenképpen arra enged következtetni, hogy a My16Ank–PP1c komplexnek nem a P-RLC a specifikus célmolekulája.

Vizsgálataink azt mutatták, hogy még mindig számos kérdés vár megválaszolásra, ha megszeretnénk érteni a Myo16b sejten belül betöltött szerepét. A Myo16b komplexet alkotva a PP1c katalitikus alegységgel protein foszfatázként viselkedhet, ahol maga a Myo16b lehet a célzó alegység, ami felelős a PP1c specificitásáért a – jelenleg még nem azonosított – célfehérjék defoszforilációjában. A My16Ank–PP1c komplex természetes szubsztrátjának a megtalálása (ami lehet akár maga a miozin 16 is) valószínűleg komoly adalékkal szolgálna a Myo16b sejten belüli funkciójának megértésében.

Jelen állás szerint azonban csak feltételezéseink vannak a Myo16b és az ankyrin domén lehetséges szerepét illetően. Ennek egyik érdekes pontja a Myo16b fark doménje, ami az IUPred bioinformatikai program (70) jóslata alapján egy teljesen rendezetlen szerkezettel bíró polipeptid lánc (úgynevezett „*intrinsically disordered protein*”), ami egy hosszú, prolin gazdag régiót tartalmaz, ami tipikus profilin kötő hely (68). Szintén a Myo16b fark doménjének disztális ~300 aminosavja felelős a nukleáris lokalizációért (59). Feltételezzük, hogy a profilin kötésen keresztül a Myo16b részt vehet a nukleáris aktin citoszkeleton organizációjában. A profilin a RhoA asszociált kináz (ROCK) révén foszforilálható (141), ami gátolja az aktinhoz való kötődését és ugyanezt a helyet defoszforilálja a PP1c (142), viszont a profilin defoszforiációjában szerepet játszó célzó alegységet még nem írták le. Ahogy kimutattuk, a miozin 16b képes kötni a PP1c katalitikus alegységet az N-terminális ankyrin doménje révén, míg a C-terminális régiója profilinnal kolokalizál a sejtmagban (59). Magától értetődő az a feltételezés, hogy a Myo16b molekuláris állványzatként viselkedve, a profilin defoszforilációjához szükséges szerkezeti vázat alkothatja. Ezen modell alapján a Myo16b a PP1c célzó alegységeként funkcionálhat a profilin specifikus és hatékony defoszforilálásában. Az izgalmas feltételezés igazolására laborunkban jelenleg intenzív kutatások folynak.

Másrészről viszont, maga a Myo16b fark domén is képes foszforilálódni a Tyr1416 és Tyr1441 aminosavakon, ami a PI3K jelátviteli útvonalon keresztül aktiválja a WAVE-komplexet, ami szintén az aktin hálózat átrendeződéséhez vezet (75). Ez mindenképpen tovább erősíti a Myo16b kulcsfontosságú szerepét az intracelluláris környezet szabályozásában.

Korábbi vizsgálatok alapján általában úgy gondoltuk, hogy a néhány miozin családban fellelhető N-terminális domén szerepe elsősorban a miozin fej és az aktin közötti kapcsolat erősítése. Kutatási eredményeink azonban rávilágítottak arra, hogy az ankyrin domén fontos szerepet játszik a Myo16b motorfehérje funkciójában: felelős a PP1c alegységgel való interakcióért és központi szerepet tölt be az intracelluláris szabályozási folyamatokban.

7 KITEKINTÉS

Az évtizedek óta tartó intenzív kutatások ellenére a miozin motorfehérjék még mindig tartogatnak meglepetéseket a tudományos közélet számára. Az újabb mérési technikák, mikroszkópos módszerek, vagy a pontosabb szerkezetvizsgálatok egyre-másra szolgáltatnak olyan eredményt, ami új lendületet adva, további kutatásokat inspirál.

Kutatási projektünk kezdetén a Myo16b-t egy egyszerű, sejtmagba lokalizálódó motorfehérjének gondoltuk, ahol a fő kérdésnek azt tartottuk, hogy a fehérje hogyan, milyen mechanizmussal jut be a sejtmagba. Mára világossá vált, hogy a Myo16b egy összetett rendszernek, egy bonyolult szabályozási- és jelátviteli hálózatnak lehet a központi tagja.

Munkacsoportunk célja a Myo16b fehérje minél szélesebb körű megismerése, az egyes domének és a teljes fehérje *in vitro* karakterizálása, interakcióinak feltérképezése. Az ankyrin domén biokémiai karakterizálása ennek a projektnek csak az első lépése volt.

Tervezzük az ankyrin domén további vizsgálatát, elsősorban a PP1c alegységekkel való kapcsolatának a pontosabb leírását, a My16Ank–PP1c komplex szerkezetvizsgálatát. Folyamatban van a motor domén és a fark domén előállítás, amivel kinetikai méréseket tervezünk, valamint a mikroszkópos *in vivo* vizsgálatokhoz szükséges fluoreszcensen jelölt konstrukciók készítése.

Reményeink szerint ez a kutatás is hozzájárul a Myo16 idegrendszeri folyamatokban betöltött szerepének a tisztázásához, ami hozzásegíthet olyan neurológiai, pszichiátriai kórképek pato-etiológiájának a megértéséhez – amilyen például a skizofrénia vagy az autizmus – ahol a Myo16 érintettsége kimutatható. Ez közvetve, akár új terápiás irányok kifejlesztéséhez is vezethet.

8 KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

8.1 AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

1. Kengyel A, Bécsi B, Kónya Z, Sellers JR, Erdődi F, Nyitrai M. Ankyrin domain of myosin 16 influences motor function and decreases protein phosphatase catalytic activity. *European Biophysical Journal*. 2015 May; 44(4): 207-18.
(IF: 2.474)
2. Kengyel, A., Wolf W.A., Chisholm, R. and Sellers JR. Nonmuscle Myosin IIA with a GFP Fused to the N-terminus of the Regulatory Light Chain Is Regulated Normally. *Journal of Muscle research and Cell Motility*. 2010 Sep; 31(3): 163-70.
(IF: 1.66)

8.2 AZ ÉRTEKEZÉS EREDMÉNYEIT BEMUTATÓ ELŐADÁSOK ÉS POSZTEREK

1. Kengyel, A., Telek, E., Nyitrai, M. Biochemical Characterization of Myosin 16 Domains. *15th Alpbach Motors Workshop*, Alpbach, Austria, Márc. 13–18, 2016
2. Kengyel, A., Kónya, Z., Bécsi, B., Erdődi, F., Nyitrai, M. Ankyrin domain of myosin 16 influences motor function and decreases protein phosphatase catalytic activity. *The 30th European Cytoskeletal Forum Meeting*, Postojna, Slovenia, Aug. 30 – Sept. 3, 2015
3. Kengyel, A., Kónya, Z., Bécsi, B., Erdődi, F., Nyitrai, M. A miozin 16 ankyrin domén szabályozza a motor funkciót és csökkenti a protein foszfatáz katalitikus aktivitását. *MBFT XXV. Kongresszusa*, Budapest, Hungary, Aug. 25–28, 2015
4. Kengyel, A., Kónya, Z., Bécsi, B., Erdődi, F., Nyitrai, M. A miozin 16 ankyrin domén szabályozza a motor funkciót és csökkenti a protein foszfatáz katalitikus aktivitását. *45. Membrán-transzport Konferencia*, Sümeg, Hungary, Május 19-22, 2015
5. Kengyel A, Bécsi B, Kónya Z, Erdődi F, Nyitrai M (2013). The role of the ankyrin domain in the function of the myosin 16b. *29th Annual Meeting of European Cytoskeletal Forum*, Stockholm, Sweden, Sept., 2014

6. Kengyel, A., Bécsi B, Kónya Z, Erdődi F, Nyitrai M (2013). The role of the ankyrin domain in the function of the myosin 16b *Mol. Biol Cell* 24, 1171 (*54th Annual Meeting of The American Society for Cell Biology*, New Orleans, LA, USA, Dec 14-18, 2013)
7. Kengyel, A., Bécsi, B., Erdődi, F., Nyitrai, M. Az ankyrin domén szerepe a miozin 16b funkciójában. *43. Membrán-transzport Konferencia*, Sümeg, Hungary, Május 21-24, 2013
8. Kengyel, A., Nyitrai, M. Binding properties of the Myosin 16b Ankyrin Domain. *The 27th European Cytoskeletal Forum Meeting*, Pécs, Hungary, Nov. 3-7, 2012
9. Kengyel, A., Sellers, J. Regulation and kinetic characterization of a GFP-fused non-muscle myosin IIA. *8th European Biophysics Congress, Intracellular Fluorescence Spectroscopy*, Pécs, Hungary, Aug. 20-22, 2011
10. Kengyel, A., Sellers, J. GFP-vel jelölt nem-izom miozin IIA regulációja és kinetikai karakterizációja. *41. Membrán-transzport Konferencia*, Sümeg, Hungary, Május 17-20, 2011
11. Kengyel, A. and Sellers, J. Kinetic Characterization of the Myosin IIA with an N-terminal GFP Fused Regulatory Light Chain. *48th Annual Meeting of The American Society for Cell Biology*, San Francisco, CA, USA, Dec 13-17, 2008
12. Kengyel, A. and Sellers, J. Kinetic Characterization of the Myosin IIA with an N-terminal GFP Fused Regulatory Light Chain. *Gordon Research Conference of the Molecular Motors*, New London, NH, USA, Jun. 30 – July. 4, 2008
13. Kengyel, A. and Sellers, J. Kinetic Characterization of the Myosin IIA with an N-terminal GFP Fused Regulatory Light Chain. *52nd Annual Meeting of the Biophysical Society*, Long Beach, CA, USA, Febr. 2-6, 2008

8.3 EGYÉB TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK

1. Kellermayer M.S.Z., Bianco, P., Mártonfalvi, Zs., Nagy, A., Kengyel, A., Szatmári D., Huber, T., Linari, M., Caremani, M., and Lombardi, V. Muscle Thixotropy: More than Just Cross-Bridges? Response to Comment by Campbell and Lakie. *Biophysical Journal*. 2008 January 1; 94(1): 329–330.
(IF: 4.68)
2. Bianco, P., Nagy, A., Kengyel, A., Szatmári, D., Mártonfalvi, Z., Huber, T. and Kellermayer, M.S.Z. Interaction Forces Between F-actin and Titin PEVK Domain Measured with Optical Tweezers. *Biophysical Journal*. Vol. 93 (6), 2102-9, 2007
(IF: 4.63)
3. Kellermayer, M.S.Z., Karsai, A., Kengyel, A., Nagy, A., Bianco, P., Huber, T., Kulcsar, A., Niedetzky, C., Proksch, R., and Grama, L. Spatially and Temporally Synchronized Atomic Force and Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy for Imaging and Manipulating Cells and Biomolecules. *Biophysical Journal*. Vol. 91 (7), 2665-77, 2006
(IF: 4.76)
4. Karsai, Á., Nagy, A., Kengyel, A., Mártonfalvi, Zs., Grama, L., Penke, B. and Kellermayer, M.S.Z. Effect of lysine-28 side chain acetylation on the nanomechanical behavior of Alzheimer amyloid β 25-35 fibrils. *J Chem. Inf. Model.*, 45 (6), 1641-6. 2005
(IF: 3.078)
5. Nagy, A., Cacciafesta, P., Grama L., Kengyel, A., Málnási Csizmadia, A. and Kellermayer, M.S.Z. Differential actin binding along the PEVK domain of skeletal muscle. *Journal of Cell Science*. 117, 5781-5789, 2004
(IF: 6.91)

Kumulatív impakt faktor: 28,21

Független citációk száma: 122

8.4 IDÉZHETŐ ABSZTRAKTOK:

1. Siththanandan V., Kengyel A., Takagi Y., Forgacs E., Hong D., Sellers, J. A Comparison of Mechanical Properties of Drosophila and Mouse Myosin 7A. *Biophys. J.* 98 (3) pp. 725a, 2010
2. Bianco, P., Nagy, A., Kengyel, A., Szatmári, D., Mártonfalvi, Z., Huber, T. and Kellermayer, M.S.Z. Interaction Forces Between F-actin and Titin PEVK Domain Measured with Optical Tweezers. *Biophysical J.* p 520A, Jan 2007
3. Nagy, A., Cacciafesta, P., Grama, L., Kengyel, A., Málnási-Csizmadia, A., and Kellermayer, M.S.Z. Elastic and actin-binding properties of full-length skeletal muscle titin's PEVK domain. *Biophys. J.* 88, 2005.
4. Nagy, A., Cacciafesta, P., Grama, L., Kengyel, A., Málnási-Csizmadia, A., and Kellermayer, M.S.Z. Differential actin binding along the PEVK domain of skeletal-muscle titin *Biophys J.* 86, 2004.
5. Nagy, A., Cacciafesta, P., Grama, L., Kengyel, A., Málnási-Csizmadia, A., and Kellermayer, M.S.Z. Elastic and actin-binding properties of full-length skeletal muscle titin's PEVK domain. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 25, 263, 2004.

8.5 EGYÉB POSZTEREK ÉS ABSZTRAKTOK

1. Siththanandan, V., Kengyel, A., Takagi, Y., Forgacs, E., Hong, D., Sellers, J. A Comparison of Mechanical Properties of Drosophila and Mouse Myosin 7A. *54th Annual Meeting of the Biophysical Society*, San Francisco, CA, USA, Febr. 20-24, 2010
2. Bianco, P., Nagy, A., Kengyel, A., Huber, T., Szatmari, D., Kellermayer, M.S.Z. Interaction forces between F-actin and titin PEVK Motifs measured with optical tweezers. *51st Annual Meeting of the Biophysical Society*, Baltimore, MD, USA, March 3-7, 2007
3. Karsai, Á., Nagy, A., Kengyel, A., Mártonfalvi, Zs., Grama, L., Penke, B. and Kellermayer, M.S.Z. Effect of lysine-28 side chain acetylation on the nanomechanical behavior of Alzheimer amyloid β 25-35 fibrils. *8th Symposium of Instrumental Analysis*, Graz, Austria, Sept. 25-28, 2005

4. Kellermayer, M.S.Z., Karsai, Á., Nagy, A., Grama, L., Kengyel, A., Mártonfalvi, Z. Datki, Z., and Penke, B. Mechanical manipulation of amyloid beta fibrils. *Alpbach Workshop on Coiled-coils*. Alpbach, Austria, Sept. 11-16, 2005
5. Nagy, A., Grama, L., Cacciafesta, P., Kengyel, A., Huber, T., Bianco, P., Trombitás, K., Granzier, H.L. and Kellermayer, M.S.Z.. Elastic and actin-binding properties of full-length skeletal muscle titin's PEVK domain. *Howard Hughes Medical Institute 2005 Meeting of International Research Scholars*. Merida, Mexico, June 22-26, 2005.
6. Kellermayer M.S.Z., Nagy A., Karsai Á., Pasquale B., Kengyel A., Huber T., Grama L.. Synchronized Atomic Force Microscopy and Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy. *Annual Meeting of the Hungarian Microscopy Society*. Balatonalmádi, Hungary, 2005. May 26-28.
7. Kellermayer, M.S.Z., Nagy, A., Karsai, A.; Kengyel, A., Huber, T., Kiss, B., Kahn, A., Tóth, P., and Grama, L. Mechanical manipulation of individual biomolecules. *Meeting of the Croatian Society for Biochemistry and Molecular Biology*. Croatia, Sept. 30 - Oct. 2, 2004.
8. Kellermayer, M.S.Z., Nagy, A., Karsai, A.; Kengyel, A., Huber, T., Kiss, B., Kahn, A., Tóth, P., and Grama, L. Mechanical manipulation of individual biomolecules. *Annual Meeting of the Hungarian Microscopy Society*. Balatonalmádi, Hungary, May 27-29, 2004.
9. Nagy, A., Cacciafesta, P., Grama, L., Kengyel, A., Málnási-Csizmadia, A., and Kellermayer, M.S.Z. Differential actin binding along the PEVK domain of skeletal-muscle titin. *XXXIV. Membrane-conference*, Sümeg, Hungary, 2004.
10. Nagy, A., Cacciafesta, P., Grama, L., Kengyel, A., Málnási-Csizmadia, A., and Kellermayer, M.S.Z. Differential actin binding along the PEVK domain of skeletal-muscle titin. *Alpbach Workshop on Molecular Motors*. Alpbach, Austria, March 28-April 2, 2004.
11. Nagy, A., Cacciafesta, P., Grama, L., Kengyel, A., Málnási-Csizmadia, A., and Kellermayer, M.S.Z. Differential actin binding along the PEVK domain of skeletal-muscle titin. *EMBO/HHMI Central European Scientists Meeting*, Prague, Czech Rep. Febr. 21-23, 2004

9 REFERENCIÁK

1. Kühne, W. 1864. Untersuchungen über das Protoplasma und die Contractilität. Leipzig: Verlag von W. Engelmann.
2. Straub, B.F. 1942. Actin. In: Szent-Györgyi A, editor. Studies from the Institute of Medical Chemistry University Szeged. Szeged: S. Karger Basel, New York. pp. 3–15.
3. Pollard, T.D., and E.D. Korn. 1973. Acanthamoeba Myosin I. Isolation from Acanthamoeba Caxtellanii of an Enzyme Similar to Muscle Myosin*. J Biol Chem. 248: 4682–4690.
4. Sebé-Pedrós, A., X. Grau-Bové, T. a Richards, and I. Ruiz-Trillo. 2014. Evolution and classification of myosins, a paneukaryotic whole genome approach. Genome Biol. Evol. 6: 290–305.
5. Berg, J.S., B.C. Powell, and R.E. Cheney. 2001. A millennial myosin census. Mol Biol Cell. 12: 780–794.
6. Mermall, V. 1998. Unconventional Myosins in Cell Movement, Membrane Traffic, and Signal Transduction. Science (80-.). 279: 527–533.
7. Schliwa, M., and G. Woehlke. 2003. Molecular motors. Nature. 422: 759–765.
8. Redowicz, M.J. 2007. Unconventional myosins in muscle. Eur J Cell Biol. 86: 549–558.
9. Odronitz, F., and M. Kollmar. 2007. Drawing the tree of eukaryotic life based on the analysis of 2,269 manually annotated myosins from 328 species. Genome Biol. 8: R196.
10. Hodge, T., and M.J. Cope. 2000. A myosin family tree. J. Cell Sci. 113 Pt 19: 3353–4.
11. Bähler, M., and A. Rhoads. 2002. Calmodulin signaling via the IQ motif. FEBS Lett. 513: 107–13.
12. Krendel, M., and M.S. Mooseker. 2005. Myosins: tails (and heads) of functional diversity. Physiology. 20: 239–251.
13. Sellers, J.R. 2000. Myosins: a diverse superfamily. Biochim Biophys Acta. 1496: 3–22.
14. Sellers, J.R. 1999. Myosins. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press.
15. Billington, N., J.R. Beach, S.M. Heissler, K. Remmert, S. Guzik-Lendrum, A. Nagy, Y. Takagi, L. Shao, D. Li, Y. Yang, Y. Zhang, M. Barzik, E. Betzig, J.A. Hammer, and J.R. Sellers. 2015. Myosin 18A coassembles with nonmuscle myosin 2 to form mixed bipolar filaments. Curr. Biol. 25: 942–8.
16. Billington, N., S.M. Heissler, S. Guzik-Lendrum, and J.R. Sellerst. 2013. Interaction of myosin 18A with nonmuscle myosin 2. In: ASCB Annual Meeting. New Orleans: . p. L373.

17. Brawley, C.M., and R.S. Rock. 2009. Unconventional myosin traffic in cells reveals a selective actin cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106: 9685–9690.
18. Mihályi, E., and A.G. Szent-györgyi. 1953. Trypsin Digestion Of Muscle Proteins : III . Adenosinetriphosphatase Activity and Actin-Binding Capacity of the Digested Myosin. *J Biol Chem*. 201: 211–219.
19. Szent-Györgyi, A.G. 1953. Meromyosins, the subunit of myosins. *Arch Biochem Biophys*. 42(2): 305–20.
20. Mueller, H., and S. V Perry. 1962. The degradation of heavy meromyosin by trypsin. *Biochem. J*. 85: 431–9.
21. Sellers, J.R., M.S. Soboeiro, K. Faust, A.R. Bengur, and E. V Harvey. 1988. Preparation and characterization of heavy meromyosin and subfragment 1 from vertebrate cytoplasmic myosins. *Biochemistry*. 27: 6977–6982.
22. Wang, F., E. V. Harvey, M.A. Conti, D. Wei, and J.R. Sellers. 2000. A conserved negatively charged amino acid modulates function in human nonmuscle myosin IIA. *Biochemistry*. 39: 5555–5560.
23. Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. 2002. *Molecular Biology of the Cell*. Fourth. Garland Publishing.
24. Szent-Györgyi, A.G. 2004. The early history of the biochemistry of muscle contraction. *J. Gen. Physiol*. 123: 631–41.
25. Leal, A., S. Endeley, C. Stengel, K. Huehne, J. Loetterle, R. Barrantes, A. Winterpacht, and B. Rautenstrauss. 2003. A novel myosin heavy chain gene in human chromosome 19q13.3. *Gene*. 312: 165–171.
26. Simons, M., M. Wang, O.W. McBride, S. Kawamoto, K. Yamakawa, D. Gdula, R.S. Adelstein, and L. Weir. 1991. Human nonmuscle myosin heavy chains are encoded by two genes located on different chromosomes. *Circ. Res*. 69: 530–539.
27. Ma, X., S.S. Jana, M.A. Conti, S. Kawamoto, W.C. Claycomb, and R.S. Adelstein. 2010. Ablation of nonmuscle myosin II-B and II-C reveals a role for nonmuscle myosin II in cardiac myocyte karyokinesis. *Mol. Biol. Cell*. 21: 3952–62.
28. Heissler, S.M., and D.J. Manstein. 2013. Nonmuscle myosin-2: Mix and match. *Cell. Mol. Life Sci*. 70: 1–21.
29. Maupin, P., C. Phillips, R. Adelstein, and T. Pollard. 1994. Differential localization of myosin-II isozymes in human cultured cells and blood cells. *J. Cell Sci*. 107: 3077–3090.
30. Rochlin, M., K. Itoh, R. Adelstein, and P. Bridgman. 1995. Localization of myosin II A and B isoforms in cultured neurons. *J. Cell Sci*. 108: 3661–3670.

31. Goody, R.S., W. Hofmann, and H.G. Mannherz. 1977. The Binding Constant of ATP to Myosin S1 Fragment. *Eur. J. Biochem.* 78: 317–324.
32. Wolcott, R.G., and P.D. Boyer. 1974. The reversal of the myosin and actomyosin ATPase reactions and the free energy of ATP binding to myosin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 57: 709–716.
33. Sellers, J. 1999. *Myosins*. OUP Oxford.
34. De La Cruz, E.M., and E.M. Ostap. 2004. Relating biochemistry and function in the myosin superfamily. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16: 61–67.
35. 2007. *Myosins: A Superfamily of Molecular Motors*. Springer Science & Business Media.
36. Spudich, J.A., and S. Watt. 1971. Biochemical Studies of the Interaction of the Tropomyosin-Troponin Complex with Actin and the Proteolytic Fragments of Myosin. *J Biol Chem.* Aug 10: 4866–71.
37. Vicente-Manzanares, M., X. Ma, R.S. Adelstein, and A.R. Horwitz. 2010. Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10: 778–790.
38. Sellers, J.R. 1991. Regulation of cytoplasmic and smooth muscle myosin. *Curr Opin Cell Biol.* 3: 98–104.
39. Milton, D.L., A.N. Schneck, D. a Ziech, M. Ba, K.C. Facemyer, A.J. Halayko, J.E. Baker, W.T. Gerthoffer, and C.R. Cremo. 2011. Direct evidence for functional smooth muscle myosin II in the 10S self-inhibited monomeric conformation in airway smooth muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108: 1421–6.
40. Jung, H.S., S. Komatsu, M. Ikebe, and R. Craig. 2008. Head-head and head-tail interaction: a general mechanism for switching off myosin II activity in cells. *Mol. Biol. Cell.* 19: 3234–42.
41. Komatsu, S., and M. Ikebe. 2004. ZIP kinase is responsible for the phosphorylation of myosin II and necessary for cell motility in mammalian fibroblasts. *J Cell Biol.* 165: 243–254.
42. Umemoto, S., A.R. Bengur, and J.R. Sellers. 1989. Effect of multiple phosphorylations of smooth muscle and cytoplasmic myosins on movement in an in vitro motility assay. *J Biol Chem.* 264: 1431–1436.
43. Ikebe, M., D.J. Hartshorne, M. Elzinga, M. Myosin, and N. York. 1986. Identification, phosphorylation, and dephosphorylation of a second site for myosin light chain kinase on the 20,000-dalton light chain of smooth muscle myosin. *J Biol Chem.* 261: 36–39.

44. Kimura, K., M. Ito, K. Chihara, Y. Fukata, M. Nakafuku, B. Yamamori, J. Feng, T. Nakano, K. Okawa, A. Iwamatsu, and K. Kaibuchi. 1996. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* (80-). Jul12: 245–8.
45. Amano, M., M. Ito, Y. Fukata, K. Chihara, T. Nakano, and Y. Matsuura. 1996. Phosphorylation and Activation of Myosin by Rho-associated Kinase. *J Biol Chem.* 271: 20246–49.
46. Ikebe, M., and S. Reardon. 1990. Phosphorylation of bovine platelet myosin by protein kinase C. *Biochemistry.* 29(11): 2713–20.
47. Nishikawa, M., J.R. Sellers, R.S. Adelstein, and H. Hidaka. 1984. Protein kinase C modulates in vitro phosphorylation of the smooth muscle heavy meromyosin by myosin light chain kinase. *J Biol Chem.* 259: 8808–8814.
48. Rayment, I. 1996. The structural basis of the myosin ATPase activity. *J Biol Chem.* 271: 15850–15853.
49. Dulyaninova, N.G., and A.R. Bresnick. 2013. The heavy chain has its day: regulation of myosin-II assembly. *Bioarchitecture.* 3: 77–85.
50. Liu, X., D.-Y. Lee, S. Cai, S. Yu, S. Shu, R.L. Levine, and E.D. Korn. 2013. Regulation of the actin-activated MgATPase activity of *Acanthamoeba* myosin II by phosphorylation of serine 639 in motor domain loop 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110: E23–32.
51. Heissler, S.M., and J.R. Sellers. 2016. Various themes of myosin regulation. *J. Mol. Biol.* 428: 1927–1946.
52. Quintero, O.A., W.C. Unrath, S.M. Stevens, U. Manor, B. Kachar, and C.M. Yengo. 2013. Myosin 3A kinase activity is regulated by phosphorylation of the kinase domain activation loop. *J. Biol. Chem.* 288: 37126–37.
53. Ingebritsen, T., and F. Cohen. 1983. The protein phosphatases involved in cellular regulation. 1. Classification and substrate specificities. *Eur J Biochem.* May 2: 255–61.
54. Grassie, M.E., L.D. Moffat, M.P. Walsh, and J.A. MacDonald. 2011. The myosin phosphatase targeting protein (MYPT) family: a regulated mechanism for achieving substrate specificity of the catalytic subunit of protein phosphatase type 1delta. *Arch Biochem Biophys.* 510: 147–159.
55. Ito, M., T. Nakano, F. Erdodi, and D.J. Hartshorne. 2004. Myosin phosphatase: structure, regulation and function. *Mol Cell Biochem.* 259: 197–209.
56. Watanabe, T., H. Hosoya, and S. Yonemura. 2007. Regulation of myosin II dynamics by

- phosphorylation and dephosphorylation of its light chain in epithelial cells. *Mol Biol Cell*. 18: 605–616.
57. Murata, K., K. Hirano, E. Villa-Moruzzi, D.J. Hartshorne, and D.L. Brautigan. 1997. Differential localization of myosin and myosin phosphatase subunits in smooth muscle cells and migrating fibroblasts. *Mol Biol Cell*. 8: 663–673.
 58. Patel, K.G., C. Liu, P.L. Cameron, and R.S. Cameron. 2001. Myr 8, a novel unconventional myosin expressed during brain development associates with the protein phosphatase catalytic subunits 1alpha and 1gamma1. *J Neurosci*. 21: 7954–7968.
 59. Cameron, R.S., C. Liu, A.S. Mixon, J.P. Pihkala, R.J. Rahn, and P.L. Cameron. 2007. Myosin16b: The COOH-tail region directs localization to the nucleus and overexpression delays S-phase progression. *Cell Motil Cytoskelet*. 64: 19–48.
 60. Xie, P. 2010. A model for processive movement of single-headed myosin-IX. *Biophys Chem*. 151: 71–80.
 61. Furusawa, T., S. Ikawa, N. Yanai, and M. Obinata. 2000. Isolation of a novel PDZ-containing myosin from hematopoietic supportive bone marrow stromal cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*. 270: 67–75.
 62. Bähler, M., R. Kroschewski, H.E. Stöffler, T. Behrmann, M. Bahler, and H.E. Stoffler. 1994. Rat myr 4 defines a novel subclass of myosin I: identification, distribution, localization, and mapping of calmodulin-binding sites with differential calcium sensitivity. *J. Cell Biol*. 126: 375–89.
 63. Kempler, K., J. Toth, R. Yamashita, G. Mapel, K. Robinson, H. Cardasis, S. Stevens, J.R. Sellers, B.A. Battelle, and J. To. 2007. Loop 2 of *Limulus* Myosin III Is Phosphorylated by Protein Kinase A and Autophosphorylation. *Biochemistry*. 46: 4280–4293.
 64. Xue, Y., F. Zhou, C. Fu, Y. Xu, and X. Yao. 2006. SUMOsp: a web server for sumoylation site prediction. *Nucleic Acids Res*. 34: W254–7.
 65. Heissler, S.M., and J.R. Sellers. 2015. Myosin Light Chains: Teaching Old Dogs New Tricks. *Bioarchitecture*. 4: 169–88.
 66. Heissler, S.M., N. Billington, and J.R. Sellers. 2013. Myosin-3B and its light chains. In: *ASCB Annual Meeting*. New Orleans: . p. P1161.
 67. McDonnell, A. V, T. Jiang, A.E. Keating, and B. Berger. 2006. Paircoil2: improved prediction of coiled coils from sequence. *Bioinformatics*. 22: 356–8.
 68. Holt, M.R., and A. Koffer. 2001. Cell motility: proline-rich proteins promote protrusions. *Trends Cell Biol*. 11: 38–46.
 69. Gasteiger, E., A. Gattiker, C. Hoogland, I. Ivanyi, R.D. Appel, and A. Bairoch. 2003.

- ExpASY: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res.* 31: 3784–3788.
70. Dosztányi, Z., V. Csizmok, P. Tompa, and I. Simon. 2005. IUPred: web server for the prediction of intrinsically unstructured regions of proteins based on estimated energy content. *Bioinformatics.* 21: 3433–3434.
 71. Thompson, R.F., and G.M. Langford. 2002. Myosin superfamily evolutionary history. *Anat. Rec.* 268: 276–89.
 72. Fornerod, M., M. Ohno, M. Yoshida, and I.W. Mattaj. 1997. CRM1 Is an Export Receptor for Leucine-Rich Nuclear Export Signals. *Cell.* 90: 1051–1060.
 73. Johnson, D.F., G. Moorhead, F.B. Caudwell, P. Cohen, Y.H. Chen, M.X. Chen, and P.T. Cohen. 1996. Identification of protein-phosphatase-1-binding domains on the glycogen and myofibrillar targeting subunits. *Eur J Biochem.* 239: 317–325.
 74. Ohno, K., F. Hirose, K. Sakaguchi, Y. Nishida, and a Matsukage. 1996. Transcriptional regulation of the *Drosophila* CycA gene by the DNA replication-related element (DRE) and DRE binding factor (DREF). *Nucleic Acids Res.* 24: 3942–6.
 75. Yokoyama, K., T. Tezuka, M. Kotani, T. Nakazawa, N. Hoshina, Y. Shimoda, S. Kakuta, K. Sudo, K. Watanabe, Y. Iwakura, and T. Yamamoto. 2011. NYAP: a phosphoprotein family that links PI3K to WAVE1 signalling in neurons. *EMBO J.* 30: 4739–54.
 76. Waite, K., and B.J. Eickholt. 2010. The neurodevelopmental implications of PI3K signaling. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 346: 245–65.
 77. Rodriguez-Murillo, L., B. Xu, J.L. Roos, G.R. Abecasis, J. a Gogos, and M. Karayiorgou. 2014. Fine mapping on chromosome 13q32-34 and brain expression analysis implicates MYO16 in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology.* 39: 934–43.
 78. Liu, Y.F., S.M. Sowell, Y. Luo, A. Chaubey, R.S. Cameron, H.-G. Kim, and A.K. Srivastava. 2015. Autism and Intellectual Disability-Associated KIRREL3 Interacts with Neuronal Proteins MAP1B and MYO16 with Potential Roles in Neurodevelopment. *PLoS One.* 10: e0123106.
 79. Sedgwick, S.G., and S.J. Smerdon. 1999. The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. *Trends Biochem Sci.* 24: 311–316.
 80. Bennett, V., and P.J. Stenbuck. 1979. Identification and partial purification of ankyrin, the high affinity membrane attachment site for human erythrocyte spectrin. *J Biol Chem.* 254: 2533–41.
 81. Rubtsov, A.M., and O.D. Lopina. 2000. Ankyrins. *FEBS Lett.* 482: 1–5.
 82. Li, J., A. Mahajan, and M.D. Tsai. 2006. Ankyrin repeat: a unique motif mediating

- protein-protein interactions. *Biochemistry*. 45: 15168–15178.
83. Mosavi, L.K., T.J. Cammett, D.C. Desrosiers, and Z.Y. Peng. 2004. The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. *Protein Sci.* 13: 1435–1448.
 84. Iwane, A.H., T. Funatsu, Y. Harada, M. Tokunaga, O. Ohara, S. Morimoto, and T. Yanagida. 1997. Single molecular assay of individual ATP turnover by a myosin-GFP fusion protein expressed *in vitro*. *FEBS Lett.* 407: 235–238.
 85. Bajaj, G., Y. Zhang, M.I. Schimerlik, A.M. Hau, J. Yang, T.M. Filtz, C. Kioussi, and J.E. Ishmael. 2009. N-Methyl-D-aspartate Receptor Subunits Are Non-myosin Targets of Myosin Regulatory Light Chain. *J. Biol. Chem.* . 284 : 1252–1266.
 86. Komatsu, S., T. Yano, M. Shibata, R.A. Tuft, and M. Ikebe. 2000. Effects of the regulatory light chain phosphorylation of myosin II on mitosis and cytokinesis of mammalian cells. *J Biol Chem.* 275: 34512–34520.
 87. Peterson, L.J., Z. Rajfur, A.S. Maddox, C.D. Freel, Y. Chen, M. Edlund, C. Otey, and K. Burridge. 2004. Simultaneous stretching and contraction of stress fibers *in vivo*. *Mol Biol Cell.* 15: 3497–3508.
 88. Uchimura, T., K. Fumoto, Y. Yamamoto, K. Ueda, and H. Hosoya. 2002. Spatial Localization of Mono- and Diphosphorylated Myosin II Regulatory Light Chain at the Leading Edge of Motile HeLa Cells Cell culture and transfection. *Cell Struct Funct.* 486: 479–486.
 89. Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, and D.J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403–10.
 90. Burgess-Brown, N.A., S. Sharma, F. Sobott, C. Loenarz, U. Oppermann, and O. Gileadi. 2008. Codon optimization can improve expression of human genes in *Escherichia coli*: A multi-gene study. *Protein Expr. Purif.* 59: 94–102.
 91. Sigrist, C.J., L. Cerutti, N. Hulo, A. Gattiker, L. Falquet, M. Pagni, A. Bairoch, and P. Bucher. 2002. PROSITE: a documented database using patterns and profiles as motif descriptors. *Br. Bioinform.* 3: 265–274.
 92. Sigrist, C.J., E. de Castro, L. Cerutti, B.A. Cucho, N. Hulo, A. Bridge, L. Bougueleret, and I. Xenarios. 2013. New and continuing developments at PROSITE. *Nucleic Acids Res.* 41: D344–7.
 93. Wang, Y., L.Y. Geer, C. Chappay, J.A. Kans, and S.H. Bryant. 2000. Cn3D: sequence and structure views for Entrez. *Trends Biochem. Sci.* 25: 300–2.
 94. Kovács, M., F. Wang, A. Hu, Y. Zhang, J.R. Sellers, and M. Kovacs. 2003. Functional divergence of human cytoplasmic myosin II: kinetic characterization of the non-muscle

- IIA isoform. *J Biol Chem.* 278: 38132–38140.
95. Phan, J., A. Zdanov, A.G. Evdokimov, J.E. Tropea, H.K. Peters 3rd, R.B. Kapust, M. Li, A. Wlodawer, and D.S. Waugh. 2002. Structural basis for the substrate specificity of tobacco etch virus protease. *J Biol Chem.* 277: 50564–50572.
 96. Margossian, S.S., and S. Lowey. 1982. Preparation of myosin and its subfragments from rabbit skeletal muscle. *Methods Enzym.* 85 Pt B: 55–71.
 97. Feuer, G., F. Molnar, and et al. 1948. Studies on the composition and polymerization of actin. *Hung Acta Physiol.* 1: 150–163.
 98. Nagy, A., Y. Takagi, N. Billington, S. a Sun, D.K.T. Hong, E. Homsher, A. Wang, and J.R. Sellers. 2013. Kinetic characterization of nonmuscle myosin IIb at the single molecule level. *J. Biol. Chem.* 288: 709–22.
 99. Toth, A., E. Kiss, F.W. Herberg, P. Gergely, D.J. Hartshorne, F. Erdodi, a Tóth, and F. Erdödi. 2000. Study of the subunit interactions in myosin phosphatase by surface plasmon resonance. *Eur J Biochem.* 267: 1687–1697.
 100. Hirschi, A., M. Cecchini, R.C. Steinhardt, F.A. Dick, and M. Rubin. 2011. An Overlapping Kinase and Phosphatase Docking Site Regulates Activity of the Retinoblastoma Protein. 17: 1051–1057.
 101. Hirano, K., I. Masaaki, D.J. Hartshorne, and M. Ito. 1995. Interaction of the Ribosomal Protein L5 with Protein Phosphatase Type 1. *J. Biol. Chem.* 270: 19786–19790.
 102. Berndt, N., and P.T. Cohen. 1990. Renaturation of protein phosphatase 1 expressed at high levels in insect cells using a baculovirus vector. *Eur J Biochem.* 190: 291–297.
 103. Pires, E.M., and S. V Perry. 1977. Purification and properties of myosin light-chain kinase from fast skeletal muscle. *Biochem. J.* 167: 137–46.
 104. Miki, M., C.G. dos Remedios, and J.A. Barden. 1987. Spatial relationship between the nucleotide-binding site, Lys-61 and Cys-374 in actin and a conformational change induced by myosin subfragment-1 binding. *Eur. J. Biochem.* 168: 339–45.
 105. Hudson, E.N., and G. Weber. 1973. Synthesis and characterization of two fluorescent sulfhydryl reagents. *Biochemistry.* 12: 4154–61.
 106. Hild, G., M. Nyitrai, and B. Somogyi. 2002. Intermonomer flexibility of Ca- and Mg-actin filaments at different pH values. *Eur. J. Biochem.* 269: 842–849.
 107. Miki, M. 1990. Resonance energy transfer between points in a reconstituted skeletal muscle thin filament. A conformational change of the thin filament in response to a change in Ca²⁺ concentration. *Eur. J. Biochem.* 187: 155–162.
 108. Wang, F., M. Kovacs, A. Hu, J. Limouze, E. V Harvey, and J.R. Sellers. 2003. Kinetic

- mechanism of non-muscle myosin IIB: functional adaptations for tension generation and maintenance. *J Biol Chem.* 278: 27439–27448.
109. He, Z.H., R.K. Chillingworth, M. Brune, J.E. Corrie, D.R. Trentham, M.R. Webb, and M. a Ferenczi. 1997. ATPase kinetics on activation of rabbit and frog permeabilized isometric muscle fibres: a real time phosphate assay. *J. Physiol.* 501 (Pt 1: 125–48.
 110. Kou, S.C., B.J. Cherayil, W. Min, B.P. English, and X.S. Xie. 2005. Single-molecule Michaelis - Menten equations. *J. Phys. Chem. B.* 109: 19068–19081.
 111. Facemyer, K.C., and C.R. Cremo. 1992. A new method to specifically label thiophosphorylatable proteins with extrinsic probes. Labeling of serine-19 of the regulatory light chain of smooth muscle myosin. *Bioconjug Chem.* 3: 408–413.
 112. Kron, S.J., and J.A. Spudich. 1986. Fluorescent actin filaments move on myosin fixed to a glass surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83: 6272–6.
 113. Sellers, J.R. 2001. In vitro motility assay to study translocation of actin by myosin. *Curr. Protoc. Cell Biol.* Chapter 13: Unit 13.2.
 114. Warshaw, D.M., J.M. Desrosiers, S.S. Work, and K.M. Trybus. 1990. Smooth muscle myosin cross-bridge interactions modulate actin filament sliding velocity in vitro. *J. Cell Biol.* 111: 453–63.
 115. Homsher, E., F. Wang, and J.R. Sellers. 1992. Factors affecting movement of F-actin filaments propelled by skeletal muscle heavy meromyosin. *Am J Physiol.* 262: C714–23.
 116. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680–684.
 117. Pollard, T.D. 2010. A guide to simple and informative binding assays. *Mol. Biol. Cell.* 21: 4061–7.
 118. Alfthan, K. 1998. Surface plasmon resonance biosensors as a tool in antibody engineering. *Biosens. Bioelectron.* 13: 653–663.
 119. Liedberg, B.O., C. Nylander, and I. Lundstrom. 1983. Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. *Sensors and Actuators.* 4: 299–304.
 120. Sprinthall, R.C. 2007. Basic statistical analysis. Pearson Allyn & Bacon.
 121. Belágyi, J. 1999. Orvosi biometria. Pécs: Pécsi Orvostudományi Egyetem.
 122. Sellers, J.R. 1985. Mechanism of the phosphorylation-dependent regulation of smooth muscle heavy meromyosin. *J Biol Chem.* 260: 15815–15819.
 123. Kovács, M., J. Tóth, L. Nyitray, J.R. Sellers, M. Kovacs, and J. Toth. 2004. Two-headed binding of the unphosphorylated nonmuscle heavy meromyosin.ADP complex to actin.

- Biochemistry. 43: 4219–4226.
124. Miller, B.M., M. Nyitrai, S.I. Bernstein, and M. a Geeves. 2003. Kinetic analysis of *Drosophila* muscle myosin isoforms suggests a novel mode of mechanochemical coupling. *J Biol Chem.* 278: 50293–300.
 125. Higuchi, H., and S. Takemori. 1989. Butanedione monoxime suppresses contraction and ATPase activity of rabbit skeletal muscle. *J. Biochem.* 105: 638–43.
 126. Sinard, J.H., W.F. Stafford, and T.D. Pollard. 1989. The mechanism of assembly of *Acanthamoeba* myosin-II minifilaments: minifilaments assemble by three successive dimerization steps. *J. Cell Biol.* 109: 1537–47.
 127. Nalavadi, V., M. Nyitrai, C. Bertolini, N. Adamek, M.A. Geeves, and M. Bahler. 2005. Kinetic mechanism of myosin IXB and the contributions of two class IX-specific regions. *J Biol Chem.* 280: 38957–38968.
 128. Scholey, J.M., K.A. Taylor, and J. Kendrick-Jones. 1980. Regulation of non-muscle myosin assembly by calmodulin-dependent light chain kinase. *Nature.* 287: 233–235.
 129. Craig, R., R. Smith, and J. Kendrick-Jones. 1983. Light-chain phosphorylation controls the conformation of vertebrate non-muscle and smooth muscle myosin molecules. *Nature.* Mar 31-Apr: 436–9.
 130. Umeki, N., H.S. Jung, S. Watanabe, T. Sakai, X.D. Li, R. Ikebe, R. Craig, and M. Ikebe. 2009. The tail binds to the head-neck domain, inhibiting ATPase activity of myosin VIIA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106: 8483–8488.
 131. Burgess, S.A., S. Yu, M.L. Walker, R.J. Hawkins, J.M. Chalovich, and P.J. Knight. 2007. Structures of smooth muscle myosin and heavy meromyosin in the folded, shutdown state. *J Mol Biol.* 372: 1165–1178.
 132. Wendt, T., D. Taylor, T. Messier, K.M. Trybus, and K.A. Taylor. 1999. Visualization of head-head interactions in the inhibited state of smooth muscle myosin. *J. Cell Biol.* 147: 1385–1390.
 133. Wendt, T., D. Taylor, K.M. Trybus, and K. Taylor. 2001. Three-dimensional image reconstruction of dephosphorylated smooth muscle heavy meromyosin reveals asymmetry in the interaction between myosin heads and placement of subfragment 2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98: 4361–4366.
 134. Espinoza-Fonseca, L.M., D. Kast, and D.D. Thomas. 2008. Thermodynamic and structural basis of phosphorylation-induced disorder-to-order transition in the regulatory light chain of smooth muscle myosin. *J Am Chem Soc.* 130: 12208–12209.
 135. Nelson, W.D., S.E. Blakely, Y.E. Nesmelov, and D.D. Thomas. 2005. Site-directed spin

- labeling reveals a conformational switch in the phosphorylation domain of smooth muscle myosin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102: 4000–4005.
136. Siemankowski, R.F., M.O. Wiseman, and H.D. White. 1985. ADP dissociation from actomyosin subfragment 1 is sufficiently slow to limit the unloaded shortening velocity in vertebrate muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82: 658–662.
 137. Ma, X., S. Kawamoto, Y. Hara, and R.S. Adelstein. 2004. A point mutation in the motor domain of nonmuscle myosin II-B impairs migration of distinct groups of neurons. *Mol. Biol. Cell*. 15: 2568–2579.
 138. Kim, K.Y., M. Kovacs, S. Kawamoto, J.R. Sellers, and R.S. Adelstein. 2005. Disease-associated mutations and alternative splicing alter the enzymatic and motile activity of nonmuscle myosins II-B and II-C. *J Biol Chem*. 280: 22769–22775.
 139. Ruppel, K.M., and J.A. Spudich. 1996. Structure-function studies of the myosin motor domain: importance of the 50-kDa cleft. *Mol. Biol. Cell*. 7: 1123–1136.
 140. Bird, J.E., Y. Takagi, N. Billington, M.-P. Strub, J.R. Sellers, and T.B. Friedman. 2014. Chaperone-enhanced purification of unconventional myosin 15, a molecular motor specialized for stereocilia protein trafficking. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111: 12390–5.
 141. Shao, J., W.J. Welch, N.A. Diprospero, and M.I. Diamond. 2008. Phosphorylation of profilin by ROCK1 regulates polyglutamine aggregation. *Mol Cell Biol*. 28: 5196–5208.
 142. Shao, J., and M.I. Diamond. 2012. Protein phosphatase 1 dephosphorylates profilin-1 at Ser-137. *PLoS One*. 7: e32802.
 143. Kengyel, A., W.A. Wolf, R.L. Chisholm, and J.R. Sellers. 2010. Nonmuscle myosin IIA with a GFP fused to the N-terminus of the regulatory light chain is regulated normally. *J Muscle Res Cell Motil*. 31: 163–170.