

PhD értekezés tézisei

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

Dr. Kengyel András Miklós

Doktori Iskola: Interdiszciplináris Orvostudományok (D93)
Doktori Iskola Vezetője: Prof. Dr. Sümegi Balázs
Doktori Program: Funkcionális fehérjedinamika vizsgálata biofizikai módszerekkel (B-130)
Doktori Program Vezetője: Prof. Dr. Nyitrai Miklós

Témavezetők: **Prof. Dr. Nyitrai Miklós**
James R. Sellers, Ph.D



PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM
Általános Orvostudományi Kar
Biofizikai Intézet
Pécs, 2017

1 BEVEZETÉS

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.

A miozinok közös tulajdonsága, hogy aktin filamentumokat kötnek és az ATP hidrolízis kémiai energiáját felhasználva mechanikai erőt képesek generálni. Szerkezetükre általánosságban jellemző a három alegység: (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 (1). A fark domén mind hosszát, mind szekvenciáját tekintve igencsak eltérő a különböző miozincsaládok esetén.

1.1 Konvencionális miozinok

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

A kinetikai vizsgálatokhoz elsősorban a funkcionálisan aktív, de amellet oldható fragmentumot: az úgynevezett nehéz meromiozint (HMM) alkalmazzák, amely a két motor domént tartalmazza egy rövid coiled-coil szakasszal összekapcsolva, valamint a könnyűláncokat. Kísérleteinkben, a konvencionális miozinok közül, teljes hosszúságú vázizom miozint (skMyo2) és HMM-t (skHMM), illetve rekombináns nem-izom miozin 2A és 2B HMM-t (nmHMM2A, nmHMM2B) használtunk.

1.2 Nem-izom miozin 2 izoformák

A nem-izom miozin 2 (nmMyo2) az állati sejtek egyik legfontosabb alkotója, az aktin citoskeleton átrendeződésében kulcsszerepet játszó, a sejtek minden életszakaszában meghatározó jelentőséggel bíró motorfehérje. Gerincesekben három izoformája ismert, úgymint nmMyo2A, nmMyo2B és nmMyo2C, amelyek különböző génekről íródnak át (2, 3), ezek közül a nmMyo2A vagy a nmMyo2B

hiánya súlyos fejlődési rendellenességhez és embrionális letalitáshoz vezet (4). 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 nmMyo2A és nmMyo2B egyaránt részt vesz a sejtek adhéziójában, morfogenezisében, a sejtosztódás folyamatában, a sejtek migrációjában vagy a vezikuláris transzportban (5). Bizonyos sejtípusokban azonban szelektíven fordulnak elő az izoformák: vérlemezkékben vagy a lépben kizárólag nmMyo2A, míg például idegszövetben túlnyomórészt nmMyo2B található (6, 7).

1.3 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, amelyek sebességi állandói jelentős eltérést mutatnak az egyes miozinok között.

Aktin kötődése a miozinhoz nagyságrendekkel megnöveli az ATPáz ciklus reakciósebességét. ATP hiányában az aktin és a miozin szoros komplexet alkot (ez az úgynevezett *rigor* állapot). ATP kötődése 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 kötődését, 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 kereszt kötött aktin erősen kereszt 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 (8, 9).

1.4 Foszforiláció és defoszforiláció

A miozinok megfelelő működését az élő sejtben számos szabályozási folyamat teszi lehetővé. A simaizom és nem-izom miozin 2 regulációjában 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 könnyűláncban és a konverter doménon, megnövelve ezáltal a miozin aktin-aktivált Mg^{2+} ATPáz aktivitását és elősegíti a miozin filamentumok kialakulását (10, 11). Az aktiválásért több kináz enzim is felelős, amelyek közül az egyik legfontosabb a Ca^{2+} - és kalmodulin-függő miozin könnyűlánc kináz (MLCK) (11).

A foszforilációhoz hasonlóan, a vele ellentétes hatású defoszforiláció ugyanannyira esszenciális a sejt megfelelő működéséhez. A foszforilált Ser és Thr aminosavakat defoszforiláló protein foszfatáz enzimkomplexeket két típusba, úgymint: PP1 és PP2 lehet sorolni a termostabil foszfatáz inhibitorral szembeni érzékenységük alapján (12). A miozin foszfatáz (MLCP) heterotrimer holoenzim a miozin regulatórikus könnyűlánc defoszforilálását végzi, szerepe esszenciális például a simaizomok relaxációjához (13) és a Myo2 filamentumok dinamikus mozgásához (14). A miozin foszfatáz a 38 kDa-os 1-es típusú katalitikus alegységből (PP1c), a 110 kDa-os nagy célzó alegységből (MYPT1) és egy 20 kDa-os esszenciális alegységből (M20) épül fel.

1.5 GFP-jelölt miozinok

A különböző fehérjék *in vivo* sejten belüli elhelyezkedését gyakran vizsgálják fluoreszcens fehérjékkel fúzionált 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) fúzionált nehézláncot (15), de elterjedt a könnyűlánc jelölése az N- vagy a C-terminálisokon. Mivel a könnyűlánc univerzális a Myo2 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 2 vizsgálata esetén a sejtekbe bejuttatott GFP-fúziós RLC tranziensen expresszálódik és kicserélve az endogén RLC-t követhetővé válik a miozinok lokalizációja vagy mozgása (16–19). Kimutatták, hogy a C-terminális GFP-jelölt RLC képes *in vivo* foszforilálódni, foszforiláció hatására aktiválódni és beépülni a miozinokba (17). Nem vizsgálták viszont, jóllehet alkalmazták (18), az N-terminális GFP-fúziós RLC-t tartalmazó miozinok kinetikai tulajdonságait. Munkánkban többek között arra voltunk kíváncsiak, vajon a 28 kDa-os GFP, fúzionálva a 20 kDa-os regulatórikus könnyűlánc N-terminálisára, befolyásolja-e a nem-izom miozin 2 normális működését és regulációját.

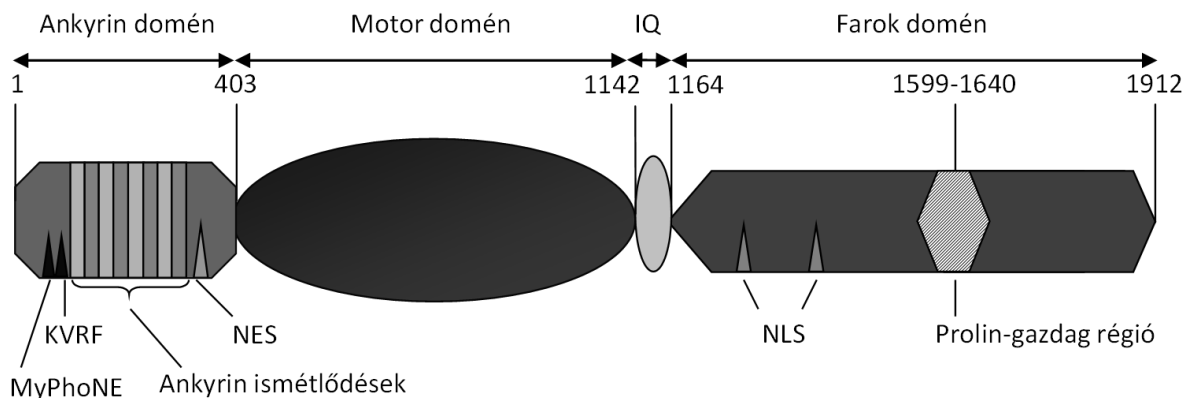
1.6 Nem-konvencionális miozin 16

A nem-konvencionális miozin 16 (Myo16) 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 Myo16 fehérjék N-terminális része nagyfokú homológiát mutat a MYPT1 szerkezetével, ezért valószínűsíthető a részvétele a defoszforilációs szabályozó folyamatokban.

1.7 Miozin 16b szerkezete

A Myo16 pre-motor doménje eltér minden korábban leírt miozinban megtalálható doméntól, ugyanis nyolc nagymértékben konzervált ismétlődő szekvencia elemet, úgynevezett *ankyrin ismétlődéseket* tartalmaz. Közvetlenül megelőzve az ankyrin ismétlődéseket egy négy aminosavból álló KVxP motívum található, ami a protein foszfatáz 1 katalitikus alegységének (PP1c) a kanonikus kötőhelye.

A motor domén hasonló a többi ismert miozinhoz, tartalmazza az ATP- és az aktin-kötő helyeket. A rövid nyaki régió egyetlen IQ motívumot tartalmaz, ami – más miozinok esetén – általában kalmodulin kötésére szolgáló hely (1), de jelenleg nem áll rendelkezésünkre információ arról, hogy mi lehet a Myo16 könnyűlánc, pedig ennek az ismerete a szabályozás megértése szempontjából elengedhetetlen lenne. A Myo16-nak két splicing variánsa ismert: a rövidebb, fark nélküli miozin 16a (Myo16a) és a teljes hosszúságú miozin 16b (Myo16b) izoforma. A Myo16b fark doménje tartalmaz egy hosszabb prolin-gazdag régiót, ami feltételezhetően a profilin aktin-kötő fehérje rögzítésére szolgál. Bioinformatikai analízis alátámasztotta, hogy nagy valószínűséggel a teljes fark domén rendezetlen szerkezetű (IUPRED, (20)).



Miozin 16b sematikus szerkezeti képe az aminosav pozíciókkal.

1.8 Miozin 16b feltételezett funkciói

Egyelőre kevés információval rendelkezünk arról, hogy a közelmúltban felfedezett Myo16, egyedi szerkezeti elemei révén, milyen élettani folyamatokban játszhat szerepet. A Myo16 a törzsfajlás során az emlősökben jelent meg, ott is viszonylag későn (21), 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 (22).

A sejtmag különböző alkotóelemeit vizsgálva, a Myo16b kolokalizációt mutatott a proliferáló sejt nukleáris antigénnel (PCNA) és a ciklin A-val. Amennyiben a Myo16b-t túlexpresszálják: a sejtek nagyobb része marad S-fázisban és késik a G2 fázisba történő átmenet (23). Ezek alapján valószínűsíthető, hogy a Myo16b-nek jelentős szerepe lehet a sejtproliferációban és a sejtciklus szabályozásában. A Myo16b kolokalizációt mutatott a profilinnel is, sőt valószínűsíthető, hogy a Myo16b farok domén a profilinen keresztül képes kötődni az aktinhoz. Feltételezhető, hogy a Myo16b egyik lehetséges funkciója az aktin polimerizációs dinamikájának szabályozása a profilin kötésén keresztül.

Egyre több adat támasztja alá azt a feltételezést, hogy a Myo16b fontos szerepet játszhat az idegsejtek fejlődési szakában. A Myo16b a farok doménjén található két Tyr 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 (24). A PI3K jelátviteli út alapvető fontosságú az idegrendszer megfelelő működéséhez, zavara számos neurológiai és pszichiátriai kórkép hátterében fellelhető (25). Genetikai vizsgálatok szignifikáns összefüggést mutattak ki a Myo16 gén variációja és a skizofrénia között (26), míg a Myo16 gén delécióját autizmus hátterében írták le (27).

1.9 Miozin 16b homológia a MYPT1-gyel

A Myo16 osztályba tartozó fehérjék N-terminális pre-motor extenziója (My16Ank) számos, más miozinnál nem található szekvenciaelemet tartalmaz: miozin foszfatáz N-terminális elemet (MyPhoNE), KVxF konszenzus motívumot, nyolc ankyrin ismétlődést, valamint egy PKC foszforilációs helyet. Az ankyrin ismétlődések alapegysége az élővilágban előforduló egyik leggyakoribb fehérje szekvencia motívum, ami klaszterekben szerveződve fordul elő. A fő funkciója ennek a tandemszerűen ismétlődő konzervált motívumnak a fehérje-fehérje interakciók elősegítése (28, 29).

Jóllehet a My16Ank domén más miozinokkal nem, viszont a miozin foszfatáz holoenzim célzó alegységével (MYPT1) nagyfokú hasonlóságot mutat. *In vivo* koimmuno-precipitációval korábban már kimutatták, hogy a Myo16b kötődik a miozin foszfatáz katalitikus alegységeihez: a PP1 α és PP1 γ -hoz. Feltételezések szerint a Myo16b szállíthatja a PP1c alegységeket a sejtmagba (22).

2 KÉRDÉSFELVETÉS

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

Elsőként a nem-izom Myo2-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 Myo16 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 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1 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 (30). Az egyszerű és hatékony tisztítás érdekében a HMM2A nehézlánc C-terminálisa Flag epitópot tartalmazott. A könnyűláncokat is tartalmazó HMM2A-t Flag affinitás kromatográfia segítségével választottuk el a többi fehérjétől, majd MonoQ-Sepharose ioncserélő kromatográfiával koncentráltuk, FPLC segítségével.

3.2 My16Ank expressziója és tisztítása *E. coli* rendszerben

GST-(TEV)-My16Ank fúziós fehérjét ER25.66 *E. coli* kompetens sejtekben expresszáltuk. A sejt-lizátumból GSH affinitás kromatográfiával tisztítottuk a fehérjét, majd TEV proteáz segítségével eltávolítottuk a GST-taget. A GST-tagról levágott My16Ank-t Q-sepharose anioncserélő kromatográfiával választottuk el a GST-től és a TEV proteáztól.

3.3 Steady-state ATPáz esszé

A miozinok steady-state ATPáz aktivitását NADH-csatolt esszével mértük változó szubsztrát koncentrációk mellett, alacsony ionerejű pufferben, 22 °C-on (31). Nem-izom miozin aktiválásához a RLC-t foszforilálni kellett 10 nM MLCK-val, 0,1 μM kalmodulin, 0,2 mM CaCl₂ és 0,2 mM ATP jelenlétében (32). 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_{ATPase} konstans értékét (33).

3.4 Foszforilációs esszé

A vad típusú, illetve GFP-jelölt nmHMM2A RLC foszforilációjának időfüggését különböző MLCK koncentrációkon végeztük, 25 °C-on. A reakció MLCK hozzáadásával történő indítása után különböző időpontokban a fehérjéket jéghideg acetonnal kicsapatva haladéktalanul megállítottuk a reakciót. A foszforilált és foszforilálatlan RLC elektroforézissel elválasztható egymástól 40% glicerint tartalmazó 10%-os poliakrilamid gélen (34).

Az RLC foszforiláció időbeliségét hasonló reakció körülmények között vizsgáltuk 0,2 mM radioaktivan jelölt [γ - ^{32}P]ATP felhasználásával (35). A reakció HMM hozzáadásával indult, majd különböző időpontokban mintát vettünk, amit szűrőpapírra cseppentettünk. A szűrőpapírt 5% triklór-ecetsavat és 2% nátrium-pirofoszfátot tartalmazó oldatba merítve precipitáltuk a fehérjéket a membránra, megállítva az enzimikus reakciót. A szűrőpapírokat szárítás után szcintillációs folyadékba helyeztük és a minta aktivitását Beckman LS6500 szcintillációs számlálóval mértük.

3.5 *In vitro* motilitási próba

In vitro motilitási próba során a felszínhez rögzített miozin fejek aktin mozgató képességét vizsgáltuk (36–38). Az esszé során nitrocellulózzal borított folyadékcellába először 0,1–0,2 mg/ml miozint, majd 20 nM TRITC-jelölt, falloidinnal stabilizált F-aktint juttattunk. Végül a folyadékcellát nagy viszkozitású, anti-photobleaching hatású GOC-oldattal öblítettük át. Nem-izom miozin motilitást ATP jelenlétében is csak abban az esetben figyelhettünk meg, ha az RLC-t foszforiláltuk 0,2 mM CaCl_2 , 0,1 μM kalmodulin és 28 nM MLCK-t tartalmazó GOC oldattal. Video felvételeket Zeiss Axioplan mikroszkóppal készítettünk.

3.6 Koszedimentációs esszé

Aktin-My16Ank koszedimentációs esszében F-aktint inkubáltunk különböző My16Ank koncentrációkkal, skHMM jelenlétében vagy anélkül, majd a mintákat ultracentrifugáltuk. SkMyo2–My16Ank koszedimentációs esszében a teljes hosszúságú vázizom miozint (skMyo2) alacsony ionerejű pufferben dializáltuk, változó My16Ank koncentráció mellett. Alacsony ionerő mellett a miozin coiled-coil farok régióján keresztül filamentumokat formált és precipitálódott. A koprecipitálódott mintákat ultracentrifugálással választottuk el.

3.7 Steady-state anizotrópia

Fluoreszcencia anizotrópia méréseket Horiba Jobin-Yvon fluoriméteren végeztük. Az aktin–My16Ank kötési kísérletekben IAEDANS-jelölt monomer G-aktint vagy IAF-jelölt filamentális F-aktinhoz kevertünk különböző koncentrációjú My16Ank-t. Az anizotrópiát 20 °C-on mértük.

3.8 Felületi plazmon rezonancia

Felületi plazmon rezonancia segítségével vizsgáltuk a My16Ank interakcióját skHMM illetve PP1c izoformákkal. A méréseket Biacore-3000 készüléken végeztük (Biacore AB, Sweden). My16Ank-t kovalens amin-csatolással rögzítettük a szenzorchip felszínére, a GST-My16Ank pedig a felszínre előzőleg kovalensen rögzített anti-GST antitestekhez kötődött. 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.

3.9 Foszfataz aktivitás mérés

A PP1c izoformák enzimatis aktivitását 1 μ M radioaktív [γ - 32 P]ATP-vel foszforilált simaizom miozin regulatórikus könnyűlánc (32 P-RLC) defoszforilálásán keresztül vizsgáltuk (39). A PP1c előzetesen 10 percig preinkubálódott különböző koncentrációjú My16Ank jelenlétében, majd a reakció a szubsztrát hozzáadásával indult. A defoszforilációs reakciót 200-200 μ l 6%-os BSA és 20%-os TCA hozzáadásával termináltuk. A precipitálódott fehérjék centrifugálása után a felülúszóban található szabad 32 P_i aktivitását szcintillációs számlálóval (Perkin) mértük. A kísérletekhez rekombináns PP1 α -t, PP1 δ -t, valamint szövetből izolált natív PP1c-t használtunk.

3.10 Statisztikai módszerek

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 (40). Normál eloszlású, ismert varianciájú, független minták (pl. *in vitro* motilitási próba sebesség értékei) összehasonlításakor kétmintás z-próbával dolgoztunk. A kinetikai folyamatok összehasonlítását Khi-négyzet próbával végeztük. A számított paramétereket a szignifikancia táblázat szabadsági fokoknak megfelelő értékével hasonlítottuk össze (41).

4 EREDMÉNYEK

4.1 GFP-RLC csökkenti a HMM ATPáz aktivitást

A GFP-RLC hatását a miozin enzimatis aktivitására steady-state Mg^{2+} ATPáz aktivitás mérésén keresztül vizsgáltuk, emelkedő aktin koncentráció függvényében. A konvencionális miozinok közös tulajdonsága, hogy ATPáz aktivitásuk aktin jelenlétében jelentősen emelkedik. A simaizom és a nem-izom Myo2 esetén ezenkívül az RLC foszforilálása is elengedhetetlen az aktiváláshoz (42). Foszforilálatlan 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 (43) értéktől, ami a jelen mérési sorozatban $0,39 \pm 0,02 \text{ s}^{-1}$ -nak adódott (átlag \pm SE, $n=8$). Az eltérés szignifikáns: kétmintás t-próbával $p \ll 0,001$. A reakciók $K_{ATPáz}$ értékében, ami a félmaximális reakciósebesség eléréséhez szükséges szubsztrát koncentrációt – leegyszerűsítve az enzim és a szubsztrát egymáshoz való affinitását – jelenti, nem mutatkozott szignifikáns eltérés: a GFP-nmHMM2A $K_{ATPáz}$ 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 $p > 0,1$).

4.2 GFP-RLC lassabban foszforilálódik

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. Az eredmények azt mutatták, hogy a GFP-RLC teljes mértékben képes foszforilálódni, de lassabb kinetikával, mint a WT-RLC.

A foszforiláció kinetikáját radioaktív $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ beépülésén keresztül vizsgáltuk, különböző HMM szubsztrát koncentrációk mellett. 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.

4.3 *In vitro* motilitási próba GFP-jelölt HMM2A-val

A miozin motor funkcióról fontos információkkal szolgál a motor fehérjéket 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 foszforilálódik a Ser19 aminosavon. ATP jelenlétében, de MLCK kezelés nélkül nem volt megfigyelhető motilitás sem a WT-nmHMM2A, sem a GFP-nmHMM2A esetén. Foszforilációt 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 ($p < 0,01$).

4.4 My16Ank fokozza a vázizom miozin ATPáz aktivitását

A nem-konvencionális Myo16 funkciója még kevésbé ismert. Azt azonban az eddigi vizsgálatok is valószínűsítik, hogy fontos szerepe lehet a foszforilációs szabályozási folyamatokban, elsősorban a N-terminális ankyrin domén (My16Ank) révén. 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.

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. Mivel a Myo16 motor domén nem áll rendelkezésünkre, ezért modell rendszerként vázizom miozin HMM (skHMM), valamint nem-izom miozin 2B HMM (nmHMM2B) fragmentumokat használtunk. A vázizom miozin motor domén ~52%-os homológiát mutat a Myo16 motor doménnel, az aktin- és az ATP-kötő domén pedig nagy mértékben konzervált.

Méréseink során a skHMM bazális aktivitása az irodalmi adatoknak megfelelően, My16Ank nélkül $0,05 \text{ s}^{-1}$ -nak adódott (44). A bazális aktivitás nem változott a növekvő koncentrációjú, maximálisan $13 \mu\text{M}$ My16Ank hozzáadására sem.

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 Mg^{2+} ATPáz aktivitására. A steady-state Mg^{2+} ATPáz reakció maximális reakciósebessége My16Ank nélkül $V_{\text{max}} = 0,41 \text{ s}^{-1}$ -nak adódott, ez megfelel a standard relaxáló körülmények között, Ca^{2+} -mentes környezetben mért értéknek (45). Ugyanakkor a Mg^{2+} ATPáz aktivitás $15 \mu\text{M}$ My16Ank hozzáadására $0,66 \text{ s}^{-1}$ -ra növekedett, miközben a hozzátartozó Michaelis konstans (K_{ATPase}) értéke $5,1 \pm 0,7 \mu\text{M}$ -ról $7,1 \pm 0,4 \mu\text{M}$ -ra nőtt.

4.5 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 (11). Másfelől, a nmHMM2A a Myo16-hoz hasonlóan szintén elsősorban idegszövetben fordul elő.

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: MLCK, Ca^{2+} és kalmodulin hozzáadására az RLC foszforilálódott és az ATPáz aktivitás jelentősen megnőtt, mégpedig a My16Ank koncentrációjának függvényében.

Ezt követően, a V_{max} és a $K_{ATPáz}$ meghatározása céljából, különböző aktin koncentrációk mellett végeztük el a méréseket. Eredményeink azt mutatták, hogy az alapesetben mért – és az irodalmi adatokkal megegyező (31) – $0,17 s^{-1}$ aktivitás My16Ank hozzáadására jelentősen, $V_{max} = 0,22 s^{-1}$ -re növekedett. Ezzel szemben a $K_{ATPáz}$ érték nem változott meg szignifikánsan. A My16Ank hatását illetően a nem-izom miozinnal végzett mérések hasonló eredményre vezettek, mint a vázizom miozinnál tapasztalt megfigyelések.

4.6 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 teljes hosszúságú vázizom miozin (skMyo2) kölcsönhatását vizsgáltuk. Eredményeink azt mutatták, hogy a My16Ank koszedimentálódott a skMyo2-vel, míg önmagában oldatban maradt, igazolva, hogy a My16Ank képes kötődni a teljes hosszúságú skMyo2 molekulához, körülbelül 1:1 sztöchiometriai aránynál telítve azt. A disszociációs egyensúlyi állandó (K_D) értéke $3,01 \pm 0,20 \mu M$ -nak adódott.

A következőkben felületi plazmon rezonancia módszert alkalmazva vizsgáltuk, hogy a My16Ank a teljes hosszúságú miozin melyik részéhez kötődve fejt ki hatását. Ehhez a vázizom miozin HMM fragmentumát használtuk. A My16Ank domén és a skHMM disszociációs egyensúlyi állandója (K_D), $2,4 \pm 1,4 \mu M$ -nak adódott. Ez az eredmény jól egyezik a korábbi méréseknél kapott értékkel, 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.

4.7 My16Ank nem köti az aktint

Mivel 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, de a My16Ank nem koszedimentálódik F-aktinnal, valószínűsíthetően nem kötődik hozzá.

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, megerősítve a korábbi megfigyeléseket, hogy a My16Ank közvetlenül nem kötődik aktinhoz.

4.8 My16Ank erősen köti a PP1c izoformákat

Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy a posztnatális patkány kisagy lizátumban található Myo16 koimmunoprecipitálódik a protein foszfatáz katalitikus alegységeivel: a PP1 α és PP1 γ izoformákkal (de nem a PP1 δ -val) (22). 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).

Hogy meghatározhatjuk 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. Különböző koncentrációjú (0,5–5 μ M) tisztított PP1 α és PP1 δ oldatokat injektáltunk az immobilizált My16Ank felszín fölé és detektáltuk az asszociációt, majd a – szabad PP1c elvonását követő – disszociációt jellemző rezonancia jelet.

Eredményeink alapján a tisztított My16Ank domén szubmikromoláris affinitással, erősen köti mind a PP1 α ($K_D = 540 \pm 209$ nM), mind a PP1 δ ($K_D = 606 \pm 173$ nM) izoformákat. Ezek az értékek ellentmondanak a korábban közölt mérési eredményeknek, amelyek szerint, a Myo16b koimmunoprecipitál a PP1 α és PP1 γ izoformákkal, de nem kötődik a PP1 δ izoformához (22).

4.9 My16Ank csökkenti a PP1c foszfatáz aktivitását

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.

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 kalmodulin-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-t.

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. 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.

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 mozgató *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 16 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, $11,7 \mu\text{M}$ 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 (MYPT1)
- 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 nehézlánc 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 2 motorfehérje foszforilációs dinamikáját vizsgáltuk a regulatórikus könnyűlánc fluoreszcens GFP-vel történő jelölése esetén. Második projektünk a nem-konvencionális miozin 16 speciális ankyrin doménjének (My16Ank) 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 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. Nem vizsgálták azonban azt, hogy ez a GFP-RLC fúziós fehérje az endogén könnyűláncához hasonlóan viselkedik-e a miozin enzimatis aktivitásának és motilitásának szabályozásában.

A nmMyo2A regulatórikus könnyűláncának foszforilációja nemcsak az enzimaktivitást szabályozza, hanem a miozin filamentumok összeszerelődését is (46). Defoszforilált állapotban, fiziológiás 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 inaktív off-konformációt (46–48). Az RLC foszforilációja stabilizálja a miozin filamentumokat ATP jelenlétében is.

Joggal feltételezhetjük, hogy ha a regulatórikus könnyűlánc amino-terminálisára egy nagyméretű GFP molekulát kapcsolunk – aminek molsúlya csaknem másfélszer akkora, mint az egész regulatórikus könnyűlánc – akkor az megzavarhatja a miozin normális működését. Például elrejtetheti a Ser19 aminosavat az MLCK foszforilálása előtt, megakadályozhatja a miozin off-konformáció kialakulását vagy más módon interferálhat a miozin normális enzimatis vagy mechanikai funkciójával. Vizsgálataink azt mutatták, hogy a foszforilálatlan GFP-RLC-t tartalmazó miozin Mg^{2+} ATPáz aktivitása aktin jelenlétében is nagyon alacsony, ami azt valószínűsíti, hogy a GFP-jelölt fehérje is képes felvenni a kompakt off-konformációt. A nmHMM2A-hoz kötött GFP-RLC, mint az MLCK szubsztrátja, nagyjából hasonló maximális sebességgel (V_{max}), viszont magasabb K_M 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 Mg^{2+} ATPáz aktivitását a foszforiláció jelentősen növelte, ami ismételtlen alátámasztotta, hogy a kiméra fehérje a foszforiláció révén jól szabályozott. A GFP-nmHMM2A aktin-aktivált Mg^{2+} ATPáz 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 Mg^{2+} ATPáz aktivitást nagyobb mértékben csökkentette a GFP fúziója a könnyűláncokkal, mint az aktin filamentumok motilitását, magyarázható azzal, hogy a két folyamatot az ATPáz ciklus eltérő kinetikai lépései szabályozzák. A nmHMM2A aktin-aktivált Mg^{2+} ATPáz aktivitását a foszfát kibocsátás (49), míg az aktin filamentumok mozgását az ADP kibocsátás 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. 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 nmMyo2A is képes off-állapotba kerülni, ami elengedhetetlen feltétele a miozinok sejten belüli dinamikus átrendeződésének. Végeredményben, az N-terminális GFP-vel jelölt RLC drasztikusan nem befolyásolja a nmMyo2A *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. 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. 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.

Többféle módszerrel is kimutattuk, hogy a My16Ank képes kötődni a miozinhoz. Jóllehet ez a kapcsolat meglehetősen gyenge, mindenképpen azt jelzi, hogy a miozin rendelkezik My16Ank kötőhellyel, ami a skHMM-mel végzett mérések alapján feltehetőleg a motor doménen vagy a könnyűláncokon található.

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-kötőhelyet módosítaná. 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 egyik lehetősége, hogy a My16Ank beépül a motor doménbe és részévé válik az aktin-kötő felszínnek. 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. *In vitro* kísérleteinkkel kimutattuk, hogy az izolált My16Ank domén erősen kötődött a PP1 α és PP1 δ alegységekhez, nagyjából azonos affinitással. Általánosságban megállapítható, hogy a My16Ank a PP1c alegységgel komplexben protein foszfatáz holoenzimként viselkedhet. Kísérletünkben foszforilált regulatórikus könnyű láncot (P-RLC) használtunk, mint a My16Ank–PP1c komplex lehetséges szubsztrátja. 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. 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 meg szeretnénk 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 Myo16 is) valószínűleg komoly adalékkal szolgálna a Myo16b sejten belüli funkciójának megértésében.

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 KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

7.1 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: 2,22)
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: 1,93)

7.2 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

7.3 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 REFERENCIÁK

1. Bähler, M., and A. Rhoads. *FEBS Lett.* 513: 107–13, 2002
2. Leal, A., S. Endeke, C. Stengel, K. Huehne, et al. *Gene.* 312: 165–171, 2003
3. Simons, M., M. Wang, O.W. McBride, S. Kawamoto, et al. *Circ. Res.* 69: 530–539, 1991
4. Ma, X., S.S. Jana, M.A. Conti, S. Kawamoto, et al. *Mol. Biol. Cell.* 21: 3952–62, 2010
5. Heissler, S.M., and D.J. Manstein. *Cell. Mol. Life Sci.* 70: 1–21, 2013
6. Maupin, P., C. Phillips, R. Adelstein, and T. Pollard. *J. Cell Sci.* 107: 3077–3090, 1994
7. Rochlin, M., K. Itoh, R. Adelstein, and P. Bridgman. *J. Cell Sci.* 108: 3661–3670, 1995
8. De La Cruz, E.M., and E.M. Ostap. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16: 61–67, 2004
9. Springer Science & Business Media 2007
10. Vicente-Manzanares, M., X. Ma, R.S. Adelstein, and A.R. Horwitz. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10: 778–790, 2010
11. Sellers, J.R. *Curr Opin Cell Biol.* 3: 98–104, 1991
12. Ingebritsen, T., and F. Cohen. *Eur J Biochem.* May 2: 255–61, 1983
13. Ito, M., T. Nakano, F. Erdodi, and D.J. Hartshorne. *Mol Cell Biochem.* 259: 197–209, 2004
14. Watanabe, T., H. Hosoya, and S. Yonemura. *Mol Biol Cell.* 18: 605–616, 2007
15. Iwane, A.H., T. Funatsu, Y. Harada, M. Tokunaga, et al. *FEBS Lett.* 407: 235–238, 1997
16. Bajaj, G., Y. Zhang, M.I. Schimerlik, A.M. Hau, et al. *J. Biol. Chem.* 284 : 1252–1266, 2009
17. Komatsu, S., T. Yano, M. Shibata, R.A. Tuft, et al. *J Biol Chem.* 275: 34512–34520, 2000
18. Peterson, L.J., Z. Rajfur, A.S. Maddox, C.D. Freel, et al. *Mol Biol Cell.* 15: 3497–3508, 2004
19. Uchimura, T., K. Fumoto, Y. Yamamoto, K. Ueda, et al. *Cell Struct Funct.* 486: 479–486, 2002
20. Dosztányi, Z., V. Csizmok, P. Tompa, and I. Simon. *Bioinformatics.* 1: 3433–3434, 2005
21. Thompson, R.F., and G.M. Langford. *Anat. Rec.* 268: 276–89, 2002
22. Patel, K.G., C. Liu, P.L. Cameron, and R.S. Cameron. *J Neurosci.* 21: 7954–7968, 2001
23. Cameron, R.S., C. Liu, A.S. Mixon, J.P. Pihkala, et al. *Cell Motil Cytoskelet.* 64: 19–48, 2007
24. Yokoyama, K., T. Tezuka, M. Kotani, T. Nakazawa, et al. *EMBO J.* 30: 4739–54, 2011
25. Waite, K., and B.J. Eickholt. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 346: 245–65, 2010

26. Rodriguez-Murillo, L., B. Xu, J.L. Roos, G.R. Abecasis, et al. *Neuropsychopharmacology*. 39: 934–43, 2014
27. Liu, Y.F., S.M. Sowell, Y. Luo, A. Chaubey, et al. *PLoS One*. 10: e0123106, 2015
28. Li, J., A. Mahajan, and M.D. Tsai. *Biochemistry*. 45: 15168–15178, 2006
29. Mosavi, L.K., T.J. Cammett, D.C. Desrosiers, and Z.Y. Peng. *Protein Sci*. 13: 1435–1448, 2004
30. Wang, F., E. V. Harvey, M.A. Conti, D. Wei, et al. *Biochemistry*. 39: 5555–5560, 2000
31. Wang, F., M. Kovacs, A. Hu, J. Limouze, et al. *J Biol Chem*. 278: 27439–27448, 2003
32. Nagy, A., Y. Takagi, N. Billington, S. a Sun, et al. *J. Biol. Chem*. 288: 709–22, 2013
33. Kou, S.C., B.J. Cherayil, W. Min, B.P. English, et al. *J. Phys. Chem. B*. 109: 19068–19081, 2005
34. Facemyer, K.C., and C.R. Cremo. *Bioconjug Chem*. 3: 408–413, 1992
35. Nishikawa, M., J.R. Sellers, R.S. Adelstein, and H. Hidaka. *J Biol Chem*. 259: 8808–8814, 1984
36. Kron, S.J., and J.A. Spudich. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 83: 6272–6, 1986
37. Sellers, J.R. *Curr. Protoc. Cell Biol*. Chapter 13: Unit 13.2, 2001
38. Warshaw, D.M., J.M. Desrosiers, S.S. Work, and K.M. Trybus. *J. Cell Biol*. 111: 453–63, 1990
39. Toth, A., E. Kiss, F.W. Herberg, P. Gergely, et al. *Eur J Biochem*. 267: 1687–1697, 2000
40. Sprinthall, R.C. Pearson Allyn & Bacon 2007
41. Belágyi, J. Pécs: Pécsi Orvostudományi Egyetem 1999
42. Sellers, J.R. *J Biol Chem*. 260: 15815–15819, 1985
43. Kovács, M., J. Tóth, L. Nyitray, J.R. Sellers, et al. *Biochemistry*. 43: 4219–4226, 2004
44. Miller, B.M., M. Nyitrai, S.I. Bernstein, and M. a Geeves. *J Biol Chem*. 278: 50293–300, 2003
45. Higuchi, H., and S. Takemori. *J. Biochem*. 105: 638–43, 1989
46. Scholey, J.M., K.A. Taylor, and J. Kendrick-Jones. *Nature*. 287: 233–235, 1980
47. Craig, R., R. Smith, and J. Kendrick-Jones. *Nature*. Mar 31-Apr: 436–9, 1983
48. Umeki, N., H.S. Jung, S. Watanabe, T. Sakai, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106: 8483–8488, 2009
49. Kovács, M., F. Wang, A. Hu, Y. Zhang, et al. *J Biol Chem*. 278: 38132–38140, 2003