Funkcióra hangolva: a miozin 5a motordomén kommunikációs útvonalainak feltérképezése

Nagy Nikolett

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Biológia Doktori Iskola

Iskolavezető: Prof. Erdei Anna

Szerkezeti Biokémia Doktori Program

Programvezető: **Prof. Nyitray László**

Témavezető: Dr. Kovács Mihály

az MTA doktora, habilitált tudományos főmunkatárs

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi kar
Biológiai Intézet
Biokémiai Tanszék

2013

BEVEZETÉS

A miozinok olyan motorenzimek, melyek az ATP molekulában tárolt kémiai energiát mechanikai energiává alakítva számos, különböző feladat elvégzésére specializálódott eukarióta mozgatórendszer működését teszik lehetővé. Kulcsszereplők például az izomkontrakcióban, erőtartó folyamatokban és a sejten belüli anyagszállításban is.

A mechanokémiai energiaátalakítás a miozin motor és az aktin sín közötti ciklikus aktomiozin kölcsönhatáson alapul. Az aktomiozin ciklus a legkülönbözőbb működési mintázatot mutató miozinok esetében is hasonló enzimatikus lépések sorozatából áll. A miozin szupercsalád meghökkentő funkcionális diverzitása azonban a különböző miozin motorok aktomiozin ciklusának specifikus adaptációját igényli az adott funkcióhoz.

A miozin motorok funkcionális adaptációja a doménstruktúrában megfigyelhető eltérések mellett a motordoménben (MD) kódolt osztály- illetve izoforma-specifikus mechanizmusoknak köszönhető.

A miozin motordomén központi „vezérlőegység” szerepét annak köszönheti, hogy ez a régió tartalmazza az aktin sín és az „üzemanyag”, az ATP megkötéséért felelős kötőhelyeket, illetve *konverter* régiót is, mely a MD apró szerkezetváltozásainak felerősítéséért, illetve azoknak az erőkar felé történő továbbításáért felelős.

A MD-ben kódolt adaptációs mechanizmusoknak, illetve a hátterükben álló szerkezeti átrendeződések az ismerete azonban még korántsem teljes.

A processzív[1] lépegető mechanizmussal az aktin sín pozitív vége felé mozgó miozin 5a a sejten belüli rövidtávú anyagszállítás kulcsszereplőjeként ismert motorfehérje. Részt vesz a melanociták sejten belüli transzportjában, a *Purkinje*-sejtek dendrittüskéibe történő *SER* transzportjában, továbbá fotoreceptor sejtek és *cochlea* érzéksejtek pre- és posztszinaptikus jelátviteli folyamataiban is kulcsszereplő. Mivel a miozin 5a motor nagy komplexitást igénylő processzív, lépegető mechanizmusa számos egyedi adaptációs mechanizmust igényel, ezért a miozin 5a molekula MD-jében működő, funkcionális adaptációt biztosító mechanizmusok feltérképezését tűztük ki célul.

A miozin 5a MD funkcionális régióinak (nukleotid-kötő hely; N-terminális szubdomén (NTS), mely az erőkar kiindulási pontját képző *konverter* régióval kommunikál) működését változtattuk meg pontmutációk segítségével. A célzott mutációk révén a vad-típusú miozin 5a motorra jellemző inter- (aktin és miozin MD közötti) és intramolekuláris kommunikációs útvonalakat bolygattuk meg.

[1] processzív: számos enzimciklus és azzal járó mechanikai lépés teljesítésére képes a sínről történő leválás nélkül egyszeri sínre kötés alkalmával

A miozin 5a motor összetett mozgásmintázatának hátterében álló eddig ismeretlen mechanizmusok feltérképezése nemcsak a miozin 5a motorműködés pontosabb megértését teszi lehetővé, hanem hipotézisünk szerint teljesebb képet adhat arról, hogy az aktomiozin ciklus hasonló enzimatikus lépéseinek hátterében álló szerkezeti átrendeződések finom eltérései miképpen eredményezhetnek eltérő működési mintázatokat a különböző miozinok esetében.

CÉLKITŰZÉSEK

Célunk volt a processzív miozin 5a motor összetett mozgásmintázatának hátterében álló eddig nem azonosított intra- és intermolekuláris (miozin MD és az aktin sín közötti) MD átrendeződések feltérképezése, illetve távolabbra mutatva rávilágítani, hogy a különböző funkciót teljesítő miozinok szerkezeti átrendeződéseiket miképp alakítják, illetve finomítják a hatékony működés érdekében az egyébként nagyfokú hasonlóságot mutató energiaátalakító aktomiozin ciklus során.

Az Első témakör célkitűzése:

Annak feltárása, hogy a nukleotid-kötő helyen található *switch-2* hurok (LDI**X**GFE) egyetlen, miozin osztályonként variabilitást mutató aminosav pozíciójának (**X**) és az abból adódó szerkezeti különbségeknek mi a szerepük az energiaátalakító aktomiozin ciklus során (a vad-típusú miozin 5a tirozint (Y439) tartalmaz a *switch-2* variábilis pozíciójában (LDI**Y**GFE)).

Az Második témakör célkitűzése:

Az N-terminális szubdomén (NTS) - *konverter* régió kölcsönható felszín szerepének azonosítása a mechanokémiai ciklus során.
(a miozin 5a NTS - *konverter* kölcsönható felszínén, az I67K mutáció révén (I67K-R709), a miozin 2 motorra jellemző taszító kölcsönhatást (K84-R704, *D. discoideum*) mimikáltuk)

- Pontmutációkkal finomhangoltuk a miozin 5a motordomén szerkezeti átrendeződéseit.
- Lépésenként megvizsgáltuk a pontmutánsok aktomiozin ATP-áz ciklusát.
- Azonosítottuk a pontmutációknak a miozin 5a motilitására gyakorolt hatását.
- Szerkezeti és kinetikai modellezéssel azonosítottuk és validáltuk a kapott kinetikai és motilitási eredmények hátterében álló szerkezeti átalakulásokat.

ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

- Egér (*Mus musculus*) miozin 5a egyfejű (S1, szubfragmentum-1) és kétfejű (HMM, nehéz-meromiozin) változatainak vad-típust és pontmutánsokat kódoló DNS konstrukcióinak létrehozása *QuikChange* mutagenezis módszerrel.

  Első témakör mutáns konstrukciói: *switch-2* mutánsok -Y439A, Y439S, Y439E S1 és Y439A HMM

  Második témakör mutáns konstrukciói: *NTS* mutánsok - I67K S1 és HMM

- Miozin 5a rekombináns fehérjék létrehozása bakulovírus - *Sf*9 (*Spodoptera frugiperda*) expressziós rendszerben.

- Miozin 5a expresszió optimalizálás és ellenőrzés SDS-PAGE/Western Blot analízissel.

- Fehérjék tisztítása:

  Affinitás kromatográfia – Flag affinitás-gyanta (miozin 5a (m5a) S1 és HMM)

  Ioncserés kromatográfia – Q Sepharose FF (m5a S1 és HMM)

  Ioncserés kromatográfia – Q Sepharose FF (PBP (Foszfátkötő fehérje); MDCC (7-(dietilamino)-3-((((2- malemidil)etil)amino)karbonil)kumarin – PBP)

- Fehérje módosítás:

  F-aktin jelölése Cys^{374}-en N-(1-pirén)jódacetamiddal (PIA)

  Foszfátkötő fehérje (PBP) jelölése Cys^{197}-en MDCC-vel

- *Steady-state* ATP-áz aktivitás (bazális és aktin-aktivált) mérések NADH-kapcsolt reakcióval (Shimadzu UV 2101PC spektrofotométer)

- *Steady-state* koszedimentációs vizsgálatok (Beckman L7-65 ultracentrifuga; GelQuant Pro, Bio-Imaging System)

- *Steady-state* fluoreszcencia titrálás – pirén-aktin fluoreszcencia alapján (SPEX Fluoromax spektrofluoriméter)

- Trp (triptofán) fluoreszcencia spektrumok felvétele (apo állapotban, nukleotidok és nukleotid-analógok jelenlétében)

- Gyorskinetikai mérések:
    - KinTek SF-2004 és BioLogic SFM 300 *stopped-flow* készülékekkel

      Fluoreszcens jelek:

        - Trp - gerjesztés: 280 nm, 340-es Interferencia filter (IF)
        - PIA - gerjesztés: 365 nm, 400-as Felül áteresztő filter (LP)
        - md-ADP/md-ATP (3'-(N-metilantraniloil)-2'-dezoxi–ADP/ATP - gerjesztés: 280 nm, 420 LP filter
        - MDCC-PBP - gerjesztés: 436 nm, 455 LP filter

      Fényszórás követése - gerjesztés: 340 nm, 340 IF filter

    - KinTek RQF-3 *quenched-flow* készülék
        - [γ-^{32}P-]ATP izotóp
- Motilitás vizsgálatok:
    - Aktin-csúszási vizsgálat (*Actin gliding assay*) (OLYMPUS IX70 Mikroszkóppal)
    - Egyedi molekula motilitás vizsgálat *TIRF* - (*Total Internal Reflection Fluorescence*) mikroszkópiás módszerrel (OLYMPUS IX70)
- Szerkezeti modellezés (MOE és Yale Morph Server)
- Globális és *steady-state* kinetikai modellezés (KinTek Explorer 3.0 szoftver)

EREDMÉNYEK (TÉZISEK)

Az Első témakör tézisei:

- Elsőként karakterizáltuk az egér (*Mus musculus*) miozin 5a aktomiozin ciklusának kinetikai sajátságait.
- Rávilágítottunk a nukleotid-kötő helyen található *switch-2* hurok miozin osztály-specifikus aminosav-pozíciójának kulcsfontosságú allosztérikus szabályozó szerepére az aktin-aktivált, Mg^{2+}- függő ADP-felszabadulás folyamatában.
- Meghatároztuk, hogy a miozin 5a tirozinja (Y439) a *switch-2* egyedi szerkezetét eredményezve biztosítja a motor adaptációját a gyors, processzív működéshez.

- Megállapítottuk, hogy az ADP felszabadulás közvetlenül meghatározza a miozin 5a motor futási sebességét.
- A vad típusú fehérjéhez képest jelentősen lelassult, ugyanakkor változatlan processzivitású miozin 5a motorokat hoztunk létre, rámutatva a miozin 5a motorok futási-sebességének célzott hangolhatóságára.
- Továbbá azonosítottuk, hogy a miozin 5a tirozinja a *switch-2* egyedi szerkezetét eredményezve teszi lehetővé a miozin 5a motor kis aktiválási energiát igénylő, gyors *rigor* aktin-kötését.
- Távolabbra mutatva, munkánk alátámasztja nukleozid-trifoszfatáz (NTP-áz) enzimekben (például: G-fehérjék és GEF-ek (*guanine nucleotide exchange factor*)) a konzervált *switch-2* hurok általános szabályozó szerepét a Mg^{2+}- függő NDP-felszabadulás folyamatában.

A Második témakör tézisei:

- A miozin 5a NTS-*konverter* kölcsönható felszín működésének megbolygatása a távoli aktin- és az ATP-kötő helyek működésének zavarát eredményezte a miozin 5a aktomiozin ciklusa során:
    - az erős aktomiozin interakciók meggyengülése
    - az ADP-felszabadulás aktin-aktivációjának megszűnése
    - egy új ATP-kötő *off-pathway*[2] intermedier megjelenése
- Lassú, ugyanakkor processzív miozin 5a motorokat hoztunk létre, melyek processzív motilitása érzékennyé vált az ATP koncentrációra és a mechanikai terhelésre.
- A miozin 5a NTS-*konverter* kölcsönható felszín megváltoztatásával egy olyan kommunikációs útvonal allosztérikus változást idéztük elő, amely a miozin 5a motor mechanikai terhelésre való érzékenységét befolyásolja (pl. az erőkar állapotainak megzavarása és ezáltal a munkaütem hátráltatása révén).
- Meghatároztuk, hogy az NTS-*konverter* kölcsönható felszín központi, ugyanakkor miozin osztályonként eltérő, specifikus szerepet tölt be az enzimmechanizmus allosztérikus folyamatainak összehangolásában.

[2] *off-pathway*: az enzimciklus fő áramlási útvonalán kívül eső enzimatikus lépések útvonala, „mellékvágány”

KÖVETKEZTETÉSEK

A motordomén kommunikációs útvonalainak megbolygatásával sikerült teljesebb képet kapnunk a miozinok nukleotid-kicserélő mechanizmusáról és ezzel kapcsoltan a miozinok mozgási sebesség optimalizáló stratégiájáról, illetve a *rigor* aktinkötés mechanizmusáról. Azonosítottuk egy terhelésérzékeny pontját a miozin 5a motordoménnek, illetve előidéztük egy eddig nem azonosított ATP-kötő *off-pathway* köztitermék megjelenését.

Eredményeink rávilágítottak, hogy a funkcionális adaptáció hátterében álló szerkezeti átrendeződések számos esetben a funkcionális paraméterek (processzivitás, motilitási sebesség, terhelhetőség) egymástól független hangolását teszik lehetővé, ugyanakkor sok esetben tetten érhető ezeknek a kommunikációs útvonalaknak a találkozása is az energiaátalakító aktomiozin ciklus során.

A processzivitás és/vagy a transzlokációs sebesség manipulálása – funkcionálisan jól karakterizált mutációk révén – lehetőséget adhat a motorenzimek pontos fiziológiás szerepének karakterizálására, például a miozin 5a szerepének azonosítására fotoreceptor sejtek ingerület-átviteli folyamataiban. A mechanikai terhelésre való érzékenység manipulálása pedig lehetőséget teremthet a molekulák fiziológiás mechanikai terhelés-kitettségének vizsgálatára is.

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ PUBLIKÁCIÓK

Tudományos közlemények

Nagy, N. T., Chakraborty, S., Harami, G. M., Sellers, J. R., Sakamoto, T., Kovács, M. (2013): *A subdomain interaction at the base of the lever allosterically tunes the mechanochemical mechanism of myosin 5a.* **PLoS ONE** 2013 May 1;8(5):e62640.

Nagy, N. T., Sakamoto, T., Takács, B., Gyimesi, M., Hazai, E., Bikádi, Z., Sellers, J. R., Kovács, M. (2010): *Functional adaptation of the switch-2 nucleotide sensor enables rapid processive translocation by myosin-5.* **FASEB J**. 2010 Nov;24(11):4480-90.

Hazai folyóiratban publikált közlemény

Nagy, N., Takács, B., Kovács, M. (2010): *Motorenzimek működési alapelvei és egyedi finomhangolása.* ***Biokémia*** (A Magyar Biokémiai Egyesület internetes folyóirata)

Konferencia kivonatok (a szerző - előadó aláhúzással jelölve)

Nagy, N. T., Chakraborty, S., Sakamoto, T., Kovács, M. (2011): *Allosteric tuning of myosin 5a motor activity.* Europen Muscle Conference, Berlin, Germany

Nagy, N. T., Kovács, M. (2011): *Allosteric tuning of myosin 5a motor activity.* 55th Annual Meeting of the Biophysical Society, Baltimore, MD, USA

Nagy, N., Sakamoto, T., Takács, B., Gyimesi, M., Sellers, J. R., Kovács, M. (2009): *A class-specific structural adaptation of the switch-2 loop enables rapid processive translocation of myosin 5a.* European Muscle Conference, Lille, France

Nagy, N., Sellers, J. R., and Kovács, M. (2008): *Role of the switch-2 active site loop in the processive mechanism of myosin 5.* 52nd Annual Meeting of the Biophysical Society, Long Beach, CA, USA

Nagy, N., Sarlós, K., Takács, B., Tóth, J., Yang, Y., Pearson, D. S., Hetényi, C., Nyitray, L., Málnási-Csizmadia, A., Geeves, M. A., Bagshaw, C. R., Sellers, J. R., Brown, J. H., Szent-Györgyi, A. G., Cohen, C., Kovács, M. (2008): *Routes of allosteric communication between functional parts of the myosin motor.* Scientific Meeting of International Research Scholars of the Howard Hughes Medical Institute, Lisbon, Portugal

Nagy, N., Kovács, M. (2007): *Role of the switch-2 active site loop in the processive mechanism of myosin 5.* Molecular Recognition Conference*, Pécs, Hungary*