

# **Nem-izom miozin 2C: egy felderítetlen gerinces motorfehérje vizsgálata**

**Sarankó Hajnalka**

**Szakdolgozat**



**Témavezető: Dr. Kovács Mihály, tudományos főmunkatárs**

**Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar  
Biológiai Intézet  
Biokémiai Tanszék  
2009**

# Tartalomjegyzék

<b><u>Bevezetés</u></b>	4
<i>Célkitűzések</i>	5
<b><u>Irodalmi áttekintés</u></b>	6
<i>A miozinról általában</i>	6
<i>Szerkezet</i>	6
<i>Működési mechanizmus</i>	8
<i>Motorfehérjék enzimatis paramétereinek vizsgálata</i>	11
<i>A miozin-2 osztály</i>	12
<i>Nem-izom miozin-2 izoformák</i>	12
<i>Az izoformák szöveti eloszlása</i>	15
<i>Az NM2 alternatív splice-formái</i>	16
<i>Természetes és mesterségesen előállított NM2 mutánsok</i>	20
<i>Az NM2 szerepe a sejtosztódásban</i>	21
<i>Az NM2C patológiai vonatkozásai</i>	23
<b><u>Anyakok és módszerek</u></b>	25
<i>Transzpozíció</i>	25
<i>Transzformálás ellenőrzése PCR-rel</i>	26
<i>Transzfectálás</i>	27
<i>Vírus amplifikálás</i>	27
<i>Fehérjeexpresszió ellenőrzése Western Blot-tal</i>	28
<i>Fehérjeexpresszió</i>	28
<i>Rekombináns NM2C-S1 preparálása FLAG-affinitás kromatográfiával</i>	29
<i>F-aktin preparálás</i>	30
<i>Fluoreszcencia spektroszkópia</i>	30
<i>Steady-state ATPáz aktivitás mérése</i>	30
<i>Tranziens kinetikai mérések</i>	31
<b><u>Eredmények és megbeszélésük</u></b>	33
<i>Transzpozíció</i>	33
<i>Expresszióhoz szükséges vírushennyiség optimalizálása</i>	
<i>Western Blot analízissel</i>	33
<i>FLAG-affinitás oszlopkromatográfia</i>	33

<i>Triptofán fluoreszcencia-változás nukleotidkötés hatására</i>	34
<i>Bazális és aktin-aktivált ATPáz aktivitás</i>	35
<i>Tranziens kinetikai mérések</i>	37
<i>Mant-dATP kötés</i>	37
<i>Mant-dezoxi-ADP kötés</i>	38
<b><u>Konklúzió</u></b>	39
<b><u>Összefoglalás</u></b>	40
<b><u>Summary</u></b>	41
<b><u>Köszönetnyilvánítás</u></b>	42
<b><u>Rövidítési jegyzék</u></b>	43
<b><u>Irodalomjegyzék</u></b>	45

## Bevezetés

A sejtekben számos mechanizmus alakult ki, melyek a belső környezet rendezett kialakításáért és fenntartásáért felelnek. Nagy sejtorganellumok és makromolekuláris komplexek nem mozoghatnak hatékonyan a diffúzió útján, gyors és nagy távolságú celluláris transzportra van szükség. A sejt különböző célból végrehajtott alakváltozásai, a membrán befűződése a citokinézis során, irányított és jól szervezett folyamatok révén valósul meg. A szervezet legparányibb élő egysége megoldásként igen hatékony stratégiát használ: molekuláris motorokat működtet ATP-ből származó szabadenergia felhasználásával. Ilyen motorok az aktin alapú motorfehérjék, a miozinok. Az ATP hidrolíziséből származó kémiai energiát mechanikai munkává alakítják, mellyel aztán az aktinon, mint a sejt természetes belső sínhálózatán mozognak.

A miozinok az egysejtű eukariótáktól a gerincesekig mindenütt megtalálható fehérjék. Fiziológiai szerepük sokrétű: fő kontraktilis fehérjéi az izomnak, szerepük van a sejt migrációban, a sejthalak és a sejt polaritás kialakításában, a sejt adhézióban, a sejt osztódásban, valamint a differenciáció során egyaránt [11].

A különböző celluláris funkcióhoz adaptálódott miozinok szerkezete és működése változatos képet mutat. Ezek alapján vizsgálhatóak az eltérések az egyes osztályok között. Évtizedek óta végeznek kinetikai vizsgálatokat, amelyek részletes leírást adnak az ATPáz enzimek működéséről. A miozint – sokfélesége miatt – az egyes szerkezeti változások során történő működésbeli sajátosságok szintén jó vizsgálati objektummá teszik. Ez az egyik oka, hogy régóta folytatnak kísérleteket ezekkel a fehérjékkel.

A másik ok, hogy a miozin patológiai szerepe is jelentős: számos betegség közvetlen vagy közvetett okozója. A nem-izom miozin 2C mennyisége tumorsejtekben rendkívül magas, ezáltal a rákkutatásban fontos szerepet kaphat, a nem-izom miozin 2B bizonyos mutációja vízfejűséget okozhat, és a kiragadott példákon kívül még számos kórtani információ lehető fel az irodalomban [3, 12].

A mi vizsgálataink tárgyát a nem-izom miozin 2C alkotta. Ezt a fehérjét csak pár éve fedezték fel, ezáltal biokémiai karakterizálása még folyamatban van, amihez remélhetőleg a mi eredményeink is hozzájárulnak.

### ***Célkitűzések***

Munkánk során az NM2C egyfejű konstrukciójának részletes kinetikai tulajdonságaira szerettünk volna fényt deríteni. A következő kérdésekre kerestük a választ:

- hogyan változik az erőkar konformációja a bekötődő nukleotidok (ADP illetve ATP) hatására?
- mint ATPáz enzim, mekkora az ATP bontásának ciklusideje, azaz milyen gyors motor?
- nagy vagy kicsi az aktinaffinitása?
- milyen sebességgel köti az egyes nukleotidokat?
- az ATP-hidrolízis során a különböző köztes állapotok melyikében mennyi időt tölt ciklusidejéből?
- a kapott eredményeket igyekeztünk más miozinok értékeivel összehasonlítani.

A kinetikai paraméterek meghatározása és ezzel együtt az NM2C karakterizálása az enzim élettani szerepéhez szükséges tulajdonságait tárja fel.

A jelen dolgozat igyekszik összefoglalni eddigi eredményeinket.

## Irodalmi áttekintés

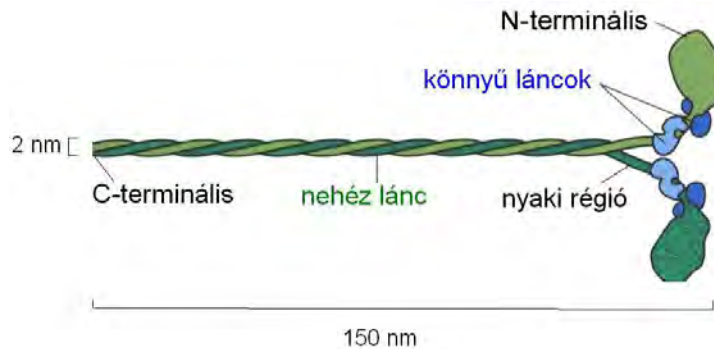
### *A miozinról általában*

#### *Szerkezet*

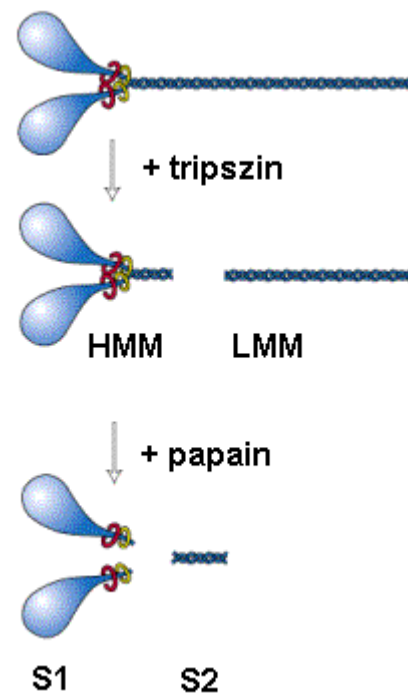
A molekuláris motorok miozin szuperfamilia több, mint 25 osztályt számlál, melyek különböző sejten belüli funkciókat töltenek be, és ehhez kapcsolódva sokféle szerkezetűek. Mégis felállítható egy alapvető felépítés: mégpedig a nehéz lánc (MHC)

fej- (motor domén), nyak- és farkrégióra osztható. Az N-terminuson a motor domén tartalmazza az aktin- és nukleotidkötő helyet. Ez a domén a legkonzerváltabb. A nyaki részhez könnyűláncok (MLC) kapcsolódnak. A C-terminális fark rész mutatja a legnagyobb diverzitást, mind hosszát, mind szekvenciáját tekintve; szerepe kargókötés, a molekula kihorgonyozása, stb., illetve több miozin osztályban  $\alpha$ -helikális coiled coil-t formál, így létrehozva a kétfejű miozin molekulát (az egyfejű miozin molekulák tipikus képviselői – más osztályok mellett – a miozin-1 izoformák). A miozin-2 molekulák filamentumokba rendeződnek, ezeket az izomban vastag filamentumoknak hívják (míg az aktin filamentumok a vékony filamentumok).

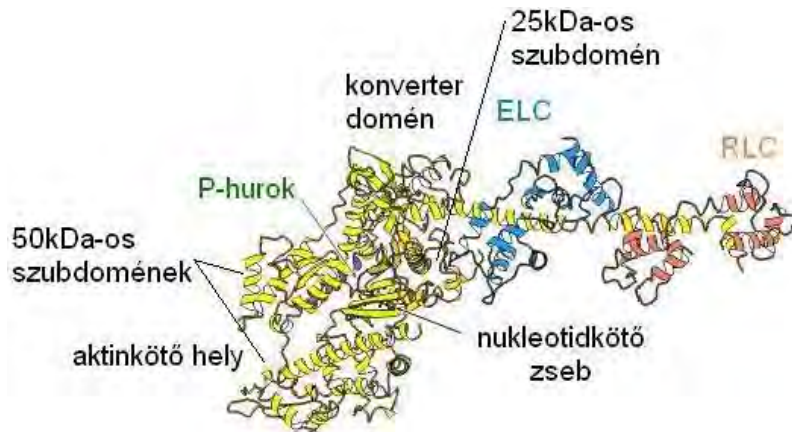
Szent-Györgyi és Mihályi darabolta fel először a miozin molekulát különböző enzimekkel [13, 14]. Tripszines emésztés után a molekula két részre hasad: nehéz meromiozinra (HMM) és könnyű meromiozinra (LMM). A HMM a miozin fejeket és a farkrész egy kis darabját foglalja magába, míg az LMM a maradék farki régiót. A HMM konstrukció előnye, hogy a teljes molekulával ellentétben szolubilis, motoraktivitása nem sérül, és a két fej



1. ábra: Miozin molekula szerkezeti rajza (<http://termtud.akg.hu>)



2. ábra: A miozin emésztéssel előállított fragmentumai ([www.nbi.dk](http://www.nbi.dk))



3. ábra: Az S1 kristályszerkezete (Stryer: Biochemistry, 2002)

kinetikai paraméterei kiválóan vizsgálhatóak. Az S2 a maradék coiled-coil rész. Az S1 részletes struktúrája, vagyis a funkcionális szubdomének a 3. ábrán láthatóak. A két 50 kDa-os szubdomén az aktinkötő árkot fogja közre, a felső 50 kDa-os és a 25 kDa-os N-terminális szubdomén között helyezkedik el a nukleotidkötő zseb, melyben a több szempontból lényeges P-hurok foglal helyet, ami egy evolúciósan nagyon konzervált rész az NTPáz fehérjékben. Az S1 C-terminális része a 20 kDa-os konverter-erőkar régió. A képen látható még a nyaki régióban helyet foglaló 2 könnyűlánc (ELC: esszenciális könnyűlánc, RLC: regulációs könnyűlánc), melyek szerepe a nehézlánc stabilizálása és a molekula működésének szabályozása egyes miozinokban.

Egy kis kitérő az aktinra, hiszen ahogy a vonat nem képzelhető el sín nélkül, úgy a miozin sem aktin nélkül. Az aktin monomer formája a globuláris aktin (G-aktin), mely alacsony ionerősségnél, alacsony hőmérsékleten és lúgos pH-n felvett szerkezet. Fiziológias körülmények között azonban polimerizálódik, kialakítva a filamentózus aktint (F-aktin). A falloidin a filamentum végéhez kötődve gátolja annak depolimerizációját. A filamentumok kialakulása, lebomlása és újraépülése számos sejtbeli mechanizmusban szerepet játszik: az amőboid mozgásban, a fagocitózisban, a sejtosztódás esetében a leánysejtek szétválásában, a különböző sejtnyúlványok létrehozásában és megszüntetésében. Az F-aktin poláris struktúrája alapján megkülönböztetnek pozitív és negatív véget.

A miozinról az ATP-hidrolízis termékei nagyságrendekkel gyorsabban szabadulnak fel aktin jelenlétében. Az aktin-miozin kölcsönhatás létrejöttét aktin-asszociált fehérjék irányíthatják. Ilyen fehérjék a troponin és a tropomiozin vázizom esetében. A superhelikális szerkezetű tropomiozin az aktinfilamentumok árkában helyezkedik el. Hozzá kötődnek a különböző troponin alegységek: a TnC, mely a citoplazmatikus  $Ca^{2+}$  kötéséért felelős, a TnI

egymásra gyakorolt hatása is vizsgálható rajta. Papainnal történő további emésztés hatására a HMM szétbomlik 2 db S1 (szubfragmentum 1) és egy S2 (szubfragmentum 2) nevezetű részre. Az S1 egy motor doménből és a nyaki régióból álló, egyfejú, motor aktivitással rendelkező konstrukció, melyen az enzim

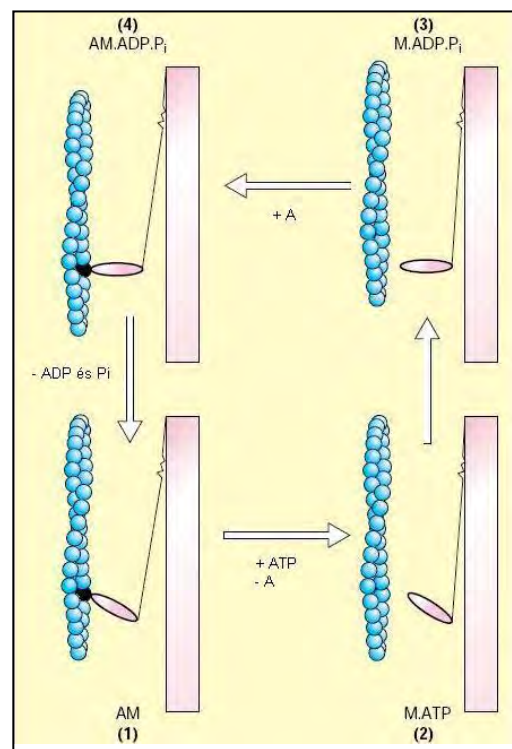
az aktinhoz kötődik, a TnT pedig közvetlenül a tropomiozinhoz. Ha idegimpulzus hatására a szarkoplazmatikus retikulumból felszabaduló  $\text{Ca}^{2+}$  a TnC-hez köt, az konformáció-változást szenved. E változás áttevődve a többi troponin alegységre végül eléri a tropomiozint, mely erre a hatásra szorosabban belesimul az árokba, felszabadítva az aktinon a miozin kötőhelyeket. Ezen sorozatos lépések révén valósulhat meg az aktomiozin kölcsönhatás.

#### *Működési mechanizmus*

A miozin működését az izomkontrakció mechanizmusán tárták fel és ennek alapján állították fel a „csúszó filamentum” modellt. A modell a vastag (miozin) és a vékony (aktin) filamentumok egymáson való elcsúszásán alapul. Ha a vastag filamentumok becsúsznak a vékonyak közé, az izom rövidül, ellenkező esetben megnyúlik. A nagy számú szarkomer (az izom működési egysége) összehangolt munkájából és egymás után következtéből adódik, hogy ezen mikroszkopikus mozgások összeadódnak, és az izom hossza akár láthatóan megváltozik.

A. Huxley és H. Huxley vizsgálta részletesebben a kétféle filamentum interakcióját, és megfigyelték, hogy a vastag és vékony filamentumok között keresztthidak létesítenek kapcsolatot, melyek a vastag filamentumhoz tartoznak, és folyamatosan – ritmikusan – tolják odébb a vékony filamentumot.

Később Lymn és Taylor építette bele ebbe a modellbe a miozin ATPáz ciklusát. A keresztthidat az S1 alkotja. 1. lépésben az S1 nukleotidmentes állapotban az aktinnal  $45^\circ$ -os szöget zár be. ATP hatására az S1 ledisszociál az aktinról (2. lépés). 3. lépésként a miozin elhidrolizálja az ATP-t, amihez kapcsoltan az erőkar felhúzódik – ekkor a miozin fej nincs az aktinhoz kötve, és merőlegesen áll a vékony filamentumra. 4. lépésként a nukleotidkötő



Ábra 4: A Lymn-Taylor modell [4]

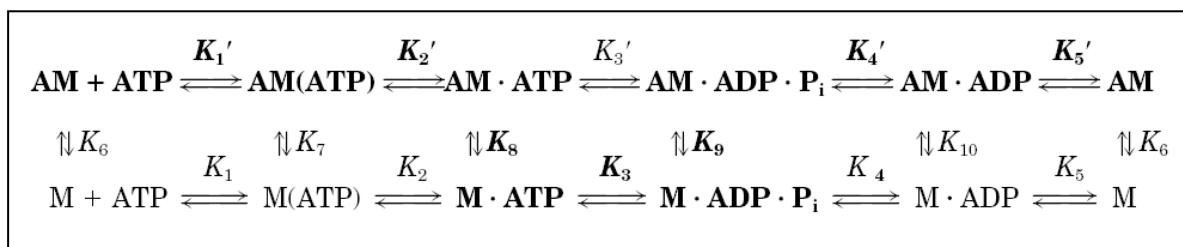
zsebben már ADP-t és foszfátot ( $\text{P}_i$ ) kötő miozin visszaköt az aktinhoz, felszabadulnak a termékek és megtörténik az erőkifejtés (powerstroke), vagyis a vékony filamentumot egy lépésnyit eltolja a miozin. Ezzel a fej visszaáll eredeti,  $45^\circ$ -os alapállapotába [15]. A modell szerint tehát az egész „keresztthíd” elmozdul.



A 3D-s kristályszerkezetek megalkotása azonban rávilágított, hogy a modell javításra szorul. Nincs kilendülő keresztlíd, a motor domén ugyanabban a szögben csatlakozik az aktinhoz, csak az erőkar mozdul el, átvezetve és felerősítve a nukleotidkötő zsebben történt konformáció-változást [4]. Ezzel megszületett a „kilendülő erőkar” hipotézis Holmes és mások munkássága nyomán. A modellhez hozzátartozik, hogy a hidrolízis után az aktinhoz nem kötött fej a felhúzott állapotnak felel meg (pre-powerstroke), míg az erőkifejtés után lecsapott állapotba megy át a feji rész (post-powerstroke) – vagyis az erőkar helyzetét az ATP-hidrolízis termékeinek felszabadulása határozza meg. Sok molekula együttes munkája nagyon hatékony eredményt produkál, az aktin filamentum haladásához vezet.

Bagshaw és Trentham megalkották a miozin ATPáz ciklusának részletes kinetikai modelljét. A motor domén triptofán aminosavakat tartalmaz, melyek fluoreszcenciája mérhető. Ha fluoreszcencia-változás észlelhető, az azt jelenti, hogy a Trp helyzete ill. környéke megváltozott konformáció-változás által. Bagshaw és munkatársai a nukleotidkötő zseb környékén lévő Trp (Trp\*) és a relé-hélixen lévő Trp-t (Trp\*\*) fluoreszcenciaváltozását használták fel a konformáció-változások detektálására [16].

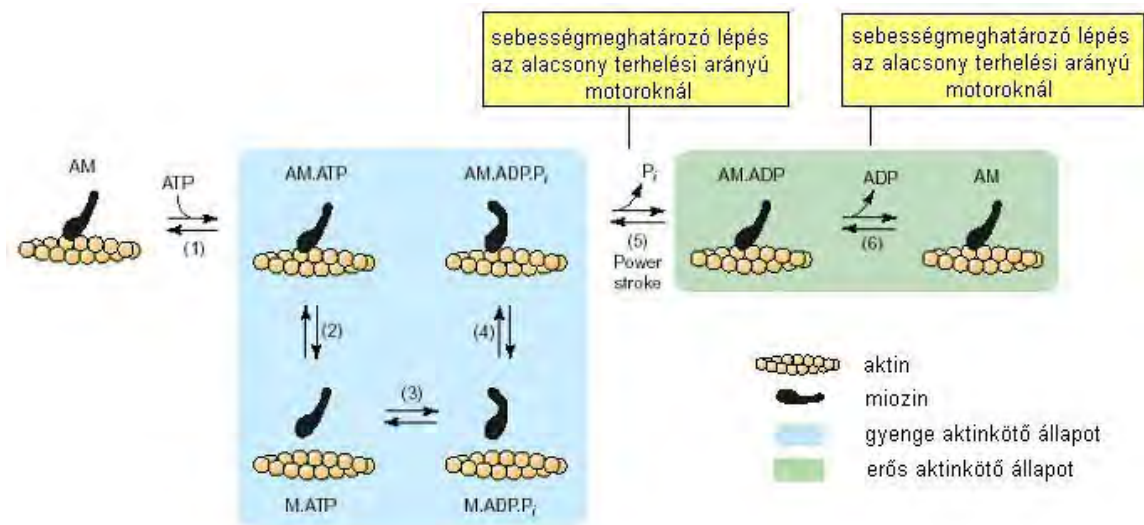
Az aktomiozin működési ciklusa:



5. ábra: Az aktomiozin kinetikai ciklusa [8]

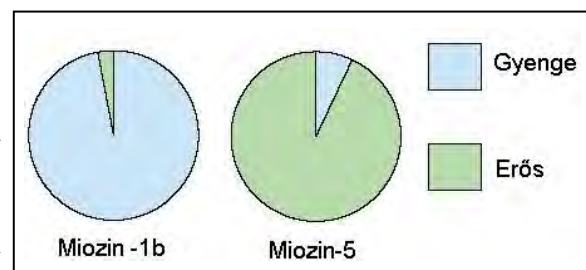
Kiindulásnak tekinthető, mikor az miozin az aktinhoz szorosán kapcsolódik, nukleotid nincs jelen. Első lépésben ATP köt a miozinhoz. A kötés során először egy ütközési lépés figyelhető meg ( $K_1$  vagy  $K_1'$  egyensúlyi állandó), majd egy izomerizációs lépés következik ( $K_2$  vagy  $K_2'$ ) mely során az ATP a nukleotidkötő zsebbe kerül. ATP hatására a miozin leválik az aktinról. A miozin ezen állapotát nevezik gyenge aktinkötő állapotnak. A levált miozinfaj elhidrolizálja az ATP-t ADP-re és szervetlen foszfátra. A hidrolízishez kapcsolatosan a fej konformációs változáson megy keresztül – azaz felhúzott állapotba kerül az erőkar –, és ebben az állapotban csatlakozik vissza az aktinhoz – ez a kapcsolat már erős aktinkötő állapot. A következő lépésben felszabadul a  $P_i$  ( $K_4$  vagy  $K_4'$ ), megtörténik az erőkifejtő lépés (powerstroke), a miozin elmozdul az aktinon, mint egy sínen. A legvégső lépésben az ADP is leválik a fehérjéről ( $K_5$ ,  $K_5'$ ). Maga az ATP hidrolízise ( $K_3$ ) nagyon gyorsan játszódik le, a

különbségek az egyes miozinokban főként ott kereshetők, hogy a termékek milyen sebességgel szabadulnak fel (a termékfelszabadulást az aktin jelenléte gyorsítja fel) [8]. A gyenge és erős aktinkötő állapotokat a 6. ábrán láthatjuk.



6. ábra: Az ATPáz ciklus grafikus sémája [2]

A motorok működése szempontjából nagyon fontos paraméter a *terhelési arány* (*duty ratio*), mely az erős aktinkötő állapotok arányát viszonyítja a teljes ciklushoz. Így megkülönböztetünk alacsony és magas terhelési arányú miozinokat. Az alacsony terhelési arányú miozinokra jellemző, hogy enzimeciklusuk nagyobb részét gyenge aktinkötő állapotokban töltik, vagyis ciklusuk gyors, esetükben a körfolyamat sebesség-meghatározó lépése (a többihez képest a leglassabb sebességgel rendelkező lépés, ezáltal ez határozza meg az egész ciklus életidejét) a foszfát felszabadulás. A magas terhelési arányú miozinok erős aktinkötő állapotokban töltik ciklusuk nagy részét, kevésbé gyorsak, inkább erőfenntartásra specializálódtak, sebesség-meghatározó lépésük az ADP felszabadulása [2].



7. ábra: Gyenge és erős aktinkötő állapotok aránya az ATPáz ciklusban [2]

Tranziens kinetikai módszerekkel megmérve az egyes lépéseket, és meghatározva azok sebességét, megállapítható a sebesség-meghatározó lépés, amivel számos információt szerezhetünk az adott motorfehérjéről, illetve enzimkinetikai alapok fektethetőek le vele kapcsolatban.

Egy motorfehérje vizsgálata során fontos megnézni, hogy az adott fehérje *processzív* motor-e. A processzivitás folytonosságot jelent, a mi szemszögünkből pontosabban azt, hogy

egy molekuláris motor folyamatosan halad – lépked-e az aktinon, nem elengedve azt egyszerre mindkét fejével. Ehhez arra van szükség, hogy az adott enzimnek nagy legyen az aktinaffinitása, vagyis ciklusa nagy részét aktinkötött állapotban töltsse (magas terhelési arányú motor – high duty ratio), illetve az egyik feje mindig kötve legyen az aktinhoz (különben eldiffundálna a sejtben, távol az aktintól). Ilyen processzív lépegető az organelláris transzportban résztvevő miozin-5. A miozin-1 és -2 izoformák jellemzően alacsony terhelési arányú motorok. Az általuk formált vastag filamentumok együttesen egy *magas effektív duty ratio*-t hoznak létre, és folyamatosan elcsúsznak az aktinon [2].

### ***Motorfehérjék enzimatikus paramétereinek vizsgálata***

ATPáz ciklusuk sokfélesége, az, hogy mikor melyik lépésre mekkora „hangsúly” tevődik, határozza meg, milyen funkcióhoz adaptálódott az adott motorfehérje, hogy minél kifinomultabb működést tegyen lehetővé az élettani, fiziológiai funkciókkal összhangban.

ATP-t adva feleslegben miozinhoz, el fogja azt hidrolizálni, bár aktin – mint aktivátor – hiányában kisebb sebességgel, mint annak jelenlétében. A hidrolízis mértékét, vagyis hogy egy enzim molekula hány ATP-molekulát bont el egy másodperc alatt, *bazális ATPáz aktivitásnak* nevezzük.

Abban az esetben, ha a reakcióban aktin is részt vesz, a ciklusidő rövidül, mert az aktin gyorsítja a termékek felszabadulását. Ebben az esetben az enzim *aktin-aktivált ATPáz aktivitása* mérhető. Az aktin koncentráció függvényében felvéve az aktivitást, meghatározható, hogy egy enzim molekula hány ATP-molekulát hidrolizál egy másodperc alatt maximális sebességgel. Az aktin koncentráció növelésével először gyorsan növekvő aktivitás tapasztalható, majd a görbe telítést mutat. További aktin hozzáadása nem változtat a bontás sebességén. Azt az aktin koncentrációt, ahol az ATPáz aktivitás fele a maximálisnak (vagyis az az aktin koncentráció, ami félig telíti az enzimet), a  $K_{ATPáz}$  értékkel jelemezzük.

A motorfehérjék vizsgálata során vizsgálható továbbá az *in vitro motilitás (IVM)*. Ebben az esetben az egyedi miozin molekulákat kikötik egy felületre. Ezután hozzáadnak jelölt aktin filamentumokat és nukleotidot. ATP hatására az aktint kötő miozin molekulák végrehajtják enzimatikus ciklusukat/ciklusaikat, eltolva ezáltal az aktin filamentumokat. Az aktin filamentumok mozgása detektálható, a csúszás sebessége a „miozin-felzínen” pedig kiszámítható  $\mu\text{m/s}$  egységben [17].

## ***A miozin-2 osztály<sup>1</sup>***

A miozin-2 osztály vázizom, szívizom, simaizom és citoplazmatikus nem-izom miozinokat foglal magába, emberben összesen 15 különböző izoformát. A különbségek a nehézláncok (MHC) génjeinek sokféleségében kereshetők, valamint a pre-mRNS-ek alternatívan hasított formái is hozzájárulnak a diverzitáshoz.

Az osztály tagjai a fő kontraktilis fehérjék az izomban, valamint döntő a szerepük van a nem-izom sejtek összehúzódásban is. A nem-izom miozinok nehézláncuk alapján a simaizom miozinnal mutatnak evolúciós rokonságot.

Minden miozin-2 izoformára jellemző, hogy hexamer, egy nehézlánc dimerből és 2 pár könnyűláncból áll. Reverzibilisen képesek kötődni az aktin filamentumhoz, ATP-t hidrolizálnak, mely által kémiai energiát alakítanak mechanikai munkává – a vékony filamentumon való haladáshoz. Azonban lényeges különbségek vannak a különböző izoformák között a szabályozásukban. A váz- és szívizom miozin-2-eket aktinhoz asszociált fehérjék regulálják (troponin és tropomiozin), a gerinces nem-izom (NM) és simaizom (SM) miozin-2-k a 20 kDa-os könnyűláncok foszforilálása útján szabályozódnak (ld. később) – foszforilálás után nő motoraktivitásuk és filamentumképzésük [18].

## ***Nem-izom miozin-2 izoformák<sup>2</sup> (NM2)***

Az NM2 alosztály alacsonyabbrendűekben mindössze egyetlen tagot számlál, míg emlősökben 3 izoformája fordul elő, amely „változatosságot” a magasabb rendű szervezet komplexebb szerveződése igényli. A sokféle szerv- és szövettípus, valamint ezek különböző működéséhez és funkciójához való adaptálódása, az ehhez szorosan kapcsolódó sejtbeli különbségek megkövetelik a miozinok széles körűen változatos és nagyobb számát.

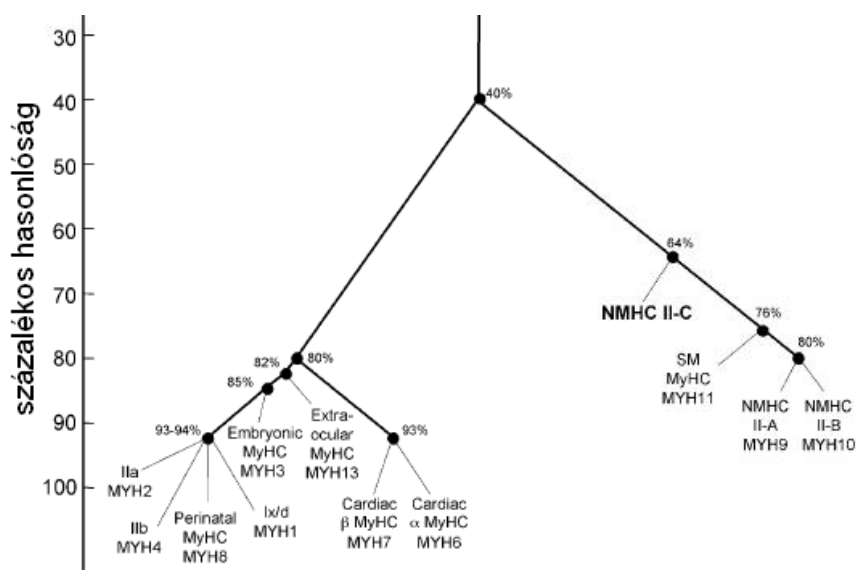
Emlősökben 3 különböző gén kódolja a 3 fehérjét, pontosabban a 230 kDa tömegű MHC-eket: MYH9 (NM2A), MYH10 (NM2B) és MYH14 (NM2C). Az MHC-k filogenetikai analízise azt mutatja, hogy a 2A és 2B között 80%-os hasonlóság van, míg a 2C-vel hasonlóságuk csak 64% (az SM-MHC-2 76%-os hasonlóságot mutat a 2A és 2B-vel). Ez azt jelenti, hogy a 2C egy korábbi leágazása a nem-izom/simaizom családnak, míg a másik három

---

<sup>1</sup> A dolgozatomban a miozin osztályokat arab számmal jelöltem témavezetőm javaslatára. Bár eredetileg római számokkal jelölték őket, újabban azonban áttértek az arab számokkal való jelölésre, mivel ma már 25-nél több osztály különül el.

<sup>2</sup> Izoforma alatt a klasszikus értelemben vett, különböző génről átíródó fehérjeváltozatokat értem. A dolgozatban később előforduló splice-formán pedig az egy génről átíródó pre-mRNS-ek alternatívan hasított formájáról transzlálódó fehérjéket (az irodalomban gyakran mindkettőt izoformának írnak).

(2A, 2B, SM) közelebb áll egymáshoz szekvencia analízisük szerint (a fa másik ágán a vázizom, a szívizom MHC-k láthatóak) [7].



8. ábra: Az NMHC-k filogenetikai fája [7]

Jellemzően filamentumformáló fehérjék, azonban esetükben mindössze pár 10 molekula asszociál úgynevezett minifilamentumba. Ezzel hosszú időn keresztül képesek lesznek az erőfenntartásra.

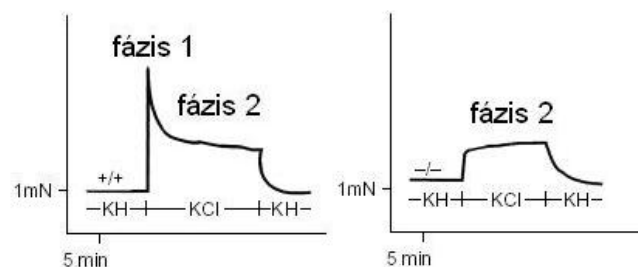
Esetükben is két pár könnyű lánc kötődik a nehéz láncokhoz, a 17 kDa-os  $MLC_{17}$  és 20 kDa-os  $MLC_{20}$ . Az  $MLC_{20}$ -at számos kináz foszforilálhatja, úgymint  $Ca^{2+}$ -kalmodulin-függő miozin könnyűlánc kináz (MLCK), Rho kináz, és az AMP által aktivált protein kináz. Az AMP-kináz egy metabolikus regulátor, akkor aktiválódik, ha alacsony az ATP-szint és energia-depriváció áll fent. Hiányában az NM2 inaktív, a sejtalak és a mitózis abnormális. A kináz aktivációjával azonban drasztikus alakváltozás figyelhető meg, kialakul az az apikális-bazális polarizáció, a kefeszegély (mint azt humán vastagbél sejtvonalban megfigyelték). Ebből megállapítható, hogy az NM2, mint egy energia-érzékelő és sejt polaritást meghatározó negatív szabályozó működik. Ezek az enzimek elsődlegesen a Ser19-et (néha Thr18-at) foszforilálják, növelve ezzel az aktin aktivált MgATPáz aktivitást, a filamentumképzést és a kontraktilis aktivitást [11]. A defoszforilálás a miozin foszfatáz rendszer feladata, hatására csökken a kontraktilis aktivitás. Mindkét esetben a  $Ca^{2+}$ -szint a szignál. Az NM2-k mellett a simaizom miozinok szabályozása történik ezzel a mechanizmussal.

Ezen miozinok a nem-izom sejtekben sokféle celluláris folyamat résztvevői. A citokinézis folyamatában feladatuk a membránbefűződés irányítása. Szerepük nélkülözhetetlen a sejt migrációban, mialatt az amöboid sejt nyúlványok kialakulnak és

„húzzák magukkal” az egész sejtet - hiszen ehhez elengedhetetlen az aktomiozin-hálózat átrendeződése. Ugyanígy elengedhetetlenek a sejt differenciációban – embrionális korban a gasztrulációban, a sejtek és szövetek alakjának kialakításában és fenntartásában, valamint a kortikális tenzió fenntartásában.

Tagjaira jellemző, hogy elsősorban nem az erőteljes kontrakcióban rejlik működésük, sokkal inkább a hosszantartó erőfenntartásra ill. lassabb intracelluláris mozgásra specializálódtak. Ha összehasonlítjuk őket a vázizom miozinokkal, melyek gyors motorok, vagyis ciklusidejüknek csak kis részét töltik aktinkötött állapotban, vagy az ellentétnek tekinthető miozin-5, ami esetében az erősen aktinkötött állapotok dominálnak, az NM2 osztály tagjai köztes helyet foglalnak el. Hosszú enzimeciklus jellemzi őket (ciklusidejük 2-6 s – vázizom: 0.03 s), ciklusuk nagy részében erősen kötődnek az aktinhoz, vagyis a leglassabb motorok. Ez viszont azzal az előnnyel jár, hogy kevés ATP elfogyasztásával hosszan tartó erő kifejtésre képesek, azaz igen „energiatakarékosak”.

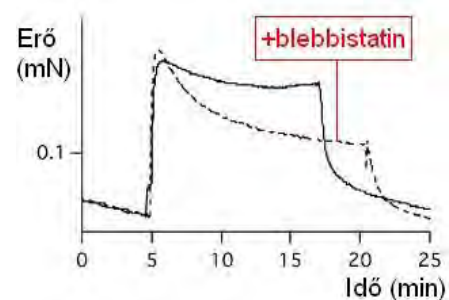
Az erőfenntartásra való specializáltságukat több kutató is vizsgálta. Elsősorban az NM2A és 2B esetén bizonyították, hogy simaizomban vegyesen fordulnak elő simaizom miozinokkal. Ebben az esetben a szerepük a kontrakció fenntartása hosszabb ideig. Morano és munkatársai vizsgálták a simaizom és nem-izom miozinok egymásra hatását simaizom sejtekben [10]. A kísérleti egerek génjei közül kiütötték az SM-MHC-t kódoló gént – összehasonlításképpen vad típusú egészséges egereket vizsgáltak és erre a génre heterozigóta egyedeket. Az egészséges egerek húgyhólyagjából szövetmintát vettek, majd az KCl-polarizációs technikával ingerelték, izometriás összehúzódásra készítve azt. Az izometriás összehúzódás vizsgálható úgy, ha az izmot kifeszítik két pont között, így az ingerlés hatására hossza nem változik, feszülése viszont igen, ami mérhető. Az ingerlés hatására megfigyelhető volt egy gyors összehúzódás (1. fázis), majd egy lassan lohadó erőfenntartó fázis (2. fázis). A feszítés mértékét ábrázolták az idő függvényében:



**9. ábra:** Erőgenerálás mintázata vad típusú SM-MHC (balra) és SM-MHC-deficiens állatok (jobbra) esetén [10]

Mindkét fázisban mérték az izom maximális rövidülési sebességét, ami gyors kontrakció esetén közel háromszoros érték volt, mint a második, erőfenntartó, feszült állapotú izomnál. Mikor SM-MHC deficiens egereken végezték el ugyanezt a kísérletet, azt az eredményt kapták, hogy náluk nem jelentkezik az 1. fázis, a második fázis viszont változatlan az előző kísérletben leírtakkal, a kapott értékek között nincs szignifikáns különbség. Mindezekből arra következtettek, hogy az első, gyors összehúzódó fázisért a simaizom miozinok, míg a második lassú, erőfenntartó fázisért a nem-izom miozinok felelősek. Ennek élettani jelentősége, hogy a húgyhólyag ürüléséért a simaizom miozinok, míg a telített hólyag falának feszítéséért a nem-izom miozinok felelősek. Ezenkívül a kísérleti állatokon azt tapasztalták, hogy ha nincs simaizom miozin, akkor a húgyhólyag képtelen kiürülni, és az egerek születésük után 24 órával elpusztulnak, ha viszont külső nyomás hatására kiürült a hólyagjuk, akkor megélhették a 72 órát. Tehát a normális működéshez mindkét miozin izoformára szükség van.

Később Rhee és munkatársai [6] vizsgálták a fenti kísérletek nyomán, hogy mi történik, ha csak simaizom miozin van jelen. Ugyanis a nem-izom miozin egy szelektív ATPáz inhibitorral, a blebbistatinnal gátolható. A blebbistatin nem változtatta meg az első fázis kontrakciós csúcsát, azonban az erőfenntartás ereje a felére esett vissza, bizonyítva ezzel, hogy a nem-izom miozinok a tartós kontrakció fenntartásáért felelnek. A nem-izom miozinok jelenlétére Löffgren és munkatársai [19] szolgáltattak további bizonyítékkal. Kimutatták, hogy az erőfenntartó fázisban lévő miozinok inkább az ADP-hez mutatnak affinitást, ami a nem-izom miozinokra jellemző tulajdonság, míg az első fázisban részt vevő miozinok ATPáz-ciklusában a  $P_i$  felszabadulás a leglassabb lépés, ami pedig a simaizom miozinokat jellemzi. Ezzel további bizonyítékot szolgáltattak az NM2-k erőfenntartó funkciójára.

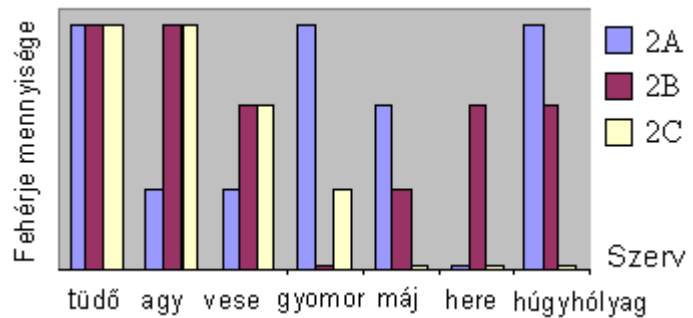


**10. ábra:** Blebbistatin hatása az erőgenerálásra [6]

#### *Az izoformák szöveti eloszlása*

Az NM2C fehérjét kódoló MYH14 nevű gént Leal és munkatársai fedezték fel a 19-es humán kromoszómán. Vizsgálataik elsősorban a fehérjét kódoló mRNS szervbeli eloszlására irányultak. Kimutatták, hogy az mRNS főként emberi vékony- és vastagélben valamint vázizmokban bőséges [20]. Magát a NM2C-t 2003-ban írták le Golomb és munkatársai [7]. Számos szervben – egérben és emberben egyaránt – meghatározták szöveti eloszlását mind mRNS mind protein szinten. Ezek szerint a fehérjét kódoló mRNS emberben megtalálható az

agyban, a szívben, a vékony- és vastagbélben, a vesében, a májban és a tüdőben. Az agyban főként a pons és a corpus callosum bővelkedik benne, ezeken belül is inkább a gliasejtek, mint a sejttestek. Legbőségebben a vázizmokban van jelen, legkisebb mennyiségben pedig a simaizmokban gazdag szervekben, úgy mint aorta, húgyhólyag és méh. Nem található a



**11. ábra:** A 3 izoforma eloszlása a különböző szervekben (csak szemléltető és nem számszerű arányok) – [3]nyomán

lépben, a csecsemőmirigyben, a limfocitákban valamint a méhlepényben. Összehasonlítva az embrionális és a felnőtt szöveteket, embrionális szövetben az NM2C mRNS-ének mennyisége rendkívül kicsi a felnőttéhez képest. Fehérjeszinten 7 szervre esett a fókuszpont [3]. Legbőségebben a tüdőben és az agyban, kevésbé a vesében fejeződik ki, míg a gyomorban csak egy egész kicsi mennyiséget találtak. A húgyhólyag, a máj, és a here pedig híján van az NM2C fehérjének. Összehasonlítást végeztek ebből a szempontból a 2A- és 2B-vel, és arra jutottak, hogy mind a három izoformából a tüdő tartalmazza a legtöbbet, a 2C és 2B együtt nagy mennyiségben az agyban fordul elő

Mivel ismeretesek az NM2C-nek olyan mutációi, melyek siketséghez vezetnek, érdemes a fehérje eloszlását megvizsgálni a belső fülben. A csontos csiga érzőfelülete nagy mennyiségben tartalmazza az NM2C-t, míg a hám- és az őket körülvevő alapszövet NM2A-ban és 2B-ben bővelkedik.

#### *Az NM2 alternatív splice-formái*

A családon belül mi az NM2 osztály tagjaival foglalkoztunk részletesen. Három izoforma körül a 2A és a 2B már régen leírásra került, a 2C-t azonban csak az utóbbi években fedezték fel [7].

Számos szempontból vizsgálták és hasonlították össze a 3 fehérjét a jobb megértés céljából.

A három nem-izom miozin-forma szöveti eloszlását széleskörűen feltárták. Az egyes szervek, szövetek és sejtek között lehet átfedés a fehérjék expressziós mintázatában, azonban megessik, hogy egy sejtben csak az egyik izotípus lehetséges fel. Jellemző, hogy a 2A főként trombocitákban, a lépben, a 2B és 2C pedig legnagyobb mennyiségben az agyban fejeződik ki.



A három izoforma más-más sejtbeli funkciókra szakosodott. Ezzel függenek össze enzimkinetikai tulajdonságaik, hiszen a működés és a funkció szorosan kapcsolt fogalmak. A 2A alacsony terhelési arányú motor, vagyis ciklusidejének nagy részét gyenge aktinkötő állapotban tölti, így rövid életidővel rendelkezik, ezzel szemben a 2B aktin affinitása magas, ciklusa lassú, hosszú időn át tartózkodik erős aktinkötő állapotban, fenntartva ezzel akár egy szerv összehúzósságát. Így 2A például az aorta ritmikus összehúzódásában játszik fontos szerepet, míg a 2B ezen sajátosága a húgyhólyag falának feszítettségében jelenik meg [21].

Munkánk és kutatásunk középpontjában az NM2C állt, így ezen fehérjéről következnek részletesebb leírás. A 2A és 2B sem marad ki, hiszen a három izoforma egymással való összehasonlítása során derül fény a különbségekre.

A három izoforma közül a 2B-nek és a 2C-nek ismeretesek természetes alternatíván hasított izoformái (a 2A esetében nem találtak ilyet).

A 2B-nek két inszertált formája van (B1, B2), és egy olyan, amiben nincs inszert, ezt nevezik B0-nak. B1 esetében 10 vagy 16 aminosav foglal helyet a loop-1-ben, az ATP-kötő zsebhez közeli flexibilis hurokban (a 212. aminosavtól kezdődően). Itoh és Adelstein a 10 aminosavas inszertált formát B1a-nak, a 16 aminosavasat B1b-nek nevezte el [22]. A B2 az aktinkötő régióval szomszédos loop-2-ben tartalmaz egy 21 aminosavnyi inszerciót (a 622. aminosavval kezdődően). Mind a B1-re, mind a B2-re jellemző, hogy csak idegszövetben expresszálódik, az első fehérje már az embrionális napokban megjelenik, és mennyisége a 10-14. embrionális napig egyenletesen nő (a vizsgálat csirke agyszöveten történt) míg kifejlett állatokban kevés a mennyisége. Ezzel ellentétben a B2 csak a születés után jelenik meg, és bőven expresszálódik végig felnőtt korban.

Az NM2C-nek 3 természetes izoformája létezik (C0, C1, C2). C0-nak nevezik, amely nem tartalmaz inszerciót. A C1 a loop-1-ben (az ATP kötőzsebhez közel) tartalmaz plusz 8 aminosavat (227. helytől kezdődően) – ez a beépülés az ATP-kötésre van hatással. A C2 esetében a loop-2-be (az aktinkötő régió közelében) 41 aminosav épül be egér esetén, illetve 33 db ember esetén. A különbség abból adódik, hogy a humán DNS-szekvencia 24 bázissal rövidebb, ahol is tartalmaz egy *gt* hasítóhelyet (az egér a 3' vég felé 24 nukleotiddal odébb tartalmazza ugyanezt a *gt* szekvenciát). Míg a C0 és a C1 széleskörűen expresszálódik, sok szövetben, addig a C2 csak idegszövetben jelenik meg [7]. Emellett Jana és munkatársai létrehoztak egy C1C2 mutánst is kísérleti célokból [1], ami mindkét inszertet tartalmazza. A C0 főleg a szívben, vázizomban, tüdőben és agyban mutatkozik (gyengén a herében, a vesében és a májban), míg a C1 legnagyobb mennyiségben az agyban és a tüdőben, valamint bővelkedik benne a here, a vese és a máj. Az agynak, mint fő NM2C-forrásnak a különböző

részei eltérő mennyiségben tartalmazzák a C2 izoformát. Humán vizsgálatokat végezve kiderült, hogy a C2 a nagyagy és a kisagyban körülbelül egyforma mennyiségben van jelen, az agykéregben pedig lényegesen kevesebb van. C0 és C1 (vagyis a C2 inszertet nem tartalmazó formák) elsősorban a nagyagyban fordulnak elő, a kisagyban kevesebb jelentkezik. Egérben is végeztek hasonló vizsgálatokat, ahol a gerincvelőt is vizsgálati tárgyá téve, ott találták a legtöbb C2-t (középagyban és kéregben nincs), C1-et főleg gerincvelőben, míg a C0 az agy = középagy > kéreg > gerincvelő mennyiségi eloszlást mutatta.

Tumorsejtvonalakat vizsgálva [3] kiderült, hogy nagy mennyiségű C1-et termelnek a mellráksejtek (a tüdőráksejtek szintén, bár valamivel kevesebbet), míg a C0 formából lényegesen kevesebb van jelen ezen a vonalon (2A és 2B ugyanolyan mennyiségben expresszál mind tumor, mind nem-tumor sejtvonalakban). Mindez a 2C sejten belüli lokalizációjához köthető, mégpedig hogy osztódó sejtekben mennyisége megnő, a tumorsejtekre pedig alapvetően jellemző a gyors, egymás utáni sejtciklus (további ismeretek a Sejtosztódás c. fejezetben).

Kelley és Adelstein 1995-ben írt egy összefoglaló tanulmányt [21] az inszertált és nem-inszertált (vagy deléciós) izoformákról simaizom miozinok és nem-izom miozinok esetében, ha az inszerció az ATP-kötőzseb közelében lévő loop-1-ben helyezkedik el (212. aminosavtól kezdődően). A meglévő adatokból arra következtettek, hogy ez a hurok fontos szerepet játszik a gerinces simaizom és nem-izom miozinok különböző enzimikus aktivitásában valamint a különböző szabályozó mechanizmusokban. Simaizmok esetében a 7 aminosavnyi inszerció megléte gyors, fázikus összehúzódást eredményezett belsejüket vizsgálva, míg a deléció tónusos összehúzódást az aortában, mely esetben a fehérje hosszú időn át fenntartja a tenziót kevés ATP felhasználásával. Megmérve az IVM-t kiderült az is, hogy az inszertált izoforma két és félszer gyorsabban transzlokálódik az aktinon, mint a deléciós forma, ugyanígy az aktin-aktivált  $Mg^{2+}$ -ATPáz aktivitás is kétszer magasabbnak adódott az inszertált enzim esetén. Mindebből levonható, hogy az inszerció valóban magasabb enzimikus aktivitást produkál, és az ATP-kötőzsebbel közeli inszert jelenléte hat az ATP-kötés sebességére, a hidrolízisre illetve a termékfelszabadulásra. NMHC-B vizsgálata folytán derült fény arra, hogy az inszerció által a fehérjébe került 214-es pozíciójú (szintén a nukleotid kötőzsebbel közeli) szerin foszforilálódik a ciklin-p34 cdc2 kinázzal (a nem inszertált NMHC-A nem mutatja ezt a sajátást). A foszforiláció szabályozó funkcióval bír a meiotikus osztódás során. Egyelőre erről annyi információ van, hogy a meiózis alatt a fenti aminosav foszforilált, míg interfázisban defoszforilált.

A loop-2-ben lévő inszert hatását az MLC<sub>20</sub> foszforiláltságával hozták összefüggésbe. Jana és mtsai valamint Kim és mtsai vizsgálták [1, 23] a 2C és a 2B foszforiláltság-függését. A foszforilálást miozin könnyűlánc kinázzal (MLCK) végezték. Ha a fehérjében jelen volt a fenti inszert (B2 és C2 ill. C1C2), nem volt szükség az MLC<sub>20</sub> foszforiláltságára a maximális aktin-aktivált ATPáz aktivitás és a maximális IVM eléréséhez.

HMM	Bazális ATPáz aktivitás (μM)	Aktin-aktivált ATPáz aktivitás				IVM (μm/s)	
		ØMLCK		MLCK		ØMLCK	MLCK
		V <sub>max</sub> (s <sup>-1</sup> )	K <sub>ATPáz</sub> (μM)	V <sub>max</sub> (s <sup>-1</sup> )	K <sub>ATPáz</sub> (μM)		
<b>C0</b>	<0.006	0.03	1,2	0,16	4,7	NSM	0,04
<b>C1</b>	<0.007	0.04	15,6	0,21	10,9	NSM	0,09
<b>C2</b>	<0.04	0.34	13,9	0,27	7,2	0,06	0,06
<b>C1C2</b>	<0.02	0.36	12,9	0,26	3,8	0,06	0,06

**1. táblázat:** Az NM2C izotípusok kinetikai paramétereinek összehasonlítása a foszforiláltság függésében [1](NSM: no significant movement (nincs jelentős mozgás))

A fenti adatokból látszik, hogy a bazális ATPáz aktivitás minden esetben nagyon alacsonynak adódott. Az aktin-aktivált ATPáz aktivitás esetében a V<sub>max</sub>-ban azonban jelentős eltérések mutatkoznak. Ha jelen van a C2-inszert és defoszforilált a 20 kDa-os könnyűlánc, 9-10-szeres a különbség a loop-2-ben inszertált enzimek javára. Ha foszforilálják a könnyűláncokat, a C0 és C1 esetében 5-szörösére nő a V<sub>max</sub> a foszforilálatlanhoz képest, azonban a C2 és C1C2 esetében nincs különbség. Az IVM-nál hasonló eredmények adódnak. Tehát az adatok alátámasztják a fentebb leírtakat, hogy ha a fehérje tartalmazza a 41 aminosavnyi inszertet a loop-2-ben, nincs szükség az MLCK-ra a maximális aktivitáshoz.

Az NM2B2 részletesebb vizsgálatát Kim és mtsai végezték, szintén az MLC20 foszforiláltságának tükrében [23]. Ugyanazt az eredményt kaptak, mint a fenti kutatók, vagyis hogy a B2-nek nincs szüksége a könnyűlánc foszforilálására. Kiderült azonban, hogy a fehérjének eleve nagyon alacsony az aktin-aktivált ATPáz aktivitása, IVM-je pedig nem is mérhető, annyira kicsi, és mindez a B2 inszertnek tulajdonítható. Ezekre az adatokra a foszforiláltság nem volt hatással. Ha 2C0 loop-2 részébe beklónozták a B2 inszertet, és megmérték a fenti paramétereket (aktin-aktivált-ATPáz aktivitás, IVM), a C0-ra jellemző értékeket kaptak, vagyis az inszert nem változtatott a fehérje ezen tulajdonságain. Ez azt is jelenti, hogy a B2 inszert hatása függ az enzim nehézláncától.. Mivel az inszert nem változtatja meg más NM2 enzimatis tulajdonságait, valamint ez az egyetlen NM2, amit az MLCK nem aktivál, valószínűleg a B2-nek elsősorban nem a motorikus aktivitása a leglényegesebb tulajdonsága, hanem esetleg más sejtbeli funkció, vagy létezik egy más

alternatív út, amin keresztül aktiválódik. Léte és jelentősége mindenképp bizonyítható, ugyanis ha rá specifikus siRNS-sel kiütötték, abnormalis lett a Purkinje-sejtek lokalizációja, kevesebb ezen sejtek dendritága és -tüskéje, valamint zavart szenvedett a kísérleti egerek motorikus koordinációja

### *Természetes és mesterségesen előállított NM2 mutánsok*

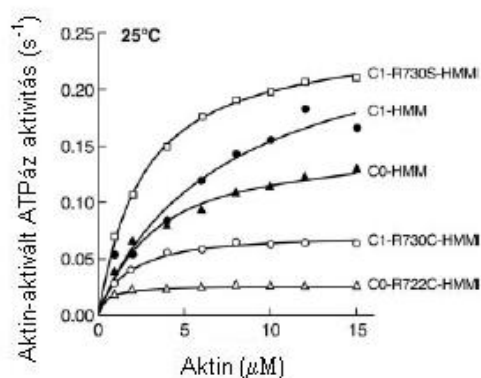
Az NM2C kinetikai tulajdonságait részletesen Kim és mtsai [9] tárták fel HMM konstrukciókon. A fehérjét kódoló MYH14 gén két alternatívan hasított izoformáját (C0 és C1) és ezek (a motorrégióban) pontmutációt tartalmazó változatait hasonlították össze egymással, valamint más 2A és 2B mutánsokkal, bazális- és aktin-aktivált ATPáz aktivitásuk valamint in vitro motilitásuk alapján.

Természetes mutánsait vizsgálták az NM2A és -2C-nek, míg a 2B esetében in vitro állították elő a mutáns fehérjét.

Fehérje	Gén	Izoforma	Mutáció	Hol?	Fenotípusos változások/Fejlődési rendellenesség
NM2A	MYH9		R702C	humán	vese, trombociták, leukociták, hallás, látás
			N93K	humán	trombociták
NM2B	MYH10		R709C	egér	szív, agy
			R709C	humán	
			N97K	humán	
NM2C	MYH14	C0	R726S	humán	belső fül - autoszómás domináns hallásvesztés
			R730C	egér	
			R730S	egér	
			R722C	egér	

2. táblázat: Az NM2 izoformák mutációi [9]

A 2C R726S<sup>3</sup> és a 2A R702C mutáció autoszómás domináns süketséget okoz. A 2B mutációja (R709C) egerekben hasonló, mint a 2A R702C, és az agy és a szív embrionális fejlődésében okoz rendellenességet. Az R702C, R709C, R730C, R722C hasonló helyen elhelyezkedő pontmutációk. A vizsgálatok tárgyát képezte a bazális és aktin-aktivált ATPáz aktivitás, valamint az IVM meghatározása a vad és mutáns konstrukciók esetében. A bazális



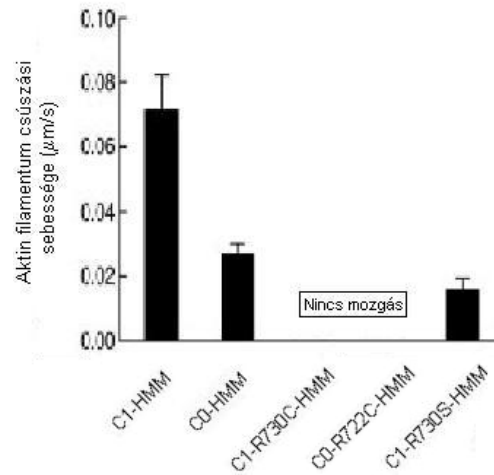
12. ábra: NM2C mutációinak aktin-aktivált ATPáz aktivitásai [9]

<sup>3</sup> R726S: a 726-os pozíciójú Arg-t cseréltek Ser-re. Ugyanezen módon történik a többi mutáció jelölése is.

ATPáz aktivitás mind a 2B és 2C mutánsok esetében is nagyon alacsonynak adódott ( $<0.004 \text{ s}^{-1}$ ).

Aktin-aktivált ATPáz aktivitás és IVM a 2C izoformái és mutánsai esetén:

Vizsgálataikból kiderült, hogy a loop-1-ben lévő plusz 8 aminosav magasabb  $V_{\max}$ -ot és magasabb IVM-t eredményezett, míg a mutánsok körében mind a C0 mind a C1 esetében (R730C és R722C) is csökkentek ezek a paraméterek, amennyiben az arginint ciszteinre cserélték. A szerinre való csere azonban magas ATPáz-aktivitást eredményezett, és az IVM is megmaradt, bár csökkent sebességgel. Tehát a szerines mutáns ATPáz ciklusa rövidebb, mint a C1-nek, és IVM-je alacsonyabb.

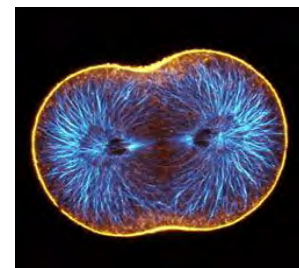


13. ábra: NM2C mutációinak IVM-a [9]

Ennek magyarázata lehet, hogy a régiók, ahová a mutációk kerültek, az erő kifejtő lépés alatt nem mozognak egymáshoz képest. Szerepük abban rejlik, hogy az ATP-kötő zsebben történt konformáció-változást továbbítsák az erőkar felé. Ha azonban a molekula ezen részét megváltoztatják, kevésbé hatékonyan fogja a kémiai munkát mechanikai munkává alakítani. Vagyis a hosszú ATPáz ciklusú mutánsok annyira lassan fogják „átvezetni” a konformáció változást az erőkarra, hogy végül a mozgás már-már nem is lesz látható. Az R730S mutáns gyorsabb ATPáz ciklusa révén ugyan képes átvinni az erőt, de a mutáció miatt már kevesebb mozgást produkál, mint a vad típus. Tehát ezen mutációk elválasztják az ATPáz aktivitást a motilitástól azzal, hogy megváltoztatják az „átvezető szakaszt”.

#### *Az NM2 szerepe a sejtosztódásban*

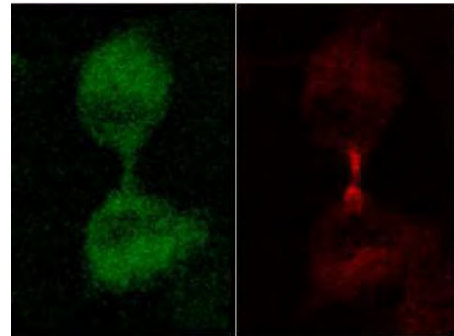
A sejthártya alatti kortikális rétegben lévő aktin filamentumokhoz nem-izom miozinok kapcsolódnak. A két fehérje kapcsolata határozza meg a sejtek alakját. A citokinézis kezdetén a nem-izom miozinok a sejt középvonalában lokalizálódnak. Munkájuk során a sejten egy összehúzódó gyűrű vagy „hasadási árok” figyelhető meg, melynek szűkülése két egyenlő félre osztja a sejtet. A gyűrű szűkülésével a keletkező két sejt egyre jobban



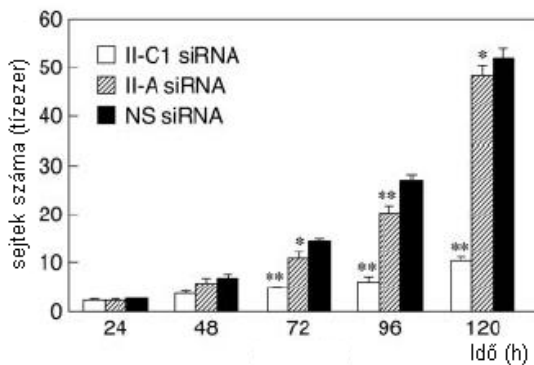
14. ábra: Az osztódó sejt befűződése (kék: mikrotubulusok, sárga: kortikális F-aktin) ([raven.zoology.washington.edu](http://raven.zoology.washington.edu))

elszeparálódik egymástól, közel az osztódás végéhez már csak egy vékony citoplazma híd tart kapcsolatot a leánysejtek között. Végül ez is megszűnik, az osztódás véget ér két új, önálló sejtet eredményezve.

Többen vizsgálták a 2A, 2B és 2C mennyiségét és szerepét osztódó sejtekben. Jana és mtsai A549 tüdő tumorsejtvonalon [3] Bao és mtsai pedig COS-7 embrionális vesesejtvonalon [5] nézték a fenti fehérjék eloszlását osztódó sejtekben. A tumorsejtekre a 2C1 izoforma volt legjellemzőbb, C0-ból alig, 2A és 2B-ből pedig közel azonos – alacsony – mennyiséget találtak. Meghatározták, hogy a 2A a leánysejtek két ellentétes pólusán mutatkozik meg nagy koncentrációban, míg a 2C inkább a citoplazmatikus hídban lokalizálódik. Ezen miozinok citokinézisben elfoglalt szerepének tisztázására izoforma-specifikus siRNS-eket juttattak a sejtekbe, kiütve ezzel a fehérjéket kódoló mRNS-eket. Ha a 2B-t ill. a 2C-t külön-külön kiütötték, csökkent a sejtproliferáció (2A-siRNS kicsi csökkenést okozott a sejtek számában) 2B esetén kevesebb, mint a felére, 2C esetén pedig kb. az ötödére! Vagyis ennek a két fehérjének a hiánya lényegesen csökkentette a sejtosztódás mértékét.

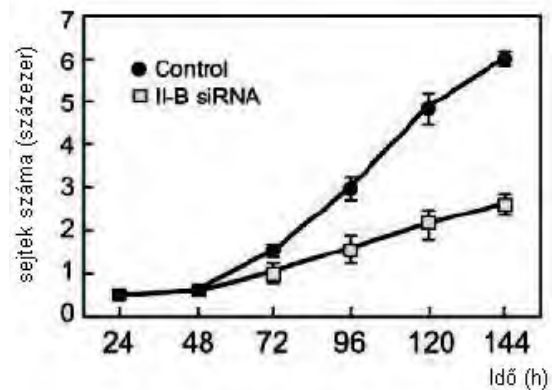


15. ábra: NM2A (GFP-vel jelölve - zöld) és NM2C (Alexa-594-gyel kapcsolva - piros) [3]



16. ábra: Az siRNS hatása NM2B esetén a sejtproliferációra [3]

izs  
gált  
ák  
azt  
is,

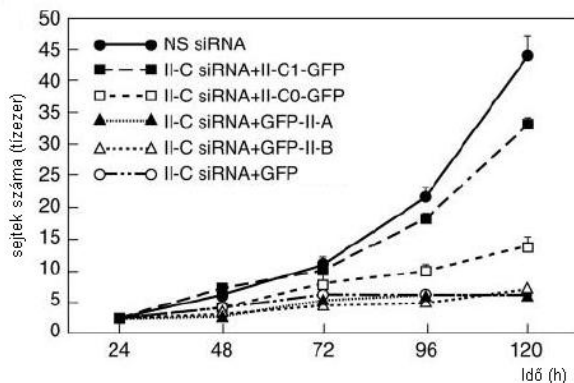


17. ábra: Az siRNS hatása a sejtproliferációra NM2A és 2C1 esetén [5]

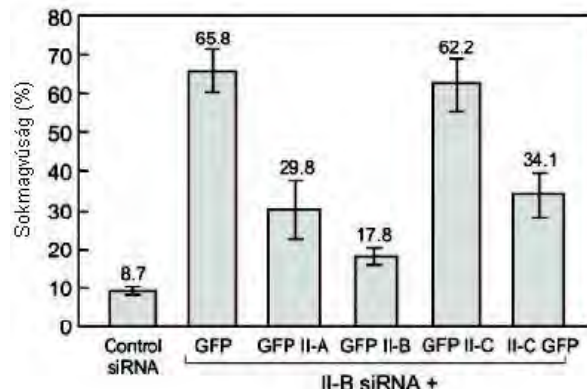
két fehérje hiánya sokmagvúságot eredményezett az osztódó sejtekben. A 2B hiánya 5-8-szor több sokmagvú sejthez vezetett, valamint ezek a sejtek nagy felületűek illetve nagyméretűek voltak, és hiányoztak belőlük a kortikális feszítő rostok.

Mind a proliferáció, mind a sokmagvúság kérdésekor felvetődött, hogy vajon egy másik izoforma helyreállítja-e az okozott hibát. A 2C hiányát nem tudta felülmenni egy később

hozzáadott másik izoforma, ha már a sejtproliferáció lecsökkent, ellenben a 2B-hiány okozta sokmagvúságon javított a 2C hozzáadása.



**18. ábra:** Hiányzó NM2C esetén milyen hatással van a proliferációra más bejuttatott izoforma [3]



**19. ábra:** Hiányzó NM2B esetén milyen mértékben csökkenti más izoformák bejuttatása a sokmagvú sejtek számát [5]

A citokinézis során történő változásokat úgy vizsgálták, hogy C1-re specifikus siRNS-t transzfektáltak A549 tumorsejtekbe, és figyelték a sejtosztódás lefolyását. Ezeknek a sejteknek az osztódása kb. 2 órát vesz igénybe. Azonban a transzfekeció hatására ez az idő ötszörösére nőtt, és hibásan folyt le. A citokinézis során kialakuló sejtosztódási gyűrű a kezelt sejtekben is kialakult, a hasadási árok megjelent, azonban széles maradt hosszú időn keresztül. A két keletkező sejt nem mutatott elülső-hátulsó polaritást és az osztódás során ellentétes irányultságot. A hasadási árok csak a 2. órában szűkült be, és a két sejt közötti citoplazmahíd csak a károsult sejtosztódás 10. órájában bomlott fel. Ebből az a következtetés vonható le, hogy a C1 a hasadási árok szűkítéséért és a citoplazmahíd visszahúzásáért felelős.

#### *Az NM2C patológiai vonatkozásai*

Az NM2C-t kódoló MYH14 gén nagy mennyiségben expresszálódik a belső fülben. A szervben belül a Corti-szervben, a csigavezetékben, a stria vascularis-ban, a Hensen- és a Claudius-sejtekben, valamint a külső sulcus sejtekben. A gén 4 különböző mutációja autoszómás domináns hallásvesztést okoz. Donaudy és munkatársai [24] 200, különböző európai országból származó emberek DNS-ét vizsgálták, a MYH14 génre és annak mutációira fókuszálva. 4 mutációt találtak, 1 nonszensz és 3 misszensz mutációt. A nonszensz mutáció a 20. pozícióban lévő citozint érinti, amely bázis helyett egy adenin épül be, ezzel a 7. pozícióban lévő szerin helyett stop kodon alakul ki, és a fehérjének csak az N-terminális vége képződik. Hatására az 1-2. évtizedben kezdődik a betegek hallásának károsulása, és a 4.

évtizedre súlyos szenzoneuronális siketség alakul ki. A vizsgált személyek egyazon nációba és egy rokoni ágba tartoztak, vagyis feltételezhető, hogy a mutáció öröklődik.

A misszensz mutációk jellegzetessége, hogy változó mértékű bilaterális, szenzoneuronális hallásvesztést eredményeznek. Ezek egyike a 2176. helyzetű citozint cseréli adeninre, ezzel a 726-os pozíciójú arginin helyett szerint kódol a kialakult hibás triplet. Enyhe, vesztibuláris károsulás nélküli siketséget okoz a vizsgált belga rokonság minden tagjában. Egy másik misszensz mutáció esetén a 1126. guanin helyett timin épül be, ezzel a 376-os pozíciójú glicin helyett ciszteint fog adni a kód – ez az aminosav a motor doménben található. Hatására az első évtizedben enyhe, bilaterális hallásvesztés alakul ki. Ebben az esetben a szülőket megvizsgálva kimutatták, hogy egyikük sem hordozza ezt a mutációt. A harmadik mutáció a miozin farokrégiójában okoz változást, a 2926-os citozin helyére timin épül, ezzel a 976-os leucin helyére pedig fenilalanin. Jellemzően enyhe bilaterális siketség alakul ki, ami apai ágon öröklődik.



## Anyakok és módszerek

### *Transzpozíció*

Az NM2C C0 és C1 S1 inszert pFastBac1 donor plazmidba való klónozását korábban témavezetőm végezte. Ezt a rekombináns plazmidot juttattuk DH10Bac Escherichia coli kompetens sejtbe (Invitrogen). [A kompetens sejt tartalmaz Bacmid mini-*att*Tn7 célhelyet, „*helper* plazmidot”. A transzpozíció a donor plazmid Tn7L része, a Bacmid mini-*att*Tn7 része és a „*helper* plazmid” segítségével jön létre transzpozíciós proteinek jelenlétében.] A membránba való bejutást hőshockkal értük el.

A -80 °C-on tárolt DH10Bac kompetens sejtek 100 µl-éhez 5 µl plazmid DNS-t adtunk (0.3 ng/ml). 30 percig jégen inkubáltuk, majd 42 °C-os vízfürdőben hőshockoltuk 45 mp-ig. 2 percig ismét jégen tartottuk. Ezután hozzáadtunk 900 µl S.O.C. médiumot (Invitrogen), majd 37 °C-on 225 rpm-mel rázattuk 4 órán át. Ezalatt a sejtekben átíródik a β-laktamáz géntől az ampicillin-rezisztenciához szükséges fehérje. A szuszpenzióból aztán hígítási sort készítettünk S.O.C. médiummal ( $10^{-1} \rightarrow 10^{-3}$ ), és szélesztettük 100 µl-jeit agarlemezre (10g/l pepton, 5g/l élesztő kivonat, 10 g/l NaCl, 12g/l agar, autoklávozás után hozzáadtunk: 50µg/ml kanamicin, 70 µg /ml gentamicin, 10 µg /ml tetraciklin, 100 µg /ml X-gal, 40 µg /ml IPTG). A lemezeket 24-48 órán át inkubáltuk 37 °C-on (amíg kinőttek a telepek). A fehér telepeket alkotó sejtekbe bejutott a plazmid, így azok képesek elbontani az X-gal-t (IPTG-vel indukáljuk a galaktózt bontó galaktozidáz termelődését).

Rekombináns Bacmid DNS izolálása: 2ml LB-médiumhoz hozzáadtunk 50 µg /ml kanamicint, 7 µg /ml gentamicint, 10 µg /ml tetraciklint, és ebbe leoltottunk steril pipettaheggyel 1-1 fehér kolóniát. Rázattuk 250 rpm-mel 24 órát 37 °C-on.

Az inkubáció leteltével 1.5 ml-t lecentrifugáltunk (14000xg, 1 perc), és a pelletet felvettük „Solution 1”-ben (15 mM Trisz-HCl – pH 8, 10 mM EDTA, 100µg/ml RNáz A molekuláris biológiai tisztaságú vízben – nukleáz-aktivitást gátló és RNS-t bontó oldat). Ezután hozzáadtunk 0.3 ml „Solution 2”-t (0.2 M NaOH, 1% SDS molekuláris biológiai tisztaságú vízben – dezintegrálja a membránokat, előidézve ezzel a sejtlyízist). Nagyon óvatosan összeszuszpendáltuk. 5 percig inkubáltuk szobahőn, ezalatt zavarossá vált. Hozzáadtunk 0.3 ml 3M-os K-acetátot (pH 5.5 – hatására a szolubilizált fehérjék, membrán törmelékek, valamint a genomiális DNS kicsapódik), óvatosan összekevertük, ami hatására sűrű lett a folyadék, majd 5-10 percre jégre tettük. Lecentrifugáltuk (14000xg, 10 perc), majd a felülúszót 0.8 ml abszolút izopropanolban feloldottuk óvatosan. Ismét jégre tettük 5-10

percre, majd ismét centrifugáltuk (14000xg, 5 perc). Ezután a pelletet szobahőn kiszárítottuk, majd feloldottuk 40 µl TE-pufferben (10 mM Trisz-HCl - pH 8.0, 1 mM EDTA). A kész rekombináns Bacmidot -20 °C-on tároltuk.

### ***Transzformálás ellenőrzése PCR-rel***

Ezzel az eljárással a kész Bacmidba beépült DNS jelenlétéről szeretnénk volna megbizonyosodni úgy, hogy felszaporítjuk biztosan kimutatható mennyiségűre, majd gélen láthatóvá tesszük. 6 db mintával dolgoztunk.

Összemérés:

5xGreen	10 µl
RunningBuffer	
dNTP mix	1 µl
upstream primer	2 µl
downstream primer	2 µl
Taq-polimeráz	0.25 µl
Templát DNS	2 µl
Molekuláris biol. víz	32.75 µl

**3. táblázat:** Bemérések az PCR-hez

A használt oligonukleotidok szekvenciái:

ST17: GCCCATGTGGCATCATCTCCA

ST18: CTCCCACGATGTAGCCAGCA

<b>Ciklusok</b>	<b>Hőmérséklet</b>	<b>Idő</b>	<b>Ciklusok száma</b>
1. denaturáció	96 °C	5 perc	1x
2. anelláció	53 °C	30 mp	25x
3. polimerizáció	72 °C	30 mp	
4. denaturáció	95 °C	45 mp	
5. befejezés	72 °C	5 perc	1x
6. tárolás	4 °C		

**4. táblázat:** A PCR menete

A kész mintákat 1.5 vegyes %-os agaróz gélen (0.375 g agarózt 25 ml TE-pufferben feloldottunk és hozzáadtunk 4 µl CyberSafe DNS-festéket) megfuttattuk.

### ***Transzfektálás***

Az elkészült Bacmid konstrukciókat transzfektáltuk *Spodoptera frugiperda* sejtekbe (Sf9 rovarsejtvonal). Ezt úgy értük el, hogy CellFectin reagenssel (Invitrogen) kezeltük a bacmideket, mely reagens mesterséges liposzómát hoz létre a DNS körül, így az átjut a rovarsejt membránján. A vírusok néhány nap alatt felszaporodtak. Az Sf9 sejttől elválasztva elkészítettük a P1 vírusnemzedéket, melyet tovább amplifikáltunk.

Menete: folyamatosan fenntartott Sf9 sejtekből 20 ml  $10^6$  sejt/ml sűrűségű szuszpenziót készítettünk. (A sejteket folyamatosan fenntartottuk, 3.5 naponta  $8 \times 10^5$  db/ml-es koncentrációra hígítottuk InsectExpress médiummal (Lonza), mely 0.5 vol/vol% penicillin-streptomycin (Sigma) tartalmazott, majd 27°C-on tartva 125 rpm-mel rázattuk a jó levegőzés érdekében). Ebben az esetben a kultúra a szokásos antibiotikumoknak csak a felét tartalmazta. 6-lyukú lemezre kitettünk 2-2 ml-t a fenti kultúrából (az egyik a negatív kontroll, a másikat fertőzzük bacmiddel), és egy órára 27 °C-os inkubátorba tettük, hogy a sejtek letapadjanak a lemez aljára. Ezalatt a vírusokhoz hozzáadtuk a CellFectin-t (5 µl bacmid, 190 µl antibiotikum nélküli tápoldat, 6 µl CellFectin reagens), és szobahőn állni hagytuk 45 percig (ezalatt létrejött a lipidmembrán a DNS körül) – az idő lejártakor hozzáadtunk 0.8 ml antibiotikum mentes tápoldatot. Miután a sejtek leültek, átmostuk őket antibiotikum nélküli tápoldattal, majd hozzáadtuk óvatosan - figyelve, hogy a sejtek ne jöjjenek fel – a CellFectin-nel kezelt vírusokat. Ezután 5 órán át 27 °C-os inkubátorba tettük, mialatt a vírus bejutott a sejtbe. 5 óra után leszívtuk a sejtekről a felülúszót és antibiotikumos táptalajt tettünk rájuk. Ismét 27 °C-os inkubáció következett 5-7 napig. Mikor a negatív kontrollhoz képest a letapadt sejtek láthatóan megfogyatkoztak és kerekesebbek lettek, leszívtuk róluk a felülúszót, ez lett a P1 vírusnemzedék. 2 vol/vol% FBS-t (Fetal Bovine Serum) adtunk hozzájuk, majd 4 °C-on tároltuk fénytől védve.

### ***Vírus amplifikálás***

P1 vírustörzsekből amplifikáltunk további – P2 illetve P3 – törzseket. 50 ml  $8 \times 10^5$  sejt/ml kultúrát megfertőztünk 1 ml P1 törzsszel, és 48 órán át inkubáltuk 27 °C-on, 120 rpm rázattal mellett. A fenti idő leteltével centrifugáltuk 1000 rpm-mel 2 percig, a felülúszó lett a P2 (ehhez aztán hozzáadtunk még 2% FBS-t, hogy tárolható legyen a készítmény 4 °C-on). További szaporítás céljából – P3 készítése – 100 ml  $8 \times 10^5$  sejt kultúrát oltottunk be 2 vol/vol% P2-vel, a fentiekhez megegyezően inkubáltuk, centrifugáltuk és tároltuk.

### ***Fehérjeexpresszió ellenőrzése Western Blot-tal***

*Western Blot*: a vírus fertőzőképességét ill. az expresszió sikerességét ellenőrizzük Western blot eljárással. A módszer lényege: az akrilamid gélben megfuttatott fehérjét átvisszük az előző irányra merőleges futtatással egy nitrocellulóz membránra. A membránon lévő fehérjéhez specifikus ellenanyagot kötünk, majd egy erre az ellenanyagra specifikus ellenanyagot adunk hozzá. Western Blue előhívó festék az utolsó komponens, mely színreakcióval jelzi a membránon a fehérje jelenlétét. Meghatározható vele a fehérje jelenléte (igen érzékeny eljárás, már nM-os mennyiséget is kimutat) és mérete (viszonyításként olyan létrát is felviszünk a géltre, aminek csíkjai ismert tömegeket jelölnek).

A vírus fertőzőképessége: 25 ml  $8 \times 10^5$  sejt/ml koncentrációjú (InsectExpress médiummal hígított) sejtszuszpenziót 1, 3, 10 % P3 vírussal megfertőztünk. 3 napig 27 °C-on, 125 rpm-mel rázattuk. Ezután lecentrifugáltunk belőlük 1 ml-t (1000rpm, 2 perc), és 0,2 ml PBS-ben (0.14 M NaCl, 0.27 mM KCl, 10.1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.18 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.3) felvettük (így ötszörös töménységű mintákat készítettünk). Ehhez hatszoros hígításban SDS-kezelőt adtunk, majd 1 percre forraltuk a mintákat. A sejtek fehérjetermelését és ezzel a sejtekhez adott optimális vírusedményiséget a címben szereplő eljárással néztük.

Poliakrilamid gélelektroforézissel futtattuk a mintákat 200 V-on 1 órát SDS-pufferben. A nitrocellulóz membránra való átblottolás 1:5 arányú metanol:trisz-glicin (trisz-glicin puffer: 3 g/l Trisz, 14.4 g/l glicin, pH 8.3), elegyben történt 40 V-on 50 percig. A membránt 15 percig 2 vol/vol %-os BSA-oldatban inkubáltuk, hogy a BSA a nem specifikus kötőhelyeket lekösse. Ezután hozzáadtuk a membránhoz az elsődleges ellenanyagot (antiMouse IgG – 10000-szeres hígításban), és 1 óráig hagytuk állni, hogy létrejöjjön a kötés. TBS+Tween-es (6 g/l Trisz pH 8, 8.8 g/l NaCl, 0.5 ml/l TWEEN-20) (mosások után hozzáadtuk a másodlagos ellenanyagot (szintén 10000-szeres hígításban), ezzel fél órát hagyjuk inkubálódni. Ismételt mosások után Western Blue reagenssel hívtuk elő a fehérjét.

### ***Fehérjeexpresszió***

Az expressziót 3-5 l  $2 \times 10^6$  sejt/ml sűrűségű sejt kultúrával végeztük. Ezt fertőztük az előzőleg meghatározott vírusedménnyiséggel (általában 3 vagy 5 vol/vol%-kal), valamint BLC vírust (a könnyű láncokért felelős) is adtunk hozzá 1%-ban. 3 napig 27 °C-on 125 rpm-mel rázattuk. Az expresszió levétele: 10 percig 6000 rpm-mel centrifugáltuk, majd a sejt pelletet PBS-sel mostuk kétszer (közben centrifugálás ugyanazon kondíciók mellett). Végül a sejt pelletet folyékony nitrogénben fagyasztottuk, és -80 °C-on tároltuk.

### ***Rekombináns NM2C-S1 preparálása FLAG-affinitás kromatográfiával***

A rekombináns DNS-technológiával előállított fehérje FLAG-affinitás-címkével rendelkezik a C-terminális végén. A címkét jelölő DNS-szakasz a fehérjét kötő régióhoz van kötve, és a fehérje „részeként” expresszálódik. Az affinitás kromatográfia során használt mikrogyöngyökhöz FLAG-antitest van kötve, ami specifikusan köti a FLAG-gel összekötött motorenzimet, ezáltal az NM2C elválasztható az egyéb sejttermeléstől. Miután minden felesleges szennyeződést lemostunk az oszlopról, nagy töménységű FLAG-peptiddel szorítjuk le a preparálni kívánt fehérjét. A technikával más fehérjéktől mentes eluátumot kapunk.

A lefagyasztott sejteket (amiben előzőleg a kívánt fehérjét termeltettük) jégen extrakciós pufferben felolvasztottuk (10 mM HEPES pH 7.3, 500 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 3mM NaN<sub>3</sub>, 0.1 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 1 mg/l leupeptin, 2 mM ATP). A proteázgátló PMSF és leupeptin azért szükséges, hogy a feltárás során kiszabadult emésztőenzimek ne emésszék el a preparálandó fehérjét; az ATP hatása pedig, hogy a miozin leválik az aktinról, ezáltal elválik az egyéb sejttermeléstől. Potterrel homogenizáltuk, majd folyamatosan mintát véve és figyelve mikroszkópban a sejtek lízisét - szonikáltuk. Miután a sejtek feltáródtak (kivettünk 50 µl mintát – ezt S1-nek (sample 1) neveztük, kezeltük SDS-kezelővel, hogy később Western blottal kimutathassuk a fehérjemennyiséget, ill. a veszteséget a preparálás egyes lépéseinél), lecentrifugáltuk – 15 perc, 20 000 rpm, 4 °C. A felülúszóhoz (melyből a fenti módon mintát vettünk – S2) hozzáadtuk 1.5 ml FLAG affinitás gyantát (Sigma), és egy éjszakán át forgatva kevertettük 4 °C-on, míg a gyöngyökhöz hozzákötött a miozin. A kevertetés után lecentrifugáltuk (1000 rpm, 4 perc, 4 °C) (és mintát vettünk a felülúszóból – S3) – ha a fehérje jól kötött a gyantához, a felülúszóban minimális a mennyisége. A gyantát átmostuk kétszer Mary+ATP pufferrel (10 mM HEPES pH 7.2, 0.1 mM EGTA, 3 mM NaN<sub>3</sub>, 0.5 M NaCl, 0.1 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 1 mg/l leupeptin, 1 mM ATP, 5 mM MgCl<sub>2</sub>). Ezután a gyantát kromatográfiás oszlopba töltöttük, majd mostuk egy oszloptérfogat Mary+ATP pufferrel, aztán 3 oszloptérfogat 80%:20% arányú HMM puffer : Mary pufferrel (HMM puffer: 10 mM HEPES pH 7.2, 0.1 mM EGTA, 3 mM NaN<sub>3</sub>, 0.1 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 1 mg/l leupeptin). (A mosások után vett minta az S4.) Az eluálást 10 ml 0.3 mg/ml kompetitív FLAG-peptiddel végeztük (beoldás 80%:20% - HMM:Mary); rátöltöttük az oszlopra, negyedórát állni hagytuk, majd 1 ml-es frakciókat szedtünk. A frakciókat Bradford-reagenssel vizsgáltuk, azonosítva ezzel azokat a frakciókat, melyekben hasznosítható mennyiségű fehérje van. Ezeket aztán Q-sepharose ioncserélő oszlopon (GE Healthcare) koncentráltuk: kis ionerőjű pufferben vittük fel (80%:20% HMM:Mary), hatására kikötött a gyöngyökhöz a fehérje, majd nagy ionerejű Mary-pufferrel eluáltunk 300 µl-es

frakciókat szedve. Ismételt Bradford-os ellenőrzés után a használható frakciókat dializáltuk (egész éjszakán át 1 l Mary-puffer + 1 mM DTT, majd 3 órán át 1 l HMM-puffer + 100 mM KCl + 1 mM DTT). A dialízis alatt a jelenlévő ATP, a FLAG peptid, valamint a felesleges sók eltávoznak. A fehérjét gyorsfagyasztottuk és folyékony N<sub>2</sub>-ben tároltuk.

### ***F-aktin preparálás***

Az aktint előre elkészített „aktin szárazporból” Spudich és Watt módszere alapján készítettük [25]. A felolvasztott G-aktin-t 40 krpm-mel 90 percig 4 °C-on ultracentrifugáltuk, ezzel a felülúszóban csak tiszta monomerek találhatók. F-aktin pufferben (4 mM HEPES pH 7.1, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 3 mM NaN<sub>3</sub>) egy éjszakán át dializáltuk. Az előbbi feltételekkel ismét centrifugáltuk, ez esetben a pellet maga az F-aktin volt. A csapadékot feloldottuk 8 ml F-aktin pufferben, és ismét dializáltuk egy éjszakán át. Végül fotométeren meghatároztuk a koncentrációját 290 nm-en. A kísérletekben az F-aktint 1,5-szeres moláris feleslegben hozzáadott falloidinnel stabilizáltuk.

### ***Fluoreszcencia spektroszkópia***

A konstrukciók Trp fluoreszcenciáját SPEX 320 fluoriméteren mértük. A gerjesztést 297 nm-en végeztük 10 mm-es küvetával 4 mm résszélességgel, és az emittált fényt 310 és 430 nm között detektáltuk. Lemértük a nukleotidmentes (*apo*) enzimet, majd ADP-kötött és ATP-kötött változatát. Bemérés: 1 μM enzim, 100 μM ADP és 1 mM ATP, 200 μl végtérfogat SF pufferben (20 mM HEPES, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM EGTA + 50 mM KCl).

### ***Steady-state ATPáz aktivitás mérése***

A kísérlet során a miozin ATPáz aktivitása vizsgálható meg arra a tényre alapozva, hogy a miozin aktivitásának függvényében hidrolizálja az ATP-t. A mérést aktin távollétében (bazális ATPáz aktivitás) illetve aktinnal titrálva (aktin-aktivált ATPáz aktivitás) is elvégeztük. Kapcsolt reakciót alkalmaztunk, mely szerint az alábbi enzimek az alábbi reakciókat katalizálják:

Miozin	ATP → ADP + Pi
Piruvát-kináz (PK)	ADP + PEP → ATP + piruvát
Laktát-dehidrogenáz (LDH)	piruvát + NADH → tejsav + NAD

**5. táblázat:** A kapcsolt reakciók

Összességében tehát az ATP hidrolízisének ADP terméke fog a kapcsolt reakcióban tovább lépni, melynek köztes terméke a piroszőlősav, melynek révén a reakcióhoz adott NADH NAD-dá oxidálódik. A NADH fogyását detektálja a spektrofotométer 340 nm-en. A fogyási görbe meredekségéből számítható a miozin aktivitása az alábbi összefüggés alapján:

$$\text{Aktivitás (átviteli szám)} = \text{meredekség [dABS}_{340}/\text{dt}] / (\epsilon_{\text{NADH}, 340} \times c_{\text{miozin}}) \text{ vagyis}$$

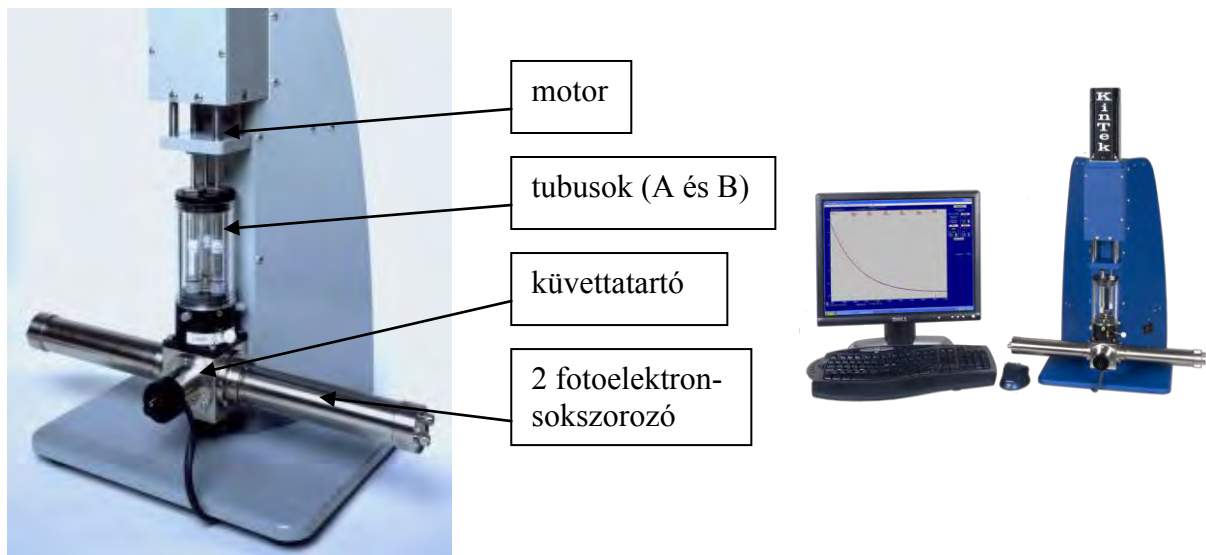
$$\text{Aktivitás} = \text{meredekség [mABS/s]} / 0,00622 \times c_{\text{miozin}} [\mu\text{M}]$$

Bemérések 1 ml mintába:

- SF-puffer
- 20 egység/ml laktát-dehidrogenáz
- 14 egység/ml piruvát-kináz
- 200 mM NADH
- 1 mM PEP
- 1 mM DTT
- 1 mM ATP
- 20 mM KCl
- 1  $\mu$ M miozin

### ***Tranziens kinetikai mérések***

E kísérleteket KinTek SF 2004 gyorskinetikai (stopped-flow) műszerrel végeztük. A műszer sémája szerint a két tubusba betöltött reagensek a dugattyú lenyomásakor a küvettába kerülnek, a reakciót fotoelektron-sokszorozóval detektáljuk. A reakció időbeli lefutása kb. 1 ms holtidővel online követhető.



20. ábra: Stopped-flow műszer (www.kintek-corp.com)

A kísérletekben az aktinmentes illetve aktinkötött NM2C konstrukciók nukleotidkötését vizsgáltuk mant-dezoxi-ATP és mant-dezoxi-ADP fluoreszcens nukleotidokkal. E nukleotidok fluoreszcenciája a miozinhoz való kötődés során megnő, illetve arról disszociálva lecsökken. A fehérje Trp-jait gerjesztve 280 nm-en energiáttranszfer útján a fluoreszcens nukleotidok is gerjesztődnek. Vagyis, ha a Trp-t gerjesztjük, és fluoreszcensen jelölt nukleotid van a miozin nukleotid kötőzsebében, arra áterjed a Trp-ok energiája, és fluoreszcens jelet fog adni. Az emittált fényt 420 nm-es felülateresztő szűrővel detektáltuk. A méréseket SF pufferben végeztük, 20 mM KCl mellett 25 °C-on.

Bemérések:

NM2C0 mant-dezoxi-ATP kötés:

A tubus: 0,5  $\mu\text{M}$  enzim

B tubus: mant-dezoxi-ATP emelkedő koncentrációban (2.5-100  $\mu\text{M}$ )

NM2C0 mant- dezoxi-ADP kötés:

A tubus: 0,5  $\mu\text{M}$  enzim

B tubus: mant-dezoxi-ADP emelkedő koncentrációban (2.5-100  $\mu\text{M}$ )

NM2C1 mant-dezoxi-ATP kötés:

A tubus: 0,2  $\mu\text{M}$  enzim

B tubus: mant-dezoxi-ATP emelkedő koncentrációban (2.5-100  $\mu\text{M}$ )

(1:1 arányú nukleotid és enzim keverésével mindkettő koncentrációja feleződik.)

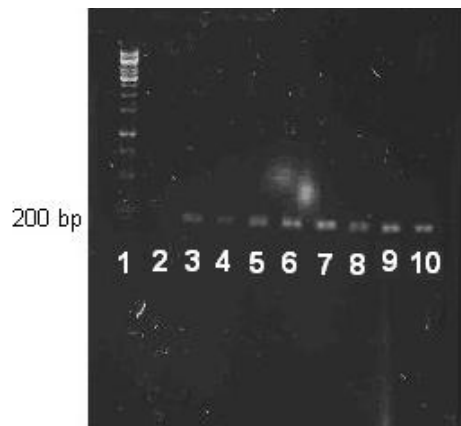
A kísérleteket a KinTek szoftver és az Origin 7.0 (Microcal Corp.) segítségével értékeltük.



## Eredmények és megbeszélésük

### *Transzpozíció*

A transzpozíció sikerességét PCR-technikával ellenőriztük. A PCR-termékeket pozitív és negatív kontroll, valamint DNS-létra mellett agaróz gélen megfuttattuk. Kb. 200 bázispárnyi terméket vártunk, mely meg is jelent minden minta esetén, vagyis tartalmazzák a rekombináns DNS-t. Tehát a transzformálás sikeres volt.



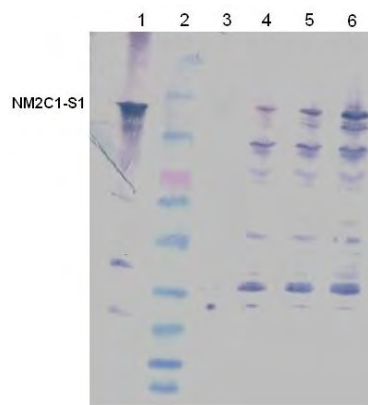
21. ábra: A PCR termékek gélképe

Mintasorrend:

1. létra - 1kb DNA Ladder – GeneRuler
2. negatív kontroll – nem tartalmaz templát DNS-t
3. pozitív kontroll – NM2C Bacmid
4. → 9.: 6 db minta az elkészített 6 párhuzamosan készített NMIIC Bacmid
10. pozitív kontroll – a transzformálás kiindulópontja – pFastBac NM2C1 plazmid

### *Expresszióhoz szükséges vírusrészecske optimalizálása Western Blot analízissel*

Az expresszióhoz szükséges vírus fertőzési fokot Western blot eljárás alapján határoztuk meg. 1, 3 és 10 vol/vol% vírussal fertőztünk Sf9 sejteket. Az előhívott membránon látszik, hogy 1%-os vírus esetén nagyon kevés fehérjét expresszál a sejt. 10 vol/vol%-os vírusrészecske mennyiséget nem szoktunk használni, mert összességében 5 vol/vol%-os fertőzéssel több fehérje termelhető le többször, mint egyszeri 10 vol/vol%-os fertőzéssel. Így a fertőzést 5 vol/vol%-os vírusrészecske mennyiségnek határoztuk meg.



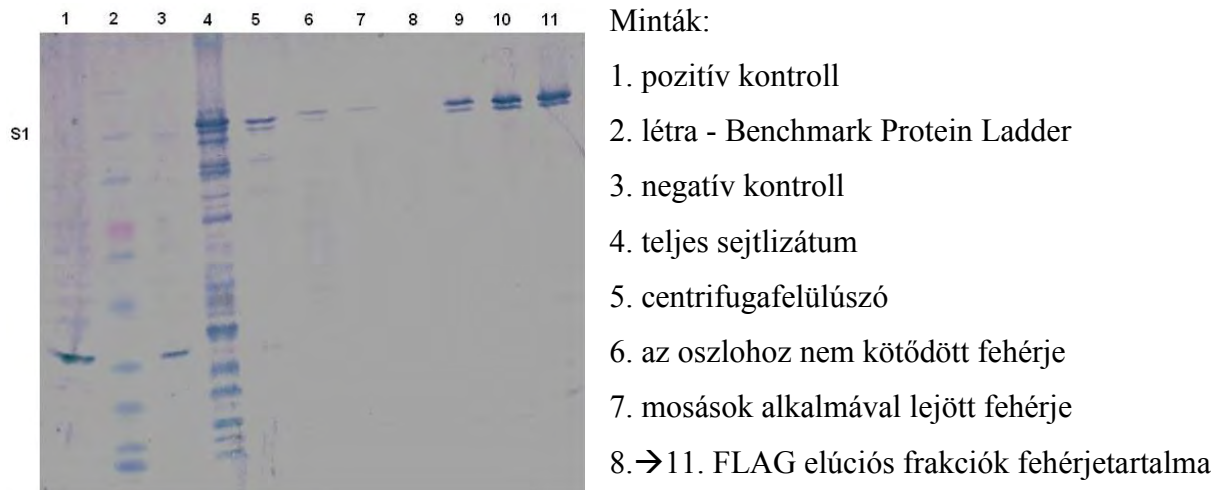
22. ábra: A Western blot képe

Mintasorrend:

1. pozitív kontroll
2. létra – Benchmark Protein Ladder
3. negatív kontroll
4. 1 vol/vol% vírusrészecske mennyiség esetén az expresszió
5. 3 vol/vol% vírusrészecske mennyiség esetén
6. 10 vol/vol% vírusrészecske mennyiség esetén

### ***FLAG-affinitás oszlopkromatográfia***

FLAG-affinitás oszlopkromatográfias eljárással végzett fehérjepreparálás után Western blot analízissel ellenőriztük, hogy a tisztítás során hol veszítettünk a kívánt fehérjéből. Látszik, hogy a teljes sejtlizátum nagy mennyiségben tartalmazza az S1 konstrukciót. Centrifugálás során távolítjuk el a sejtörmelékét, és az ennek során keletkezett felülúszóban szintén ott van a konstrukciónk. Azonban sajnos a gyantához nem kötődött frakcióban is jelen van és az oszlop mosása során is veszítünk belőle egy keveset.

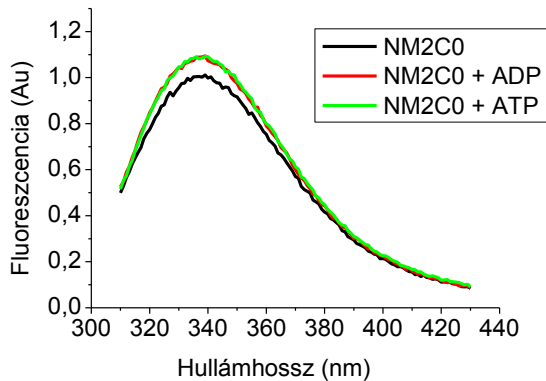


**23. ábra:** FLAG-affinitás oszlopkromatográfia során az egyes lépések vett mintákból készített Western blot

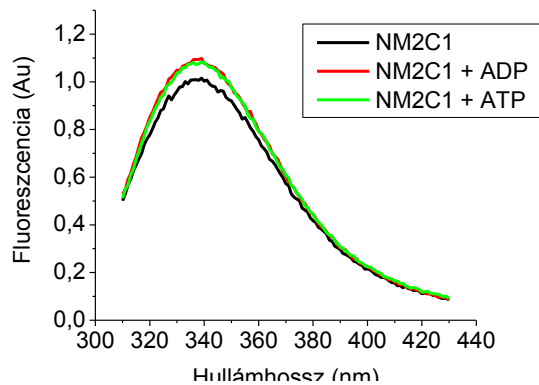
### ***Triptofán fluoreszcencia-változás nukleotidkötés hatására***

Az általunk vizsgált S1 konstrukciókban 5 db triptofán található. Ha 297 nm-en gerjesztjük ezeket az aminosavakat, fluoreszcens fényt fognak emittálni, amit 310 és 430 nm között mérhetünk fluoriméteren.

Abból a tényből indultunk ki, hogy a korábban vizsgált miozinok esetén a nukleotidkötő zseb térszerkezete megváltozik nukleotidkötés hatására, és ez a konformáció-változás a relé-konverter régióra is áttérjed. Ennek eredményeképp az itt található Trp környezete megváltozik, a fluoreszkáló aminosav takarásba kerül – vagy épp kikerül onnan - ezáltal fluoreszcencia változás tapasztalható. ADP hatására kicsi, ATP hatására nagy emelkedést várunk, mivel az erőkar felhúzott állapotú lesz, amely szerkezeti változástól emelkedettebb fluoreszcenciát várunk [26].



24. ábra: NM2C0 spektruma



25. ábra: NM2C1 spektruma

Konstrukció	Trp-fluoreszcencia változás ADP hatására (%)	Trp-fluoreszcencia változás ATP hatására (%)
C0	8 %-os emelkedés	8 %-os emelkedés
C1	9 %-os emelkedés	7 %-os emelkedés

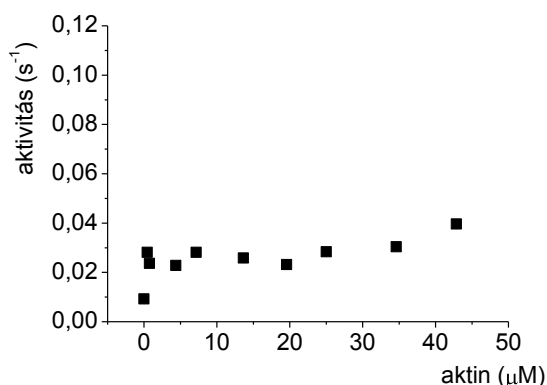
6. táblázat: Fluoreszcencia emelkedés %-ban kifejezve nukleotidok hatására

Mind ADP, mind ATP hatására valóban, 7-9%-os fluoreszcencia-intenzitásnövekedés jelentkezett. Érdekes, hogy az emelkedés foka hasonló a két nukleotid esetén, más miozinoknál lényeges különbség figyelhető meg közöttük. Miozin-X esetében ADP hatására 6 %-os, míg ATP hatására 20 %-os emelkedés volt megfigyelhető [27].

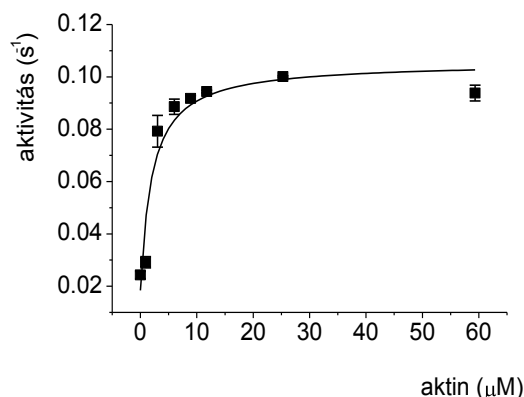
Mindez arra enged következtetni, hogy ATP-t kötve sem domináns a felhúzott erőkarú állapot. Az ADP- és ATP-kötött konformáció nem különbözik lényegesen egymástól, mégpedig azért, mert ATP hatására sem húzódik fel akkora mértékben az erőkar, mint más miozinok esetében. Mélyebb következtetéseket csak további vizsgálatokból lehet levonni.

### **Bazális és aktin-aktivált ATPáz aktivitás**

NM2C0 és C1 esetén is megmértük a bazális (aktin nélküli) és aktin-aktivált ATPáz aktivitást. Az aktin-aktivált mintánál kapott aktivitás-értékeket korigáltuk az aktin "háttér" (miozin távollétében mérhető) ATPáz aktivitásával. Az aktin koncentráció függvényében a görbe telítést mutat ( $V_{max}$  érték). Az az aktin koncentráció, melyen az ATPáz aktivitás fele a maximálisnak, a  $K_{ATPáz}$  paramétert adja.



26. ábra: NM2C0 aktin-aktivált ATPáz aktivitása



27. ábra: NM2C1 aktin-aktivált ATPáz aktivitása

NM2C0 esetén alig tapasztaltunk aktin-aktivált ATPáz aktivitást. A bazális aktivitáshoz képest alig kétszeres emelkedés tapasztalható. A C1 esetén ötszörös növekedést mértünk, ami még mindig alacsony érték, de a C0-hoz viszonyítva legalább már egyértelműen megjelenik. Ismételt mérések szükségesek, hogy megbizonyosodjunk az eredmény helyességéről.

Összehasonlítva más miozinokkal:

Konstrukció (S1)	Bazális ATPáz aktivitás ( $s^{-1}$ )	Maximális aktin-aktivált ATPáz aktivitás ( $V_{max}, s^{-1}$ )	$K_{ATPáz}$ ( $\mu M$ )
NM2C0	0.0093	nem értelmezhető	nem értelmezhető
NM2C1	0.024	0.10	1.91
NM2B	0.007	0.13	59
NM2A	0.13	0.17	72
gyors vázizom miozin	0.06	29	18
szívizom miozin	0.04	4.2	58
sima izom miozin	0.06	0.7	59

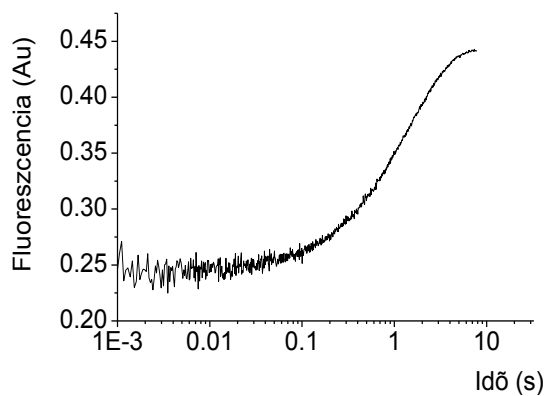
7. táblázat: Az általunk mért paraméterek összehasonlítása más miozinokkal [28]

A 7. táblázatból látható, hogy a felsorolt fehérjék mindegyikének alacsony a bazális ATPáz aktivitása. A steady-state maximális aktin-aktivált ATPáz aktivitásuk között azonban lényeges különbségeket láthatunk. A gyors vázizom miozinhoz képest a három NM2 izoforma két nagyságrenddel lassabb. Az NM2-k alapvetően gyengén aktiválódnak aktinnal, a 2C is alacsony  $V_{max}$  értékkel bír. A  $K_{ATPáz}$  értékekről: a C1 konstrukció esetében nagyon alacsony értékeket mértünk, a görbe nagyon meredeken fut felfelé, vagyis nagyon kicsi aktin koncentrációnál a miozin molekulák fele telítve van aktinnal, és maximális sebességgel végzik ciklusukat. A C1 ebből a szempontból nagyon különbözik a többi NM2-től, amelynek

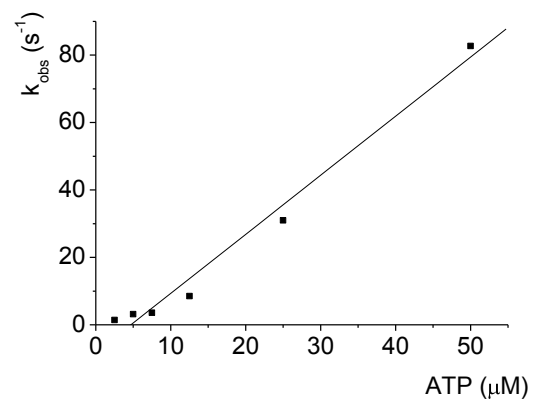
$\sim 50 \mu\text{M}$  a  $K_{\text{ATPáz}}$ -uk. Az, hogy a C1-hez tartozó érték kisebb, arra enged következtetni, hogy vagy nagyobb az affinitása a gyenge aktinkötő állapotban, mint más miozinoknak, vagy van egy lassú lépés erős aktinkötő állapotban, mely sebesség meghatározóvá válik már kis aktin koncentráció mellett. Ilyen lehet például az ADP felszabadulása. A leírtak szilárd alátámasztására azonban további mérésekre van szükség.

### Tranziens kinetikai mérések

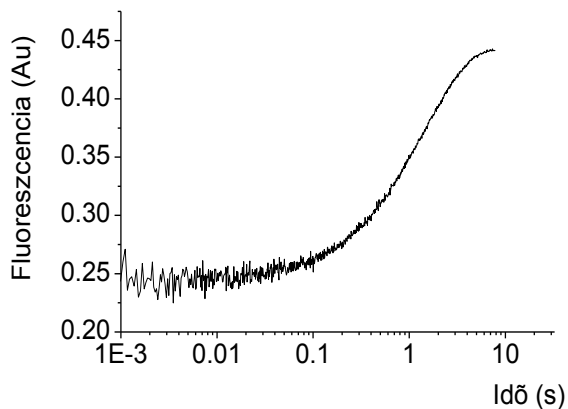
#### Mant-dezoxi-ATP kötés



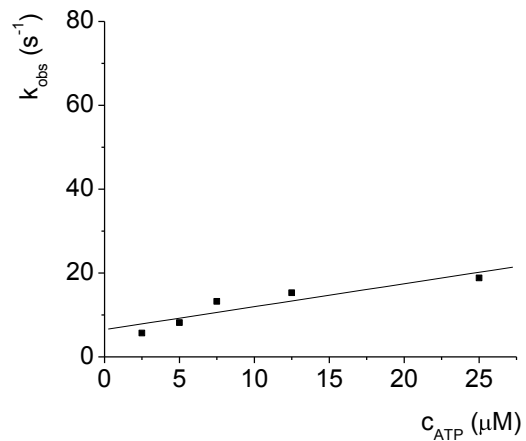
**28. ábra:** NM2C0 esetében  $2,5 \mu\text{M}$  mant-dATP bekötése által okozott fluoreszcencia-változás az idő függvényében (átlagolt mérés)



**29. ábra:** NM2C0 - Az egyes mant-dATP koncentrációkhoz tartozó látszólagos sebességi állandók ábrázolása



**30. ábra:** NM2C1 esetében  $2,5 \mu\text{M}$  mant-dATP bekötése által okozott fluoreszcencia-változás az idő függvényében (átlagolt mérés)



**31. ábra:** NM2C1 - Az egyes mant-dATP koncentrációkhoz tartozó látszólagos sebességi állandók ábrázolása

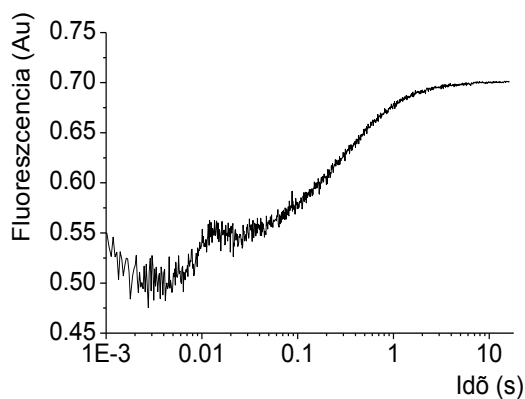
Összehasonlító adatok más NM2-kel:

Konstrukció (S1)	$k_{on}$ ( $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )
NM2C0	1.75
NM2C1	0,55
NM2A	1.03
NM2B	0.65

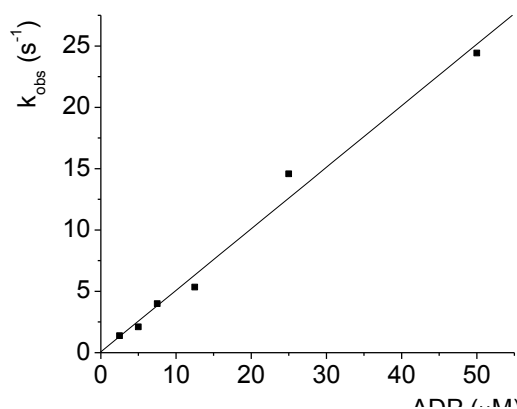
8. táblázat: NM2 izoformák (S1 konstrukció) ATP kötésének sebességi állandói [8, 28]

A miozint pseudo-elsőrendű körülmények között összekevertük ötszörös feleslegben mant-dezoxi-ATP-vel. A kapott tranziensekhez egyfázisú exponenciális függvényeket illesztettünk, melyeknek  $k_{obs}$  (megfigyelt sebességi állandó) értékeit az ATP koncentráció függvényében ábráztuk. A pontokra illesztett lineáris függvény meredeksége megadja a kötés sebességi állandóját ( $k_{on}$ ). Az y-tengelymetszet a disszociációs sebességi állandót adja ( $k_{off}$ ). Ennek értéke a 0-tól nem különbözik szignifikánsan, vagyis a kötés kvázi irreverzibilis, így a  $k_{off}$ -ot nem értelmeztük.

#### Mant- dezoxi-ADP kötés



32. ábra: NM2C0 esetében 2,5 $\mu\text{M}$  mant-dADP bekötése által okozott fluoreszcencia-változás az idő függvényében (átlagolt mérés)



33. ábra: NM2C0 - Az egyes mant-dADP-koncentrációkhoz tartozó látszólagos sebességi állandók ábrázolása

A mant-dezoxi-ADP kötés sebességi állandója  $0,50143 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$  -nak adódott. Az NM2A és -B  $k_{on}$ -ja is hasonló értéket mutat (2A: 0.55, 2B:  $0.81 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$  [1,4]).

Azonban nagyon kicsi a  $k_{off}$ -ja (az ADP leválás sebességi állandója), ami számunkra meglepő volt. Eszerint nagyon lassan engedi el az enzim az ADP-t, vagyis nagy az ADP-affinitása.

## Konklúzió

Munkánk célja az volt, hogy az NM2C két splice-formájának S1 kontrukcióját előállítsuk, majd steady-state és tranziens kinetikai mérések révén minél jobban megértsük működését.

Az NM2C fehérjét kis koncentrációban, de aktív formában sikerült létrehozni.

Az elvégzett steady-state és tranziens kinetikai mérések alapján a következő megállapításokat tehetjük:

- nukleotidkötés hatására a fehérje konformáció-változáson megy át, azonban az ATP- és ADP-kötött szerkezet között nincs nagy különbség. Ezt azzal magyaráztuk, hogy ATP-t kötve sem húzódik fel annyira az erőkar, hogy az lényegesen eltérjen az ADP-kötött állapottól, mely nem jellemző általánosan a miozinokra.
- aktin-aktivált ATPáz aktivitásuk nagyon alacsony értéknek adódott, melynek oka, hogy az aktin nagyon gyengén aktiválja az NM2C-t. Ugyanakkor nagyon kicsi aktin koncentrációnál telítődik a miozin molekulák fele. Ebből arra következtetünk, hogy vagy nagy az enzim aktin affinitása gyenge aktinkötő állapotban, vagy van egy, a többihez képest lényegesen lassabb sebességű lépés kis aktin koncentrációnál erős aktinkötő állapotban.
- az ATP-kötés az NM2C esetében irreverzibilis, mint általában a miozinoknál. Az ADP-kötésből pedig arra következtetünk, hogy az ADP felszabadulása kinetikailag lassú folyamat, ezáltal az ADP affinitás magasnak várható. A nukleotidok kötésének sebessége az NM2-ekre jellemző értékkel rendelkezik.

Feltételezéseink alátámasztására további vizsgálatokra és mérésekre van szükség.

## Összefoglalás

Vizsgálatunk tárgya, a nem-izom miozin 2C a gerincesekben általánosan előforduló motorfehérje. Mint minden miozin, az NM2C is ATP hidrolíziséből származó energiát alakít át mechanikai munkává, mellyel az aktinon elmozdul.

Az NM2C eloszlásáról tudjuk, hogy szervszinten főként az agyban és a tüdőben [7], míg sejtszinten az osztódó sejtek között kialakult citoplazma hídban lokalizálódik [3]. Fő fiziológiás szerepe a citokinézis során a leánysejtek szétválasztása. Patológiai vonatkozásai jelentősek, mutációi autoszómás domináns siketséghez vezetnek [24], valamint a fehérje tumorsejtekben jelentősen nagy mennyiségben van jelen [3]. Az NM2C-nek három természetes splice-formája ismeretes, a C0, a C1 (8 aminosavnyi inszertet tartalmaz az ATP kötőhely közelében), a C2 (41 aminosavnyi inszert az aktinkötő hely közelében), valamint egy C1C2 kísérleti konstrukció, mely mindkét inszertet tartalmazza [1].

Munkánk során megkezdtük az NM2C0 és C1 szolubilis, egyfejű S1 konstrukció enzimatis paramétereinek kinetikai karakterizálását. Az S1 konstrukción a kinetikai tulajdonságok egyértelműbben vizsgálhatók, mint a korábban már karakterizált kétfejű (HMM) konstrukciókon.

Az általunk előállított NM2C két splice-formájával fluoreszcencia spektroszkópiai, steady-state és tranziens kinetikai méréseket végeztünk. Eddigi eredményeink alapján elmondható, hogy a kétféle nukleotid kötése nem változtatja meg az erőkar helyzetének konformációját. Továbbá vagy nagyobb az NM2C aktin affinitása gyenge aktinkötő állapotban, mint más miozinok esetén, vagy már kis aktin koncentrációnál sebesség-meghatározó lépéssé válik egy olyan állapot, melyben az NM2C erősen köti az aktint. A nukleotidok kötésének tranziens vizsgálataiból arra következtetünk, hogy egyrészt az ATP kötése irreverzibilis, másrészt mivel az ADP valószínűsíthetően rendkívül lassan disszociál az NM2C-ről, az enzim ADP affinitása magasnak jósolható. Az ATP- és az ADP-kötés sebessége az NM2-re jellemző értékekkel rendelkezik.

Eredményeink elősegítik az NM2C enzimatis ciklusának mélyebb megértését, ezen keresztül a fehérje fiziológiai szerepének felderítését.



## **Summary**

The object of our study is the non-muscle myosin 2C, which is a ubiquitous motor protein in vertebrates. As every myosin, NM2C hydrolyses ATP to convert chemical energy into mechanical work to fuel translocation along actin filaments.

We know that the expression of NM2C is most abundant in the brain and lung among the investigated organs. At the level of cells it is localised in the cytoplasmic bridge of the proliferating cells. Its major physiological role is to separate the nascent daughter cells. The NM2C's pathological role is also important: its mutations lead to autosomal dominant hearing impairment or loss, in tumor cell lines the protein is present in large amounts. The NM2C has three natural alternatively spliced isoforms, the non-inserted C0 isoform, the C1 isoform inserted by 8 amino acids into loop-1 (near the ATP-binding region), the other isoform (C2) inserted by 41 amino acids into loop-2 (near the actin-binding region), and also exists an artificial construction (C1C2), which contains both inserts.

In our work we began the kinetic characterization of the soluble, one-headed subfragment-1 (S1) of NM2C0 and C1 isoforms. Kinetic parameters can be investigated easier on the S1 fragments than on the earlier described two-headed (HMM) constructions.

We produced the NM2C0 and C1 isoforms, and examined these myosins by fluorescent spectroscopic, steady-state and transient kinetic methods. Present results suggest the two different nucleotides (ADP and ATP) do not change the conformation of the position of the lever-arm. Additionally the steady-state actin-binding measurements support two possible hypotheses: actin affinity of NM2C in weak actin binding state is stronger than in other myosins, OR at low actin concentrations a strong actin binding NM2C state becomes the rate-limiting step. From the transient measurements of nucleotide binding we can draw the following conclusions: ATP-binding is irreversible; presumably ADP dissociates very slowly from the NM2C.ADP complex therefore NM2C expected to possess high ADP affinity. ATP- and ADP-binding rates of NM2C have similar values as other non-muscle myosin isoforms.

Our results can be utilized in the understanding of the enzymatic cycle of NM2C, and contributing the exploration of this myosin's physiological role.

## **Köszönetnyilvánítás**

Legelőször szeretnék köszönetet mondani Témavezetőmnek, Dr. Kovács Mihálynak, aki elindított a kutatói pályán. Hozzáértéssel és támogatással, valamint odafigyeléssel és türelemmel segített végig a munkámban és válaszolta meg kérdéseimet. Köszönettel tartozom még Prof. Gráf Lászlónak és Dr. Nyitray Lászlónak, akik lehetőséget adtak a Biokémiai Tanszéken, hogy elkészülhessem ez a dolgozat. Külön köszönet minden labortársamnak, név szerint: Gervai Juditnak, Dr. Gyimesi Máténak, Harami Gábornak, Nagy Nikolettnek, Sarlós Katának és Takács Balázsnak. Szeretném még megköszönni Málnási-Csizmadia Andrásnak és laborjának, mint „testvérlabornak” a segítségét. Végül köszönöm a családomnak és barátaimnak az érzelmi támogatást.

## Rövidítések

(előfordulási sorrendben)

ATP	adenozin-trifoszfát
ADP	adenozin-difoszfát
MHC	myosin heavy chain - miozin nehézlánc
MLC	myosin light chain - miozin könnyűlánc
HMM	hard meromyosin - nehéz meromiozin
LMM	light meromyosin - könnyű meromiozin
S1, S2...	szubfragmentum 1, 2 ill. sample 1, 2 - minták
ELC	essential light chain - esszenciális könnyűlánc
RLC	regulatory light chain- regulációs könnyűlánc
G-aktin	globuláris aktin
F-aktin	filamentózus aktin
TnC, TnI, TnT	troponin alegységek
A	aktin
M	miozin
AM	aktomiozin komplex
P <sub>i</sub>	szervetlen foszfát
Trp	triptofán
IVM	in vitro motilitás
NM	nem-izom miozin
SM	simaizom miozin
NM2	nem-izom miozin 2
NM2A, 2A	nem-izom miozin 2 A
NM2B, 2B	nem-izom miozin 2 B
NM2C, 2C	nem-izom miozin 2 C
MLC17	17 kDa-os könnyű lánc
MLC20	20 kDa-os könnyű lánc
MLCK	miozin könnyűlánc kináz
Ser	szerin
Thr	treonin
NMHC	nem-izom miozin nehézlánc
Arg, R	arginin
C	cisztein
N	aszparagin
K	lizin
S	szerin
mtsai	munkatársai
siRNA	small interfering RNS - kis interferáló RNS
RNS	ribonukleinsav
DNS, DNA	dezoxiribonukleinsav
EDTA	etiléndiamin-tetraecetsav
SDS	sodium-dodecyl-sulphate – Na-dodecilsulfát
PCR	polimerase chain reaction - polimeráz láncreakció
Sf9	Spodoptera frugiperda sejtvonala
FBS	fetal bovine serum - embrionális borjúsérum
P1, P2, P3	vírusnemzedékek
BSA	bovine serum albumin - borjúsérum albumin
BLC	könnyűlánc vírus
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

EGTA	etilénglikol-tetraecetsav
DTT	ditiotreitól
PMSF	fenil-metil-szulfonil-fluorid
PK	piruvát-kináz
LDH	laktát-dehidrogenáz
PEP	foszfoenol-piruvát
NADH	redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid
NAD	nikotinamid-adenin-dinukleotid
ABS	abszorbancia
$\epsilon$	moláris extinkciós koefficiens
SF	stopped-flow
mant-dATP, - dADP	mant-dezoxi-ATP, - ADP
$k_{obs}$	észlelt sebességi állandó
$k_{on}$	kötési sebességi állandó
$k_{off}$	disszociációs sebességi állandó

## Irodalomjegyzék

1. Jana, S.S., et al., *An Alternatively Spliced Isoform of Non-muscle Myosin II-C Is Not Regulated by Myosin Light Chain Phosphorylation*. J Biol Chem, 2009. **284**(17): p. 11563-71.
2. De La Cruz, E.M. and E.M. Ostap, *Relating biochemistry and function in the myosin superfamily*. Curr Opin Cell Biol, 2004. **16**(1): p. 61-7.
3. Jana, S.S., S. Kawamoto, and R.S. Adelstein, *A specific isoform of nonmuscle myosin II-C is required for cytokinesis in a tumor cell line*. J Biol Chem, 2006. **281**(34): p. 24662-70.
4. Holmes, K.C., *The swinging lever-arm hypothesis of muscle contraction*. Curr Biol, 1997. **7**(2): p. R112-8.
5. Bao, J., S.S. Jana, and R.S. Adelstein, *Vertebrate nonmuscle myosin II isoforms rescue small interfering RNA-induced defects in COS-7 cell cytokinesis*. J Biol Chem, 2005. **280**(20): p. 19594-9.
6. Rhee, A.Y., O. Ogut, and F.V. Brozovich, *Nonmuscle myosin, force maintenance, and the tonic contractile phenotype in smooth muscle*. Pflugers Arch, 2006. **452**(6): p. 766-74.
7. Golomb, E., et al., *Identification and characterization of nonmuscle myosin II-C, a new member of the myosin II family*. J Biol Chem, 2004. **279**(4): p. 2800-8.
8. Wang, F., et al., *Kinetic mechanism of non-muscle myosin IIB: functional adaptations for tension generation and maintenance*. J Biol Chem, 2003. **278**(30): p. 27439-48.
9. Kim, K.Y., et al., *Disease-associated mutations and alternative splicing alter the enzymatic and motile activity of nonmuscle myosins II-B and II-C*. J Biol Chem, 2005. **280**(24): p. 22769-75.
10. Morano, I., et al., *Smooth-muscle contraction without smooth-muscle myosin*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(6): p. 371-5.
11. Conti, M.A. and R.S. Adelstein, *Nonmuscle myosin II moves in new directions*. J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 1): p. 11-8.
12. Ma, X., et al., *Function of the neuron-specific alternatively spliced isoforms of nonmuscle myosin II-B during mouse brain development*. Mol Biol Cell, 2006. **17**(5): p. 2138-49.
13. Gergely, J., *Studies on myosin-adenosinetriphosphatase*. J Biol Chem, 1953. **200**(2): p. 543-50.
14. Mihalyi, E. and A.G. Szent-Gyorgyi, *Trypsin digestion of muscle proteins. III. Adenosinetriphosphatase activity and actinbinding capacity of the digested myosin*. J Biol Chem, 1953. **201**(1): p. 211-9.
15. Lymn, R.W. and E.W. Taylor, *Mechanism of adenosine triphosphate hydrolysis by actomyosin*. Biochemistry, 1971. **10**(25): p. 4617-24.
16. Bagshaw, C.R. and D.R. Trentham, *The characterization of myosin-product complexes and of product-release steps during the magnesium ion-dependent adenosine triphosphatase reaction*. Biochem J, 1974. **141**(2): p. 331-49.
17. Sellers, J.R., S. Umemoto, and G. Cuda, *In vitro studies of determinants of smooth muscle mechanics*. Adv Exp Med Biol, 1993. **332**: p. 267-76; discussion 276-7.
18. Duke, T.A., *Molecular model of muscle contraction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(6): p. 2770-5.
19. Lofgren, M., et al., *Nonmuscle Myosin motor of smooth muscle*. J Gen Physiol, 2003. **121**(4): p. 301-10.
20. Leal, A., et al., *A novel myosin heavy chain gene in human chromosome 19q13.3*. Gene, 2003. **312**: p. 165-71.

21. Kelley, C.A. and R.S. Adelstein, *Characterization of myosin II isoforms containing insertions of amino acids in the flexible loop near the ATP-binding pocket*. Biophys J, 1995. **68**(4 Suppl): p. 225S.
22. Itoh, K. and R.S. Adelstein, *Neuronal cell expression of inserted isoforms of vertebrate nonmuscle myosin heavy chain II-B*. J Biol Chem, 1995. **270**(24): p. 14533-40.
23. Kim, K.Y., et al., *The B2 alternatively spliced isoform of nonmuscle myosin II-B lacks actin-activated MgATPase activity and in vitro motility*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **369**(1): p. 124-34.
24. Donaudy, F., et al., *Nonmuscle myosin heavy-chain gene MYH14 is expressed in cochlea and mutated in patients affected by autosomal dominant hearing impairment (DFNA4)*. Am J Hum Genet, 2004. **74**(4): p. 770-6.
25. Spudich, J.A. and S. Watt, *The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin*. J Biol Chem, 1971. **246**(15): p. 4866-71.
26. Malnasi-Csizmadia, A., R.J. Woolley, and C.R. Bagshaw, *Resolution of conformational states of Dictyostelium myosin II motor domain using tryptophan (W501) mutants: implications for the open-closed transition identified by crystallography*. Biochemistry, 2000. **39**(51): p. 16135-46.
27. Kovacs, M., F. Wang, and J.R. Sellers, *Mechanism of action of myosin X, a membrane-associated molecular motor*. J Biol Chem, 2005. **280**(15): p. 15071-83.
28. Kovacs, M., et al., *Functional divergence of human cytoplasmic myosin II: kinetic characterization of the non-muscle IIA isoform*. J Biol Chem, 2003. **278**(40): p. 38132-40.