

MOTORENZIMEK MŰKÖDÉSI ALAPELVEI ÉS EGYEDI FINOMHANGOLÁSA

Nagy Nikolett, Takács Balázs, Kovács Mihály
ELTE Biokémiai Tanszék

A nukleotidok és fehérjék közötti kölcsönhatás az élet kémiájának alapvető, ősi jelensége. A nukleotid-hidrolízis enzimatis katalízise az anyagcsere és energiaforgalom nélkülözhetetlen folyamatain túlmenően rendkívül sokféle motor- és jelátvivő enzim működésének hajtóerejéül is szolgál. E magas fokon specializált aktivitások teszik lehetővé a magasabbrendű szervezetek komplexitását és alkalmazkodó-képességét. Kutatócsoportunk (www.mk-lab.org) a sejtszétválást és a sejten belüli transzportot hajtó aktomiozin, valamint a DNS-hibajavításban és rekombinációban kulcsszerepet játszó DNS-helikáz motorenzimek működésének mikéntjét és szerepét vizsgálja. Jelen cikkünkben az aktomiozin rendszer biokémiai folyamatai és a rendszer mechanikai (erőgeneráló, illetve erőtartó) működése közötti összefüggéseket megvilágító, közel-múltban elért eredményeinket foglaljuk össze.

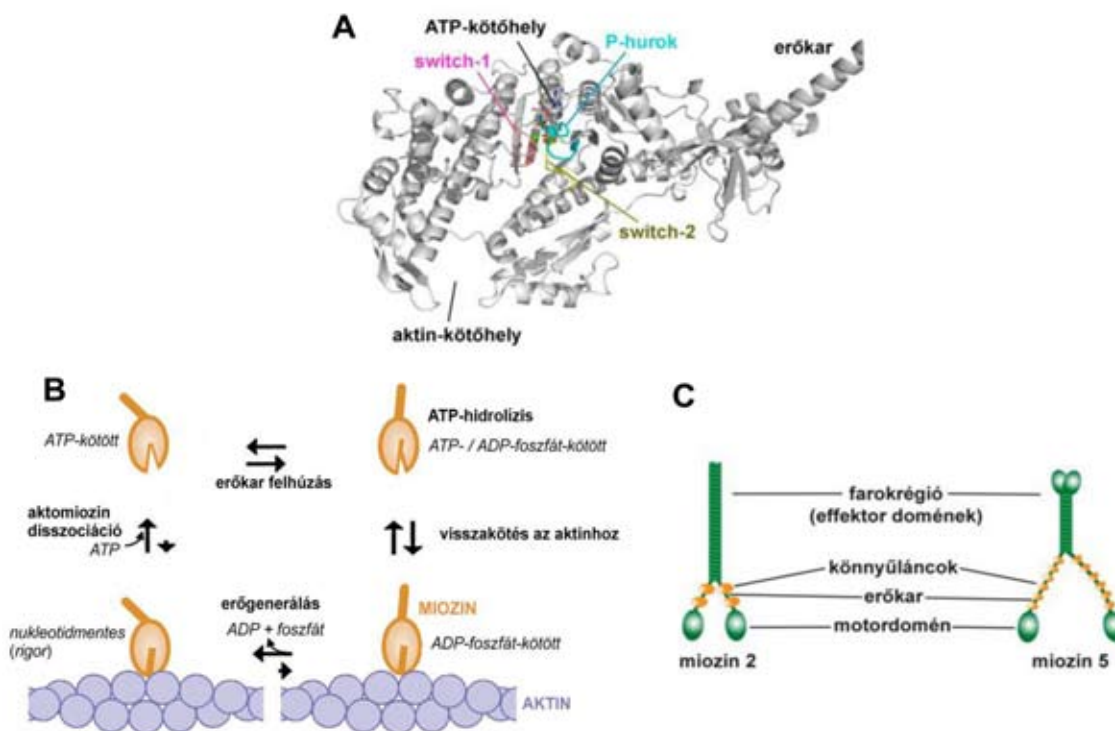
Hidrolitikus hajtóerő befogása munkavégzésre

Enzimek széles skálája hasznosítja a nukleozid-trifoszfátok (NTP) hidrolízise során felszabaduló szabadenergiát olyan intramolekuláris átalakulások hajtóerejeként, amelyek a partnerekkel (fehérjékkel, nukleinsavakkal, lipidekkel) történő kölcsönhatások révén hatékony jelátviteli vagy erőgeneráló működést eredményeznek. Ezek az univerzális – az NTP-molekula hidrolízisének, illetve a hidrolízis-termékek új NTP-szubsztrátra történő „kicserélésén” alapuló – mechanizmusok olyan szerkezeti (allosterikus) kommunikációs útvonalakat hasznosítanak, amelyek evolúciós konzerváltsága még egészen különböző élettani folyamatokban szereplő enzimek esetében is nyilvánvaló [1-3]. A G-fehérjék, miozinok és kinezinok nukleotidkötő helyének három legfontosabb konzervált szerkezeti eleme a *switch-1* és *switch-2*, illetve a P-hurok (1A. ábra). Ezek az elemek a katalízis mellett az enzimek és a partnerek közötti allosterikus kapcsolásban is bizonyítottan kulcsszerepet játszanak [4]. Az ezen elemekben mutatkozó – némely esetben csupán egyetlen aminosavat érintő – természetes változatosság ugyanakkor teret enged az enzimműködés specializációjának, egyfajta finomhangolási mechanizmust biztosítva az enzimek számára.

Az erőgeneráló, jelátviteli, illetve anyagcsere-folyamatokban betöltött enzimfunkciók kölcsönható partnerekkel együttműködésben valósulnak meg, ami az enzim hatásának további hangolását teszi lehetővé. G-fehérjék esetében az allosterikus aktivátorok (*GAP: GTPase activating protein*), illetve nukleotid-cserefaktorok (*GEF: guanine nucleotide exchange factor*); kinezinok illetve miozinok esetében pedig a sínként szolgáló mikrotubulus, illetve aktin filamentum elengedhetetlen kelléke a hatékony enzimműködésnek.

A miozin motorok az ATP-ben tárolt kémiai energiát – szerkezeti átalakulásokon keresztül – mechanikai energiává alakítva az aktin sínen történő egyirá-

nyú elmozduláshoz hasznosítják. Ezek a minden eukarióta sejtben előforduló fehérjék teszik lehetővé számos sejtalkotó, sejt, szerv és szervezet mozgatását. A miozinok kulcsenzime a vázizom-, szívizom- és simaizom-kontrakció folyamatának, illetve szerepet játszanak vezikulumok és molekula-komplexek



1. ábra. A miozin szerkezete és működési ciklusa. A) A motordomén funkcionális régiói és az ATPáz aktív hely konzervált szerkezeti elemei. **B)** Az aktomiozin működési ciklusának egyszerűsített sémája. **C)** A miozin 2 és miozin 5 holoenzimék alegység- és doménszerkezete.

intracelluláris transzportjában, a sejt migráció és -differentiáció, citokinézis, endo- és exocitózis folyamataiban [5]. Mind az egyedi molekulaként működő *processzív* transzporterek (amelyek számos enzimecikel és azzal járó mechanikai lépés elvégzésére képesek a sínről történő leválás előtt), mind a „köteget” (*ensemble*) formában (filamentumokban, illetve membránfelszíneken csoportosan) működő miozinok azonos elemi lépésekből álló enzimecikelon mennek keresztül az erőgenerálás során (1B. ábra). A miozin család képviselőinek sokrétű élettani (mechanikai) funkciói ugyanakkor az enzimecikel egyedi finomhangolását is megkövetelik [6].

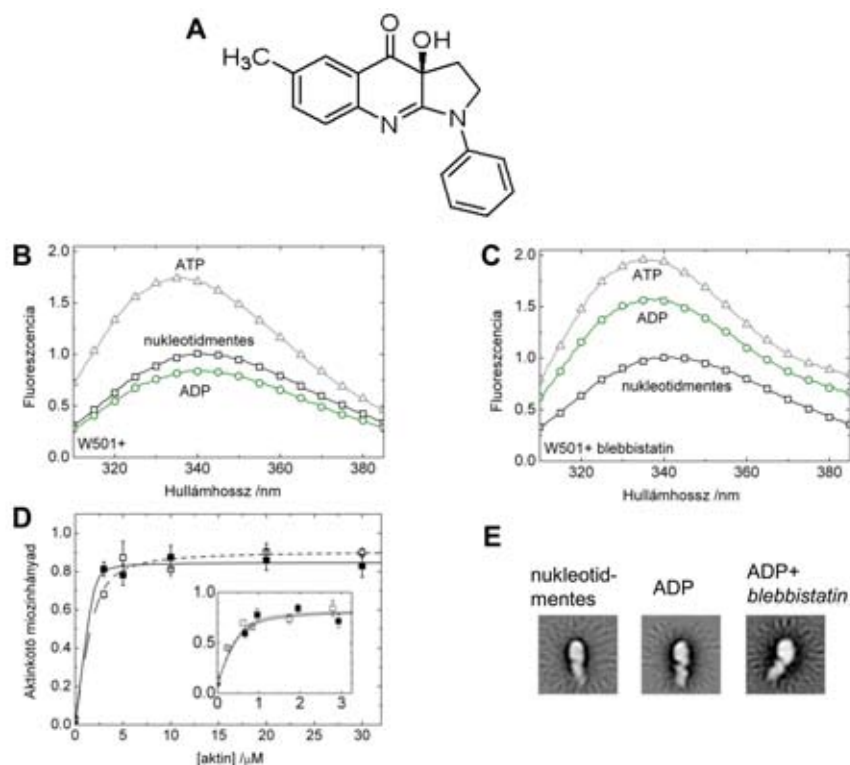
Valamennyi miozin tartalmaz egy katalitikus (motor) domént, amely általában a fehérjék N-terminálisán helyezkedik el, és az ATP valamint az aktin kötőhelyét tartalmazza (1A. ábra). A motordoménből indul ki az erőkar funkcionáló nyaki régió, amelyet a kalmodulin családba tartozó könnyűláncok stabilizálnak. Újabb eredmények szerint magányos egyszálú α -hélix motívumok is betölthetik az erőkar funkcióját [7, 8]. A C-terminális farokrégió a nehézláncok dimerizációjáért (és a filamentumképzésért) felelős *coiled-coil*-formáló szakaszt, illetve egyéb effektor (pl. szállítmány- vagy membránkötő) doméneket tartalmazhat (1C. ábra) [5]. A miozin szuperfamilia – rendkívüli formagazdagsá-

gának és univerzális előfordulásának köszönhetően – mára az eukarióta életfa filogenetikai kutatásának egyik legfontosabb objektumává nőtte ki magát [9, 10].

A motordomén három legfontosabb funkcionális egysége – a nukleotidkötő zseb, az aktinkötő árok, valamint az erőkar kiindulópontja – kifinomult intramolekuláris kommunikációt valósít meg az enzimműködés során (1A-B. ábra) [4]. A funkcionális egységek összehangolt működése teszi lehetővé a hatékony erőgenerálást, melynek során az erőkar „felhúzásának” aktinról levált, „lecsapásának” pedig aktinkötött állapotban kell történnie.

Lencsevén az erőgenerálás instabil köztiállapota

A miozin enzimműködés fő útvonalának (1B. ábra) számos köztiállapotáról széleskörű szerkezeti és kinetikai-energetikai ismerettel rendelkezőnk, azonban a folyamat legizgalmasabb része – az erőgenerálás – egyben a legkevésbé fel-



2. ábra. A blebbistatin stabilizálja az erőgeneráló lépés kezdőállapotát. A) A blebbistatin szerkezete. **B-C)** Egytriptofános miozin mutáns (W501+) triptofán fluoreszcencia-emissziós spektrumai különböző nukleotidok jelenlétében, blebbistatin nélkül (**B**) illetve a gátlószer jelenlétében (**C**). A W501+ az erőkar szenzora: magas fluoreszcenciája blebbistatin és ADP jelenlétében a felhúzott erőkarú állapotot jelzi. **D)** A blebbistatin nem változtatja meg a miozin-ADP komplex magas aktin-affinitását. Az ábra az ADP-kötött miozinféjek aktinkötöttségi hányadának aktinkoncentráció-függését mutatja, amelyet ultracentrifugálást követő SDS-PAGE denzitometriás analízis révén határoztunk meg blebbistatin nélkül (teli négyzetek) illetve a gátlószer jelenlétében (üres négyzetek). **E):** Elektronmikroszkópos felvételek, amelyek azt igazolták, hogy a blebbistatin erőkar-felhúzást indukál az ADP-kötött miozinféjekben. Ezen eredmények alapján az aktomiozin-ADP-blebbistatin komplex szerkezete nagyban hasonlít az **1B** ábra jobb alsó sarkában bemutatott erőgenerálás-indító állapota.

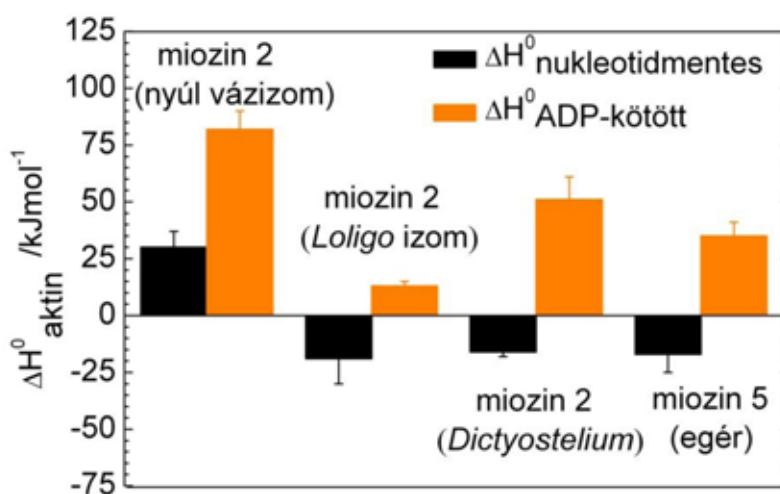
derített is [4, 11]. A nukleotidmentes, aktinhoz erősen kötött (*rigor* állapotú) miozin ATP-kötése a miozin aktinkötő árkának kinyílásához és az aktomiozin komplex disszociációjához vezet [12, 13]. A kötött ATP ezután a *switch-2* hurok záródását indukálja, mely egyrészt katalitikus konformációba hozza az aktív-helyet, másrészt – allosztérikus kommunikációs útvonalakon – az erőkar felhúzását eredményezi [4, 14]. A hidrolízist követően kialakuló miozin-ADP-foszfát komplex visszakötődik az aktin sínhez, amely kinetikailag aktiválja az erőkar lecsapását és az erőgeneráló lépéshez (*powerstroke*) vezet – utóbbi lépéshez kapcsolatosan a hidrolízis-termékek is felszabadulnak a miozintról [15]. A felhúzott erőkarú aktomiozin-ADP-foszfát négyes komplex ezért az erőgenerálás kiindulópontjának tekinthető [11]. Fontossága ellenére azonban ezt az állapotot – rövid életideje és alacsony *steady-state* részaránya miatt – rendkívül nehéz „elkapni” szerkezeti-energetikai jellemzés céljából.

Korábban jellemeztük a *blebbistatin*, egy sejtbiológiai és élettani vizsgálatokban rendkívül hasznosnak bizonyult miozin-inhibitor gátlási mechanizmusát (2A. ábra) [16]. Újabb kísérleteinkben arra a meglepő felfedezésre jutottunk, hogy ADP jelenlétében a blebbistatin a miozint erős aktinkötő, felhúzott erőkarú szerkezetben „fagyasztja be”, amely állapot nagymértékben hasonlít az erőgenerálás gátlószer nélkül igen nehezen stabilizálható „hiányzó láncszemére”, amelyet így elsőként sikerült kimutatnunk [17]. A szerkezet spektroszkópiai és gyorskinetikai jellemzéséhez egytriptofános motordomén konstrukciókat használtunk, amelyek a *switch-1* (és ezen keresztül az aktinkötő árok), illetve az erőkar mozgását érzékelik (2B-C. ábra) [18, 19]. A szerkezet nagy aktin-affinitását ultracentrifugálásos kísérletekkel (2D. ábra), az erőkar felhúzott állapotát pedig elektronmikroszkópos felvételekkel (2E. ábra) is igazoltuk.

A miozin belső rugója megfeszül az aktin kötésekor

A miozin erőgenerálásának alapvető mozzanata az aktomiozin kölcsönhatás létrejötte: az erőkifejtő lépés során létrejövő erős aktinkötés fontos energetikai hajtóerőt képvisel. Az erősen aktinkötött, nukleotidmentes (*rigor*) állapot az erőkifejtő lépés végállapota (1B. ábra) [4]. E fontos állapot atomi szerkezetét azonban több évtizednyi erőfeszítés ellenére sem sikerült meghatározni. A különálló fehérjék (miozin motordomén, aktin monomer) kristályszerkezeteinek a rigor komplex elektronmikroszkópos képeibe történő dokkolása arra derített fényt, hogy a motordomén – akkor rendelkezésre álló – aktinmentes szerkezetében megfigyelt aktinkötő ároknak be kell záródnia az erős aktinkötés létrejöttéhez [13, 20]. Később kiderült, hogy a vezikulum-transzporterként működő miozin 5, illetve eredményeink alapján a puhatestű (*Loligo*) izom miozin 2 – nukleotidmentes állapotban – zárt árkú szerkezetet vesz fel aktin távollétében is [21, 22]. Újabb spektroszkópiai, gyorskinetikai és kalorimetriás kísérleteinkben kimutattuk, hogy ez a szerkezeti változatosság pontos korrelációt mutat az egyes miozinok aktinkötésének energetikájával: ha az aktinkötési folyamat árokszáródást indukál, akkor endoterm karakterű; ha az árok eleve zárt aktin távollétében, akkor az aktinkötés exoterm (3. ábra) [23]. Atomi szintű energetikai számításaink és korábbi szerkezeti információk alapján az árokszáródással járó kedvezőtlen entalpia-változás a motordomén magjában elhelyezkedő hétszálú

β -lemez torziós feszüléséből származik. Ez a szerkezeti elem jelenlegi nézetek szerint a nukleotid- és aktin-kötőhelyek közötti allosztérikus kommunikációt bel-



3. ábra. Különböző miozinok aktinkötésével járó entalpiaváltozás. Nukleotidmentes (fekete) állapotban egyedül a nyúl vázizom miozin 2 aktinkötése endoterm folyamat. Az ároknylást indukáló ADP jelenléte (narancssárga) valamennyi miozin aktinkötését endoterm irányba tolja el.

ső erőátvivő rugó gyanánt szolgálja [22]. A miozinban tehát – ha az aktinkötés nyitott árkú (pl. nukleotidkötött) állapotból indul – belső feszültség ébred az aktinhoz történő precíz térbeli illeszkedés érdekében.

Nukleotidcsere szabályozza a miozinok haladási sebességét

Az eddig említett kísérletek az izolált miozin motordomén energia-átalakító működésének megértését célozták. *In vivo* azonban gyakorlatilag minden miozin több motoregységből álló szerveződésben („kétfejű” dimerként, illetve filamentumokba vagy egyéb szupramolekuláris egységekbe kötegelve) fejt ki működését [5]. A mechanikailag és energetikailag hatékony működés megköveteli a motoregységek (fejek) tevékenységének összehangolását [6]. Ennek a – magasabb szerveződési szinten zajló – kommunikációnak a megvalósítására a motorenzimek az egyes fejekre a nyak „húzásán” keresztül ható mechanikai terhelést használják fel [24, 25]. Ez a kommunikációs forma a klasszikus allosztéria-fogalom kiterjesztésére ad alapot: az egyes motoregységekre ható „külső” mechanikai erő – a motordomén szerkezetének, illetve energiatájképének módosításán keresztül – döntően befolyásolhatja az enzimciklus kinetikai-energetikai paramétereit.

A kétfejű* dimerként, alternáló (*hand-over-hand*) mechanizmussal lépegető miozin és kinezin izoformák processzív haladásának feltétele, hogy bármely időpillanatban legalább az egyik fej kötődjön a sínhez. Ehhez az enzimciklusok összehangolt, eltolt fázisú működése szükséges. A *steady-state* működés során a miozin 5 egyedi fejei a ciklusidő kb. 70 %-át töltik aktinkötött állapotban (*duty ratio, terhelési arány*). A fejek közti koordináció hiányában egy dimer molekula

* „Fej” alatt a motordomén és a hozzá tartozó nyakrégió együttesét értjük

így átlagosan kb. 10 lépési ciklust végezhetne a sínről való leválást megelőzően. Egyedimolekula-motilitás kísérletek alapján tudjuk viszont, hogy a miozin 5 processzivitása ennél jelentősen magasabb, átlagosan 60 lépés elvégzésére is képes [26]. Ezt az magyarázza, hogy a két fej között fellépő ellentétes irányú húzóerő a vezető fej aktinról való leválásának lassulását (mozgás irányával ellentétes erő hatása), míg a követő fej leválásának gyorsítását (mozgással egyirányú erő hatása) eredményezi [27]. Újabb kísérletek tanúsága szerint a miozin 5 mechanikai koordinációja a processzív haladás energetikai hatékonyságát is növeli a „felesleges”, transzlokációhoz nem vezető ATPáz ciklusok elkerülésének elősegítésével [7].

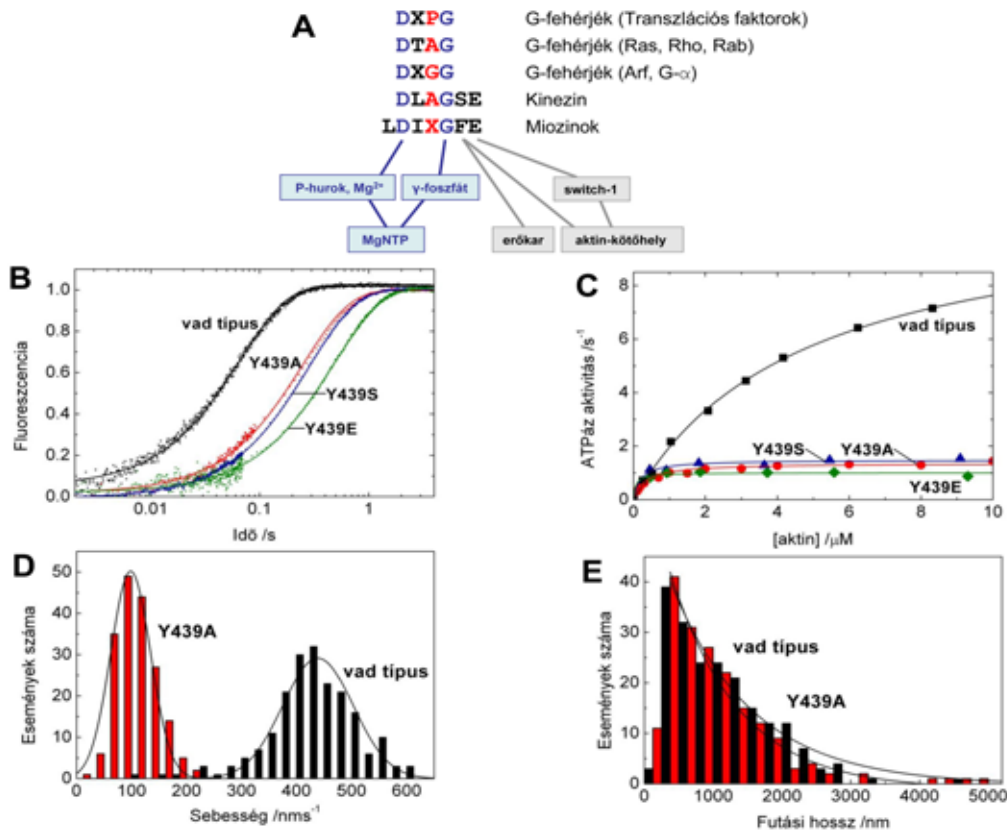
Arra a kérdésre, hogy a fejek közötti feszültség az enzimeciklus mely kinetikai lépéseit hangolja, a nem-izom miozin 2 (NM2) és miozin 5 motorokon végzett gyorskinetikai, szerkezeti és egyedimolekula-mérések alapján kaptunk választ [28, 29]. Mindkét miozintípus a magas terhelési arányú motorok közé tartozik, e sajátság NM2 esetén a hosszú távú erőtartásban, míg miozin 5 esetén a fent említett processzív dimer működésben játszik fontos szerepet. A magas terhelési arányt mindkét miozin esetén az biztosítja, hogy az ATP-hidrolízist, az aktinhoz való visszakötődést és a foszfát-felszabadulást követően létrejövő erősen aktinkötött miozin-ADP komplexből az ADP felszabadulása lassú (a működési ciklus sebesség-meghatározó lépése) [30-32].

Az NM2 *in vivo* minifilamentumokba rendeződve szolgál a citokinézis, a sejtmigráció és a simaizom-kontrakció hajtóerejéül [33]. Egyfejű (terheletlen kontroll) és kétféjű aktinkötött (terhelt) NM2 konstrukciók gyorskinetikai és elektronmikroszkópos vizsgálatával megállapítottuk, hogy az egyes fejek különböző irányú terhelése markánsan befolyásolja az ADP-felszabadulás kinetikáját, lehetővé téve így a molekula terhelési arányának hangolását [28]. Az erőtartó funkció segítésére a molekulán belül fellépő mechanikai feszültség csökkenti a mozgás irányával ellentétes irányú erő hatása alatt lévő fej ADP-felszabadulásának sebességét, így biztosítva hosszú távú erőtartást; míg a mozgás irányába ható erő gyorsítja az ADP-felszabadulást, így az NM2 fejek nem akadályozzák a gyorsabb motorok (pl. simaizom-miozin) által hajtott kontrakciót.

A miozin 5 esetében a fellépő intramolekuláris feszültség szintén a sebesség-meghatározó ADP-felszabadulás időzítését szabályozza az erősen aktinkötött aktomiozin-ADP komplexben [24, 25]. Az egyedi fejek aktinról való leválásának ilyen módon történő összehangolása biztosítja a szállítmány (endoplazmatikus retikulum, melanoszómák, szinaptikus vezikulumok) 1-2 μm (30-60 lépésnyi) távolságba juttatását.

A közelmúltban végzett kísérleteinkkel igazoltuk, hogy az ADP-felszabadulás hangolása az élettani funkció betöltését segítő adaptációs mechanizmusként működik a miozinok evolúciója során [29]. Miozin 5 esetén a szállítmány célhelyre juttatása mellett a haladás sebességének optimalizálása is fontos lehet egyes folyamatok során, pl. a fotoreceptorokban és a belsőfül szőrsejtjeiben működő, gyors ingerületvezetést biztosító szinapszisok esetében [34]. Kimutattuk, hogy a nukleotid-kötőzsebben található *switch-2* hurok, amely a G-fe-

hérjék, kinezinek és miozinok konzervált szerkezeti eleme (4A. ábra) [2, 3], az NTP-hidrolízis katalízise mellett – kiterjedt kommunikációs kapcsolatai révén – biztosítja az NTP hidrolíziséből származó energia produktív felhasználását. A *switch-2* szekvenciája a miozin szupercsaládon belül egyetlen pozícióban mutat variabilitást (4A. ábra). E pozícióban a miozin 5 osztály tagjai tirozint tartalmaznak, míg ugyanitt számos más miozin osztályban kisebb oldalláncú aminosavak találhatóak. Vad típusú és pontmutáns miozin 5 konstrukciók kinetikai és



4. ábra. A *switch-2* hurok szerkezete meghatározza az ADP-felszabadulás kinetikáját és a miozin 5 processzív haladási sebességét. **A)** A *switch-2* aminosav-szekvenciája és konzervált kommunikációs útvonalai különböző NTPázokban. **B)** Vad típusú és *switch-2* („X pozíció”) pontmutáns miozin 5 konstrukciók ADP-felszabadulási tranziensei stopped-flow gyorskinetikai mérésben. **C)** A konstrukciók steady-state ATPáz aktivitásának aktinkoncentráció-függése. **D)** Kétfejű vad típusú (fekete) és *switch-2*-mutáns (piros) miozin 5 konstrukciók aktinon való haladásának sebessége TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence) egyedimolekula-motilitás mérésben. A **B-D** ábrákon bemutatott eredmények alapján az Y439A *switch-2* mutáció az ADP-felszabadulás (nukleotidcsere) kinetikai változásán keresztül az ATPáz aktivitás és a mozgási sebesség arányos lassulását okozta. **E)** Kétfejű miozin 5 konstrukciók processzív futáshossz-eloszlása TIRF kísérletben. Az eredmények megmutatták, hogy az Y439A mutáns haladási sebességének lassulása ellenére a processzivitás és az energetikai hatékonyság változatlan maradt, e sajátságok tehát egymástól függetlenül szabályozhatók.

egyedimolekula-motilitás vizsgálata alapján megállapítottuk, hogy a *switch-2* miozin 5-re jellemző változata teszi lehetővé a szállítófehérje gyors processzív működését [29]. A Mg²⁺-függő ADP-felszabadulás kinetikája a konstrukciókban precíz korrelációt mutatott az aktinon történő transzlokáció sebességével: ezáltal demonstráltuk, hogy a nukleotidcsere kémiai folyamata közvetlenül megha-

tározza a motor mechanikai teljesítményét (4B-E. ábra). Az eredmények azt is jelzik, hogy a *switch-2* génszabályozási módosítása mesterséges motorok sebességének hangolására is felhasználható.

Egyre több megerősítést nyer az a szemlélet, amely szerint a Mg^{2+} -függő nukleotidcsere a metabolikus, jelátviteli és erőgeneráló folyamatokat működtető enzimek széles skálájának univerzális, ám egyedileg finomhangolt szabályozója [1, 35]. E kép alapján az aktin például a miozin allosztérikus nukleotidcserefaktorának („GEF-jének”) tekinthető. A közeljövőben a területen zajló kutatás vezérfonalát alighanem e szabályozási mechanizmus szerkezeti és dinamikai részleteinek, elveinek felderítése fogja képezni, ami tovább gazdagítja majd az életfolyamatok fizikai-kémiai alapjairól alkotott képünket.



Nagy Nikolett 2008-ban szerzett diplomát az ELTE TTK biológus szakán. 2008 szeptembere óta az ELTE Szerkezeti Biokémia Doktori Programjának hallgatója. Az ELTE Biokémiai Tanszékén, Kovács Mihály motorenzimológiai kutatócsoportjában készíti doktori munkáját. Fő kutatási területe a processzív motorműködés szerkezet-funkció összefüggéseinek feltárása.



Takács Balázs 2006-ban szerzett biológusdiplomát az ELTE TTK-n. Szakdolgozatát az ELTE Immunológiai Tanszékén, prof. Sármay Gabriella témavezetésével készítette. 2006 szeptemberében felvételt nyert az ELTE Szerkezeti Biokémia doktori programjára. Kovács Mihály csoportjában végzett munkája alapján jelenleg doktori dolgozatát írja.

Kovács Mihály az ELTE-n szerzett biológusdiplomát 1998-ban. Tanulmányait az ELTE-n és a Leicesteri Egyetemen folytatta, 2002-ben kapott Ph.D. fokozatot. Ezután az amerikai National Institutes of Health-ben dolgozott posztdoktorként. 2005-ben tért vissza az ELTE Biokémiai Tanszékére, ahol a motorenzimológiai kutatócsoportot vezeti (www.mk-lab.org).



2008-ban habilitált, munkáját 2009-ben az MTA Talentum Díjával jutalmazták. Fő érdeklődési területe különböző biológiai motorok (aktomiozinszisztemek, DNS-helikázok) működési és szabályozási mechanizmusainak, valamint mechanikai erők enzimműködésre gyakorolt hatásainak vizsgálata.

Irodalomjegyzék

1. Goody, R. S. and Hofmann-Goody, W. (2002) Exchange factors, effectors, GAPs and motor proteins: common thermodynamic and kinetic principles for different functions, *Eur. Biophys. J.* 31, 268-274.
2. Kull, F. J., Vale, R. D., and Fletterick, R. J. (1998) The case for a common ancestor: kinesin and myosin motor proteins and G proteins, *J. Muscle Res. Cell Motil.* 19, 877-886.
3. Vale, R. D. (1996) Switches, latches, and amplifiers: common themes of G proteins and molecular motors, *J. Cell Biol.* 135, 291-302.
4. Geeves, M. A. and Holmes, K. C. (2005) The molecular mechanism of muscle contraction, *Adv. Protein Chem.* 71, 161-193.
5. Sellers, J. R. (1999) *Myosins* Oxford University Press, New York.
6. De La Cruz, E. M. and Ostap, E. M. (2004) Relating biochemistry and function in the myosin superfamily, *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 61-67.

7. Baboolal, T. G., Sakamoto, T., Forgacs, E., White, H. D., Jackson, S. M., Takagi, Y., Farrow, R. E., Molloy, J. E., Knight, P. J., Sellers, J. R., and Peckham, M. (2009) The SAH domain extends the functional length of the myosin lever, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 106, 22193-22198.
8. Suveges, D., Gaspari, Z., Toth, G., and Nyitray, L. (2009) Charged single alpha-helix: a versatile protein structural motif, *Proteins* 74, 905-916.
9. Richards, T. A. and Cavalier-Smith, T. (2005) Myosin domain evolution and the primary divergence of eukaryotes, *Nature* 436, 1113-1118.
10. Odronitz, F. and Kollmar, M. (2007) Drawing the tree of eukaryotic life based on the analysis of 2,269 manually annotated myosins from 328 species, *Genome Biol.* 8, R196.
11. Malnasi-Csizmadia, A. and Kovacs, M. (2010) Emerging complex pathways of the actomyosin powerstroke, *Trends Biochem. Sci.* under review.
12. Conibear, P. B., Bagshaw, C. R., Fajer, P. G., Kovacs, M., and Malnasi-Csizmadia, A. (2003) Myosin cleft movement and its coupling to actomyosin dissociation, *Nat. Struct. Biol.* 10, 831-835.
13. Holmes, K. C., Angert, I., Kull, F. J., Jahn, W., and Schroder, R. R. (2003) Electron cryo-microscopy shows how strong binding of myosin to actin releases nucleotide, *Nature* 425, 423-427.
14. Malnasi-Csizmadia, A., Pearson, D. S., Kovacs, M., Woolley, R. J., Geeves, M. A., and Bagshaw, C. R. (2001) Kinetic resolution of a conformational transition and the ATP hydrolysis step using relaxation methods with a *Dictyostelium* myosin II mutant containing a single tryptophan residue, *Biochemistry* 40, 12727-12737.
15. Gyimesi, M., Kintsés, B., Bodor, A., Perczel, A., Fischer, S., Bagshaw, C. R., and Malnasi-Csizmadia, A. (2008) The mechanism of the reverse recovery step, phosphate release, and actin activation of *Dictyostelium* myosin II, *J. Biol. Chem.* 283, 8153-8163.
16. Kovacs, M., Toth, J., Hetenyi, C., Malnasi-Csizmadia, A., and Sellers, J. R. (2004) Mechanism of blebbistatin inhibition of myosin II, *J. Biol. Chem.* 279, 35557-35563.
17. Takacs, B., Billington, N., Gyimesi, M., Kintsés, B., Malnasi-Csizmadia, A., Knight, P. J., and Kovacs, M. (2010) Myosin complexed with ADP and blebbistatin reversibly adopts a conformation resembling the start point of the working stroke, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 107, 6799-6804.
18. Kintsés, B., Gyimesi, M., Pearson, D. S., Geeves, M. A., Zeng, W., Bagshaw, C. R., and Malnasi-Csizmadia, A. (2007) Reversible movement of switch 1 loop of myosin determines actin interaction, *EMBO J.* 26, 265-274.
19. Malnasi-Csizmadia, A., Woolley, R. J., and Bagshaw, C. R. (2000) Resolution of conformational states of *Dictyostelium* myosin II motor domain using tryptophan (W501) mutants: implications for the open-closed transition identified by crystallography, *Biochemistry* 39, 16135-16146.
20. Schroder, R. R., Manstein, D. J., Jahn, W., Holden, H., Rayment, I., Holmes, K. C., and Spudich, J. A. (1993) Three-dimensional atomic model of F-actin decorated with *Dictyostelium* myosin S1, *Nature* 364, 171-174.
21. Coureux, P. D., Wells, A. L., Menetrey, J., Yengo, C. M., Morris, C. A., Sweeney, H. L., and Houdusse, A. (2003) A structural state of the myosin V motor without bound nucleotide, *Nature* 425, 419-423.
22. Yang, Y., Gourinath, S., Kovacs, M., Nyitray, L., Reutzel, R., Himmel, D. M., O'Neill-Hennessey, E., Reshetnikova, L., Szent-Gyorgyi, A. G., Brown, J. H., and Cohen, C. (2007) Rigor-like structures from muscle myosins reveal key mechanical elements in the transduction pathways of this allosteric motor, *Structure.* 15, 553-564.

23. Takacs, B., O'Neill-Hennessey, E., Hetenyi, C., Kardos, J., Szent-Gyorgyi, A. G., and Kovacs, M. (2010) Myosin cleft closure determines the energetics of the actomyosin interaction, under review.
24. Rosenfeld, S. S. and Sweeney, H. L. (2004) A model of myosin V processivity, *J. Biol. Chem.* 279, 40100-40111.
25. Forgacs, E., Cartwright, S., Sakamoto, T., Sellers, J. R., Corrie, J. E., Webb, M. R., and White, H. D. (2008) Kinetics of ADP dissociation from the trail and lead heads of actomyosin V following the power stroke, *J. Biol. Chem.* 283, 766-773.
26. Mehta, A. D., Rock, R. S., Rief, M., Spudich, J. A., Mooseker, M. S., and Cheney, R. E. (1999) Myosin-V is a processive actin-based motor, *Nature* 400, 590-593.
27. Veigel, C., Schmitz, S., Wang, F., and Sellers, J. R. (2005) Load-dependent kinetics of myosin-V can explain its high processivity, *Nat. Cell Biol.* 7, 861-869.
28. Kovacs, M., Thirumurugan, K., Knight, P. J., and Sellers, J. R. (2007) Load-dependent mechanism of nonmuscle myosin 2, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 104, 9994-9999.
29. Nagy, N., Sakamoto, T., Takacs, B., Gyimesi, M., Hazai, E., Bikadi, Z., Sellers, J. R., and Kovacs, M. (2010) Functional adaptation of the switch-2 nucleotide sensor enables rapid processive translocation by myosin-5, under review.
30. Wang, F., Kovacs, M., Hu, A., Limouze, J., Harvey, E. V., and Sellers, J. R. (2003) Kinetic mechanism of non-muscle myosin IIB: functional adaptations for tension generation and maintenance, *J. Biol. Chem.* 278, 27439-27448.
31. Rosenfeld, S. S., Xing, J., Chen, L. Q., and Sweeney, H. L. (2003) Myosin IIB is unconventionally conventional, *J. Biol. Chem.* 278, 27449-27455.
32. De La Cruz, E. M., Wells, A. L., Rosenfeld, S. S., Ostap, E. M., and Sweeney, H. L. (1999) The kinetic mechanism of myosin V, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 13726-13731.
33. Verkhovsky, A. B., Svitkina, T. M., and Borisy, G. G. (1995) Myosin II filament assemblies in the active lamella of fibroblasts: their morphogenesis and role in the formation of actin filament bundles, *J. Cell Biol.* 131, 989-1002.
34. Libby, R. T., Lillo, C., Kitamoto, J., Williams, D. S., and Steel, K. P. (2004) Myosin Va is required for normal photoreceptor synaptic activity, *J. Cell Sci.* 117, 4509-4515.
35. Thomas, C., Fricke, I., Scrima, A., Berken, A., and Wittinghofer, A. (2007) Structural evidence for a common intermediate in small G protein-GEF reactions, *Mol. Cell* 25, 141-149.