

Az erőgenerálás szerkezeti háttere a miozin motorfehérjében

Várkuti Boglárka

Doktori értekezés tézisei

Témavezető: Dr. Málnási-Csizmadia András

az MTA doktora, habilitált egyetemi docens

Szerkezeti Biokémia Doktori Program

Biológia Doktori Iskola

Programvezető: Prof. Nyitray László

Iskolavezető: Prof. Erdei Anna



Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar

Biológiai Intézet
Biokémiai Tanszék

Budapest, 2013

Bevezetés

A P-hurok NTPáz család tagjainak kötőpartner molekulák általi allosztérikus aktivációja számos motor és jelátviteli rendszerben előfordul, mint például az aktin–miozin, mikrotubulus–kinezin, GEF-G-fehérje vagy DNS-DNS polimeráz komplexek esetében. Annak ellenére, hogy e fehérjék aktivációja az eukarióta sejt működéséhez elengedhetetlen, magának az aktivációnak a szerkezeti mechanizmusa mindmáig ismeretlen.

Az F-aktin amellett, hogy sinként szolgál a miozin motorfunkciójának betöltéséhez, egyben aktiválja is annak ATPáz aktivitását, lehetővé téve a hatékony erő kifejtést. Aktin hiányában az enzim ciklus sebesség-meghatározó lépése az erőkar lecsapása, az úgynevezett „fordított felhúzási lépés”, ami meghatározza a miozin bazális *steady-state* ATPáz aktivitását. Aktin jelenlétében azonban az erőkar lecsapása felgyorsul és a ciklus egyéb lépései válnak sebesség meghatározóvá. A miozin aktin aktivációja így a miozin *steady-state* ATPáz aktivitásának nagyságrendekkel való emelkedését vonja maga után.

Az aktin aktiváció során az aktin gyengén kötődik a miozinhoz, kialakítva az erőgenerálás kiindulási állapotát. Az erőgenerálási lépés során, ami az aktin kötött miozin erőkar lecsapása, az aktomiozin interakció megerősödik és a komplexből felszabadul a foszfát. Az aktin aktiváció – az úgynevezett kinetikai útvonal választó mechanizmuson keresztül – a miozin molekulákat az erőgenerálási lépésen át, az enzimciklus hatékony útvonalára tereli. Habár az aktin aktiváció egy általános mechanizmus a miozinok között, a folyamat szerkezeti háttere nem ismert, mely leginkább annak köszönhető, hogy limitáltak az információink az erőgenerálási lépés kiindulási, átmeneti illetve végső állapotainak szerkezetéről. Még a miozin aktin általi aktivációjáért specifikusan felelős miozin szerkezeti elem sem ismert.

Nemrégiben egy olyan miozin állapotot figyeltek meg ADP és blebbisztatin – egy miozin II specifikus inhibitor – jelenlétében, mely a miozin erőgenerálásának egy lehetséges átmeneti állapotát képviseli. A miozin-ADP-blebbisztatin komplex kristályosítására tett kísérletek azonban kudarcba fulladtak, a blebbisztatin miozin-ADP komplexhez való alacsony affinitása miatt. Emiatt az erőgenerálás egy fontos állapotának atomi szerkezet továbbra is feltáratlan.

Célkitűzések

Az aktin aktivált miozin ATPáz aktivitás molekuláris mechanizmusának megismerése céljából a következőket tűztük ki célul:

- azonosítani a miozin aktin általi aktivációjáért specifikus miozin szerkezeti elemet
- megvizsgálni a miozin aktin általi aktivációjának *in vivo* szerepét

- meghatározni az erőgenerálás kiindulási, gyengén kötő aktomiozin állapot atomi szerkezetét
- felfedni kommunikációs útvonalakat a miozin aktinkötő régiója, nukleotid kötősebe és relé/konverter régiója között
- ADP jelenlétében a miozin blebbisztatinnal történő kovalens keresztkötésével a miozin-ADP-blebbisztatinnal komplex kristályosítását lehetővé tenni

Tézisek - Eredmények

1. *Egy új kölcsönhatást írtunk le a miozin egy konzervatív hurokrégiója és az aktin N-terminális régiója között, mely kötés specifikusan felelős a miozin aktin általi aktivációjáért. Az új aktinkötő miozin hurkot aktivációs huroknak nevezünk el.*

Gyenge aktinkötő, felhúzott erőkarral rendelkező (PDB kód: 1VOM) és lecsapott erőkarú (1MMD), illetve erős aktinkötő (2OVK) miozin szerkezeteket *in silico* dokkoltunk egy aktin trimer modellhez. A dokkolt aktomiozin komplexek molekuladinamikai relaxációja és *in vitro* keresztkötési kísérleteink által egy új aktinkötő hurkot fedeztünk fel, mely sóhid kötésekkel alakít ki az aktin N-terminális régiójával. Jellemeztük az aktinkötő hurok mutáns *Dictyostelium discoideum* miozin II motor domén (*Dd MD*) konstrukciók *steady-state* és tranziens kinetikai tulajdonságait, amik hasonlóak voltak aktin távollétében a vad típushoz. A hurok-mutációk kismértékben befolyásolták a *Dd MD* aktinkötését, ám aktin általi aktivációja az ATPáz aktivitásuknak szinte teljesen megszűnt, ezért a felfedezett aktinkötő miozin hurkot aktivációs huroknak neveztük el. *Mus musculus* miozin Va S1 (mioV) fehérje aktivációs hurkának mutációja esetében szintén a miozin aktin általi aktivációjának hiányát tapasztaltuk.

2. *Az aktin N-terminális régió és a miozin aktivációs hurok közötti kölcsönhatás megszüntetésével az aktin aktivációs és in vitro motilitási tulajdonságai a miozinnal szétválaszolódnak.*

Az aktin aktivációt nélkülöző aktivációs hurok mutáns *Dd MD* konstrukciók a vad típusú miozinhoz hasonló sebességgel képesek mozgatni az aktin filamentumokat *in vitro* motilitási esszéekben.

3. *Az aktomiozin rendszer in vivo erő kifejtését a miozin ATPáz aktivitásának aktin általi aktivációja teszi lehetővé.*

Aktivációs hurok mutáns vagy vad típusú testfal miozint tartalmazó transzgenikus *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) törzseket állítottunk elő. Az aktivációs hurok testfal miozin mutációt tartalmazó állatok ugyan gyorsabban mozogtak testfalmiozin-hiányos társaiknál, de lassabbak voltak a vad típusú állatoknál. Ezzel ellentétben, az

aktivációs hurok mutáns fonálféregek erőkifejtő képessége a testfal-hiányos állatokéhoz hasonlóan teljes mértékben megszűnt vad típusú társaikhoz képest.

4. *In silico* módszerekkel meghatároztuk a gyengén kötő aktomiozin komplex atomi szerkezetét, az erőgeneráló lépés kiindulási állapotát, ahol a miozin egy új, „extra felhúzott” állapotában található.

Egy aktin trimer modell gyenge aktinkötő, felhúzott erőkarú miozin kristályszerkezetéhez (1VOM) történő *in silico* dokkolásával és 100 ns idejű molekuladinamikai szimulációjával gyengén kötő aktomiozin komplexet hoztunk létre. Ugyanezzel a módszerrel meghatároztunk erősen kötő, rigor aktomiozin szerkezeteket (aktin trimer + apo/rigor-szerű miozin kristályszerkezetek, 1Q5G/2OVK), amiket más, ismert rigor szerkezeti modellekhez hasonlítva validáltuk a módszerünket. Molekuladinamikai szimuláció hatására a gyengén kötő aktomiozin komplexben lévő miozin felhúzott erőkara további 18 fokkal felhúzódott, illetve zárt switch II hurokrégiója tovább záródott. Ez az aktinkötés indukált „extra felhúzott” állapot képviseli az erőgeneráló lépés kiindulási állapotát, mely mindezidáig ismeretlen volt.

5. *A miozin aktivációs hurok és az aktin N-terminális régió között kialakuló sóhid kötés felelős a miozin extra felhúzott állapotáért az erőgenerálás kiindulási állapotában.*

Az aktivációs hurok és aktin közötti kölcsönhatást megszüntető *in silico* mutációk az extra felhúzott szerkezetű miozin eredeti állapotába történő relaxációját okozzák a molekuladinamikai szimulációk során. Más aktinkötő hurok *in silico* mutációja az aktomiozin komplexben nincs ilyen hatással a miozin szerkezetére.

6. *Egy gyenge aktinkötésre kialakuló szerkezeti változásokon alapuló kommunikációs útvonalat fedeztünk fel, mely a miozin aktivációs hurkán keresztül tart a relé régió és nukleotid kötőzseb felé.*

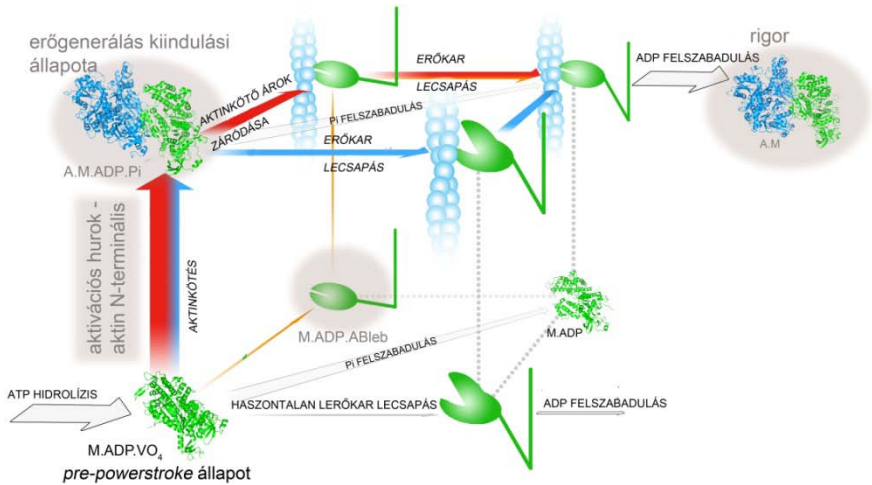
A gyengén kötő aktomiozin komplexben kialakuló aktin N-terminális és miozin aktivációs hurok közötti kölcsönhatás révén a felső relé régió (ahol az aktivációs hurok elhelyezkedik) sóhid és hidrofób interakciókon keresztül kapcsolatba lép a relé hélixszel és a nukleotid kötőzseb *switch* II hurkával, ami a miozin extra felhúzott állapotához vezet. Az aktivációs hurok *in silico* mutációjával megszűnik ez a szerkezeti kommunikációs útvonal az aktinkötő régió, erőkar és nukleotid kötőzseb között, míg más aktinkötő hurkok mutációi nem befolyásolják az útvonal interakcióit.

7. A blebbistatin egy fotoreaktív változatával, a para-azidoblebbistatinnal kovalensen telítettük a miozint ADP jelenlétében, ezzel elősegítve a miozin-ADP-azidoblebbistatin komplex kristályosítását.

Megszintetizáltuk a blebbistatin C-15 pozícióban lévő azido szubsztituált származékát, amit UV sugárzás általi aktivációval a miozin molekula kötőzsebébe kovalensen be lehet kötni. UV sugárzás hiányában a para-azidoblebbistatin Dd MD ATPáz aktivitásának gátlása hasonló a módosítatlan blebbistatinéhoz. Sorozatos keresztkötési ciklusokkal telítettük a miozint para-azidoblebbistatinnal ADP jelenlétében, majd ezt követően meghatároztuk az inhibitor kötőhelyét is a miozinon.

Konklúziók

- az aktin N-terminális régiója és a miozin aktivációs hurka közötti sóhíd kötések megszüntetésével a miozin enzimciklus paraméterei (az aktin aktivált ATPáz aktivitás hiányát leszámítva) nem változnak meg, ami az aktivációs hurok aktin általi miozin aktivációjának specifikus szerepére utal
- az izomzat *in vivo* erőgenerálását a miozin aktin általi aktivációja szabályozza az aktivációs hurokaktin kölcsönhatáson keresztül, mely folyamat felelős az aktomiozin rendszer hatékonyságáért
- az aktivációs hurok és aktin közötti kölcsönhatás okozza a miozin extra felhúzott állapotát az erőgenerálás kiindulási állapotú aktomiozin komplexében, mely szerkezet mindeddig ismeretlen
- a miozin aktinkötő régiója mind a relé/konverter régióval mind a nukleotid kötőzsebbel kommunikál, mely szerkezeti kommunikációs útvonalak az aktivációs hurok és az aktin N-terminális régiója között létrejövő kölcsönhatás során alakulnak ki
- az erőgenerálási lépés egy köztes állapotának ismert atomi szerkezetével, amilyen például a miozin-ADP-azidoblebbistatin állapot, egy lépéssel közelebb kerülnénk a miozinban zajló erőgenerálás molekuláris mechanizmusának megértéséhez



A miozin párhuzamos erőgenerálási útvonalainak mechanisztikus modellje. A miozin erőgenerálási útvonalaihoz tartozó különböző állapotok ismert miozin (zöld) és aktin (kék) szerkezetei szalagábrázolással, míg ismeretlen szerkezeti állapotai sematikus módon vannak feltüntetve az ábrán. A doktori értekezés által meghatározott szerkezetek, illetve szerkezetük meghatározásához történő hozzájárulás szürke háttérrel került kiemelésre, csakúgy, mint az értekezésben felfedezett aktivációs hurok-aktin interakció, mely a miozin aktin általi allosztérikus aktivációját teszi lehetővé. A nyílak szélessége az útvonalak relatív fluxusát fejezi ki. A piros, kék és narancssárga útvonalak három különböző útjai a miozin erőgenerálásának. (PDB kódok: 1VOM, *pre-powerstroke*; 1MMA, M.ADP)

Alkalmazott módszerek

- *Dictyostelium discoideum* miozin II motor domén (*Dd MD*) megaprimér PCR módszerrel és *Mus musculus* miozin Va S1 (mioV) QuikChange mutagenézissel történő aktivációs hurok mutánsainak generálása után a *Dd MD* konstrukciókat *Dictyostelium* sejt kultúrában, illetve a mioV fehérjekonstrukciókat bakulovírus-Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) expressziós rendszerben termeltettük
- a fehérjetisztítás His- (*Dd MD*) és Flag-címke (mioV) affinitás kromatográfiával történt
- aktint nyúl vázizomból preparáltunk, majd pirén-jódacetammal N-(1-pirén)jódacetamid jelöltük Cys374 aminosavát
- *Dd MD* és aktin kovalens keresztkötését EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid) reagenssel végeztük
- *Dd MD* konstrukciókkal tranziens kinetikai fluoreszcens méréseket BioLogic SFM 300 stopped-flow műszerrel végeztünk, a fehérje Trp501, mant-dADP (3'-(N-metilantranilol)-2'-deoxy-ADP) vagy pirén-jelölt aktin fluoreszcencia változásait követve

- *Dd MD* és mioV steady-state bazális és aktin-aktivált ATPáz aktivitását Schimadzu UV-2101 PC spektrofotométer segítségével követtük egy piruvát kináz/laktát dehidrogenáz–kapcsolt esszében
- *Dd MD* és aktin steady-state ko-szedimentációs esszéit ultracentrifugálással, SDS gélelektroforézissel és a gélek denzitometráálásával végeztük el
- az in vitro motilitási tesztekben a TRITC-jelölt (tetramethylrhodamine-5-isothiocyanate) aktin filamentumok mozgását Olympus IX71 mikroszkóppal követtük
- transzgenikus *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) törzseket génpuska módszerrel hoztunk létre
- a *C. elegans* törzsek utódszámát, élethosszát és motilitását számszerűsítettük
- a *C. elegans* törzsek erőgenerálását atomerómikroszkóppal (AsylumResearch MFP3D) mértük meg
- fehérjeszerkezetek in silico preparálását Zhenhui Yang végezte: az 1VOM és 1MMD szerkezetekben lévő VO_4^{3-} and BeF_3^- csoportokat az Antechamber és Gaussian programok segítségével Pi csoportokra cserélte, az 1VOM, 2OVK és 1MMD szerkezetek hiányzó aminosavait homológ modellezéssel (Modeller 9.2) egészítette ki, az aktin N-terminális régióját pedig kiegészítette a hiányzó aminosavaival és egy N-terminális acetil csoporttal (Acetyl-Asp₁-Glu-Asp-Glu₄-actin)
- az aktin és miozin dokkolását Zhenhui Yang végezte Haddock V2.1 szoftverrel
- a molekuladinamikai relaxációt Zhenhui Yang végezte Amber szoftvercsomag segítségével
- a para-azidoblebbistatin szintézisét Képiró Miklós végezte
- a *Dd MD* fehérje para-azidoblebbisztatinnal történő kovalens keresztkötését a miozin-kötött inhibitor fotoaktivációjával értük el
- a miozin para-azidoblebbisztatint kötő peptidjeit tömegspektrometriával és Findmod programmal Képiró Miklóssal határoztuk meg

Az értekezés alapjául szolgáló publikációk

Boglárka H. Várkuti, , Zhenhui Yang, Bálint Kintses, Péter Erdélyi, Irén Bárdos-Nagy, Attila L. Kovács, Péter Hári, Miklós Kellermayer, Tibor Vellai and András Málnási-Csizmadia. "A novel actin binding site of myosin required for effective muscle contraction." *Nature structural & molecular biology* 19, no. 3 (2012): 299-306.

Miklós Képiró, **Boglárka H. Várkuti**, Andrea Bodor, György Hegyi, László Drahos, Mihály Kovács and András Málnási-Csizmadia. "Azidoblebbistatin, a photoreactive myosin inhibitor." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, no. 24 (2012): 9402-9407.

Boglárka H. Várkuti, Zhenhui Yang and András Málnási-Csizmadia. " A structural model of actomyosin in the prepowerstroke state: actin induced ‘extra priming’ of myosin " – beküldés alatt

Konferencia kiadványok (az előadó szerző nevének aláhúzásával)

A structural model of actomyosin in the prepowerstroke state: actin-binding induced extra priming of myosin

Boglárka Várkuti *Zhen Hui Yang, András Málnási-Csizmadia*

2013 Philadelphia, US, Biophysical Society 57th Annual Meeting, poszter prezentáció

An actomyosin model of the initial state of the powerstroke

Boglárka H. Várkuti, *Yang Zhe Hui, Málnási-Csizmadia András*

2012 Rhodes, European Muscle Conference, előadás

Structural Model of the Pre-Powerstroke State of the Actomyosin Complex

*Zhen Hui Yang, **Boglárka H. Varkuti**, Anna Rauscher, Miklos Kepiro, Andras Malnasi-Csizmadia*

2012 San Diego, US, Biophysical Society 56th Annual Meeting, előadás

A novel actin binding site enables effective muscle contraction

Boglárka H. Várkuti, *Bálint Kintses, Zhen Hui Yang, Péter Erdélyi, Irén Bárdos-Nagy, Péter Hári, Miklós Kellermayer, Tibor Vellai, András Málnási-Csizmadia*

2011 Berlin, European Muscle Conference, előadás

Synthesis and functional characterization of azido-blebbistatin, a photoreactive myosin inhibitor

Miklós Képiró, **Boglárka H. Várkuti**, *György Hegyi, Mihály Kovács, András Málnási-Csizmadia*

2011 Berlin, European Muscle Conference, előadás

Synthesis and functional characterization of azido-blebbistatin, a photoreactive myosin inhibitor

Miklós Képiró, **Boglárka Várkuti** and **András Málnási-Csizmadia**

2011 Budapest, Hungary, 4th European Conference on Chemistry for Life Sciences, poszter prezentáció

A novel actin binding site of myosin is responsible for effective muscle contraction

Boglárka Várkuti, **Bálint Kintses**, **Zhen Hui Yang**, **Péter Erdélyi**, **Irén Bárdos-Nagy**, **Péter Hári**, **Miklós Kellermayer**, **Tibor Vellai**, **András Málnási-Csizmadia**

2011 Baltimore, US, Biophysical Society 55th Annual Meeting, poszter prezentáció

The molecular mechanism of actin activation of myosin

Boglárka Várkuti, **Bálint Kintses**, **Zhen Hui Yang**, **András Málnási-Csizmadia**

2009 Lille, France, European Muscle Conference, poszter prezentáció

The role of the proline-rich loop in the enzyme mechanism of myosin II

Boglárka Várkuti, **Kintses Bálint**, **Yang Zhenhui**, **Málnási Csizmadia András**

2008 Szeged, Annual Meeting of the Hungarian Society of Biochemistry, poszter prezentáció, poszterdíj

The role of the proline-rich loop in the communication of actomyosin

Boglárka Várkuti, **Málnási-Csizmadia András**

2007 Temesvár, 10. International Students' Conference of Technological Sciences, előadás, különdíj

Egyéb publikációk

Miklós Képiró, **Boglárka H. Várkuti**, László Végner, Gergely Vörös, Máté Varga, András Málnási-Csizmadia. "Para-nitroblebbistatin, the non-phototoxic and photostable myosin II inhibitor." – beküldés alatt

Géntechnológia és fehérjemérnökség, 15. fejezet (elektronikus jegyzet szerk.: Prof. Nyitrai László). Szerzők: Alexa Anita, Fodor Krisztián, Garai Ágnes, Glatz Gábor, Radnai László, Rapali Péter, Szakács Dávid, **Várkuti Boglárka**, Zeke András. Budapest 2013.