

Lassan járj, tovább érsz: a sejtosztódás és -differentiáció motorjainak mechanikai szabályozása

Slowly but steadily: mechanoregulation of motors of cell division and differentiation

Kovács Mihály

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Biokémiai Tanszék, 1117 Budapest, Pázmány Péter sétány 1/C, E-mail: kovacsm@elte.hu, web: <http://www.mk-lab.org>

Összefoglalás

A minden állati sejtben jelen lévő nem izom miozin-2 (NM2) motorok a sejtosztódás, -mozgás és -differentiáció folyamataiban játszanak nélkülözhetetlen szerepet. Felderítettük, hogy e motorok hosszú távú sejtbeli erő kifejtésre és erő tartásra specializálódtak, amely működés a vázizommiozinokétól drasztikusan eltérő biokémiai és mechanikai sajátosságok következménye. Az NM2 enzim működésének és mozgatóképességének (motilitásának) analízisével azt is megmutattuk, hogy a humán NM2 izoformák – sejtbeli funkcióiknak megfelelően – eltérő motilitási típusokat tesznek lehetővé: az NM2A inkább aktív kontrakcióra, míg az NM2B inkább energiahatékony erő tartásra képes. Kiemelkedő élettani jelentőségén túl az NM2 ideális kísérleti objektum egy új áttörésekkel kecsegtető tudományterület, a mechanobiokémia számára is, amely többek között a külső erők enzim működésre gyakorolt hatásait vizsgálja.

Kovács, M.

Department of Biochemistry, Eötvös Loránd University, H-1117 Budapest, Pázmány Péter sétány 1/C, E-mail: kovacsm@elte.hu

Summary

Non-muscle myosin-2 (NM2) isoforms are ubiquitously expressed in animal tissues and play essential roles in cell division, migration and differentiation. We have shown that NM2 exhibits functional adaptations to prolonged force generation and maintenance. Accordingly, the biochemical and mechanical properties of NM2 drastically differ from those of skeletal muscle myosins. By analyzing their enzyme kinetic and motile properties, we have shown that, according to their physiological roles, human NM2 isoforms can perform different types of motility: NM2A is more suited for active contraction, whereas NM2B is suited for sustained tension maintenance. Beyond its prominent physiological roles, NM2's biochemical properties make it an excellent system for studies in mechanobiology, a promising field investigating the effect of mechanical forces on enzyme function.

A miozinok funkcionális diverzitása

Az aktomiozin-mozgatórendszer a sejt váz fontos elemeként valamennyi eukarióta sejtben jelen van. A miozinmotorok aktinfilamentumokon történő mozgása a hajtóereje a különböző izmok összehúzó-dásán kívül például a sejtosztódás során a leánysejtek szétválásának, az exo- és endocitózisnak, a sejt szervecskéik transzportjának és az amöboid sejtmozgásnak. Ehhez az aktív mozgáshoz a miozin az adenozin-trifoszfát (ATP) hidrolíziséből származó szabad energiát hasznosítja. Jóllehet a miozin ATPáz működésének és erőgenerálásának számos lényegi mozzanata – Szent-Györgyi Albert és kutatócsoportja alapvető felfedezéseire építve – a múlt század végére leírásra került, az erőgeneráló lépésnek a

kemomechanikai ciklusban elfoglalt helyével és az aktomiozin-kölcsönhatással kapcsolatban számos kérdőjel maradt. Emellett az utóbbi két évtizedben nagyszámú, szerkezeti és funkcionális sokféleséget mutató miozinosztály és -izoforma létére derült fény. Ezek az ismeretek két szempontból is alapvetően befolyásolják a tudományterület további irányvonalait: 1) Az új miozinok közül számos izoforma rendelkezik (vagy rendelkezhet) olyan biokémiai és szerkezeti sajátosságokkal, amelyek lehetővé teszik a kemomechanikai energiaátalakítás máig ismeretlen, az izommiozinokon nehezen vizsgálható aspektusainak felderítését; 2) Az új miozinok az eddig leírt motilitási mechanizmusoktól jelentősen eltérő módon fejthetik ki aktivitásukat, és ezeknek az eddig ismeretlen motilitási típusoknak – a miozinok széles

körü biológiai funkciói révén – fontos élettani, orvosi biológiai és biotechnológiai szerepe lehet.

A diverzitás mint a biológia egyik alapvető aspektusa, a motorenzim működési sajátosságainak sokféleségében is megmutatkozik [1]. A vázizom miozin-2 fehérjének, amely a – több száz molekulából felépülő – vastag filamentum részeként feje ki működését, és gyors izom-összehúzódást produkál, alapvetően más mechanikai teljesítményre és ehhez szorosan kapcsolt enzimkinetikai mechanizmusra van szüksége, mint például a miozin-5 alának, amely egyedi molekulaként lépeget az aktinszálon, és vezikulumok transzportját végzi. Ezt a funkcionális diverzitást eltérő enzimmechanizmusok teszik lehetővé, amelyek közül számosat részletesen jellemeztünk [2-7].

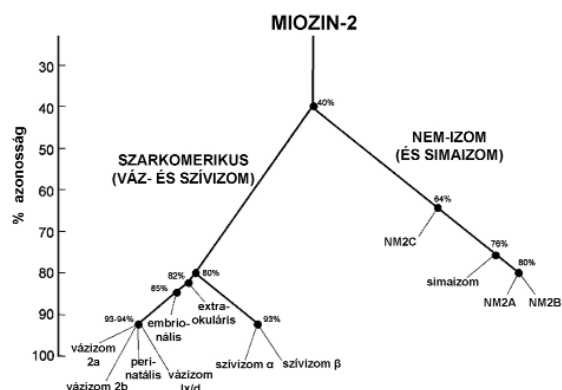
Az NM2 motorok hosszú távú, alacsony energiaigényű erő kifejtésre szakosodtak

Az NM2 az izommiozin-2 fehérjéhez hasonlóan kétfejú, filamentumokat képező miozin. Az izom vastag filamentumaival ellentétben azonban az NM2 mindössze kb. 30 molekulából álló minifilamentumokat képez (1. ábra), amelyek valamennyi állati sejttípusban jelen vannak, és központi szerepet játszanak a citokinézisben, az amöboid sejtvándorlásban, valamint a sejtek és szövetek alakjának fenntartásában [8]. A legtöbb alacsonyabb rendű szervezet egyetlen NM2-izoformával rendelkezik, míg emlősökben három különböző NM2 (A, B és C) izoenzim található, amelyek a simaizom-miozinnal mutatnak evolúciós rokonságot (2. ábra).

Élettani szerepükből adódóan az NM2-izoformáknak a gyors kontrakció helyett lassabb sejtbeli mozgások végrehajtására specializálódott mechenozimikus működési paraméterekkel kell rendelkezniük. Részletes állandósult állapotú és tranziens enzimkinetikai mérésorozatokban, valamint fénymikroszkópos aktinmozgató kísérletekben megvizsgáltuk e miozinok enzimkinetikai sajátosságait és mozgatóképességét (motilitását). Azt találtuk, hogy a két



1. ábra Az NM2-minifilamentum szerkezete [26].



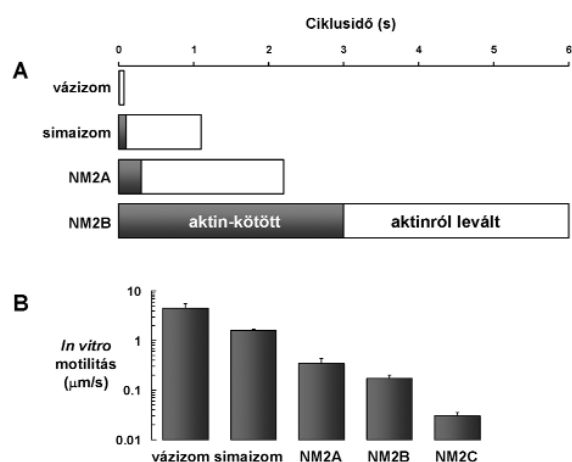
2. ábra Humán miozin-2-izoformák törzsfája [25].

korábban ismert humán NM2-izoforma (NM2A és NM2B) mind a vázizom-, mind a simaizom-miozinoknál sokkal lassabban működő motor (3. ábra) [3,4]. A terhelési arány (*duty ratio*) kifejezi, hogy az állandósult állapotú működés során a miozinfaj az enzim ciklusidő mekkora hányadát tölti aktinhez kötött, teher tartó állapotban [1], ami az adott miozin-izoforma részletes kinetikai sajátosságainak ismeretében kiszámítható. Érdekes módon az NM2A az izommiozinokéhoz hasonló alacsony terhelési arányt (kb. 10%) mutat, míg az NM2B (amely még az NM2A fehérjénél is hosszabb ATPáz ciklusidejű) terhelési aránya magas (50%), motilitása pedig lassú (3. ábra). Ezek a sajátosságok azt sugallják, hogy az NM2B elsősorban hosszú távú erő tartásra specializálódott.

Enzimológiai és motilitási jellemzéseink látványos összhangban voltak későbbi munkákkal, amelyek azt mutatták meg, hogy különböző élettani folyamatokban (például idegszövet-regeneráció, simaizom-kontrakció) az NM2A mindig a gyorsabb kontrakciót igénylő feladatot végzi, míg az NM2B feladata az erő tartás [9-12]. Élettani munkákból arra is fény derült, hogy a simaizom-kontrakcióhoz



Kovács Mihály az Eötvös Loránd Tudományegyetemen szerzett biológusdiplomát 1998-ban. Tanulmányait az ELTE-n és a Leicesteri Egyetemen folytatta, 2002-ben kapott PhD-fokozatot. Ezután három évig az egyesült államokbeli *National Institutes of Health* intézményben dolgozott posztdoktorként. 2005-ben tért vissza az ELTE Biokémiai Tanszékére, ahol a motorenzimológiai kutatócsoportot vezeti (<http://www.mk-lab.org>). A 2008. évi Talentum-díj nyertese az élettudományi kategóriában. Fő érdeklődési területe különböző biológiai motorok (aktomiozinrendszerek, DNS-helikázok) működési és szabályozási mechanizmusainak, valamint mechanikai erők enzim működésre gyakorolt hatásainak vizsgálata.



3. ábra A miozin-2-enzimkinetika és -motilitás diverzitása. A: Miozin-izoenzimek enzimikus ciklusidejének összehasonlítása, az aktinhoz kötött (szürke) és aktinról levált (fehér) állapotokban töltött időhányad feltüntetésével. B: Miozin-2-izoenzimek in vitro aktinmozgatási sebessége [3,4,20].

az NM2-izomformák gyakran dominánsan hozzájárulnak [9,13]. A húgyhólyag simaizom-falában például, ahol aktív kontrakcióra van szükség, elsősorban NM2A található, míg az aorta sima izmában, ahol a passzív erőtartás az elsődleges funkció, az NM2B van jelen nagyobb mennyiségben [9].

Mechanikai szabályozás: az NM2 kontraktilis és tehertartó üzemmódok közötti váltásra képes

A mechanobiokémia fontosságát egyre több megfigyelés jelzi, amelyek azt igazolják, hogy külső erőhatások egyes enzimek specifikus konformációváltozásait idézik elő, és így a biokémiai folyamatok rövid és hosszú távú szabályozásához járulnak hozzá [14,15]. Szerepéből és biokémiai sajátosságai-ból adódóan a miozin (különösen az NM2) az egyik legalkalmasabb kísérleti rendszer mechanobiokémiai effektusok vizsgálatára [16].

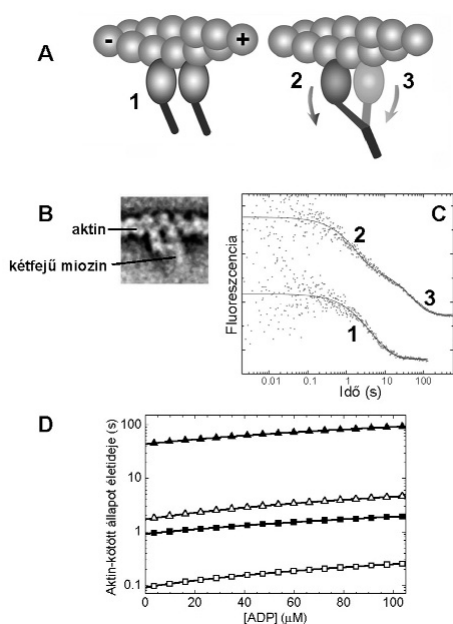
Az erőtartó szerep alapján sejtettük, hogy az NM2 működésének erősen terhelésfüggőnek kell lennie. Korábbi eredményekre építve kidolgoztunk egy olyan eljárást, amelynek segítségével a nukleotid-kötés és az ADP-felszabadulás, az ATPáz-ciklus két kulcslépése mechanikailag terhelt állapotban is vizsgálható oldatbeli körülmények között (4. ábra) [17]. Kiderítettük, hogy az NM2 állandósult állapotú kontrakciós ciklusának végén az ATP-hidrolízis-termék ADP távozása a legfontosabb kinetikai „kapu”, amely meghatározza az NM2 erős aktin-

kötő, azaz tehertartó állapotának életidejét. Ennek alapja az, hogy az ADP-kötött tehertartó állapotból való kilépéshez az ADP-nek először el kell távoznia a miozin aktív helyéről, hogy helyére ATP-molekula kötődhessen, amely az aktomiozin komplex disszociációját okozva új kontrakciós ciklust indít el.

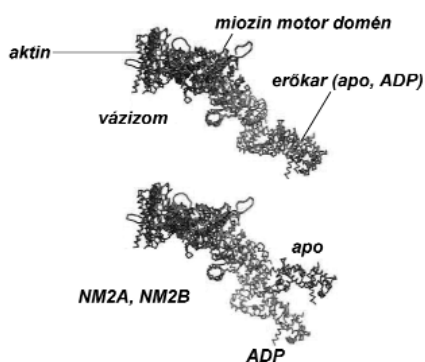
Adataink azt mutatták, hogy az ADP-felszabadulás kinetikája erősen terhelésfüggő (NM2B esetén még kifejezettebben, mint NM2A esetében), és ez a tulajdonság ellenirányú (a miozin mozgási irányával ellentétes) erő esetén az ATPáz-ciklus drasztikus lelassulását, illetve a terhelési arány növekedését okozza [17]. Az NM2 nagy ADP-affinitása révén az ADP által okozott termékgtátlás is hozzájárul a tehertartó működéshez (4. ábra). Ez a mechanikai szabályozó funkció lehetővé teszi, hogy ellenirányú terhelés esetén az NM2 az aktinkötött tehertartó állapot életidejének igen jelentős megnövelésével (amely ebben az állapotban több perccel is elérhető) rendkívül energiahatékony módon (alacsony ATPáz-aktivitás mellett) hosszú távú erőtartásra legyen képes. Ugyanezen jelenség azt is biztosítja, hogy asszisztáló (a miozin mozgási irányával megegyező irányú) erőhatás esetén az NM2-izomformák ATPáz-ciklusa felgyorsuljon, és terhelési aránya csökkenjen, így elkerülve azt, hogy a miozinok a gyorsabban mozgó motorok (például simaizom-miozin) által hajtott kontrakciót fékezzék.

Az ADP-felszabadulás terhelésfüggéséből arra is következtettünk, hogy az ADP-kötött és -mentes formák közötti átmenet során erőarmoizgásnak kell történnie. Ezt a feltételezést alátámasztotta egy másik munkánk, amelyben kisszögű röntgenszórás-kísérletekben az NM2-izomformák minden eddig vizsgált miozinnál nagyobb (közel 5 nm méretű) erőarmoizgást mutattak az ADP-felszabaduláshoz kapcsolatosan (5. ábra) [18]. Ez összhangban áll kinetikai és energetikai adataink alapján végzett számításainkkal is [17]. Jelenleg a korábban kidolgozott kinetikai mérési eljárás alkalmazásával vizsgáljuk, hogy a mechanikai terhelés hogyan változtatja meg az NM2 és más enzimek reakcióinak termodinamikai jellemzőit [19].

Számos, emberben előforduló NM2-mutáció súlyos betegséget (May-Hegglin-anómália, sükettség) okoz [8]. Mutáns miozinok enzimológiájának és motilitásának jellemzésével kimutattuk, hogy e mutációk az aktinaktiválás, a fehérjék stabilitásának megváltozása, az erőarmoizgás és így a motilitás akadályozása révén fejtik ki hatásukat [20].



4. ábra Az NM2-enzimkinetika terhelésfüggése. A: Egyfejű miozinkonstrukció (1) esetén a szomszédos aktinmonomerekhez kapcsolódó miozinfjek nyaki végei egymástól több nm távolságra helyezkednek el. Amikor egy kétfejű miozinkonstrukció mindkét fejével (2,3) aktinhoz köt, a fejekben különböző irányú mechanikai feszültségek jönnek létre. A „2” jelű fejre az aktin-filamentum „+” vége felé irányuló, asszisztáló erő, míg a „3” jelű fejre a „-” vég felé irányuló, ellenálló erő hat (nyilak). B: A kétfejű aktinkötött NM2 elektronmikroszkópos képe. C: Fluoreszcens mant-ADP-ligandum NM2B-fejekről történő disszociációjának tranziensei mechanikailag terheletlen (1) és terhelt (2,3) állapotokban (stopped-flow kísérlet). D: A miozinfjek aktinkötésének élettideje állandósult állapotú kontrakció során (üres jelek: NM2A, sötét jelek: NM2B, négyzet: 2 pN asszisztáló erő, háromszög: 2 pN ellenálló erő esetén) [17,23].



5. ábra Aktinkötött miozin-2-fejek kisszögű röntgenszórással és fehérjekristályszerkezet-dokkolással megállapított szerkezete nukleotidmentes (apo) és ADP-kötött állapotban [18]. A vázizom miozin-2 fehérjével (fent) ellentétben az NM2 (lent) jelelős (5 nm) erőkarlemozdulást mutat ADP-kötés hatására.

Az NM2 működése a simaizom-miozin-2 fehérjéhez hasonlóan a nyaki régió foszforilációja révén szabá-

lyozódik [21]. A kétfejű, defoszforilált miozin aszimmetrikus szerkezetet vesz fel, amelyben a két fej kölcsönösen akadályozza egymás ATP-áz és mozgató aktivitását [22]. A gátolt állapot biokémiai sajátosságai azonban jórészt ismeretlenek. Kimutattuk, hogy a blokkolt állapot csak ATP jelenlétében jön létre, más nukleotidállapotokban nem [23]. Jelenleg folyó munkáinkban jellemezni kívánjuk, hogy a gátolt állapot milyen aktinkötő sajátosságokkal rendelkezik, és részt tud-e venni az erőtartásban. Ezzel a simaizom-élettan egyik legfontosabb jelenlegi kérdését célozzuk meg, mivel az inaktív erőtartó molekula mibenléte és állapota ismeretlen. Munkáink között szerepel továbbá az NM2-működés erőfüggésének vizsgálata lézercsapda-kísérletekkel [24], valamint a nemrég felfedezett, a hallás folyamataiban szerepet játszó NM2C-izoforma működésének felderítése [25].

Irodalomjegyzék

- [1] De La Cruz, E. M., Ostap, E. M. (2004) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **16**: 61–67.
- [2] Kovacs, M., Wang, F., Sellers, J. R. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**: 15071–15083.
- [3] Wang, F., Kovacs, M., Hu, A., Limouze, J., Harvey, E. V., Sellers, J. R. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**: 27439–27448.
- [4] Kovacs, M., Wang, F., Hu, A., Zhang, Y., Sellers, J. R. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**: 38132–38140.
- [5] Toth, J., Kovacs, M., Wang, F., Nyitrai, L., Sellers, J. R. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**: 30594–30603.
- [6] Yang, Y., Kovacs, M., Xu, Q., Anderson, J. B., Sellers, J. R. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**: 32061–32068.
- [7] Yang, Y., Kovacs, M., Sakamoto, T., Zhang, F., Kiehart, D. P., Sellers, J. R. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **103**: 5746–5751.
- [8] Sellers, J. R. (1999) *Myosins*. Oxford University Press, New York.
- [9] Rhee, A. Y., Ogun, O., Brozovich, F. V. (2006) *Pflügers Arch.*, **452**: 766–774.
- [10] Wylie, S. R., Wu, P. J., Patel, H., Chantler, P. D. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**: 12967–12972.
- [11] Wylie, S. R., Chantler, P. D. (2001) *Nat. Cell Biol.*, **3**: 88–92.
- [12] Wylie, S. R., Chantler, P. D. (2003) Myosin IIA drives neurite retraction. *Mol. Biol. Cell*, **14**: 4654–4666.
- [13] Morano, I., Chai, G. X., Baltas, L. G., Lamounier-Zepter, V., Lutsch, G., Kott, M., Haase, H., Bader, M. (2000) *Nat. Cell Biol.*, **2**: 371–375.
- [14] Johnson, C. P., Tang, H. Y., Carag, C., Speicher, D. W., Discher, D. E. (2007) *Science*, **317**: 663–666.
- [15] Epstein, N. D., Davis, J. S. (2003) *Cell*, **112**: 147–150.
- [16] Howard, J. (2001) *Mechanics of Motor Proteins and the Cytoskeleton* (Sinauer Associates, Sunderland, MA., USA).
- [17] Kovacs, M., Thirumurugan, K., Knight, P. J., Sellers, J. R. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **104**: 9994–9999.
- [18] Iwamoto, H., Oiwa, K., Kovacs, M., Sellers, J. R., Suzuki, T., Wakayama, J., Tamura, T., Yagi, N., Fujisawa, T. (2007) *J. Mol. Biol.*, **369**: 249–264.
- [19] Sarlos, K., Thirumurugan, K., Knight, P. J., Sellers, J. R., Kovacs, M. (2007) *J. Muscle Res. Motil.*, **28**: 429.
- [20] Kim, K. Y., Kovacs, M., Kawamoto, S., Sellers, J. R., Adelstein, R. S. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**: 22769–22775.
- [21] Sellers, J. R., Pato, M. D., Adelstein, R. S. (1981) *J. Biol. Chem.*, **256**: 13137–13142.
- [22] Wendt, T., Taylor, D., Messier, T., Trybus, K. M., Taylor, K. A. (1999) *J. Cell Biol.*, **147**: 1385–1390.
- [23] Kovacs, M., Toth, J., Nyitrai, L., Sellers, J. R. (2004) *Biochemistry*, **43**: 4219–4226.
- [24] Veigel, C., Schmitz, S., Takagi, Y., Kovacs, M., Sellers, J. R. (2008) *Annu. Meeting Biophys. Soc.* accepted.
- [25] Golomb, E., Ma, X., Jana, S. S., Preston, Y. A., Kawamoto, S., Shoham, N. G., Goldin, E., Conti, M. A., Sellers, J. R., Adelstein, R. S. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**: 2800–2808.