

A miozin II motorfehérje mechanikai modellezése

PhD értekezés tézisei

Bibó András

Tudományos vezető:
Dr. Károlyi György

Külső konzulens:
Dr. Kovács Mihály

Budapest, 2012.

1. A kutatás előzményei és célkitűzései

Biológiai rendszerekben kiemelten fontos szerepet játszanak az enzimek. Ezek a makromolekulák bizonyos reakciókban – ha nem is reagensként, de – közreműködőként megjelennek. Reagensnek azért nem nevezhetők, mert míg a reagens a reakció során kémiai átalakuláson mennek keresztül, addig az enzimek egy körfolyamat lépéseit járják végig, a reakció végére pedig visszakerülnek kiindulási állapotukba. Kémiai értelemben tehát katalizátornak tekinthetők, szerepük azonban a „klasszikus” katalizátorokén messze túlmutat: sok biológiai folyamatban a reakció meggyorsítása másodlagos cél, sőt, sok esetben egyáltalán nem is az. Az enzimek működésének célja igen sokszor az, hogy egy adott reakció során a felszabaduló energiát hasznosítsák az élőlény szempontjából fontos célra.

Az enzimek egy speciális csoportját alkotják az ún. *motorfehérjék*, melyeknek legfőbb jellegzetessége, hogy az enzim által katalizált reakció reagenséből (az ún. *szubsztrátból*) a felszabaduló energiát magas hatásokkal képesek mechanikai energiává alakítani.

Dolgozatomban a vázizom miozin II mechanikai modellezését tűzte ki célul. Ez az enzim – ahogy a neve is mutatja – a vázizom összehúzódásáért felelős. (Vannak egyéb miozin II-esek is: szívizom, simaizom, ezekkel a dolgozatban nem foglalkoztunk, ami alól kivétel az értekezés 2. fejezete, melyben a kapott eredmények minden olyan motorfehérjére alkalmazhatók, amelyek két mechanikai funkciót betöltő helye van.) Az izom alapegységében, a *szarkomerben* közel 300 miozin molekula dolgozik együtt egy kötélműzítő csapatra emlékeztető együttműködésben. A miozin molekulák – kábel-szerűen összerendeződve – egy fehérjekötélen, az *aktinon* haladnak az összehúzódás során, miközben enzimciklusonként egy adenosin-trifoszfát (ATP) molekulát adenosin-difoszfáttá (ADP) és szervetlen foszfátiónná (Pi) alakítanak. Az ATP bár kémiai értelemben szubsztrát, mechanikai szempontból azonban inkább üzemanyag-nak tekinthető. A miozinnak négy üteme van, melyek közül az egyik a *munkaiütem* – ennek során az adott miozin aktívan részt vesz az erő kifejtésben – a maradék három ütem azonban egy a kötélműzítő fogásváltásához hasonló mozdulatsorozat, mely alatt az adott molekula a többi erő kifejtő tag segítségével passzívan utazik együtt a „csapattal”.

A miozin működésének vizsgálatát nem csak rendkívül kicsi mérete nehezíti meg, hanem a szarkomerben való együttdolgozás során fellépő bonyolult és nagyon nehezen vagy alig mérhető kölcsönhatások is.

A miozin II-es viselkedésének leírására sokféle modell készült a makroszkopikus mechanikai modellektől kezdve az enzimkinetikai modelleken át a molekuláris dinamikai szimulációkig. A főként a XIX. században és a XX. század elején „klasszikus” mechanikai elemekkel (lineáris rugó, ideális csillapítás, stb.) kifejlesztett makroszkopikus modellek a mai ismeretek alapján már nem kellő pontosságúak, ezért ma már nem használatosak.

Az enzimkinetikai modellek sok kérdésre választ adtak és jelenleg is dinamikusan fejlődnek, hátrányuk azonban, hogy többé-kevésbé önkényesen, vagy nem kellően tisztázott feltételeken alapuló diszkrét állapotok sorozatával közelítik a miozin folyamatos mozgását. A folyamatos mozgást több párhuzamos állapotsorral modellezik, amelyekben az oda- és a visszaalakulásnak a valószínűségei mutatják meg a legvalószínűbb útvonalat, ami motorfehérjék esetében gyakran függ a molekulára jutó terheléstől, ám ezek a modellek olyan lényeges mechanikai vonatkozásokat, mint a terhelés *iránya* már csak nagyon nehézkesen, vagy egyáltalán nem képesek figyelembe venni.

A miozin bonyolult működésének mechanikai vonatkozásait a kinetikai modelleknél jóval pontosabban és részletesebben tárják fel a molekuláris dinamikai modellek, melyek a miozint

alkotó atomok mozgását kísérlük meg leírni dinamikai egyenletek alapján. Bár ezek a kinetikai modelleknél megbízhatóbban követik a molekula mozgását, mégis igen sok megoldatlan probléma és kérdés állja útját ennek a megközelítésnek. Az egyik, hogy a miozin atommagjainak száma megközelíti a 10 ezret (ez 30 ezer körüli szabadságfokot jelent). A másik, hogy az atomok nagy elmozdulásokat végeznek, ráadásul a lehetségesen fellépő ütközések és megakadások durva nemlinearitáshoz vezetnek, nagyságrendekkel megnövelve a számítási időt. További probléma, hogy az atomi szinten igen fontos hőrezgések rendkívül kicsi időlépést írnak elő, tovább növelve a számítási időt. Nem kis nehézség az sem, hogy a lehetséges megakadások miatt a szimulációk a rendkívül bonyolult potenciálfüggvényen igen könnyen eltévednek és kikötnek egy lokális minimumnál, amelyen a valóságos molekula a hőrezgések miatt igen gyorsan túljut.

A fentiek fényében vált világossá számunkra, hogy milyen nagy lehetőségek rejlenek egy olyan modellben, amely a lehető legalacsonyabb szabadságfokszámmal kísérli meg leírni a miozin mozgását. Az eddig elért eredmények és a fennálló kérdések fényében a kutatás célkitűzéseit az alábbiakban foglaltuk össze:

1. Fel kívántunk állítani egy alacsony szabadságfokú rendszert, mely képes modellezni egy olyan motorfehérje mozgását, melynek kettő mechanikai funkciót betöltő helye van. (A miozin esetében a két funkció az aktin kötés és az emelőkar elfordulása.)
2. Minimalizálni kívántuk a rendszerbe való önkényes beavatkozások számát, és célul tűztük ki egy olyan modell megalkotását, mely a miozin négy ütemét követő mozgást végez, a különböző állapotok között folyamatos átmenettel.
3. A miozin molekula haladóképeségét a molekula belső tulajdonságaként követeltük meg, mivel az eddigi modellek a haladóképeséget egy külső, nem szimmetrikus geometriai kényszer segítségével érték el, melynek létezését egyetlen kísérlet sem igazolja.
4. A modelltől megköveteltük a miozin II-vel kapcsolatos kísérleti eredményekkel egyező mechanikai viselkedést.
5. A hőrezgések figyelembevételével választ kívántunk adni arra a kérdésre, hogy a miozin mechanikai munkavégzése hőretesz-szerű (thermal ratchet) avagy relaxációs mechanizmussal történik-e.
6. A miozin munkaüteme körüli tisztázatlan kérdések megválaszolásával magyarázatot kívántunk adni arra az ellentmondásra, hogy az izom makroszkopikus mérésekből adódó hatásfoka (közel 55-60 százalék) jóval magasabb annál, mint amit az egyedi miozinmolekulákon kimértek, ahol ez az érték nem volt magasabb 15 százaléknál.

2. Az értekezés felépítése, az elvégzett vizsgálatok

A dolgozat első fejezete az izom összehúzódással kapcsolatos első kísérletekből és az azokból felállított modellekből kiindulva a miozin II-vel kapcsolatos kutatások eddig elért eredményeit foglalja össze. Ugyanebben a fejezetben mutatjuk be a különböző tudományágakban a miozin II vizsgálatára kialakult elméleti és kísérleti módszereket, a fejezet végén pedig felsoroljuk azokat az eddig megválaszolatlan kérdéseket, melyekre a kutatás során választ kaptunk.

A dolgozat második fejezetében a – minden motorfehérjére jellemző – túlcillapítás figyelembe vételével egy egyszerű mechanikai modellt mutatunk be, amellyel minden olyan motrofehérje jellemezhető, melynek kettő mechanikai funkciót betöltő helye van. Megmutatjuk, hogy a csillapítási középpont figyelembe vételével térbeli és időbeli szétválasztás érhető el, mellyekkel a két különböző mechanikai funkciót ellátó részen különböző nagyságú és különböző lecsengésű elmozdulásfüggvények állíthatók elő.

A harmadik fejezetben a második fejezet eredményeit a miozin II-re alkalmazzuk: a miozin fejrészébe beépítve a szétválasztó mechanizmust a rendszerünket egy szimmetrikus geometriai kényszeren működtetjük. A szabadságfokok száma a geometriai kényszerrel való kapcsolattól függően 2 és 4 között változik.

A miozin működése során – és így a modellben is – fellépő nagy elmozdulások miatt a rendszer viselkedését egy elsőrendű, nemlineáris közönséges differenciálegyenlet-rendszer írja le. Matriks-aritmetikai felírásban a nemlinearitás úgy jelenik meg, hogy mind a csillapítási, mind pedig a merevségi mátrix függ az elmozdulásoktól, így esetünkben nem konstans, hanem érintő mátrixaink vannak. Bár a számításokhoz használt numerikus módszer – modellünk alacsony szabadságfoka miatt – az egyenletrendszert mátrixműveletek nélkül, közvetlenül oldja meg, valójában nem tesz mást, minthogy az adott pillanathoz tartozó érintő csillapítási és merevségi mátrixok alapján számítja a következő pillanathoz tartozó elmozdulásvektort. A szimulációt végző programot C nyelven írtam, mely negyedrendű Runge-Kutta módszerrel számítja ki a differenciál-egyenlet rendszer közelítő megoldását.

A numerikus szimuláció elkészültét a paraméterek meghatározása követte, mely során mind a merevségi, mind pedig az energetikai jellemzők tekintetében is egy, a miozin II viselkedésével egyezően működő rendszert kaptunk. A 3. fejezet végén megmutatjuk, hogy ez az alacsony szabadságfokú modell a miozin II viselkedését jól követi, a 2. tézisben felsorolt kísérleti eredményekkel egyező viselkedést mutat.

A dolgozat utolsó, negyedik fejezetébe a miozin molekula alrészének pontos geometriáját figyelembe vevő modell került, amely 7 merev elemből áll. Jelentős továbblépés a megelőző fejezethez képest, hogy a molekuláris szinten mindig jelenlévő hőrezgések hatását figyelembe vesszük. A modell geometriai paramétereit nem mi választottuk, ezeket a miozin II-ről rendelkezésre álló elektronsűrűség-térképek alapján vettük fel. Bár egy nagyon egyszerű – a belső elemek közötti kényszerekkel kapcsolatos – feltevés révén a modell szabadságfokainak száma nem növekedett, a rendszer az előző modellhez képest összetettebb, a nemlineárist tovább növelő kényszerkapcsolatokkal rendelkezik. A feladat megoldására két alternatíva merült fel. Az első lehetőség az előző fejezethez hasonló – a szabadságfokok számának csökkenését figyelembe vevő – levezetés lett volna, ám ez rendkívül bonyolult, nemlineáris, trigonometrikus egyenletrendszerek megoldását kívánta volna, így ezektől eltekintve más megoldási módszert alkalmaztunk: a hőrezgések megfelelő figyelembevételére olyan kicsi időlépést írt elő, amely esetében a legegyszerűbb numerikus módszer, az Euler-módszer is kellően pontos megoldást adta a differenciálegyenlet-rendszernek oly módon, hogy egy végtelen merev helyett egy rugalmas elemekből álló külső kényszert alkalmaztunk, mely a számítások szempontjából kellően pontos eredményekre vezetett.

A szimulációs program megírását a paraméterek meghatározása követte, melyek közül a csillapítási együtthatókat az elemek legtöbbjében a valós geometria és a miozint körülvevő folyadék viszkozitása alapján vettük fel, míg a merev elemeket összekapcsoló három rugó merevségét úgy választottuk meg, hogy a különböző állapotok energiaszintjei a kísérletekben kapottakkal megegyezzenek. Ezek alapján olyan modellt kaptunk, amely a harmadik tézisben

felsorolt kísérleti eredményekkel egyező viselkedést mutat.

Ugyancsak a 7 elemből álló hőrengéses modellel sikerült választ kapnunk arra a kérdésre, hogy a miozin működésében a hőrengés-szerű avagy a relaxációs mechanizmus-e a meghatározó. Mint kiderült a két hatás együtt van jelen: geometriai értelemben a relaxációs mechanizmus nevezhető meghatározónak, ugyanis ekkor lép fel az emelőkar elfordulásának közel 85 százaléka, ezt azonban megelőzi egy hőrengés mechanizmus, amely alatt a relaxációs szakasz erőit jóval felülmúló erők működnek, kis elmozdulások kíséretében. Az erők szempontjából tehát a hőrengés bizonyult meghatározónak. Emellett a munkaiütemmel kapcsoltos szimulációk feloldották a makroszkopikus és az egyedi molekulákon mért határfok értékek közötti látszólagos ellentmondást is. Az elvégzett szimulációk a munkaiütem folyamatának mélyebb megértését tették lehetővé, ami alapján kimondtuk a dolgozat negyedik tézisét.

3. A kutatás eredményei, tézisek

A kutatások eredményeképpen az alábbi négy tézist lehetett megfogalmazni.

1. tézis. *Megalkottam egy túlcillapított mechanikai rendszert, amely a mozgások térbeli és időbeli szétválasztásával olyan motorfehérjék modellezésére alkalmas, melyeknek kettő mechanikai funkciót betöltő helye van. A vizsgált rendszer leírása során bevezettem a csillapítási középpont fogalmát, mely a nem elhanyagolható tömegű rendszerek tömegközéppont fogalmával mutat analógiát. ([1] publikáció alapján.)*

2. tézis. *Három merev testből álló mechanikai modellt alkottam a miozin II-re, amely képes modellezni a motorfehérje négyütemű enzimeciklusát. A modell szakaszonként különböző exponenciális mozgásfüggvényeket ad, a következő kísérleti eredményekkel egyező viselkedést mutatva:*

- *Enzimeciklusonként egyszer van energia betáplálva a rendszerbe, az ATP hidrolízisének megtörténtekor.*
- *Az enzimeciklus megakad, ha a miozin nincs kötőhely közelében, így gátolva van a miozin energiapazarló működése.*
- *Az enzimeciklus periódusideje nő a teher növekedésével.*
- *A miozin aktinhoz kötött idejének a teljes periódusidőhöz viszonyított aránya (azaz a kapcsoltsági hányados) a teher növekedésével együtt nő.*
- *Létezik egy tétlenségi teher, melyet elérő vagy meghaladó terhelés esetén az enzimeciklus leáll.*
- *ATP hiányában a miozin az aktinhoz erősen kötött állapotban marad, és ekkor csak egy igen magas teher képes csak a miozint az aktinról leszakítani.*
- *A munkaiütem alatt a miozint az aktinhoz kötő erő folyamatosan nő.*
- *A rendszer energiagörbéje a kísérleti eredményekre illeszkedik.*

([3] publikáció alapján.)

3. tézis. Megalkottam egy kiterjesztett modellt a miozin II-re. A hét merev testből álló rendszer elemei a kísérleti eredményekből nyert geometriai paraméterekkel rendelkeznek. Figyelembe vettem a hőrengés okozta véletlen hatásokat ebben a kiterjesztett modellben, amely a következő, kísérletekben megfigyelt tulajdonságokkal rendelkezik:

- Az enzimeciklus során a miozin II alrészeinek egymáshoz képesti elmozdulása megegyezik a kísérletekben megfigyelt értékekkel.
- Enzimeciklusonként egyszer van energia betáplálva a rendszerbe, az ATP hidrolízisének megtörténtekeor.
- Az enzimeciklus megakad (azaz jóval kevésbé valószínű), ha a miozin nincs kötőhely közelében, így gátolva van a molekula energiapazarló működése.
- Létezik egy tétlenségi teher, melyet elérő vagy meghaladó terhelés esetén az enzimeciklus leáll.
- ATP hiányában a miozin az aktinhez erősen kötött állapotban marad, és ekkor csak egy igen magas teher képes csak a miozint az aktinről leszakítani.
- A munkaiütem alatt a miozint az aktinhez kötő erő folyamatosan nő.
- A rendszer energiagörbéje a kísérleti eredményekre illeszkedik.

([2] publikáció alapján)

4. tézis. Feltártam a miozin II munkaiütemének egy eddig rejtett részét, amely feloldotta a makroszkopikus hatásfokmérések és az egyedi molekulákon végzett kísérleti eredmények között feszülő látszólagos ellentmondást. A munkaiütemet két részre választottam szét, és megmutattam, hogyan ötvöződik a miozin II-ben egy hőretesz (Kramers) mechanizmus egy relaxációs (Eyring) mechanizmussal. ([2] publikáció alapján.)

4. Az eredmények hasznosítása, további kutatási irányok

A dolgozatban a miozin II mechanikai modellezésével foglalkoztunk. Kézenfekvő további kutatási irány a miozinok családjának többi tagjára való alkalmazása a modellnek, mivel a miozinok mindegyike teljesíti az első fejezetben és az első tézisben előírt feltételt. További kutatási irányként merül fel egy másik motorfehérjére a *kinezinre* való alkalmazás lehetősége.

A dolgozat harmadik fejezetében ismertetett modell megmutatta, hogy egy rendkívül egyszerű mechanikai rendszer is képes a miozin bonyolult működésével egyező viselkedést mutatni, ami egy igen érdekes további kutatási irányt jelöl ki: a rendszer egyszerű volta a mesterséges izom megtervezésének lehetőségét veti fel, mellyel a valóságos izomszövettel egyező viselkedésű rendszer lenne előállítható. Mivel a modell hőrengések nélkül is a miozinhoz hasonló viselkedést mutatott, felmerül a lehetősége, hogy a mesterséges izmot a miozin méreteit jóval meghaladó mérettartományban tervezzük meg, ahol a hőrengések által előidézett (és a negyedik tézisben feltárt) hőretesz mechanizmusra már nem számíthatunk.

A dolgozat negyedik fejezetében kiolvasható, hogy a miozin hogyan képes ötvözni a magas mechanikai munkavégzés képességét a hőrengések zaját kiszűrő nagy pontosságú tehermérés

követelményével. A rendszerben fellépő nagy elfordulások miatt a hajlító és a húzómerevségnek a teherhordásban való részvétele folyamatosan és nagymértékben változik, a miozin II pedig éppen ezt a jelenséget használja ki: a miozin egyik elemének, az *emelőkar* elfordulási merevségének és az ahhoz csatlakozó, kötélszerű S2 elem húzási merevségének megfelelő aránya képessé teszi a két követelmény – a munkavégzés és a pontos mérés – egyidejű teljesítésére.

A miozin II emelőkaros teherviselési mechanizmusa tehát egy igen meggyőző példát ad arra, hogyan kell a motorfehérjék nanométeres mérettartományában nagy mechanikai határfokot elérni. Bár a dolgozat szerzője nem jártas kellően a nanogépek dinamikus fejlődő világában, mégis úgy érzi, hogy az e területen működő kutatótársainak is tanulsággal szolgál a miozin II működése, amelynek utánzásával egy egyszerű, ám mégis hatékony rendszer építhető nagy erő kifejtő képességgel és pontos érzékelésen alapuló belső vezérléssel.

Publikációk az értekezés témakörében

Magyarországon megjelent idegen nyelvű folyóiratszövegek

- [1] Bibó, A., Károlyi Gy., Kovács M. (2010): Spatial and temporal separation in overdamped systems. *Periodica Polytechnica Ser. Civ. Eng.* 54/2:89–94
- [2] Bibó A., Károlyi Gy., Kovács M. (2012): Fluctuation and dissipation in a mechanical model of myosin II. *Periodica Polytechnica Ser. Civ. Eng.*, közlésre elfogadva.

Nemzetközi konferenciakiadványban megjelent konferenciák

- [3] Bibó A., Károlyi Gy., Kovács M. (2010): Internal Lever Arm Model for Myosin II. *IUTAM Symposium on Dynamics Modeling and Interaction Control in Virtual and Real Environments* Budapest, 2010. június 7-11., pp. 155–163.

Magyar nyelvű konferenciakiadványban megjelent konferenciák

- [4] Bibó A. (2007): Motorfehérjék mechanikai modellezése. *Doktori kutatások a BME Építőmérnöki Karán, 2007. november 14.*, Budapest, pp.139–146.

Csak kivonatban megjelent nemzetközi konferencia-előadások

- [5] Bibó A., Károlyi Gy., Kovács M. (2009): A visco-elastic myosin model. *17th Inter-Institut Seminar for Young Researchers*, Krakko.
- [6] Bibó A., Károlyi Gy., Kovács M. (2010): Internal Lever Arm Model for Myosin II. *81st Annual Meeting of the International Association of Applied Mathematics and Mechanics*, Karlsruhe, Germany.
- [7] Bibó A., Károlyi Gy., Kovács M. (2011): Internal Lever Arm Model for Myosin II. *SIAM Conference on Applications of Dynamical Systems*, Snowbird, UTAH.

- [8] Bibó A., Károlyi Gy., Kovács M. (2011): Internal Lever Arm Model for Myosin II. *Wellcome Trust Focused Meeting – Cellular Cytoskeletal Motor Proteins*, Hinxton, Cambridge, UK.
- [9] Bibó A., Károlyi Gy., Kovács M. (2011): Internal Lever Arm Model for Myosin II. *Gordon Conference on Muscle & Molecular Motors*, New London, NH, USA.

Egyéb publikáció

- [10] Bibó A., Károlyi Gy., Bóday T.(2009): Fly-wheel model exhibits the hither and thither motion of a bouncing ball. *International Journal of Non-Linear Mechanics* 44: 905–912,