

Zárójelentés

OTKA K 60665

A kutatásaimat az eredeti pályázattal összhangban az alábbi három biológiai fizikai témakörben végeztem. A kutatási projekt keretében megjelent 8 tudományos cikkünk, melyek összesített impaktfaktora 37.816 (további 4 publikáció beküldés, illetve megírás alatt áll).

1. Molekuláris motorok

A mitotikus orsó kialakulásáért, valamint számos intracelluláris mozgásért felelős kinezin az egyik legismertebb motorfehérje, működési mechanizmusa viszont máig nem teljesen értett és aktív kutatás tárgya. A '90-es évek közepén megjelenő első egymolekulás kísérleti adatok számos egyszerű (ún. Brown racsnitípusú) modell megszületését inspirálták. Az azóta is rohamos ütemben gyarapodó kísérleti eredmények azonban sorra rációfoltak ezekre a modellekre, és már a '90-es évek végére egyértelművé vált, hogy az eredmények értelmezéséhez (többek között a kinezin két feje közötti koordináció megértéséhez) lényegesen eltérő és részletesebb modellre lenne szükség. A modellalkotás előrelátható komplexitása azonban hosszú évekre megakasztotta ezt a folyamatot. Mígnem a jelen projekthez kapcsolódó kutatásaink kezdetén fel nem ismertük, hogy a kinezin két fejét néhány jól meghatározott állapottal jellemezve (a mikrotubulus kötése, a nukleotidkötés, valamint a neck-linker dokkolása alapján megkülönböztetve), a két fejet összekötő egy-egy neck-linkert pedig szemiflexibilis polimerláncként leírva, termodinamikailag konzisztens módon felépíthető a dimerikus kinezin molekula teljes kinetikai modellje [2][8].

Az így felállított modell paramétereit szimulált hőkezeléssel kiegészített Monte-Carlo szimulációk segítségével határoztuk meg. Nagy meglepetésünkre és örömünkre a paraméterkeresés egyetlen jól definiált paraméterhalmazt eredményezett, amely komoly egyezést mutatott a kísérletileg meghatározott paraméterekkel. A kapott paraméterhalmaz segítségével a modell képes reprodukálni a kísérleti adatok széles halmazát (sebesség, lépésidő, randomness, processzivitás, hidrolízis ráta, stb.) különböző körülmények között (nukleotid koncentráció, terhelő erő, neck-linker hossza és összetétele, stb.), alátámasztva a modellünk helyességét.

Elsőként sikerült tehát a kinezinnek egy olyan részletes kinetikai modelljét megalkotnunk, amely hűen visszaadja a kinezin lépési mechanizmusának részleteit; természetesen magyarázatát adja annak, hogy a neck-linkerek miként képesek szinkronizálni a fejek kinetikáját (a neck-linkerek mechanikai feszültsége által vezérelt gating folyamatokon keresztül); és prediktív erővel bír akár vad típusú, akár módosított kinezinokkal végzett kísérletek kimenetelét illetően.

A molekuláris motorok egy egészen más családját alkotják a DNS és RNS molekulák mentén haladó motorfehérjék. Ezek kísérleti jellemzésének egyik legfontosabb állomása a kinetikai sebességi állandók, a processzivitás, valamint a mechanokémiai csatolás kvantitatív meghatározása. Az ELTE Biokémiai Tanszékén Kovács Mihály csoportjával együttműködve dolgoztunk ki egy olyan új és hatékony módszert, amely különböző hosszúságú DNS és RNS szálakkal elvégzett stopped-flow kísérletek esetén a motorfehérjék által elhidrolizált NTP molekulák mennyiségének mérése alapján határozza meg a kérdéses mennyiségeket [6].

A motorfehérjék dinamikájának és konformációváltásainak tanulmányozása során érdeklődésünk kiegészült a fehérjék konformációváltásai során fellépő belső súrlódás vizsgálataival is. A fehérjék konformációváltását ugyanis nemcsak a külső közegben való súrlódás, hanem saját belső súrlódásuk is fékezi. Ugyanakkor a belső súrlódásnak mind a fizikai eredete, mind pedig a jelentősége máig ismeretlen. Annak ellenére van ez így, hogy a belső súrlódás egy alapvető jellemzője a konformációváltásoknak, és számos kísérleti és elméleti próbálkozás történt ennek feltárására. A kísérleti munkát nagyban nehezíti az a tény, hogy a belső súrlódásra elsősorban a külső közeg viszkozitásának a megváltoztatása segítségével lehet következtetni, a viszkozitásváltoztatáshoz használt adalékanyagok viszont kölcsönhatnak magukkal a vizsgált fehérjékkel is, megváltoztatva dinamikai tulajdonságaikat. Az ELTE Biokémiai Tanszékén Málnási-Csizmadia András csoportjával együttműködve kezdtük el kutatni ezt a jelenségek körét a tripszin nevű fehérje egyik konformációváltásának vizsgálatával (viszonylag alacsony adalékkoncentrációk mellett). Első eredményeink, amelyek többek között arra utalnak, hogy a belső súrlódás egy aktivációs folyamat következménye és jelentősen függ a fehérje flexibilitásától, nemrég kerültek publikálásra [7]. Ebben a cikkben javaslatot tettünk egy félig fenomenologikus elméleti magyarázatra, amely két flexibilisen csatolt reakciókoordinátára bontja az átalakulás folyamatát, melyek közül az egyik áll kapcsolatban a külső közeggel, míg a másik a fehérje érdes belső energiefelzínével. Ezen modell részletes elméleti és numerikus vizsgálatán jelenleg is dolgozunk.

2. Membrándinamika

Forgács Gábor csoportjában a Univ. of Missouri (Columbia) egyetemen mágneses csipesszel megfogott szuperparamágneses mikrogöngyök segítségével húznak ki felületi nanostruktúrákat tumorsejtekből, és a nanostruktúrák elszakadásainak detektálásából próbálnak meg következtetéseket levonni a nanostruktúrák, valamint a mikrogöngyökkel való kölcsönhatásuk tulajdonságait illetően. Ezek a kutatások az áttétek képződésének megértését szolgálják, hiszen az erekben áramló tumorsejtek is hasonló nanostruktúrák segítségével tapadhatnak meg az érfalakon. Hosszú ideig úgy tűnt, hogy a kihúzott nanostruktúrák membrán eredetű nanocsövek, így a jelen OTKA

projekt keretében a nanocsövek képződésének és gyöngyről való leszakadásának az elméleti leírásán keresztül vettünk részt a kutatásokban. Az évek során azonban egyre több olyan bizonyíték került elő, amely arra utal, hogy a kihúzott nanostruktúrák inkább az extracelluláris mátrixból származnak. Az eddigi eredményeink átértelmezése és az ehhez kapcsolódó kézirat megírása folyamatban van.

Az utóbbi időben a figyelem központjába került a biológiai vagy mesterséges eredetű membrán vezikulumok felületre történő kitapadása, valamint az azt követő kiszakadása. Elméleti számolásainkkal ezen témakör számos alapvető jelenségének fizikai hátterét tártuk fel. Egyrészt magyarázatot adtunk arra, hogy töltött lipidek jelenléte miért segíti kevésbé a vezikulumok kiszakadását töltött felületre való letapadás után, mint ahogy azt naivan várnánk; másrészt megmutattuk, hogy az adhézió, illetve a felületen már jelenlévő szabad membrán él miként gyorsítja fel a kiszakadás folyamatát; harmadrészt pedig megmutattuk, hogy porózus felszínnek esetén milyen feltételek mellett és milyen mértékben türemkednek be a vezikulumok a pórusokba, illetve meghatározzuk a rendszer paramétereinek függvényében az egyensúlyi állapotokat is. Eredményeinket poszter formájában mutattuk be a Magyar Biofizikai Társaság XXIII. kongresszusán, két kézirat pedig megírás alatt áll.

A projekt membrándinamikai témakörének talán legjelentősebb irányvonalává annak a folyamatnak az elméleti és numerikus módszerekkel való megértése vált, amely során a membrán vezikulumok szilárd felületre kitapadnak, deformálódnak, majd a felületi adhézió által megfeszített membránjuk egy vagy több spontán keletkező tranziens kiszakadás után kiterül a felületre. Ezt a jelenséget korábban még senki sem jellemezte. Vizsgálatainkban egyszerre vettük figyelembe a spontán lyukképződés és -záródás dinamikáját; ennek hatását a membrán mechanikai feszültségére és a lyukon keresztül történő folyadékáramlásra; valamint a letapadási front haladását és ennek a membránt megfeszítő hatását. Eredményeink rávilágítanak arra, hogy milyen paraméterek mellett várható gyors kiszakadás (és ún. supported lipid bilayer képződés), valamint hogy a paramétereiktől függően miként zajlik le a kiszakadás teljes folyamata. Ezen eredményeket a napokban mutattuk be a 8. Európai Biofizikai Kongresszuson poszter formájában (amelyet a legjobb diák poszter kategóriában díjaztak). Kézirat megírása is folyamatban van.

3. Evolúcióelmélet

Sikerült felállítanunk egy olyan evolúcióbiológiai modellt, amely magyarázatot ad a természetes genetikai transzformáció mechanizmusának fenntartására baktériumokban [1]. Ennek lényege, hogy ha a baktériumok különálló populációkban élnek (amelyekben a környezeti változók, pl. táplálékforrások, egymástól függetlenül változnak), akkor a populációk közötti gyenge migráció előnyössé teheti a természetes

genetikai transzformációért felelős gének meglétét. A transzformáció ugyanis azt jelenti, hogy a baktérium idegen géneket vesz fel és építi be a saját kromoszómájába. Így egy környezeti változás után az ilyen baktériumok képesek lehetnek felvenni a migránsok által beszállított, éppen hasznossá váló géneket, majd ezeket elterjeszteni az egész populációban a genetikai transzformációért felelős génekkel együtt.

A modell kulcseleme a populációk közötti gyenge migráció, amely egy újfajta térbeliséget jelent a populációk dinamikájának modellezésénél gyakran használt explicit térbeliség (pl. rácsmodellek), valamint az átlagtér-közelítés mellett. Így természetesen adódott, hogy a modellünk általánosításával vizsgáljuk a térbeliség szerepét evolúciós játékelméleti problémákban. Konkrétabban, bevezettünk egy minimális populációstruktúrát, amelyben az egyedek kölcsönhatása két különböző (egy lokális és egy globális) szinten zajlik hierarchikus módon. Ezt a populációstruktúrát alkalmaztuk az ismételt fogoly dilemma játékra, valamint a kő-papír-olló játékra, és olyan jelenségeket sikerült reprodukálnunk, amelyeket korábban csak részletes térbeli modellek segítségével lehetett [4]. Az általunk bevezetett minimális populációstruktúra egyik legnagyobb előnye éppen az, hogy képes feltárni, hogy a megfigyelt jelenségért mennyire felelősek a térbeliség részletei, vagy akár már a legegyszerűbb térbeliség megléte is elégséges.

Ismeretes, hogy az RNS szerkezetek mutációval szembeni robusztussága erősödhet azáltal, hogy a természetes szelekció a genotípusok populációját a neutrális altér belseje felé fókuszálja. Megmutattuk, hogy a robusztusságot jelentősen javítja, ha a populációban genetikai rekombináció is történhet [3].

Egy másik munkánkban azt a kérdést vizsgáltuk, hogy mikro-RNS molekulák genetikai és környezeti robusztussága között van-e kapcsolat. Megfelelő mérőszámokat bevezetve a robusztusság jellemzésére sikerült kimutatnunk, hogy a kétféle robusztusság között jelentős korreláció tapasztalható, megcáfolva ezzel Borenstein és Ruppin korábbi eredményeit [5]. Ez alapján valószínűsíthető, hogy a genetikai robusztusság kialakulását nagyban segíti a környezeti stabilitásra történő szelekció.

Egyéb tudományos tevékenység

A fentiekén kívül a pályázat három éve alatt még további 6 tudományos cikkem született a komplex hálózatok témaköréből (amely nem része a jelen OTKA pályázatnak).