

A KINEZIN LÉPÉSI MECHANIZMUSÁNAK  
FELTÁRÁSA EGY TERMODINAMIKAILAG  
KONZISZTENS MODELL SEGÍTSÉGÉVEL

**Czövek András**

Doktori értekezés

Témavezető: **Dr. Derényi Imre**, egyetemi docens, az MTA doktora

Eötvös Lóránd Tudományegyetem

Biológiai Fizika Tanszék

2009



Fizika doktori iskola

A doktori iskola vezetője: **Prof. Horváth Zalán**, akadémikus

Statisztikus fizika, biológiai fizika és kvantumrendszerek fizikája program

Programvezető: **Prof. Kürti Jenő**, az MTA doktora



# Tartalomjegyzék

<b>1. Bevezetés</b>	<b>5</b>
<b>2. A kinezin-1 általános jellemzői</b>	<b>9</b>
2.1. A kinezin szerepe a sejtben . . . . .	13
2.1.1. Endoplazmikus retikulum . . . . .	13
2.1.2. Sejtszervecske- és vezikulum szállítás . . . . .	13
2.1.3. Sejtosztódás . . . . .	15
<b>3. A kinezin-1-gyel kapcsolatos mérési technikák</b>	<b>17</b>
3.1. Kinezin koncentráció . . . . .	17
3.2. A nukleotid-kötőhelyek koncentrációja . . . . .	18
3.2.1. Kötődés nitrocellulózhoz . . . . .	18
3.2.2. Gélszűrés . . . . .	19
3.2.3. Fehérjedetergens alkalmazása . . . . .	19
3.3. Egyensúlyi állapot előtti kinetika . . . . .	19
3.3.1. Quench-flow mérések . . . . .	20
3.3.2. Pulse-chase mérések . . . . .	20
3.3.3. Stopped-flow mérések . . . . .	21
3.4. Másodpercenkénti és lépésenkénti ATP hidrolízis . . . . .	22
3.5. ATP szintézis . . . . .	22
3.6. Motility assay . . . . .	23
3.7. Optikai csipeszes mérések . . . . .	23
3.8. A neck linker dokkolásának szabadenergiája . . . . .	26

<b>4. Teljes, termodinamikailag konzisztens modell</b>	<b>29</b>
4.1. Állapotok . . . . .	30
4.2. Az átmenetek erőfüggése . . . . .	31
4.2.1. Gyors folyamatok . . . . .	32
4.2.2. Kétdimenziós állapottér . . . . .	33
4.3. Termodinamikai konzisztencia . . . . .	34
4.4. Polimer modell . . . . .	37
4.4.1. A szabad fej sűrűsége a kötőhelyen . . . . .	39
4.4.2. A NL dokkolásának valószínűsége . . . . .	41
4.4.3. A polimermodell kísérleti vonatkozásai . . . . .	41
4.5. Termodinamikai dobozok alkalmazása . . . . .	45
4.6. A kinetikai modell implementálása . . . . .	46
<b>5. Eredmények</b>	<b>49</b>
5.1. Vad típusú kinezinek . . . . .	49
5.2. Mutáns kinezinek . . . . .	57
5.3. A modell kísérleti ellenőrzése . . . . .	60
5.4. „Power stroke” vagy „biased diffusion”? . . . . .	61
5.5. Konklúzió . . . . .	62
<b>6. Összefoglalás</b>	<b>63</b>
<b>A Táblázat</b>	<b>67</b>
<b>B A gyakrabban előforduló jelölések és rövidítések listája</b>	<b>71</b>

# 1. fejezet

## Bevezetés

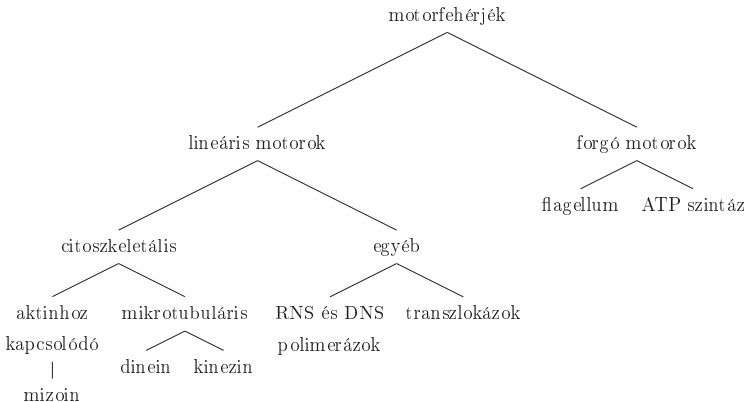
A sejt belsejében a fehérjék, sejtszervecskék és membránvezikulumok gyakran tesznek meg több mikrométert jól meghatározott utak mentén és érkeznek meg rendeltetési helyükre. Hosszú axonok esetén ez a távolság a métert is meghaladhatja. Ezt a mozgást a diffúzióval nem lehet megmagyarázni. Ahhoz például, hogy a gerincben elhelyezkedő idegsejtekben termelődő neurotranszmitter az axon mentén diffúzió útján eljusson az ujjak végi szinapszisokba, több száz évre lenne szükség. A élő sejtek ezt a problémát motorfehérjék alkalmazásával oldják meg (1. ábra). Az axonális transzportért felelős motorfehérjék a kinezin illetve dinein családba tartoznak, és gyakorlatilag minden vizsgált eukarióta sejt típus minden fejlődési szakaszában megtalálhatók.

A kinezinek a legkisebb citoskeletális, azaz sejtvázhoz kapcsolódó motorok. Méretben őket a miozinok követik, a legnagyobbak pedig a dineinek. Hármuk közül a kinezint sikerült legkésőbb izolálni, bár előzőleg már számos alkalommal megfigyelték a kinezinnel kapcsolatos transzportjelenségeket [1], [2], [3], [4]. Az izolálásra és a névadásra csak 1985-ben került sor [5]. A név a görög *kinein*-ből (mozogni) jön.

Az utóbbi évtizedekben nagy mennyiségű kinezinnel kapcsolatos adat halmozódott fel, azonban máig nem született konszenzus e kémiai energiát mechanikai munkává alakító motor pontos működési mechanizmusáról. Milyen

hatékony a kinezin? Van-e futilis hidrolízis? Elengedhetetlen-e a neck linker dokkolása a megfigyelt viselkedés megmagyarázásához? Milyen egy tipikus trajektória a kinezin állapotterében? Hogy ezekre a kérdésekre eddig nem született kielégítő válasz, nem utolsósorban annak köszönhető, hogy a kísérleti adatok egymásnak gyakran ellentmondanak. Hasznosnak tűnt tehát egy minél több mérhető paramétert tartalmazó kinetikai modellt készíteni, aminek segítségével a fenti kérdések megválaszolása mellett a kinezin kinetikai paramétereit is illeszteni tudjuk.

Modellünk egyedülálló abból a szempontból, hogy benne több olyan állapot közti átmenet kinetikai állapotának kiszámítását és erőfűggését helyeztük fizikai alapokra, amikre eddig csak becslések voltak. Ehhez egyrészt a freely jointed chain polimermodellt használtuk, másrészt megköveteltük a termodinamikai konzisztencia teljesülését. Az irodalomban arra sem találtunk példát, hogy a kinezin monomer állapotainak valamennyi kombinációját figyelembe vegyék a dimer kinetika során. Ezzel a modellel sikerült reprodukálnunk a kinezin sebességének, lépésidőjének és randomnessének ATP- és



1.1. ábra. A motorfehérjék osztályozása

ADP-koncentráció- és erőfüggését. Eredményeink mutáns kinezinek viselkedésével is jó egyezést mutatnak. Ezért úgy gondoljuk, hogy a mechanizmus apró részleteire vonatkozó fenti kérdésekre is helyes választ tudunk adni.

Modellünk jelentőségét azonban nem is annyira a paraméterek fittelésében, mint inkább újszerűségében látjuk: egy termodinamikailag konzisztens és bizonyos értelemben teljes keretrendszert ad a kinezin és a hozzá hasonló rendszerek leírására.





## 2. fejezet

### A kinezin-1 általános jellemzői

Már jóval a kinezin felfedezése előtt ismert volt, hogy mikrotubulusok (MT) nélkül az axonális transzport megszűnik [6], [7]. A MT-ok a sejtváz részét képező,  $\alpha$ - és  $\beta$  tubulin fehérjékből álló fehérjeszálak. Az  $\alpha$ - és  $\beta$ -tubulin 8 nm hosszú heterodimert képez. Tubulin heterodimerek láncja adja a protofilamentumot, amikből 13 darab hengerpalástot formálva alkot egy mikrotubulust. A 13 *in vivo* körülmények között mágikus szám, noha *in vitro* előfordulnak ennél kevesebb vagy több protofilamentumból felépülő MT-ok is.

A protofilamentumok 0.9 nm-rel el vannak csúsztatva egymás mellett, ami a hengerpalást alakzat miatt az 1. és 13. protofilamentum között éppen egy  $\alpha$ - és  $\beta$ -tubulin közötti laterális (protofilamentumok közötti) kapcsolatot eredményez, amit a MT varratának is szoktak hívni. A MT  $\alpha$ -tubulinban végződő végére csak lassan tud újabb tubulin heterodimer kapcsolódni, ezért ezt a véget mínusznak hívjuk. A  $\beta$ -tubulinban végződő a gyorsan növekvő, plusz vég. A MT-ok sugárirányban indulnak ki a sejtmag melletti sejt középpontból, ezért többnyire a sejt középponttól távolabbi vég a plusz, de idegsejtek dendritjében találunk például antiparallel MT-ra is [8].

Maga a kinezin túl kicsi ahhoz, hogy mikroszkóppal látható legyen. Ha azonban egy felülethez kinezineket kötünk, majd MT-okat helyezünk rájuk, a MT-ok hosszirányú tengelyeik mentén mozogni kezdenek, amit mikroszkóppal már láthatóvá lehet tenni (motility assay) [9]. A kinezinhez illet-

ve dineinhez kötődő membránvezikulumok szintén elég nagyok ahhoz, hogy mozgásuk optikai úton közvetlenül megfigyelhető legyen. Ezekhez hasonló kísérletekből tudjuk, hogy a dineinek és a kinezinnek MT mentén haladó motorfehérjék. Az összes dinein a MT – vége felé halad, míg a kinezinnek többsége + vég motor. Ez alól kivétel a kinezin-14 alcsalád, amibe – vég motorok tartoznak. A dinein és kinezin külön osztályba sorolását az aminosav-szekvenciában és szerkezetben mutatkozó nagy különbség indokolta. Eltérő az 5'-adenililimido-difoszfát (AMPPNP) hatására bekövetkező MT-affinitásváltozás is. Az AMPPNP egy nem hidrolizálható adenosin-trifoszfát (ATP) analóg, ami a kinezin MT-affinitását növeli, a dineinét csökkenti [10]. A dineinhez képest a kinezinről sokkal többet tudunk, részben mert csak az utóbbit sikerült kristályosítani. Röntgenkrisztallográfiás mérésekből tudjuk, hogy a kinezin a tubulin heterodimernek főleg a  $\beta$  egységére köt, de egy kicsit átlóg az  $\alpha$ -ra is.

Jelenleg a kinezineket mintegy 17 különböző alcsaládba sorolják. Felfedezésükkor mindegyik külön, egyéni nevet kapott (esetenként többet is), így szükségessé vált a nomenklatúra szabványosítása, ami a jelenleg használatos kinezin-1, kinezin-2 stb. alcsaládneveket eredményezte.

A kinezinnek közös szerkezeti vonása a nukleotidot és tubulint kötő globuláris fej rész és az  $\alpha$ -hélix struktúrájú szár. A legtöbb kinezin a szár mentén dimerizálódik, de léteznek mono-, tri- és tetramer változatok is. A fej elhelyezkedése alapján három osztályt különböztetünk meg:

1. N-osztály

A fej rész a fehérje N-terminálisán található. Ezek + vég motorok.

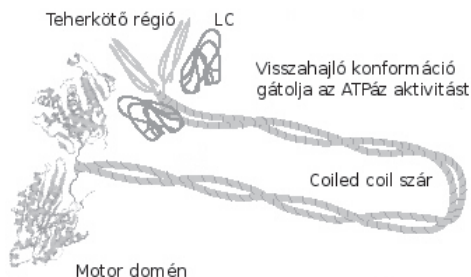
2. C-osztály

A fej rész a fehérje C-terminálisán található. Ezek - vég motorok.

3. Internal vagy Medial osztály

A fej rész az aminosav szekvencia közepe felé található. Ezek MT-depolimerizációban részt vevő fehérjék.

Az N-családba tartozik a kinezin-1 (korábbi elnevezések: konvencionális kinezin, KHC). A kinezin-1 *in vivo* homodimerként fordul elő. A monomer N terminálisán van a kb. 340 aminosavból álló fej rész, amin tehát a nukleotid- és mikrotubulus-kötőhely található. A fej egy kb. 13 aminosavból álló neck linkerrel (NL) csatlakozik a kb. 485 aminosavnyi alfa hélixet formáló szárhoz. (Egyes leírások egy nyaki részt is megkülönböztetnek a szár és a NL között, innen a „neck linker” elvezés.) Két monomer szára egymás köré csavarodva coiled coil formál, így jön létre a dimer. A fehérje egy 92 aminosav hosszúságú, teher megkötésére alkalmas régióban végződik. Erre a részre köt egy-egy, a teherszállításban szerephez jutó könnyű lánc fehérje (light chain, LC), ami miatt a kinezin-1-et heterotetramernek is lehet tekinteni (2.1. ábra).



2.1. ábra. A kinezin-1 szerkezete [11].

A fej a megkötött ATP-t elhidrolizálja. Ez az ATPáz aktivitás teher hiányában lecsökken, ilyenkor ugyanis, hogy feleslegesen ne fogyasszon ATP-t, a szár végén található konzervált pár aminosavas szakasz ráhajlik a fejre és gátolja ezt a folyamatot [12]. Ha a szárát levágják, az autoinhibíció megszűnik. Ha a szár végén van teher, de a fej nem kötődik MT-hoz, akkor a kinezin csak egy ATP-t hidrolizál el, mert a végtermék (adenozin-difoszfát, ADP) kibocsátásához MT-ra van szükség.

A kinezin-1 a MT + vége irányában képes lépkedni. Mivel a kinezin-1 a MT  $\beta$ -tubulinjához köt, a lépéshossz azonos a MT 8 nm-es periódusával. A lépés módja sokáig vita tárgyát képezte. A jelöltek a következők voltak:

1. Hernyó modell

Az egyik fej mindig elől van, a másik mindig hátul, a kinezin araszolgat.

2. „Hand over hand” modellek

Egy fej felváltva van hol elől, hol hátul. Ez több módon lehetséges:

a) Csavarodó modell

Mindkét fej ugyanarról az oldalról előzi a másikat.

b) Változó oldalról előző modell

Az egyik fej balról, a másik jobbról előz.

Ha a kinezin egyik fejét megfestjük, 16 nm-es elmozdulásokat figyelhetünk meg. Ezzel egybevágnak az optikai csipeszes kísérletek, amik a tömegközéppont egyenlő, 8 nm-es elmozdulásait mutatták. Ha a kinezin fej mindig a következő kötőhelyre köt, akkor a hernyó modell kizárható, mivel abból 8 illetve 4 nm következnek. A hernyó modell is tud 16 nm-es fejelmozdulásokat produkálni, ha mindig a szomszédos utáni kötőhelyre köt a fej, azonban így a lépések nem egyenértékűek: az első fejnek nyújtózkodnia kell, míg a hátsó fej szinte odarántódik az első mögé. A megfigyelt lépések idejének eloszlása azonban csak egy csúccsal rendelkezik, és ez egyenértékű lépésekre utal. A csavarodó modell a kinezin-1 szárának folyamatos csavarodását jósolja, ami a rákötött terhet forgatná. Ezt szintén nem tudták kísérletileg megfigyelni, így a jelenleg általánosan elfogadott modell a változó oldalról előző [13].

A kinezin-1 irányított mozgásnak legáltalánosabban elfogadott magyarázatában a főszerepet a NL játssza. A NL a lekötött fejnek a MT negatív végéhez közelebbi végéből indul és ATP hatására egy része képes a fejhez hozzákötöni úgy, hogy a maradék NL a MT + végéhez közelebből induljon. Ezt a konformációváltozást NL dokkolásnak hívjuk. A MT-hoz kötött fej dokkolt

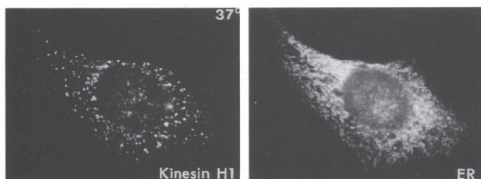
állapotában a MT-on kötőhelyet kereső diffundáló fej közelebb van az elülső kötőhelyhez, mint a hátsóhoz, ezért nagyobb valószínűséggel köt előre (lásd később a 4.3. ábrát).

## 2.1. A kinezin szerepe a sejtben

A kinezin családba tartozó fehérjék számos sejt folyamatban játszanak fontos vagy akár létfontosságú szerepet.

### 2.1.1. Endoplazmikus retikulum

Az endoplazmikus retikulum (ER) egy sejtbeli membránhálózat. Membránvezikulumokból, üregekből és csövekből áll. Szerepe van többek között a citoplazmikus kalciumkoncentráció szabályozásában, makromolekulák és szteroidok raktározásában valamint a fehérjék szintézisében és szállításában. Képződése és fenntartása egyaránt a MT hálózathoz kötődik (2.2. ábra). Új membránstruktúrák kialakulásakor kinezinek húzzák MT-ok mentén a membránt, amit aztán egy CLIMP-63 nevű fehérje rögzít a MT-hoz. Más fehérjék a membránüregek egyesítését vagy darabolását végzik [14].



2.2. ábra. A kinezin-1 és az ER kolokalizációja [15].

### 2.1.2. Sejtszervecske- és vezikulum szállítás

Míg a kis molekulák elég gyorsan diffundálnak ahhoz, hogy egy átlagos méretű sejtben belül bárhova elég gyorsan eljussanak, a nagyobb méretű vezikulu-

mok és sejt szervecskéket (pl. mitokondrium) a kinezinek mozgatják MT-ok mentén. Ha a sejt nagyon nagy, kis molekulák célba juttatásához sem elég a diffúzió. Motorfehérjékre van szükség egyes sejt komponensek rendezéséhez is.

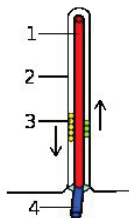
A Golgi készülék és az ER többek között a fehérjeszekréción folyamatban játszik fontos szerepet. Az ER a fehérjeszintézis és a fehérje folding, a Golgi készülék a fehérjék osztályozásának feladatát látja el. A kettő közötti szállítás membránvezikulumok felhasználásával történik. A Golgi készüléktől távolodó membrán transzportot kinezinek végzik [15]. Ezen felül, bár a Golgi apparátus lehorgonyzásáért főként dineinek a felelősek, bizonyos körülmények között kinezinek is részt vesznek ebben a feladatban [16].

Az idegsejt hosszú nyúlványa az axon, ennek végén helyezkedik el a szinapszis. Két idegsejt között az ingerület a szinapsziszból kikerülő ingerület-átvivő anyagok (neurotranszmitterek) útján terjed. A neurotranszmitterek a szinapszistól távol, a sejt maghoz közel termelődnek, ezért aktív transzportra van szükségük, hogy rendeltetési helyükre jussanak. Ezt nevezik axonális transzportnak. A retrográd (szinapszis felé tartó) axonális transzportban a kinezin-1, 2, 3 és 4 alcsaládnak van szerepe, míg az anterográd (sejtmag felé tartó) transzportban dineinek működnek közre.

Saxton és munkatársai által végzett kísérletekben [17] *Drosophila* lárváknál kinezin-1 mutánsánál a farki rész ritmikus rángatkozásában mutatózós disztális bénulás figyelhető meg. Az idegsejtek axonjain duzzanatok keletkeznek, amiket a feltorlódott vezikulumok okoznak. A leírt mutáció letális.

A csillók és flagellumok hosszú sejt kitüremkedések belső mikrotubuláris struktúrával. Egyes sejt esetében mozgó funkciót töltenek be (pl. csillók terelgetik a petesejtet a petevezetékben, az egysejtűek egy része csillókkal vagy flagellumokkal hajtja magát), más részük mechano-, kemo- vagy fotoreceptorokban kap szerepet. Mivel a csillókban és a flagellumokban nincs fehérjeszintetizáló apparátus, növekedésük során folyamatosan a végükbe kell szállítani az építőanyagot. A flagellumon belüli szállítást intraflagelláris transzportnak (IFT) nevezik (2.3. ábra). A leggyorsabb sejtnek 20 perc kell egy

csilló összerakásához. Az IFT-ben a kinezin-2-nek és a dineinnek van a legnagyobb szerepe. A szem receptorsejtjeiben az IFT megszűnése retinitis pigmentozáshoz vezet, ami csörlátással és farkasvaksággal jár.



2.3. ábra. Eukarióta flagellum. 1 - MT struktúra (axonéma), 2 - sejtmembrán, 3 - IFT, 4 - axonéma alapja (bazális test) [18]

Egyes kétéltűek és halak a párzási időszakban figyelemfelkeltés céljából változtatják a színüket. Ennek molekuláris hátterében szintén kinezinek állnak. A hal vagy kétéltű pigmentsejtjeiben cAMP (ciklikus adenosinmonofoszfát) koncentrációnövekedés hatására a melanoszómak (pigmenttestek) a sejt közepéből szétvándorolnak (diszperzió). Ha a koncentráció ismét lecsökken, a melanoszómak visszavándorolnak (aggregáció). Kimutatták, hogy a melanoszóma-diszperzióban a kinezin-2 alcsaládnak van szerepe. Az aggregációért dineinek felelősek [19], [20].

### 2.1.3. Sejtosztódás

A sejtosztódás sok allépésből álló folyamat, amiben tucatnyi különböző fehérjemotor vesz részt.

A MT-ok kiindulási pontja a sejtmag melletti centroszóma vagy sejtközpont. A centroszóma állati sejtekben két centriólumból áll. A sejtosztódás profázisában a centroszóma MT-szervező aktivitása megnő, az egymás felé növesztett szálak között kialakulnak antiparallel párok. Az ilyen párokra a tetramer kinezin-5 (régi nevén BimC) rácsatlakozik, és elkezd egyszerre mind-

kettőn a pozitív vég felé sétálni. A két szál ennek következtében egymáshoz képest szétcsúszik, a centriólumok távolodni kezdenek egymástól. Egy másik kinezin azért felelős, hogy a centriólumokat a magmembrán közelében tartsa, így azok egy sejtmag körüli mozgásba kezdenek. Amikor a sejtmag átellenes oldalára érnek, a centriólumok a plazmamembrán felé növesztett (ún. asztrális) MT-ok segítségével dineineken keresztül lehorgonyozzák magukat a plazmamembránhoz.

A metafázisban a magmembrán felszakad, a lemásolt, egyelőre összekapcsolódott kromoszómák kiszabadulnak. A centriólumokból kiinduló MT-okra ráköt a kromoszómák karjairól a száránál fogva lógó kinezin-4 (régii nevén kromokinezin), és a kromoszómát a MT + vége felé (azaz a túlsó centroszóma felé) húzza. Mivel az ellenkező irányból érkező MT-okra is kötnek kinezin-4 motorok, amik az ellenkező irányban fejtenek ki erőt, a kromoszómák végül a sejt ekvatoriális síkjába állnak be.

Miután a kromoszómák közepén felsorakoztak, a két DNS példányt szét kell választani. Ehhez egy MT-nak be kell találnia a kromoszóma kinetokór régiójába. A MT dinamikus instabilitása itt fontos szerepet játszik abban, hogy a sikertelen MT-ok depolimerizálódjanak. A MT depolimerizációt elősegíti a kinezin-13 alcsaládba tartozó XKCM1. A kinetokór régióról a száruknál fogva kinezin-7 motorok lógnak. Ezek a kinezin család leghosszabb szárú tagjai, így a kromoszómától viszonylag messze rá tudnak kötni kinetokórba betaláló MT-ra. Eközben a szintén a kinetokór régióban előforduló kinezin-13 depolimerizáló motorok pozitív vége felől elkezdik lebontani a MT-t, így a kromoszómák a megfelelő pólusba vándorolnak.



## 3. fejezet

# A kinezin-1-gyel kapcsolatos mérési technikák

A kinezin-1-gyel (továbbiakban kinezin) kapcsolatos, számunkra fontos mérések között vannak trajektóriákra, szabadenergiákra és sebességi állandókra vonatkozók. Az általunk végzett szimuláció nagy mértékben támaszkodik ezen mérések eredményeire. A mérési módszerek ismeretében lehetőségünk van a kísérletileg kapott paraméterértékeket kritikusán kezelni, a szimulációnk illesztéséből adódó értékektől való eltérésüket megmagyarázni.

### 3.1. Kinezin koncentráció

Egy kinezin preparátum jellemzését többnyire a motor koncentráció megméréseivel szoktak kezdeni [21]. Erre valamilyen kolorimetrikus módszert használnak, például a Bradford-analízist, ahol egy fehérjéhez kötődő festék abszorpciós csúcsának kék felé tolódásából lehet következtetni a fehérjekoncentrációra. A módszer függ a fehérje aminosav-összetételétől

Hasonlóan aminosav függő eredményt ad, ha 280 nm-en megmérjük a fehérje abszorpcióját. Ez a módszer a Beer-Lambert törvényen alapul:

$$c = \frac{A_{280}}{\epsilon l}, \quad (3.1)$$

ahol  $c$  a fehérje koncentrációja,  $A_{280}$  a 280 nm-en mért abszorpció,  $\epsilon$  az extinkciós koefficiens és  $l$  a fény mintában megtett útja. Valójában csak három aminosavnak van elnyelési csúcsa 280 nm-en: a triptofánnak, a tirozinnak és a cisztinnek. Ez utóbbi két, kénhíddal összekapcsolódó ciszteint jelent, aminek koncentrációja általában nem ismert. Ennek áthidalására két szélsőséges megközelítést szoktak alkalmazni. Mivel a cisztin extinkciós koefficiense egy nagyságrenddel eleve kisebb, mint a másik kettő aminosavé, és mivel valószínűleg a ciszteinek amúgy is csak egy része képez kénhidat, ezek járulékát esetenként egyszerűen el is hanyagolhatjuk. Ezzel ellentétes feltevés, hogy minden cisztein részt vesz egy kénhíd kialakításában. A fehérjét a kolorimetrikus mérés előtt többnyire denaturálják, bár sok fehérje esetében nincs különbség a natív és denaturált forma abszorpciója között.

Mivel csak a mikrotubulus-kinezin asszociáció sebessége függ a kinezin koncentrációtól, a kinetikai szimuláció szempontjából ez egy irreleváns paraméter, más mérések kiértékeléséhez viszont szükséges.

## 3.2. A nukleotid-kötőhelyek koncentrációja

Egyes kísérletekben (pl. az úgynevezett motility assay-ben, lásd később) nem fontos tudni a kinezin motor koncentrációját. Az ATP- és ADP-kötődés sebességi állandójának méréseinek kiértékelésénél azonban elengedhetetlen a nukleotid-kötőhelyek koncentrációjának ismerete, ami a dimer motor koncentráció kétszerese. Ennek mérésére több módszer is létezik [21].

### 3.2.1. Kötődés nitrocellulózhoz

A kinezin szintetizálása során a fehérjével együtt többnyire hozzá erősen kötődő ADP nukleotidokat is kapnak. Ha ezt a kinezin preparátumot mikrotubulus nélkül magas koncentrációjú radioaktív [ $\alpha - ^{32}\text{P}$ ]ATP-vel inkubálják egy-másfél órát, a fehérjéhez erősen kötődő ADP molekulák [ $\alpha - ^{32}\text{P}$ ]ATP-re cserélődnek. Az oldat pár cseppjét ezek után megfelelően előkészített nitrocellulóz (NC) lapon átszűrjük: a szabad nukleotidok átmennek, a kinezinhez

kötöttek a NC-n ragadnak. A NC lapnak megméri a  $\beta$  aktivitását, amiből egyenesen lehet következtetni a kötőhelyek koncentrációjára.

### 3.2.2. Gélszűrés

Hasonlóan az előző módszerhez az ADP-t itt is  $[\alpha - ^{32}\text{P}]\text{ATP}$ -re cserélik. A preparátumot azonban gélszűréssel választják szét: a gél szemcseméretét úgy kell megválasztani, hogy szemben a fehérjéhez kötöttel, a szabad nukleotid ne eluálódjon. A szabad nukleotidoktól így módon elválasztott kinezin már vizsgálható a Bradford módszerrel és folyadék szcintillációs számlálóval, hogy meghatározzuk a fehérje- és nukleotid-kötőhely-koncentrációt

### 3.2.3. Fehérjedeteregens alkalmazása

Kinezin-ADP komplexhez radioaktív  $[\alpha - ^{32}\text{P}]\text{ATP}$ -t adnak, és különböző idő-kig inkubálják, aminek során az ADP lecserélődik  $[\alpha - ^{32}\text{P}]\text{ATP}$ -re. Ez egy hidrolízis során rögtön  $[\alpha - ^{32}\text{P}]\text{ADP}$ -vé alakul. A reakciót savval leállítják. A sav hatására a fehérjék denaturálódnak, és a bennük lévő nukleotidok kiszabadulnak. Vékonyréteg kromatográfia (TLC) segítségével az  $[\alpha - ^{32}\text{P}]\text{ADP}$ -t és az  $[\alpha - ^{32}\text{P}]\text{ATP}$ -t szétválasztják és megméri relatív aktivitásukat. Az  $[\alpha - ^{32}\text{P}]\text{ADP}$  koncentrációt idő függvényében ábrázolják, és egy exponenciális függvényt illesztnek rá, aminek aszimptotája adja kötőhelyek koncentrációját.

## 3.3. Egyensúlyi állapot előtti kinetika

Ezek a mérések a kinezin első lépését veszik górcső alá. Hogy ennek időbeli lefolyása elég jól felbontható legyen, sokkal nagyobb (tipikusan milligrammnyi) mennyiségű kinezin szükséges, mint az előző módszereknél [21].

### 3.3.1. Quench-flow mérések

Kinezin-mikrotubulus (K·MT) komplexhez különböző koncentrációjú radioaktív  $[\alpha - ^{32}\text{P}]\text{ATP}$ -t adnak, majd különböző időknél savval leállítják a reakciót. Az eddigi módszerekkel ellentétben a MT-nak köszönhetően a kinezintől már a sav hozzáadása előtt disszociálhatnak a hidrolízis során keletkező,  $[\alpha - ^{32}\text{P}]\text{ADP}$  nukleotidok. A sav denaturálja a fehérjéket, ezért az  $[\alpha - ^{32}\text{P}]\text{ADP}$  kiszabadul. Az  $[\alpha - ^{32}\text{P}]\text{ADP}$  mennyiségét TLC módszerrel megméri, a kapott értékeket idő függvényében ábrázolják, a pontokra

$$[\text{ADP}] = A_{burst}(1 - \exp(-k_b t)) + k_2 t \quad (3.2)$$

függvényt illesztnek. A 3.2. egyenlet egy  $k_2 t$  egyeneshez tartó exponenciális emelkedést („burst”) ír le. A burst  $k_b$  rátája az  $[\alpha - ^{32}\text{P}]\text{ATP}$  kinezinhez kötődésének és azt követő hidrolízisének effektív rátája. Nagy  $[\alpha - ^{32}\text{P}]\text{ATP}$  koncentrációra a burst ráta ezért a hidrolízis sebességi állandójával egyezik meg. Az  $A_{burst}$  burst amplitúdó a reakció leállítása előtti pillanatban kinezinhez kötődő, első hidrolízisből származó  $[\alpha - ^{32}\text{P}]\text{ADP}$  koncentrációjával kapcsolatos. Ha az  $[\alpha - ^{32}\text{P}]\text{ATP}$  erősen kötődik a kinezinhez, akkor nagy  $[\alpha - ^{32}\text{P}]\text{ATP}$  koncentrációkra ez nagyjából megegyezik a kötőhelyek koncentrációjával. Ha azonban az  $[\alpha - ^{32}\text{P}]\text{ATP}$ -nek hidrolízis helyett lehetősége van a kinezintől disszociálni, a burst amplitúdó jelentősen kisebb lehet a kötőhelyek koncentrációjánál. A kötőhely koncentrációjának ismeretében a burst amplitúdóból így módon az  $[\alpha - ^{32}\text{P}]\text{ATP}$  disszociációs állandójára következtethetünk.

### 3.3.2. Pulse-chase mérések

Ezekből a mérésekből az ATP disszociációs sebességi állandóját lehet meghatározni. K·MT komplexet  $[\alpha - ^{32}\text{P}]\text{ATP}$ -vel gyorsan összekevernek („pulse”), majd különböző idők után hozzáadnak nagy koncentrációjú ATP-t („chase”). A reakciót savval leállítják, majd TLC-vel megméri az  $[\alpha - ^{32}\text{P}]\text{ATP}$  és  $[\alpha - ^{32}\text{P}]\text{ADP}$  mennyiségét. A quench flow méréshez képesti különbség az, hogy itt a kinezinhez kötődő  $[\alpha - ^{32}\text{P}]\text{ATP}$  egy részének még lesz ideje

$[\alpha - ^{32}\text{P}]\text{ADP}$ -vé alakulni az után is, hogy több  $[\alpha - ^{32}\text{P}]\text{ATP}$  már nem kötődhet kinezinhez, mivel a chase koncentrációja sokkal nagyobb az  $[\alpha - ^{32}\text{P}]\text{ATP}$ -énél. Hogy a kinezinhez kötődő  $[\alpha - ^{32}\text{P}]\text{ATP}$ -nek mekkora része hidrolizálódik el és mekkora része disszociál, ezt a két folyamat sebességi állandójának aránya határozza meg. A quench flow mérésből kinyert hidrolízis sebességi állandót felhasználva a pulse-chase mérésből így megkapjuk az  $[\alpha - ^{32}\text{P}]\text{ATP}$  disszociációjának sebességi állandóját.

### 3.3.3. Stopped-flow mérések

Ennél a módszernél a keverés után optikai úton figyelik a reakciót. Gyakran a nukleotidok fluoreszcens analógjait használják (mantATP, mantADP). Ezek akkor adnak jelet, mikor kinezinhez kötődnek, szabadon a vizes oldat quenchemel a fluoreszcenciát.

Analóg használatakor fontos szempont, hogy a kinezin ugyanúgy működjön vele, mint ADP-vel vagy ATP-vel. Ennek tesztelésére a katalitikus rátát szokták lemérni, ami lehet a kinezin MT mozgató képessége vagy az ATP hidrolízis rátája. mantADP és mantATP esetében szaturáló nukleotid koncentrációnál a katalitikus ráta ugyan hasonló a nem fluoreszcens változatok alkalmazásakor megfigyelthez, azonban kis nukleotid koncentrációknál háromszor annyi fluoreszcens nukleotid szükséges ugyanakkora katalitikus rátához [21]. A megfigyelések magyarázata sem egyértelmű általában. Fluoreszcens nukleotiddal végzett kísérlet esetében például kinezinnel való reagáltatás során először egy exponenciális fluoreszcens jelnövekedést figyelnek meg, ami aztán egy kisebb rátával történő lecsengésbe megy át. A fluoreszcencia kezdeti felugrását a nukleotid felvételének tulajdoníthatjuk, de kérdés, hogy a jel csökkenését a kinezin konformációváltozása, a nukleotid hidrolízise, a foszfát vagy esetleg a nukleotid kibocsátása okozza-e.

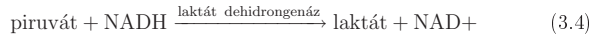
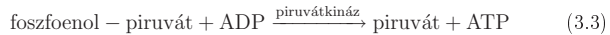
ADP disszociáció méréséhez  $\text{K}\cdot\text{ADP}$ -t mantADP-vel inkubálnak, míg az összes ADP mantADP-re nem cserélődik. Az elegyet gyorsan összekeverik ATP-vel és MT-sal, aminek hatására a mantADP kibocsátódik, és helyébe az ATP lép. Az oldatba kilépő mantADP fluoreszcens jelét a vizes buffer

quenched, így a jel exponenciális csökkenésének rátája az ADP disszociációjának sebességi állandója.

### 3.4. Másodpercenkénti és lépésenkénti ATP hidrolízis

A kinezinnek azt a tulajdonságát, hogy ATP-t ADP-vé és foszfáttá bont le (hidrolizál), ATPáz aktivitásnak hívjuk. A legtöbb mérés lépésenként 1 körüli ATP hidrolízisét jósolja [22], [23], [24], [25]. Az ezen felül elhidrolizált ATP-k száma a futilis hidrolízis.

Az ATPáz aktivitás közvetlen mérése során a következő két reakciót használják fel:



Az oldatba ATP-t, kinezint, MT-t, piruvát kinázt, laktát dehidrogenázt és NADH-t tesznek, és mérik a 340 nm-es extinkciót. 340 nm-en a NADH nyel el, aminek a csökkenése egyenesen arányos az ADP termeléssel, ez pedig az ATP hidrolízissel [9]. Ebből a másodpercenkénti ATP hidrolízist lehet megkapni. A lépésenkénti ATP hidrolízisek számához a kinezin sebességét is meg kell mérni.

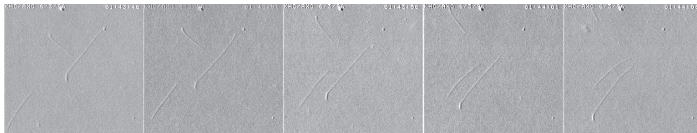
### 3.5. ATP szintézis

A kinezinben lévő ADP kis valószínűséggel bár, de át alakulhat ATP-vé. Az ATP szintézis rátáját Hackney oxigén izotóp-cserés módszerrel mérte ki [26].  $^{18}\text{O}$  izotóppal 100%-osan feldúsított vizes oldathoz ATP-t tartalmazó kinezint és MT-t adnak. ATP hidrolízis során az ATP  $\gamma$ -foszfátjához egy vízmolekula oxigénje kapcsolódik. A foszfát így egy darab  $^{18}\text{O}$  izotóp atomot

fog tartalmazni. Ha a keletkező  $\text{ADP}\cdot[^{18}\text{O} \text{ P}_i$  a kinezinből való kilépés előtt visszaalakul ATP-vé, a foszfát lead egy oxigénatomot, ami 25% eséllyel  $^{18}\text{O}$ . Az ATP ismét elhidrolizálódik, ekkor a foszfát 25% eséllyel tartalmaz 1, 75% eséllyel 2  $^{18}\text{O}$ -t, és így tovább. A keletkező  $[^{18}\text{O}]_1 \text{ P}_i$ ,  $[^{18}\text{O}]_2 \text{ P}_i$ ,  $[^{18}\text{O}]_3 \text{ P}_i$  és  $[^{18}\text{O}]_4 \text{ P}_i$  mennyiségét gázkromatográfiával és tömegspektroszkópiai úton határozzák meg, amiből az ATP szintézis rátájára lehet következtetni.

### 3.6. Motility assay

Kinezineket száruknál fogva felülethez rögzítenek, majd az oldatba MT-t tesznek. A kinezin fejek rákapcsolódnak a MT-ra, és mozgatják azt. A MT mozgása - ellentétben a kisméretű kinezinével - már mikroszkóp alatt közvetlenül megfigyelhető (3.1. ábra).

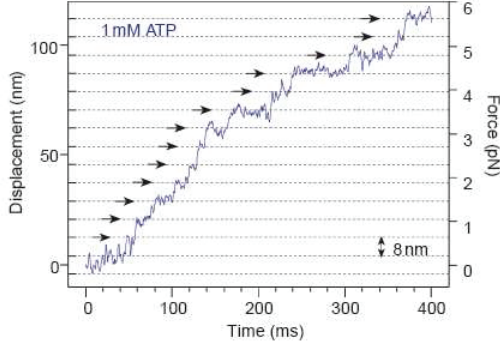


3.1. ábra. Motility assay kísérlet felvételei. S. Endow és H. Song [11].

### 3.7. Optikai csipeszes mérések

Az optikai csipesz egy lézer segítségével létrehozott, fénygradiensén alapuló potenciálgödör, aminek segítségével egy csapdázott tárgyat tudunk mozgatni, illetve a potenciálból való kimozdulása alapján a csapdázott tárgyra ható erő mérni.

Fehérmotoros kísérletekben a csapdázott tárgy általában egy mikrométer méretű gyöngy, amit a motor (esetünkben a kinezin) szárához erősítenek. A gyöngy középpontjának helyzetét mikroszkóp alatt nanométer felbontással tudják követni. A helyzet-idő görbéken jól látszanak a 8 nm-es diszkrét lépé-



3.2. ábra. Kinezin trajektóriája egy optikai csipeszes mérésből [31].

sek és a köztük lévő várakozási szakaszok [27], [28], [24], [29], [22]. Nishiyama és munkatársai 4 nm-es allépéseket is megfigyeltek [30].

A „force-clamp” technikát alkalmazva az erőt állandó nagyságúnak tartva tudják figyelni a gyöngy mozgását. Az erőfüggő görbéket azonban általában nem így veszik fel, hanem a gyöngy pozícióját állandónak tartják, és hagyják, hogy a kinezin kísétáljon a potenciálból.

A 3.2. ábra egy ilyen mérés eredményét mutatja. A mintavételezés meghatározza, mekkora a legrövidebb detektálható lépés. A jelentős zaj miatt sokszor nem egyértelmű, mi számít lépésnek, ezért fontos szerepe van, milyen ablakot és szűrőt használunk az adatok kiértékelésekor [32].

Az optikai csipesszel kapott trajektóriákból számos mennyiség kinyerhető: a kinezin  $v$  sebessége, egy előre- illetve hátralépés  $t_d^e$  illetve  $t_d^h$  idejének (dwell time) várható értéke és eloszlása, az előre- és hátralépések számának  $h$  hányadosa, a  $p$  processzivitás (lépések száma, míg le nem válik a MT-ről) valamint az  $r$  randomness.

Ezen a ponton néhány fogalom tisztázásra szorul. Lépésnek fogom hívni a kinezin tömegközéppontjának 8 nm-es elmozdulását a MT mentén, előre-



illetve hátrakötésnek pedig a lépésnek azon részét, mikor a MT-hoz nem kötött fej a plusz illetve mínusz vég felé eső kötőhelyre köt. Ciklus alatt átmenetek ismétlődő sorozatát értem. Ezek után a randomness definíciója a következő:

$$r = \lim_{t \rightarrow \infty} \frac{\langle x^2(t) \rangle - \langle x(t) \rangle^2}{L \langle x(t) \rangle}, \quad (3.5)$$

ahol  $t$  az idő,  $x$  az elmozdulás,  $L$  a lépéshossz,  $\langle \rangle$  sokaságátlagot jelöl.  $r$  egy jól definiált és a 3.5. egyenlet alapján jól is mérhető mennyiség.

Limitáló átmenetnek nevezzük azt az átmenetet, aminek ideje a lépés idejét dominálja. Megmutatható, hogy a randomness a limitáló átmenetek számával függ össze. Ha csak előrelépéseket engedünk meg és egy lépés során a rendszer egy állapotban csak egyszer fordulhat elő, akkor  $r = \frac{1}{n_{limit}}$ , ahol  $n_{limit}$  a limitáló átmenetek száma.  $r$  ebben az esetben legfeljebb 1. Az előbbi feltételek mellett  $r$  kiszámítható az egyes lépések idejének statisztikai tulajdonságaiból is:

$$r = \left( \frac{\sigma(t_d^e)}{\tau(t_d^e)} \right)^2, \quad (3.6)$$

ahol  $\sigma(t_d^e)$  és  $\tau(t_d^e)$  egy előrelépés idejének szórása illetve átlaga.

Ha megengedünk hátralépéseket is, és feltesszük, hogy  $t_d^h = t_d^e$ , akkor a 3.6. egyenlet így módosul:

$$r_h = (1 - 2P_h) \left( \left( \frac{\sigma(t_d^e)}{\tau(t_d^e)} \right)^2 - 1 \right) + \frac{1}{(1 - 2P_h)}, \quad (3.7)$$

ahol  $r_h$  a randomness, ha hátralépéseket is megengedjük és  $P_h$  a hátralépés valószínűsége [27], [24], [33]. A  $t_d^h = t_d^e$  feltéves alaptalannak tűnhet, de, mint látni fogjuk, teljesen fedi a valóságot.

A futilis hidrolízis szintén megváltoztatja a randomnesset. Schaevitz és munkatársai a futilis hidrolízisre egy ciklusként tekintenek, amin minden alkalommal végigmenve egy ATP elhidrolizálódik, és amiből kilépve a lépés megtörténik [33]. A ciklus megismétlésének valószínűsége  $\epsilon_f$ , befejezésének  $1 - \epsilon_f$ . Számításuk során tehát egyenlővé tették a futilis elhidrolizált ATP-k számát a lépésidőt (és ezáltal  $r$ -t) befolyásoló ciklus-ismétlődések számával.

Ez alapján a randomness így módosul:

$$r_f = \epsilon_f + (1 - \epsilon_f)r, \quad (3.8)$$

ahol  $r$  a 3.6. által megadott mennyiség. A futilisan elhidrolizált ATP-k száma azonban nagyobb, mint az újrajárt ciklusoké. Nagy hátrahúzó erő esetén például (ahol a kinezin szimulációnk szerint futilisan hidrolizál) arra várunk, hogy az elülső fej leváljon a MT-ről. Ez az átmenet versenyez az ADP kibocsátásával, ami, ha megtörténik, egy újabb ATP elhidrolizálását vonja maga után. Az újrajárt ciklusok száma tehát az elülső fej ADP-kibocsátási és leválási sebességi állandójának hányadosa, ami csak az *elülső fejben* futilisan elhidrolizált ATP-k számával egyenlő. Közben azonban a hátsó fej is hidrolizál ATP-t, többet is, mint az elülső.

### 3.8. A neck linker dokkolásának szabadenergiája

Rice és munkatársai a NL dokkolás szabadenergiáját határozták meg elektron spin rezonancia (ESR) spektroszkópia segítségével [34]. 3 bázisspektrumot alkalmaztak, az ATP-t AMPPNP analóggal helyettesítették. A 35 °C-os, ADP-t tartalmazó kinezin spektrumát használták a mobilis, a 0 °C-os, AMPPNP·K az immobilis, a kettőt levonva egy 15 °C-on készített AMPPNP·K spektrumból pedig az intermedier bázisspektrum gyanánt. (Az intermedier bázisra a jobb illesztés érdekében volt szükség.) Az ESR spektrumok hőmérsékletfüggéséből mind az AMPPNP·K, mind az ADP·K fej NL dokkolására egy nagyon kedvező entalpiajárulékot kaptak, amit egy nagyon kedvezőtlen entrópiatag kompenzál. Összességében a NL dokkolás AMPPNP·K esetén  $\approx -1.2k_B T$  (tehát kicsit kedvező), ADP·K pedig  $\approx 1k_B T$  (kicsit kedvezőtlen) szabadenergiaváltozással jár. Hackney oxigén izotóp-cserés mérései alapján kétségbe vonja ezeket az adatokat, és úgy gondolja, hogy a  $-1.2k_B T$  túl kevés ahhoz, hogy a kinezin erő ellenében is haladni tudjon [26]. Hackney az eltérést részben az ATP analóg használatának tulajdonítja.

A szimuláció paramétereinek fittelése során ezek a szabadenergiák voltak a legproblémásabbak. A következő fejezetekben kifejtett okokból végül arra a

következtetésre jutottunk, hogy a NL dokkolása a Rice és munkatársai által mérthez képest ATP-t tartalmazó fej esetében kedvezőbb, ADP-t tartalmazó fej esetén pedig kedvezőtlenebb.



## 4. fejezet

# Teljes, termodinamikailag konzisztens modell

A kinezinnel kapcsolatos irodalomban számos kinetikai modellt találunk. A kísérleti adatok kiértékelésekor futtatott szimulációk többnyire egy-egy adott sebességi állandó illesztését szolgálják és leegyszerűsített kinetikai hálózattal operálnak: kevés állapottal és kevés átmenettel. Az átmenetek közül sokat irreverzibilisnek tételeznek fel, ami esetenként lehet jó közelítés, de nagyon gyakran nem az. A hálózat topológiája többnyire lineáris, esetleg egy-két hurkot vagy elágazást tartalmaz [35], [28]. A kimondottan elméleti írások már bonyolultabb hálózatokat vizsgálnak [33], [36], azonban nem találtunk olyan munkát, amelyik egyszerre lenne *teljes*, (azaz figyelembe venné a monomer állapotok összes kombinációját) és *termodinamikailag konzisztens*. A kinezin helyes modellezéséhez ezek pedig elengedhetetlen feltételek.

Azt szeretnénk, hogy olyan paramétertartományban is jól írjuk le a kinezin működését, ahol nincs elképzelésünk arról, hogy milyen állapotok lesznek betöltöttek. Az állapotér felépítésénél tehát az a helyes eljárás, ha először eldöntjük, mik azok a monomer állapotok, amik egy lépés során egyáltalán relevánsak lehetnek, majd ezeket a monomer állapotokat mindkét fej esetén megengedjük. Kinetikai szimulációhoz még az állapotok közti kinetikai állandókat (azaz sebességi vagy egyensúlyi állandókat) kell meghatároznunk.

A kinetikai állandók meghatározása több módon történik.

1. A nukleotidokkal kapcsolatos átmenetek (felvétel, leadás, hidrolízis) kinetikáját főként kísérletekből ismerjük.
2. A NL köti össze a két fejet, így alkalmas arra, hogy a két fej viselkedését koordinálja. A neck linkert freely jointed chain polimerláncként modelleztük, így meg tudtuk határozni a monomer fej NL-ének dokkolási valószínűségét és a fejek lekötésének sebességi állandóit.
3. Az állapotok közötti átmenetek sebességi állandói nem függetlenek, hanem termodinamikailag konzisztensnek kell lenniük. Ennek segítségével NL dokkolással járó folyamatok és dimer állapotok közti átmenetek egyensúlyi állandóját, valamint az ATP szintézis sebességi állandóját tudtuk meghatározni.

Modellünkben az állapotok kinetikai paraméterei (a szabad fej lekötését kivéve) erőfüggetlenek, az erőfüggés a dokkolt és dokkolatlan neck linkerű állapotok betöltöttségén keresztül érvényesül.

## 4.1. Állapotok

Nézzük először, milyen állapotokra is van szükség! A processzív lépkedéshez MT-hoz erősen és gyengén kötő, valamint MT-hoz nem kötő állapotok kellene. Az irányított mozgáshoz a hátsó és első fejnek különbözőképp kell viselkednie és/vagy a MT-hoz nem kötő fejnek előnyben kell részesítenie az elülső kötőhelyet a hátsóval szemben. Ezeket a neck linker dokkolás biztosítja. Az energiát a hidrolízis ciklus szolgáltatja, aminek során a fej üres, ATP-t majd ADP-t tartalmazó állapotok után visszatér az üres állapotba.

Egy kinezin fejnek ezért a legegyszerűbb esetben a következő hat állapotát különböztetjük meg: 0, D, D\*, T, T\* és  $\tilde{D}$ . Ezeket hívjuk monomer állapotoknak. A jelölések a fej három tulajdonságára utalnak, úgymint a bennük lévő nukleotidra (0, D vagy T), a NL állapotára (csillag) és a MT-hoz való kötöttségre (hullám). Csak az  $\tilde{D}$  állapot jelent MT-hoz nem kötődő (azaz szabad)

fejet, ami ilyenkor ADP-t tartalmaz és a NL-e nem dokkolt. A többi állapotban a fej MT-hoz kötött. A D illetve T állapotokban a fej rendre ADP-t illetve ATP-t köt és a NL nem dokkolt. Ezek csillagos változatai (D\* és T\*) NL-dokkolt állapotokat jelentenek. Mivel az irodalomban a nukleotidmentes fej esetében csak dokkolatlan neck linkerrel találkozunk [37], modellünkben az egyszerűség kedvéért ilyenkor a NL nem lehet dokkolt, azaz 0-nak nincs csillagos párja.

## 4.2. Az átmenetek erőfüggése

A kinezin processzivitásának megértésében alapvető fontosságú a fejek koordinációjának kérdése. A hátsó fejnek másképp kell viselkednie, mint az elülsőnek, például jó lenne, ha gyorsabban válna le a MT-ről. Kézenfekvő megoldásnak tűnik erőfüggő sebességi állandók bevezetése, ami más viselkedést eredményezne egy előrehúzott és egy hátrahúzott fej esetében. Fontos kérdés tehát, hogy egy  $F$  erővel mennyire lehet megváltoztatni egy átmenet valószínűségét.

A fehérjeszerkezetnek már egy kis megváltozása is nagy különbséget eredményezhet a sebességi állandókban. Ez azonban önmagában még nem elég ahhoz, hogy egy átmenetet például letiltsunk. Arra is szükség van, hogy a fehérje szerkezete permanensen a megváltozott állapotban maradjon. Ennek betöltöttsége azonban kis  $\vec{f}$  erő és kis szerkezeti átalakulás következtében nem nőhet jelentősen, mivel az egyensúlyi állandó az  $e^{\frac{\vec{f} \cdot \vec{l}}{k_B T}}$  Boltzmann faktorral arányos, ahol  $\vec{l}$  az erő támadáspontjának elmozdulása, azaz a kitevő számlálójában az erő által végzett munka van,  $k_B$  a Boltzmann állandó és  $T = 293\text{K}$  a hőmérséklet. A kinezin fejekre tipikusan  $10\text{ pN}$  nagyságrendű erők hatnak, a szerkezeti megváltozások pedig  $\text{nm}$  alattiak [38], így az erő által végzett munka nem nagyon haladja meg a  $k_B T \approx 4\text{ pN nm}$  szintjét. Ha például  $\vec{l} = 0.5\text{ nm}$  és  $\vec{f} = 10\text{ pN}$ , az egyensúlyi állandó mindössze egy  $e^{1.25} \approx 3.5$ -ös faktorial fog változni, ami egy  $50\text{-}50\%$  -os betöltöttséget  $25\text{-}75\%$ -ra változtat. Ekkora  $\vec{l}$  elmozdulással tehát nem lehet egy átmenetet letiltani.

Tudomásunk szerint a kinezinben egyedül a NL dokkolása során zajlik le nagyobb szerkezeti változás (3.5 nm), amivel már elég nagy betöltöttségváltozást el tudunk érni.

Kétfejkötött esetben tehát az erő az átmenetek sebességi állandói között csak neck linker dokkolás útján tud lényeges különbséget létrehozni. A szabad fej lekötése során, mikor a külső erő nem a fehérje szerkezetének változtatásán, hanem a polimerszál végének elmozdításán keresztül hat, az erőnek ismét fontos szerep jut. Erőfüggő betöltöttségeket az illesztések finomhangolására lehetne használni, ez viszont a modellt túlságosan elbonyolítaná.

Elégnek tartottuk tehát, ha a modellben az erő az átmenetek sebességi állandóira nem hat, csak a NL dokkolásának valószínűségét változtatja, a sebességi állandók pedig attól függenek, hogy a NL a kétféle állapot közül melyikben van. Emellett az erő befolyásolja a szabad fej előre- illetve hátrakötésének sebességi állandóját.

#### 4.2.1. Gyors folyamatok

A NL dokkolás gyors folyamat, ezért a dokkolt és nem dokkolt állapotot tekinthetjük minden pillanatban egyensúlyban lévőnek. A  $D - D^*$  illetve  $T - T^*$  állapotok helyett így rendre egy-egy összetett  $D^{(*)}$  illetve  $T^{(*)}$  állapotot vezethetünk be. A kinetikai modell ezáltal annyiban egyszerűsödik, hogy a  $D - D^*$  illetve  $T - T^*$  állapotok között két-két sebességi állandó helyett egy-egy egyensúlyi állandónk lesz, amivel az összetett állapotokban lévő alállapotok ( $D$  és  $D^*$  illetve  $T$  és  $T^*$ ) valószínűségét írjuk le. A szimuláció így lényegesen fel is gyorsul, mivel a kinezin nem fog a dokkolt és dokkolatlan állapotok között ugrálni. Ezzel a fenti hat monomer állapotot a következő négyre redukáltuk:  $0$ ,  $D^{(*)}$ ,  $T^{(*)}$  és  $\tilde{D}$ . Ezek voltak azok, amiket végül a modellünkben használtunk.

A  $\tilde{D}$  állapot bevezetését a szabad fej gyors diffúziója tette lehetővé. Mivel a fej diffúziós együtthatója  $10^2 \text{ nm}^2/\mu\text{s}$  nagyságrendű és a NL 10 nm körüli hosszúságú, a szabad fej helyzete a diffúziós tartományban  $\mu\text{s}$  nagyságrendű idő alatt egyensúlyba kerül, ami sokkal gyorsabb, mint a többi átmenet ideje.

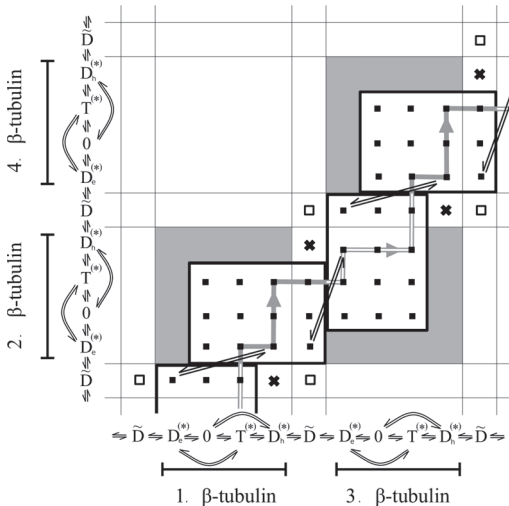


A szabad fej helyzetét ezért egy sűrűségfüggvény jellemzi, amit a NL-t leíró polimermodellből számolunk.

## 4.2.2. Kétdimenziós állapot tér

A dimer állapotokat a 4.1. ábrán szemléltetjük. A tengelyeken egy adott fej (monomer) állapotai és pozíciója látható: a hand over hand lépegetési mechanizmus miatt az egyik fej csak a páratlan  $\beta$ -tubulinokra köt, a másik csak a párosakra. Mivel a két fej csak egymással szomszédos tubulinokra köthet, az állapottérnek csak az átló közeli pontjai lehetnek betöltöttek.

Az állapottér  $4 \times 3$ -as blokkokra osztható, amik a kinetikai állandók szempontjából egymással teljesen megegyeznek, de különböznek a szabadenergia-szintben és abban, hogy a kinezin melyik  $\beta$ -tubulinokra köt. Egy blokkot feloszthatunk egy  $3 \times 3$ -as négyzetre, amiben a kétfejkötött állapotok vannak



4.1. ábra. A kinezin kétdimenziós állapottere

(azaz mikor mindkét fej kötődik a MT-hoz) és egy  $1 \times 3$ -as téglalapra, ami az egyfejkötött állapotokat tartalmazza. Ezekhez járul még a négyzettel jelölt  $(\tilde{D}, \tilde{D})$  MT-ról levált állapot, ami a kinezin mozgásának kezdeteként és végeként szolgál.

A tengelyeken jelölt vékony, kettős, fekete nyilak a megengedett átmeneteket jelölik. Mivel a kinezin egy tipikus előrelépés során kétszer kerül a  $D^{(*)}$  állapotba, ábrázolási szempontból célszerű volt egy tubulin egységen belül ezt az állapotot kettéhasítani. A kettő  $D^{(*)}$  közül az egyik hátsó, a másik elülső fejet jelent, erre vonatkoznak az alsó indexek. A nem lehetséges konfigurációkat szürke háttérrel jelöltük. Egyfejkötött állapotban az elülső illetve hátsó pozíció értelmét veszti, ezért ott az egyik  $D^{(*)}$  állapotot megszüntettük. Az onnan kiinduló átmenet azonban továbbra is létezik, ezért szerepel egy átlós irányú átmenet is. A hosszú vastag szürke nyíl egy tipikus előrelépési trajektóriát mutat.

Az egyetlen átmenet, ami nem szerepel a 4.1. ábrán, a  $T \rightleftharpoons \tilde{D}$ . Ez valóban két átmenet ( $T \rightleftharpoons \tilde{T} \rightleftharpoons \tilde{D}$ ), amiket összevontunk, hogy ne kelljen egy új  $\tilde{T}$  állapotot bevezetni (lásd 5.1. rész).

Mivel a kinezin két feje egyenértékű, bevezethetünk egy egyszerű jelölést a dimer állapotokra. Legyen  $AB$  az a dimer állapot, ahol  $A$  a hátsó fej monomer állapota,  $B$  pedig az elülső. (Ezek rendre a MT – ill. + végéhez közelebbi pozíciókat jelentik, és nincs közük a haladási irányhoz). Ha legalább az egyik fej szabad, a sorrend értelmét veszti, azaz  $A\tilde{D}$  ugyanazt jelenti, mint  $\tilde{D}A$ .

Kétfejkötött állapotban a vad típusú NL rövidegsége miatt az elülső fej neck linkere nem lehet dokkolt, ezért, noha hosszabb NL-rel is végeztünk futtatásokat, ezeket az állapotokat a modell nem tartalmazza. Ez alól csak a későbbiekben bemutatott „tandem” kinezin kivétel.

### 4.3. Termodinamikai konzisztencia

Mivel a monomer és dimer állapotok közt egyedül a NL-ben ébredő erő tesz különbséget, a monomer állapotok közti sebességi állandókat egyenlőnek te-

4.1. táblázat. Monomer kinetikai paraméterek  $F = 0$  esetén.

paraméter	modell értéke	irodalmi értékek	egység	hivatkozások
$\Delta G_{T,T^*}$	-7	$\sim -1.2$	$k_B T$	[34]
$\Delta G_{D,D^*}$	5.5	$\sim 1$	$k_B T$	[34]
$k_{T \rightarrow 0}$	100	1–300 <sup>†</sup>	$s^{-1}$	[39], [40], [41], [35]
$k_{T^* \rightarrow 0}$	0			
$k_{0 \rightarrow T}$	3.8	0.8–5.6	$s^{-1} \mu M^{-1}$	[39], [40], [41], [42]
$k_{D \rightarrow 0}$	300	10–1000 <sup>†</sup>	$s^{-1}$	[39], [40], [41], [35], [42], [43], [44], [45]
$k_{D^* \rightarrow 0}$	0			
$k_{0 \rightarrow D}$	1.5	1.5	$s^{-1} \mu M^{-1}$	[44]
$k_{T \rightarrow D}$	10	70–500 <sup>†</sup>	$s^{-1}$	[40], [41], [35], [42]
$k_{T^* \rightarrow D^*}$	200			
$k_{D \rightarrow \bar{D}}$	10	10–100 <sup>†</sup>	$s^{-1}$	[39], [42], [43], [46]
$k_{D^* \rightarrow \bar{D}}$	105			
$k_{\bar{D} \rightarrow D}$	20	10–20	$s^{-1} \mu M^{-1}$	[41], [47]
$k_{T^{(*)} \rightarrow \bar{D}}$	3	N/A	$s^{-1}$	N/A

<sup>†</sup> A NL állapota nem derül ki a kísérletből

kintjük olyan dimer állapotok közti átmenetekével, ahol a másik fej  $\bar{D}$  állapotban van. A bemenő monomer kinetikai paramétereit a 4.1. táblázat tartalmazza. Célunk, hogy ezekből a paraméterekből a polimermodell és a termodinamikai konzisztencia felhasználásával megkapjuk az összes dimer átmenet kinetikai paraméterét. Az átmenetek fentebb tárgyalt erőfüggetlensége abban nyilvánul meg, hogy a táblázat minden eleme erőfüggetlen, kivéve a NL dokkolás szabadenergiáit. A monomer paraméterek közül a táblázat nem tartalmazza az ATP szintézis sebességi állandóját, mivel azt a többi bemenő paraméterből fogjuk számolni.

A modell hatékonysága leginkább a dimer állapotok közti kinetikai állapotok illetve a 4.1. táblázatban szereplő paraméterek száma ( $\approx (2 \times 6) \times (2 \times 6)$  illetve 14) közti nagy különbségben mutatkozik.

Jelölje  $k_{a \rightarrow b}$  az  $a$  állapotból a  $b$  állapotba vezető átmenet elsőrendű (azaz 1/idő dimenziójú) sebességi állandóját.  $a$  és  $b$  vagy monomer állapotok vagy dimer állapotok. Az  $a$  és  $b$  állapot közötti egyensúlyi állandón a

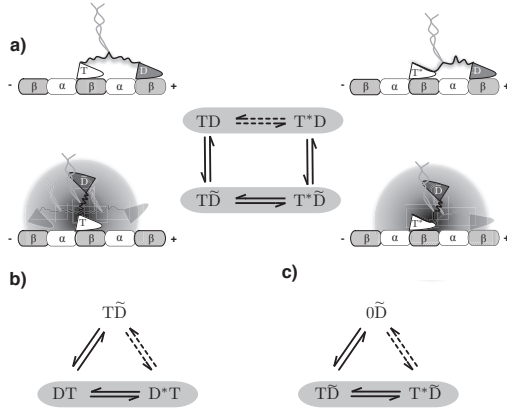
$$K_{a,b} = \frac{k_{a \rightarrow b}}{k_{b \rightarrow a}} = e^{-\frac{\Delta G_{a,b}}{k_B T}} \quad (4.1)$$

kifejezést értjük, ahol  $\Delta G_{a,b} = G_b - G_a$  a két állapot közötti szabadenergia-különbség.

A termodinamikai konzisztencia a kinezin esetében azt követeli meg, hogy az átmeneteknek minden olyan sorozatában, aminek kezdő és végállapota  $m$  periódusnyi eltolástól eltekintve megegyezik, az egyensúlyi állandókra teljesüljön a

$$K_{a,b} K_{b,c} \cdots K_{z,a} = e^{-n \frac{\Delta G_{\text{ATP}}}{k_B T} + \frac{m F l}{k_B T}} \quad (4.2)$$

összefüggés, ahol  $n$  az átmenetek sorozata alatt elhidrolizált ATP molekulák számát jelenti ( $n < 0$  ATP szintézisnek felel meg),  $m$  a megtett lépések száma,



4.2. ábra. A NL dokkolása termodinamikai dobozokban. A termodinamikai dobozok szaggatott nyíllal jelölt átmeneteinek egyensúlyi állandóját számoljuk ki a 4.14., 4.15. és 4.16. képletekkel.

$F$  a külső erő,  $L$  a lépéshossz, valamint

$$\Delta G_{\text{ATP}} = \Delta G_{\text{ATP}}^0 - k_{\text{B}}T \ln \left( \frac{[\text{ATP}]}{[\text{P}_i][\text{ADP}]} \right) \quad (4.3)$$

az egy ATP molekula hidrolízise során felszabaduló szabadenergia. Ha a koncentrációkat mol/liter-ben adjuk meg, a  $\Delta G_{\text{ATP}}^0$  standard szabadenergia-változás értéke  $\approx -32.5 \text{ kJ/mol} \approx -13.5k_{\text{B}}T$ . Hacsak másképp nem jelöljük, a szimulációk során  $[\text{ATP}] = [\text{P}_i] = 10^{-3} \text{ mol/l}$  és  $[\text{ADP}] = 0.01[\text{ATP}]$  értékeket használunk. Így egy ATP hidrolízisével járó szabadenergiaváltozás  $\Delta G_{\text{ATP}} \approx -25k_{\text{B}}T$ .

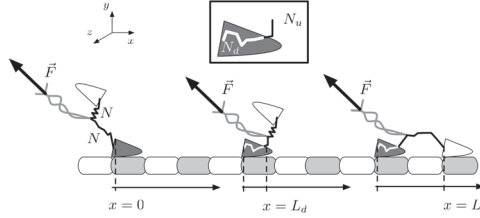
A 4.2. egyenlet által leírt hurkokat termodinamikai dobozoknak hívjuk. Ezek segítségével olyan átmenetek egyensúlyi állapotait kaphatjuk meg, amiket akár kísérleti, akár elméleti úton máskülönben nehéz lenne meghatározni. A 4.2. ábrán a modellben felhasználtak közül látható az a három termodinamikai doboz, amiben NL dokkolás is lejátszódik.

## 4.4. Polimer modell

Mivel a fejek a húzóerőt neck linkereiken keresztül érzik, az erőfüggő viselkedés reprodukálásában a főszerepet a NL megfelelő modellezése játssza. A modell segítségével tudjuk kiszámítani a szabad fej sűrűségét az elülső és a hátsó kötőhelyeken, valamint a NL dokkolásának egyensúlyi állapotját.

A NL egy polimerszál, aminek vég-vég vektorának leírására több modell létezik. Ha végtelen sok, a kapcsolódási pontban szabadon forogni tudó, merev rudat összekapcsolunk, a vég-vég vektor sűrűségfüggvénye Gauss lesz, vagyis a vég-vég vektor harmonikus potenciált érez. A Gauss lánc hosszának várható értéke az erő függvényében nem korlátos, ezért a NL leírásánál nem szerencsés az alkalmazása. Nagyobb hátrahúzó erőknél Gauss láncnál ugyanis előfordulhat, hogy a szabad fejet túlhúzzuk a kötőhelyen.

A legegyszerűbb véges megnyúlással bíró polimermodell a freely jointed chain (FJC) modell. Ez a polimerszál  $l_{\text{K}}$  hosszú, egymáshoz kapcsolódó merev rudak (Kuhn szegmensek) láncaként írja le. A Kuhn szegmensek a



4.3. ábra. Sematikus ábra a kinezinről

kapcsolódási pontokban szabadon foroghatnak. Az  $l_K$  hosszúság neve Kuhn hossz. Ennek értéke  $2l_p$ , ahol  $l_p$  a perzisztenciahossz, vagyis az a távolság, amin egy hajlítható lánc tangensvektorának autokorrelációja lecseng. Ha a lánc  $N$  darab Kuhn szegmensből áll, akkor a maximális megnyúlás  $Nl_K$ . Kis megnyújtáshoz szükséges erő nagy  $N$  esetén a megnyújtás lineáris függvénye, nagy megnyúlásokra az erő hatványfüggvény szerint nő.

Megjegyezzük, hogy a worm like chain (WLC) modell is egy véges megnyúlással bíró polimermodell, és ilyen szempontból szintén megfelelő lett volna. A két NL dokkoló és nem dokkoló szakaszokra bontása miatt a feladatra jobban illeszkedik a FJC modell, a szakaszok illesztésénél ugyanis a WLC is FJC-ként viselkedik.

A derékszögű koordináta-rendszert úgy vesszük fel, hogy az  $x$  tengely legyen párhuzamos a MT-sal, és mutasson annak + vége felé. Az  $y$  tengely legyen a MT felszínére merőleges, a  $z$  tengely pedig a MT felszínére tangenciális. A kinezin szára mindig az  $x-y$  síkban van (oldalirányban nem húzzuk). A szár végén ható  $\vec{F} = (F, |F| \tan \alpha, 0)$  erő  $\alpha$  szöget zár be a MT-sal.  $\alpha$ -t a kísérlet geometriája (az optikai csipeszbe fogott gyöngy mérete és a kinezin szárának hossza) határozza meg, mi  $45^\circ$ -nak vettük. Az „erő nagysága” alatt  $\vec{F}$   $x$  komponensét,  $F$ -et értjük; ez az a mennyiség, amit kísérletek során mérni szoktak. A „teher” ennek  $-1$ -szerese.

Egy fej NL-e  $N = N_d + N_u$  darab Kuhn szegmensből áll.  $N_d$  azon Kuhn szegmensek száma, amik le tudnak dokkolni,  $N_u$  pedig a nem dokkolóké

(undocked). Ha a koordináta rendszer origóját a teljes NL elejére helyezzük, akkor dokkolt NL esetén a NL nem dokkolt része  $\vec{L}_d = (L_d, 0, 0)$ -ból indul (4.3. ábra).

Egyfejkötött esetben a szabad fej addig diffundál, míg rá nem talál az elülső vagy hátsó kötőhelyre a MT-on. A lekötés sebességi állandója a szabad fej kötőhelyen felvett sűrűségével arányos, amit mi a NL végének sűrűségével azonosítunk. Ezt a közelítést a fej gyors diffúziója teszi lehetővé (lásd 4.2.1. fejezet).

#### 4.4.1. A szabad fej sűrűsége a kötőhelyen

A szabad fejre nem hat erő. Jelölje  $\rho_N^0(\vec{R})$  az  $N$  Kuhn szegmensből álló szabad NL  $\vec{R}$  vég-vég vektorának egyre normált valószínűség-sűrűségét. Ez egy gömbszimmetrikus eloszlás, ami maximumát  $N > 1$ -re 0-ban veszi fel, mivel az entrópia itt maximális. Az eloszlás maximumának 0-ból való kitérítéséhez erőt kell kifejtenuünk, az ilyen polimereket ezért entropikus rugónak is nevezik.  $N \rightarrow \infty$  esetén  $\rho_N^0(\vec{R})$  egy Gauss-eloszlás, de bármely  $N < \infty$ -re is kiszámítható analitikusan.

Legyen  $\rho(\vec{R})$  egy háromdimenziós, gömbszimmetrikus sűrűségfüggvény és legyen  $\vec{R} = 0$  az origó. Ekkor  $\rho(\vec{R})$  és  $x$  tengelyre vett vetülete,  $\tilde{\rho}(x)$  közötti összefüggés:

$$\rho(\vec{R}) = -\frac{1}{2\pi|\vec{R}|} \left. \frac{d\tilde{\rho}(x)}{dx} \right|_{x=|\vec{R}|} \quad (4.4)$$

Mivel egy, az egyik végén rögzített merev rúd másik vége csak egy gömb felszínén mozoghat,  $\rho_1^0(\vec{R}) = \delta(l_K - |\vec{R}|)/(4l_K^2\pi)$ , ahol  $\delta$  a Dirac delta függvény. Ha ezt a 4.4. egyenletbe helyettesítjük és az egyenletet kiintegráljuk,  $\tilde{\rho}_1^0(x)$ -re egy konstans  $1/(2l_K)$  értékű függvényt kapunk  $[-l_K, l_K]$  tartóval.  $\tilde{\rho}_1^0(x)$ -t  $N - 1$ -szer autokonvolválva kapjuk  $\tilde{\rho}_N^0(x)$ -t, amit a 4.4. egyenlet segítségével tudunk visszaalakítani a háromdimenziós  $\rho_N^0(\vec{R})$  eloszlássá. Ily módon tehát kiszámolhatjuk bármely  $N$  darab Kuhn szegmensből álló erőmentes polimerlánc 3 dimenziós vég-vég vektorának sűrűségfüggvényét.

Jelölje  $\rho_N(\vec{R}, \vec{F})$  az egyik végén  $\vec{F}$  erővel meghúzott,  $N$  Kuhn szegmensből

álló NL  $\vec{R}$  vég-vég vektorának sűrűségfüggvényét, ahol  $\vec{R}$  a NL fej felőli vége felől mutat a NL húzott vége felé. Az erő megtöri a gömbszimmetriát, mivel a valószínűség minden  $\vec{R}$  helyen megsúlyozódik egy Boltzmann faktoriall:

$$\rho_N(\vec{R}, \vec{F}) = \frac{\rho_N^0(\vec{R})e^{\frac{\vec{F}\vec{R}}{k_B T}}}{Z_N(\vec{F})} \quad (4.5)$$

ahol

$$Z_N(\vec{F}) = \int \rho_N^0(\vec{R}')e^{\frac{\vec{F}\vec{R}'}{k_B T}} d\vec{R}' \quad (4.6)$$

az állapotösszeg.

Tekintsünk két összekapcsolt,  $N_1$  és  $N_2$  Kuhn szegmensből álló NL-t, amelyek közül az elsőt a kapcsolódási pontban  $\vec{F}$  erővel húzunk, a második szabad (lásd a 4.3. ábra bal oldali vagy középső diagramját). Az  $\vec{R}$  vég-vég vektor  $\rho_{N_1, N_2}(\vec{R}, \vec{F})$  sűrűsége a kötött fej 4.5. egyenlet által leírt NL-ének és a szabad fej  $\rho_{N_2}^0$  sűrűségű NL-ének konvolúciójából adódik:

$$\rho_{N_1, N_2}(\vec{R}, \vec{F}) = \int \rho_{N_1}(\vec{R}', \vec{F})\rho_{N_2}^0(\vec{R} - \vec{R}')d\vec{R}'. \quad (4.7)$$

Nem dokkolt NL esetén a fej sűrűsége tehát

$$c(\vec{R}, \vec{F}) = \frac{\int \rho_N^0(\vec{R}')e^{\frac{\vec{F}\vec{R}'}{k_B T}} \rho_N^0(\vec{R} - \vec{R}')d\vec{R}'}{\int \rho_N^0(\vec{R}')e^{\frac{\vec{F}\vec{R}'}{k_B T}} d\vec{R}'}, \quad (4.8)$$

dokkolt esetben pedig

$$c^*(\vec{R}, \vec{F}) = \frac{\int \rho_{N_u}^0(\vec{R}' - \vec{L}_d)e^{\frac{\vec{F}\vec{R}'}{k_B T}} \rho_N^0(\vec{R} - \vec{R}')d\vec{R}'}{\int \rho_{N_u}^0(\vec{R}' - \vec{L}_d)e^{\frac{\vec{F}\vec{R}'}{k_B T}} d\vec{R}'}. \quad (4.9)$$

A szabad fej előrekötésének (elsőrendű) sebességi állandója így dokkolatlan NL esetén  $k_b c(\vec{L}, \vec{F})$ , dokkolt NL esetén  $k_b c^*(\vec{L}, \vec{F})$ , ahol  $k_b$  a fej oldatból MT-hoz kötődésének másodrendű sebességi állandója,  $\vec{L} = (L, 0, 0)$  pedig az előlő kötőhelyre mutató vektor. Hátrakötés esetén  $\vec{L}$  helyébe egyszerűen  $-\vec{L}$ -t írunk. Az összetett egyfejkötött állapotokból ( $D^{(*)}\tilde{D}$  és  $T^{(*)}\tilde{D}$ ) törtéző lekötések sebességi állandóihoz még ki kell számolnunk a dokkolt illetve dokkolatlan NL valószínűségét, hogy ezekkel súlyozzuk a  $c^*(\vec{L}, \vec{F})$  és  $c(\vec{L}, \vec{F})$  sűrűségeket.



#### 4.4.2. A NL dokkolásának valószínűsége

Az NL dokkolásával járó szabadenergiaváltozás két részből tevődik össze: a kémiai kötések kialakulásával járó nagy entalpiacsökkenésből és az ezt majdnem kompenzáló, a NL rendeződésével járó entrópiacsökkenésből. Rice és munkatársai mérése szerint ha a fej ATP-t tartalmaz, a NL dokkolás külső erő nélkül így szabadenergiailag végeredményben kicsit kedvező lesz, ADP esetében pedig kicsit kedvezőtlen. Jelölje  $G_a$  egy  $a$  állapot szabadenergiáját és legyen  $\Delta G_{a,b} = G_b - G_a$ . Rice egyfejkötött kinezinre  $\Delta G_{T,T^*} \approx -1.2k_B T$  illetve  $\Delta G_{D,D^*} \approx 1k_B T$  értékeket mért [34].

Egyfejkötött esetben, ha erőt kapcsolunk a kötött fej NL-ének végére, annak minden állapot a megsúlyozódik egy  $e^{\frac{F\vec{R}}{k_B T}}$  Boltzmann faktoriall. A dokkolt és nem dokkolt állapot közötti  $K_{A,A^*}(\vec{F})$  egyensúlyi állandó ezézt

$$K_{A,A^*}(\vec{F}) = e^{-\frac{\Delta G_{A,A^*}}{k_B T}} \frac{\int \rho_{N_u}^0(\vec{R}' - \vec{L}_d) e^{\frac{F\vec{R}'}{k_B T}} d\vec{R}'}{\int \rho_N^0(\vec{R}') e^{\frac{F\vec{R}'}{k_B T}} d\vec{R}'}, \quad (4.10)$$

ahol  $A$  D-t vagy T-t jelent.

Az egyensúlyi állandóból a dokkolt NL  $P_A^*$  és a dokkolatlan NL  $P_A = 1 - P_A^*$  valószínűségét a

$$P_A^*(\vec{F}) = \frac{K_{A,A^*}(\vec{F})}{1 + K_{A,A^*}(\vec{F})}. \quad (4.11)$$

és a

$$P_A(\vec{F}) = \frac{1}{1 + K_{A,A^*}(\vec{F})}. \quad (4.12)$$

kifejezések adják. A szabad fej előrekötésének várható ideje végül a következő alakot ölti:

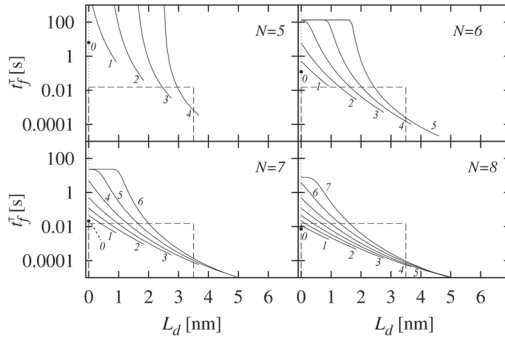
$$t_f^A(F) = \frac{1}{k_b [P_A^*(\vec{F})c^*(\vec{L}, \vec{F}) + P_A(\vec{F})c(\vec{L}, \vec{F})]}. \quad (4.13)$$

#### 4.4.3. A polimermodell kísérleti vonatkozásai

Carter és Cross több erőre megmérte a kinezin sebességét [29]. Növelve a hátrahúzó erőt, egyre kevesebb előrelépést és egyre több hátrálépést figyeltek meg, majd  $-7$  pN-nál az előre- és hátrálépések száma egyenlő lett. Ezt az

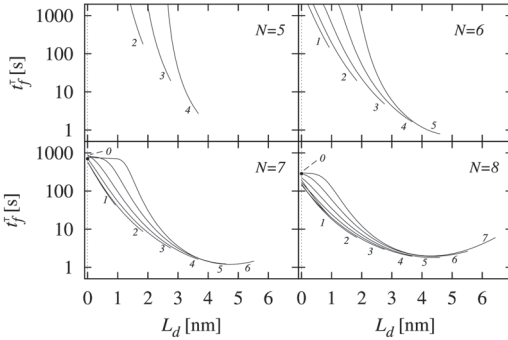
$F_s$  erőértéket megállító erőnek („stall force”) hívjuk. Telítő ATP koncentrációra megállító erőnél egy előrelépés ideje átlagosan 0.3 s, 0 pN esetén pedig 0.015 s. Mivel egy lépés alatt előrekötésen kívül sok egyéb dolog is történik (pl. nukleotid felvétel, hidrolízis), az előbbi idők felső korlátot jelentenek  $t_f^T(-7\text{pN})$  és  $t_f^T(0)$  értékére. A 4.5. és a 4.4. ábra a dokkoló NL hosszának függvényében mutatja  $t_f^T$  értékeit  $F = -7$  pN-ra és  $F = 0$ -ra, ha a Rice-féle kísérletben kapott értékhez közeli  $\Delta G_{\text{T},\text{T}^*} = -2k_{\text{B}}T$ -t használjuk. Erőmentes esetben a legtöbb görbe bejut a szaggatott vonalakkal határolt elfogadható tartományba (4.4. ábra). A megállító erőnél azonban a legjobb idő 0.3 s helyett 1 s ( $N = 6, N_{\text{d}} = 5$ ), de az is úgy, hogy a dokkolt NL túllóg a fejen ( $L_{\text{d}} = 4.5\text{nm} > 3.5\text{ nm}$ ).

$t_f$  még három állítható paraméteret tartalmaz:  $k_{\text{b}}^T$ -t,  $I_{\text{p}}^T$ -t és  $\Delta G_{\text{T},\text{T}^*}$ -t. A



4.4. ábra. A szabad fej előrekötésének várható ideje  $L_{\text{d}}$  függvényében, ha a kötött fej ATP-t tartalmaz.  $\Delta G_{\text{T},\text{T}^*} = -2k_{\text{B}}T$ ,  $F = 0$ . A négy ábra különböző  $N$  számú Kuhn szegmensből álló NL-eket mutat, a görbék mellett számok  $N_{\text{d}}$ -t jelölik. A szaggatott vonalakkal határolt területet a fej 3.5 nm-es mérete és a kísérletben mért 0.015 s-os felső határ keretezi.

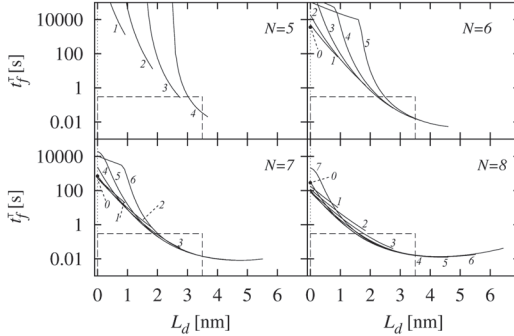
$t_f(l_p)$  függvénynek 0.55 nm körül minimuma van, ahol mintegy háromszoros csökkenést figyelhetünk meg a 0.46 nm-hez képest, azonban a kinezin randomness paramétere (lásd 5.1. fejezet) elromlik.  $k_b$  értékét százszorosára (2000 s<sup>-1</sup>) növelve  $t_f$  ismét eléggé lecsökkenne ahhoz, hogy a kísérletek alapján elfogadható tartományba essen. A kísérleti adatoktól ilyen nagymértékű elrugaszkodás igazolására mondhatnánk, hogy mivel  $k_b$ -re csak szabad (oldatban lévő) kinezinekre vonatkozó mérések vannak, egyfejkötött esetben, mikor a szabad kinezin fej már eleve közel van a MT-hoz, a MT és a kinezin fej között fellépő elektrosztatikus vonzás következtében ez a sebességi állandó sokkal nagyobb. Az élő sejtben tipikusan 1 nm-es Debye távolság azonban túl kicsi ahhoz, hogy a 9 nm hosszú NL végén diffundáló fej bármit is érezzen a MT töltéséből. Mivel 100 s<sup>-1</sup> körül  $k_b$  diffúzió-limitálttá válik, ennél nagyobb érték fizikailag nem lenne igazolható.



4.5. ábra. A szabad fej előrekötésének várható ideje  $L_d$  függvényében, ha a kötött fej ATP-t tartalmaz.  $\Delta G_{T,T^*} = -2k_B T$ ,  $F = -7$  pN. A négy ábra különböző  $N$  számú Kuhn szegmensből álló NL-eket mutat, a görbék melletti számok  $N_d$ -t jelölik.

$\Delta G_{T,T^*} - 7k_B T$ -re állítva  $t_f$ -re a 4.6. ábrát kapjuk. Így már több NL-hosszra is elfogadható lépésidő értéket kapunk. Mivel az irodalomban szereplő 13 aminosavas NL-hez a  $N = 5, N_d = 4$ -es NL áll legközelebb, ezért ezt választottuk a kinetikai modell futtatásához. Mivel a szabadenergia-különbségeket csak Rice és munkatársai mérték ki,  $\Delta G_{T,T^*}$  értékének  $-7k_B T$ -re állításával csak egy mérést hagyunk figyelmen kívül.

A 4.5. ábra arra bizonyíték, hogy NL dokkolás nélkül a kinezin nem tudna a kísérletekben alkalmazott erő ellenében haladni. Noha 0 erő mellett még  $\Delta G_{T,T^*} = -2k_B T$  szabadenergiaváltozás is elég lenne (4.4. ábra,  $N = 8, N_d = 0$ ),  $F_s$  környékén azonban NL dokkolás nélkül a kinezinnek legalább 100 másodpercre lenne szüksége egy lépéshez (4.5. ábra,  $N_d = 0$  pontok). Tehát még a kinetikai modell alkalmazása előtt, pusztán polimermodellezési



4.6. ábra. A szabad fej előrekötésének várható ideje  $L_d$  függvényében, ha a kötött fej ATP-t tartalmaz.  $\Delta G_{T,T^*} = -7k_B T$ ,  $F = -7$  pN. A négy ábra különböző  $N$  számú Kuhn szegmensből álló NL-eket mutat, a görbék melletti számok  $N_d$ -t jelölik. A szaggatott vonalakkal határolt területet a fej 3.5 nm-es mérete és a kísérletben mért 0.015 s-os felső határ keretezi.

megfontolások alapján kizárhatjuk azt a lehetőséget, hogy a NL csak azután dokkol, hogy a másik fej előrekötött: a lépéshez szükség van a NL dokkolásra.

## 4.5. Termodinamikai dobozok alkalmazása

Egyfejkötött esetben már kiszámítottuk a NL-dokkolt állapot valószínűségét. A polimermodell közvetlen alkalmazása a NL dokkolásra kétfejkötött esetben igen bonyolult mikroszkopikus megfontolásokat igényelne. A 4.2.a ábrán látható termodinamikai dobozra a 4.2. egyenletet alkalmazva azonban rögtön megkapjuk az egyensúlyi állandót.

$$K_{AB,A^*B}(\vec{F}) = K_{A,A^*}(\vec{F}) \frac{c^*(\vec{L}, \vec{F})}{c(\vec{L}, \vec{F})}, \quad (4.14)$$

ahol  $A$  a T és D állapotok közül az egyik,  $B$  pedig T, D vagy 0.

A 4.2.b ábra dobozának kérdéses átmenete a szabad fej a hátsó kötéshelyhez kötődése NL dokkolása közben. Ennek sebességi állandóját így kapjuk meg:

$$k_{B\bar{D} \rightarrow D^*B}(\vec{F}) = k_{D^* \rightarrow \bar{D}} \frac{k_{\bar{D} \rightarrow D}}{k_{D \rightarrow \bar{D}}} K_{DB,D^*B}(\vec{F}), \quad (4.15)$$

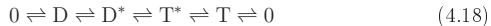
ahol  $B$  ismét T, D, vagy 0 közül bármelyik, a képlet utolsó egyensúlyi állandóját pedig a 4.15. egyenlet adja.

A harmadik, 4.2.c dobozból az üres fej NL-dokkolással egybekötött nukleotidfelvételének sebességi állandóját kapjuk.

$$k_{0B \rightarrow A^*B}(\vec{F}) = k_{A^* \rightarrow 0} \frac{k_{0 \rightarrow A}}{k_{A \rightarrow 0}} K_{AB,A^*B}(\vec{F}), \quad (4.16)$$

ahol  $A$  T vagy D,  $B$  pedig T, D, vagy 0.

A 4.14., 4.15. és 4.16. termodinamikai dobozok egyike sem tartalmaz ATP hidrolízist. A 4.3. egyenletet az ATP szintézis sebességi állandójának kiszámítására használjuk fel. Vegyük például a következő két ciklust:



A 4.17. illetve a 4.18. átmenetek helyett bármely más ciklus megfelelő, amiben szerepel a  $T \rightarrow D$  illetve a  $T^* \rightarrow D^*$  átmenet és aminek ismerjük a végállapotai közötti szabadenergia-különbséget. A 4.2. egyenlet alapján felírhatjuk:

$$k_{D \rightarrow T} = k_{T \rightarrow D} \frac{k_{D \rightarrow 0}}{k_{0 \rightarrow D}} \frac{k_{0 \rightarrow T}}{k_{T \rightarrow 0}} e^{\frac{\Delta G_{ATP}}{k_B T}} \quad (4.19)$$

$$k_{D^* \rightarrow T^*} = k_{T^* \rightarrow D^*} \frac{k_{D \rightarrow 0}}{k_{0 \rightarrow D}} \frac{k_{0 \rightarrow T}}{k_{T \rightarrow 0}} e^{\frac{\Delta G_{D,D^*} - \Delta G_{T,T^*}}{k_B T}} e^{\frac{\Delta G_{ATP}}{k_B T}}. \quad (4.20)$$

Hackney oxigén izotóppal végzett mérései során  $k_{D \rightarrow T} = 0.0017 \text{ s}^{-1}$  értéket kapott. A 4.19. egyenlet ugyanerre a mennyiségre nekünk  $0.0023/\text{s}^{-1}$ -t adott, ami nagyon jó egyezés.

## 4.6. A kinetikai modell implementálása

A modellt egy mintegy 1000 soros C programban kódoltam le. A program ki-próbálható a <http://kinesin.elte.hu> honlapon (Firefox böngésző és Java Script engedélyezése szükséges). Ezen a helyen a C forráskód is hozzáférhető.

A szimulációban a lépések helyes számlálása végett a két fejet külön kellett vennünk, így a 4.1. ábra 12 darab MT-hoz kötött állapota és az egy  $\tilde{D}\tilde{D}$  helyett  $24+1$  állapotunk volt.

A lépéseket kinetikai Monte Carlo módszerrel számítottam. Egy  $a$  állapotban eltöltött  $\tau_a$  idő az állapotból kivezető, konkrétan megvalósuló átmenettől függetlenül ugyanazt az exponenciális eloszlást követi. Az exponenciális eloszlás  $T_a$  időállandója az állapotból kivezető átmenetek sebességi állandójának összege. Az exponenciális eloszlású  $\tau_a$ -t a 0 és 1 között egyenletes eloszlású  $R$ -ből így nyerjük:

$$\tau_a = T_a \log(R). \quad (4.21)$$

Annak valószínűsége (és így gyakorisága), hogy konkrétan melyik átmenet valósul meg, az átmenet sebességi állandójával arányos.

A FJC implementálása során Mathematicával a 4.4. egyenletet alkalmazva előre legvártottuk a 3 dimenziós erőmentes eloszlásokat, amiket a C

program beolvas. A 4.7. egyenlet numerikus integrálásakor  $d\vec{R} = \min(Nl_K, N_u l_K)/70$ , az integrációs tartomány pedig a két NL által bejárható gömbök metszete.

Az általunk használt FJC modell nem veszi figyelembe a lánc önelkerülését valamint a MT illetve a fejek okozta szterikus hatásokat. Ez utóbbi kettőt úgy lehetne a beépíteni a modellbe, hogy definiálunk egy

$$\Theta(\vec{R}) = \begin{cases} 0 & \text{ha } R_y < 0 \text{ vagy } |\vec{R}| < 2 \text{ nm,} \\ 1 & \text{különben.} \end{cases} \quad (4.22)$$

kizárási függvényt, amivel megszorozzuk a 4.5. egyenlet számlálóját és a 4.6. egyenlet integrandusát. Az  $R_y < 0$  a MT, a  $|\vec{R}| < 2$  nm pedig a MT-hoz kötött 2 nm sugarú fej helyén tenné 0-vá a láncvégek sűrűségét. A MT és a kötött fej helyéről kivett valószínűség a többi helyen eloszlik, így a kötőhelyeken megnövekedett sűrűségértékeket kapunk. Ez a növekedés azonban legfeljebb csak kétszeres, ugyanakkor a számítások nagyon lelassulnak, hiszen a NL-ek minden kapcsolódási pontjára újra kell számolni a szabad fej NL-ének 4.6. állapotösszegét. A 4.22. kizárási függvényt ezért végül nem használtuk.

Egy átmenet akkor számít lépésnek, ha az átmenet során egyfejkötött állapotba kerülünk és az előző egyfejkötött állapotban a másik fej volt kötött. A kinetika a  $\tilde{D}\tilde{D}$  állapotból indul. Az első lépés nem kerül bele a statisztikába.





## 5. fejezet

# Eredmények

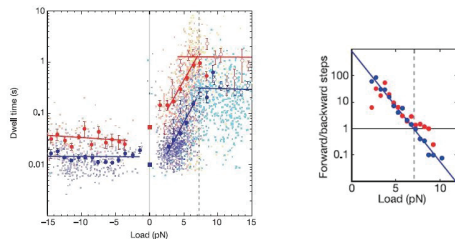
A szimuláció futtatásával elsődleges célunk Carter és Cross mérési eredményeinek [29] reprodukálása volt. Emellett még szerettünk volna megfelelni az irodalomban gyakori 100-200 lépéses processzivitásértéknek, Block és társai randomness méréseinek, és néhány, mutáns kinezinekkel végzett kísérletnek is. A 4.1. táblázat tartalmazza azokat a paraméterértékeket, amikkel a legjobb illesztést értük el. Ugyanitt feltüntettük az irodalomban fellelhető mért értékeket is. A 4.1. táblázat 14 paraméterén kívül bemenő paraméterek voltak még:  $N_d = 4$ ,  $N_u = 1$ ,  $\alpha = 45^\circ$ ,  $[ADP] = 0.01[ATP]$ ,  $[ATP] = 1\text{mM}$ ,  $[P_i] = 1\text{mM}$ ,  $L = 8\text{nm}$ ,  $L_d = 3.5\text{nm}$ ,  $l_p = 0.46\text{nm}$ .

### 5.1. Vad típusú kinezinek

Az 5.2. ábra lépésidőt mutató része elég nagy hasonlóságot mutat az 5.1. ábrán mutatott eredeti mérés eredményeivel. Ezek a görbék hordozzák a legtöbb információt.

A lépésidő erőfüggését Carter és Cross alacsony ( $10\mu\text{M}$ ) és magas ( $1\text{mM}$ ) ATP koncentráción mérték. A két görbe logaritmusos y-tengely mellett nagyjából párhuzamos. A vízszintes tengelyen a teher ( $= -F$ ) van feltüntetve.

Ha feltesszük, hogy előrehúzáskor lépésenként 1 ATP fogy, akkor a két koncentráció lépésidő-különbségéből  $k_{0\rightarrow T} \approx 4.3\text{ s}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$  adódik. Ehhez elég

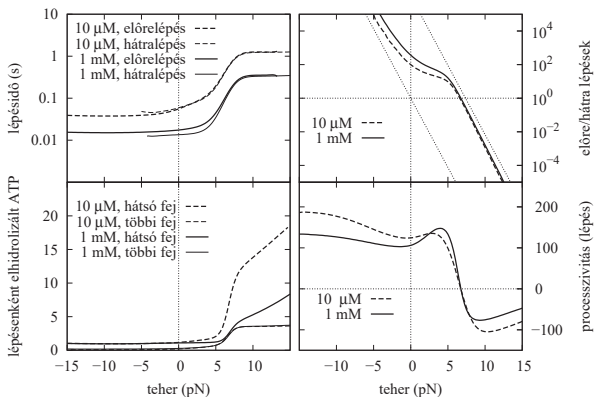


5.1. ábra. Dwell-time görbe és az előre- és hátralépések hányadosa Carter és Crossnál [29]. A lépésidő-görbe melletti kis pontok az egyes lépések idejei, a nagy pontok ezek átlaga. Piros: alacsony ATP koncentráció, kék: magas ATP koncentráció.

közeli a teljes kinetikával fittelt  $k_{0-T} \approx 3.8 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ -os érték.

A szimulációból kapott trajektóriákat elemezve arra jutottunk, hogy a különböző ATP koncentrációk esetén fennálló, nagy hátrahúzásokra megfigyelt nagy lépésidő különbséget a futilis hidrolízis okozza. Itt az előrelépések valószínűsége elhanyagolható, ezért lényegében az történik, hogy a kinezin egy AD állapotban két út közül választhat: az elülső fej vagy leválik a MT-ről, vagy kibocsátja az ADP-jét. Mivel a kinezin fej csak  $D^{(*)}$  állapotból tud leszakadni a MT-ről, ahhoz, hogy egy hátralépés megtörténjen, az elülső fejnek az utóbbi esetben ismét fel kell vennie egy ATP-t, azt el kell hidrolizálnia. Az elülső fej így átlagosan  $\frac{k_{D \rightarrow A} + k_{D \rightarrow \bar{D}}}{k_{D \rightarrow \bar{D}}}$  darab ATP-t hidrolizál el. Ez független az ATP koncentrációtól, ahogy az az 5.2. ábra bal alsó dobozában látszik is. (Itt — mivel egyfejkötött állapotban a kinezin nagyon rövid ideig tartózkodik — a „többi fej” lényegében az elülső fejben zajló hidrolízist jelenti.) Eközben a hátsó fej szintén hidrolizál, az 5.2. ábra szerint ráadásul jóval többet, mint az elülső. Az A függelékben található táblázatból kiderül, hogy 0 erőnél is van futilis hidrolízis: modellünkben a kinezin lépésenként 1.34 ATP-t fogyaszt. A legtöbb mérés 1 ATP/lépést jósol, ezek során azonban nem közvetlenül mérik a hidrolízist, hanem egy egyszerűsített kinetikai mo-

dellből [22] vagy randomness mérésen [24] keresztül következtetnek rá. Már részleteztük, milyen problémák adódhatnak egy nem teljes kinetikai hálózattól, a 3.7. fejezetben pedig megmutattuk, hogy a randomness csak az egyik fejben zajló hidrolízisek száma befolyásolja. Közvetlenül mért lépésenkénti hidrolízisre példa Yildiz és munkatársai 1.22 ATP/lépés értéke [25].



5.2. ábra. Szimuláció eredmények. A lépésidő, az előre- és hátralépések hányadosa, a lépésenkénti ATP hidrolízis és a processzivitás a teher függvényében. A negatív teher előrehúzást jelent.

Szembeötlő, hogy az előre- és hátralépések idejei végig együtt futnak. Hogy lehetséges ez? Előrehúzáskor miért nem az előrelépés a gyorsabb, erős hátrahúzáskor pedig miért nem a hátralépés?

Gondolatban egyszerűsítsük le a kinetikai hálózatot az előre- és hátralépések versenyére! A lassabb folyamat nem mehet végbe lassan, hiszen addig a gyorsabb már nagy valószínűséggel megtörténik. Ezért ugyanolyan gyorsnak fogjuk látni a két folyamatot, a gyakoriságuk lesz az, amiben különbözni fognak (hasonlóan a 4.6. fejezetben említettekhez). Nagy előrehúzó erőknél a lépésidő független az erőtől, hiszen itt az előrekötés ideje még nem limi-

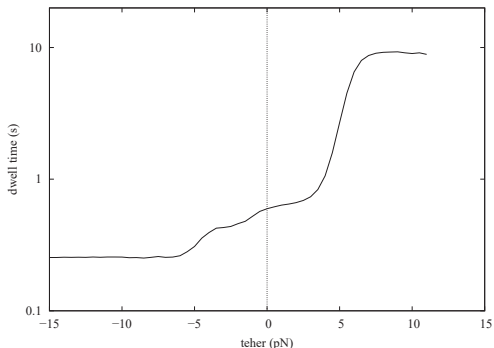
tál. 0 pN környékén elkezdődik egy, az előrelépések exponenciális lassulásának köszönhető exponenciális felfutás. A megállító erő körül beleütközünk az ugyanakkor exponenciálisan gyorsuló hátralépésekbe, és innentől a hátralépések ideje határozza meg a lépésidő erőfüggését. Ha a hátralépéseket letiltanánk, a lépésidő -7 pN után tovább emelkedne. Hasonlóan, ha az előrelépéseket tiltanánk le, a visszahúzó erőt csökkentve -7pN után a lépésidő nem csökkenne, hanem exponenciálisan nőne.

A lépésidő-görbe rendbetételéhez volt szükség a  $k_{T \rightarrow \bar{D}}$  paraméter bevezetésére. Nélküle nagy hátrahúzáskor a lépések túl lassúak lennének. Michio Tomishige hívta fel figyelmünket arra, hogy kísérletileg megfigyelték az ATP-t kötő fej disszociációját a MT-ről, és hogy ennek figyelembe vétele rendbe tenné a lépésidő-görbét. A  $\tilde{T}$  állapot bevezetése helyett inkább egy „kettős”, MT-ről leválást és ATP hidrolízist is tartalmazó átmenetet adtunk a modellhez. Mivel  $k_{T \rightarrow \bar{D}}$  értéke kicsi, erős hátrahúzáson kívül elhanyagolható a hatása. A  $k_{\bar{D} \rightarrow T}$  sebességi állandó értékét termodinamikai dobozból számítjuk.

Az eredeti mérésben 10  $\mu\text{M}$  ATP koncentrációra 1 pN teher környékén egy kis plató látszik. Van-e emögött valami?

Egyfejkötött állapot három féle lehet:  $0\tilde{D}$ ,  $T^{(*)}\tilde{D}$  vagy  $D^{(*)}\tilde{D}$ . Az erőt csökkentve mindhárom állapotra lesz egy „fordulópont”, ahol a hátrakötés valószínűbbé válik az előrekötésnél. Minden ilyen pontban a lépésidő megnő. A növekedés mértéke attól függ, hogy az adott egyfejkötött állapotból milyen gyakran történik lépés. Nagy ATP koncentráció esetén például a  $0\tilde{D}$  állapot fordulópontjában a lépésidő növekedése sokkal kisebb lesz, mint a  $T^{(*)}\tilde{D}$  állapotéban. A 4.1. táblázatban szereplő paraméterekre nagy ATP koncentrációra (5.2. ábra, bal felső doboz, alsó görbék) csak a  $T^{(*)}\tilde{D}$  fordulópontjában látható növekedés, és kis ATP koncentrációra (felső görbék) is csak egy nagyon enyhe dudor figyelhető meg 1 pN teher környékén (Bezier simítás nélkül ez a dudor jobban látható lenne).

Hogy lássuk, létező effektusról van szó, lecsökkentettük az ATP koncentrációt 1  $\mu\text{M}$ -ra (így a  $0\tilde{D}$  és  $D^{(*)}\tilde{D}$  fordulópontokban az ugrások nagyobbak



5.3. ábra. Az előrelépés idejének három fokozatú növekedése.  $[ATP]=1\mu M$ ,  $\Delta G_{T,T^*} = -12k_B T$  és  $\Delta G_{D,D^*} = -2k_B T$ . A hátrakötés sebességi állandója a következő teherértékeknél haladja meg az előrekötését:  $0\tilde{D}: \approx -7$  pN,  $D^{(*)}\tilde{D}: \approx -1.25$  pN és  $T^{(*)}\tilde{D}: \approx 3.8$  pN.

lettek) és megváltoztattuk  $\Delta G_{T,T^*}$ -t és  $\Delta G_{D,D^*}$ -t  $-12$  és  $-2k_B T$ -ra (amitől a fordulópontok helyei jobban szétváltak). Az 5.3. ábrán már jól látszik, hogy a lépésidő három fokozatban növekszik.

A processzivitásban  $4$  pN környékén látszik egy csúcs. Ennek magyarázata, hogy itt a szabad fej a  $\tilde{D}\tilde{D}^{(*)}$  állapotból a hátrahúzás miatt már elég gyorsan hátraköt ahhoz, hogy a kötött fej csak ritkán tudjon leválni a MT-ről, viszont a  $\tilde{D}T^{(*)}$  állapotban (azaz az egyfejkötött állapotok többségében) szinte mindig előreköt. Magas processzivitáshoz pedig épp erre a két dologra van szükség. Schnitzer és munkatársai méréseiben [48] ugyan szintén találunk egy csúcsot, de az  $0.5$  pN-nál van és a rossz felbontás és nagy mérési hiba miatt nem lehet eldönteni, hogy azonos-e az általunk látottal.

Az előre- és hátralépések  $h$  hányadosának teherfüggésére Carter és Cross a következő függvényt illesztette:

$$h = 802e^{-0.95 \times \text{teher}}, \quad (5.1)$$

amiben - mint erre M. Bier 2008-as cikkében felhívja a figyelmet - az az érdekes, hogy a kitevő éppen  $\frac{FL}{2k_B T}$  [49]. A nevezőben szereplő kettesre Bier a következő magyarázatot adja:

Legyen  $G < 0$  az elől kötött és hátul kötött fej szabadenergia-különbsége. Legyen  $\Phi$  a kötött fej NL-e és a MT által bezárt szög.  $\Phi$  előrekötés során 0-tól 180°-ig változik. Tegyük fel, hogy  $\Phi < 90^\circ$  esetén a fej hátraköt,  $\Phi > 90^\circ$  esetén pedig előre. Ha a legegyszerűbb lineáris összefüggést tételizzük fel a NL  $G(\Phi)$  szabadenergiájára ( $G(0) = 0, G(180) = G$ ), akkor  $\forall \Phi_1 < 90^\circ \exists \Phi_2 > 90^\circ: G(\Phi_2) = G(\Phi_1) + \frac{G}{2}$ . Vagyis az előrekötés és hátrakötés valószínűségének aránya a  $e^{\frac{G}{2k_B T}}$  Boltzmann faktoriall lesz arányos. Ha  $G$  helyébe  $G_0 - FL$ -t írunk, ahol  $G_0$  a 0 erő melletti szabadenergia-változás,  $FL$  pedig az egy lépés alatt végzett mechanikai munka, megkapjuk az 5.1. egyenlet erőfüggését.

Ez a magyarázat azonban több sebből vérzik. Egyrészt,  $G(\Phi)$  visszahat a különböző  $\Phi$  szögekhez tartozó állapotok betöltöttségére. Másrészt nem lehet  $\Phi$  alapján feltételt szabni az előre- és hátrakötésre. Továbbá az előre- vagy hátralépés nem azonos az előre- vagy hátrakötéssel: a lépés több alfolyamatból áll, amiknek csak egyike a lekötés.

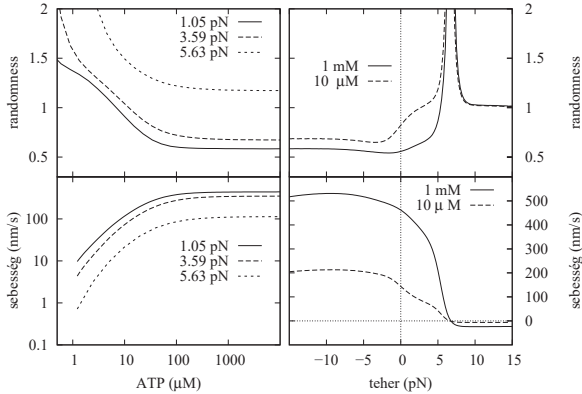
Csak nagy előre- vagy hátrahúzásra tudjuk megmondani az előre- és hátralépések hányadosának erőfüggését. Nagy hátrahúzó erők esetén, mikor már erőtlől függetlenül a lépések majdnem 100%-a hátralépés, a hányadost csak az előrelépés valószínűsége határozza meg, ez pedig az elülső kötőhelyen vett fejsűrűséggel együtt  $e^{\frac{FL}{k_B T}}$  szerint cseng le. A nagy hátrahúzó erő miatt a kötött fej neck linkere ugyanis teljesen hátrafelé szeret állni, ahonnan a szabad fej nem ér el az elülső kötőhelyre, csak a kötött fejig. Ahhoz, hogy elérjen, a kötött fej neck linkerének az  $F$  erő ellenében el kell mozdulnia  $L$  távolságot az elülső kötőhely irányában. Nagy előrehúzó erőkre hasonló a helyzet. Kis erőkre (ahol Carter és Cross is mért) a helyzet bonyolultabb, mivel ott mind az előre-, mind a hátralépés elég nagy valószínűséggel megtörténik. Az 5.2. ábra jobb felső dobozában behúztuk a két  $e^{\frac{FL}{k_B T}}$ -val arányos aszimptotát, amiket egy lankásabb átmenet köt össze. Carter és Cross adataihoz

nagyon hasonlítanak Nishiyama eredményei [31].

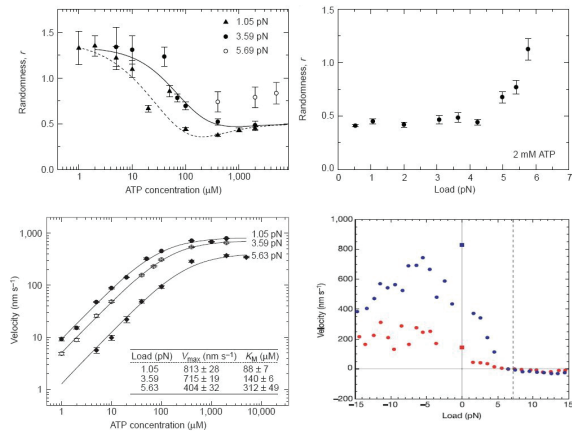
Az 5.4. ábra felső sorában a randomness ATP koncentráció- és teherfüggése látható. A visszahúzó erőt növelve a 3.7. egyenlettel összhangban a visszalépések egyre gyakoribbá válása miatt megnő a randomness. A megállító erőnél a randomness divergál, mivel ebben a pontban  $P_h = 0.5$ . Magas ATP koncentráció mellett kis visszahúzó erőre  $r \approx 0.5$ , ami két, egyenlő sebességű állandójú limitáló átmenetet jelent.

A randomness illesztése miatt kellett az ADP-s fej NL dokkolását kedvezőtlenebbé tennünk. A Rice által mért  $\Delta G_{D,D^*} = 1k_B T$  érték túl nagy randomnessot eredményez, ugyanis a 4.15. egyenlet értelmében sok lesz a hátralépés.

A szimuláció eredményeiből kiderült az is, hogy magas ATP koncentrációra és kis hátrahúzás esetén nem kettő, egyenlő sebességű állandójú limitáló



5.4. ábra. Szimuláció eredmények. Bal oszlop: Randomness és sebesség görbék ATP koncentráció függvényében több teherértékre (1.05, 3.59, 5.63 pN). Jobb oszlop: Randomness és sebesség görbék a teher függvényében 1 mM és 10  $\mu$ M ATP koncentrációra.



5.5. ábra. Sebesség és randomness görbék az ATP koncentráció és a teher függvényében. Visscher és munkatársai [27] és Carter és Cross [29] ábrái.

átmenetünk van, hanem három különböző:  $k_{D \rightarrow \bar{D}} = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_{T \rightarrow D} = 200 \text{ s}^{-1}$  és  $k_{D \rightarrow 0} = 300 \text{ s}^{-1}$ , ami szintén 0.5 körüli  $r$  értéket ad. Megjegyezzük, hogy bár a Visscher-féle mérésben (5.5. ábra, [27]) kis erőre  $r$  0.5 alá is lemegey, a Yildiz és munkatársai mérése az általunk kapott 0.58-os randomnesset közelíti meg jobban [25].

Megnéztük a kinezin sebességének ADP-függését is ATP hiányában. Ezt a kísérletet Yildiz és munkatársai végezték, eredményük az 5.7. ábra bal oldalán látható. Ez a kísérlet alkalmas a  $k_{0 \rightarrow D}$  sebességi állandó beállítására, mivel ez a paraméter a kis ADP koncentráció miatt máshol nem nagyon számít. A szimulációból kapott görbék (5.6. ábra, bal oldal) megegyeznek a kísérletiekkel.

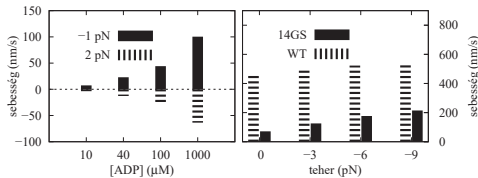


## 5.2. Mutáns kinezinek

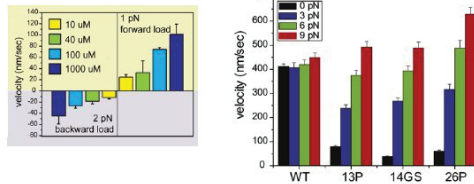
Mutáns kinezinekkel végzett kísérleteket is sikerült elég jó eredménnyel reprodukálnunk. Yildiz és munkatársai NL-t 14 aminosavval hosszabbították meg, és nézték a mutáns sebességének erőfüggését [25]. Erőmentes esetben a meghosszabbított neck linkerű kinezin sebessége körülbelül a tizede a vad típusúnak, 9 pN előrehúzás esetén azonban meg is haladja azt (5.7. ábra, jobb oldal, 14GS oszlop). A 14 aminosav a mi modellünkben NL-enként 6-tal több (azaz összesen 11) Kuhn szegmenst jelent. Ezek közül továbbra is 4 tud ledokkolni. 0 pN-nál ugyanazt a viselkedést kaptuk, mint Yildiz, de előrehúzó erő hatására a mutáns kinezin sebessége a kísérletben megfigyeltnek csak harmada. A 16 nm-es kötőhelyen olyan kicsi a 14GS szabad fejének sűrűsége, hogy a sebességen a kétszeres (16 nm-es) lépések engedélyezése sem segítene.

Case és munkatársai a teljes NL-t egy random coilra cserélték, és azt tapasztalták, hogy a kinezinek MT-mozgató hatása szinte teljesen megszűnt, ugyanakkor a másodpercenkénti ATP hidrolízis 60-ról csak 20-ra váltott [50]. Ezt a kísérletet szintén sikerült reprodukálnunk.

A NL random coilra cserélését a NL dokkolásával járó szabadenergia növelésével szimuláltuk. Eredményeink az 5.8. ábrán láthatók. A  $0k_B T$  a vad típusnak felel meg, míg a  $24k_B T$  a dokkolni teljesen képtelen (random coilra



5.6. ábra. Szimuláció eredmények. Bal oldal: A kinezin sebessége 0 ATP koncentráció mellett számos ADP koncentrációra két teherértékre. Jobb oldal: A vad típusú (WT) és meghosszabbított neck linkerű (14GS) kinezin sebessége különböző mértékű előrehúzások mellett. [ATP]=1 mM.

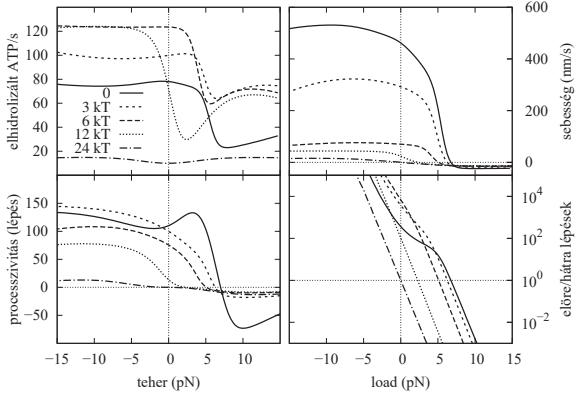


5.7. ábra. Bal oldal: A kinezin sebessége 0 ATP koncentráció mellett számos ADP koncentrációra két teherértékre. Jobb oldal: A vad típusú (WT) és meghosszabbított neck linkerű (13P, 14GS, 26P) kinezin sebessége különböző mértékű előrehúzások mellett [25]. Modellünkkel a WT és a 14GS oszlopot szimuláltuk. [ATP]=1 mM

csérelt) NL-nek.  $24k_B T$  esetén a sebesség, processzivitás és az előre és hátralépés hányadosa görbék antiszimmetrikusak, míg az elhidrolizált ATP/s görbe szimmetrikus. Ez az előre- és hátralépés szimmetriáját fejezi ki NL dokkolás hiányában. Az ábrák a kísérleti eredményekkel jó egyezést mutatnak: vad típusú kinezin  $\approx 450$  nm/s körüli sebessége 0-ra esik le, míg a másodpercenkénti ATP hidrolízis 80-ról csak 15-re változik.

Michio Tomishige szóban számolt be olyan kísérletről, amelyben a kinezin egyik (mutáns) fejének neck linkerét elvágták, és a fej elejéhez kötötték. (Valamiért erre a kinezin konstrukcióra a „tandem” elnevezés ragadt.) Az eredeti NL dokkolni képes részéből meghagytak egy szakaszt, ami így nem volt összeköttetésben a másik fejjel, viszont valószínűleg befolyásolta a mutáns fej kinetikai paramétereit. Mindkét NL-t meghosszabbították. A sebesség függött a meghagyott NL szakasz hosszától, az optimális hossznál értéke 100 nm/s körül volt.

A két különböző fej miatt eltűnik a 4.1. ábra szimmetriája, ezért a kísérlet implementálásához meglehetősen át kellett írni a szimuláció sebességi állandókat számoló függvényét. Három neck linkerünk van: a vad típusú fej  $N$  Kuhn szegmensevel, a mutáns fej dokkolni tudó NL-e, ami a fej kinetikai pa-

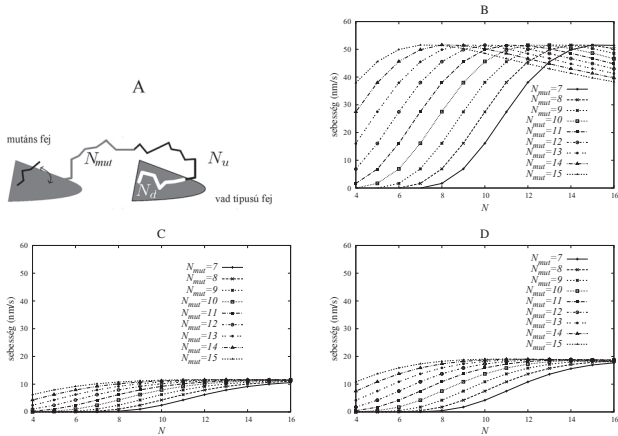


5.8. ábra. Szimuláció eredmények. A másodpercenként elhidrolizált ATP, a sebesség, a processzivitás és az előre- és hátralépések hányadosa a teher függvényében, megnövelt NL dokkolás szabadenergia ( $\Delta G_{T,T^*}$  és  $\Delta G_{D,D^*}$ ) mellett. A szabadenergianövekmények: 0 (vad típus), 3, 6, 12, és 24  $k_B T$ .

$$[\text{ATP}] = 1 \text{ mM}$$

ramétereit befolyásolja és a mutáns fej  $N_{mut}$  darab Kuhn szegmensből álló, a másik fej NL-éhez csatlakozó NL-e. A két fejet összekötő NL szempontjából a mutáns fej egy állandóan dokkolt neck linkerű fej, a mutáns fej kinetikai paraméterei (nukleotid felvétel, stb.) viszont a meghagyott NL szakasz hosszától és állapotától függenek. Ez volt az egyetlen szimuláció, ahol megengedtük a hátrakötést abban az esetben, ha a kötött fej NL-e dokkolt.

Három esetet vizsgáltunk: 1. a mutáns fej kinetikai paraméterei egy dokkolt fejével egyeznek meg 2. a mutáns fej kinetikai paraméterei egy dokkolatlan fejével egyeznek meg 3. a mutáns fej kinetikai paraméterei egy erőmentes fejével egyeznek meg. Ezek eredményeit mutatja az 5.9. ábra, ahol a NL hosszak függvényében néztük a kinezin sebességét. A kinezinek sebességének maximuma 50 nm/s-nál volt, ez azonban a dokkolt esetben történt. A való-



5.9. ábra. Szimuláció eredmények. Tandem kinezin. **A**: A tandem kinezin sematikus rajza. **B-D**: Sebesség a vad típusú fej ( $N$ ) és a mutáns fej ( $N_{mut}$ ) NL hosszának függvényében, ha a mutáns fej lógó neck linkere **B**: dokkol, **C**: dokkolatlan, **D**: úgy viselkedik, mint egy erőmentes neck linker.

$$[\text{ATP}]=1\text{mM}, F=0.$$

sághoz valószínűleg közelebb álló 3. esetben a kinezin legnagyobb sebessége csak 20 nm/s.

### 5.3. A modell kísérleti ellenőrzése

Modellünk több, kísérletileg leellenőrizhető jóslatot tesz. A polimermodell egyik fő tanulsága, hogy  $\Delta G_{T,T^*}$  és  $\Delta G_{D,D^*}$  szabadenergia-változásoknak a Rice és munkatársai által mérthez képest nagyobbak kell lennie, ha a megfigyelt sebességeket el akarjuk érni. A mérés nehézsége érthetővé teszi, hogy ezeket a mennyiségeket közvetlenül eddig mindössze egyetlen alkalommal mérték meg [34], ugyanakkor éppen ezért érdekes lenne, ha összehasonlít-

hatnánk több mérési adatot.

Az előre- és hátralépések hányadosa szimulációnk és a fentebb kifejtett elméleti megfontolások szerint is nagy erőkre  $e^{\frac{FV}{k_B T}}$  erőfüggést mutat. Ennek kísérleti kimutatásánál ahhoz, hogy elég jó statisztikát kapjunk, nagy előrehúzás esetén elég sok hátralépést, illetve fordítva, nagy hátrahúzás esetén elég sok előrelépést kellene megfigyelni. Ennek elméleti akadálya ugyan nincs, de meglehetősen hosszú méréseket igényel.

A lépésenként elhidrolizált ATP-k számának erőfüggésére nincs kísérleti adat, mivel itt nagyszámú kinezinre kellene ugyanakkora erőt kifejteni. Ennek ellenőrzése tehát technikailag egyelőre nem megoldható.

A szimuláció talán legkönnyebben leellenőrizhető jósága a processzivitás erőfüggése, különös tekintettel a kis hátrahúzásnál jelentkező maximumra (5.2. ábra). Érdekes lenne az 5.3. ábrán demonstrált lépcsőzetes lépésidő emelkedés pár  $\mu\text{M}$ -os ATP koncentráció és jobb erőfelbontás melletti kimérése is.

A dolgozat elsősorban meglévő mérések reprodukálására törekedett, de ezeken kívül bármely, kísérletileg könnyen változtatható paraméterre le lehet futtatni a szimulációt. További jó ellenőrzést jelenthetne az ADP- és foszfát-koncentráció vagy  $\alpha$  változtatásának vizsgálata.

## 5.4. „Power stroke” vagy „biased diffusion”?

A NL dokkolás szabadenergiaváltozásának mértékének függvényben beszélhetünk „power stroke” illetve „biased diffusion”-szerű folyamatról. Állandó vita tárgya, hogy a kinezin esetében melyikről van szó [51].

A power stroke során az elmozdulás energetikailag nagyon kedvező, még nagy visszahúzó erő esetén is megtörténik. A rendszer egy energialejtőn csúszik egyre lejjebb. Power stroke például a miozin emelőkarjának előrelendülése.

Biased diffusion esetében az elmozdulás energetikailag nem feltétlenül kedvező, a rendszer akár „hegynek felfele” is mehet. Az előrehaladást itt az

biztosítja, hogy a rendszer helyzetének függvényében az energiefelszín változik. A kinezinre alkalmazva ez azt jelentené, hogy a NL dokkolás energetikailag ugyan nem különösebben kedvező, de például az első fej sokkal nehezebben disszociál a MT-től, mint a hátsó.

A power stroke és biased diffusion két szélsőséges eset. Szimulációnk ATP-t tartalmazó fej esetén a NL dokkolására  $-7k_B T$ -s szabadenergiaváltozást adott. Ez az érték nem kicsi, de az ATP hidrolízis  $-25k_B T$ -s szabadenergiaváltozásához képest még mindig nem nagy. Eszerint a kinezin a két mechanizmust keverve használja.

## 5.5. Konklúzió

Modellünkkel sikerült visszaadnunk a kinezin viselkedését. A paramétereket néhány görbéhez hangoltuk, az egyezés ezekkel a görbékkel mennyiségileg is jó. A többi görbét is legalább minőségileg, trendekben visszakaptuk. Gyakran azonban két azonos kísérlet eredménye közt is akkora az eltérés, hogy nem is lenne értelme elvárni, hogy egyetlen paraméterkészlettel az összes mérést számszerűleg reprodukáljuk.

A kinezin szempontjából a modell egyik fő üzenete a NL dokkolás fontossága. NL dokkolás nélkül megállító erő esetén az előre- és hátrakötések ideje messze meghaladná a mért értékeket.

Másik fontos tanulság, hogy a NL dokkolás ATP esetében sokkal kedvezőbbnek, ADP esetében pedig sokkal kedvezőtlenebbnek kell lennie, mint amit Rice és munkatársainak mérése [34] sugall. A Rice által mért szabadenergia értékekkel a szimuláció jóval kisebb megállító erőit és nagyobb randomneszt ad.

Modellünk azonban nem csak a konkrét fittelt paraméterek miatt érdekes, hanem a felállított módszer miatt is. Ez a teljes és termodinamikailag konzisztens keretrendszer alkalmazandó a többi motorfehérje vagy egyéb hasonló fizikai rendszer kinetikai modellezésénél.

## 6. fejezet

### Összefoglalás

Doktori disszertációmban bemutattam a kinezin általunk kifejlesztett kinetikai modelljét. Az első fejezet, a bevezetés után a másodikban áttekintettem a kinezin fehérjecsalád sejtbeli szerepét, amely magába foglalja a membrántranszportot és sejtosztódásnál a mitotikus orsó kialakulását valamint a kromoszómaszegregációt. A harmadik fejezetet a kinetikai modell szempontjából fontosabb kísérleti módszereknek szenteltem. A legtöbb mérés a kinezin és nukleotidok illetve MT asszociációs és disszociációs sebességi állandójára vonatkozik, ezért itt elég nagy a szórás a kísérleti adatok közt. Ezzel szemben az irodalomban egyetlen, ESR spektroszkópiával készült mérés lelhető fel a dokkolt és dokkolatlan NL szabadenergiakülönbségére. A bemenő paraméterek mellett sok adatot találunk a kinezin sebességére, a lépésidőre, a randomnessre és a processzivitásra. Ezek közül elsősorban Carter és Cross valamint Block görbéit akartuk visszakapni a modellből.

A negyedik fejezetben került sor a modell részletes leírására. A modell teljes olyan értelemben, hogy minden monomer állapot kombinációja megengedett. A sebességi állandók számítása termodinamikailag konzisztens módon történik. Ezzel egyrészt egy, a fizikával ellentmondásban nem álló modellt nyerünk, másrészt olyan sebességi állandók kiszámítására nyílik lehetőség, amiket máskülönben csak nagy nehézségek árán tudnánk számszerűsíteni. A kinezin két fejt összekötő fehérjészálát a freely jointed chain polimermodellel

modelleztük, és ezt használtuk fel a fejek sűrűségének és a neck linker dokkolási valószínűségének kiszámítására. Az ideális NL hosszára a polimermodell alapján végeztünk számításokat, amiből azt kaptuk, hogy a NL dokkolásával járó szabadenergiaváltozásnak ATP esetében kedvezőbbnek kell lennie a Rice által mértékhez képest. A kinezin neck linkerére ható erő csak a szabad fejek sűrűségét és a neck linker dokkoltságát befolyásolják közvetlenül, más kinetikai paraméterre nem hatnak. Nagy vonalakban felvázoltam a modell implementálásának azon pontjait, amik kérdések lehetnek.

Az ötödik fejezetben a szimuláció eredményeit ismertettem. Általánosságban elmondható, hogy a vad típusú kinezin szimulációkban és kísérletileg megfigyelt viselkedése jól egyezik. A legnagyobb információtartalommal az lépésidő-erő görbék bírnak. Ezekből tudunk következtetni többek között a futilis hidrolízisek számára és az ATP felvétel sebességi állandójára. A randomness görbék illesztése során az ADP-t tartalmazó fej NL dokkolását a hátralépések csökkentése érdekében kedvezőtlenebbé kellett tenni.

A legnagyobb eltérések a kísérletek és a szimulációk eredményei között elsősorban a mutáns kinezinek esetében adódnak, de ezek is csak kvantitatív különbségek. A NL random coilra cserélésének nálunk is hasonló hatása van, mint Case és munkatársai kísérletében. Yildiz és társaival [25] ellentétben azonban a NL meghosszabbítása előrehúzó erő esetén nálunk nem teszi gyorsabbá a kinezint a vad típusnál. A virtuális tandem kinezin sebessége is csak fele az igazinak. Mivel ezek az eltérések a NL hosszának változtatásával kapcsolatosak, orvoslásukra valószínűleg a polimermodellt kellene finomítani.



# Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Derényi Imrének sok segítségével, türelméért, biztatásáért és doktori tanulmányaim lehetővé tételéért. Szintén hálás vagyok Szöllősi Gergelynek, akinek nagy része van ebben a munkában.



# A függelék

## Táblázat

Ez a táblázat néhány mérhető mennyiség értékét tartalmazza különböző paraméterértékekre. Az „Eredeti paraméterek” a 4.1. táblázatban szereplő értékeket jelenti. Mindig csak a sor elején jelölt paraméter értékét változtatjuk, a többi marad az „Eredeti paraméterek”-nek megfelelő.

	$v$ (nm/s)	#ATP/lépés	$p$	$F_s$ (pN)	$t_d^*$		$t_d^*$		$h$	
					$F = F_s$ (s)	$F = 15 \text{ pN}$ (s)	$F = 15 \text{ pN}$ [ATP]=10 $\mu\text{M}$ (s)	$F = -15 \text{ pN}$ (s)		$F = -15 \text{ pN}$ [ATP]=10 $\mu\text{M}$ (s)
Erdeti paraméterek	462	1.34	107	-6.7	0.17	0.015	0.035	0.35	1.26	359
[ADP]=100 $\mu\text{M}$	458	1.34	99	-6.7	0.17	0.015	0.021	0.34	<b>0.31</b>	333
[ADP]=1000 $\mu\text{M}$	429	1.31	<b>53</b>	-6.5	0.14	0.015	<b>0.015</b>	0.27	<b>0.13</b>	<b>161</b>
[ADP]=10000 $\mu\text{M}$	246	1.13	<b>8</b>	-6.7	0.13	0.015	<b>0.014</b>	<b>0.15</b>	<b>0.10</b>	<b>19</b>
$N = 6$	343	2.09	<b>272</b>	-6.2	0.16	0.019	0.054	0.32	1.21	<b>146</b>
$N = 7$	<b>218</b>	<b>3.78</b>	<b>500</b>	-5.6	0.19	0.023	<b>0.071</b>	0.32	1.20	<b>83</b>
$N = 8$	<b>146</b>	<b>6.04</b>	<b>711</b>	-5.1	0.19	0.027	<b>0.088</b>	0.32	1.20	<b>54</b>
$N_d = 2$	<b>82</b>	<b>11</b>	<b>3</b>	-3.8	0.25	<b>0.041</b>	<b>0.139</b>	0.46	1.36	216
$N_d = 3$	328	2.22	<b>32</b>	-6.2	0.19	0.018	0.047	0.38	1.30	497
$\alpha = 50^\circ$	462	1.34	107	-6.7	0.17	0.017	0.043	0.46	1.48	359
$\alpha = 60^\circ$	462	1.34	107	-6.7	0.21	0.02	0.06	<b>2.81</b>	<b>8.69</b>	359
$\alpha = 70^\circ$	462	1.34	107	-6.7	<b>1.90</b>	<b>6.46</b>	<b>1.74</b>	N/A	N/A	359
$l_p = 0.43 \text{ nm}$	365	1.89	<b>29</b>	-6.6	0.20	0.017	0.044	0.42	1.55	605
$l_p = 0.45 \text{ nm}$	458	1.36	85	-6.7	0.21	0.015	0.038	0.36	1.31	411
$\Delta G_{T,T^*} = 0 k_B T$	431	1.35	103	<b>-3.23</b>	0.18	0.015	0.039	0.35	1.26	238
$\Delta G_{T,T^*} = -2 k_B T$	458	1.34	106	-4.3	0.18	0.015	0.039	0.35	1.26	343
$\Delta G_{T,T^*} = -4 k_B T$	462	1.34	107	-5.2	0.17	0.015	0.039	0.35	1.26	370
$\Delta G_{T,T^*} = -10 k_B T$	449	1.45	108	<b>-8.2</b>	0.17	0.016	0.040	0.35	1.26	357
$\Delta G_{D,D^*} = 0 k_B T$	411	1.28	<b>347</b>	-4	0.17	0.014	0.032	0.31	1.17	<b>52</b>
$\Delta G_{D,D^*} = 2 k_B T$	423	1.28	<b>253</b>	-5	0.16	0.014	0.033	0.31	1.17	<b>62</b>
$\Delta G_{D,D^*} = 4 k_B T$	452	1.29	141	-6	0.17	0.014	0.035	0.32	1.20	<b>122</b>
$\Delta G_{D,D^*} = 7 k_B T$	419	1.63	99	-7.3	0.18	0.019	0.051	0.40	1.32	<b>1301</b>
$\Delta G_{D,D^*} = 10 k_B T$	<b>138</b>	<b>6.9</b>	96	-7.9	0.30	<b>0.065</b>	<b>0.236</b>	0.52	1.42	<b>6578</b>
$k_{0-T} = 1 \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	448	1.33	105	-6.8	0.19	0.016	<b>0.116</b>	0.37	<b>3.76</b>	323
$k_{0-T} = 2 \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	458	1.34	105	-6.7	0.17	0.016	0.064	0.35	2.08	352
$k_{0-T} = 5 \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	463	1.35	104	-6.7	0.16	0.015	0.033	0.35	1.04	371

Hacsak másképp nem jelöljük, [ATP] = 1000  $\mu\text{M}$  és  $F = 0$ . Kövéren szedett értékek a kettes faktornál nagyobb mértékű eltérést jelölik.

A táblázat a következő oldalon folytatódik.

	$v$ (nm/s)	#ATP/lépés	$p$	$F_s$ (pN)	$t_g^*$			$t_g^*$		$h$
					$F = F_s$ (s)	$F = 15 \text{ pN}$ (s)	$F = 15 \text{ pN}$ [ATP]=10 $\mu\text{M}$ (s)	$F = -15 \text{ pN}$ (s)	$F = -15 \text{ pN}$ [ATP]=10 $\mu\text{M}$ (s)	
$k_{0 \rightarrow T} = 10 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	463	1.36	106	-6.7	0.17	0.015	0.023	0.34	0.69	373
$k_{0 \rightarrow T} = 30 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	461	1.39	108	-6.7	0.16	0.016	0.017	0.34	<b>0.46</b>	370
$k_{T \rightarrow 0} = 1 \text{s}^{-1}$	403	1.9	109	-6.6	0.16	0.018	0.037	0.34	<b>0.44</b>	307
$k_{T \rightarrow 0} = 10 \text{s}^{-1}$	456	1.4	107	-6.7	0.17	0.016	0.036	0.34	<b>0.52</b>	361
$k_{T \rightarrow 0} = 500 \text{s}^{-1}$	359	1.22	<b>21</b>	-6.5	0.15	0.015	0.035	0.32	<b>3.61</b>	<b>60</b>
$k_{T^* \rightarrow 0} = 1 \text{s}^{-1}$	465	1.34	107	-6.7	0.17	0.016	0.016	0.34	1.29	383
$k_{T^* \rightarrow 0} = 10 \text{s}^{-1}$	466	1.34	107	-6.8	0.19	0.015	0.015	0.35	1.30	390
$k_{T^* \rightarrow 0} = 100 \text{s}^{-1}$	466	1.34	107	-6.7	0.16	0.015	0.015	0.35	1.30	385
$k_{0 \rightarrow D} = 0.1 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	453	1.42	109	-6.7	0.18	0.016	0.039	0.35	1.27	353
$k_{0 \rightarrow D} = 100 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	440	1.31	65	-6.6	0.16	0.015	0.035	0.29	1.00	201
$k_{D \rightarrow 0} = 1 \text{s}^{-1}$	<b>11</b>	1.17	<b>0.11</b>	<b>-0.14</b>	<b>0.08</b>	0.014	0.014	<b>0.11</b>	<b>0.13</b>	<b>1.23</b>
$k_{D \rightarrow 0} = 10 \text{s}^{-1}$	<b>83</b>	1.18	<b>1.23</b>	<b>-2.3</b>	<b>0.07</b>	0.014	0.017	<b>0.15</b>	<b>0.35</b>	<b>3.65</b>
$k_{D \rightarrow 0} = 100 \text{s}^{-1}$	360	1.27	<b>21</b>	-6.5	0.14	0.015	0.034	0.31	2.36	<b>61</b>
$k_{D \rightarrow 0} = 600 \text{s}^{-1}$	475	1.44	<b>282</b>	-6.7	0.18	0.016	0.043	0.36	1.31	<b>1073</b>
$k_{D \rightarrow 0} = 1000 \text{s}^{-1}$	469	1.55	<b>514</b>	-6.7	0.18	0.017	0.047	0.36	1.33	<b>1720</b>
$k_{D^* \rightarrow 0} = 1 \text{s}^{-1}$	461	1.35	107	-6.7	0.17	0.015	0.039	0.35	1.26	375
$k_{D^* \rightarrow 0} = 10 \text{s}^{-1}$	449	1.45	107	-6.7	0.18	0.016	0.042	0.35	1.26	354
$k_{D^* \rightarrow 0} = 100 \text{s}^{-1}$	365	2.29	109	-6.5	0.15	0.020	0.066	0.34	1.23	288
$k_{\bar{D} \rightarrow D} = 1 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	<b>212</b>	<b>3.71</b>	<b>9</b>	-6.7	0.32	0.024	<b>0.073</b>	<b>0.86</b>	2.47	653
$k_{\bar{D} \rightarrow D} = 2 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	293	2.52	<b>17</b>	-6.7	0.25	0.020	0.056	0.61	1.87	653
$k_{\bar{D} \rightarrow D} = 100 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	474	1.24	<b>254</b>	-6.8	0.17	0.015	0.037	0.32	1.20	<b>173</b>
$k_{\bar{D} \rightarrow D} = 1000 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	459	1.21	<b>1546</b>	-6.7	0.16	0.014	0.036	0.31	1.19	<b>100</b>
$k_{\bar{D} \rightarrow \bar{D}} = 1 \text{s}^{-1}$	420	1.37	<b>1779</b>	-5.7	0.18	0.015	0.039	0.36	1.33	<b>156</b>
$k_{\bar{D} \rightarrow \bar{D}} = 30 \text{s}^{-1}$	470	1.35	<b>30</b>	-7.15	0.15	0.016	0.039	0.33	1.14	492
$k_{\bar{D} \rightarrow \bar{D}} = 100 \text{s}^{-1}$	476	1.38	<b>6</b>	-7.4	0.11	0.015	0.040	0.26	0.89	578

Hacsak másképp nem jelöljük, [ATP] = 1000  $\mu\text{M}$  és  $F = 0$ . Kövéren szedett értékek a kettes faktornál a nagyobb mértékű eltérést jelölik.

A táblázat a következők oldalán folytatódik.

	$v$	#ATP/lépés	$p$	$F_s$	$F = F_s$	$F=15 \text{ pN}$	$F=15 \text{ pN}$	$F=-15 \text{ pN}$	$F=-15 \text{ pN}$	$h$
	(nm/s)			(pN)	(s)	(s)	[ATP]=10 $\mu\text{M}$ (s)	(s)	[ATP]=10 $\mu\text{M}$ (s)	
$k_{D^* \rightarrow \bar{D}} = 1 \text{ s}^{-1}$	<b>11</b>	<b>14.93</b>	<b>11</b>	-6.7	<b>0.50</b>	<b>0.697</b>	<b>0.897</b>	0.42	1.35	188
$k_{D^* \rightarrow \bar{D}} = 10 \text{ s}^{-1}$	728	<b>3.18</b>	56	-6.7	0.23	<b>0.108</b>	<b>0.109</b>	0.36	1.32	359
$k_{D^* \rightarrow \bar{D}} = 1000 \text{ s}^{-1}$	<b>938</b>	1.16	67	-6.75	0.16	<b>0.006</b>	0.027	0.34	1.26	<b>177</b>
$k_{T \rightarrow \bar{D}} = 0.1 \text{ s}^{-1}$	464	1.34	123	-7.8	<b>1.12</b>	0.016	0.039	<b>2.44</b>	<b>9.03</b>	<b>726</b>
$k_{T \rightarrow \bar{D}} = 1 \text{ s}^{-1}$	463	1.34	117	-6.7	0.15	0.016	0.039	<b>0.85</b>	<b>3.07</b>	587
$k_{T \rightarrow \bar{D}} = 10 \text{ s}^{-1}$	458	1.35	82	-6.1	<b>0.07</b>	0.015	0.039	<b>0.12</b>	<b>0.43</b>	<b>144</b>
$k_{T \rightarrow \bar{D}} = 50 \text{ s}^{-1}$	315	1.26	<b>11</b>	-4.75	<b>0.03</b>	0.014	0.031	<b>0.03</b>	<b>0.22</b>	<b>11</b>
$k_{T \rightarrow D} = 1 \text{ s}^{-1}$	465	1.24	116	-6.8	0.19	0.015	0.039	0.37	<b>1.30</b>	406
$k_{T \rightarrow D} = 50 \text{ s}^{-1}$	449	1.76	80	-6.5	0.14	0.015	0.040	0.28	1.16	265
$k_{T \rightarrow D} = 100 \text{ s}^{-1}$	436	2.18	65	-6.4	0.12	0.015	0.040	0.23	1.09	187
$k_{T^* \rightarrow D^*} = 1 \text{ s}^{-1}$	<b>31</b>	2.63	550	-6.1	0.31	<b>0.254</b>	<b>0.276</b>	0.33	1.20	<b>1165</b>
$k_{T^* \rightarrow D^*} = 10 \text{ s}^{-1}$	<b>87</b>	1.64	387	-6.4	0.22	<b>0.089</b>	<b>0.111</b>	0.33	1.22	<b>1005</b>
$k_{T^* \rightarrow D^*} = 100 \text{ s}^{-1}$	365	1.3	159	-6.7	0.17	0.020	0.043	0.34	1.25	536
$k_{T^* \rightarrow D^*} = 500 \text{ s}^{-1}$	519	1.54	58	-6.7	0.165	0.013	0.037	0.35	1.26	204
$k_{T^* \rightarrow D^*} = 1000 \text{ s}^{-1}$	496	1.87	<b>34</b>	-6.6	0.16	0.012	0.037	0.35	1.26	<b>123</b>

Hacsak másképp nem jelöljük, [ATP] = 1000  $\mu\text{M}$  és  $F = 0$ . Kővéren szedett értékek a kettes faktornál nagyobb mértékű eltérést jelölik.



## B függelék

### A gyakrabban előforduló jelölések és rövidítések listája

$\tilde{D}$	MT-hoz nem kötődő, ADP-t tartalmazó fej dokkolatlan NL-rel
D	MT-hoz kötődő, ADP-t tartalmazó fej dokkolatlan NL-rel
D*	MT-hoz kötődő, ADP-t tartalmazó fej dokkolt NL-rel
D <sup>(*)</sup>	MT-hoz kötődő, ADP-t tartalmazó fej (összetett állapot)
T	MT-hoz kötődő, ATP-t tartalmazó fej dokkolatlan NL-rel
T*	MT-hoz kötődő, ATP-t tartalmazó fej dokkolt NL-rel
T <sup>(*)</sup>	MT-hoz kötődő, ATP-t tartalmazó fej (összetett állapot)
0	MT-hoz kötődő, nukleotidot nem tartalmazó fej dokkolatlan NL-rel
$[P_i]$	foszfát koncentráció
[ADP]	adenozin-difoszfát koncentráció
[ATP]	adenozin-trifoszfát koncentráció
$c(\vec{R}, \vec{F})$	nem dokkolt NL esetén a szabad fej sűrűsége az $\vec{R}$ helyen
$c^*(\vec{R}, \vec{F})$	dokkolt NL esetén a szabad fej sűrűsége az $\vec{R}$ helyen
$F$	$\vec{F}$ $x$ komponense
$\vec{F}$	erővektor
$F_s$	a megállító erő $x$ komponense
$G_a$	egy $a$ állapot szabadenergiája
$\Delta G_{a,b}$	$G_b - G_a$
$h$	előre- és hátralépések számának hányadosa
$k_{a \rightarrow b}$	$a$ állapotból $b$ -be mutató sebességi állandó
$K_{a,b}$	$a$ és $b$ állapot közötti egyensúlyi állandó



$L$	lépéshossz
$\vec{L}$	az elülső kötőhelyre mutató vektor
$L_d$	a ledokkolt NL végének $x$ koordinátája
$\vec{L}_d$	a ledokkolt NL-szakasz végébe mutató vektor
$l_K$	Kuhn szegmens hossza
$l_p$	perzisztenciahossz
$r$	randomness
$k_B$	Boltzmann állandó
$k_b$	a fej MT-hoz kötődésének másodrendű sebességi állandója ( $1/(\text{idő} \times \text{fej koncentráció})$ )
$K$	kinezin
$N$	a NL Kuhn szegmenseinek száma
MT	mikrotubulus
$N_u$	a nem dokkoló Kuhn szegmensek száma
$N_d$	a dokkoló Kuhn szegmensek száma
$N_{mut}$	NL Kuhn szegmensek száma a tandem konstrukció mutáns fején
NL	neck linker
$p$	processzivitás
$P_h$	a hátralépések valószínűsége
$T$	hőmérséklet
$t_d^e$	előrelépés ideje
$t_d^h$	hátralépés ideje
$t_f$	az előrekötés ideje
$v$	a kinezin sebessége
$Z_N(\vec{F})$	az $N$ Kuhn szegmensből álló NL állapotösszege
$\alpha$	$\vec{F}$ és a MT által bezárt szög
$\rho_N^0(\vec{R})$	az $N$ Kuhn szegmensből álló, erőmentes NL $\vec{R}$ vég-vég vektorának sűrűsége
$\rho_N(\vec{R}, \vec{F})$	az $N$ Kuhn szegmensből álló, $\vec{F}$ erővel húzott NL $\vec{R}$ vég-vég vektorának sűrűsége
$\rho_{N_1, N_2}(\vec{R}, \vec{F})$	az $N_1$ és $N_2$ Kuhn szegmensből álló NL $\vec{R}$ vég-vég vektorának sűrűsége, ha az 1. NL-szakaszt $\vec{F}$ erővel húzzuk



# Irodalomjegyzék

- [1] Heaton, MB (1977) Retrograde axonal-transport in lateral motor neurons of chick-embryo prior to limb bud innervation. *Developmental Biol.* 58:421–427.
- [2] Brady, S (1985) A novel brain atpase with properties expected for the fast axonal-transport motor. *Nature* 317:73 – 75.
- [3] Allen, R, Metzuzals, J, Tasaki, I, Brady, S, Gilbert, S (1982) Fast axonal-transport in squid giant-axon. *Science* 218:1127 – 1129.
- [4] Gainer, H, Sarne, Y, Brownstein, M (1977) Biosynthesis and axonal-transport of rat neurohypophyseal proteins and peptides. *Journal of Cell Biology* 73:366 – 381.
- [5] Vale, R, Reese, T, Sheetz, M (1985) Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell* 42:39–50.
- [6] Ribak, C, Vaughn, J, Saito, K (1978) Immunocytochemical localization of glutamic-acid decarboxylase in neuronal somata following colchicine inhibition of axonal-transport. *Brain Research* 140:315 – 332.
- [7] Fink, B, Byers, M, Middaugh, M (1973) dynamics of colchicine effects on rapid axonal transport and axonal morphology. *Brain Research* 56:299 – 311.

- [8] Sheetz, M, Pfister, K, Bulinski, J, Cotman, C (1998) Mechanisms of trafficking in axons and dendrites: Implications for development and neurodegeneration. *Progress in Neurobiology* 55:577–594.
- [9] Woehlke, G et al. (1997) Microtubule interaction site of the kinesin motor. *Cell* 90:207 – 216.
- [10] Murphy, D, Wallis, K, Hiesch, R (1983) Identity and origin of the ATPase activity associated with neuronal microtubules. II. Identification of a 50,000-dalton polypeptide with ATPase activity similar to F-1 ATPase from mitochondria. *Journal of Cell Biology* 96:1306–1315.
- [11] Kinesin homepage. <http://www.proweb.org/kinesin>.
- [12] Seiler, S et al. (2000) Cargo binding and regulatory sites in the tail of fungal conventional kinesin. *Nature Cell Biology* 2:333 – 338.
- [13] Yildiz, A, Selvin, PR (2005) Kinesin: walking, crawling or sliding along? *Trends In Cell Biol.* 15:112–120.
- [14] Vedrenne, C, Hauri, HP (2006) Morphogenesis of the endoplasmic reticulum: Beyond active membrane expansion. *Traffic* 7:639–646.
- [15] Lippincottschwartz, J, Cole, N, Marotta, A, Conrad, P, Bloom, G (1995) Kinesin is the motor for microtubule-mediated golgi-to-er membrane traffic. *Journal of Cell Biology* 128:293 – 306.
- [16] Xu, Y et al. (2002) Role of kifc3 motor protein in golgi positioning and integration. *Journal of Cell Biology* 158:293 – 303.
- [17] Saxton, WM, Hicks, J, Goldstein, LSB, Raff, EC (1991) Kinesin heavy-chain is essential for viability and neuromuscular functions in drosophila, but mutants show no defects in mitosis. *Cell* 64:1093–1102.
- [18] Answers.com. <http://www.answers.com/topic/flagellum-2>.

- [19] Tuma, MC, Zill, A, Bot, NL, Vernos, I, Gelfand, V (1998) Heterotrimeric kinesin II is the microtubule motor protein responsible for pigment dispersion in *Xenopus* melanophores. *J. Cell Biol.* 143:1547–1558.
- [20] Nilsson, H, Wallin, M (1997) Evidence for several roles of dynein in pigment transport in melanophores. *Cell Motility Cytoskeleton* 38:397–409.
- [21] Gilbert, SP, Mackey, AT (2000) Kinetics: A tool to study molecular motors. *Methods* 22:337–354.
- [22] Hua, W, Young, E, Fleming, M, Gelles, J (1997) Coupling of kinesin steps to ATP hydrolysis. *Nature* 388:390–393.
- [23] Coy, D, Wagenbach, M, Howard, J (1999) Kinesin takes one 8-nm step for each atp that it hydrolyzes. *Journal of Biological Chemistry* 274:3667 – 3671.
- [24] Schnitzer, M, Block, S (1997) Kinesin hydrolyses one ATP per 8-nm step. *Nature* 388:386–390.
- [25] Yildiz, A, Tomishige, M, Gennerich, A, Vale, RD (2008) Intramolecular strain coordinates kinesin stepping behavior along microtubules. *Cell* 134:1030–1041.
- [26] Hackney, D (2005) The tethered motor domain of a kinesin-microtubule complex catalyzes reversible synthesis of bound ATP. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102:18338–18343.
- [27] Visscher, K, Schnitzer, M, Block, S (1999) Single kinesin molecules studied with a molecular force clamp. *Nature* 400:184–9.
- [28] Guydosh, N, Block, S (2006) Backsteps induced by nucleotide analogs suggest the front head of kinesin is gated by strain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103:8054–8059.

- [29] Carter, N, Cross, R (2005) Mechanics of the kinesin step. *Nature* 435:308.
- [30] Nishiyama, M, Muto, E, Inoue, Y, Yanagida, T, Higuchi, H (2001) Substeps within the 8-nm step of the ATPase cycle of single kinesin molecules. *Nature Cell Biol.* 3:425–428.
- [31] Nishiyama, M, Higuchi, H, Yanagida, T (2002) Chemomechanical coupling of the forward and backward steps of single kinesin molecules. *Nat Cell Biol* 4:790–797.
- [32] Carter, B, Vershinin, M, Gross, S (2008) A comparison of step-detection methods: How well can you do? *Biophysical Journal* 94:306 – 319.
- [33] Shaevitz, JW, Block, SM, Schnitzer, MJ (2005) Statistical kinetics of macromolecular dynamics. *Biophys. J.* 89:2277–2285.
- [34] Rice, S et al. (2003) Thermodynamic Properties of the Kinesin Neck-Region Docking to the Catalytic Core. *Biophysical Journal* 84:1844–1854.
- [35] Farrell, CM, Mackey, AT, Klumpp, LM, Gilbert, SP (2002) The role of atp hydrolysis for kinesin processivity. *J Biol Chem* 277:17079–17087.
- [36] Liepelt, S, Lipowsky, R (2007) Kinesin’s network of chemomechanical motor cycles. *Phys Rev Lett* 98:258102.
- [37] Mori, T, Vale, RD, Tomishige, M (2007) How kinesin waits between steps. *Nature* 450:750–754.
- [38] Hyeon, C, Onuchic, JN (2007) Internal strain regulates the nucleotide binding site of the kinesin leading head. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:2175–2180.
- [39] Ma, Y, Taylor, E (1995) Kinetic Mechanism of Kinesin Motor Domain. *Biochemistry* 34:13233–13241.

- [40] Gilbert, S, Johnson, K (1994) Pre-Steady-State Kinetics of the Microtubule. *cnt dot. Kinesin ATPase. Biochemistry* 33:1951–1960.
- [41] Gilbert, S, Webb, M, Brune, M, Johnson, K (1995) Pathway of processive ATP hydrolysis by kinesin. *Nature* 373:671.
- [42] Auerbach, S, Johnson, K (2005) Alternating Site ATPase Pathway of Rat Conventional Kinesin. *J. Biol. Chem.* 280:37048.
- [43] Ma, Y, Taylor, E (1997) Kinetic Mechanism of a Monomeric Kinesin Construct. *J. Biol. Chem.* 272:717.
- [44] Ma, Y, Taylor, E (1997) Interacting Head Mechanism of Microtubule-Kinesin ATPase. *J. Biol. Chem.* 272:724–730.
- [45] Rice, S et al. (1999) A structural change in the kinesin motor protein that drives motility. *Nature* 402:778–784.
- [46] Crevel, I et al. (2004) What kinesin does at roadblocks: the coordination mechanism for molecular walking. *EMBO J.* 23:23–32.
- [47] Moyer, M, Gilbert, S, Johnson, K (1998) Pathway of ATP Hydrolysis by Monomeric and Dimeric Kinesin. *Biochemistry* 37:800–813.
- [48] Schnitzer, M, Visscher, K, Block, S (2000) Force production by single kinesin motors. *NATURE CELL BIOLOGY* 2:718–723.
- [49] Bier, M (2008) The energetics, chemistry, and mechanics of a processive motor protein. *Biosystems* 93:23 – 28.
- [50] Case, R, Rice, S, Hart, C, Ly, B, Vale, R (2000) Role of the kinesin neck linker and catalytic core in microtubule-based motility. *Curr. Biol.* 10:157–160.
- [51] Block, S (2006) Kinesin Motor Mechanics: Binding, Stepping, Tracking, Gating, Limping... and Some Newly Discovered Rotational States. *Molecular Motors: point counterpoint.*

# REVEALING THE STEPPING MECHANISM OF KINESIN BY MEANS OF A THERMODYNAMICALLY CONSISTENT MODEL

## Summary

The homodimer motor protein kinesin-1 can attach to a microtubule with its two heads and is able to walk on it and pull the cargo attached to its tail. The detailed mechanism of this movement is not known. The questions waiting for answer include the precise role of the neck linker, the free energy change of neck linker docking, the number of hydrolysed ATPs during one step and an average trajectory in the state space of kinesin-1.

Past kinetic models of kinesin-1 used too simple kinetic networks and/or were not consistent thermodynamically in giving the kinetic constants. In the last few years enough data has accumulated to make it possible to create a model in which the input parameters are well established and that includes all the dimer states constructed from the direct product of monomer states. The goal of our work was to create a thermodynamically consistent kinetic model that satisfies these criteria.

We modelled the neck linker connecting the two heads with a freely jointed chain polymer model.

Thermodynamic consistency on one hand makes the model physically valid and on the other hand enables us to quantify the rates of some transitions that are otherwise hard to calculate or access experimentally.

The results of the polymer model suggest that the values of the free energy differences measured by Rice et al. are too small. Our calculations indicate that to keep the dwell time low the docked state of an ATP containing head must be more favorable than measured. On the other hand, based on kinetic simulations in case of an ADP containing head the docked state must be more unfavorable.

Using our simulation we could reproduce the results of Carter and Cross and Block with good fidelity. Furthermore, our results are in good agreement with measurements of mutant kinesins done by Yildiz et al. We obtained a somewhat different result for the ratio of the number of forward and backward steps from that of Carter and Cross. However at high force values the force dependence of this observable is well established theoretically and our results can reproduce that.

With the fitted parameters the kinesin-1 does futile hydrolysis during backward force. Also in case of zero external force slightly more than 1 ATP is used for one step.

According to our simulation the free energy change during neck linker docking is not small but not very big either. This means that the stepping mechanism of kinesin-1 is between „biased diffusion” and „power stroke”.

Our model lays down principles (completeness, thermodynamic consistency, placing the values of the kinetic parameters on an experimental or theoretical ground) that can be and should be a guide line for future modelling of motor proteins or other similar systems.



# A KINEZIN LÉPÉSI MECHANIZMUSÁNAK FELTÁRÁSA EGY TERMODINAMIKAILAG KONZISZTENS MODELL SEGÍTSÉGÉVEL

## Összefoglaló

A kinezin-1 homodimer motorfehérje képes mikrotubulus mentén haladni és a szárhoz csatolt terhet elhúzni. Ennek a mozgásnak a részletes mechanizmusa nem ismert. A megválaszolóra váró kérdések között szerepel a neck linker szerepe, a neck linker dokkolás szabadenergiája, a lépésként elhidrolizált ATP-k száma és egy átlagos lépés során leírt trajektória a kinezin-1 állapotterében.

A kinezin-1 eddigi kinetikai modelljei túl egyszerű hálózatot használtak és/vagy nem voltak termodinamikailag konzisztensek a kinetikai állandók megadásánál. Az utóbbi években elég sok adat halmozódott fel ahhoz, hogy lehetővé váljon egy olyan modell felépítése, aminek bemenő paraméterei kellően megalapozottak, ugyanakkor szerepel benne az összes, monomer állapotok direkt szorzatából képzett dimer állapot. Munkánk célja egy olyan termodinamikailag konzisztens modell megalkotása volt, ami eleget tesz ezeknek a kritériumoknak.

A két fejet összekötő két neck linker modellezéséhez a freely jointed chain polimermodellt használtuk.

A termodinamikai konzisztencia megkövetelése azt jelenti, hogy bármely két állapot között bármely útvonalon az egyensúlyi állandók szorzata egyenlő a két állapot közti szabadenergia-különbségből képzett Boltzmann faktorial. Ennek segítségével egyfelől a modell fizikailag érvényes lesz, másfelől pedig más módon csak nehezen számítható vagy mérhető átmenetek sebességei állandói is elérhetővé válnak.

A polimermodellből kapott eredmények alapján a Rice és munkatársai által kapott dokkolási szabadenergia-különbségek kicsinek bizonyultak. Polimermodelllezési számítások alapján a lépésidő alacsonyan tartásának érdekében a dokkolt állapotnak ATP-t tartalmazó fej esetén a mértnél kedvezőbbnek kell lennie. Kinetikai modellünk ADP-t tartalmazó fej esetére magasabb szabadenergiájú dokkolt állapotot jósol.

A szimuláció segítségével elég jó hűséggel sikerült reprodukálnunk Carter és Cross valamint Block vad típusú kinezin-1-re vonatkozó méréseit, továbbá több, Yıldız és munkatársai által végzett, mutáns kinezin-1-re vonatkozó mérést. Az előre- és hátralépések hányadosának erőfüggésében némileg eltérő eredményt kaptunk, mint Carter és Cross. Ennek a hányadosnak nagy erőkre mutatott erőfüggése azonban elméletileg jól megalapozott, amivel eredményeink egyeznek.

A fittelt paraméterek mellett a kinezin-1 hátrahúzás során a kinezin-1 futilsan hidrolizál. Erőmentes esetben is valamivel több, mint 1 ATP használódik el egy lépéshez.

Szimulációnk szerint a neck linker dokkolással járó szabadenergia-változás értéke szimulációnk szerint nem kicsi, de nem is nagyon nagy. Ez azt jelenti, hogy a kinezin-1 működési mechanizmusa a „biased diffusion” és a „power stroke” között van.

A modell olyan irányelveket fektet le (teljesség, termodinamikai konzisztencia, a kinetikai paraméterek kellő megalapozottsága), amik a későbbiekben más motorfehérjékre és egyéb hasonló rendszerekre is alkalmazhatók és alkalmazandók.