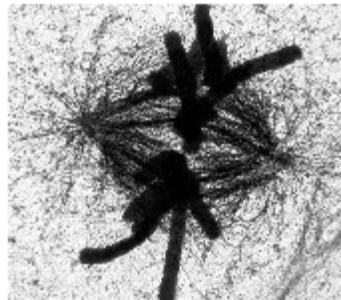


MOLEKULARNI MOTORI

Prof. dr. sc. Ljubica Glavaš-Obrnec

Kretanje unutar stanice



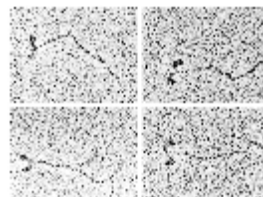
Mnogi proteini - molekularni motori članovi su superobitelji *P-loop NTPaza*

Eukariotske stanice sadrže 3 glavne obitelji proteina koji omogućavaju pokretanje:

1. miozine
2. kinezine
3. dineine

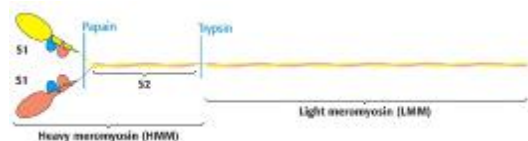
1. Miozin

1. Kreće se duž aktinskih vlakana
2. U mišićima su 2 kopije koje su građene iz teškog lanca molekularne mase 87 kd, 1 esencijalnog lakog lanca i 1 regulatornog lakog lanca.
3. U humanom genomu nađeni su kodovi za više od 40 različitih miozina



Struktura miozina pri niskoj rezoluciji

STRUKTURA MIOZINA

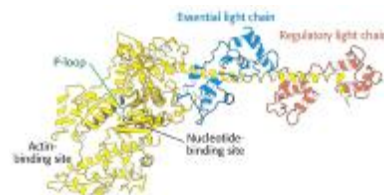


Tripsin i papain cijepaju MIOZIN na 4 fragmenta:

1. 2 S1 ostatka,
2. 1 S2 ostatak nazvan i teški meromiozin (HMM) i
3. 1 ostatak nazvan laki meromiozin (LMM).

Svaki S1 ostatak tvori glavu miozina (sadrži 850 aminokiselina jednog od 2 teška lanca, kao i 1 kopiju lakog lanca).

Struktura S1 miozina pri visokom razlučivanju



Svaki S1 ostatak sastoji i od *P-loop NTP-aze* (vezanje i hidrolizira ATP)

Dvostruko uzvijena uzvojnica miozina

Izdruženi lanac je α -uzvojnica teškog lanca, koja je vezno mjesto za 2 laka lanca.

Laki lanci su članovi EF obitelji, slično kalmulinu. S2 i laki meromiozin su duge α -uzvojnice.

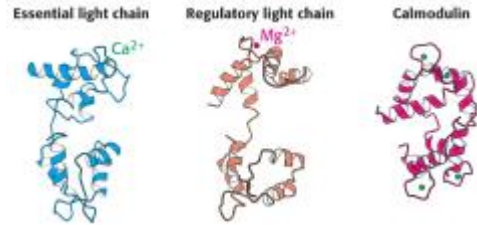
Ove strukture zajedno su duge su 1700 Å, a vežu glave miozina s drugim strukturama.

U mišićnom miozinu, nekoliko LMM domena dolazi zajedno i stvara visoko-organizirane nakupine

Uzvojnice su stabilizirane hidrofobnim ostacima na dodirnim točkama između uzvojnica.



Laki lanci miozina

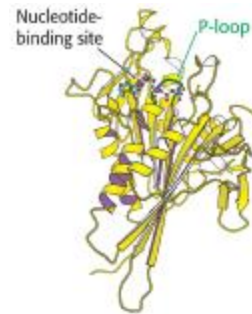


2. Kinezini

1. važni za transport proteina, vezikula i organela kroz mikrotubule, uključujući i odjeljivanje kromosoma.
2. Grade ih po 2 kopije teškog i lakog lanca. Teški lanac kinezina u pola je manji od miozinskog teškog lanca.
3. Humani genom kodira za više od 40 kinezina.

Sličnosti između kinezina i miozina su u jezgri *P-loop NTP-aze* i homologna je onoj nađenoj u G-proteinu.

Struktura kinezina pri visokom razlučivanju

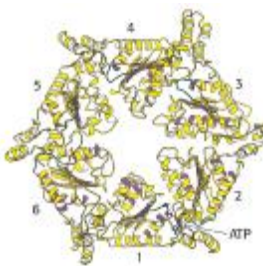


Dimerni protein sastoji se od 2 glave povezane izduženom polimernom strukturom. Veličina glave je 1/3 glave miozina. Slično strukturi miozina sadrži *P-loop NTPazu* i izduženi dio građen je od α -uzvojnica.

Za razliku od miozina, α -uzvojnice direktno su vezane na glave. Ako postoje, laki lanci vežu se u blizini karboksilnog kraja.

3. Dineini

daju energiju za kretanje cilija i flagela nekih eukariotskih stanica. Izuzetno su veliki i njihov teški lanac veći je od 500 kd. Humani genom kodira oko 10 dineina.



Teški lanac dineina sadrži 6 regija koje su homologne AAA podobitelji ATP-aznih domena.

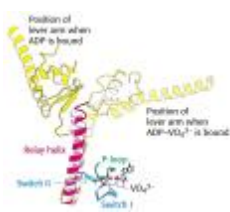
Na osnovi strukture ostalih AAA ATPaznih domena napravljen je model glave dineina.

Ključno obilježje *P-loop NTP-aza* je da se strukturno mijenjaju vezanjem i hidrolizom NTP

Kako se ti proteini konformacijski mijenjaju?

2 regije oko nukleotid-veznog mjesta, analozi *switch* regiji G proteina (*switch 1* i *switch 2*), odgovaraju poziciji γ -fosfatne skupine ATP i zauzimaju konformaciju kad je ta grupa odsutna. Te konformacijske promjene dopuštaju dugoj α -uzvojnici (*relay helix*) da uskladi svoj položaj. Karboksilni kraj uzvojnice regira sa strukturama bočne ruke ("lever arm") i takve promjene u njenom položaju vode ka promjeni položaja (reorientaciji) bočne ruke.

Vezanje ATP značajno smanjuje afinitet glave miozina za aktinska vlakna.



Još uvijek mehanizam vezanja miozina na aktin nije u potpunosti razjašnjen. Poznato je da amino-terminalni kraj uzvojnice regira s miozinskom domenom i veže se na aktin.

Konformacija i afinitet vezanja motornih proteina mijenja se vezanjem i hidrolizom ATP

Vezanjem kompleksa ADP-VO_3^- (analoga ATP, odnosno prijelazno stanje pri hidrolizi ATP) na S1, duga uzvojica veže laki lanac (označen kao "lever arm") i tako ga poljsne s glavne domene. U prisustvu samo ADP, "lever arm" rotira za 90 stupnjeva u odnosu na položaj u kome je u prisustvu ADP-VO_3^- .

Identične konformacijske promjene onima u miozinu događaju se u kinezinu

Iako kinezin nema α -uzvojnicu bočne ruke, relativno kratak segment nazvan «neck linker» mijenja konformaciju kao odgovor na vezanje nukleotida. Princip: «neck linker» veže se na glavnu domenu kinezina kada se veže ATP, a oslobađa se kada je nukleotid-vezno mjesto prazno ili zauzeto s ADP. **Kinezini se razlikuju od miozina po tome što vezanje ATP na domenu povećava afinitet između kinezina i njegovog partnera za vezanje, mikrotubule.**

TABLE S4.1 Effect of nucleotide binding on protein affinity

Protein	Bound to	
	NTP	NDP
Myosin (ATP or ADP)	Low	High
Affinity for actin		
Kinesin (ATP or ADP)	High	Low
Affinity for microtubules		
Heterotrimeric G protein (α subunit) (GTP or GDP)	Low	High
Affinity for $\beta\gamma$ dimer		
Affinity for effectors	High	Low

MIOZINI SE KREĆU DUŽ AKTINSKIH VLAKANA

U Miozini, kinezini i dineini kreću se ciklički ovisno o stanju u kome se nalaze i s različitim afinitetom po dugim polimernim makromolekulama

U Za miozin, molekularni put je polimerni oblik aktina, 42 kd protein kojega uobičajeno ima u eukariotskim stanicama oko 10% ukupnih proteina.

U Polimeri aktina stvaraju se i razgrađuju neprestano u stanici – ovisno o hidrolizi ATP.

U U mišićima su miozin i aktin ključne molekule odgovorne za kontrakciju mišića.

Mišići su kompleks miozina i aktina

Mišićne stanice sadrže puno paralelnih miofibrila, promjera – 1 μm

Funkcionalna jedinica – sarkomera, tipično se ponavlja svakih 2,3 μm duž fibrile u opuštenom mišiću.

Tamna A vrpca i svijetla I vrpca pravilno se izmjenjuju.

U centralnoj zoni A vrpce, H zoni, manja je gustoća nego u ostatku vrpce.

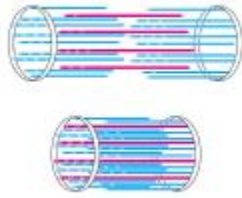
I vrpca prepolovljena je sa Z linijom vrlo velike gustoće.

Molekularni plan sarkomere

Regije u sarkomeri prikazuju prisustvo 2 vrste interaktivnih proteinskih vlakana:

- Debela vlakna s promjerom od 15 nm sastoje se primarno od miozina
- Tanka vlakna promjera 9 nm sastoje se od aktina kao i od tropomiozina i kompleksa tropoina.

Klizanje-vlakno model



- Kontrakcije mišića - tanka vlakna klize duž debelih vlakana uz hidrolizu ATP.
- Tropomiozin i kompleks troponina reguliraju klizanje u odgovoru na živčani podražaj.
- Pri odmaranju, tropomiozin blokira interakcije između miozina i aktina.
- Živčani podražaj vodi ka povećanju koncentracije iona kalcija i, u odgovoru, omogućava interakcije miozin-aktin.

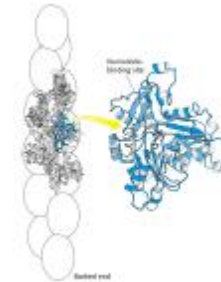
Aktin je polarni, samoklopivi, dinamički polimer

Ø Svaki polimer aktina (određeno elektronskom mikroskopijom, x-kristalografijom, atomskim razlučivanjem) sastoji se od 4 domene, koje zajedno mogu opkoliti vezani nukleotid, ATP ili ADP.

Ø Monomeri aktina (G-aktini, od *globular*) zajedno tvore aktinska vlakna (F-aktin). F-aktin ima strukturu uzvojnice. Kako je rotacija oko 180 stupnjeva. F-aktin slični kablju.

Ø Aktinski monomeri usmjereni su u istom pravcu što F-aktin čini polarnim.

Ø Jedan kraj vlakna nazvan je *plus* (bodljikavi) kraj, a drugi *minus* (zašiljeni) kraj.



Kako se stvaraju aktinska vlakna?

Ø Polarni, dobro organizirani, polimeri aktina stvaraju se spontano iz monomera u odgovarajućim uvjetima.

Ø Povezivanje prva dva do tri monomera nije favorizirana reakcija; Kad jednom nastane jezgra vlakna potiče se polimerizacija:

$$K_d = \frac{[A_n] [A]}{[A_{n+1}]}$$

K_d = konc. monomera na početku reakcije (kritična konc. monomer);
Ako je [A]_n ≈ K_d → polimerizacija je stopirana

Aktinska vlakna unutar stanice su izuzetno aktivne dinamičke strukture koje stalno se izgrađuju ili gube monomere.

Koncentracija monomera može biti regulirana β -timozinom, proteinima koji se smještaju na krajeve vlakana i sl.

Evolucija aktinskih vlakana

Homologi su enzimima koji sudjeluju u metabolizmu šećera – heksokinazama.



Nađene su sličnosti i s prokariotskim MreB proteinom.

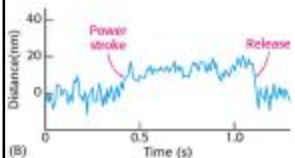
Kretanje pojedinih motornih proteina može se direktno pratiti



Tzv. optičkom zamkom može se vidjeti kretanje molekula miozina na aktinskim vlaknima:

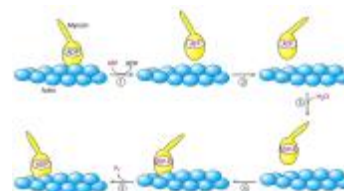
(A) Aktinsko vlakno (plavo) smješteno je iznad fragmenata teškog mermiozina (HMM) (žuto). Kuglice su stavljenе na svaki kraj vlakna u optičku zamku koju stvara fokusirani infracrveni laser (narančasto). Promjene položaja tih kuglica mogu se mjeriti nanometarskom preciznošću.

(B) zapis promjene položaja od 11 nm uslijed dodatka ATP



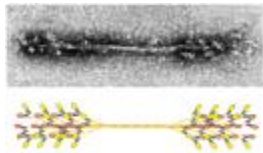
Pojedine miozinske glave vežu aktinsko vlakno i konformacijski ga mijenjaju

Konformacijske promjene udružene s oslobađanjem fosfata odgovorne su za snagu potrebnu za kretanje



Glava miozina (žuto) s vezanim ADP veže se na aktinsko vlakno (plavo). Zamjena ADP sa ATP vodi ka: (1) oslobađanju miozina s aktina i (2) reorientaciji bočne ruke («lever arm») miozina. Hidrolizom ATP (3) omogućava se glavi miozina ponovno vezanje na drugo mjesto duž vlakna aktina (4). Oslobađanjem Pi (5) pojačava se snaga interakcija miozina i aktina i «lever arm» se ponovo reorientira.

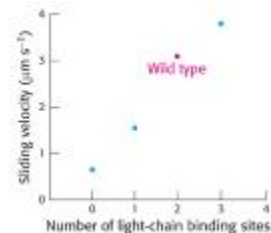
Kako taj ciklus sudjeluje u kontrakciji mišića?



Molekule miozina samoizgrađuju debele bipolarne strukture s glavama miozina na krajevima i tankom proteinskom strukturom između.

Oko 500 glavnih domena smješteno je na površini svakog tankog vlakna. Te domene uparene su u miozinske dimere, no 2 glave unutar svakog dimera djeluju neovisno. U prisustvu normalnih koncentracija ATP većina miozinskih vlakana je odijeljena s aktina i svaka može neovisno hidrolizirati ATP, vezati se na aktin, osloboditi P_i . Kako je zakačeno samo nekoliko glava, vlakna aktina mogu realtivno slobodno kliziti i to oko 110 Å po ciklusu. Kada se stabilne glava zakače na isto aktinsko vlakno, brzina kretanja miozina u odnosu na aktin naraste do 80.000 Å/sek.

Dužina bočne ruke određuje brzinu motora



Ispitivanje je napravljeno na mutiranim miozinima i normalnom miozinu.

Brzina transporta mutiranih miozina s manjom bočnom rukom manja je u odnosu na divlji tip miozina i miozine s produljenom bočnom rukom.

KINEZINI I DINEINI KREĆU SE PO MIKROTUBULAMA

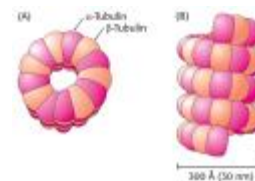
Kinezini se kreću po mikrotubulama često prenoseći organele i vezikule iz centra stanice na periferiju

- Ø Neki kinezini izuzetno su važni za prijenos impulsa na periferiju neurona.
- Ø Mutacije u kinezinima mogu biti uzrokom oboljenja živčanog sustava.
- Ø Tako mutacija u kinezinu KIF1Bβ može dovesti do periferne neuropatije, kao i Charcot-Marie-Tooth bolesti.
- Ø Smatra se da mutacije u genima za kinezine su povezane sa sklonošću ka shizofreniji.

Dineini imaju važnu ulogu u klizanju mikrotubula pri kretanju cilija i flagela na površini eukariotske stanice.

Mikrotubule su šuplji cilindrični polimeri

Ø Izgrađene su od 2 vrste homolognih 50-kd podjedinica, α i β -tubulina, koji se slažu u obliku uzvojnice i na taj način grade zid šupljeg cilindra.



Ø Alternativno, mikrotubule se mogu izgraditi od 13 paralelnih protovlakana

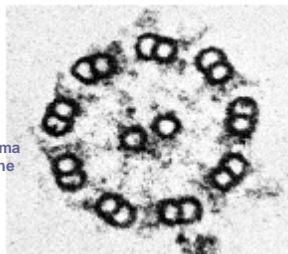
Vanjski promjer mikrotubule je 30 nm. Slično aktinu, polarne su strukture. Minus krajem ukotvljene su blizu središta stanice, dok je plus kraj smješten na površini stanice

Razmještaj mikrotubula

• Mikrotubule su ključne komponente cilija i flagela

• Npr. spermiji se kreću zahvaljujući flageli koja sadrži mikrotubule.

• Skupina mikrotubula - aksonema sastavljena je od periferne skupine od 9 parova mikrotubula koje okružuju 2 pojedinačne mikrotubule.



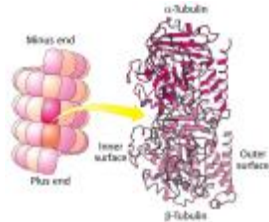
Uloga mikrotubula u stanici

- Ø Mikrotubule su važne u određivanju oblika stanice i odvajanju kromosoma u mitozu.
- Ø One su visoko dinamičke strukture koje rastu dodavanjem α i β -tubulina na krajeve postojećih struktura.
- Ø Slično aktinu tubulini se također vežu i hidroliziraju NTP.
- Ø Za razliku od aktina tubulini radije hidroliziraju GTP.
- Ø Kritična koncentracija za polimerizaciju GTP oblika tubulina je niža nego ona za GDP oblik.

Tubulini su također članovi obitelji *P-loop NTP-aza*.

Prisutni su jedino u eukariota (iako je pronađen prokariotski homolog (FtsZ).

FtsZ sudjeluje u podjeli diobi bakterija i stvaranju prstenastih struktura što ukazuje da je tubulin evoluirao iz pradašnjeg proteina za diobu stanice.



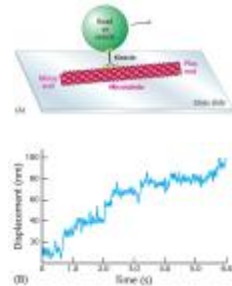
Kontinuirano produžavanje i skraćivanje mikrotubula izuzetno je važno za njihovu ulogu u staničnoj diobi. Taxol se zbog svoje uloge u staničnom ciklusu i sposobnosti vezanja na mikrotubule koristi kao protutumorski lijek, jer može spriječiti brzu diobu stanice.

Kretanje kinezina

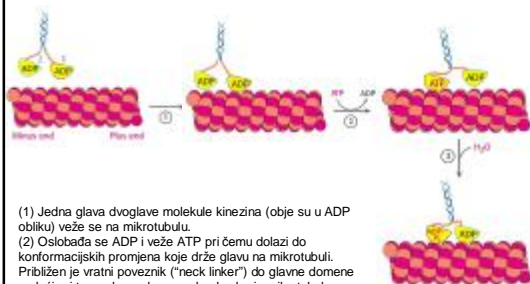
Kinezini se kreću po mikrotubulama tako da se prvo veže jedna a zatim druga glava.

Molekula kinezina uobičajeno čini 100 ili više koraka do plus kraja mikrotubule tijekom 1 sek

Adicija ATP snažno povećava afinitet kinezina za mikrotubule, dok kod miozina vezanje ATP dovodi do njegova otpuštanja s aktina.



Kretanje kinezina po mikrotubulama



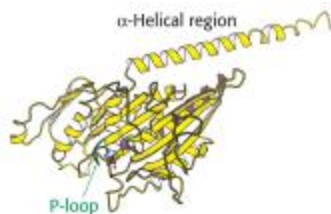
- (1) Jedna glava dvoglave molekule kinezina (obje su u ADP obliku) veže se na mikrotubulu.
- (2) Oslobađa se ADP i veže ATP pri čemu dolazi do konformacijskih promjena koje drže glavu na mikrotubuli. Približen je vratni poveznik ("neck linker") do glavne domene vodeći pri tome drugu domenu do plus kraja mikrotubule.
- (3) Hidroliza ATP događa se kad druga glava stupa u interakcije s mikrotubulom.



Izmjena ATP s ADP (4) u drugoj glavi gura prvu glavu s mikrotubule, oslobađa se P_i i pomiče se prva domena po mikrotubuli. (5) Ciklus se ponavlja pomičući dimer kinezina.

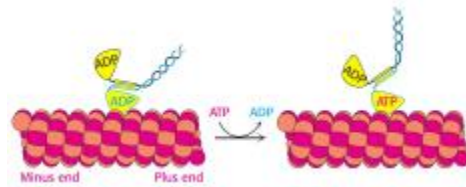
Kinezini hidroliziraju ATP brzinom 80 mol/sek, što je 80 A po molekuli ATP. Po mikrotubuli kinezini se kreću 6400 A/sek.

Male strukturalne promjene mogu obrnuti polarnost motora



Neki kinezini kao što je *ncd* preću se prema minus kraju mehanizmom koji je nešto drugačiji nego u konvencionalnih kinezina, koji se kreću suprotnim smjerom.

Ncd se kreće tako da zamjena ATP sa ADP oslobađa α -uzvojnica s glavne domene pomičući drugu glavnu domenu prema minus kraju.



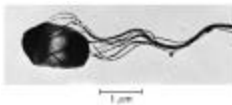
Vezanje ATP u konvencionalnih kinezina vodi prema vezanju neck linker-a, vezanje ATP u *ncd* oslobađa uzvijenju regiju. Time je dopušteno drugoj motornoj domeni *ncd* dimera vezanje na mikrotubulu u smjeru minus kraja.

ROTACIJSKI MOTOR POMAŽE KRETANJE BAKTERIJA

U 1 sekundi bakterije se mogu pomaći za 25 μm ili 10 dužina.

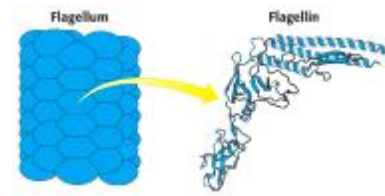
Zašto?

U bakterijskim motorima, jedan element vrti se oko centralne osi, a smjer rotacije može se vrlo brzo mijenjati



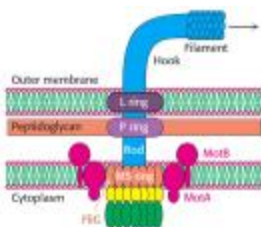
Bakterije, poput *E. coli* i *S. typhimurium* plivaju pomoću flagela smještenih na njihovoj površini. Kada flagele rotiraju u smjeru obrnutom od kazaljke na satu, stvara se snop flagela koje guraju bakteriju kroz otopinu.

Struktura flagelina



Bakterijske flagele su polimeri promjera oko 15 nm i duge oko 15 μm , sastavljene od 53-kd podjedinica flagelina. Podjedinice su povezane u strukturu uzvojnice koja ima 5.5 podjedinica po uzvoju. Svaka flagela je zavrtnuta u lijevu stranu.

Tok protona omogućava rotaciju bakterijskim flagelama



Motor flagela je vrlo složen i sastoji se od 40 različitih proteina. Genetičkim studijama nađeno je 5 komponenti izuzetno važnih za funkciju motora: MotA – membranski protein s 4 transmembranske uzvojnice i citoplazmatskom domenom
MotB – membranski protein s jednom transmembranskom uzvojnicom i velikom periplazmatskom domenom.

Komponente flagelnog motora

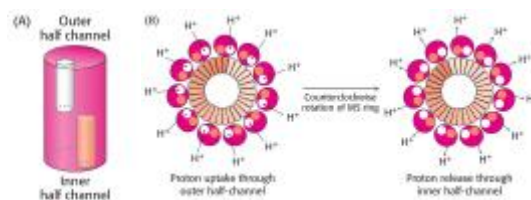


Oko 11 MotA-MotB parova stvara prsten oko baze flagela

FliG, FliM i FliN dijelovi su strukture slične disku koji se naziva MS prsten s 30 FliG podjedinica koje dolaze zajedno i tvore prsten

MotA-MotB i FliG stvaraju protonske kanale koji pomažu rotaciju flagela

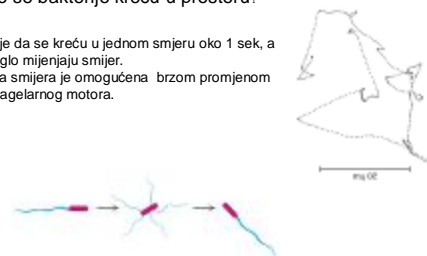
Na koji način protok protona kroz membranu omogućava mehaničku rotaciju?



Hipoteza vezana za kretanje bakterija pomoću flagela bila bi da svaki MotA-MotB par povezan je u strukturu koje tvore polukanale. FliG služi kao rotirajući nosač proteina. Prema tome, proton s periplazmatskog prostora prolazi u polikanal i prenosi se pomoću FliG podjedinice. MS prsten rotira, okrećući i flagele, dopuštajući na taj način prolaz protona s unutar polukanal i u stanicu.

Kako se bakterije kreću u prostoru?

Uočeno je da se kreću u jednom smjeru oko 1 sek, a zatim naglo mijenjaju smjer. Promjena smjera je omogućena brzom promjenom smjera flagelnog motora.



Kada se flagele kreću u smjeru suprotnom od kazaljke na satu, uzvijena vlakna stvaraju koherentnu nakupinu koja favoriziraju izduženi oblik svakog vlakna i bakterije glatko plivaju. Promjenom rotacije flagele se kreću svaka za sebe i bakterija pada.

