

ANDRZEJ A. KASPRZAK

Zakład Biochemii Mięśni

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN

Pasteura 3, 02-093 Warszawa

e-mail: aak@nencki.gov.pl

MECHANIZM GENERACJI RUCHU PRZEZ KINEZYNE

WPROWADZENIE

Kinezyne są białkami motorycznymi, które generują ruch i siłę na koszt hydrolizy ATP podczas ich oddziaływania z mikrotubulami. Białka te odgrywają podstawową rolę w wielu procesach komórkowych, takich jak transport wewnątrzkomórkowy, mitoza, mejoza oraz kontrola dynamiki polimeryzacji mikrotubul. Kinezyne, podobnie jak miozyny tworzą ogromną nadrodzinę, liczącą w chwili obecnej co najmniej dwieście różnych białek. Wspólne cechy kinezyn to obecność globularnej domeny (główki) wiążącej mikrotubule i hydrolizującej ATP oraz wydłużonej, zazwyczaj superhelikalnej domeny odpowiedzialnej za dimeryzację cząsteczek i wiążącej łańcuchy lekkie (Ryc. 1). Schemat ten dotyczy kinezyne „klasycznej”; oprócz niej

w nadrodzinie kinezyn można znaleźć białka jednogłówkowe oraz takie, które praktycznie pozbawione są części superhelikalnej (HIROKAWA 1998).

Porównanie sekwencji aminokwasowych kinezyn i miozyn nie wykazuje istotnych podobieństw pomiędzy nadrodzinami. Jednakże analiza struktur trójwymiarowych prowadzi do wniosku, iż elementy strukturalne w obrębie główki odpowiedzialne za hydrolizę ATP oraz wiązanie do polimeru (mikrotubuli w przypadku kinezyne, aktyny w przypadku miozyny) mają podobne ułożenie i, co więcej, to ułożenie jest podobne do występującego w białkach G. Sugeruje to wspólną ewolucyjną przeszłość białek motorycznych i białek G (VALE 1996).

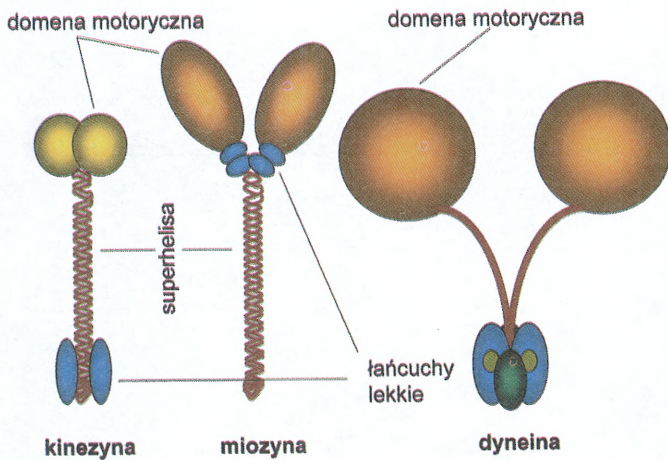
MECHANIZM GENERACJI SIŁY (RUCHU) PRZEZ KINEZYNE

Przy użyciu kilku biofizycznych technik wykazano, że białka motoryczne poruszają się wzdłuż polimeru w sposób nieciągły — krokami, przesuując się w każdym kroku z jednej podjednostki białka polimeru do drugiej. Znajduje to także uzasadnienie strukturalne, ponieważ białka motoryczne oddziałują w sposób specyficzny z określonymi miejscami w podjednostkach polimeru. Wielkość takiego kroku roboczego wynosi 5–15 nm dla miozyny II i 8 nm dla kinezyne. W większości enzymów hydrolizujących ATP, w małych białkach G, a także w samych motorach zmiany konformacji elementów strukturalnych w obrębie centrum aktywnego nie przekraczają 0.4–0.5 nm. Zatem podstawową sprawą w poznaniu mechanizmu ge-

neracji ruchu musi być wyjaśnienie, w jaki sposób tak niewielkie zmiany struktury związane z hydrolizą ATP prowadzą do co najmniej dziesięciokrotnie większych przemieszczeń cząsteczek motoru.

Zanim przejdziemy do opisu konkretnych modeli generacji siły warto się zastanowić, czy rzeczywiście hydroliza ATP jest czynnikiem powodującym ruch. Pozornie jest to pytanie retoryczne, gdyż brak ATP lub zastąpienie go niehydrolizowalnym analogiem powoduje całkowite zahamowanie zdolności motorycznych. Jednak sprawa nie jest aż tak oczywista.

Cząsteczki białek, nawet tak dużych jak miozyna czy kinezyne, są obiektami na tyle małymi, że ich energia termiczna w temperatu-



Ryc. 1. Domenowa budowa kinezyzny, miozyny i dyneiny.

rze pokojowej może powodować fluktuacje ich położenia (ruchy Browna) na odległości porównywalne z wielkością kroku roboczego. Obliczenia potwierdzają możliwość takiego włączenia tego zjawiska w proces generacji siły, ale jej nie dowodzą, gdyż zazwyczaj wymagają znajomości wielu parametrów niedostępnych lub trudnych do zmierzenia. Jeżeli białka motoryczne w sprytny sposób wykorzystują ruchy Browna do swojego przemieszczania się, jaka jest rola ATP? Ponieważ fluktuacje położenia są z natury swojej przypadkowe, po kroku lub kilku krokach w jednym kierunku następuje krok lub kilka kroków w kierunku przeciwnym i w rezultacie białko takie nie wykazywałoby cechy jednokierunkowego przemieszczania się wzdłuż polimeru. Potrzebny jest element, który blokowałby możliwość powrotu do poprzedniego położenia. Taką rolę spełnia cykliczna hydroliza ATP. Zatem energia uwalniana podczas hydrolizy ATP służy do prostowania ruchu dyfuzyjnego, tak jak dioda może służyć do prostowania prądu. Taki mechanizm generacji ruchu nosi nazwę mechanizmu dyfuzyjnego albo Brownowskiej lub termicznej zapadki (ASTUMIAN i DERÉNYI 1999).

Drugim rodzajem mechanizmu, prowadzącego do generacji ruchu jest mechanizm konformacyjny, w którym rolę wzmacniacza małych zmian konformacyjnych zachodzących w obrębie centrum aktywnego pełni zawias molekularny i sztywny element strukturalny białka, opisywany jako „dźwignia”. Małe zmiany w pobliżu punktu obrotu zawiasu powodują duże przesunięcia odległego końca dźwigni. W przypadku miozyny, rolę taką spełnia C-końcowa helisa wiążąca łańcuchy lekkie (patrz artykuł B. PLISZKI w tym numerze KOSMOSU), której położenie zależy od rodzaju intermediatu nukleotydowego w centrum katalitycznym miozyny. Jednakże kinezyzna nie zawiera strukturalnej domeny mogącej spełniać taką funkcję.

W 1999 r. duża grupa badaczy koordynowanych przez Roberta Vale'a, na podstawie pomiarów fluorescencyjnego przeniesienia energii, elektronowego rezonansu paramagnetycznego i mikroskopii elektronowej, zaproponowała model generacji siły przez białka z nadrodziny kinezyzn (RICE i współaut. 1999). Według przedstawionej przez nich hipotezy, rolę mechanicznego wzmacniacza zmian strukturalnych w obrębie centrum aktywnego pełni tzw. łącznik szyjki. Jest to element strukturalny obejmujący w kinezyzie klasycznej aminokwasy 323–335. Gdy w centrum aktywnym znajduje się ADP, łącznik szyjki nie oddziałuje z główką i ma całkowitą swobodę ruchu. Aminokwasy te są natomiast związane z główką i unieruchomione w stanie, kiedy w centrum aktywnym związany jest ATP lub ADPP_i. Rozważmy ten mechanizm nieco dokładniej.

Związanie cząsteczki ATP przez główkę A i jego hydroliza (Ryc. 2), powoduje zmiany w położeniu łącznika szyjki i jego silną interakcję z główką (Etap 1 na Ryc. 2). Wskutek tego oddziaływania główka B zostaje przerzucona wzdłuż protofilamentu mikrotubuli o 16 nm (Etap 2), tak, aby osiągnąć następne miejsce oddziaływania wzdłuż protofilamentu. Po hydrolizie ATP i oddysocjowaniu powstałego ADP (Etap 3) główki A i B zamieniają się rolami. Mutageniza sterowana łącznika szyjki w pełni potwierdziła znaczenie tego rejonu białka w procesie generacji ruchu (CASE i współaut. 2000). Również ostatnio poznana struktura krystaliczna kinezyzny KIF1A pokazała, że łącznik szyjki ma uporządkowaną strukturę w stanie, kiedy wiązany jest ATP (KIKKAWA i współaut. 2001), natomiast w stanie wiążącym ADP nie udało się ustalić położenia przestrzennego tego elementu, co świadczy o jego dużej mobilności. Model Vale'a jest w chwili obecnej najszerzej zaakceptowanym mechanizmem generacji ruchu przez kinezyne. Jednakże niełatwo sobie

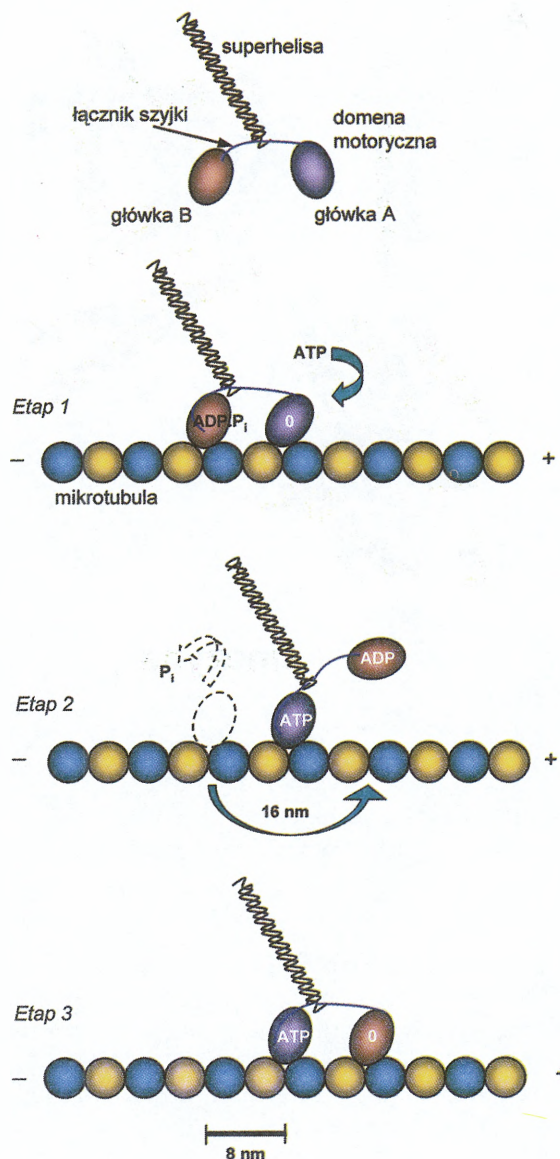
wyobrazić, w jaki sposób to odwracalne wiązanie łącznika szyjki może zachodzić. Warto również zauważyć, że hipoteza Vale'a została sformułowana na podstawie pomiarów z użyciem jednogławkowego konstruktury kinezy, podczas gdy proponowany mechanizm, przynajmniej w jego oryginalnej postaci, dotyczy dwugławkowego białka. Jest mało prawdopodobne, że główka B (Ryc. 2) zostaje przeniesiona do nowego miejsca na protofilamencie wyłącznie wskutek zmian konformacyjnych w główce A. Być może dużą rolę odgrywają drgania termiczne, natomiast silne wiązanie łącznika szyjki uniemożliwia powrót główki B do jej poprzedniego położenia. Jeśli tak jest, to opisane zjawisko ma cechy obu mechanizmów: dyfuzyjnego oraz konformacyjnego i należałoby go określić mianem jako „konformacyjnie kontrolowanej dyfuzji”.

Dwie cechy zaobserwowane po raz pierwszy u kinezyn uczyniły białka tej nadrodziny szczególnie interesującymi obiektami badań biofizycznych i biochemicznych. Są to kierunkowość i procesywność ruchu.

KIERUNKOWOŚĆ RUCHU

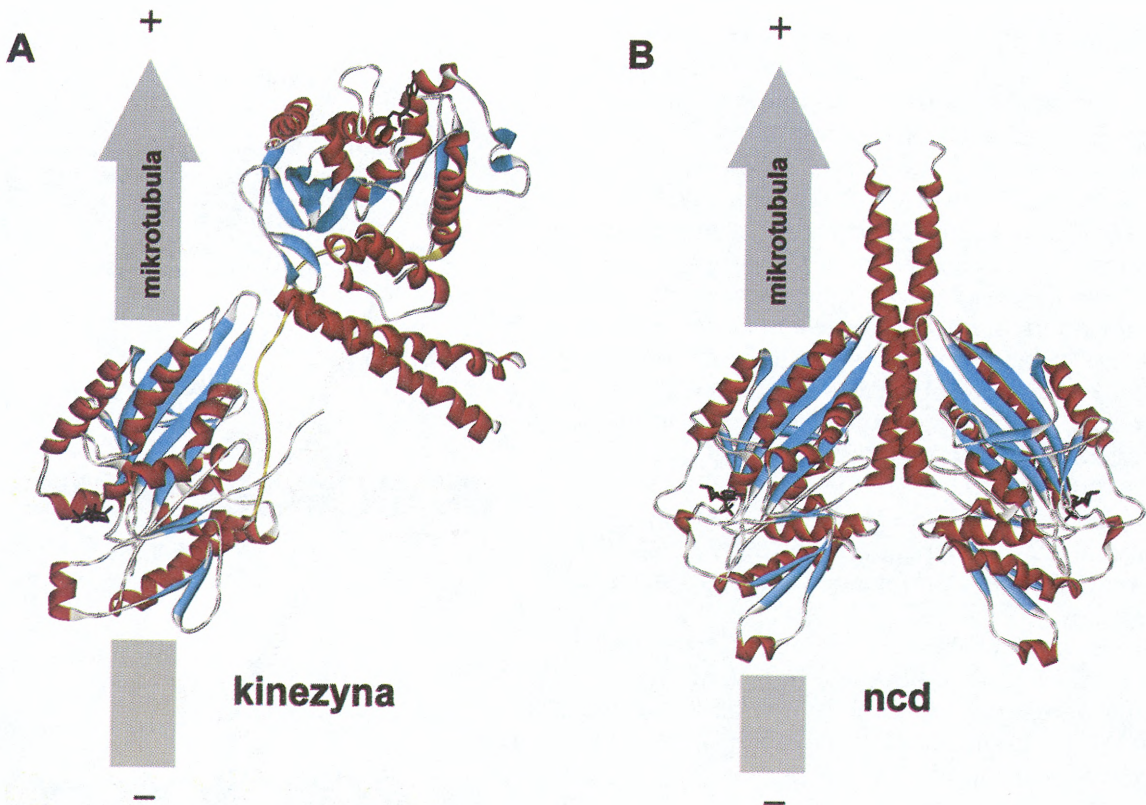
Kinezyzna „klasyczna” porusza się po mikrotubuli w kierunku końca (+), czyli końca szybkorosnącego podczas polimeryzacji. Inne białko z rodziny kinezy, *ncd* (ang. non-claret disjunctonal), którego domena motoryczna jest w dużym stopniu homologiczna do kinezy, generuje ruch i siłę w kierunku przeciwnym, tj. (-). Przed odkryciem tego zjawiska sądzono, że kierunek poruszania się cząsteczki motoru po polimerze jest jednoznacznie wyznaczony przez struktury motoru, jak i polimeru, po którym się porusza. Zatem odwrotny kierunek poruszania się implikowałby inną strukturę przestrzenną motoru lub inne jego miejsce wiązania na polimerze. Żadna z tych możliwości jednak nie zachodzi.

Dopiero analiza krystalograficznie otrzymanych struktur dimerów kinezy i *ncd* pokazała, że mimo wielkich podobieństw w strukturach domeny motorycznej, przestrzenne ułożenie główek w ich dimerach jest całkowicie różne (Ryc. 3). W kinezy klasycznej obie główki są luźno połączone z początkiem superhelisy długimi odcinkami łącznika szyjki i nie mają kontaktu z dalszymi segmentami superhelisy. W *ncd*, ułożone symetrycznie główki tworzą sieć niekowalencyjnych wiązań z szyjką i superhelisą. Na Ryc. 3 umieszczono oba białka tak, aby orientacja ich główek aktualnie związanych była taka sama. Położenie główki niezwiązanej, wynikające ze struktury dimeru, jest w obu



Ryc. 2. Generacja siły ruchu przez kinezyne. Opis w tekście.

wypadkach całkowicie różne. W przypadku kinezy druga główka jest znacząco przesunięta w kierunku (+) mikrotubuli. W *ncd* widać tendencję do niewielkiego przesunięcia niezwiązanej główki w kierunku przeciwnym (Ryc. 3B), co tłumaczy przeciwny kierunek poruszania się tych białek. W tym kontekście bardzo interesujące było otrzymanie zmutowanego *ncd*, w którym Gln-340, jeden z aminokwasów łączących główkę *ncd* z superhelisą, zastąpiono resztą lizynową (ENDOW i HIGUCHI 2000). W testach ruchliwości *in vitro* mutant taki poruszał się w obu kierunkach, tj. wykonywał kilka kroków w stronę (+), po czym kilka kroków w kierunku odwrotnym. Jest to silny dowód przemawiający za hipotezą, że oddziaływania główka-superhe-



Ryc. 3. Porównanie dimerów kinezyzny i ncd w podobnej orientacji główki związanej z mikrotubulą. W strukturze kinezyzny łańczik sztywności zaznaczono kolorem żółtym. Opis w tekście.

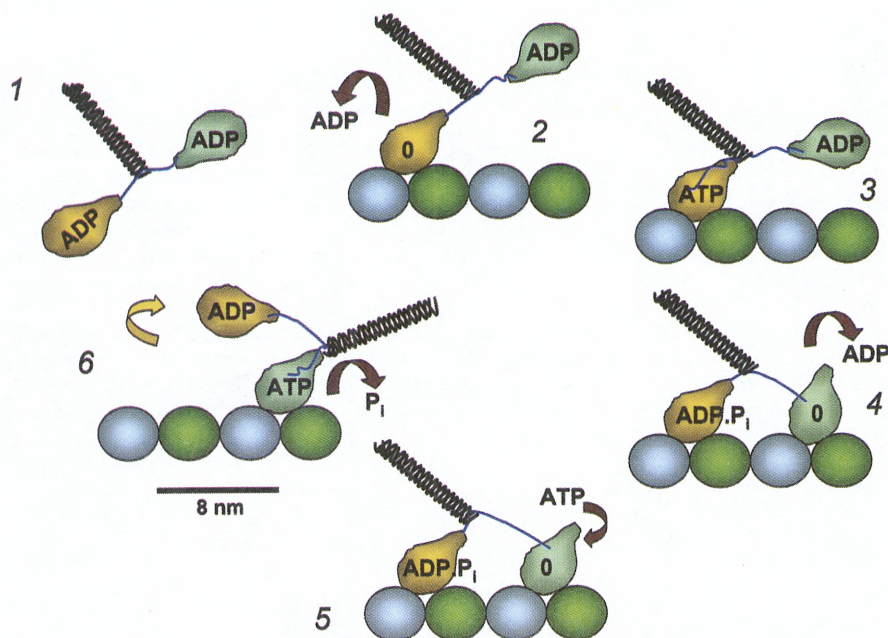
lisa decydują o kierunkowości poruszania się. Co więcej, uderzające jest podobieństwo chaotycznie zachowującej się cząsteczki, w której źle funkcjonuje jeden z elementów generacji siły (zapadka?) do wspomnianych powyżej molekuł podlegających ruchom Browna.

PROCESYWNOŚĆ RUCHU

Ponieważ kinezyzna klasyczna, w przeciwieństwie do miozyny II, nie tworzy filamentów i nie działa w grupie, w każdym momencie cyklu mechanochemicznego jej cząsteczka musi być związana z mikrotubulą przynajmniej jedną główką. W przypadku całkowitego zerwania kontaktu z polimerem siły dyfuzji przeniosłyby ją w miejsce odległe od mikrotubuli, co uniemożliwiłoby jej funkcję. Po związaniu się z mikrotubulą kinezyzna rozpoczyna serię cykli mechanochemicznych przemierzając, bez dysocjacji z polimeru, odległość ok. 800 nm, tj. wykonując ok. 100 kroków. Zatem kinezyzny przenosząc ładunek dosłownie kroczą jedna za drugą wzdłuż protofilamentu. Tylko niektóre białka z nadrodziny kinezyn są procesywne. Na przykład, wspomniane już ncd nie wykazuje takiej cechy. Nie jest ona zresztą potrzebna, ponieważ białka ncd, działając w grupie, są

zakotwiczone na stałych elementach komórki, co zapobiega ich dyfuzji. Zjawisko procesywności tłumaczy się ścisłą koordynacją pomiędzy rodzajem intermediatu nukleotydowego w każdej z główek 7 i jej powinowactwem do mikrotubuli. Wolna kinezyzna zawiera w każdej z główek jedną cząsteczkę ADP (Ryc. 4, etap 1), który oddysocjowuje po utworzeniu kompleksu z protofilamentem (Etap 2). Umożliwia to związanej główce przyłączenie ATP (Etap 3). Po hydrolizie ATP i wytworzeniu intermediatu ADPP_i, główka niezwiązana może także się przyłączyć do mikrotubuli (Etap 4), co powoduje utratę przez nią drugiego produktu reakcji ADP (Etap 5) i związanie przez nią nowej cząsteczki ATP. Dopiero w tej konformacji główka zawierająca ADPP_i może się odłączyć (Etap 6) i następnie obrócić. Po dysocjacji obu produktów hydrolizy, tj. P_i i ADP, powracamy do etapu 2, z tym, że główki zmieniły się rolami. Mechanizm ten nazwano mechanizmem „ręka w ręce” (ang. „hand-over-hand”) (HACKNEY 1995).

Nie zostało dotychczas wyjaśnione, w jaki sposób główki kinezyzny przekazują sobie informacje o rodzaju intermediatu nukleotydowego w centrum aktywnym. Komunikacja taka musi zachodzić na stosunkowo dużej odległości (8–16 nm) przy użyciu łańcików sztywności, które mają



Ryc. 4. Koordynacja główek kinezyzny podczas cyklu mechanochemicznego, prowadząca do wystąpienia zjawiska procesywności ruchu. Opis w tekście.

niewielką zawartość lub są wręcz pozbawione struktury drugorzędowej. Inną możliwością przekazywania informacji wzdłuż protofilamentu jest lokalne odkształcenie struktury mikrotubuli. Biorąc pod uwagę duże odległości, jak i fakt, iż mikrotubule są polimerami znacznie mniej elastycznymi od mikrofilamentów (aktyny-F), hipoteza tak wydaje się w chwili obecnej mało uzasadniona.

Ponieważ procesywność wymaga ścisłej koordynacji pomiędzy dwiema główkami kinezyzny, jednogłówkowe konstrukty kinezyzny klasycznej nie są procesywne (HANCOCK i HOWARD

1998). Dlatego zaskoczeniem wydawało się odkrycie, iż jednogłówkowa kinezyzna KIF1A jest procesywnym białkiem (OKADA i HIROKAWA 1999). Wyjaśnienie tego zjawiska potwierdziło jednak ogólny mechanizm procesywności. Główka KIF1A zawiera długą pętlę o wysokiej zawartości lizyny. Oddziaływanie tej dodatnio naładowanej pętli z mikrotubulą umożliwia zerwanie kontaktu z protofilamentem pozostałych części główki w chwili, gdy główka się przemieszcza, bez konsekwencji utracenia kontaktu z mikrotubulą.

PERSPEKTYWY

W ciągu ostatniego dziesięciolecia uzyskanie trójwymiarowych struktur o wysokiej rozdzielczości dla kilku białek motorycznych doprowadziło do weryfikowalnych eksperymentalnie hipotez opisujących molekularny mechanizm przekształcania energii hydrolizy ATP w ruch mechaniczny. Modele te są ciągle bardzo niedoskonałe. Dla ich weryfikacji potrzebne jest określenie wysokiej rozdzielczości struktur kompleksów tych białek z odpowiednimi polimerami, tj. miozyny z aktyną-F i kinezyzny z mikrotubulą. Otrzymanie takich struktur nie jest w chwili obecnej możliwe. Innym problemem jest łatwość deformacji niektórych elementów strukturalnych białek motorycznych, które ze względu na swą funkcję powinny mieć łatwość przemieszczania się. Istnieje zatem możliwość, że krystalizacja wymusza pewne konformacje nie istniejące normalnie w roztworze.

Wskazuje to na konieczność dalszego badania białek motorycznych przy użyciu technik fizykochemicznych, takich jak NMR, fluorescencyjne przeniesienie energii czy elektronowy rezonans paramagnetyczny.

Takie zjawiska jak procesywność i różny kierunek poruszania się na polimerze w obrębie tej samej nadrodziny okazały się nie być ograniczone do kinezyn. Miozyna V i aksonemalna dyneina c są białkami procesywnymi (MEHTA i współaut. 1999). Odkryto także, że miozyna VI porusza się po mikrofilamencie w kierunku (-), tj. w kierunku przeciwnym do innych poznanych miozyn (WELLS i współaut. 1999). Biorąc pod uwagę te fakty oraz ewolucyjne pokrewieństwo białek motorycznych należy przypuszczać, że fundamentalny mechanizm prowadzący do generacji ruchu jest taki sam dla wszystkich białek motorycznych (VALE i MILLIGAN 2000).

MECHANISM OF FORCE GENERATION BY KINESIN

Summary

Motor proteins such as myosin, kinesin, and dynein move along actin filaments or microtubules by converting chemical energy of ATP hydrolysis into mechanical work. Resolution of the atomic structures of several proteins of the kinesin superfamily led to the proposal that to produce motility, these motors use a common mechanism. The key feature of this mechanism is involvement of a 13-amino acid long structural element located between the kinesin's catalytic core and its neck, called „the neck linker”. Movement of kinesin can be accomplished by disordering and restructuring the linker depending on the type of the nucleotide intermediate present at the catalytic site of the protein. A motor protein is able to make multiple steps along the

polymer without becoming detached, is called „processive”. Some members of the kinesin superfamily are processive. It is shown that processivity is a simple consequence of the force generation mechanism. Another interesting feature of kinesin motors is that members of the same family can move on microtubules in opposite directions. Although the catalytic cores of different members of the kinesin superfamily are very similar, the proteins that exert force in the opposite directions differ also in spatial arrangement of the two heads. Thus, in a particular protein the position of the head that is actually stepping determines the direction of the movement.

LITERATURA

- ASTUMIAN R. D., DERÉNYI I., 1999. *A chemically reversible Brownian motor: Application to kinesin and ncd*. *Biophys. J.* 77, 993–1002.
- CASE R. B., RICE S., HART C. L., LY B., VALE R. D., 2000. *Role of the kinesin neck linker and catalytic core in microtubule-based motility*. *Current Biology* 10, 157–160.
- ENDOW S. A., HIGUCHI H., 2000. *A mutant of the motor protein kinesin that moves in both directions on microtubules*. *Nature* 406, 913–916.
- HACKNEY D. D., 1995. *Highly processive microtubule-stimulated ATP hydrolysis by dimeric kinesin head domains*. *Nature* 377, 448–450.
- HANCOCK W. O., HOWARD J., 1998. *Processivity of the motor protein kinesin requires two heads*. *J. Cell Biol.* 140, 1395–1405.
- HIROKAWA N., 1998. *Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport*. *Science* 279, 519–526.
- KIKKAWA M., SABLIN E. P., OKADA Y., YAJIMA H., FLETTERICK R. J., HIROKAWA N., 2001. *Switch-based mechanism of kinesin motors*. *Nature* 411, 439–445.
- MEHTA A. D., ROCK R. S., RIEF M., SPUDICH J. A., MOOSEKER M. S., CHENNEY R. E., 1999. *Myosin-V is a processive actin-based motor*. *Nature* 400, 590–593.
- OKADA Y., HIROKAWA N., 1999. *A processive single-headed motor: kinesin superfamily protein KIF1A*. *Science* 283, 1152–1157.
- RICE S., LIN A. W., SAFER D., HART C. L., NABER N., CARRAGHER B. O., CAIN S. M., PECHATNIKOVA E., WILSON-KUBALEK E. M., WHITTAKER M., PATE E., COOKE R., TAYLOR E. W., MILLIGAN R. A., VALE R. D., 1999. *A structural element in the kinesin motor protein that drives motility*. *Nature* 402, 778–784.
- VALE R. D., 1996. *Switches, Latches and Amplifiers: common themes of G-proteins and molecular motors*. *J. Cell Biol.* 135, 291–302.
- VALE R. D., MILLIGAN R. A., 2000. *The way things move : looking under the hood of molecular motor proteins*. *Science* 288, 88–95.
- WELLS A. L., LIN A. W., CHEN L.-Q., SAFER D., CAIN S. M., HASSON T., CARRAGHER B. O., MILLIGAN R. A., SWEENEY H. L., 1999. *Myosin VI is a myosin that moves backwards*. *Nature* 401, 505–508.