

Zdeněk Lánský

Kráčející proteiny v nitru živých buněk

Pokroky matematiky, fyziky a astronomie, Vol. 61 (2016), No. 4, 273–284

Persistent URL: <http://dml.cz/dmlcz/145975>

Terms of use:

© Jednota českých matematiků a fyziků, 2016

Institute of Mathematics of the Czech Academy of Sciences provides access to digitized documents strictly for personal use. Each copy of any part of this document must contain these *Terms of use*.



This document has been digitized, optimized for electronic delivery and stamped with digital signature within the project *DML-CZ: The Czech Digital Mathematics Library* <http://dml.cz>

Kráčející proteiny v nitru živých buněk

Zdeněk Lánský, Vestec

Abstrakt. Pohyb je jednou ze základních charakteristik všech organismů. Původcem buněčného pohybu je vnitrobuněčná biopolymerní síť, která se nazývá cytoskelet. V tomto přehledovém článku se budeme zabývat několika základními molekulárními mechanismy, které v rámci cytoskeletu vedou k vytváření buněčného pohybu.

Cytoskelet je původcem buněčného pohybu

Vnitrobuněčný pohyb je jednou z podstatných vlastností všech organismů. Tento pohyb je nezbytný pro uskutečnění zcela základních biologických pochodů, jako je například buněčné dělení, vnitrobuněčný transport, ale také pohyb celé buňky nebo organismu. Síly, které vedou k buněčnému pohybu, jsou vytvářeny cytoskeletem, což je vnitrobuněčná síť proteinových vláken, na která se váže mnoho dalších proteinů [3], [30]. V tomto článku budeme diskutovat několik molekulárních mechanismů, pomocí nichž cytoskeletální mašinerie vytváří síly vedoucí k (vnitro)buněčnému pohybu.

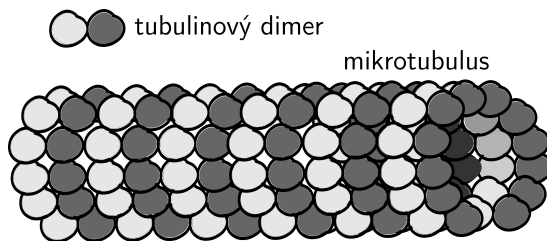
Cytoskelet sestává z několika druhů proteinových vláken. Zde se budeme zabývat pouze jedním druhem, a to vlákny, které se nazývají mikrotubuly. Mikrotubuly jsou polární polymery sestávající z tubulinových dimerů a tvořící ohebná dutá vlákna o průměru zhruba 25 nm, která jsou dlouhá až desítky mikrometrů (obr. 1). Tato vlákna nejsou statická, ale procházejí neustálými cykly polymerace a depolymerace; hovoří se o tzv. dynamické nestabilitě mikrotubulů [22], [14].

Mikrotubulární cytoskelet je schopen generovat mechanické síly dvěma základními mechanismy. Jeden mechanismus je založen na dynamické nestabilitě, tj. polymeraci a depolymeraci daného mikrotubulu, přičemž růst a ustupování špičky daného mikrotubulu může vyvíjet tlak nebo naopak tah na další buněčné struktury [19], [26]. Druhý mechanismus je založen na vzájemném přemísťování existujících mikrotubulů. V tomto krátkém přehledu se budeme zabývat pouze tímto druhým mechanismem, jehož kanonickým původcem jsou proteiny zvané molekulární motory.

Molekulární motory

Molekulární motory jsou proteiny, jež mohou přeměňovat chemickou energii na mechanickou sílu. Jedním z nejlépe prozkoumaných molekulárních motorů, který je asociován s mikrotubuly, je kinesin-1. Ten využívá mikrotubuly jako jakési kolejnice, podél nichž se dokáže pohybovat způsobem připomínajícím lidskou chůzi. Jádrem kinesinu je homodimerní protein se dvěma identickými globulárními částmi, které se nazývají motorové domény a které jsou navzájem spojeny úzkým podlouhlým tzv. stonkem. Kinesin

RNDr. ZDENĚK LÁNSKÝ, Ph.D., Biotechnologický ústav AV ČR, v. v. i., BIOCEV, Průmyslová 595, 252 50 Vestec, e-mail: zdenek.lansky@ibt.cas.cz

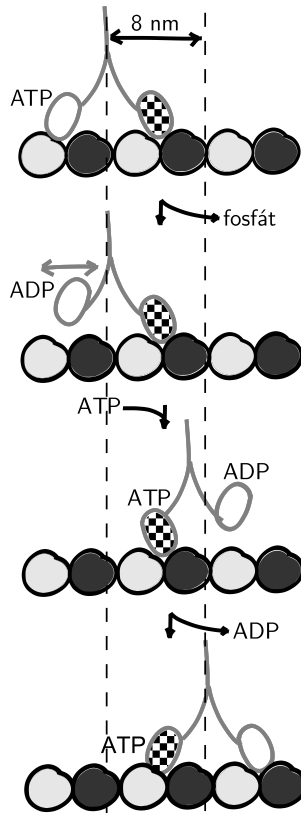


Obr. 1. Struktura mikrotubulů. Mikrotubuly jsou složeny z tubulinových dimerů, které se skládají z α - a β -tubulinu (označené dvěma odstíny šedě). Na jednom konci mikrotubulu je roztoku vystaven α -tubulin, zatímco na druhém β -tubulin, čímž je určena polarita celého polymeru.

Proteiny a jejich konformační změny. Proteiny jsou biopolymery sestávající z omezeného počtu stavebních kamenů, kterými je 22 základních aminokyselin. Proteiny jsou velmi různorodé molekuly, jejichž tvary mohou být kulovité, protáhlé či vláknité, a které mohou mít různou distribuci povrchových nábojů. Mohou tedy v buňce plnit zcela odlišné úkoly. Tato různorodost je dána jak pořadím aminokyselin v jejich polymerním řetězci (může být až tisíce aminokyselin dlouhý), tak jejich vzájemným prostorovým uspořádáním (konformací). Proteinové molekuly mohou být v mnoha případech značně rozměrné, dosahující desítek nanometrů. Konaformační změny, které nastávají při určitých chemických reakcích nebo fyzikálních interakcích takovýchto makromolekul, mohou vést k nanometrovým pohybům některých jejich částí. U specifických proteinových molekul může buňka tyto pohyby organizovat tak, aby vyústily v makroskopický buněčný pohyb. Typickým příkladem těchto specifických molekul jsou motorové proteiny, jinak také nazývané molekulární motory.

získává energii pro svůj pohyb hydrolýzou adenosin-trifosfátu (ATP) na adenosin-difosfát (ADP). Jedna molekula ATP se váže na motorovou doménu. Ta následně prochází cyklem konformačních změn, které vedou k provedení jednoho kroku podél mikrotubulu (obr. 2) [34].

Adenosin-trifosfát (ATP) je malá organická molekula, pomocí níž může buňka uchovávat energii a směřovat ji do míst, kde je potřeba. Řada proteinů dokáže odštěpit fosfát z molekuly ATP, přičemž vzniká adenosin-difosfát (ADP) a uvolní se značné množství energie. Proteiny pak tuto energii dále využívají k pohánění buněčných pochodů. Mezi proteiny, které využívají ATP ke své funkci, patří i molekulární motory.



Obr. 2. Chemo-mechanický cyklus kinesinu-1. Obě motorové domény jsou navázány pevně na mikrotubulus (zobrazen částečně — tři tubulinové dimery), vedoucí motorová doména (označena šachovnicí) nemá navázaný žádný nukleotid (ATP, ADP), zadní motorová doména má navázané ATP. ATP na zadní motorové doméně se hydrolyzuje na ADP a odštěpuje se fosfát. Touto chemickou změnou se výrazně sníží afinita zadní motorové domény k povrchu mikrotubulu, což umožní její difuzní pohyb podél mikrotubulu. Během toho se na původní vedoucí motorovou doménu naváže ATP a dojde k další konformační změně spojené s posunem těžiště celé molekuly kinesinu o 8 nm. Motorová doména s ADP, která se teď ocitá vpředu, se naváže na další vazebné místo na mikrotubulu. Jakmile se to stane, oddělí se od ní molekula ADP, bez které zůstane tato motorová doména pevně navázaná na mikrotubulus a celý cyklus může začít nanovo. Video znázorňující tento proces je k dispozici na webu <https://www.youtube.com/watch?v=YAv4g3Pk6k>

Jeden krok kinesinu-1 má obvykle délku 16 nm, což délkou odpovídá dvěma tubulinovým dimerům, a těžiště celého molekulárního motoru se při něm přesune o 8 nm. Skládá se z několika dobře definovaných mezikroků znázorněných na obr. 2. Molekula kinesinu-1 vykoná za sekundu zhruba 100 kroků, což vede k typickým rychlostem v řádu $0,8 \mu\text{m/s}$ [37], [35], [31]. U některých kinesinů, jako je například kinesin-1, se obě motorové domény střídají v provádění jednotlivých kroků tak, aby vždy jedna z nich zůstala navázaná na mikrotubulus. Tyto motory, které se nazývají procesivní, pak mohou „kráčet“ podél mikrotubulů do vzdálenosti několika set kroků [37]. Naproti

Pozorování vzdáleností menších než difrakční limit optické mikroskopie. V klasické optické mikroskopii není možné rozlišit dva sousední body, které jsou blíže než Abbého difrakční limit. Vzhledem k tomu, že současně EMCCD a CMOS kamery umožňují detekovat signál jedné fluorescenční molekuly, je možné zkoumaný vzorek dostatečně naředit a sledovat v čase tuto jednu molekulu chemicky navázanou například na motorovou doménu molekulárního motoru. Naměřenou dvojrozměrnou distribuci fotonů emitovaných z této molekuly můžeme proložit Gaussovou křivkou. Přesnost, s jakou pak můžeme lokalizovat její maximum odpovídající poloze emitující molekuly, závisí na technických parametrech experimentu, jako je šum kamery, velikost pixelů kamery, nebo počet detekovaných fotonů z této molekuly [33]. Běžně používané fluorescenční molekuly však můžeme lokalizovat s relativně velkou přesností i v běžných experimentálních podmínkách; např. při časovém rozlišení 0,5 s dosahuje prostorová přesnost přibližně 1 nm [36].

tomu neprocesivní motory po provedení jednoho kroku podél mikrotubulu z tohoto mikrotubulu zcela disociují.

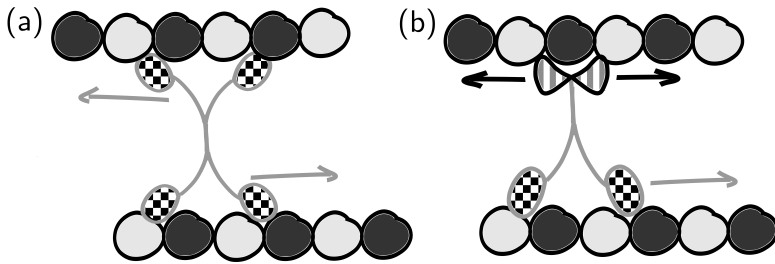
Vzhledem k tomu, že mikrotubuly jsou polární polymery, motorové domény molekulárních motorů se na ně mohou vázat pouze jedním směrem. Tento jev vede k tomu, že daný druh molekulárního motoru se podél mikrotubulu může pohybovat pouze jedním směrem. Molekulární motory se tedy mohou rozdělovat na dvě skupiny, podle toho na kterou stranu mikrotubulu se pohybují, tj. na kterou stranu vyvíjejí svoji sílu.

Motory a přesouvání mikrotubulů

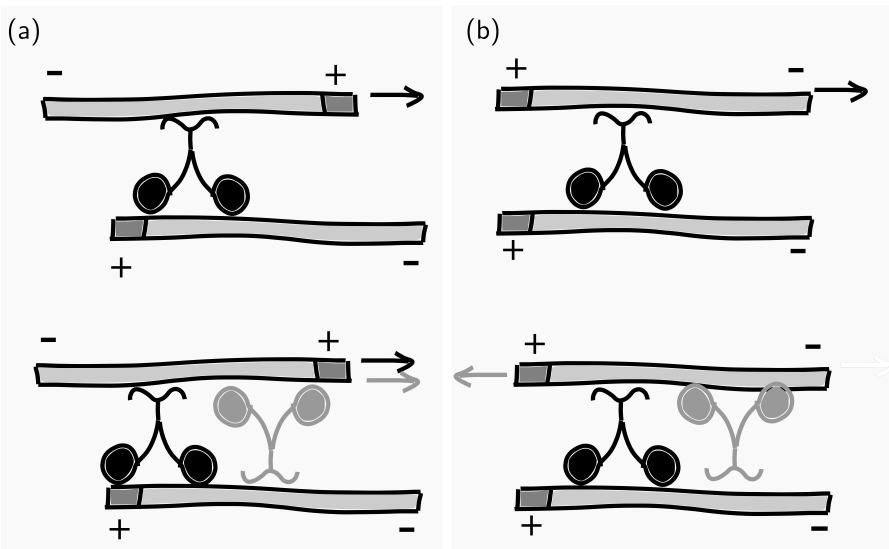
Jak dochází ke vzájemnému posouvání mikrotubulů pomocí molekulárních motorů? Buňky k tomu využívají kinesiny, které mají kromě dvou zmiňovaných motorových domén ještě další vazebná místa pro mikrotubuly. Typickými představiteli jsou homotetramerní kinesin-5, který má čtyři identické motorové domény (obr. 3a), a kinesin-14, který má dvě motorové domény a jedno další vazebné místo pro mikrotubulus, které však nemá katalytickou funkci, tj. nedokáže hydrolyzovat ATP (obr. 3b).

Vzhledem k tomu, že mikrotubuly jsou polární, mohou být dva mikrotubuly spojené molekulárními motory buď jako paralelní, nebo antiparalelní pár (viz obr. 4, kde jsou opačné konce mikrotubulů označeny znaménky + a -). Jestliže jsou mezi mikrotubuly navázány například molekulární motory pohybující se ke konci mikrotubulu označenému znaménkem mínus (jako je kinesin-14), síla generovaná mezi dvěma mikrotubuly antiparalelního páru způsobí jejich vzájemný pohyb, zatímco síla generovaná v paralelním páru způsobí vzájemné zablokování motorů a oba mikrotubuly budou stabilně svázané dohromady (obr. 4) [11]. Podobně tomu bude pro tetramerické motory, k nimž patří kinesin-5 [18]. Tímto mechanismem může buňka regulovat, které páry mikrotubulů se budou vzájemně pohybovat a které ne.

Molekulární motory typu kinesin-14, které spojují dva mikrotubuly tím, že se na jeden z nich vážou dvě motorové domény a na druhý z nich nekatalytické vazebné místo, mají jednu zvláštnost, která se specificky projevuje na vzájemném pohybu



Obr. 3. Více vazebné kinesiny mohou přesunovat mikrotubuly. (a) Tetramerní kinesiny, jako je například kinesin-5, mají čtyři motorové domény (označené šachovnicí), pomocí kterých k sobě vážou dva mikrotubuly a vzájemně je posouvají. (b) Kinesin-14 má nekatalytické vazebné místo (označeno svislými pruhy), pomocí kterého se může pohybovat podél mikrotubulu jednodimenzionální difúzí. Kinesin-14 pak také může vzájemně posunovat mikrotubuly. Šipky naznačují směr pohybu motorových domén a nekatalytického vazebného místa.



Obr. 4. Antiparalelní mikrotubuly spojené kinesinem-14 se pohybují, zatímco paralelní jsou zablokovány. Šipky naznačují směr pohybu horního mikrotubulu. Motorové domény kinesinu-14 kráčí směrem k minusovému konci mikrotubulu, čímž posouvají mikrotubulus, se kterým interagují, opačným směrem, tj. jeho plusovým koncem vpřed. Mikrotubulus, se kterým interaguje nekatalytické vazebné místo, je posouván stejným směrem, kterým kráčí molekulární motor. Symetrické rozložení kinesinu-14 v překryvu mezi mikrotubuly (znázorněno ve spodní části obou panelů pomocí černého a šedého motoru) tedy vede k vzájemnému pohybu obou mikrotubulů pouze v případě jejich antiparalelního uspořádání (a). V případě paralelního uspořádání mikrotubulů (b) jsou síly motorů v rovnováze a oba mikrotubuly jsou zablokovány. Jestliže je symetrie rozložení motorů jakkoliv porušena (znázorněno v horní části obou panelů), dochází k vzájemnému pohybu mikrotubulů jak v případě antiparalelních (a), tak v případě paralelních mikrotubulů (b).

obou mikrotubulů a jejíž důsledky zatím nejsou zcela objasněny. Tato zvláštnost vyplývá z vlastností nekatalytického vazebného místa tohoto typu kinesinů, které se po navázání na mikrotubulus dokáže po jeho povrchu difúzně pohybovat (obr. 3b). Tato interakce je připisována elektrostatickým silám mezi záporně nabitým povrchem mikrotubulu a kladně nabitým oblastem na tomto nekatalytickém místě molekulárního motoru. Díky zmíněné elektrostatické interakci je energie nutná k úplné disociaci motoru z mikrotubulu a jeho uvolnění do roztoku mnohem větší než energie nutná ke krátkodobé částečné disociaci vedoucí pouze k přeskoku do vedlejšího vazebného místa na povrchu mikrotubulu [7]. Energetická bariéra mezi sousedními vazebnými místy je natolik nízká, že tuto jednodimenzionální difúzi podél mikrotubulu je možné pozorovat za běžných fyziologických teplot. Očekáváme, že molekulární motor, který je na jednom mikrotubulu zakotven tímto „kluzkým“ vazebným místem, není schopen přenést veškerou vyvíjenou sílu na druhý mikrotubulus, což zdánlivě snižuje jeho účinnost při přesouvání mikrotubulů. Domníváme se však, že to je právě tato vlastnost, která umožňuje souboru kinesinů-14 vzájemně posunovat mikrotubuly rychlostí dosahující až 100 nm/s [11], přestože rychlost jednoho motoru kinesinu-14 je přibližně desetkrát menší [8]. Objasnění tohoto zdánlivého rozporu je v současné době v centru pozornosti našeho výzkumu prováděného v Biotechnologickém ústavu AV ČR.

Molekulární motory a vyvíjené síly

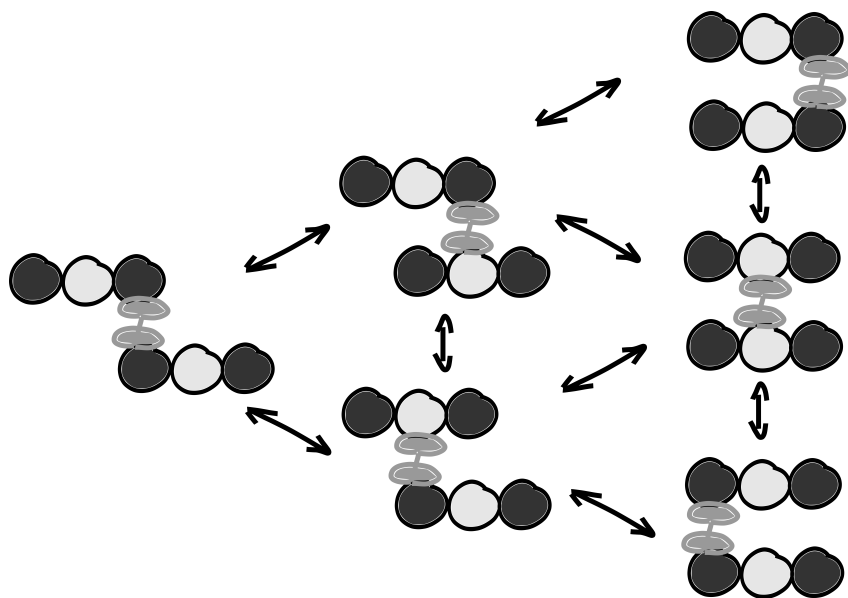
Rychlost molekulárního motoru není jeho jediná důležitá vlastnost. Další neméně důležitá charakteristika motoru je síla, kterou dokáže vyvinout. Typická maximální síla připadající na jeden molekulární motor je v řádu jednotek pikonewtonů [31]. Ukazuje se však, že tato síla pravděpodobně není způsobena výhradně konformační změnou spojenou s hydrolyzačním cyklem ATP. Změna volné energie spojená s touto konformační změnou byla měřením určena přibližně na 5 pN · nm [27]. Kinesin-1 se však jedním krokem dokáže pohnout na vzdálenost 8 nm proti vnější síle o velikosti až 7 pN. K vysvětlení tohoto rozporu přispěly týmy kolem Roberta Crosse a Toshio Yanagidy. Podařilo se jim ukázat, že při kráčení molekulárního motoru hrají značnou úlohu elektrostatické interakce a entropická asymetrie, daná polárností struktury mikrotubulu a motorové domény, které společně určují směr difúzního pohybu motorové domény během kroku [15], [32].

Velmi zřídka je do vnitrobuněčného transportu zapojen pouze jednotlivý molekulární motor. Většinou se jedná o společnou sílu vytvářenou souborem mnoha motorů. Dosud však není zcela jasné, jakým způsobem se celková síla vytváří a jak závisí na počtu zúčastněných motorů. Jedna z prvních prací, která se zabývá řešením tohoto problému, je publikace Kenya Furuty a kolektivu [13]. Její autoři použili velmi elegantní metodu, kterou byli schopni měřit sílu vyvinutou jedním až čtyřmi molekulárními motory. Ukázali tak, že celková vyvinutá síla závisí na strategii tvorby síly jednoho daného motoru. Zatímco celková síla procesivních kinesinů-1 byla na počtu motorů závislá jen velmi málo (jedna molekula kinesinu-1 dokáže vyvinout přibližně 7 pN, zatímco čtyři molekuly jen asi 7,5 pN), u neprocesivního kinesinu-14 byla celková síla mnohem více závislá na počtu zúčastněných motorů (změřit sílu vyvinutou jednou molekulou je technicky náročné, ale dvě molekuly vyvinou zhruba 0,5 pN a čtyři molekuly vyvinou až 1,5 pN).

Difuzní proteiny a přesouvání mikrotubulů

Viděli jsme, že difuzní vazebná místa a difuze proteinů podél mikrotubulů jsou důležité pro transport mikrotubulů pomocí molekulárních motorů. V buňce se ovšem vyskytují i proteiny, které mají dvě difuzní vazebná místa umožňující laterálně spojovat dva mikrotubuly, ale přitom se nechovají jako motory, tj. nedokáží hydrolyzovat ATP a tím využívat chemickou energii. Jedná se například o mikrotubulární svorky z proteinové rodiny MAP65/PRC1/Ase1 [16]. Ukazuje se, že i tyto svorky dokáží mikrotubuly cíleně přesouvat, přestože by na první pohled neměly být schopny s nimi pohybovat. Klíč k tomuto jevu spočívá právě v difuzní povaze jejich dvou vazebných míst a značném rozdílu mezi afinitami těchto proteinů pro jeden mikrotubulus a pro mikrotubuly dva. Tento rozdíl způsobuje, že proteinová svorka má po svém navázání do prostoru mezi dvěma mikrotubuly velmi malou pravděpodobnost tento prostor opustit [5]. Svorky proto zůstávají uzavřené v prostoru mezi mikrotubuly, ale zároveň vzhledem k difuzní povaze své vazby na mikrotubulus se dokáží v tomto prostoru pohybovat pomocí jednodimenzionální difuze, která je poháněna termální energií okolí. Tato souhra vlastností vede k podobnému efektu, jako když difundující částice plynu vytvářejí tlak na stěny nádoby, ve které jsou uzavřeny [21].

Co z tohoto jevu plyne pro mikrotubulární sítě? Představme si případ, kdy jsou svorky uzavřeny v překryvu mezi dvěma mikrotubuly, které se však nepřekrývají svojí celou délkou. V tomto případě každá termální fluktuace vzájemné polohy těchto dvou



Obr. 5. Entropické síly vzájemně posouvají mikrotubuly tak, aby byl maximalizován jejich překryv. Příklad jedné proteinové svorky uzavřené v překryvu mezi dvěma mikrotubuly o délce tří vazebných míst. Termální fluktuace převádí tento systém mezi jednotlivými stavy. Entropie systému stoupá s odhalováním dalších vazebných míst pro svorku, která je uzavřena v překryvu mezi mikrotubuly, tj. se vzrůstající délkou tohoto překryvu.

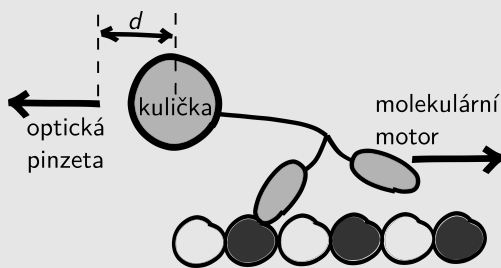
mikrotubulů bude měnit délku oblasti překryvu, kde se svorky mohou vyskytovat. Fluktuace, které délku překryvu zvětší, odhalí více vazebných míst na mikrotubulech, do kterých se může vázat dané množství svorek uzavřených mezi mikrotubuly. Stav s největším počtem možných konfigurací daného počtu svorek a vazebných míst na mikrotubulu, tj. stav s maximální entropií, nastává, když se oba mikrotubuly úplně překryjí (obr. 5) [24]. Tento entropický mechanismus tedy vždy vzájemně posouvá mikrotubuly tak, aby zaujaly postavení s maximálním možným překryvem [21].

Nejjednodušší model takovéto situace je analogií jednodimenzionálního ideálního plynu, kde jednotlivé částice plynu nahradíme difundujícími proteinovými svorkami. Pro ty pak bude platit vztah $FL = nk_{\text{B}}T$, kde n je počet svorek uzavřených v překryvu mezi mikrotubuly, L je délka překryvu mezi mikrotubuly, F je vyvíjená síla a $k_{\text{B}}T$ je Boltzmannův faktor. Tento jednoduchý model předpovídá, že síla je nepřímo úměrná délce překryvu mezi mikrotubuly. Pro typickou situaci, odpovídající deseti svorkám uzavřeným v překryvu o délce 100 nm, předpovídá sílu zhruba 0,5 pN. Experimentálně byl tento nárůst síly potvrzen a naměřené síly dosáhly až několika pikonewtonů [21], což jsou hodnoty postačující pro buněčné přeskupování. Kde v buňce se tyto síly mohou uplatnit, však zatím není zcela známo a je to jedna z otázek současného výzkumu.

Role třecích sil

Při výkladu mechanismů, jež vedou k přeskupování buněčného nitra, jsme zatím nevěnovali pozornost třecím silám. Pohyb cytoskeletálních proteinů podél cytoskeletál-

Manipulace jednotlivých molekul a měření sil. K měření sil, které vyvine jeden či více molekulárních motorů, se typicky používá optická pinzeta. Tento přístroj využívá radiačního tlaku zaostřeného laserového paprsku, pomocí kterého můžeme manipulovat s mikroobjekty, jakými typicky jsou skleněné nebo polystyrenové kuličky o průměru okolo jednoho mikrometru [1]. Patříčným zředěním můžeme navázat v průměru jeden molekulární motor na jednu kuličku, kterou pak umístíme pomocí pinzety do blízkosti mikrotubulu. Jakmile se motor naváže na mikrotubulus a začne podél něj kráčet, detekujeme vychýlení kuličky z centra zaostřeného laseru. Tato odchylka d je úměrná síle, kterou molekulární motor vyvíjí.



ních vláken, jako je například kráčení molekulárních motorů podél mikrotubulů nebo difuzní pohyb svorek mezi dvěma mikrotubuly, je však, stejně jako každý jiný mechanický systém, ovlivňován také třecími silami, které souvisí s tvorbou a zanikáním krátkodobých vazeb mezi oběma povrchy v kontaktu [4]. Vliv tření na funkci molekulárních motorů byl experimentálně zkoumán v přítomnosti ADP, kdy je motorová doména pouze slabě navázaná na mikrotubulus a u mnoha motorů se tudíž pohybuje difuzí podél povrchu mikrotubulu. Díky tomu, že pomocí optické mikroskopie lze přímo sledovat difuzi individuálních motorů, je možné charakterizovat tření mezi mikrotubulem a molekulárním motorem koeficientem γ , vypočteným pomocí Einsteina vztahu $D = k_B T / \gamma$, kde D je změřený difuzní koeficient motoru [10]. Typické hodnoty koeficientu tření mezi molekulárním motorem a povrchem mikrotubulu jsou v řádu jednotek $\mu\text{Ns/m}$. Při rychlostech obvyklých při přeskupování cytoskeletálních sítí, které jsou řádově $v \sim 100 \text{ nm/s}$, tedy dosahují třecí síly mezi jedním motorem a povrchem mikrotubulu, $F = \gamma v$, hodnoty kolem 0,1–10 pN [4], což není v cytoskeletálním kontextu zanedbatelné.

Tření ovlivňuje též entropickou tvorbu sil vyvolanou difundujícími mikrotubulárními svorkami. Výše jsme se věnovali silám vyvolaným skupinou proteinových svorek, které jsou uzavřeny v překryvu mezi dvěma mikrotubuly. Podle modelu ideálního plynu se síla vyvolávající vzájemný pohyb mikrotubulů lineárně zvyšuje se vzrůstajícím počtem svorek. S ním však také současně vzrůstá interakční plocha mezi povrchem mikrotubulu a svorkami a narůstá tření mezi těmito povrchy. Nejjednodušší model předpokládá lineární nárůst celkového koeficientu tření γ_{celk} s počtem svorek, $\gamma_{\text{celk}} = n\gamma$. V takovém případě, za použití modelu ideálního plynu k vyjádření síly, bude rychlost vzájemného pohybu mikrotubulů nezávislá na počtu svorek a bude se měnit pouze s délkou překryvu L podle vztahu $v = F / \gamma_{\text{celk}} = k_B T / L\gamma$. Experimentálně bylo zjištěno, že celkové tření vzrůstá s počtem svorek rychleji než lineárně, čímž se účinnost tohoto mechanismu ještě více snižuje [21]. Role třecích sil v přeskupování cytoskeletu je jedna z nejméně probádaných oblastí a bude velmi zajímavé sledovat další objevy na tomto poli.

Přeskupování cytoskeletálních sítí

V průběhu života buňky se její cytoskeletální síť přetváří tak, aby plnila nezbytné úkoly v daném stadiu buněčného cyklu. K tomuto přetváření slouží, mimo jiné, i mechanismy, které jsme stručně popsali v tomto článku. Jak tyto mechanismy působí dohromady a jak se vzájemně ovlivňují, aby došlo k správnému přetváření cytoskeletální sítě, je klíčová otázka, jejíž zodpovězení nám pomůže objasnit, jak fungují základní buněčné pochody, jako např. buněčné dělení, při kterém cytoskelet umožňuje rozdělit genetickou informaci rovnoměrně mezi obě dceřiné buňky [6]. V současné době jsme zatím velmi vzdáleni od pochopení tohoto komplexního systému a začínáme pouze chápat jednotlivé prvky tohoto spletitého aparátu.

Pro pokrok v této oblasti byl zcela zásadní vývoj experimentálních metod, k němuž došlo v posledních dvou desetiletích. To platí zejména o metodách umožňujících sledovat jednotlivé molekuly a manipulovat s nimi s možností současného měření sil, jako je vysoce citlivá fluorescenční mikroskopie a optická pinzeta [17], [23]. Kombinace těchto experimentálních metod a jejich aplikace na experimentální systémy, které

vytvoříme uměle ve zkumavce (*in vitro*) z několika molekul (z několika komponent daného systému) nám umožňuje zkoumat samouspořádávání těchto molekul a jejich vzájemnou souhru při plnění jejich úkolů. Zřejmě nejdůležitější fakt je, že takovéto skládání experimentálního systému *in vitro* nám dovoluje postupně budovat systémy se vzrůstající složitostí, za použití více a více stavebních kamenů — různých molekul. V současné době jsme schopni sestavit, prozkoumat a matematicky popsat systémy sestávající z několika málo prvků [5], [2], [20], [25], [9], [12], [28], [29]. Přírozeným dalším krokem bude tyto systémy dále zesložitovat postupným přidáváním dalších a dalších komponent. Je však otázka, jak komplexní systémy budeme schopni vytvořit *in vitro* a do jaké míry budou odrážet děje odehrávající se v žijícím organismu (*in vivo*). Ideální postup bude zřejmě kombinace *in vitro* experimentů s experimenty, ve kterých budeme perturbovat (geneticky, chemicky, mechanicky atd.) nativní *in vivo* systémy. Povahy tohoto problému a zejména fakt, že se jedná o systémy s mnoha komponentami, které jsou vzájemně propojeny a které se vzájemně regulují na mnoha úrovních, slibuje velmi zajímavý výhled do budoucna.

Poděkování. Autor by rád poděkoval prof. RNDr. Jaromíru Pláškoví, CSc., RNDr. Evě Žatecké, Ph.D., a RNDr. Tomáši Hendrychovi, Ph.D., za kritické poznámky a podnětné připomínky k obsahu tohoto textu.

L i t e r a t u r a

- [1] ASHKIN, A.: *Acceleration and trapping of particles by radiation pressure*. Phys. Rev. Lett. 24 (1970), 156–159.
- [2] BIELING, P., et al.: *A minimal midzone protein module controls formation and length of antiparallel microtubule overlaps*. Cell 142 (2010), 420–432.
- [3] BLANCHOIN, L., et al.: *Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility*. Physiol. Rev. 94 (2014), 235–263.
- [4] BORMUTH, V., et al.: *Protein friction limits diffusive and directed movements of kinesin motors on microtubules*. Science 325 (2009), 870–873.
- [5] BRAUN, M., et al.: *Adaptive braking by Ase1 prevents overlapping microtubules from sliding completely apart*. Nat. Cell Biol. 13 (2011), 1259–1264.
- [6] CIVELEKOGLU-SCHOLEY, G., SCHOLEY, J. M.: *Mitotic force generators and chromosome segregation*. Cell. Mol. Life Sci. 67 (2010), 2231–2250.
- [7] COOPER, J. R., WORDEMAN, L.: *The diffusive interaction of microtubule binding proteins*. Curr. Opin. Cell Biol. 21 (2009), 68–73.
- [8] DECASTRO, M. J., et al.: *Working strokes by single molecules of the kinesin-related microtubule motor ncd*. Nat. Cell Biol. 2 (2000), 724–729.
- [9] DUELLBERG, C., et al.: *Reconstitution of a hierarchical +TIP interaction network controlling microtubule end tracking of dynein*. Nat. Cell Biol. 16 (2014), 804–811.
- [10] EINSTEIN, A.: *Zur Theorie der Brownschen Bewegung*. Ann. Phys. 19 (1906), 371–381.
- [11] FINK, G., et al.: *The mitotic kinesin-14 Ncd drives directional microtubule-microtubule sliding*. Nat. Cell Biol. 11 (2009), 717–723.

- [12] FINK, G., LÖWE, J.: *Reconstitution of a prokaryotic minus end-tracking system using TubRC centromeric complexes and tubulin-like protein TubZ filaments*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *112* (2015), 1845–1850.
- [13] FURUTA, K., et al.: *Measuring collective transport by defined numbers of processive and nonprocessive kinesin motors*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *110* (2012), 501–506.
- [14] GARDNER, M. K., et al.: *Microtubule catastrophe and rescue*. Curr. Opin. Cell Biol. *25* (2013), 14–22.
- [15] GRANT, B. J., et al.: *Electrostatically biased binding of kinesin to microtubules*. PLoS Biol. *9* (2011), e1001207.
- [16] JANSON, M. E., et al.: *Crosslinkers and motors organize dynamic microtubules to form stable bipolar arrays in fission yeast*. Cell *128* (2007), 357–368.
- [17] JOO, C., et al.: *Advances in single-molecule fluorescence methods for molecular biology*. Annu. Rev. Biochem. *77* (2008), 51–76.
- [18] KAPITEIN, L. C., et al.: *The bipolar mitotic kinesin Eg5 moves on both microtubules that it crosslinks*. Nature *435* (2005), 114–118.
- [19] LAAN, L., et al.: *Force-generation and dynamic instability of microtubule bundles*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *105* (2008), 8920–8925.
- [20] LAAN, L., et al.: *Cortical dynein controls microtubule dynamics to generate pulling forces that position microtubule asters*. Cell *148* (2012), 502–514.
- [21] LANSKY, Z., et al.: *Diffusible crosslinkers generate directed forces in microtubule networks*. Cell *160* (2015), 1159–1168.
- [22] MITCHISON, T. J., KIRSCHNER, M. W.: *Dynamic instability of microtubule growth*. Nature *312* (1984), 237–242.
- [23] MOFFITT, J. R., et al.: *Recent advances in optical tweezers*. Annu. Rev. Biochem. *77* (2008), 205–228.
- [24] ODDE, D. J.: *Mitosis, diffusible crosslinkers, and the ideal gas law*. Cell *160* (2015), 1041–1043.
- [25] OSAWA, M., et al.: *Reconstitution of contractile FtsZ rings in liposomes*. Science *320* (2008), 792–794.
- [26] POWERS, A. F., et al.: *The Ndc80 kinetochore complex forms load-bearing attachments to dynamic microtubule tips via biased diffusion*. Cell *136* (2009), 865–875.
- [27] RICE, S., et al.: *Thermodynamic properties of the kinesin neck-region docking to the catalytic core*. Biophys. J. *84* (2003), 1844–1854.
- [28] ROBERTS, A. J., et al.: *Reconstitution of dynein transport to the microtubule plus end by kinesin*. Elife *3* (2014), e02641.
- [29] SUBRAMANIAN, R., et al.: *Marking and measuring single microtubules by PRC1 and Kinesin-4*. Cell *154* (2013), 377–390.
- [30] SUBRAMANIAN, R., KAPOOR, T. M.: *Building complexity?: Insights into self-organized assembly of microtubule-based architectures*. Dev. Cell *23* (2012), 874–885.
- [31] SVOBODA, K., BLOCK, S. M.: *Force and velocity measured for single kinesin molecules*. Cell *77* (1994), 773–784.
- [32] TANIGUCHI, Y., et al.: *Entropy rectifies the Brownian steps of kinesin*. Nat. Chem. Biol. *1* (2005), 342–347.

- [33] THOMPSON, R. E., et al.: *Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes*. Biophys. J. 82 (2002), 2775–2783.
- [34] VALE, R. D., MILLIGAN, R.: *The way things move: looking under the hood of molecular motor proteins*. Science 288 (2000), 88–95.
- [35] VERBRUGGE, S., et al.: *Kinesin's step dissected with single-motor FRET*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106 (2009), 17741–17746.
- [36] YILDIZ, A., et al.: *Myosin V walks hand-over-hand: single fluorophore imaging with 1.5-nm localization*. Science 300 (2003), 2061–2065.
- [37] YILDIZ, A., et al.: *Kinesin walks hand-over-hand*. Science 303 (2004), 676–678.

Poznámka redakce:

V živých buňkách existuje řada molekulových strojů nanometrových rozměrů, které dokáží měnit chemickou energii na mechanický pohyb. Krácející proteiny z článku Zdeňka Lánského jsou toho skvělým příkladem.

Již proslulý nositel Nobelovy ceny za fyziku Richard Feynman v jedné ze svých přednášek v roce 1984 předpověděl, že časem bude možné vytvářet prakticky použitelné molekulové stroje. Jeho vize se naplnila a letošní Nobelovu cenu za chemii obdrželi Jean-Pierre Sauvage, Sir J. Fraser Stoddart a Bernard L. Feringa za výzkum, jenž umožnil syntézu molekulových komplexů, které se již chovají jako molekulové stroje.

Základní charakteristiku molekulového stroje představuje existence několika podjednotek molekulového komplexu, které se vůči sobě mohou navzájem pohybovat. Prvnímu z laureátů se podařilo najít způsob, jak připravovat řetízky prstencových molekul zvané katenany. Sir J. Fraser Stoddart připravil rotaxeny — na podlouhlou nápravu navlékl molekulové prstence, s nimiž dokázal definovaným způsobem pohybovat. B. L. Feringa syntetizoval molekuly tvořené dvěma planárními strukturami spojenými dvojnou vazbou, které dokáží vůči sobě rotovat rychlostí až $12 \cdot 10^6$ otáček za sekundu při pohánění pulzy UV záření.

Práce oceněné Nobelovou cenou otevřely cestu k sestavování mnoha dalších jednoduchých strojů, jako jsou klouby, ložiska, táhla, páky nebo spínače. Podrobněji se tomuto tématu budeme věnovat v některém z dalších čísel PMFA.