

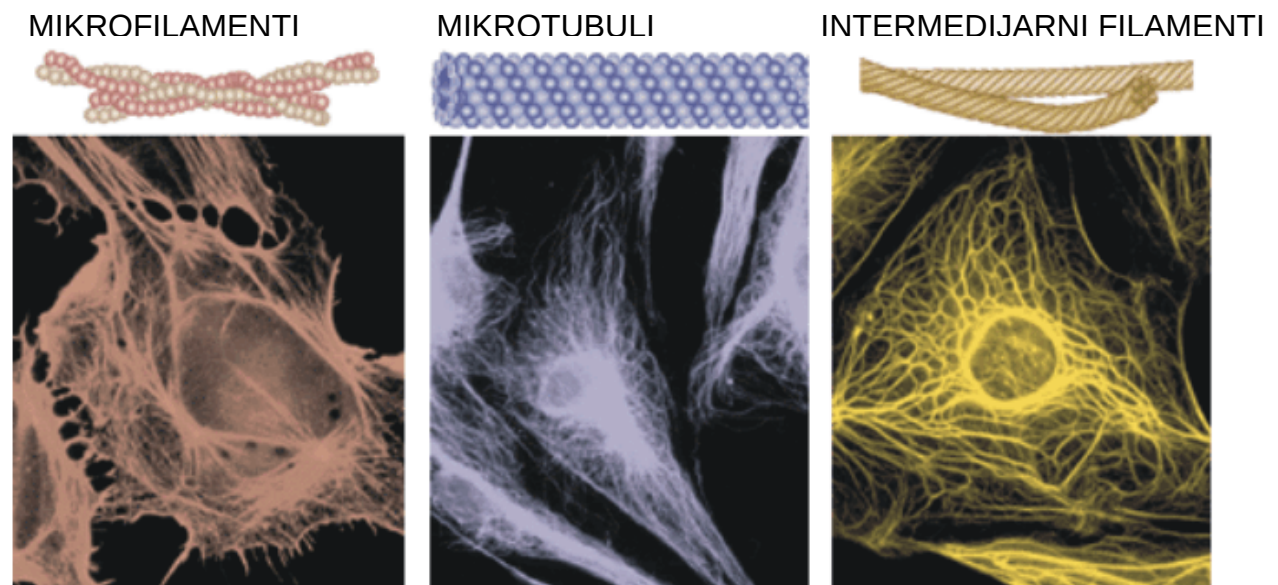
MEHANIKA STANIČNOG SKELETA

Igor Weber

Zavod za molekularnu biologiju, Institut Ruđer Bošković, Zagreb

UVOD

Stanice živih bića su osnovne jedinice žive tvari, svojevrsni atomi života. Velik dio stanica životinja i mikroorganizama (bakterija i praživotinja) je, barem u dijelu svog životnog ciklusa, pokretljivo. Kretanje stanica ovisno je o sustavu unutarstaničnih nitastih proteinskih tvorbi koje tvore tzv. stanični skelet ili citoskelet. Niti, ili filamenti, citoskeleta dijele se u tri skupine: mikrofilamente, koji se sastoje od kuglastog proteina aktina, mikrotubule, koji se sastoje od tubulina, te intermedijarne filamente, kojih ima različitih vrsta i sastoje se od spiralno namotanih proteina međusobno slične molekulske građe (Slika 1). To su kabeli, cijevi i konopci staničnog skeleta.



Slika 1. Nitasti sastojci staničnog skeleta: mikrofilamenti, mikrotubuli i intermedijarni filamenti.

Stanično kretanje od odlučujuće je važnosti u mnogim fazama razvoja i života živih bića, pa tako i čovjeka. U embrionalnom razvoju različite grupe stanica aktivno migriraju u posebna područja embrija, i kasnije zametka, i time tvore nakupine istovrsnih stanice koje se razvijaju u zasebna tkiva i organe. Tijekom razvoja čovječjeg mozga, kontakti između živčanih stanica, ili neurona, stalno se iznova stvaraju kretanjem posebnih neuronskih izdanaka i tako stvaraju nove strukture unutar mozga, koje tvore temelj misaonih procesa. Obrana organizma od škodljivih mikroorganizama temelji se na aktivnosti bijelih krvnih stanica, leukocita, koje stalno patroliraju krvnim sustavom i spremne su vrlo brzo reagirati i efikasno se kretati prema mjestu infekcije. Zacijeljivanje rana također se temelji na kretanju posebnih stanica koje doslovce prekriju mjesto ozljede poput flastera. Na žalost, stanično kretanje je odgovorno i za vrlo opasan poremećaj u ponašanju stanica, naime za pojavu metastaza u razvoju zloćudnih tumora.

Iz ovih je primjera jasno da proučavanje temeljnih mehanizama staničnog kretanja, koje je ovisno o staničnom skeletu, može dovesti i do boljeg razumijevanja mnogih važnih medicinskih procesa i poremećaja.

SILE U SVIJETU STANICA

Prije negoli se osvrnemo na ulogu citoskeleta u kretanju stanica, razmotrimo u kakvom se okruženju stanice kreću. Newtonov prvi zakon kretanja tvrdi da tijelo na koje ne djeluje vanjska sila ostaje u stanju mirovanja ili kretanja konstantnom brzinom (zakon inercije). Taj zakon vrijedi, međutim, u odsutnosti vanjskog otpora ili trenja, dakle u vakuumu. Na tijela uronjena u neku tekućinu ili plin djeluje sila otpora koja je, općenito uzevši, razmjerna brzini njihovog kretanja. Ta se sila naziva viskozna sila. Prirodu kretanja odrediti će omjer inercijalnih i viskoznih sila koje djeluju na neko tijelo. Taj se omjer može izraziti pomoću Reynoldsovog broja:

$$R = F_i/F_v = Lvp/\eta$$

gdje je L (m) najveća linearna dimenzija predmeta, v (m/s) brzina, ρ (kg/m³) gustoća tekućine, te η (Pa s) viskoznost tekućine. U slučaju bakterije koja se kreće kroz vodu brzinom od 10 $\mu\text{m/s}$, R je reda veličine 10^{-5} . Inače je taj broj od važnosti u hidrodinamici, gdje određuje granicu između laminarnog i turbulentnog tijeka tekućina.

Koliko će se dugo kretati bakterija kroz vodu ako se prestane aktivno pokretati, ($F=0$), i kako daleko će stići?

Da bismo odgovorili na ovo pitanje, moramo pogledati kako izgleda jednačba gibanja za tijelo uronjeno u tekućinu. Razmotrimo tri vrste sila: inercijalne, elastične i viskozne (Slika 2).

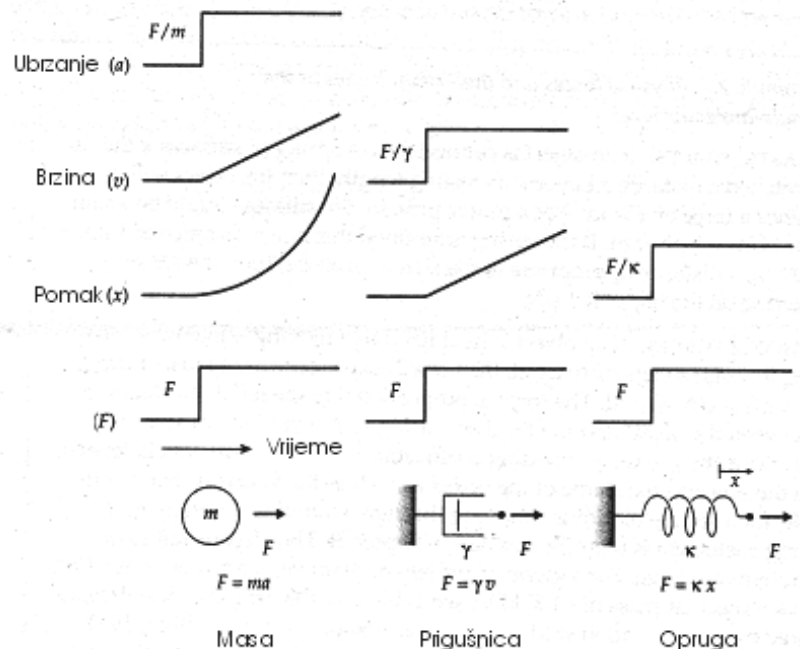
Za slučaj bakterije vrijedi:

$$m \, dv/dt + \gamma v = F.$$

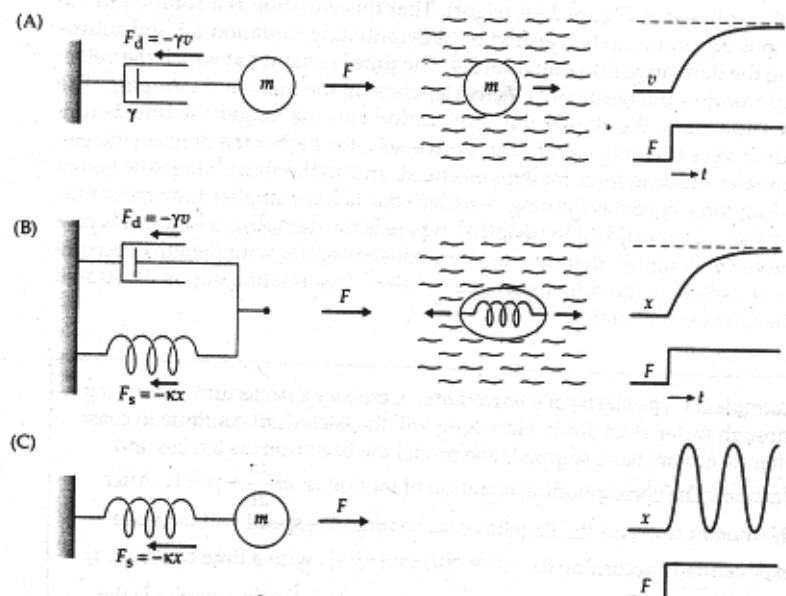
Rješenje ima oblik:

$$v(t) = F/\gamma [1 - e^{(-t/\tau)}], \quad \tau = m/\gamma.$$

Koeficijent otpora γ ovisi o viskoznosti tekućine kao i o geometriji tijela. Na primjer, za kuglu radijusa r on iznosi $\gamma = 6\pi\eta r$. Na slici 3A vidi se da tijelo koje kreće iz mirovanja ubrzava sve dok ne postigne određenu konačnu brzinu F/γ .



Slika 2. Inercijalne, viskozne i elastične sile.



Slika 3. Kombinirano djelovanje sila.

Karakteristično vrijeme potrebno da brzina postigne otprilike dvije trećine te brzine ($1-e^{-1}$) iznosi $\tau=m/\gamma$. Masa je proporcionalna volumenu (L^3), dok je koeficijent otpora proporcionalan L , tako da je karakteristično vrijeme τ proporcionalno L^2 .

Ono postaje vrlo kratko za tijela malih dimenzija. Za bakteriju koja se trenutno prestane aktivno pokretati, τ će iznositi oko $0.2 \mu s$. Ako je imala početnu brzinu $v(0)=25 \mu m/s$, prijeći će put od $5 \mu m$, što je manje od dimenzija jedne molekule vode.

Sila

U svijetu mikroorganizama inercija ne igra praktički nikakvu ulogu. Ondje vrijedi pred-Newtonovska, Aristotelova fizika!

MEHANIČKA SVOJSTVA NITI CITOSKELETA

Slika 4. Podkritično i nadkritično prigušenje.

Zanimljivo je razmotriti slučaj istovremenog djelovanja elastičnih i viskoznih sila (Slika 3B). Taj je model značajan za modeliranje globalnih promjena oblika, ili konformacijskih promjena, proteina u njihovom prirodnom okruženju, vodenoj otopini. Jednadžba gibanja je u tom slučaju:

$$\gamma \frac{dx}{dt} + \kappa x =$$

F.

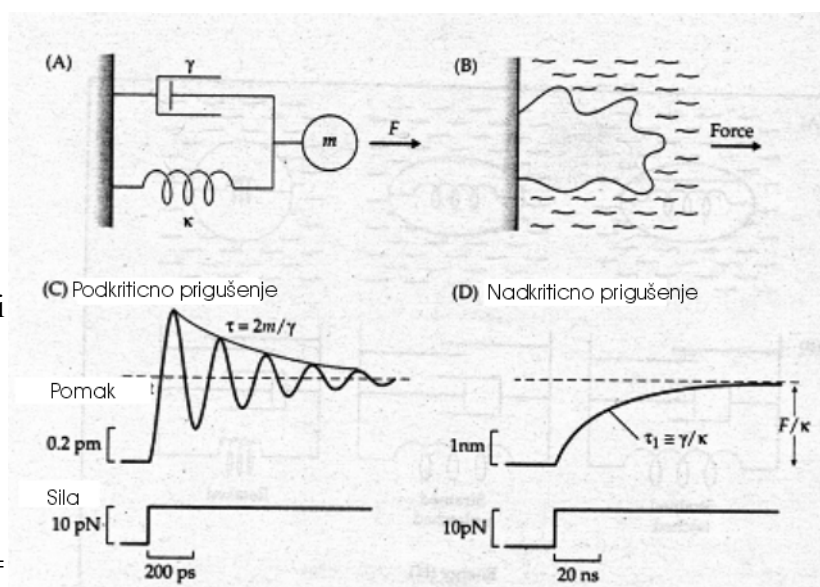
Rješenje ima oblik:

$$x(t) = F/\kappa [1 - e^{-(t/\tau)}], \quad \tau = \gamma/\kappa.$$

Vidimo da u ovom slučaju rješenje za pomak x ima isti oblik kao rješenje za brzinu v u prethodnom primjeru. Vremenska skala konformacijskih promjena proteina koja se dobije ovakvim modelom leži u području 10-100 ns.

Proteini imaju svojstvo elastičnosti. Dijelovi proteina i skupina proteina međusobno su povezani kemijskim vezama koje vibriraju. Potpuni model za promjenu oblika proteina u vodenim otopinama uključuje elastičnu, viskoznu i inercijalnu komponentu. Kvalitativno ponašanje ovakvog sustava ovisi o omjeru $\gamma^2/4m\kappa$. Ukoliko je

$$\gamma^2 < 4m\kappa$$

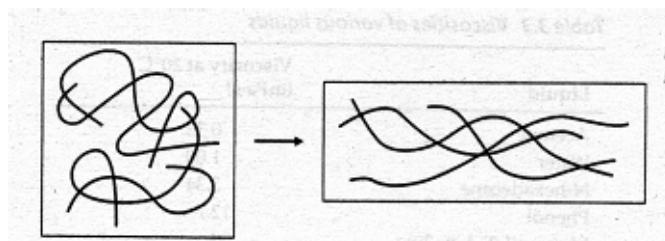


kretanje je oscilatorno, međutim amplituda oscilacija polako trne. Radi se o podkritičnom prigušenju (Slika 4C). Ukoliko, naprotiv, vrijedi $\gamma^2 > 4m\kappa$, gibanje postaje monotono nalik na slučaj prikazan na slici 3B. Radi se o nadkritičnom prigušenju (Slika 4D). Kretanja proteina su nadkritično prigušena. Primjerice, za protein miozin vrijedi $m = 160 \times 10^{-24}$ kg, $\gamma = 60$ pN·s/m, te $\kappa = 4$ pN/nm, tako da prije spomenuti omjer iznosi oko 1400. Spoznaja da su pobuđenja proteina i stanica nadkritično prigušena isključuju nadri-znanstvene ideje o „rezonantnom odzivu“ žive tvari na kojekakve oscilirajuće signale.

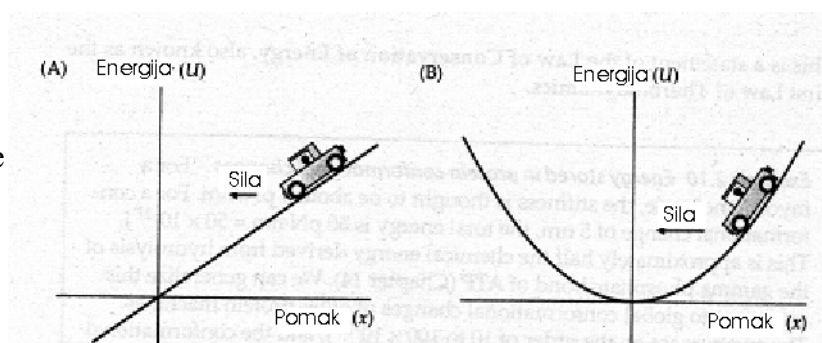
Elastičnost dugih, lančastih molekula, poput niti citoskeleta, ima drugačije porijeklo od elastičnosti krutih tvari. To je takozvana gumena elastičnost, jer elastičnost gume počiva na istom principu (Slika 5). Elastičnost gume naziva se još i entropijskom elastičnošću, jer lančaste molekule imaju svojstvo da se svijaju pod utjecajem termalnih sila, isto kao što se npr. molekule plina spontano kreću zbog termalnog pobuđenja. Mjera neuređenosti sustava naziva se entropija i proporcionalna je logaritmu broja stupnjeva slobode u sustavu. Zanimljivo je da se entropijska elastičnost može matematički opisati pomoću harmoničkog potencijala (Slika 6), kao i elastičnost čvrstih tijela, iako potonja ima drugačiju osnovu. U čvrstim tijelima, međumolekulske sile imaju takav oblik da postoji ravnotežna udaljenost između molekula na kojoj je potencijalna energija međudjelovanja minimalna (Slika 7). Poveća li se ili smanji ta udaljenost, molekule će početi oscilirati oko svojih ravnotežnih položaja. Isto tako postoji i ravnotežna udaljenost krajeva dugačkih, smotanih, lančastih molekula. Deformacija gumastog tijela uzrokovat će sličnu, elastičnu deformaciju. Entropijska elastičnost ima zanimljivo svojstvo da koeficijent elastičnosti takvih tijela ili otopina raste s temperaturom. Takvo ponašanje je povezano s činjenicom da je na višoj temperaturi svijanje lančastih molekula pod utjecajem termalnih sila jače pobuđeno.

Odlučni utjecaj na to u kojoj mjeri će određena lančasta molekula biti smotana ima njena čvrstoća, tj. otpor prema svijanju. Čvrstoća je svojstvo materijala od kojeg je određena nit napravljena i uobičajeno se izražava pomoću karakteristične konstante materijala, Youngovog modula (E). Čvrstoća većine proteina odgovara čvrstoći tvrde plastike, npr. Plexiglasa. Konstanta elastičnosti u odnosu na svijanje ravnih greda iznosi

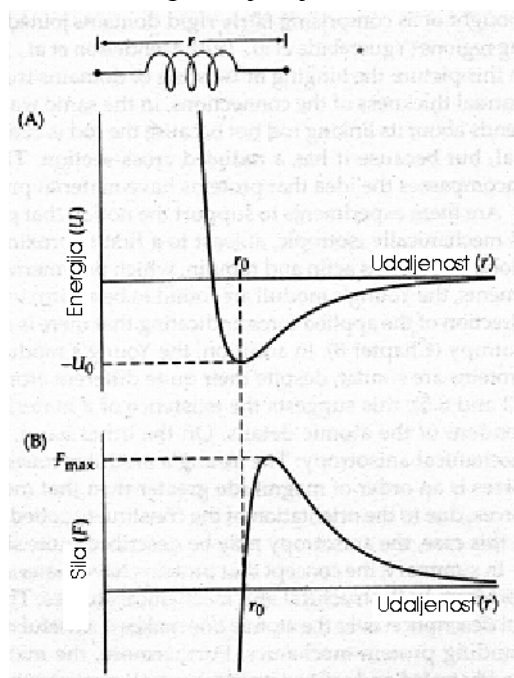
$$\kappa = 3EI / L^3$$



Slika 5. Elastičnost gume.

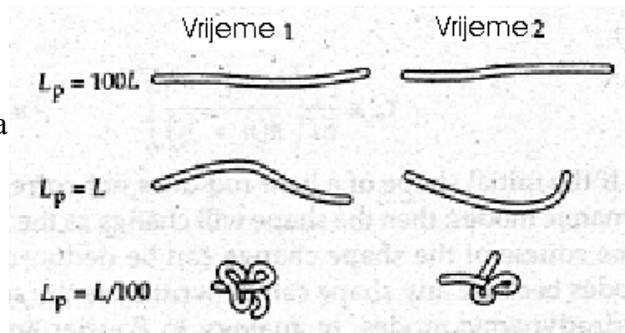


Slika 6. Potencijalna energija za: (A) stalnu silu i (B) silu ovisnu o pomaku, tj. harmonički potencijal.



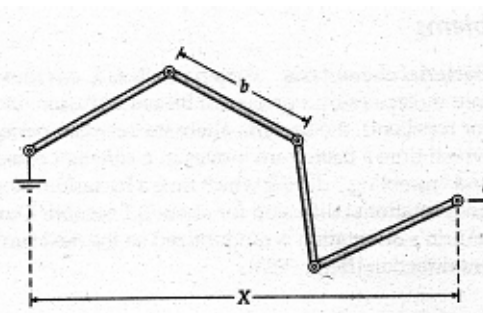
gdje je E Youngov modul (Pa), I geometrijski faktor koji ovisi i obliku poprečnog presjeka grede, a L duljina grede. Vidimo da otpor prema svijanju naglo opada s duljinom grede. Npr., mikrotubuli imaju vrijednost koeficijenta čvrstoće prema svijanju $EI=30 \times 10^{-24} \text{ Nm}^2$, što za mikrotubul duljine $10 \text{ }\mu\text{m}$ daje $\kappa = 10^{-7} \text{ N/m}$. Da bi se kraj takvog mikrotubula savio za $1 \text{ }\mu\text{m}$ potrebna je vrlo mala sila od samo 0.1 pN . Aktinski mikrofilamenti su tri reda veličine savitljiviji od mikrotubula.

Filamenti citoskeleta su, kako vidimo, vrlo savitljivi i kao takvi su podložni termalnim fluktuacijama svog oblika. Veličina koja određuje otpor filameta prema termalnom svijanju naziva se duljina perzistencije i iznosi $L_p = EI / kT$, gdje je k Boltzmanova konstanta ($k = 1.38 \times 10^{-23} \text{ J/K}$). Količina energije kT je uobičajena mjera za termalnu energiju na određenoj apsolutnoj temperaturi T , tako da je L_p ekvivalentna omjeru otpora nekog filameta prema svijanju i energije termalnog pobuđenja koje ga nastoji saviti (Slika 8). Drugačija interpretacija duljine perzistencije je da je to ona duljina na kojoj smjerovi tangenti određenog svinutog filameta postaju nekorelirani. To znači da je za dvije točke međusobno udaljene L_p vjerojatnost bilo kojeg kuta između pripadnih tangenti jednaka. L_p aktinskih vlakana iznosi oko $15 \text{ }\mu\text{m}$, a mikrotubula oko 6 mm , u skladu s njihovom znatno većom čvrstoćom.



Slika 8. Duljina perzistencije.

Razmatranje mehaničkih svojstava filamenata zaključiti ćemo osvrtnom na tzv. slobodno povezani lanac (Slika 9). To je lanac čiji su segmenti duljine b međusobno povezani potpuno savitljivim zglobovima. Takav lanac ima svojstva entropijske elastičnosti i može se izračunati njegov elastični koeficijent koji za male sile razvlačenja ili sabijanja iznosi $3kT/nb^2$, gdje je n broj segmenata u lancu. Vidimo da će lanac biti to savitljiviji što ima više segmenata i što su oni duži.



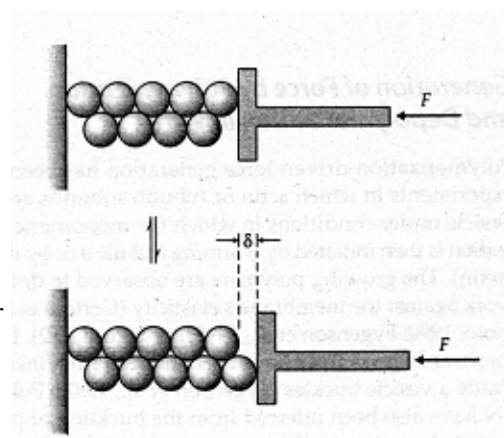
Slika 9. Slobodno povezani lanac.

MOLEKULARNI MOTORI

U dosadašnjem razmatranju opisali smo pasivna mehanička svojstva niti citoskeleta koja, uz staničnu membranu, uvelike određuju mehanička svojstva živih stanica. Međutim, aktinski mikrofilamenti igraju glavnu ulogu i u mehanizmu pokretanja stanice. Naime, mikrofilamenti nisu niti stalne duljine, već se stalno razgrađuju i ponovno izgrađuju od svojih elementarnih građevnih elemenata, kuglastih molekula proteina aktina. Proces dodavanja i odvajanja pojedinačnih molekula postojećem filamentu nazivaju se polimerizacijom i depolimerizacijom. Ukoliko se kraj mikrofilamenta koji se polimerizira, tj. produljuje, nađe u blizini lipidne membrane koja omeđuje stanicu, taj proces može proizvesti silu koja gura membranu, a time i pokreće stanicu prema naprijed (Slika 10). To je jedan od temeljnih mehanizama staničnog kretanja.

Određivanje veličine sile polimerizacije uključuje argumente iz kinetike kemijskih reakcija i statističke fizike. U ravnoteži, ona iznosi

$$F = kT/\delta \ln([A]/K_c),$$



Slika 10. Sila polimerizacije aktina.

gdje je A koncentracija monomera aktina u otopini, a K_c tzv. kritična koncentracija aktina pri kojoj su procesi polimerizacije uravnoteženi, odnosno jednako vjerojatni.

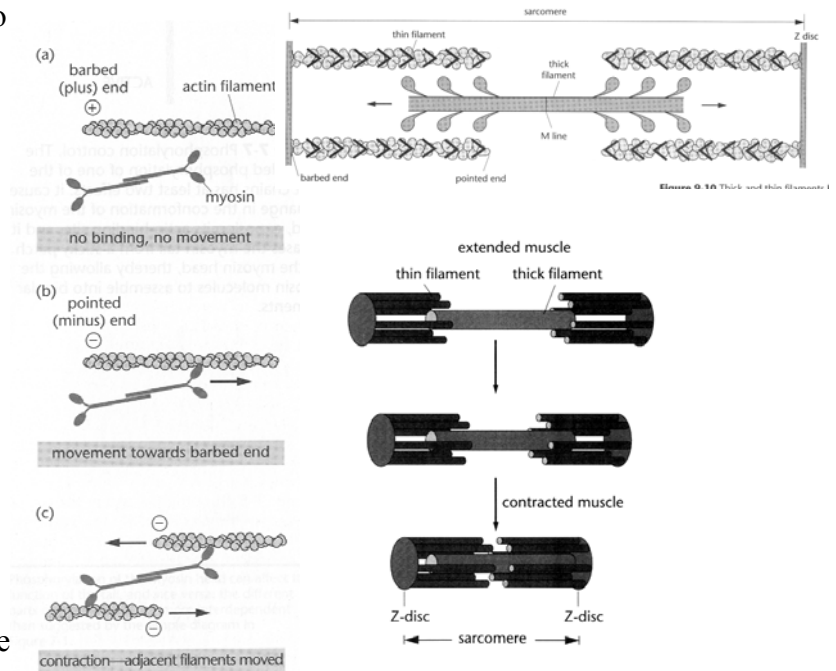
Vidimo da će sila polimerizacije biti to veća što je veća koncentracija aktinskih molekula koje se mogu ugraditi u procjep između rastućeg kraja filameta i membrane. Sila polimerizacije mikrofilameta uz koncentraciju monomera aktina sto puta veću od kritične iznosi oko 7 pN.

Međutim, kako nastaje procjep u koji se dodatne aktinske molekule mogu ugraditi? Odgovor na to pitanje daje tzv. model Brownovog rovaša.

Taj model postulira da termalne fluktuacije membrane, a i one elastičnog filameta o kojima je bilo riječi ranije, omogućuju stvaranje prostora između dviju struktura dovoljno velikog za ugradnju molekule aktina. Naziv rovaš dolazi od efekta nalik na ispravljanje, ili

iskorištavanje termičkih fluktuacija

za pokretanje usmjerenog procesa, u ovom slučaju deformacije stanične membrane. Sila polimerizacije je primjer u kojem kombinacija nasumičnih procesa, termalnih fluktuacija i difuzije molekula, može proizvoditi silu.



Slika 11. Mehanizam kontrakcije mišića.

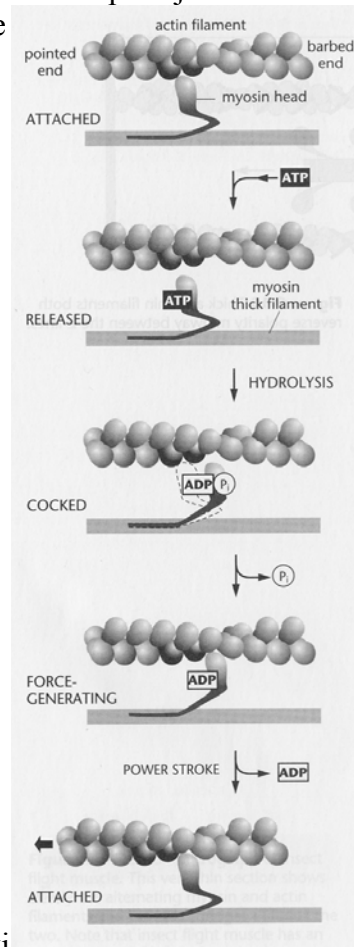
Primjer u kojem se kemijska energija direktno pretvara u mehaničku predstavljaju proteini-motori. Ti proteini pretvaraju energiju energetski bogatih kovalentnih veza u konformacijsku promjenu proteinske strukture, čime se ona sprema u obliku potencijalne elastične energije. Ta se energija zatim oslobađa u tijeku interakcije proteina-motora s nitima citoskeleta, čime se uzrokuje njihovo međusobno kretanje. Uz svaki od filamentoznih sustava vezani su specijalizirani motorni proteini, uz mikrotubule kinezin i dinein, a uz mikrofilamente miozin. Kontrakcija snopova aktinskih niti (tanki filamenti) uzrokovana aktivnošću miozinskih snopova (debeli filamenti) u osnovi je stezanja mišićnih vlakana. Na slici 11 prikazana su tri stupnja organizacije mišićnih vlakana. Molekula miozina sastoji se od dugačkog „repa“ na čijem su jednom kraju nalaze dvije „glave“. Dok glave igraju ulogu motora, miozinske molekule se mogu vezati u snopove pomoću repova. Miozin se po aktinskoj niti kreće samo u jednom smjeru, prema takozvanom plus-kraju. Kada se molekule miozina u debelom filamentu kreću u suprotnim smjerovima a pričvršćene su uz aktinske niti, uzrokovat će relativno nasuprotno gibanje tih niti. Osnovni građevni element mišićnog vlakna, sarkomera, sastoji se od centralnog debelog filameta i postraničnih mikrofilamenata koji su učvršćeni na krajevima. U slučaju pobuđenja mišića, dolazi do relativnog klizanja debelih i tankih filamenata i mišić se grči tj. kontrahira.

Direktnu pretvorbu kemijske energije u mehaničku nije zasada uspio provesti niti jedan motor kojega je izradio čovjek. To se pokušava napraviti u području istraživanja nanotehnologije, gdje se posebnim postupcima mogu proizvoditi molekularne naprave reda veličine nanometara. Stupanj iskoristivosti energije u bioloških proteinskih motora iznosi

otprilike 50%. Sile koje oni proizvode iznose nekoliko pN, a pomaci iznose nekoliko nm. Sila od jednog pN odgovara otprilike težini jednog crvenog krvnog zrnca.

Između glave i repa molekule miozina nalazi se savitljivo područje, ili domena, koja omogućuje međusobno zakretanje tih dviju postraničnih domena. Mala promjena molekulske konformacije u tom području uzrokovana pretvorbom molekule ATP-a u ADP, prenosi se principom poluge na mnogo veću globalnu promjenu međusobne orijentacije glave i repa. Glava rotira oko 30° u odnosu na rep. Tako miozin djeluje kao molekulska poluga. Detalji ciklusa kretanja miozina po aktinskoj niti prikazani su na slici 12.

Razlika u interakciji različitih proteinskih motora sa svojim pripadnim nitima uzrokovana je prvenstveno različitim geometrijim, odnosno periodičnom građom mikrotubula i mikrofilamenata. Periodičnost mikrotubula (8 nm) je mnogo manja od one mikrofilamenata (37 nm) i usporediva je s duljinom koraka proteina kinezina, tako da se taj dvoglavi protein može sam kretati po niti tako da je u svakom trenutku jedna od glava, tj. motornih domena, u kontaktu s mikrotubulom. Kinezin se stoga može sam kontinuirano kretati uzduž mikrotubula i njegovo kretanje se može usporediti s hodanjem. Miozin, naprotiv, ne može prekoračiti između dva ekvivalentna vezajuća mjesta, pa zbog toga ovi proteini moraju djelovati u skupinama, gdje se u svakom trenutku poneka miozinska glava nalazi u optimalnom položaju za vezanje na aktinsku nit i njeno pokretanje. Kako pojedinačne glave molekula miozina provode u kontaktu s aktinskom niti puno manje vremena od molekula kinezina, možemo ih usporediti s trkačima koji dio puta prenesu kolege trkači. Ako upotrijebimo usporedbu s motorima s unutrašnjim izgaranjem, dok bi dvoglavi kinezin odgovarao dvocilindričnom motoru, miozinski filament bi imao toliko cilindara koliko glava sadrži.



Slika 12. Kretanje miozina po aktinskoj niti.

ZAKLJUČAK

Na kraju treba istaknuti da se kretanje stanica, posebice stanica višestaničnih životinja, uvelike razlikuje od kretanja makroskopskih krutih tijela na koje smo navikli u svakodnevnom iskustvu. Ne samo da je poredak važnosti sila obrnut od uobičajenog, već stanice imaju svojstva mekih, savitljivih tijela koja im omogućuju da pri kretanju mijenjaju oblik. Pojedini dijelovi stanice kreću se neovisno jedan o drugome. Na primjer, dok se jedan dio stanice može širiti prema naprijed djelovanjem aktinskog polimerizacijskog „motora“, drugi se dio može povlačiti u sebe uz pomoć kontrakcije miozinskih filamenata. Međusobno kretanje unutarstaničnih struktura moguće je pretvoriti u kretanje čitave stanice. Međutim, da bi se čitava stanica usmjereno kretala, različite aktivnosti u raznim dijelovima stanice moraju biti usklađene jedna s drugom. Stanična biologija bavi se proučavanjem biokemijskih i biofizičkih mehanizama na kojima počiva unutrašnja organizacija stanica živih bića. Regulaciju aktivnosti unutar staničnog skeleta moguće je potpunije razumjeti tek u kontekstu mnogobrojnih procesa koji se istovremeno odvijaju u stanici.

